

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA**

ALBERY MARTINS E SILVA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA HIPÓXIA E ANÓXIA DURANTE O CRESCIMENTO
MICELIAL DE *METARHIZIUM ROBERTSII* NA TOLERÂNCIA A ESTRESSES DE
CONÍDIOS E REGULAÇÃO DE GENES**

**STUDY OF THE EFFECTS OF HYPOXIA AND TRANSITORY ANOXIA DURING
MYCELIAL GROWTH OF *METARHIZIUM ROBERTSII* ON CONIDIAL STRESS
TOLERANCE AND GENE REGULATION**

São Paulo – SP

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

ALBERY MARTINS E SILVA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA HIPÓXIA E ANÓXIA DURANTE O CRESCIMENTO
MICELIAL DE *METARHIZIUM ROBERTSII* NA TOLERÂNCIA A ESTRESSES DE
CONÍDIOS E REGULAÇÃO DE GENES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof. Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel
Orientador

São Paulo – SP
2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

M341e MARTINS e SILVA, Albery.

Estudo dos efeitos da hipóxia e anóxia durante o crescimento micelial de *Metarhizium Robertsii* na tolerância a estresses de conídios e regulação de genes / Albery Martins e Silva. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2022.

60 f.: il. color.

Tese de Doutorado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel.

1. Fungos Entomopatogênicos. 2. Hipóxia. 3. Anóxia. 4. Estresses. 5. Adaptação. I. Rangel, Drauzio Eduardo Naretto. II. Título.

CDD 620.82



TERMO DE APROVAÇÃO

ALBERY MARTINS E SILVA

“ESTUDOS DOS EFEITOS DA HIPOXIA E ANOXIA DURANTE O CRESCIMENTO MICELIAL DE METARHIZIUM ROBERTSII NA TOLERÂNCIA A ESTRESSES DE CONÍDIOS E REGULAÇÃO DE GENES”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof(a). Dr(a) Drauzio Eduardo Naretto Rangel (presidente-orientador)

Prof(a). Dr(a) Claudio Alberto Tellez Soto (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Livia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Tacyana Pires de Carvalho Costa (FACULDADE UNINASSAU - ALIANÇA)

Prof(a). Dr(a). Lucélia Campelo de Melo Santos (SECRETARIA DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE ALTOS-PI)

São Paulo, 16 de agosto de 2022.

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Drauzio Eduardo Naretto Rangel

Houve alteração do Título: sim () não (x):



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“ESTUDOS DOS EFEITOS DA HIPOXIA E ANOXIA DURANTE O CRESCIMENTO MICELIAL DE METARHIZIUM ROBERTSII NA TOLERÂNCIA A ESTRESSES DE CONÍDIOS E REGULAÇÃO DE GENES”**

Autor(es):

Discente: **Albery Martins e Silva**

Assinatura: _____

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Drauzio Eduardo Naretto Rangel**

Assinatura: _____

Coorientador(a): **Prof.(a) Dr.(a)**

Assinatura: _____

Houve alteração do Título: sim () não (✓):

Data: 16/08/2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os meus ex-professores e a minha família, peças fundamentais na minha formação e opção profissional.

AGRADECIMENTOS

É chegado o momento de expressar meus sinceros agradecimentos a todos os mestres, familiares e amigos. Sei que corro o risco de não dar conta desses “muitíssimo obrigados” como é merecido, pois será difícil exprimir a beleza que foi esse movimento de energias e impulsos que foram chegando. Para além da mera formalidade, se destaca um sentido: o da formação de uma verdadeira rede de solidariedade e afeto. Devo contar que esta não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas intercorrências pessoais de toda ordem que me atropelaram.

Tais percalços, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho e, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força. Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de momentos de angústia, sofrimento e incertezas, em uma estrada larga, margeada de flores, frutos e frondosas árvores! Um renascer para a vida!

Talvez essa tese seja o resultado mais visível desse processo de construção e, dando continuidade à história, dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Agradeço a Ele também por manter meus familiares ao meu lado, com saúde, apesar de ainda vivermos em um “perigo constante”.

Agradeço também à Universidade Brasil, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Dedico aos meus pais Carmelino e Otávia (in memoriam), por todos os ensinamentos com visão futurista e pela oportunidade desta vida. A composição abaixo define bem o momento em que eu, muito jovem tive de sair de casa para estudar:

*“No dia em que eu saí de casa
Minha mãe me disse filho vem cá
Passou a mão em meus cabelos,
Olhou em meus olhos começou falar
Por onde você for eu sigo*

*Com meu pensamento sempre onde estiver
Em minhas orações eu vou pedir a Deus
Que ilumine os passos seus(...)"
(No dia em que saí de casa - Joel Marques, 1992).*

Agradeço à minha esposa Elly Martins, por seguir comigo nessa jornada e principalmente pelo apoio nos momentos difíceis, ao me tranquilizar dizendo que tudo iria dar certo.

Agradeço ao meu filho João Pedro, pela ajuda dispensada às pesquisas, atualizações médicas e por todo o apoio recebido.

Agradeço aos meus irmãos que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas, momentos de afastamento e reclusão, me mostrando o quanto era importante estudar. Agradeço à minha sobrinha neta Luyza Maria, pelas valiosas dicas e pelas correções de textos.

Agradeço imensamente ao Professor Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel, por ter assumido a orientação desta tese em um tema absolutamente novo e de grande importância ao conhecimento científico, dosando os elogios e as críticas com comentários de incentivo.

Ao professor Dr. Ricardo Scarpara Navarro pela forma competente e respeitosa que conduziu a minha orientação inicial; pelas conversas sinceras e úteis sobre meu projeto de pesquisa e encorajamento.

Agradeço à minha amiga e colega de Faculdade, Selma Soriano, quem compartilha comigo o "dom" de ao falar, transmitir seus conhecimentos, e que sei que mesmo estando longe, torce diariamente por mim e compartilha de vários momentos, não só da vida acadêmica como familiar.

Agradeço a todos os colegas de doutorado, que vivenciaram momentos de estudo, escrita de artigo e tensão, no decorrer dessa jornada. Em especial cito, representando todos, Marina, minha colega de Faculdade e amiga, pela sua determinação, coragem e grande promotora de eventos da turma.

Meu muito obrigado a todos.

RESUMO

Pouco se sabe sobre o impacto da hipóxia e anóxia durante o crescimento micelial na tolerância a diferentes condições de estresse do desenvolvimento de conídios fúngicos. Os conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos em meio de ágar batata dextrose (PDA) sob normóxia (controle = concentrações normais de oxigênio), hipóxia contínua e anóxia transitória, bem como meio mínimo. A tolerância dos conídios produzidos nessas diferentes condições foi avaliada em relação ao calor úmido (estresse térmico), menadiona (estresse oxidativo), cloreto de potássio (estresse osmótico), radiação UV e 4-nitroquinolina-1-óxido (estresse genotóxico 4-NQO). O crescimento sob condição hipóxica induziu maior tolerância dos conídios de *M. robertsii* à menadiona, KCl e radiação UV. A condição anóxica transitória induziu maior tolerância dos conídios ao KCl e à radiação UV. O estresse nutricional (ou seja, meio mínimo) induziu maior tolerância dos conídios ao calor, menadiona, KCl e radiação UV. O gene *hsp30* e *hsp101* que codifica uma proteína de choque térmico foi superexpresso, em análise molecular, sob condição anóxica. Em conclusão, o crescimento sob hipóxia e anóxia produziu conídios com maior tolerância ao estresse do que os conídios produzidos em condições normóxicas. O estresse nutritivo gerado pelo meio mínimo, no entanto, induziu uma tolerância ao estresse muito maior. Essa condição também causou o maior nível de expressão gênica nos genes *hsp30* e *hsp101*. Permitindo concluir que houve uma maior adaptação ao estresse dos conídios produzidos sob estresse nutritivo, hipóxia e anóxia.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos; resistência cruzada; hipóxia; anóxia transitória; normóxia; adaptação; estresse nutricional; radiação UV-B; estresse por calor, estresse oxidativo, estresse osmótico, estresse genotóxico.

ABSTRACT

Little is known about the impact of hypoxia and anoxia during mycelial growth on tolerance to different stress conditions of fungal conidia development. *Metarhizium robertsii* conidia were produced on potato dextrose agar (PDA) medium under normoxic (control = normal oxygen concentrations), continuous hypoxia and transient anoxia, as well as minimal medium. The tolerance of conidia produced under these different conditions was evaluated in relation to moist heat (thermal stress), menadione (oxidative stress), potassium chloride (osmotic stress), UV radiation and 4-nitroquinoline-1-oxide (genotoxic stress 4-NQO). Growth under hypoxic conditions induced greater tolerance of *M. robertsii* conidia to menadione, KCl and UV radiation. The transient anoxic condition induced greater tolerance of conidia to KCl and UV radiation. Nutritional stress (ie, minimal medium) induced greater tolerance of conidia to heat, menadione, KCl and UV radiation. The hsp30 and hsp101 gene encoding a heat shock protein was overexpressed in molecular analysis under anoxic condition. In conclusion, growth under hypoxia and anoxia produced conidia with greater stress tolerance than conidia produced under normoxic conditions. The nutritional stress generated by the minimal medium, however, induced a much higher stress tolerance. This condition also caused the highest level of gene expression in the hsp30 and hsp101 genes. Allowing concluding that there was a greater adaptation to the stress of the conidia produced under nutritional stress, hypoxia and anoxia.

Keywords: entomopathogenic fungi; cross-resistance; hypoxia; transient anoxia; normoxia; adaptation; nutritional stress; UV-B radiation; heat stress, oxidative stress, osmotic stress, genotoxic stress

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Pouco se sabe sobre o impacto da hipóxia e anóxia durante o crescimento do fungo patógeno de inseto *Metarhizium robertsii* na tolerância cruzada a diferentes condições de estresse. Os conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos em meio de ágar batata dextrose (PDA) sob normóxia (controle = concentrações normais de oxigênio), hipóxia contínua e anóxia transitória. O crescimento sob hipóxia e anóxia produziu conídios com maior tolerância a estresses do que os conídios produzidos em condições normóxicas. Essa condição também causou o maior nível de expressão gênica nos genes hsp30 e hsp101. Permitindo concluir que houve uma maior adaptação ao estresse dos conídios produzidos sob hipóxia e anóxia..

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta a estresse térmico38
- Figura 2 – Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anoxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta a estresse oxidativo causado por menadiona.....39
- Figura 3. Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anoxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta ao estresse osmótico causado por cloreto de potássio.....40
- Figura 4. Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anoxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta à radiação UV.....39
- Figura 5. Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta ao estresse genotóxico causado pelo composto mutagênico 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO).....42

Figura 6. Produção de conídios de *Metarhizium robertsii* produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e em meio mínimo (MM).....43

Figura 7. Quantidade relativa normalizada (NRQ) de transcritos de fungos selecionados medidos por RT-qPCR. As barras de erro representam SE das médias de três réplicas biológicas. Valores estatisticamente diferentes entre cada tratamento (hipóxia, anoxia e fungos cultivados em meio mínimo) e controles foram determinados pelo teste t de Student e estão marcados com um asterisco.....44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E CONTROLE BIOLÓGICO.....	19
3.2 TOLERÂNCIA DE FUNGOS A DIFERENTES ESTRESSES DO MEIO AMBIENTE ..	20
3.3 EFEITOS DA HIPOXIA E ANOXIA EM FUNGOS.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 ISOLADO DO FUNGO	28
4.2 PRODUÇÃO E COLHEITA DE CONÍDIOS	29
4.3 GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS PARA EXPERIMENTOS DE STRESS	30
4.4 TOLERÂNCIA AO CALOR	31
4.5 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO	31
4.6 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OSMÓTICO	32
4.7 TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV.....	32
4.8 TOLERÂNCIA A 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO (4-NQO)	34
4.9 MEDIÇÃO DA PRODUÇÃO CONIDIAL.....	34
4.10 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	35
5 RESULTADOS	37
5.1 TOLERÂNCIA AO CALOR	37
5.2 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO	37
5.3 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OSMÓTICO	38
5.4 TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV.....	39
5.5 TOLERÂNCIA A 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO (4-NQO)	40
5.6 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS	41
5.7 EXPRESSÃO GÊNICA.....	42
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Os fungos exibem as respostas ambientais centrais, incluindo a indução de um conjunto central de genes que respondem a diversos estresses ambientais, que conferem proteção cruzada contra o estresse (BROWN et al., 2020; RANGEL, 2011). Quando o fungo patógeno de insetos *Metarhizium robertsii* sofre um forte e constante estímulo estressante durante o crescimento micelial, este fungo produzirá descendentes (conídios) que apresentam maior tolerância ao mesmo ou a outros tipos de condições de estresse (RANGEL, 2011). *M. robertsii* responde a muitas condições de estresse, incluindo estresse nutricional (RANGEL et al., 2006a; RANGEL et al., 2008b), choque térmico (RANGEL et al., 2008b), estresse osmótico (RANGEL et al., 2008b), estresse oxidativo (RANGEL et al., 2008b), estresse alcalino (RANGEL et al., 2015b), ácido salicílico (RANGEL et al., 2012), iluminação (DIAS et al., 2020; DIAS et al., 2021; RANGEL et al., 2011), estresse biótico causado por antagonismo fúngico (Medina et al., 2020) e hipóxia (RANGEL et al., 2015b), que por sua vez produzem conídios mais tolerantes a diversas outras condições de estresse. Os conídios de *M. robertsii* produzidos sob estresse nutritivo, estresse osmótico e anóxia transitória também são mais virulentos para insetos (OLIVEIRA et al., 2018; OLIVEIRA E RANGEL, 2018; RANGEL et al., 2008a) porque muitos genes relacionados ao estresse também são genes relacionados à virulência que são regulados durante o crescimento sob estresse (DIAS et al., 2020).

Hipóxia (baixa concentração de oxigênio) e anóxia (depleção total do nível de oxigênio) são condições que estressam os microrganismos aeróbicos que necessitam de oxigênio para crescer (MASUO et al., 2010). A hipóxia causa alterações significativas no metabolismo fúngico (ALDER-RANGEL et al., 2018;

ALDER-RANGEL et al., 2020; CAMILO E GOMES, 2010; ERNST E TIELKER, 2009; HILLMANN et al., 2015; MASUO et al., 2010; RANGEL et al., 2015a; SHIMIZU et al., 2010), crescimento micelial (OLIVEIRA E RANGEL, 2018) e virulência (HILLMANN et al., 2015; OLIVEIRA E RANGEL, 2018). A hipóxia está associada à resposta ao dano do DNA (SHIMIZU et al., 2009) e induz as respostas ambientais centrais (BROWN et al., 2020). A análise das respostas transcricionais revelou que a hipóxia influencia principalmente a expressão de genes para respostas ao estresse, conservação de energia e metabolismo de carbono (BONACCORSI et al., 2006; CHUN et al., 2007; MASUO et al., 2010; SETIADI et al., 2006). O crescimento em hipóxia também tem efeitos dramáticos na parede celular do fungo e na expressão de enzimas glicolíticas (BUTLER, 2013).

A hipóxia é típica na maioria dos ambientes de campo de batalha da interação hospedeiro-patógeno (ERNST E TIELKER 2009). Fungos entomopatogênicos, alguns dos quais são usados comercialmente para controle biológico de insetos (LI et al., 2010; MAGAN, 2001; MASCARIN et al., 2010), também devem lidar com a hipóxia durante sua entrada no hospedeiro do inseto. A capacidade de crescer no solo vários centímetros abaixo da superfície pode ter fungos entomopatogênicos pré-adaptados para proliferar na hemolinfa do inseto com seu baixo teor de oxigênio (ST. LEGER E WANG, 2020). O fungo *M. robertsii* é um importante agente para o controle biológico mundial de insetos-praga agrícolas (ALSTON et al., 2005; LI et al., 2010; RANGEL et al., 2022; RANGEL E CORREIA, 2003) e vetores de doenças (AL-AIDROOS E ROBERTS, 1978; RANGEL et al., 2020). Assim, a produção de conídios, a virulência a insetos e a tolerância ao estresse de conídios dos isolados fúngicos são qualidades muito importantes para melhor servir como agentes de controle biológico de insetos na agricultura e na saúde pública. Aqui estudamos

como o crescimento micelial de *M. robertsii* sob hipóxia e anóxia transitória afeta a tolerância dos conídios produzidos ao calor, estresse oxidativo, estresse osmótico, radiação UV e estresse genotóxico. Além disso, foram avaliados, através de testes moleculares, os padrões de expressão de um conjunto de genes usualmente envolvidos em diferentes respostas ao estresse.

2 OBJETIVOS

Estudar os efeitos da hipóxia e anóxia transitória no crescimento micelial de conídios de *Metarhizium robertsii*, quando submetidos aos estresses térmico, oxidativo, osmótico, radiação UV e genotóxico.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os efeitos da hipóxia e anóxia transitória durante o crescimento micelial de *Metarhizium robertsii* na tolerância dos conídios ao calor, estresse oxidativo, estresse osmótico, radiação UV e estresse genotóxico.
- Avaliar os padrões de expressão de um conjunto de genes usualmente envolvidos em diferentes respostas a estresses do fungo *Metarhizium robertsii* quando expostos a hipóxia e anóxia transitória.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E CONTROLE BIOLÓGICO

O uso indiscriminado de agrotóxicos tem sido durante muitos anos o principal meio de controle de pragas em diversas culturas agrícolas no Brasil e em diversas partes do mundo (LI et. al., 2010). Com isso, são causados vários desequilíbrios ambientais nesses ecossistemas, que vão desde a superpopulação de pragas, seleção de insetos resistentes, poluição dos solos e aquíferos até causando danos à saúde humana (PEDIGO, 2002). O Brasil e a China têm obtido grandes progressos na produção de bioinseticidas para controle de insetos agrícolas e florestais (LI et. al., 2010).

Os fungos entomopatogênicos são encontrados em ecossistemas agrícolas e naturais (ROBERTS; ST. LEGER, 2004) e são considerados um dos principais agentes de controle biológico de pragas agrícolas (LI et. al., 2010). Além disso, esses patógenos possuem alta capacidade de disseminar seus esporos através da ação dos ventos e chuvas para locais distantes.

Fungos patógenos de insetos podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como os ovos, larvas, pupas e adultos (COOK, 1996). Diferentemente de outros micro-organismos entomopatogênicos, fungos infectam os insetos principalmente pela penetração através do tegumento. Esta característica apresenta uma vantagem em relação às bactérias e vírus entomopatogênicos, que causam doença apenas após a ingestão do micro-organismo durante a alimentação (ROBERTS; ST. LEGER, 2004). O processo de infecção dos fungos entomopatogênicos ocorre através da adesão e germinação de conídios na superfície do inseto, seguida de penetração física por um apressório através da cutícula (ROBERTS; ST. LEGER, 2004). Além da penetração física,

ocorre à ação de enzimas (proteases, lipases e quitinases) que digerem o exoesqueleto do inseto (ROBERTS; ST. LEGER, 2004). As hifas desenvolvem-se na cavidade interna no corpo do hospedeiro, ocorrendo em seguida à liberação de micotoxinas causando a paralisação ou morte do inseto. O micélio surge externamente do corpo do inseto produzindo esporos que poderão ser dispersos no ambiente infectando assim outros insetos (ROBERTS; ST. LEGER, 2004).

Os fungos entomopatogênicos mais estudados pertencem aos gêneros *Aschersonia*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, *Hirsutella* e *Verticillium* (HUMBER et. al., 2011). Os gêneros mais estudados e usados em programas de controle biológico são *Metarhizium* e *Beauveria* (LI et. al., 2010).

O fungo *Beauveria bassiana* é uma espécie muito utilizada como micoinseticida em diversos tipos de plantações para o biocontrole de pragas como a broca-do-café no Brasil e Colômbia (FARIA; WRAIGHT, 2007). Mundialmente são encontrados diversos produtos comerciais para controle biológico contendo *B. bassiana* como ingrediente ativo (FARIA; WRAIGHT, 2007), assim como, o fungo *Metarhizium anisopliae* que tem sido utilizado em larga escala como um agente de controle biológico de grande eficácia, tendo como hospedeiro mais de 200 espécies de insetos, sendo muito usado como bioinseticidas de cigarrinhas de cana de açúcar no Brasil (LI et. al., 2010).

3.2 TOLERÂNCIA DE FUNGOS A DIFERENTES ESTRESSES DO MEIO AMBIENTE

Um dos maiores problemas para o uso de fungos entomopatogênicos é altas temperaturas e outros estresses ambientais que os fungos estão expostos. Altas temperaturas podem alterar processos fisiológicos quando seguido de elevada

umidade causando danos na membrana citoplasmática (CRISAN, 1973) e inativação e desnaturação de proteínas (CRISAN, 1973). Em contraste a exposição ao calor seco causa danos ao DNA através da perda de bases nitrogenadas levando a depurinação (SETLOW; SETLOW, 1996). Os fungos entomopatogênicos podem sobreviver em uma amplitude relativamente grande de temperaturas, mas temperaturas acima de 34 ou 35 °C são restritivas ao crescimento destes fungos (RANGEL et. al., 2010).

Os fungos utilizam vários mecanismos para se proteger de altas temperaturas e para sobreviver a esse estresse induzem mecanismos de proteção sob essas condições, por exemplo, as proteínas de choque térmico (HSP) são induzidas quando os fungos estão sob a condição de estresse térmico, neutralizando os efeitos do estresse e levando a um aumento da tolerância ao calor (RENSING et. al., 1998; RANGEL et. al., 2011). Outro exemplo de mecanismo é a acumulação endógena de polióis e trealose ligados à resistência biológica dos fatores abióticos ambientais adversos (SINGER; LINDQUIST, 1998). A utilização da substância polioliol nas células aumenta a taxa de germinação dos fungos ampliando a sua sobrevivência durante o seu armazenamento em longo prazo, e a trealose estabiliza proteínas durante o choque térmico e preserva a integridade das membranas (RANGEL et. al., 2008; SINGER; LINDQUIST, 1998).

Outra condição que interfere no desenvolvimento dos fungos é o estresse oxidativo que é causado por espécies reativas de oxigênio (EROS) que são geradas como resultado de seu metabolismo celular (FRIDOVICH, 1978a; FRIDOVICH, 1978b). As espécies reativas de oxigênio mais estudadas são os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, e quando produzidos em excesso podem causar danos no DNA (ácido dextrorribonucleico) proteínas e lipídios

(FRIDOVICH, 1978a; FRIDOVICH, 1978b). Quando o nível de EROS excede a capacidade antioxidante das células, ocorre o estresse oxidativo, alguns fatores que induzem a formação da EROS incluem a radiação ionizante, radiação ultravioleta, peróxido de hidrogênio, metais pesados, e outros produtos químicos (JAROSZ; LINDQUIST, 2010). Os fungos entomopatogênicos são suscetíveis a EROS quando são induzidas pelo calor e radiação UV-A e estresse nutritivo quando estão expostos ao meio ambiente (RANGEL et. al., 2006), e quando estão dentro do hospedeiro, eles estão sujeitos às células fagocíticas que geram a formação da EROS para eliminar patógenos invasores (WANG; ST. LEGER, 2006). Vários produtos químicos como menadione, diamide, peróxido de hidrogênio, paraquat, cloreto de sódio entre outros, induzem a formação de espécies reativas de oxigênio, através da ação direta na cadeia respiratória das células eucarióticas (ALI et. al., 2011; FRIDOVICH, 1978a; FRIDOVICH, 1978b, JAROSZ; LINDQUIST, 2010), causando estresse oxidativo. Em contrapartida, o organismo possui um complexo processo de defesa antioxidante enzimático que combate os agentes oxidantes (EROS) evitando um maior dano celular, como as enzimas superóxido dismutase e catalase que funciona em conjunto, a superóxido dismutase convertendo o radical superóxido em peróxido de hidrogênio que é reduzido em água e oxigênio pela catalase (JAROSZ; LINDQUIST, 2010).

Na última etapa do processo infeccioso, os fungos precisam adaptar-se a altas pressões osmóticas na hemolinfa de insetos (WANG; DUAN; ST. LEGER, 2008). A capacidade de sobreviver ao estresse osmótico requer várias adaptações envolvendo osmoregulação (HOHMANN, 2002), transporte de ions, homeostasia e síntese de melanina (KOGAJ et al., 2006). Nessas condições, os fungos ajustam seus potenciais de soluto internos por acumulação de solutos, como glicerol, eritritol,

manitol e trealose, o que reduz o potencial interno da água e limita as perdas osmóticas (RANGEL et al., 2015b). O glicerol e eritritol são considerados os maiores compostos osmoregulatórios em *Aspergillus nidulans*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus* implicando que o conteúdo foi elevado após o crescimento em meio osmoticamente alterado com cloreto de potássio (HALLSWORTH; MAGAN, 1994; HALLSWORTH; MAGAN, 1995). Neste trabalho, o cloreto de potássio é utilizado porque o KCl é um estressor osmótico ambientalmente onipresente em diversos habitats de fungos (DE LIMA ALVES et al., 2015). Além disso, já foi utilizado em outro estudo com o fungo entomopatogênico *Metarhizium robertsii*, onde apresenta respostas semelhantes ao KCl e ao NaCl (RANGEL; ANDERSON; ROBERTS, 2008).

Embora o estresse genotóxico causado pelo 1-óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) não seja conhecido no meio ambiente do inseto, de acordo com vários estudos, ele danifica o DNA de maneira similar à radiação UV (VASILIEVA, 2002). O composto químico 4-NQO é um potente carcinógeno, e tem sido usado como mutagênico em bactérias e fungos para estudos genéticos sobre danos e reparo de DNA (DOWNES et al., 2014). Além disso, o 4-NQO causa mutagênese microbiana por quebra da cadeia de DNA e pela produção de adutos de transferência de carga (DOWNES ET AL., 2014). Além disso, o 4-NQO induz substituições em resíduos de guanina e adenina, embora com uma preferência muito maior pela guanina (DOWNES ET AL., 2014), produzindo danos de base, como dímeros de pirimidina ciclobutana e fotoprodutos (6-4). Essas lesões de DNA são geralmente reparadas por mecanismos diferentes, incluindo reparo de excisão de nucleotídeos (FRIEDBERG et al., 1995), fotorreativação (ESSEN, 2006) e reparo de endonuclease UV (YAJIMA et al., 1995). Além disso, o 4-NQO induz estresse

oxidativo, evidenciado pela produção de oxigênio reativo in vivo em cepas de bactérias com vários defeitos na defesa antioxidante (NUNOSHIBA; DEMPLÉ, 1993). Dado que o 4-NQO produz danos no DNA que é considerado semelhante ao causado pela radiação UV, procurou-se responder se a tolerância aos UV se correlacionaria com a resistência ao 4-NQO.

O *priming* (também conhecido como aclimatação, resistência adquirida ao estresse, resposta adaptativa ou proteção cruzada) é definido como uma exposição de um organismo a um estresse leve que leva ao desenvolvimento de uma resposta subsequente mais forte e protetora. Essa memória de um estresse encontrado anteriormente provavelmente fornece uma forte vantagem de sobrevivência em um ambiente em rápida mudança. Priming foi identificado em animais, plantas, fungos e bactérias (HARISH e OSHEROV, 2022). Isso permite que o organismo libere um grande número de propágulos que são pré-programados para sobreviver melhor nas condições adversas em que foram formados. As condições de iniciação que aumentam a virulência dos esporos ou a resistência à drogas antifúngicas são de importante relevância médica e agrícola. Compreender os mecanismos responsáveis pelo priming em fungos filamentosos continua sendo uma importante fronteira inexplorada (HARISH e OSHEROV, 2022). Portanto, estudar o priming causado pela hipoxia e anoxia em *Metarhizium robertsii* é de grande importância para melhorar nosso conhecimento sobre se hipoxia e anoxia induzem tolerância a outros estresses e também se induzem a expressão de genes de estresse e virulência.

3.3 EFEITOS DA HIPOXIA E ANOXIA EM FUNGOS

O oxigênio é importante para a sobrevivência da grande parte dos organismos eucariontes, devido ao seu papel principal em importantes processos bioquímicos e

fisiológicos, incluindo a produção de energia (sob a forma de ATP) a partir de glicose pelo metabolismo aeróbio. Na natureza, o desafio da falta de oxigênio pode ocorrer com uma frequência bastante elevada, dependendo do modo de vida do organismo (CAMILO; GOMES, 2010). Assim, os organismos desenvolveram um conjunto complexo de respostas celulares adaptativas e moleculares ativado pela diminuição na disponibilidade de oxigênio (hipóxia) (CAMILO; GOMES, 2010; ERNST; TIELKER, 2009). Essas respostas são adaptativas, pois elas podem levar a mudanças no estado fisiológico e metabólico de células, o que lhes permitem lidar com o estresse associado com restrição de oxigênio e melhorar a sobrevivência celular (CAMILO; GOMES, 2010).

Hipóxia (baixas concentrações de oxigênio) faz o metabolismo dos fungos sofrer mudanças significativas (MASUO et. al., 2010). Algumas espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* que é um fungo aeróbio facultativo podem utilizar tanto a respiração quanto a fermentação para a obtenção de energia, quando em condições de anaerobiose essas células são dependentes de fermentação. Além disso, precisam de compostos essenciais como esteróis e ácidos graxos, dado que as reações enzimáticas que conduzem a sua biossíntese utilizam oxigênio molecular como um aceptor de elétrons, e, se o oxigênio não é suficiente, esses compostos não são funcionais (BECERRA et. al., 2002). Essas espécies respondem a alterações de baixa concentração de oxigênio, alterando os padrões de expressão dos genes, um conjunto de genes que respondem a essas alterações são os genes de hipóxia. Entre os genes que são induzidos durante a hipóxia estão os genes que utilizam o oxigênio como um substrato (ERG11, HEM13, OLE1); isoformas de genes relacionados com a respiração aeróbia e troca de ATP entre citoplasma e mitocôndria (COX5b, CYC7, ACC3), os genes relacionados com a

absorção ou a biossíntese de esteróis (SUT1, HMG2, CPR1) e outros, cujas funções ainda não foram bem definidas. (BECERRA et. al., 2002).

As respostas de algumas espécies de fungos como *Cryptococcus neoformans* (CHUN et. al., 2007), *Trichoderma reesei* (BONACCORSI et. al., 2006), *Aspergillus niger* (DIANO et. al., 2009) e *Candida albicans* (SETIADI et. al., 2006) a hipóxia tem sido estudada devido a sua importância na patogênese e na indústria de fermentação. Análise global da transcrição destes fungos mostra que a hipóxia modifica a expressão de genes para a conservação de energia no metabolismo de carbono, bem como para a resposta ao estresse (SETIADI et. al., 2006; CHUN et. al., 2007; BONACCORSI et. al., 2006).

Os mecanismos de adaptação à hipóxia têm sido largamente estudados em células de mamíferos e micro-organismos não patogênicos, no entanto, há pouca informação a respeito dessa condição na infecção e virulência dos patógenos (ERNST; TIELKER, 2009). Sabe-se que os mecanismos de adaptação à hipoxia são variáveis entre os fungos (BARKER et. al., 2012) e que esta condição é um fator chave na virulência dos fungos patogênicos humanos. Nos tecidos do hospedeiro as tensões de oxigênio são baixas, o que deve ser superado pelos patógenos durante o processo infeccioso (CHUN et. al., 2007; ERNST; TIELKER, 2009).

Em condições anóxicas ocorre à redução da disponibilidade de ATP, essencial para funções celulares impedindo o crescimento celular. A exposição prolongada a anóxia provoca a morte celular (MASUO et. al., 2010). Sob baixa tensão de oxigênio, as cadeias respiratórias alternativas e receptores de elétrons, também como as reações de fermentação, podem gerar ATP. Alguns micro-organismos como fungos e bactérias reduzem o nitrato de amônia em nitrogênio em sua biomassa. Sob limitação de oxigênio ou condições anóxicas esse processo é

muito utilizado pelas bactérias como uma via alternativa de respiração gerando ATP (ZHOU et al., 2002; ABE et al., 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLADO DO FUNGO

O isolado de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575 foi obtido da USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, NY, USA. As culturas estoque foram mantidas a 4 °C em tubos de ensaio em ágar batata dextrose (BDA) (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) ajustado para pH 6,9.

Isolado de *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575



USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Robert W. Holley

(Center for Agriculture and Health, NY, USA).



As culturas estoque foram mantidas a 4 °C em tubos de ensaio em ágar batata dextrose (BDA) (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) ajustado para pH 6,9.

4.2 PRODUÇÃO E COLHEITA DE CONÍDIOS

Conídios do fungo entomopatogênico *M. robertsii* foram produzidos em 23 ml de BDA ou no meio basal para crescimento sob estresse nutritivo (MM = Czapek Dox Agar sem sacarose), (NaNO₃, 0,2%), (K₂HPO₄, 0,1%), (MgSO₄, 0,05%), (KCl, 0,05%), (FeSO₄, 0,001%) e Bacto Agar 1,5% (Becton, Dickinson e CO, Sparks, MD, EUA) em poliestireno de 95 mm. O pH de ambos os meios foi ajustado para 6,9.

Os conídios foram produzidos em (1) BDA sob normóxia (concentrações normais de oxigênio) mantidas dentro de uma caixa plástica perfurada como controle; (2) BDA sob hipóxia contínua (placas de Petri seladas três vezes com Parafilm) de acordo com Shabana et al. (2001); ou (3) BDA sob anóxia transitória (as culturas foram cultivadas por 24 h sob normóxia e transferidas para frascos de anaerobiose com BD GasPakTMEZ (260001) Anaerobe Container System with Indicator (Sparks, MD, EUA). O fabricante do GasPakTMEZ afirma na Bula que o frasco anaeróbico contém aproximadamente 13% de dióxido de carbono e menos de 0,7% de oxigênio médio. Após cinco dias, as placas foram transferidas para normóxia por mais oito dias; e (4) em meio mínimo conforme descrito anteriormente sob estresse nutritivo e normóxia. Todas as culturas foram mantidas em a escuridão dentro de uma manga grossa de pano preto por 14 dias.

O crescimento sob estresse nutritivo é um controle positivo que produziu conídios de *M. robertsii* com maior tolerância a muitas condições de estresse (DIAS et al., 2021; MEDINA et al., 2020; RANGEL et al., 2006a; RANGEL et al., 2008b; RANGEL et al., 2015b; RANGEL et al., 2012; RANGEL et al., 2011). No entanto, este meio reduz significativamente a produção de conídios (RANGEL et al., 2006a).

Uma suspensão de conídios ($100 \mu\text{l}$ de 10^7 conídios ml^{-1}) foi inoculada uniformemente com um espalhador de vidro em meio BDA ou meio mínimo. As culturas foram incubadas por 14 dias a $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e aproximadamente 90% de umidade relativa. Foram produzidos três lotes diferentes de conídios, um para cada repetição de cada tipo de experimento de estresse.

Salvo indicação em contrário, todos os experimentos foram conduzidos a $26 \text{ }^\circ\text{C}$. Os conídios de todos os tratamentos foram coletados após 14 dias de crescimento e suspensos em 10 ml de solução estéril de Tween 80 (0,01%) em tubos Pyrex com tampa de rosca ($20 \times 125 \text{ mm}$). Os conídios coletados foram suficientes para uma suspensão de 10^5 conídios ml^{-1} . As suspensões (ajustadas para 1×10^5 conídios ml^{-1}) foram agitadas vigorosamente usando um vórtice e $40 \mu\text{l}$ foram inoculados em meio BDA. Todas as suspensões de conídios foram gotejadas, mas não espalhadas no centro do meio de cultura. As suspensões foram usadas imediatamente após a preparação para cada um dos experimentos de condição de estresse.

4.3 GERMINAÇÃO DOS CONÍDIOS PARA EXPERIMENTOS DE STRESS

Dependendo do experimento, a germinação no escuro foi observada 24 ou 48 h após a inoculação das suspensões de conídios. A placa de ágar foi corada com uma gota de solução de azul de metileno (BRAGA et al., 2002), coberta com lamínula e examinada ao microscópio de luz com aumento de 400x. Os conídios foram considerados germinados quando o tubo germinativo apresentava uma projeção branca do conídio. Foram avaliados pelo menos 300 conídios por placa e calculada a porcentagem de germinação. Todos os conídios germinativos e não germinativos foram contados na mesma lamínula. A margem da suspensão de conídios foi a área utilizada para contagem por se tratar de uma área comumente menos povoada por

conídios. Cada tratamento foi repetido pelo menos quatro vezes com um novo lote de conídios produzidos para cada repetição.

4.4 TOLERÂNCIA AO CALOR

Para estudar as tolerâncias ao calor dos conídios produzidos nos tratamentos sob normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e estresse nutritivo, as suspensões de conídios foram preparadas para exposição ao calor. Em seguida, os conídios de cada isolado foram colhidos e suspensos conforme descrito anteriormente e submetidos ao calor de acordo com RANGEL et al. (2005) e SOUZA et al. (2014).

As suspensões de conídios foram agitadas vigorosamente e, em seguida, 2 ml foram transferidos para tubos Pyrex com tampa com rosca (20 × 125 mm). Os tubos com suas suspensões foram colocados em banho térmico a 45°C por 0 (controle não exposto), 2, 3, 4 e 5 h (RANGEL et al., 2005; SOUZA et al., 2014). Após exposição ao calor, 40 µl da suspensão foram inoculados no centro de uma placa de Petri de poliestireno (60 × 15 mm) com 10 ml de meio BDA suplementado com 0,003% de benomyl com 25% de ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, Bonham, Tx). A germinação dos conídios foi avaliada após 24 (para o controle não exposto ao calor) ou 48 h (para o fungo exposto ao calor). O fungicida benomyl tem sido utilizado em inúmeros estudos para reduzir a velocidade de germinação para facilitar as contagens de germinação após 24 e 48 h (RANGEL et al., 2006b). A percentagem de germinação foi determinada como descrito acima.

4.5 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO

Para estudar as tolerâncias ao estresse oxidativo dos conídios produzidos nos tratamentos sob normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e sob estresse nutritivo, os conídios foram expostos ao forte agente gerador de superóxido

menadiona bissulfato de sódio 2-metil-1,4 -naftoquinona (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) seguindo o método descrito por AZEVEDO et al. (2014).

As suspensões de conídios usadas para os experimentos de estresse oxidativo foram preparadas como descrito acima. Suspensões de 10 ml de meio BDA (controle 0 mM) ou BDA suplementado com menadiona (Sigma-Aldrich Corporation, EUA) foram inoculados em placas de Petri de poliestireno (60 x 15 mm). Para todos os isolados, as concentrações de menadiona utilizadas foram 0,07, 0,10, 0,15 e 0,18 mM. As concentrações de oxidante foram selecionadas após a construção de curvas de sobrevivência com base na germinação de conídios expostos à menadiona (Azevedo et al., 2014). Após 24 h de incubação, a porcentagem de germinação foi determinada.

4.6 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OSMÓTICO

Para estudar as tolerâncias ao estresse osmótico dos conídios produzidos nos tratamentos sob normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e sob estresse nutritivo, os conídios foram expostos ao cloreto de potássio (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, EUA), como descrito em Araújo et al. (2019). Ou seja, as suspensões foram inoculadas em placas de Petri de vidro (40 × 12 mm Normax, Portugal) com 4 ml de BDA (controle 0 M) ou BDA suplementado com cloreto de potássio. Para todos os isolados, as concentrações de KCl avaliadas foram 0,9, 1,0, 1,3, 1,4, 1,5, 1,7, 1,9, 2,1 e 2,4 M. A porcentagem de germinação foi determinada em 24 h conforme descrito acima.

4.7 TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV

Para estudar as tolerâncias à radiação UV dos conídios produzidos nos tratamentos sob normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e sob

estresse nutritivo, os conídios foram expostos à radiação UV utilizando a Câmara de Teste de Xenônio conforme descrito por DIAS et al. (2018).

As suspensões de conídios foram preparadas conforme descrito anteriormente e inoculadas em placas de polietileno (35 × 10 mm) contendo 6 ml de BDA suplementado com benomil 0,003% com 25% de ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, Bonham, TX, EUA). As placas permaneceram abertas no fluxo laminar por 30 min. para secar as suspensões de conídios. Após a secagem, as suspensões foram expostas em uma Câmara de Teste de Xenônio QSUN XE-3-HC 340S (QLAB® Corporation, Westlake, OH, EUA), que é um equipamento que realiza testes realísticos de radiação UV utilizando o filtro Daylight-Q. Para evitar a dessecação do meio, as placas foram cobertas com filme de diacetato. Placas de Petri com a suspensão seca de todos os isolados foram expostas por 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 e 210 min, equivalente à irradiância de 3,5, 3,9, 4,3, 4,6, 5,0, 5,3, 5,7, 6,0, 6,4, 6,7, 7,1 e 7,5 kJ m⁻², respectivamente.

A irradiância ponderada de Quaité no interior da câmara foi de 1335 mW m⁻². A irradiância espectral foi medida conforme descrito em outro lugar (Dias et al., 2018; Rangel et al., 2004). O espectro de ação do dano ao DNA (formação do dímero de pirimidina de ciclobutano) desenvolvido por Quaité et al. (1992) e normalizado para unidade em 300 nm foi empregado para calcular irradiâncias UV ponderadas em mW m⁻². Filtros de diacetato de celulose (JCS Industries, Le Miranda, CA, EUA) foram usados para excluir radiação UV-C e UV-B de comprimento de onda curto. A irradiância e a temperatura do equipamento foram ajustadas conforme DIAS et al. (2018).

As placas de Petri controle (uma para cada isolado) com a suspensão de conídios não expostas à radiação UV foram cobertas com papel alumínio e colocadas na câmara por 210 min.

A germinação de conídios foi observada em 24 horas (placas de controle) ou 48 horas (placas irradiadas com UV) após as suspensões de conídios serem inoculadas no meio conforme descrito acima.

4.8 TOLERÂNCIA A 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO (4-NQO)

Para estudar a tolerância ao estresse a mutagênicos de conídios produzidos nos tratamentos sob normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e em meio mínimo, os conídios foram expostos ao composto mutagênico 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO), de acordo com ARAÚJO et al. (2018). Quando ativado pelo metabolismo celular, o 4-NQO forma adutos reagindo com as bases purinas do DNA, e as distorções na hélice do DNA pelo 4-NQO são muito semelhantes às produzidas por lesões induzidas por radiação UV (BAILLEUL et al., 1981; JENNINGS, 1993).

As suspensões de conídios foram preparadas para exposição a 4-NQO e os conídios de cada isolado foram colhidos conforme descrito anteriormente. As suspensões foram inoculadas em BDA (controle 0 M) ou BDA suplementado com cloreto de potássio em placas de Petri de poliestireno (35 × 10 mm). Cada placa continha 5 ml de meio. Para todos os isolados, as concentrações de 4-NQO foram 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0 μM . A porcentagem de germinação foi determinada em 24 horas como descrito acima.

4.9 MEDIÇÃO DA PRODUÇÃO CONIDIAL

Para medir a produção de conídios, três cilindros de ágar por placa foram retirados em locais aleatórios do meio com uma broca de cortiça (5 mm de diâmetro) e suspensos em 1 ml de solução de Tween 80 estéril (0,01%). A concentração de

conídios resultante foi determinada usando um hematocítômetro. Este ensaio foi realizado em triplicado usando três lotes diferentes de culturas (RANGEL et al., 2006a; RANGEL et al., 2008b; RANGEL et al., 2012).

4.10 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

O grupo de genes envolvidos em diferentes respostas ao estresse e selecionados para estudar seus padrões de expressão inclui genes marcadores de estresse oxidativo, como superóxido dismutases (sod1 e sod2) e catalases (catB e catC); e estresse térmico, como proteínas de choque térmico (hsp30 e hsp101). Além disso, os níveis de expressão do gene ssga do estresse por falta de hidrofobina e do gene da protease pr1 foram estudados, pois podem estar envolvidos na proteção contra o estresse que fungos inseto-patogênicos sofrem durante a adesão e degradação da cutícula do inseto, que são os estágios iniciais da infecção. O processo de infecção. O RNA total foi obtido a partir de conídios cultivados sob normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e meio mínimo. As células fúngicas foram moídas com almofariz e pilão em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído usando o kit RNA easy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha) com uma etapa de digestão de DNA em coluna (DNase I, Qiagen). O RNA foi quantificado por espectrofotômetro Nanodrop (Thermo, Wilmington, EUA), e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). O cDNA de fita simples foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total usando o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), que inclui uma etapa de eliminação de qualquer DNA genômico restante. O cDNA foi então amplificado usando um QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) em um sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) com a condição de ciclo térmico universal fornecida pelo fabricante. Para confirmar que apenas produtos únicos foram amplificados, uma

etapa de fusão à temperatura foi então realizada. Os controles negativos foram testados usando modelos gerados sem transcriptase reversa. As reações contendo pares de primers sem molde também foram incluídas como controles em branco. O ensaio foi realizado em duplicatas técnicas para cada uma das três réplicas biológicas independentes. Curvas padrão foram obtidas para avaliar a eficiência da PCR de cada par de primers utilizado. A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gpd) foi usada como gene de manutenção. Os níveis de expressão dos genes relativos ao gene housekeeping foram calculados de acordo com Hellemans et al. (2007) e expresso como a quantidade relativa normalizada (NRQ). A análise estatística foi realizada usando o teste t de Student bicaudal. Os gráficos foram construídos com o Prism GraphPad 5 (GraphPad Software, EUA). Os primers usados e as eficiências de PCR são detalhados na Tabela 1.

5 RESULTADOS

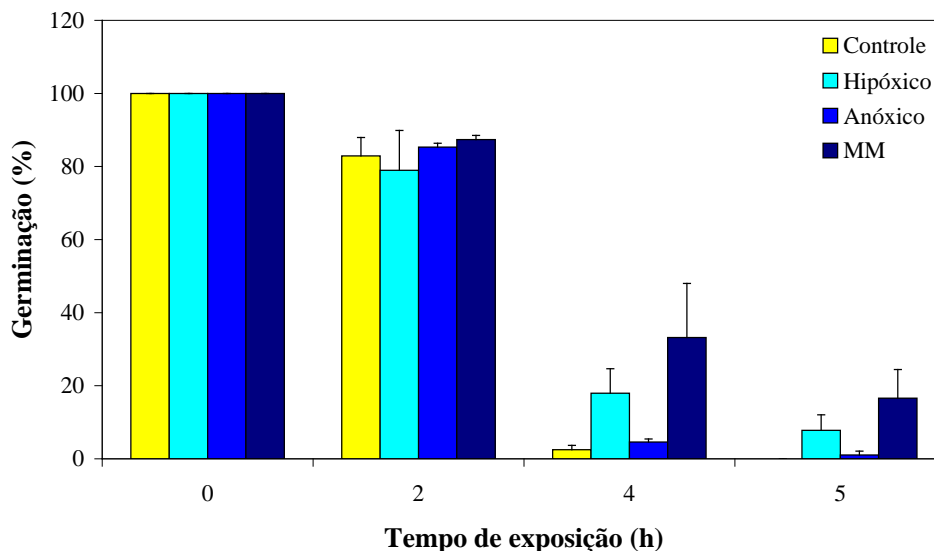
5.1 TOLERÂNCIA AO CALOR

O crescimento micelial sob estresse hipóxico induziu uma tolerância ao calor ligeiramente maior dos conídios de *M. robertsii* do que os conídios produzidos sob condições normóxicas (Figura 1). Conídios produzidos sob hipóxia tiveram tolerância semelhante aos conídios produzidos sob estresse nutritivo e em normóxia (controle).

O tratamento sob anóxia transitória não induziu maior tolerância ao calor dos conídios (Figura 1).

Os conídios produzidos sob estresse nutritivo foram mais tolerantes do que os conídios produzidos em meio BDA sob normóxia (controle) ou anóxia (Figura 1).

Figura 1. Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta a estresse térmico. A exposição ao calor ocorreu em suspensão em banho térmico a 45°C. A germinação dos conídios foi realizada em meio de cultura BDA contendo 0,003% de benomil. As comparações estatísticas foram feitas dentro de cada tempo de exposição, não entre os diferentes tempos de exposição. As barras de erro são erros padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em momentos diferentes. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

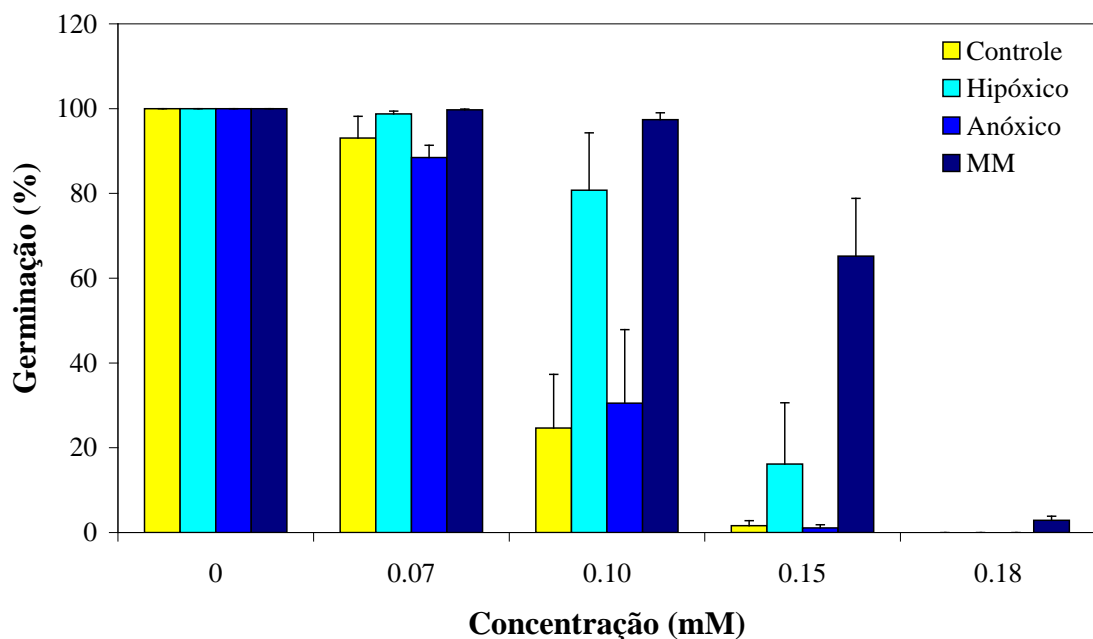


5.2 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO

As tolerâncias dos conídios à menadiona foram maiores para os conídios produzidos sob hipóxia, que foram mais tolerantes do que os conídios produzidos em normóxia e anóxia transitória (Figura 2).

Os conídios produzidos com uma concentração de 0,10 mM de menadiona alcançaram tolerância semelhante aos conídios produzidos sob estresse nutritivo; entretanto, quando a concentração foi aumentada para 0,15 mM, a tolerância dos conídios à menadiona foi menor que a dos conídios produzidos sob estresse nutritivo (Figura 2). Portanto, o crescimento sob estresse nutritivo induz maior tolerância dos conídios ao estresse oxidativo (Figura 2).

Figura 2. Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta a estresse oxidativo causado por menadiona. As comparações estatísticas foram feitas dentro de cada tempo de exposição, não entre os diferentes tempos de exposição. Porcentagem média de germinação de conídios em meio BDA suplementado com menadiona de conídios de *M. robertsii* produzidos sob as condições acima. Para exposição ao estresse oxidativo, os conídios produzidos nas condições acima foram inoculados em meio de cultura BDA contendo diferentes concentrações de menadiona. As comparações estatísticas foram feitas dentro de cada concentração de menadiona, não entre as diferentes concentrações. As barras de erro são erros padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em momentos diferentes. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$)



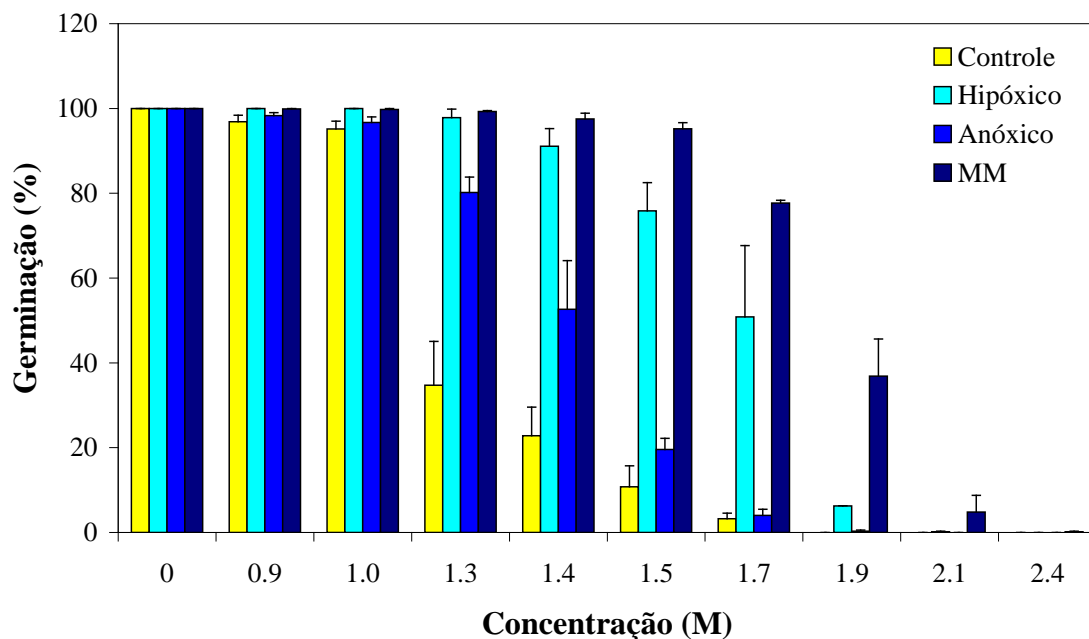
5.3 TOLERÂNCIA AO ESTRESSE OSMÓTICO

O crescimento micelial sob hipóxia e anóxia transitória produziu conídios com maior tolerância ao estresse osmótico induzido por KCl do que conídios produzidos em normóxia (Figura 3). No entanto, os conídios produzidos sob anóxia transitória

foram menos tolerantes ao estresse osmótico do que os conídios produzidos sob hipóxia.

Em menor concentração de KCl (1,3 M), os conídios produzidos sob hipóxia apresentaram tolerância ao estresse osmótico semelhante aos conídios produzidos sob estresse nutritivo. No entanto, em concentrações mais altas de KCl, os conídios produzidos sob estresse hipóxico foram menos tolerantes do que os conídios produzidos sob estresse nutritivo (Figura 3).

Figura 3. Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anoxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta ao estresse osmótico causado por cloreto de potássio. Porcentagem média de germinação de conídios em meio BDA suplementado com cloreto de potássio de conídios de *M. robertsii* produzidos sob as condições acima. A germinação dos conídios foi realizada em BDA (controle) ou BDA suplementado com 0,9; 1,0; 1,3; 1,4; 1,5; 1,7; 1,9; 2,1; e 2,4 M KCl. As comparações estatísticas foram feitas dentro de cada concentração de KCl, não entre as diferentes concentrações. As barras de erro são erros padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em momentos diferentes. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

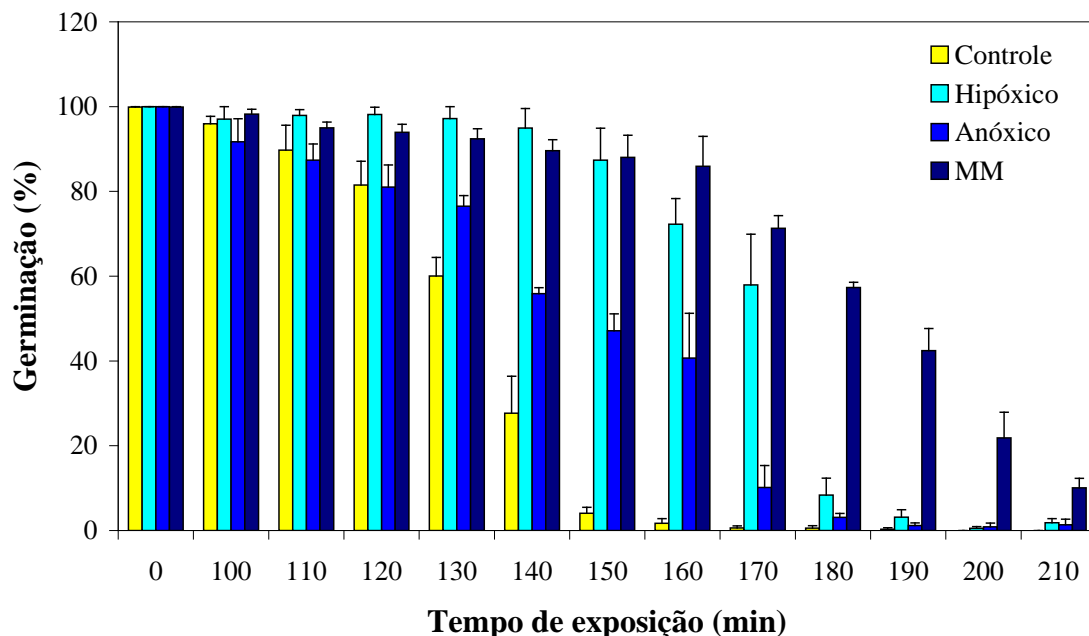


5.4 TOLERÂNCIA À RADIAÇÃO UV

O crescimento micelial sob hipóxia e anóxia produziu conídios com maior tolerância à radiação UV do que os conídios produzidos em normóxia (Figura 4). Mas, os conídios produzidos sob anoxia transitória foram menos tolerantes à

radiação UV do que os conídios produzidos sob hipóxia (Figura 4). Os conídios produzidos sob anoxia transitória sempre foram mais tolerantes à radiação UV do que os conídios produzidos sob normóxia, exceto para exposição UV acima de 180 min, que prejudicou seriamente a germinação (Figura 4). Por um lado, a exposição de 130 a 170 min à radiação UV de conídios produzidos sob hipóxia foram tão tolerantes à radiação UV quanto os conídios produzidos sob estresse nutritivo. Quando a exposição UV foi aumentada para 180 min, os conídios produzidos sob estresse hipóxico foram menos tolerantes do que os conídios produzidos sob estresse nutritivo (Figura 4).

Figura 4. Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anoxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta à radiação UV. Percentual médio de germinação de conídios após exposição à radiação UV de conídios de *M. robertsii* produzidos nas condições acima. Para exposição ao estresse, suspensões de conídios foram expostas à radiação UV por 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 e 210 minutos. As barras de erro são erros padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em momentos diferentes. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

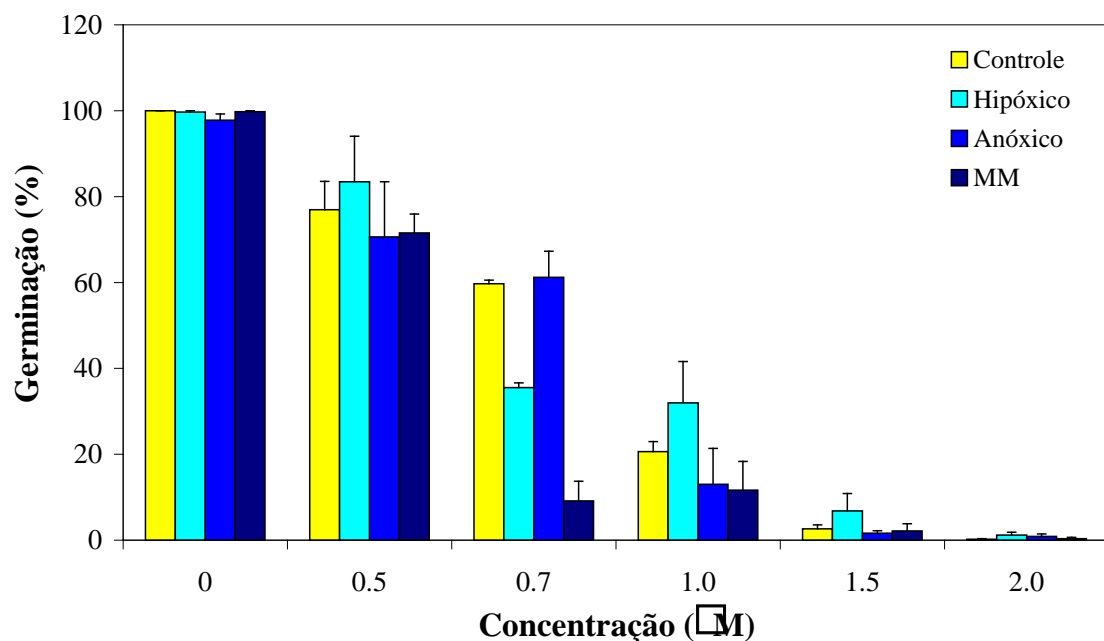


5.5 TOLERÂNCIA A 4-NITROQUINOLINA-1-ÓXIDO (4-NQO)

O crescimento micelial sob hipóxia constante, anóxia transitória ou estresse nutritivo não produziu conídios com tolerância significativamente aumentada ao agente genotóxico 4-NQO. Em vez disso, os conídios produzidos sob estresse

nutritivo foram menos tolerantes do que os conídios produzidos em meio BDA em normóxia como controle (Figura 5). Assim, o mecanismo bioquímico de tolerância fúngica ao 4-NQO é diferente dos demais estresses estudados, conforme discutido em Araújo et al. (2018).

Figura 5. Conídios de *Metarhizium robertsii* foram produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e em meio mínimo (MM). Uma suspensão de conídios produzida nesses quatro tratamentos foi exposta ao estresse genotóxico causado pelo composto mutagênico 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO). Porcentagem média de germinação de conídios em meio BDA suplementado com 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) de conídios de *M. robertsii* produzidos sob as condições acima. Para exposição ao estresse, suspensões de conídios foram expostas a 4-NQO 0 (controle), 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 μM de 4-NQO. As comparações estatísticas foram feitas dentro de cada concentração de 4-NQO, não entre as diferentes concentrações. As barras de erro são erros padrão de pelo menos três experimentos independentes realizados em momentos diferentes. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

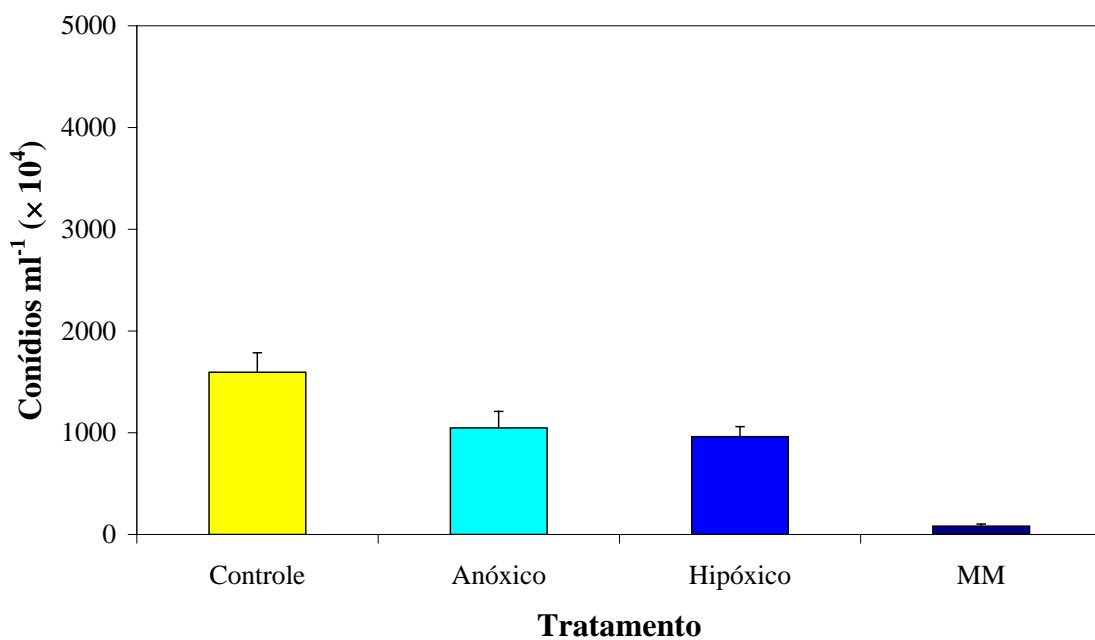


5.6 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS

A cultura de *M. robertsii* sob estresse hipóxico ou anóxico produziu quantidades semelhantes de conídios, mas menos conídios do que quando em normóxia (Figura 6). Como de costume, o estresse nutritivo produziu a menor quantidade de conídios.

Em comparação com normóxia (controle), 39,7% menos conídios foram produzidos sob condições de estresse hipóxico, 34,3% menos sob anóxia transitória e 94,8% menos sob estresse nutritivo (Figura 6).

Figura 6. Produção de conídios de *Metarhizium robertsii* produzidos nos tratamentos em normóxia (controle), hipóxia contínua, anóxia transitória e em meio mínimo (MM). Para medir a produção de conídios, três tampões de ágar (por placa) foram retirados em locais aleatórios do meio com uma broca de cortiça (5 mm diâmetro) e suspensos em 1 ml de Tween 80 estéril (0,01%). Os tampões foram suspensos em 1 mL de solução estéril de Tween 80 (0,01% v/v). A contagem de conídios foi realizada no hematócítmetro de Neubauer. Este ensaio foi realizado em triplicado usando três lotes diferentes de culturas. As barras do gráfico com a mesma letra não são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

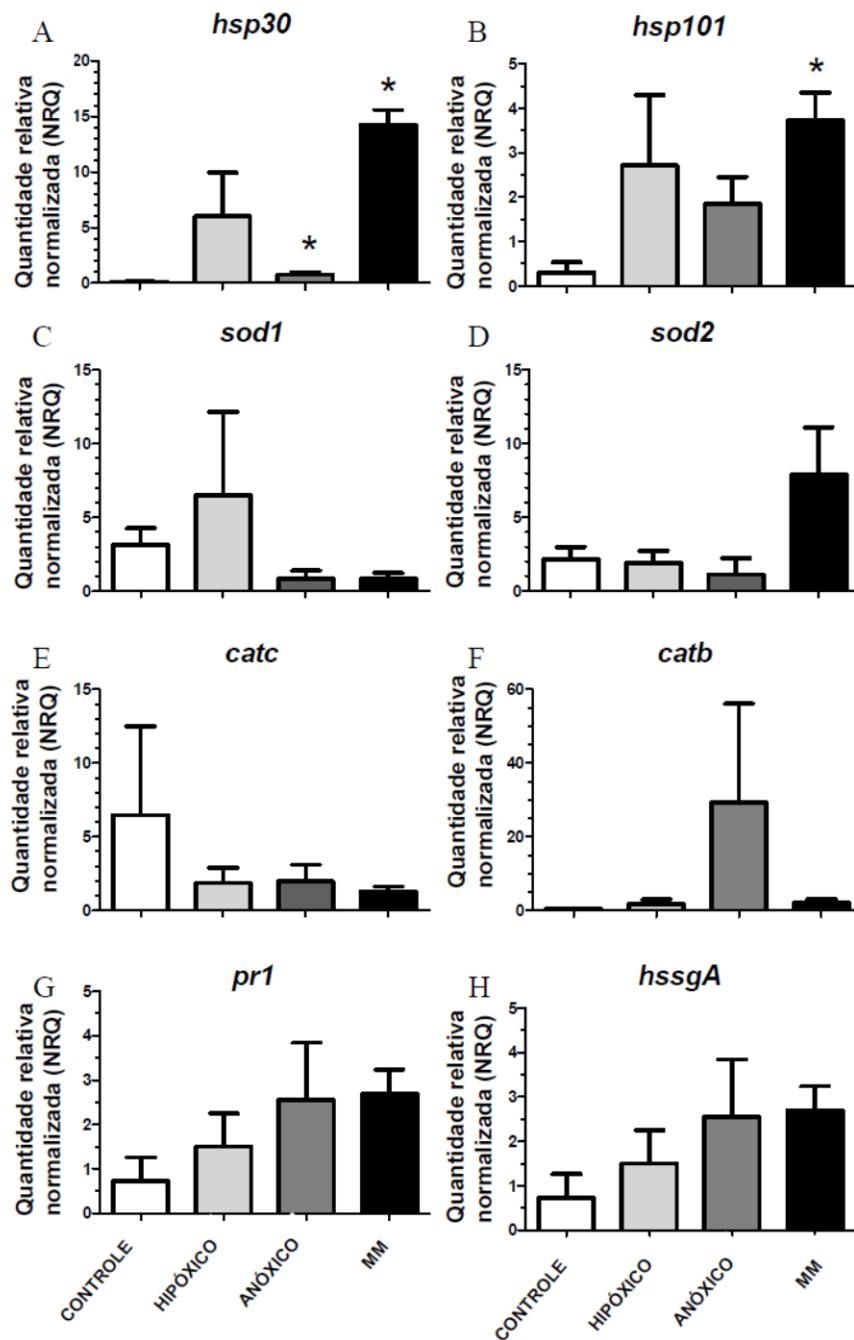


5.7 EXPRESSÃO GÊNICA

Dois dos dez genes selecionados como marcadores de processos relacionados ao estresse (hsp30 e hsp101) foram significativamente superexpressos em pelo menos uma das condições testadas. Na anóxia, hsp30 foi induzida em comparação com controles normóxicos (Figura 7A e 7B). A indução também ocorreu para ambos os genes hsp em fungos cultivados em meio mínimo em comparação com os fungos cultivados em meio rico (Figura 7). No entanto, não foi detectada indução em genes marcadores de estresse oxidativo, como superóxido dismutases (sod1 e sod2) e

catalases (*catB* e *catC*), e o gene codificador de hidrofobina *ssga*, e o gene da protease *pr1* (Figura 7).

Figura 7. Quantidade relativa normalizada (NRQ) de transcritos de fungos selecionados medidos por RT-qPCR. As barras de erro representam SE das médias de três réplicas biológicas. Valores estatisticamente diferentes entre cada tratamento (hipóxia, anoxia e fungos cultivados em meio mínimo) e controles foram determinados pelo teste t de Student e estão marcados com um asterisco.



6 DISCUSSÃO

A capacidade de induzir maior tolerância ao estresse de fungos entomopatogênicos é vital para aplicação no controle biológico de insetos na agricultura (RANGEL et al., 2018). Descobrimos que o crescimento sob hipóxia contínua ou anóxia transitória induziu maior tolerância ao estresse dos conídios de *Metarhizium robertsii* do que os conídios produzidos em normóxia. Os conídios produzidos sob hipóxia foram mais tolerantes a quatro condições de estresse: calor, estresse oxidativo, estresse osmótico e radiação UV (Figuras 1-4). A anóxia transitória, por outro lado, induziu maior tolerância ao estresse dos conídios apenas a duas condições de estresse: estresse osmótico e radiação UV conforme demonstrado em nosso trabalho. No entanto, o crescimento sob estresse nutricional, no experimento, sempre proporcionou conídios com maior tolerância a outros estresses do que os conídios produzidos sob estresse hipóxico e anóxico, ou sob normóxia. *M. robertsii* exposto a anóxia transitória cresceu assim que retornou à condição de crescimento ideal, presumivelmente tornando-se latente e retomando o crescimento ativo à medida que a condição de anóxia foi eliminada.

Maior tolerância ao estresse genotóxico não foi alcançada pela produção de conídios sob hipóxia, anóxia ou estresse nutritivo (Figura 5). Talvez por que essas condições não foram capazes de induzir alterações no material genético dos conídios a elas expostos.

Outro estudo também descobriu que os conídios produzidos sob luz branca eram tão tolerantes ao estresse genotóxico quanto os conídios produzidos no escuro (DIAS et al., 2021).

Da mesma forma, foi recentemente descoberto, que o crescimento de *M. robertsii* sob iluminação também induziu maior tolerância de conídios do que

conídios produzidos no escuro (ambos sob normóxia), nas mesmas quatro condições de estresse: calor, estresse oxidativo, estresse osmótico e radiação UV (DIAS et al., 2021), que teve um nível comparável de tolerância de conídios produzidos sob hipóxia.

Comparando apenas as tolerâncias dos conídios à radiação UV, os conídios produzidos sob hipóxia causaram maior tolerância aos raios UV, do que os conídios produzidos sob luz branca (DIAS et al., 2021). Isso é particularmente interessante porque a luz e o oxigênio são detectados pelo mesmo domínio LOV (para luz, oxigênio ou voltagem), que foi nomeado por Winslow Briggs com base na semelhança de sequência entre proteínas que detectam esses três fatores ambientais (HUALA et al., 1997). As proteínas do domínio LOV são um subconjunto das proteínas do domínio PAS (IDNURM et al., 2010; TAYLOR e ZHULIN, 1999). Os domínios PAS são importantes módulos de sinalização que monitoram mudanças na luz, potencial redox, oxigênio e nível geral de energia de uma célula (TAYLOR e ZHULIN, 1999), e hipóxia e anóxia são fatores ambientais que são detectados pelo PAS (TAYLOR e ZHULIN, 1999). Os domínios PAS foram identificados em proteínas de todos os três domínios da vida: Bacteria, Archaea e Eucarya (TAYLOR e ZHULIN, 1999).

O crescimento sob altas concentrações de oxigênio é conhecido por induzir maior termotolerância no fungo *Metarhizium lepidiotae* (anteriormente *M. anisopliae* var. *lepidiotum*) (Garcia-Ortiz et al., 2015). Portanto, descobrimos que o estresse hipóxico e anóxico também pode induzir tolerância cruzada em *M. robertsii*.

A produção de conídios sob anoxia transitória e hipóxia constante foi menor do que a produção de conídios sob normóxia (Figura 6). No entanto, em outro estudo, descobrimos que o crescimento de *M. robertsii* sob normóxia, hipóxia e

anóxia transitória produziu uma quantidade semelhante de conídios; no entanto, cada colônia apresentou morfologia e coloração diferentes (OLIVEIRA e RANGEL, 2018). A colônia mantida sob normóxia apresentou conídios verde-escuros (cor teca) sem uma camada de micélio. As colônias dos tratamentos de hipóxia e anóxia produziram conídios sob uma camada de micélio branco (OLIVEIRA e RANGEL, 2018), conforme descrito anteriormente em RANGEL et al. (2004). Essas diferenças entre os resultados deste experimento (Figura 2) e os resultados produzidos por OLIVEIRA e RANGEL (2018) podem ser devido a diferentes lotes de meio de cultura da Difco adquiridos em anos diferentes. Observe que a produção de conídios na Figura 6 é 1595×10^4 conídios ml^{-1} (erro padrão = $191,4 \times 10^4$ conídios ml^{-1}) para culturas sob normóxia (Controle); no entanto, OLIVEIRA e RANGEL (2018) verificaram que culturas sob normóxia produziram aproximadamente 5000×10^4 conídios ml^{-1} . Resultados diferentes na produção de conídios em meio BDA, que é um meio complexo devido à sua composição de batata indefinida, têm sido comumente encontrados em nossos estudos. Por exemplo, no estudo de 2006, a produção de conídios em PDA suplementado com extrato de levedura (PDAY) foi de cerca de 9.000×10^4 conídios ml^{-1} (Rangel et al., 2006a); entretanto, no estudo de 2008, a produção de conídios no PDAY foi de aproximadamente 4000×10^4 conídios ml^{-1} (Rangel et al., 2008b).

A influência do estresse hipóxico, estresse anóxico e estresse nutritivo na maior tolerância ao estresse conidial é evidenciada pela regulação positiva das proteínas de choque térmico 30 e 101 nesses tratamentos (Figuras 7A, B). O estresse anóxico apenas aumentou a hsp30, mas não a hsp101. Em *Trichoderma reesei*, genes envolvidos na proteção celular (genes da proteína de choque térmico hsp98 e hsp30 e uma flavohemoglobina), síntese de ergosterol (erg1 e erg3),

glicólise e as vias das pentose fosfato foram regulados durante a hipóxia (BONACCORSI et al., 2006). A indução de hsp70 sob hipóxia também foi relatada em *Blastocladiella emersonii* (GEORG e GOMES, 2007), *Candida albicans* (SETIADI et al., 2006) e *Cryptococcus neoformans* (CHUN et al., 2007).

Como plantas e animais, os fungos têm genes centrais de resposta ao estresse que são comumente induzidos em resposta a diversos tipos de estresses ambientais, que também induzem um segundo conjunto de genes que é comumente reprimido em resposta a essas condições (BROWN et al., 2020; RANGEL, 2011). Em *Aspergillus nidulans*, um fator de transcrição (AtfA) desempenha um papel fundamental na regulação dessas respostas ao estresse. Embora o número de genes sob controle de AtfA pareça ser específico para um tipo de estresse, tanto o estresse oxidativo quanto o osmótico induziram a expressão de genes adicionais em diferentes agrupamentos e a deleção de AtfA aumentou a resposta ao estresse de agrupamentos diferentes adicionais (EMRI et al., 2015). Essas redes regulatórias complexas podem ajudar a explicar nossos resultados de expressão. Embora as HSPs tenham sido descritas pela primeira vez como resposta ao estresse térmico, elas desempenham um papel importante como chaperonas em resposta a diferentes tipos de estresse, ajudando a estabilizar novas proteínas ou redobrar proteínas que foram danificadas por condições de estresse (De MAIO, 1999). Encontramos uma indução de genes codificadores de hsp sob condições de estresse nutricional e anóxia. Ambos os genes hsp também foram superexpressos em *M. robertsii* expostos à luz azul, verde, vermelha e branca durante o crescimento micelial (DIAS et al., 2020). Esses resultados podem sugerir um papel central de genes codificadores de hsp no núcleo de genes de resposta ao estresse de *M. robertsii*.

Para os genes de estresse oxidativo, não encontramos indução para os genes *sod1*, *sod2* e *catB* e *catC* por hipóxia, anoxia ou estresse nutritivo. DIRMEIER et al. (2002) relataram que *Saccharomyces cerevisiae* exposta à anóxia experimenta estresse oxidativo transitório; e a expressão do gene *sod1* de células de levedura é bastante variável, uma vez que primeiro cai 2-4 h após a mudança de condições aeróbicas para anaeróbicas, e então aumenta após 5-6 h de tal mudança (DIRMEIER et al., 2002). Estudos sobre genes adicionais de resposta ao estresse, juntamente com os fatores de transcrição envolvidos na regulação de tais genes em *M. robertsii* são necessários para elucidar essas complexas redes regulatórias.

7 CONCLUSÃO

O crescimento sob hipóxia e anóxia produziu conídios com maior tolerância ao estresse do que os conídios produzidos em condições normóxicas. O estresse nutritivo gerado pelo meio mínimo, no entanto, induziu uma tolerância ao estresse muito maior. Essas condições também causaram o maior nível de expressão gênica em genes relacionados ao estresse, sugerindo uma melhor adaptação a essas condições.

REFERÊNCIAS

AL-AIDROOS, K.; ROBERTS, D. W. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. *Can. J. Genet. Cytol.*, v. 20, p. 211-219, 1978.

ALDER-RANGEL, A.; BAILÃO, A. M.; DA CUNHA, A. F.; SOARES, C. M. A.; WANG, C.; BONATTO, D.; DADACHOVA, E.; HAKALEHTO, E.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FERNANDES, E. K. K.; BRAUS, G. H.; BRAGA, G. U. L.; GOLDMAN, G. H.; MALAVAZI, I.; HALLSWORTH, J. E.; TAKEMOTO, J. Y.; FULLER, K.; SELBMANN, L.; CORROCHANO, L. M.; BERTOLINI, M. C.; SCHMOLL, M.; PEDRINI, N.; LOERA, O.; FINLAY, R. D.; PERALTA, R. M.; RANGEL, D. E. N. The second International Symposium on Fungal Stress: ISFUS. *Fungal Biol*, v. 122, n. 6, p. 386-399, 2018.

ALDER-RANGEL, A.; IDNURM, A.; BRAND, A. C.; BROWN, A. J. P.; GORBUSHINA, A.; KELLIHER, C. M.; CAMPOS, C. B.; LEVIN, D. E.; BELL-PEDERSEN, D.; DADACHOVA, E.; BAUER, F. F.; GADD, G. M.; BRAUS, G. H.; BRAGA, G. U. L.; BRANCINI, G. T. P.; WALKER, G. M.; DRUZHININA, I.; PÓCSI, I.; DIJKSTERHUIS, J.; AGUIRRE, J.; HALLSWORTH, J. E.; SCHUMACHER, J.; WONG, K. H.; SELBMANN, L.; CORROCHANO, L. M.; KUPIEC, M.; MOMANY, M.; MOLIN, M.; REQUENA, N.; YARDEN, O.; CORDERO, R. J. B.; FISCHER, R.; PASCON, R. C.; MANCINELLI, R. L.; EMRI, T.; BASSO, T. O.; RANGEL, D. E. N. The Third International Symposium on Fungal Stress – ISFUS. *Fungal Biol*, v. 124, n. 5, p. 235-252, 2020/05/01/ 2020.

ALI, S. et.al.. Superoxide dismutase production by *Isaria fumosorosea* on metals and its role in stress tolerance and fungal virulence. *Biocontrol Sci Technol*. v.21, p. 1457-1469, 2011.

ALSTON, D. G.; RANGEL, D. E. N.; LACEY, L. A.; GOLEZ, H. G.; KIM, J. J.; ROBERTS, D. W. Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Biological Control*, v. 35, p. 163-171, 2005.

ARAÚJO, C. A. S.; DIAS, L. P.; FERREIRA, P. C.; MITTMANN, J.; PUPIN, B.; BRANCINI, G. T. P.; BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N. Responses of entomopathogenic fungi to the mutagen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Fungal Biology*, v. 122, n. 6, p. 621-628, 2018.

ARAÚJO, C. A. S.; FERREIRA, P. C.; PUPIN, B.; DIAS, L. P.; AVALOS, J.; EDWARDS, J.; HALLSWORTH, J. E.; RANGEL, D. E. N. Osmotolerance as a determinant of microbial ecology: A study of phylogenetically diverse fungi. *Fungal Biol.*, 2019/09/16/ 2019.

AZEVEDO, R. F. F.; SOUZA, R. K. F.; BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N. Responsiveness of entomopathogenic fungi to menadione-induced oxidative stress. *Fungal Biol*, v. 118, n. 0, p. 990-995, 2014.

BAILLEUL, B.; GALIEGUE, S.; LOUCHEUX-LEFEBVRE, M. H. Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucleosides. *Cancer Res*, v. 41, n. 11 Pt 1, p. 4559-65, Nov 1981.

BECERRA, M.; LOMBARDIA-FERREIRA, L. J.; HAUSER, N. C.; HOHEISEL, J. D.; TIZON, B.; CERDAN, M. E. The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of hap1, rox1, rox3 and srb10 deletions. *Mol Microbiol*, v. 43, n. 3, p. 545-55, Feb 2002.

BONACCORSI, E. D.; FERREIRA, A. J. S.; CHAMBERGO, F. S.; RAMOS, A. S. P.; MANTOVANI, M. C.; FARAH, J. P. S.; SORIO, C. S.; GOMBERT, A. K.; TONSO, A.; EL-DORRY, H. Transcriptional response of the obligatory aerobe *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia: Implications for energy production and survival in the absence of oxygen. *Biochemistry*, v. 45, n. 12, p. 3912-3924, Mar 28 2006.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. *Mycologia*, v. 94, p. 912-920, 2002.

BROWN, A. J. P.; LARCOMBE, D. E.; PRADHAN, A. Thoughts on the evolution of Core Environmental Responses in yeasts. *Fungal Biol*, v. 124, n. 5, p. 475-481, May 2020.

BUTLER, G. Hypoxia and gene expression in eukaryotic microbes. *Annual Review of Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 291-312, 2013.

CAMILO, C. M.; GOMES, S. L. Transcriptional response to hypoxia in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryotic Cell*, v. 9, n. 6, p. 915-925, Jun 2010.

CHUN, C. D.; LIU, O. W.; MADHANI, H. D. A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during Infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Plos Pathogens*, v. 3, n. 2, p. e22, 2007.

COOK, R. J. et al. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: A framework for scientific evaluation. *Biological Control*, v. 7, n. 3, p. 333–351, 1996.

CRISAN, E.V. Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi. *Mycologia*. v. 65, p. 1171-1198, 1973.

DE LIMA ALVES, F. et al. Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. *Current Genetics*, v. 61, n. 3, p. 457–477, 9 ago. 2015.

DE MAIO, A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock (Augusta, Ga.)*, v. 11, n. 1, p. 1-12, 1999.

DIANO, A.; PEETERS, J.; DYNESSEN, J.; NIELSEN, J. Physiology of *Aspergillus niger* in oxygen-limited continuous cultures: influence of aeration, carbon source concentration and dilution rate. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, n. 5, p. 956-965, Aug 2009.

,

DIAS, L. P.; ARAÚJO, C. A. S.; PUPIN, B.; FERREIRA, P. C.; BRAGA, G. Ú. L.; RANGEL, D. E. N. The Xenon Test Chamber Q-SUN® for testing realistic tolerances of fungi exposed to simulated full spectrum solar radiation. *Fungal Biol*, v. 122, n. 6, p. 592-601, 2018.

DIAS, L. P.; PEDRINI, N.; BRAGA, G. U. L.; FERREIRA, P. C.; PUPIN, B.; ARAÚJO, C. A. S.; CORROCHANO, L. M.; RANGEL, D. E. N. Outcome of blue, green, red, and white light on *Metarhizium robertsii* during mycelial growth on conidial stress tolerance and gene expression. *Fungal Biol*, v. 124, n. 5, p. 263-272, 2020/05/01/ 2020.

DIAS, L. P.; SOUZA, R. K. F.; PUPIN, B.; RANGEL, D. E. N. Conidiation under illumination enhances conidial tolerance of insect-pathogenic fungi to environmental stresses. *Fungal Biology*, 2021/06/11/ 2021.

DIRMEIER, R.; O'BRIEN, K. M.; ENGLE, M.; DODD, A.; SPEARS, E.; POYTON, R. O. Exposure of yeast cells to anoxia induces transient oxidative stress: Implications for the induction of hypoxic genes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 38, p. 34773-34784, 2002.

DOWNES, D. J. et al. Characterization of the Mutagenic Spectrum of 4-Nitroquinoline 1-Oxide (4-NQO) in *Aspergillus nidulans* by Whole Genome Sequencing. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, v. 4, n. 12, p. 2483–2492, dez. 2014.

EMRI, T.; SZARVAS, V.; OROSZ, E.; ANTAL, K.; PARK, H.; HAN, K. H.; YU, J. H.; POCSI, I. Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics*, v. 16, p. 478, Jun 27 2015.

ERNST, J. F.; TIELKER, D. Responses to hypoxia in fungal pathogens. *Cellular Microbiology*, v. 11, n. 2, p. 183-190, Feb 2009.

ESSEN, L. O. Photolyases and cryptochromes: Common mechanisms of DNA repair and light-driven signaling? *Current Opinion in Structural Biology*, v. 16, n. 1, p. 51–59, 2006.

FARIA, M. R. DE; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, v. 43, n. 3, p. 237–256, dez. 2007.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science*, v. 201, n. 4359, p. 875-80, Sep 8 1978a.

FRIDOVICH, I. Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochemistry and Photobiology*, v. 28, n. 4-5, p. 733-41, Oct-Nov 1978b.

FRIEDBERG E. C., WALKER G. C., SEIDE W. DNA Repair and Mutagenesis. In: _____ DNA Repair and Mutagenesis. 2. ed. Washington, D.C: ASM Press, cap. 8 1995. p. 638.

GARCIA-ORTIZ, N.; TLECUITL-BERISTAIN, S.; FAVELA-TORRES, E.; LOERA, O. Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 99, n. 6, p. 2783-91, Mar 2015.

GEORG, R. C.; GOMES, S. L. Comparative expression analysis of members of the Hsp70 family in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Gene*, v. 386, n. 1-2, p. 24-34, Jan 15 2007.

HARISH, E.; OSHEROV, N. Fungal Priming: Prepare or Perish. *J Fungi (Basel)*, v. 8, n. 5, Apr 25 2022.

HILLMANN, F.; SHEKHOVA, E.; KNIEMEYER, O. Insights into the cellular responses to hypoxia in filamentous fungi. *Current Genetics*, v. 61, n. 3, p. 441-455, August 01 2015.

HUALA, E.; OELLER, P. W.; LISCUM, E.; HAN, I. S.; LARSEN, E.; BRIGGS, W. R. Arabidopsis NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, v. 278, n. 5346, p. 2120-2123, Dec 1997.

HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. v. 98, n. 2008, p. 262–266, 2011.

IDNURM, A.; VERMA, S.; CORROCHANO, L. M. A glimpse into the basis of vision in the kingdom Mycota. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, n. 11, p. 881-92, Nov 2010.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v. 18, n. 1, p. 8–11, jan. 1994.

HALLSWORTHT, J. E.; MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. p. 1109–1115, 1995.

HOHMANN, S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. v. 66, n. 2, p. 300–372, 2002.

JAROSZ, D. F.; LINDQUIST, S. Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation. *Science*, v. 330, n. 6012, p. 1820-1824, Dec 23 2010.

JENNINGS, D. H. (Ed.) *Stress Tolerance of Fungi*. Mycology Series. New York: Marcel Dekker, Inc., v.10, p.281, Mycology Seriesed. 1993.

KOGEJ, T. et al. Mycosporines in extremophilic fungi - Novel complementary osmolytes? *Environmental Chemistry*, v. 3, n. 2, p. 105–110, 2006.

LI, Z. Z.; ALVES, S. B.; ROBERTS, D. W.; FAN, M. Z.; DELALIBERA, I.; TANG, J.; LOPES, R. B.; FARIA, M.; RANGEL, D. E. N. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci and Technol*, v. 20, n. 2, p. 117-136, 2010.

MAGAN, N. Physiological Approaches to Improving the Ecological Fitness of Fungal Biocontrol Agents. In: BUTT, T. M. et al (Ed.). *Fungi as Biocontrol Agents*. Oxon: CAB Publishing, 2001.

MASCARIN, G. M.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, p. 753-761, 2010.

MASUO, S.; TERABAYASHI, Y.; SHIMIZU, M.; FUJII, T.; KITAZUME, T.; TAKAYA, N. Global gene expression analysis of *Aspergillus nidulans* reveals metabolic shift and transcription suppression under hypoxia. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 284, n. 6, p. 415-424, Dec 2010.

MEDINA, E. Q. A.; OLIVEIRA, A. S.; MEDINA, H. R.; RANGEL, D. E. N. Serendipity in the wrestle between *Trichoderma* and *Metarhizium*. *Fungal Biology*, v. 124, n. 5, p. 418-426, 2020/05/01/ 2020.

OLIVEIRA, A. S.; BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N. *Metarhizium robertsii* illuminated during mycelial growth produces conidia with increased germination speed and virulence. *Fungal Biol*, v. 122, n. 6, p. 555-562, 2018.

OLIVEIRA, A. S.; RANGEL, D. E. N. Transient anoxia during *Metarhizium robertsii* growth increases conidial virulence to *Tenebrio molitor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 153, p. 130-133, 2018/03/01/ 2018.

PEDIGO, L. P. *Entomology and pest management*. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

QUAITE, F. E.; SUTHERLAND, B. M.; SUTHERLAND, J. C. Action spectrum for DNA damage in alfalfa lowers predicted impact of ozone depletion. *Nature* v. 358, p. 576-578, 1992.

RANGEL, D. E. N. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 27, p. 1281-1296, 2011.

RANGEL, D.E.N. et.al. Thermotolerance of germlings and mycelium of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium* spp. and mycelial recovery after heat stress. *J Basic Microbiol* . v.50, p. 344–350, 2010.

RANGEL, D. E. N.; ALDER-RANGEL, A.; DADACHOVA, E.; FINLAY, R. D.; KUPIEC, M.; DIJKSTERHUIS, J.; BRAGA, G. U. L.; CORROCHANO, L. M.; HALLSWORTH, J. E. Fungal stress biology: a preface to the Fungal Stress Responses special edition. *Curr. Gen.*, v. 61, n. 3, p. 231-238, 2015.

RANGEL, D. E. N.; ALSTON, D. G.; ROBERTS, D. W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*, v. 112, p. 1355-1361, 2008.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 93, n. 2, p. 127-134, 2006.

RANGEL, D. E. N.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol. Res.*, v. 112, p. 1362-1372, 2008.

RANGEL, D. E. N.; BIGNAYAN, H. G.; GOLEZ, H. G.; KEYSER, C. A.; EVANS, E. W.; ROBERTS, D. W. Virulence of the insect-pathogenic fungi *Metarhizium* spp. to Mormon crickets, *Anabrus simplex* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Bulletin of Entomological Research*, v. 112, n. 2, p. 179-186, 2022.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 88, p. 116-125, 2005.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; HALLSWORTH, J. E.; ROBERTS, D. W. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Curr. Gen.*, v. 61, n. 3, p. 383-404, 2015.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on artificial and natural substrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 87, p. 77-83, 2004.

RANGEL, D. E. N.; BUTLER, M. J.; TORABINEJAD, J.; ANDERSON, A. J.; BRAGA, G. U. L.; DAY, A. W.; ROBERTS, D. W. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 93, n. 3, p. 170-182, 2006.

RANGEL, D. E. N.; CORREIA, A. D. C. B. Virulencia de *Aphanocladium album* (Preuss) Gams e *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas (Deuteromycotina: Hyphomycetes) para o percevejo-de-renda da seringueira, *Leptopharsa heveae* (Drake & Poor) (Hemiptera: Tingidae). *Ciência e Agrotecnologia*, v. Edição Especial, p. 1636-1642, 2003.

RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, E. K. K.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Culture of *Metarhizium robertsii* on salicylic-acid supplemented medium induces increased conidial thermotolerance. *Fungal Biol*, v. 116, p. 438-442, 2012.

RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, E. K. K.; BRAGA, G. U. L.; ROBERTS, D. W. Visible light during mycelial growth and conidiation of *Metarhizium robertsii* produces conidia with increased stress tolerance. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 315, n. 2, p. 81-86, 2011.

RANGEL, D. E. N.; FINLAY, R. D.; HALLSWORTH, J. E.; DADACHOVA, E.; GADD, G. M. Fungal strategies for dealing with environmental and agricultural stress. *Fungal Biol.*, v. 122, n. 6, p. 602-612, 2018.

RANGEL, D. E. N.; PIEDRABUENA, A. E.; ROITMAN, I.; MESSIAS, C. L. Laboratory and field studies for the control of Chagas disease vectors using the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v. 105, p. e21745, 2020.

RENSING, L.; MONNERJAHN, C.; MEYER, U. Differential stress gene expression during the development of *Neurospora crassa* and other fungi. *FEMS Microbiology Letters*, v. 168, p. 159-166, 1998.

ROBERTS, D. W.; ST. LEGER, R. J. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Adv. Appl. Microbiol.*, v. 54, p. 1-70, 2004.

ST. LEGER, R. J.; WANG, J. B. *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. *Open Biology*, v. 10, n. 12, p. 200307, 2020.

SETIADI, E. R.; DOEDT, T.; COTTIER, F.; NOFFZ, C.; ERNST, J. F. Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: Linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *Journal of Molecular Biology*, v. 361, n. 3, p. 399-411, 2006/08/18/ 2006.

SETLOW.B; SETLOW.P. Role of DNA Repair in *Bacillus subtilis* Spore Resistance. *Journal of Bacteriology*. p. 3486 –3495, 1996.

SHABANA, Y. M.; ELWAKIL, M. A.; CHARUDATTAN, R. Effect of nutrition and physical factors on mycelial growth and production of pigments and nonchromatic UV-absorbing compounds of *Alternaria eichhorniae*. *J. Phytopathology*, v. 149, n. 1, p. 21-27, 2001.

SHIMIZU, M.; FUJII, T.; MASUO, S.; FUJITA, K.; TAKAYA, N. Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteomics*, v. 9, n. 1, p. 7-19, Jan 2009.

SHIMIZU, M.; FUJII, T.; MASUO, S.; TAKAYA, N. Mechanism of de novo branched-chain amino acid synthesis as an alternative electron sink in hypoxic *Aspergillus nidulans* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 5, p. 1507-1515, Mar 2010.

SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell*. v. 1, p. 639-648, 1998.

SOUZA, R. K. F.; AZEVEDO, R. F. F.; LOBO, A. O.; RANGEL, D. E. N. Conidial water affinity is an important characteristic for thermotolerance in entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci and Technol*, v. 24, n. 4, p. 448–461, 2014.

ST. LEGER, R. J.; WANG, J. B. *Metarhizium*: jack of all trades, master of many. *Open Biology*, v. 10, n. 12, p. 200307, 2020.

TAYLOR, B. L.; ZHULIN, I. B. PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, n. 2, p. 479-+, Jun 1999.

VASILIEVA, S. SOS Chromotest methodology for fundamental genetic research. *Research in Microbiology*, v. 153, n. 7, p. 435–440, set. 2002.

YAJIMA, H. et al. A eukaryotic gene encoding an endonuclease that specifically repairs DNA damaged by ultraviolet light. *The EMBO journal*, v. 14, n. 10, p. 2393–9, 1995.

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 17, p. 6647–6652, 25 abr. 2006.

WANG, C.; DUAN, Z.; ST. LEGER, R. J. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell*, v. 7, n. 2, p. 302–309, 2008.