

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

**ELVIRA MARQUES DA LUZ DIAS**

**TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES DE METARHIZIUM A ESTRESSE  
OXIDATIVO INDUZIDO POR MENADIONA**

**TOLERANCE OF METARHIZIUM SPECIES TOMENADIONE-INDUCED  
OXIDATIVE STRESS**

São Paulo – SP

2023

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

**ELVIRA MARQUES DA LUZ DIAS**

**TOLERÂNCIA DE ESPÉCIES DE METARHIZIUM A ESTRESSE  
OXIDATIVO INDUZIDO POR MENADIONA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Prof. Dr. Cláudio Alberto Tellez Solto  
**Orientador**

Prof. Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel  
**Coorientador**

São Paulo – SP

2023

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

D532t      DIAS, Elvira Marques da Luz.  
Tolerância de espécies de *Metarhizium* a estresse oxidativo induzido por Menadiona / Elvira Marques da Luz Dias. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2024.  
46 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Carlos Alberto Tellez Soto.

Coorientação: Prof. Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel.

1. Menadiona. 2. Germinação de Conídios. 3. Tolerância ao estresse. 4. Fungos entomopatogênicos. I. Soto, Carlos Alberto Tellez. II. Rangel, Drauzio Eduardo Naretto. III. Título.

CDD 620.28

**TERMO DE APROVAÇÃO**

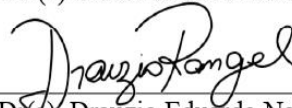
**ELVIRA MARQUES DA LUZ DIAS**

**“TOLERÂNCIA DE ESPECIES DE METARHIZIUM A ESTRESSE OXIDATIVO  
INDUZIDO POR MENADIONA”.**

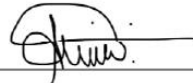
**Dissertação** aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre no  
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia** da Universidade Brasil, pela seguinte banca  
examinadora:



Prof.(a) Dr.(a) Carlos Alberto Tellez Soto (Presidente-Orientador)



Prof.(a). Dr.(a). Drauzio Eduardo Naretto Rangel (Co- Orientador)



Prof.(a) Dr.(a) Alessandra Baptista (Membro Interno)



Prof.(a) Dr.(a) Eliane Mendes Rodrigues (Membro Externo)

São Paulo, 14 de dezembro de 2023

**Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a). Carlos Alberto Tellez Soto**

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:

**"TOLERÂNCIA DE ESPECIES DE METARHIZIUM A ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR MENADIONA".**

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

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Autor(es):

Discente: **ELVIRA MARQUES DA LUZ DIAS**

Assinatura: Elvira Marques da Luz Dias

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Claudio Alberto Tellez Soto**

Assinatura: Claudio Alberto Tellez Soto

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

Assinatura: Drauzio Rangel

São Paulo, 14 de dezembro de 2023

## DEDICATÓRIA

A minha Mãe Emília (in memoriam), minha maiorMestre, com ela aprendi, a priorizar não somente a ciência, mas, sobretudo a essencialidade da vida: o Amor, a Compaixão ea Fé.

A todos os meus filhos de coração, sobrinhos (as), vocês são especiais. Afirmo a todos que a ciência pode fazer a grande diferença, nas nossas escolhas e conquistas.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, fonte de graças, por permitir o Título de Mestre, a ti toda honra e toda glória. Gratidão.

Aos Mestres, especialmente ao Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel pelo apoio, colaboração e direcionamento, sua contribuição foi essencial.

Ao Dr. Claudio Alberto Tellez Solto, pelo acolhimento, paciência e serenidade, sua participação foi fundamental.

Ao meu esposo Iremar, companheiro fiel de todos os momentos.

A Universidade Brasil e a Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Educação – CAPES, pela oportunidade.

## RESUMO

Estresse oxidativo é causado por espécies reativas de oxigênio (EROs), como íon superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Vários tipos de condições de estresse, incluindo calor, radiação UV-A e produtos químicos como diamida, paraquat, menadiona, cloreto de sódio são potentes indutores de EROs. Fungos entomopatogênicos são predispostos a EROs induzidas pelo calor e radiação UV-A quando fora do inseto hospedeiro e quando dentro do hospedeiro, estão sujeitos a células fagocitárias que geram EROs para eliminar patógenos invasores. Este trabalho teve como objetivos avaliar os níveis de tolerância de espécies de *Metarhizium* ao estresse oxidativo induzido pela menadiona e analisar a viabilidade de espécies de *Metarhizium* ao estresse oxidativo em diferentes concentrações de menadiona. A germinação dos conídios foi avaliada 24 h após a inoculação em ágar batata dextrose (BDA) (controle) ou BDA suplementado com menadiona 0,05; 0,07; 0,09; 0,11; 0,13; 0,15 e 0,17 mM. As placas foram mantidas a 26°C no escuro. Os fungos mais resistentes ao estresse oxidativo foram *M. anisopliae* (ARSEF 4570) proveniente da Ilha de Macquarie na Austrália situado no círculo polar antártico e *M. brunneum* (ARSEF 5626) da Finlândia provavelmente por que eles evoluíram a intensa radiação ultravioleta, frio e outros estresses, sendo o fungo mais susceptível ao estresse oxidativo *M. álbum* (ARSEF 2082), provavelmente por causa da sua falta de pigmentação. Nossos resultados contribuem para o entendimento das respostas ao estresse oxidativo dos fungos estudados, o qual estão naturalmente expostos e avultarmos sua utilização como agente de controle biológico.

**Palavras-chave:** Menadiona. Germinação de conídios. Tolerância ao estresse. Fungos entomopatogênicos.

## ABSTRACT

Oxidative stress is caused by reactive oxygen species (ROS) such as superoxide ion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. Various types of stress conditions including heat, UV-A radiation and chemicals such as diamide, paraquat, menadione, sodium chloride are potent inducers of ROS. Entomopathogenic fungi are predisposed to ROS induced by heat and UV-A radiation when outside the insect host and when inside the host, they are subject to phagocytic cells that generate ROS to eliminate invading pathogens. This work aimed to evaluate the tolerance levels of *Metarhizium* species to oxidative stress induced by menadione and to analyze the viability of *Metarhizium* species to oxidative stress in different concentrations of menadione. Conidial germination was evaluated 24 h after inoculation on potato dextrose agar (BDA) (control) or PDA supplemented with 0.05 menadione; 0.07; 0.09; 0.11; 0.13; 0.15 and 0.17 mM. The plates were kept at 26°C in the dark. The fungi most resistant to oxidative stress were *M. anisopliae* (ARSEF 4570) from Macquarie Island in Australia located in the Antarctic Circle and *M. brunneum* (ARSEF 5626) from Finland, probably because they evolved under intense ultraviolet radiation, cold and others. stresses, with *M. album* (ARSEF 2082) being the fungus most susceptible to oxidative stress, probably because of its lack of pigmentation. Our results contribute to the understanding of the responses to oxidative stress of the studied fungi, which are naturally

**Keywords:** Menadione. Germination of conidia. Stress tolerance. Entomopathogenic fungi.

## **DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO**

Os fungos patogênicos de insetos são microrganismos benéficos que ajudam a controlar naturalmente as populações de insetos nocivos em nossas plantações. No entanto, esses fungos também enfrentam desafios para sobreviver e se reproduzir dentro dos insetos hospedeiros, e um desses desafios é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando os fungos produzem moléculas chamadas de "espécies reativas de oxigênio" (ROS) em excesso. Essas ROS podem causar danos às células do fungo, prejudicando seu crescimento e capacidade de infectar outros insetos. Existem várias razões pelas quais os fungos patogênicos de insetos enfrentam estresse oxidativo, como a resposta de defesa do hospedeiro e mudanças ambientais. Para lidar com o estresse oxidativo, os fungos têm mecanismos internos de defesa. Eles produzem enzimas antioxidantes, agindo como mecanismos de defesa, que ajudam a neutralizar as ROS e proteger suas células dos danos. Quando os fungos têm uma defesa antioxidante forte e suficiente, eles podem sobreviver ao estresse oxidativo e continuar combatendo as pragas de insetos de forma eficaz. Compreender como o estresse oxidativo afeta os fungos patogênicos de insetos é importante para melhorar as estratégias de controle biológico. Ao entender os mecanismos de defesa antioxidante dos fungos, os cientistas podem desenvolver formas de torná-los mais resistentes e, assim, aumentar sua eficácia na proteção de nossas culturas. Isso nos permite reduzir a dependência de pesticidas químicos, promovendo uma agricultura mais sustentável e conveniente ao meio ambiente.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> Esquema do experimento com o estresse oxidativo. ....   | 24 |
| <b>Figura 2</b> Preparação do experimento com estresse oxidativo. Cada coluna de placas de Petri é de um isolado e as sete concentrações de menadione mais o controle. .... | 25 |
| <b>Figura 3</b> Contagem de germinação a 400x magnificação. ....  | 25 |
| <b>Figura 4</b> Agrupamento dos isolados segundo a distância da Matriz Euclidiana ....  | 28 |
| <b>Figura 5</b> Germinação média de conídios de 3 fungos entomopatogênicos do grupo A Tolerância baixa. ....  | 29 |
| <b>Figura 6</b> Germinação média de conídios de 7 fungos entomopatogênicos do grupo Grupo B - Tolerância moderada.....  | 30 |
| <b>Figura 7</b> Germinação média de conídios de 6 fungos entomopatogênicos do grupo C Tolerância alta.....  | 31 |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....  | 11 |
| 2 OBJETIVOS E HIPÓTESES.....  | 13 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 13 |
| 2.2 HIPÓTESE .....  | 13 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA.....  | 14 |
| 3.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E CONTROLE BIOLÓGICO .....                   | 14 |
| 3.2 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>METARHIZIUM</i> .....                        | 15 |
| 3.3 HISTÓRIA DO FUNGO <i>METARHIZIUM</i> .....                            | 17 |
| 3.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....   | 18 |
| 3.4 IMPORTÂNCIA DA MENADIONA EM ESTUDOS SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO<br>..... | 19 |
| 3.5 TOLERÂNCIA DE FUNGOS A DIFERENTES ESTRESSES DO MEIOAMBIENTE<br>.....  | 20 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS  |    |
| 4.1 ISOLADOS DE FUNGOS E CONDIÇÕES DE CULTURA .....                       | 23 |
| 4.2 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DA MENADIONA .....                             | 24 |
| 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 26 |
| 5 RESULTADOS.....   | 27 |
| 6 DISCUSSÃO .....   | 32 |
| 7 CONCLUSÃO .....   | 35 |
| REFERÊNCIAS.....  | 36 |
| APÊNDICE .....  | 45 |

## 1 INTRODUÇÃO

Vários estudos utilizam espécies de fungos entomopatogênicos de insetos principalmente dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Sporothrix*, estes são utilizados em diferentes programas de controle biológico de insetos-praga no Brasil. Esses fungos são importantes agentes de controle biológico usados como alternativa aos inseticidas em diversos países do mundo (Alston, Rangel *et al.*, 2005; Li, Alves *et al.*, 2010; Moura Mascarin, Biaggioni Lopes *et al.*, 2018).

Ao parasitar os insetos, estes fungos causam sua morte e conseqüentemente o controle biológico das pragas por meio de epizootias. O esporo do fungo adere a superfície do inseto, germinam as estruturas fúngicas que penetram a cutícula dos insetos, superam o sistema de defesa do hospedeiro, proliferando as estruturas de disseminação para o controle do inseto-praga. Eles continuam se proliferando no corpo do inseto já morto e se espalham na plantação (Roberts e St. Leger, 2004).

Em campo, estes fungos em geral podem ser inativados, fora do hospedeiro e não conseguir os efeitos de controle de pragas desejado, pela ação da radiação solar tanto de raios UV quanto térmicas e pelo estresse nutritivo (Fridovich, 1978c; a; b). Todas essas condições geram estresse oxidativo que podem inativar o fungo. O mesmo pode ocorrer com o fungo no interior de insetos por ação do sistema imunológico dos mesmos (Lavine e Strand, 2002).

O estresse oxidativo produzido pelo sistema de defesa imune do inseto induz várias mudanças nas biomoléculas com inativação de suas funções (Halliwell e Whiteman, 2004). Os ácidos graxos insaturados são degradados, causando uma diminuição na fluidez da membrana plasmática. As proteínas apresentam modificações de cadeias laterais de aminoácidos, alterando sua estrutura e inativando sua ação catalítica. As quebras de fita simples e dupla ocorrem na espinha dorsal do DNA com perda de bases, prejudicando assim a replicação. Todas essas alterações são deletérias para a célula, e pode causar morte celular (Pungartnik, Melo *et al.*, 2009).

O efeito hormesis corresponde a um conjunto de respostas adaptativas dos sistemas biológicos a desafios ambientais ou internos, através das quais o sistema melhora as suas funcionalidades e/ou tolerância a desafios mais severos. Este fenômeno tem merecido atenção dos cientistas nas últimas décadas, contribuindo para

o reconhecimento das suas bases evolutivas. Hormésis é, portanto, uma resposta das células e organismos a desafios (estresse) externos ou gerados intrinsecamente.

Para testar os fungos resistentes ao estresse oxidativo em laboratório, e fazer o desenvolvimento do melhor fungo para o controle do inseto-praga, são utilizados produtos químicos, como menadiona, diamida e paraquat (Gulshan, Lee *et al.*, 2011). A Menadiona, escolhida como agente estimulante do estresse oxidativo nesse estudo, é uma quinona que produz radical superóxido na célula (Mutoh, Kawabata *et al.*, 2005). Nos fungos, o peróxido de hidrogênio é gerado pela menadiona a partir da oxidação de hidroquinonas (Watanabe e Forman, 2003).

Neste contexto, o controle de pragas que infestam lavouras é objeto de grande interesse para a ciência por representar importante retorno financeiro e econômico, sendo um dos desafios mundiais de maior relevância as plantações agrícolas em escala global que representam negócios bilionários entre países, como é o caso do Brasil, as pragas podem causar prejuízos relacionados à produtividade e lucratividade.

Sendo assim, o aprimoramento de patógenos fúngicos que parasitam insetos bem como o conhecimento sobre tolerâncias ao estresse, aos quais estarão naturalmente expostos é extremamente necessário para melhorar a eficiência e efetividade destes fungos. Para tanto, técnicas para o melhoramento fúngico tem sido alvo de pesquisas na área da engenharia, para vencer os desafios do ambiente e o controle natural dos insetos-praga, que sem o controle adequado podem causar uma verdadeira destruição nos agroecossistemas do mundo.

## 2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

Testar a tolerância e a germinação de diferentes espécies de *Metarhizium* expostos ao estresse oxidativo induzido pela menadiona.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os níveis de tolerância de espécies de *Metarhizium* ao estresse oxidativo induzido pela menadiona.

Analisar a viabilidade de espécies de *Metarhizium* ao estresse oxidativo em diferentes doses de menadiona.

### 2.2 HIPÓTESE

Diferentes espécies de *Metarhizium* exibirão variações significativas em sua capacidade de resistir ao estresse oxidativo induzido pela menadiona, com algumas espécies demonstrando maior tolerância do que outras. Essa variação na tolerância ao estresse oxidativo pode estar relacionada à expressão diferencial de genes antioxidantes e ao sistema de defesa antioxidante de cada espécie de *Metarhizium*, refletindo adaptações evolutivas às condições ambientais específicas de suas respectivas origens. A hipótese deste estudo é que diferentes espécies de *Metarhizium* exibirão variações significativas em sua tolerância ao estresse oxidativo induzido pela menadiona, refletindo diferenças nas adaptações bioquímicas e genéticas dessas espécies em resposta a desafios oxidativos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E CONTROLE BIOLÓGICO

Os fungos patógenos de insetos têm sido objeto de interesse e estudo por cientistas e entomologistas há décadas devido ao seu papel fundamental na regulação natural das populações de insetos. Esses microrganismos, pertencentes ao reino Fungi, são capazes de infectar uma ampla variedade de espécies de insetos, desde pragas agrícolas até vetores de doenças. A relação entre fungos patógenos e insetos é complexa uma vez que esses microrganismos encontram no corpo de seus hospedeiros um ambiente propício para sua multiplicação e desenvolvimento. Nesta introdução, exploraremos alguns dos principais aspectos dos fungos patógenos de insetos, desde sua diversidade até os mecanismos de infecção e os possíveis impactos na agricultura e no controle biológico de pragas.

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, Alves *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, Alves *et al.*, 2010). E o Brasil continua na liderança com uso de fungos patógenos de insetos até o atual momento (Moura Mascarin, Biaggioni Lopes *et al.*, 2018).

Os fungos entomopatogênicos são encontrados em ecossistemas agrícolas e naturais (Roberts e St. Leger, 2004) e são considerados um dos principais agentes de controle biológico de pragas agrícolas (Li, Alves *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, Bruckart *et al.*, 1996). Diferentemente de outros microrganismos 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 microrganismo durante a alimentação (Roberts e 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 e St. Leger, 2004). Além da penetração física, ocorre a ação de enzimas (proteases, lipases e quitinases) que digerem o exoesqueleto do inseto (Roberts e 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 e St. Leger, 2004).

Os fungos entomopatogênicos mais estudados pertencem aos gêneros *Aschersonia*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, *Hirsutella* e *Verticillium* (Humber, 2007; Humber, 2008). Os gêneros mais estudados usados em programas de controle biológico são *Metarhizium* e *Beauveria* (Li, Alves *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 e Wraight, 2007). Mundialmente são encontrados diversos produtos comerciais para controle biológico contendo *B. bassiana* como ingrediente ativo (Faria e 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, Alves *et al.*, 2010).

### **3.2 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *METARHZIUM***

O gênero *Metarhizium* é extremamente importante devido à sua natureza entomopatogênica, ou seja, sua capacidade de infectar e matar insetos. A contribuição dos fungos patogênicos é vasta, desempenham papel fundamental tanto para ecologia quanto para a área econômica, devido ao seu uso com agente de controle biológico. Essa importância se estende aos setores da agricultura, pesquisa científica e a saúde pública.

Controle de Pragas Agrícolas: O fungo *Metarhizium* é amplamente utilizado como um agente de controle biológico para combater pragas agrícolas. Os fungos deste gênero são eficazes contra uma variedade de insetos, como besouros, gafanhotos, moscas, larvas de insetos e formigas, entre outros. Isso reduz a necessidade de pesticidas químicos, que podem ser prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana(Li, Alves *et al.*, 2010).

Sustentabilidade Agrícola: A capacidade do fungo *Metarhizium* de controlar pragas de insetos de forma seletiva e direcionada torna-o uma ferramenta valiosa para a agricultura sustentável. Ele ajuda a manter o equilíbrio natural dos ecossistemas agrícolas, reduzindo o impacto negativo sobre a biodiversidade e o solo(St. Leger, 2008; Li, Alves *et al.*, 2010).

Menor Resistência de Insetos: Os insetos têm mostrado uma menor tendência a desenvolver resistência aos fungos *Metarhizium* em comparação com os pesticidas químicos. Isso ocorre porque os fungos atacam os insetos de maneira mais complexa, envolvendo-se em uma relação de coevolução que torna mais difícil o desenvolvimento de resistência (Li, Alves *et al.*, 2010).

Segurança Alimentar: A utilização do fungo *Metarhizium* como um meio de controle de pragas em cultivos agrícolas contribui para uma maior segurança alimentar, uma vez que reduz a perda de colheitas devido a infestações de insetos. Menos pragas significam maior produção de alimentos (Li, Alves *et al.*, 2010).

Proteção da Saúde Pública: Além de sua aplicação na agricultura, o fungo *Metarhizium* também é usado no controle de vetores de doenças, como mosquitos transmissores de malária, dengue e Zika vírus. Isso ajuda a reduzir a propagação de doenças infecciosas em populações humanas, contribuindo para a saúde pública (Scholte, Njiru *et al.*, 2003; Scholte, E.J., Knols, B.G. *et al.*, 2004; Scholte, E. J., Knols, B. G. *et al.*, 2004; Scholte, Ng'habi *et al.*, 2005; Scholte, Knols *et al.*, 2006; Muniz, Catão *et al.*, 2017; Rangel, Piedrabuena *et al.*, 2020).

Pesquisa Científica: O gênero *Metarhizium* é uma fonte valiosa de estudo para cientistas e pesquisadores interessados em entomologia, ecologia de insetos, microbiologia e controle biológico. Seu estudo pode levar a desenvolvimentos futuros na área de biocontrole e na compreensão das interações entre fungos entomopatogênicos e seus hospedeiros(Li e Feng, 2009; Li, Ying *et al.*, 2010; Gao, Jin *et al.*, 2011; Peng, Guo *et al.*, 2021).

O gênero *Metarhizium* desempenha, portanto, um papel fundamental na

promoção de práticas agrícolas mais sustentáveis, na proteção da saúde pública e na redução do impacto ambiental associado ao uso de pesticidas químicos. Sua importância se estende a múltiplas esferas, contribuindo para um equilíbrio mais saudável entre a agricultura, a natureza e a sociedade.

### 3.3 HISTÓRIA DO FUNGO *METARHIZIUM*

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* tem uma história rica e fascinante que se estende por vários séculos. Sua história está interligada com o desenvolvimento da entomologia, da micologia e da busca por métodos sustentáveis de controle de pragas (Lacey, Frutos *et al.*, 2001; Lord, 2005; Lacey, Grzywacz *et al.*, 2015).

A primeira espécie conhecida do gênero *Metarhizium* foi um isolado de insetos infectados na Ucrânia no final da década de 1870. Era originalmente denominado *Entomophthora anisopliae* com base no nome genérico de seu hospedeiro escaravelho, *Anisopliae* austríaco por Metschnikoff em 1879. O fungo foi renomeado como *Isariadestructor* no ano seguinte por Metschnikoff em 1880. Ambas as colocações genéricas estavam incorretas, então um novo nome genérico, *Metarhizium* foi proposto para este fungo por Sorokin em 1883. O nome específico original "anisopliae" foi mantido (Roberts e St. Leger, 2004).

A investigação científica formal de *Metarhizium anisopliae* e suas propriedades entomopatogênicas começou no final do século XIX. Cientistas e pesquisadores começaram a estudar sistematicamente fungos que infectavam insetos e outros artrópodes. *Metarhizium anisopliae* estava entre os fungos identificados como candidatos promissores para o controle de insetos (Lacey, Frutos *et al.*, 2001; Roberts e St. Leger, 2004; Lord, 2005; Lacey, 2012; Lacey, Grzywacz *et al.*, 2015).

Hoje, *Metarhizium anisopliae* continua a desempenhar um papel vital nas estratégias integradas de manejo de pragas em todo o mundo. A sua rica história reflete os esforços contínuos de cientistas e investigadores para aproveitar o poder da natureza para o controle sustentável de pragas, minimizando ao mesmo tempo o impacto ambiental da agricultura.

### 3.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é um processo biológico que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do organismo em neutralizá-las usando antioxidantes. As EROs são moléculas altamente reativas, como radicais livres, peróxidos e outras espécies, que podem causar danos aos componentes celulares, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Esse desequilíbrio pode levar a danos celulares e está associado a várias doenças humanas, incluindo doenças neurodegenerativas, câncer, diabetes e outras condições crônicas (Auten e Davis, 2009).

Fungos patógenos de insetos são organismos que infectam e causam doenças em insetos hospedeiros. Esses fungos geralmente produzem esporos que entram no corpo do inseto e se desenvolvem internamente, causando a morte do hospedeiro. O processo de infecção e colonização dos tecidos do inseto hospedeiro pelo fungo é influenciado por diversos fatores, incluindo a resposta imunológica do inseto (Roberts e St. Leger, 2004).

Em organismos, como insetos, o estresse oxidativo também pode desempenhar um papel importante na resposta imune e no combate a infecções causadas por patógenos, incluindo fungos patógenos. Quando os insetos são infectados por fungos patogênicos, ocorrem respostas imunológicas complexas, que frequentemente envolvem a geração de EROs para combater a infecção. Ao serem expostos aos fungos patogênicos, os insetos frequentemente desencadeiam uma resposta imune, que inclui a ativação de células imunológicas especializadas, como hemócitos, e a produção de compostos tóxicos, como EROs. A geração de EROs é uma estratégia usada pelo inseto para tentar combater a infecção fúngica, uma vez que essas espécies reativas podem danificar o fungo e suas estruturas celulares. No entanto, alguns fungos patogênicos de insetos desenvolveram adaptações para lidar com o estresse oxidativo gerado pelos insetos hospedeiros. Eles podem possuir enzimas antioxidantes eficientes que ajudam a neutralizar as EROs ou possuir mecanismos de resistência para evitar serem danificados por essas moléculas reativas. Além disso, o estresse oxidativo também pode influenciar a dinâmica da interação entre o fungo patogênico e o inseto hospedeiro. Em alguns casos, o estresse oxidativo pode levar a uma menor capacidade do inseto em combater a infecção,

tornando-o mais suscetível à doença. Em outros casos, o estresse oxidativo pode atuar como um mecanismo de sinalização, regulando a expressão de genes envolvidos na resposta imune do inseto (Miller, Rangel *et al.*, 2004; Wang, Duan *et al.*, 2008; Zhang, Zhao *et al.*, 2009; Qu e Wang, 2018).

O estresse oxidativo, portanto, desempenha um papel importante na interação entre fungos patogênicos e insetos hospedeiros. Essa relação é complexa e pode variar dependendo das espécies envolvidas, mas compreender como o estresse oxidativo influencia essa interação pode fornecer conhecimentos importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas baseadas em fungos patogênicos e para o estudo da imunidade de insetos.

### **3.5 IMPORTÂNCIA DA MENADIONA EM ESTUDOS SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO**

A menadiona, também conhecida como vitamina K3, desempenha um papel crucial nos estudos sobre estresse oxidativo devido às suas propriedades como agente indutor de estresse oxidativo. Ela é frequentemente usada em pesquisas para avaliar a capacidade das células e organismos de lidar com o estresse oxidativo e suas respostas a esse desafio (Borges, Borges-Perez *et al.*, 2004; Azevedo, Souza *et al.*, 2014; Kazmierczak-Baranska e Karwowski, 2022).

**Indução controlada de estresse oxidativo:** A menadiona é uma substância que gera espécies reativas de oxigênio (ROS) quando metabolizada pelas células. Isso torna uma ferramenta valiosa para induzir de forma controlada o estresse oxidativo em experimentos. Isso permite aos pesquisadores estudar as respostas das células e organismos ao estresse oxidativo de forma padronizada (Gessler, Sokolov *et al.*, 2002; Herdeiro, Pereira *et al.*, 2006; Fernandes, Mannarino *et al.*, 2007).

**Avaliação das defesas antioxidantes:** O uso da menadiona permite a avaliação das defesas antioxidantes naturais das células e organismos. Quando o estresse oxidativo é induzido pela menadiona, as células podem ativar mecanismos de defesa, como a produção de enzimas antioxidantes (por exemplo, superóxido dismutase e catalase) e antioxidantes não enzimáticos (como o glutathione). Isso possibilita o estudo das estratégias de proteção celular contra danos causados pelos ROS (Cuellar-Cruz, Castano *et al.*, 2009).

**Estudos de viabilidade celular e apoptose:** A menadiona pode causar danos

celulares significativos devido à geração de ROS. Portanto, seu uso em estudos de estresse oxidativo é valioso para avaliar a viabilidade celular e a indução de processos como apoptose. Isso fornece informações sobre a capacidade das células de se recuperar do estresse oxidativo ou de entrar em um estado de morte programada (Magnani, Soriani *et al.*, 2008; Sha, Martins *et al.*, 2013; Ramos-Perez, Lorenzo-Castrillejo *et al.*, 2014).

Relevância para doenças relacionadas ao estresse oxidativo: O estresse oxidativo desempenha um papel importante em muitas doenças humanas, como câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e envelhecimento. O uso da menadiona em pesquisas permite a investigação das respostas celulares ao estresse oxidativo, o que pode ajudar a entender melhor os mecanismos subjacentes a essas doenças e desenvolver estratégias terapêuticas (Tomasetti, Nocchi *et al.*, 2012; Na, Han *et al.*, 2013; Jones, Liu *et al.*, 2021; Kazmierczak-Baranska e Karwowski, 2022; Mishra, Park *et al.*, 2022).

A menadiona, portanto, desempenha um papel fundamental na pesquisa sobre estresse oxidativo, fornecendo uma ferramenta versátil para induzir estresse oxidativo controlado e estudar as respostas celulares a ele. Isso não apenas aumenta nossa compreensão dos mecanismos de defesa antioxidante, mas também tem implicações importantes para o desenvolvimento de terapias e o entendimento de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

### **3.6 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 (Roberts e Campbell, 1977). 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 e 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, Braga *et al.*, 2005; Rangel, Fernandes *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, Monnerjahn *et al.*, 1998; Rangel, 2011). Entre os genes de choque térmico existentes em *M. robertsii* são as *hsp 30* e *hsp 101* (Dias, Pedrini *et al.*, 2020). Outro exemplo de mecanismo é a acumulação endógena de polióis e trealose ligada à resistência biológica dos fatores abióticos ambientais adversos (Singer e Lindquist, 1998). A utilização da substância poliol 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 (Singer e Lindquist, 1998; Rangel, Anderson *et al.*, 2008).

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, 1978c; a; b). 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, 1978c; a; b). 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 e 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, Anderson *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 e 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, Wang *et al.*, 2011), 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 e Lindquist, 2010). Em *M. robersii* os genes que codificam superóxido dismutase (*sod1* e *sod2*) e catalase (*catc*) (Dias, Pedrini *et al.*, 2020).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Para o cumprimento do objetivo proposto por esse estudo, foi delineado o estudo experimental fatorial com dois fatores, o primeiro determinado com as espécies de fungos *Metarhizium*, e o segundo com as dosagens de menadiona. A variável observada foi a germinação dos conídios dos fungos.

### 4.1 ISOLADOS DE FUNGOS E CONDIÇÕES DE CULTURA

Todos os isolados foram obtidos da coleção USDA-ARS de Culturas de fungos entomopatogênicos (ARSEF, Robert W. Holley Center for Agriculturee Saúde, Ithaca, NY, EUA) (Tabela 1). ARSEF = *ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures*. O objetivo da Coleção ARSEF é fornecer suporte fundamental para pesquisas básicas e aplicadas sobre fungos patógenos de invertebrados). As culturas de estoque foram mantidas a 4°C em teste tubos inclinados de ágar batata dextrose (Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) (PDA) ajustado para pH 6, 9. Os conídios de cada isolado foram produzidos em 23 ml de meio BDA em placas de Petri de poliestireno (95 ×15 mm).

**Tabela 1** - Espécie de fungos e sua origem geográfica

| Isolate    | Species                            | Substrate/Host  | Geographic Origin                              | Year |
|------------|------------------------------------|---|--|------|
| ARSEF 23   | <i>Metarhizium robertsii</i>       | <i>Conoderus sp.</i> [Coleoptera: Elateridae]                               | North Carolina, USA                            | 1961 |
| ARSEF 324  | <i>Metarhizium acridum</i>         | <i>Austracris guttulosa</i> [Orthoptera: Acrididae]                         | Queensland, Australia                          | 1979 |
| ARSEF 1187 | <i>Metarhizium brunneum</i>        | <i>Oxycanus sp.</i> [Lepidoptera: Hepialidae]                               | Palmerston North, New Zealand                  | 1966 |
| ARSEF 1545 | <i>Metarhizium pingshaense</i>     | Adult, <i>Scotinophara coarctata</i> [Hemiptera: Pentatomidae] on rice      | Philippines: Brooke's Point region, Palawan    | 1984 |
| ARSEF 2082 | <i>Metarhizium album</i>           | <i>Cofana spectra</i> [Hemiptera: Cicadellidae]                             | Kotamobagu, Sulawesi Utara, Celebes, Indonesia | 1985 |
| ARSEF 2134 | <i>Metarhizium robertsii</i>       | <i>Phyllophaga ?anxia</i> [Coleoptera: Scarabaeidae]                        | Southern Quebec, Canada                        | 1985 |
| ARSEF 2341 | <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. | <i>Scotinophara coarctata</i> [Hemiptera: Pentatomidae]                     | Palawan, Philippines                           | 1986 |
| ARSEF 2547 | <i>Metarhizium robertsii</i>       | <i>Rhizotrogus majalis</i> [Coleoptera: Scarabaeidae]                       | Syracuse, New York, USA                        | 1987 |
| ARSEF 2560 | <i>Metarhizium robertsii</i>       | <i>Atta sexdens rubropilosa</i> [Hymenoptera: Formicidae]                   | Piracicaba, Sao Paulo, Brazil                  | 1988 |
| ARSEF 2575 | <i>Metarhizium robertsii</i>       | <i>Curculio caryae</i> [Coleoptera: Curculionidae]                          | South Carolina, USA                            | 1988 |
| ARSEF 3341 | <i>Metarhizium acridum</i>         | <i>Ornithacris cavroisi</i> [Orthoptera: Acrididae]                         | Niamey, Niger                                  | 1991 |
| ARSEF 3609 | <i>Metarhizium acridum</i>         | <i>Patanga succincta</i> [Orthoptera: Acrididae]                            | Thailand                                       | 1992 |
| ARSEF 4343 | <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. | Soil  | Macquarie Island, Australia                    | 1994 |
| ARSEF 4570 | <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. | Soil  | Macquarie Island, Australia                    | 1993 |
| ARSEF 5626 | <i>Metarhizium brunneum</i>        | <i>Tenebrio molitor</i> [Coleoptera: Tenebrionidae] bait from soil          | Pälkäne, Hämeen Lääni, Finland                 | 1986 |
| ARSEF 5749 | <i>Metarhizium anisopliae</i> s.l. | <i>Schistocerca piceifrons</i> [Orthoptera: Acrididae]                      | Cerro de Ortega, Colima, Mexico                | 1992 |
| ARSEF 7711 | <i>Metarhizium brunneum</i>        | I Earth BioScience F52; IMI 385045  | Austria  | 2005 |
| ARSEF 7847 | <i>Metarhizium guizhouense</i>     | Soil sample baited with <i>Galleria mellonella</i> [Lepidoptera: Pyralidae] | Snowflake, Arizona                             | 2005 |

s.l. = sensu lato

**Fonte:** ARSEF, Robert W. Holley Center for Agriculturee Saúde, Ithaca, NY, EUA.

Uma suspensão de conídios ( $100 \times 10^7$  conídios/ml) foi inoculado uniformemente com um espalhador de haste de vidro no meio de ágar. As culturas

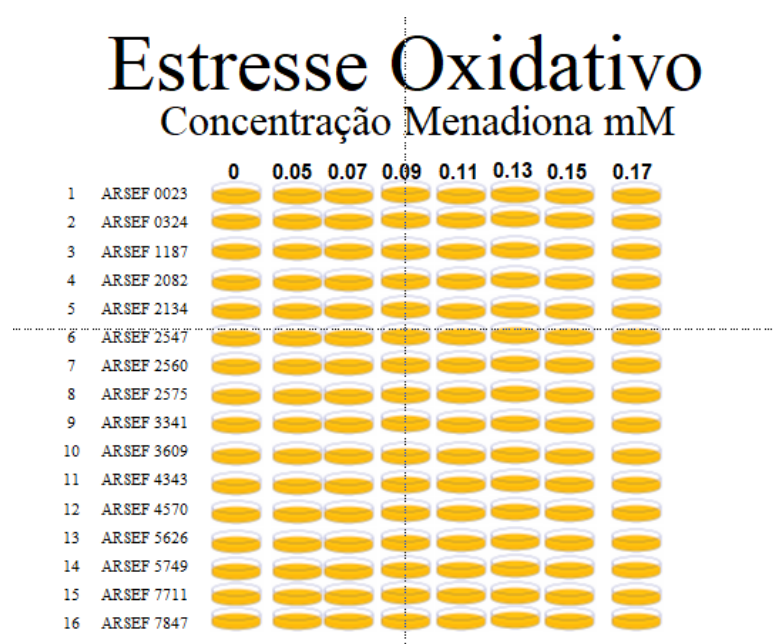
foram incubadas no escuro a  $26 \pm 1$  °C por 14 dias. Cada tratamento foi repetido duas vezes, com um novo lote de conídios produzidos para cada repetição.

#### 4.2 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DA MENADIONA

Para preparar inóculo para experimentos de estresse oxidativo, conídios aéreos foram removidos com uma alça microbiológica sem tocar o substrato e suspenso em 10 ml de solução estéril de Tween 80 (0,01% v/v) (Sigma -Aldrich Corporation, EUA) usando tubos Pyrex (20 x 125 mm) (Corning, Corning, NY, EUA). As suspensões (conídios/ml) foram vigorosamente agitadas (vórtice), e 40 µl das suspensões foram inoculado em PDA (controle) ou PDA suplementado com o superóxido forte agente gerador: menadiona (bissulfato de sódio de menadiona) 2-metil-1,4 -naftoquinona (Sigma-Aldrich Corporation, EUA) em placas de Petri de poliestireno (12 x 40 milímetros) de acordo com (Azevedo, Souza *et al.*, 2014).

Para todos os isolados, foram utilizadas 7 concentrações de menadiona de 0,00 (controle), 0,05, 0,07, 0,09, 0,11, 0,13, 0,15 e 0,17mM. As placas foram incubadas por 24 horas a 26°C (figura 1). A Germinação foi observado em 24 após a suspensão de conídios ter sido inoculada no meio. A placa de ágar foi coberta com uma lamínula e examinada ao microscópio de luz a 400 x-ampliação. (figura 3).

**Figura 1** Esquema do experimento com o estresse oxidativo.



Fonte: Dados do Estudo

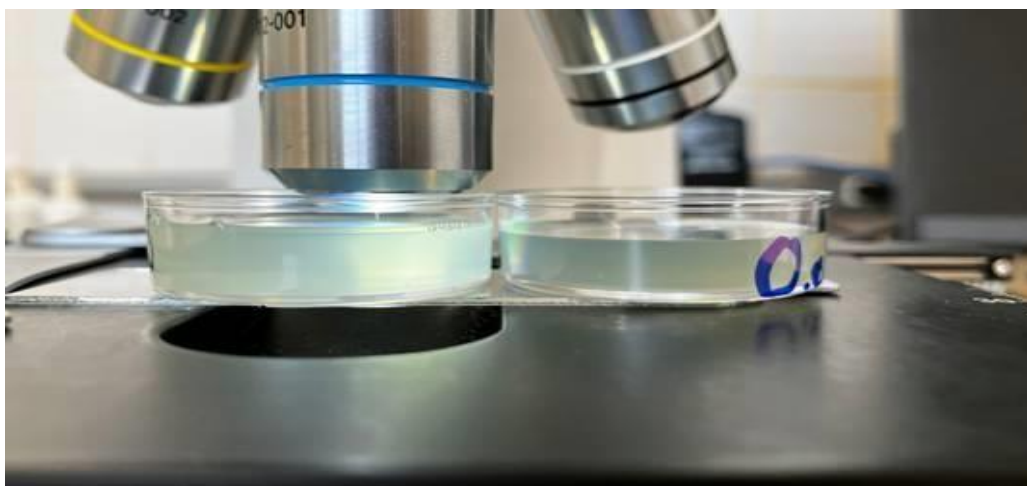
Para o esquema do experimento com o estresse oxidativo foram usadas 128 placas de Petri (12 x 40 mm) com meio BDA suplementado com menadiona. As placas foram incubadas por 24 horas a 26°C (figura 2). As repetições foram feitas em datas diferentes com culturas diferentes = total de placas de Petri = 384 após as três repetições. 5 ml de meio de cultura por placa de Petri. Os conídios foram considerados germinados quando o tubo germinativo apresentou projeção visível do conídio (Milner, Huppertz *et al.*, 1991). Pelo menos 300 conídios por placa foi avaliada e a porcentagem de germinação foi calculada (Rangel, Anderson *et al.*, 2006). Cada experimento foi repetido três vezes com um novo lote de conídios produzidos para cada repetição.

**Figura 2** Preparação do experimento com estresse oxidativo. Cada coluna de placas de Petri é de um isolado e as sete concentrações de menadione mais o controle.



Fonte: Autoria própria

**Figura 3** Contagem de germinação a 400x magnificação.



Fonte: Autoria própria

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com duas repetições. Para a avaliação da germinação dos isolados fúngicos frente à diferentes doses de menadione, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa AGROESTAT (Barbosa e Maldonado Junior, 2015). Foi empregada a técnica de análise multivariada para o agrupamento dos isolados de fungos executado pelo *software* R (R-Core-Team, 2021).

A matriz de distância Euclidiana foi calculada como medida de dissimilaridade e utilizada para o agrupamento dos isolados. A análise de agrupamentos hierárquicos (Sneath e Sokal, 1973) foi realizada com o algoritmo de Ward para obter grupos de acesso semelhantes calculando a distância euclidiana usando a viabilidade conidial da exposição dos isolados as 7 concentrações de menadiona de 0,00 (controle), 0,05, 0,07, 0,09, 0,11, 0,13, 0,15 e 0,17 mM. O resultado da análise foi apresentado em forma de gráfico (dendrograma), que ajudou a identificar os grupos de isolados para comparar a tolerância entre os isolados (Figura 4), um dendrograma obtido a partir de análises de cluster, dividiu todos os isolados fúngicos em três clusters com base em sua tolerância. A análise de agrupamento hierárquico foi processada no software STATISTICA versão 10 (StatSoft, 2010). As tolerâncias dos isolados fúngicos foram classificadas em três categorias: Grupo A – Tolerância baixa; Grupo B – Tolerância moderada; e Grupo C – Tolerância alta. O agrupamento hierárquico fornece excelentes representações visuais porque facilita comparações rápidas e simples de dois ou mais conjuntos de dados (Champely e Chessel, 2002). Tem-se usado agrupamento hierárquico com sucesso para separar diferentes grupos de fungos de acordo com suas tolerâncias ao estresse (Araújo, Dias *et al.*, 2018; Dias, Araújo *et al.*, 2018; Araújo, Ferreira *et al.*, 2020; Lima, Costa *et al.*, 2021; Licona-Juárez, Andrade *et al.*, 2023).

## 5 RESULTADOS

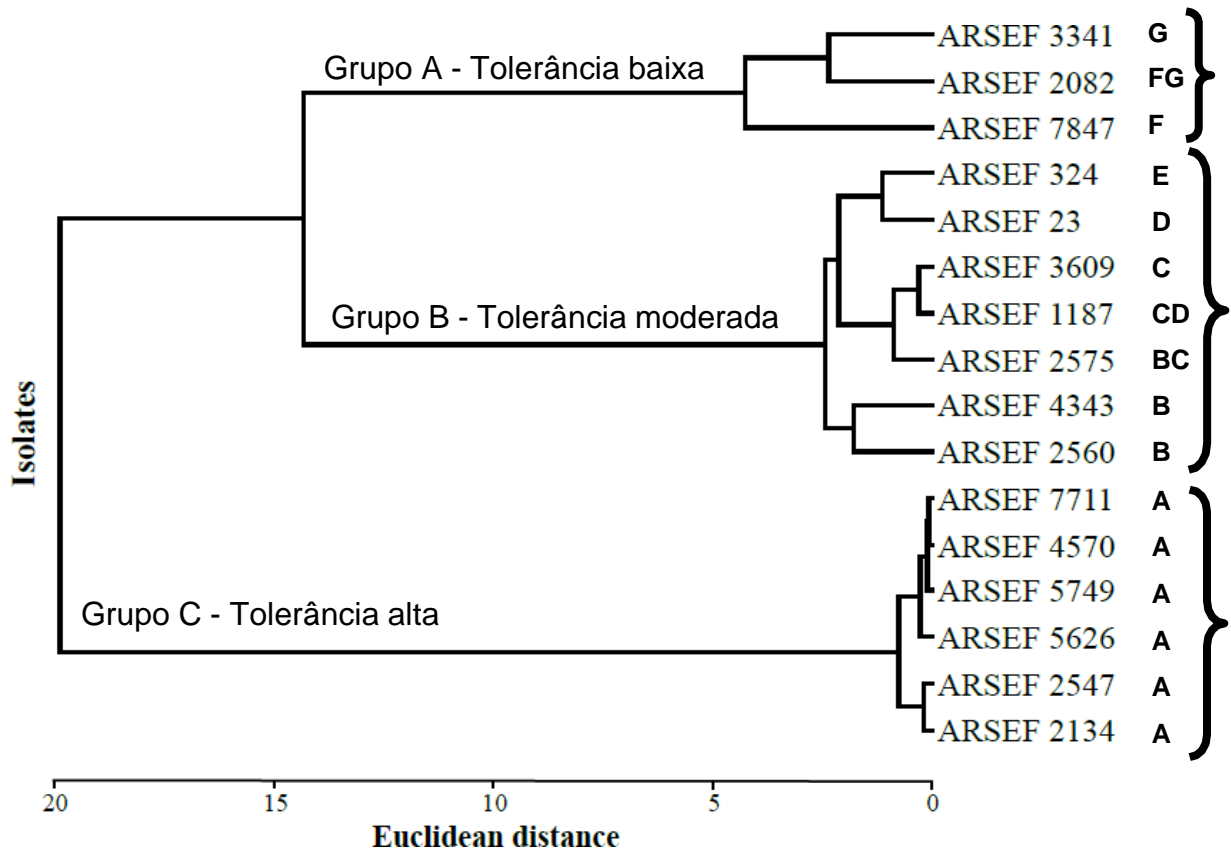
Os experimentos utilizados nesta pesquisa compararam a germinação de diferentes espécies de *Metarhizium* a distintas concentrações de menadiona na simulação do estresse oxidativo. Várias combinações foram testadas em busca da espécie com melhor resistência ao estresse oxidativo, em três repetições. Todas as 16 espécies foram testadas nas variações de concentração da menadiona e a validação das diferenças das médias pelo teste de Tukey (Tabela 1 Apêndice).

Os isolados foram agrupamentos em três categorias de acordo com suas tolerâncias. Os isolados mais suscetíveis a menadiona foram ARSEF 3341 (*M. acridum*), ARSEF 2082 (*M. album*), e ARSEF 7847 (*M. guizhouense*), (Figuras 4). O isolado 3341 zerou a viabilidade de germinação na terceira dose, havendo tolerância baixa ao estresse oxidativo apenas nas concentrações 0,05 e 0,07 (Figura 5).

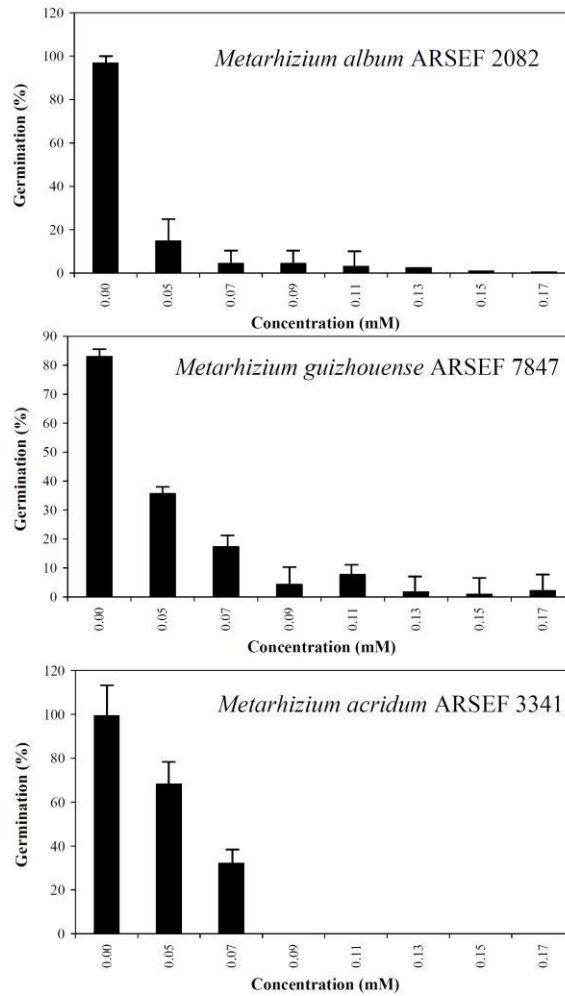
Os isolados que demonstraram moderada tolerância foram ARSEF 4343 (*M. anisopliae*), ARSEF 2575 (*M. robertsii*), ARSEF 2560 (*M. robertsii*), ARSEF 3609 (*M. acridum*), ARSEF 1187 (*M. brunneum*), ARSEF 23 (*M. robertsii*), and ARSEF 324 (*M. acridum*), sendo que neste grupo o isolado mais tolerante foi o ARSEF 4343 e o menos tolerante foi o ARSEF 324 (Figuras 4 e 6).

Os isolados ARSEF 2134 (*M. robertsii*), ARSEF 2547 (*M. robertsii*), ARSEF 4570 (*M. anisopliae*), ARSEF 5626 (*M. brunneum*), ARSEF 5749 (*M. anisopliae*) e ARSEF 7711 (*M. brunneum*) demonstraram maior resistência as variações de estresse oxidativo simuladas pelo uso das diferentes doses de menadiona. (Figuras 4 e 7). Os isolados deste categoria grupo C – Tolerância alta, obtiveram viabilidade germinativa dos fungos, em todas as Concentrações Inibitória Mínima - MIC.

**Figura 4** Agrupamento dos isolados segundo a distância da Matriz Euclidiana

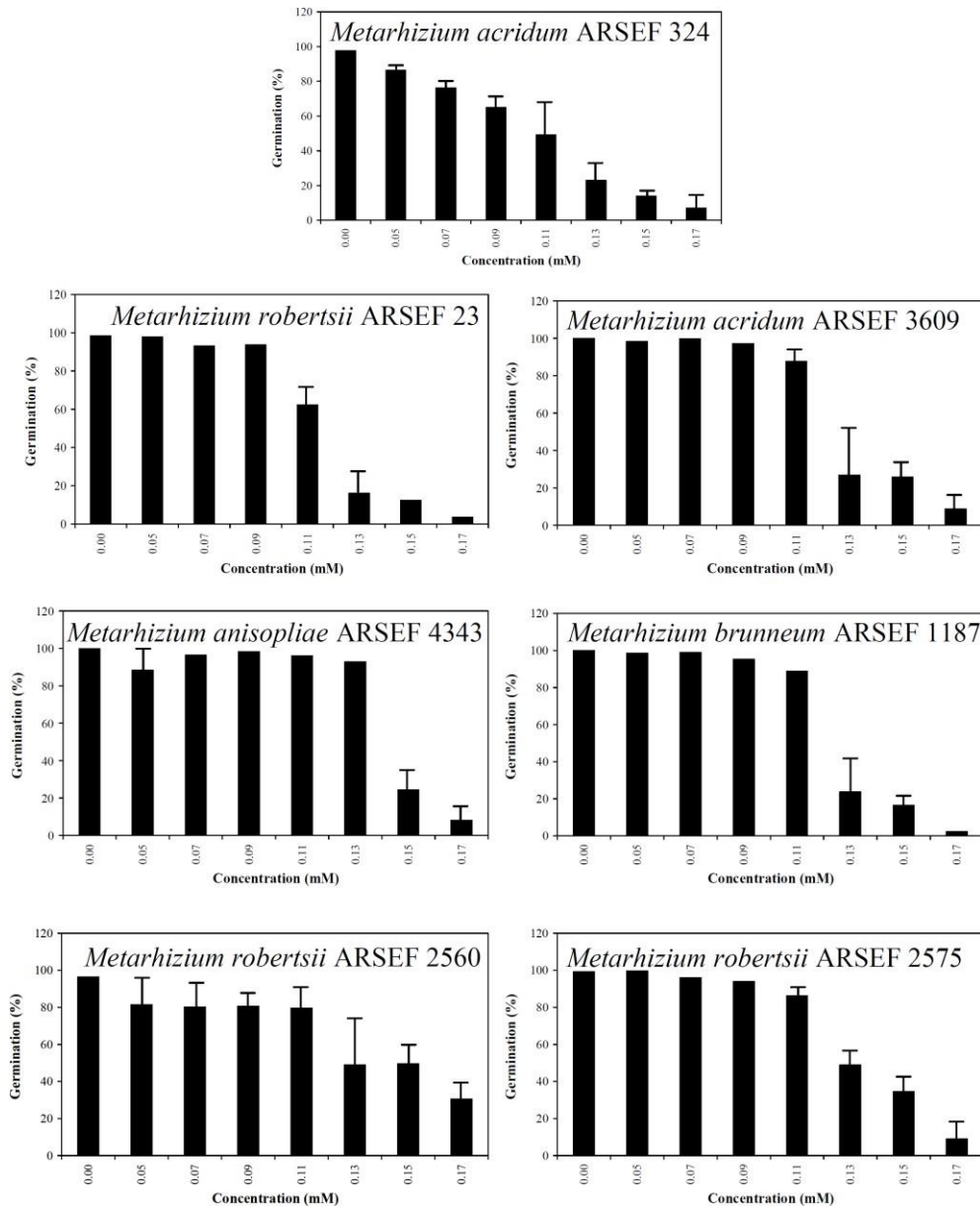


**Figura 5** Germinação média de conídios de 3 fungos entomopatogênicos do grupo A Tolerância baixa. A germinação dos conídios foi avaliada 24 horas após a inoculação em BDA (controle) ou BDA suplementado com menadiona em concentrações milimolar. As placas foram mantidas a 26°C no escuro.



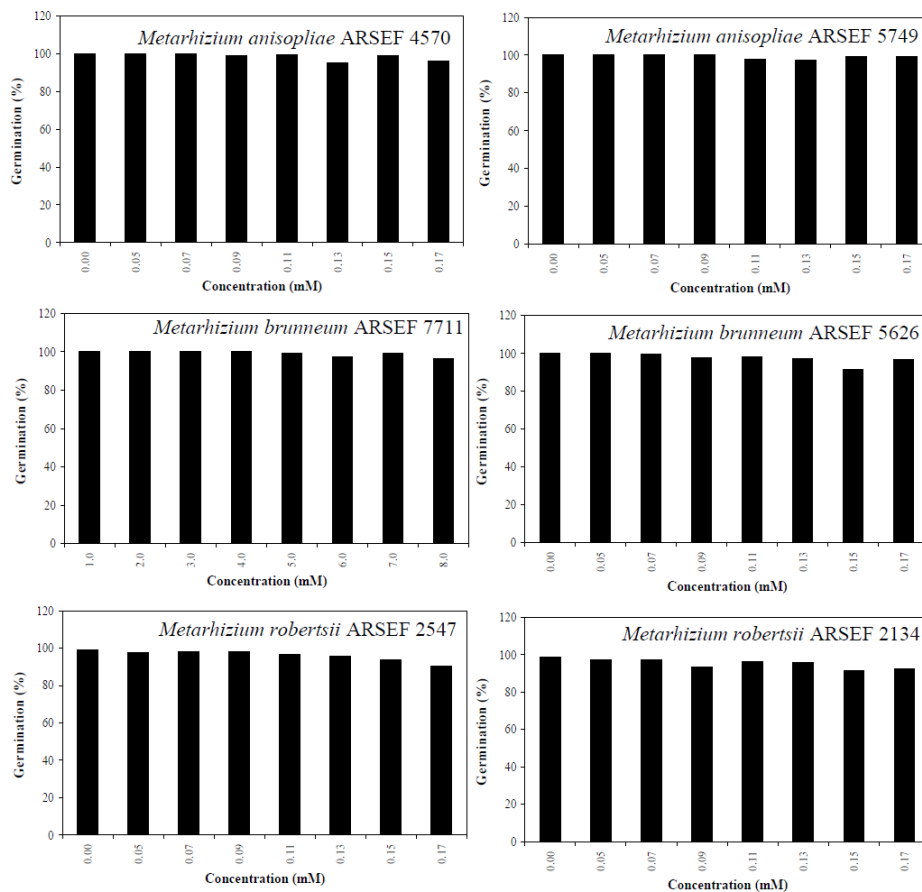
Fonte: Dados do estudo, 2022.

**Figura 6** Germinação média de conídios de 7 fungos entomopatogênicos do grupo Grupo B - Tolerância moderada. A germinação dos conídios foi avaliada 24 horas após a inoculação em BDA (controle) ou BDA suplementado com menadiona em concentrações milimolar. As placas foram mantidas a 26°C no escuro.



Fonte: Dados do estudo, 2022.

**Figura 7** Germinação média de conídios de 6 fungos entomopatogênicos do grupo C Tolerância alta. A germinação dos conídios foi avaliada 24 horas após a inoculação em BDA (controle) ou BDA suplementado com menadiona em concentrações milimolar. As placas foram mantidas a 26°C no escuro.



Fonte: Dados do estudo, 2022.

## 6 DISCUSSÃO

Os isolados ARSEF 4570 (*M. anisopliae* da Ilha de Macquarie na Austrália situado no círculo polar antártico 54,63 Sul 158,86 Oeste) e ARSEF 5626 (*M. brunneum* da Finlândia 61,32 Norte e 24,28 Oeste) se mostraram extremamente tolerantes ao estresse oxidativo, isto deve ser devido ao extremo estresse que estes isolados suportam, a radiação ultravioleta e de congelamento e, portanto, estes isolados evoluíram para suportar seus meios ambientes severos. Os isolados ARSEF 2134 (*M. robertsii* do Canadá), ARSEF 2547 (*M. robertsii* dos Estados Unidos), ARSEF 5749 (*M. anisopliae* do México) e ARSEF 7711 (*M. brunneum* Austria) mostraram similar tolerância ao estresse oxidativo aos isolados da Ilha de Macquarie e da Finlândia. A alta tolerância desse isolado à radiação ultravioleta e ao calor provavelmente se deve às condições severas em que este fungo foi isolado no deserto selvagem da Austrália e também à febre comportamental dos hospedeiros acridos que se aquecem ao sol (Elliot, Blanford *et al.*, 2002; Hunt e Charnley, 2011) aquecendo seus corpos a 47 °C (Blanford e Thomas, 2000). As condições do deserto e a febre comportamental em gafanhotos selecionaram *M. acridum* para suportar fatores abióticos extremos, por exemplo. Calor e radiação ultravioleta. *M. acridum* teve maior atividade enzimática do que *M. robertsii* (ARSEF 2575) (Miller, Rangel *et al.*, 2004). Além disso, os conídios de ARSEF 324 são mais bem equipados com maiores quantidades de trealose e manitol do que *M. robertsii* (ARSEF 2575) (Rangel e Roberts, 2018), mas não está claro porque ARSEF 324 foi menos tolerante ao estresse oxidativo induzido por menadiona do que outras espécies de *Metarhizium*.

Os isolados de *M. brunneum* (ARSEF 5626) e *M. anisopliae*.l. (ARSEF 5749) apresentam a maior concentração inibitória mínima de 0,17 mM (Azevedo, Souza *et al.*, 2014). No entanto, outros autores observaram tolerâncias mais elevadas à menadiona, por exemplo, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Fusarium graminearum* e *Aspergillus nidulans* cresceram bem com 0,5 mM de menadiona (Nikolaou, Agrafioti *et al.*, 2009). Outros estudos mostraram que *C. glabrata* e *C. albicans* crescem entre 0,8 e 1,2 mM, respectivamente (Cuellar-Cruz, Briones-Martin-Del-Campo *et al.*, 2008). Alguns fungos por exemplo, *Clonostachys rosea* germinam em concentrações extremamente altas de menadiona 10 mM (Zou, Xu *et al.*, 2010), que é aproximadamente 35 vezes maior que a concentração inibitória mínima para os dois *Metarhizium* spp. Por outro lado, estes dois isolados são extremamente susceptíveis

ao calor (Rangel, Braga *et al.*, 2005; Rangel, Fernandes *et al.*, 2010) e à radiação ultravioleta (Braga, Flint *et al.*, 2001).

Quanto à tolerância aos fungicidas, o isolado ARSEF 5749 apresentou tolerância ao fungicida monoacetato de dodecilguanidina (dodine) semelhante à de *M. robertsii* (ARSEF 2575) (Rangel, Dettenmaier *et al.*, 2010). O gênero *Metarhizium* não produz carotenóides (Fang, Fernandes *et al.*, 2010) ou melanina (Rangel, Butler *et al.*, 2006; Fang, Fernandes *et al.*, 2010) que poderiam proteger os conídios contra o estresse oxidativo. Portanto, os isolados extremamente tolerantes à menadiona neste estudo (ARSEF 5626 e 5749) provavelmente possuem complexo enzimático que reduz o superóxido e o peróxido de hidrogênio pelas enzimas superóxido dismutase e catalase, respectivamente.

Os fungos *M. album* (ARSEF 2082), *M. acridum* (ARSEF 3341) e *M. guizhouense* (ARSEF 7847) foram os mais sensíveis isolados. *M. acridum* tem um grande histórico de baixa tolerância a produtos químicos (Rangel, Dettenmaier *et al.*, 2010; Araújo, Dias *et al.*, 2018; Araújo, Ferreira *et al.*, 2020), portanto, esta baixa tolerância deste isolado não é um fato inesperado. O fungo *M. album* não tem pigmentação verde de *Metarhizium* e a pigmentação é hialina ou branca, provavelmente a falta de pigmentação fez deste fungo o mais sensível de todos os *Metarhizium*. Embora *M. album* tem sido pouco estudado com relação a tolerância a estresses, o único registro é que esta espécie é muito susceptível à radiação UV-B (Braga, Flint *et al.*, 2001) foi observado também que *M. robertsii* mutantes para pigmentação tornando o fungo albino, foram mais susceptíveis a radiação UV-B e calor (Rangel, Butler *et al.*, 2006). O fungo *M. guizhouense* (ARSEF 7847) foi isolado por Rangel, DEN, em um deserto no norte do Arizona, Estados Unidos. Este isolado tem uma coloração mais escura que os outros isolados de *M. anisopliae*, mas foi um dos isolados mais susceptíveis à menadiona. ARSEF 7847 também é muito sensível ao calor em relação aos outros isolados estudados aqui (Fernandes, Keyser *et al.*, 2010).

A tolerância dos conídios a diversas condições de estresse é grandemente influenciada pelo ambiente onde os fungos crescem. Durante o crescimento micelial, vários fatores como luz visível (Dias, Pedrini *et al.*, 2020; Dias, Souza *et al.*, 2021; Dias, Pupin *et al.*, 2022), fontes de carbono (Rangel, Anderson *et al.*, 2006), substratos de crescimento ou componentes do meio (Rangel, Braga *et al.*, 2004; Ying e Feng, 2006; Kim, Je *et al.*, 2010; Kim, Skinner *et al.*, 2010; Kim, Kassa *et al.*, 2011), estresse

nutritivo (Rangel, Anderson *et al.*, 2008; Silva, Pedrini *et al.*, 2023), choque térmico (Rangel, Anderson *et al.*, 2008), estresse osmótico (Rangel, Anderson *et al.*, 2008), estresse oxidativo (Rangel, Anderson *et al.*, 2008), hipoxia e anoxia (Silva, Pedrini *et al.*, 2023) e ácido salicílico (Rangel, Fernandes *et al.*, 2012) podem contribuir para o aumento da tolerância ao estresse dos conídios. Este aumento da tolerância induzido por fatores químicos ou físicos é denominado “adaptação ambiental ou proteção cruzada” (Rangel, 2011). A tolerância dos conídios à menadiona, conseqüentemente, está sujeita a alta plasticidade fenotípica de acordo com o substrato ou condições onde o fungo é produzido. Portanto, os resultados de tolerância à menadiona obtidos neste estudo (Fig.4) são específicos para os fungos cultivados em meio BDA no escuro. Outros meios de cultura ou outras condições de cultivo podem alterar significativamente estes resultados. Por exemplo, os conídios do fungo *Isaria fumosorosea* produzidos em meio de cultura Sabouraud dextrose ágar (SDA) suplementado com sulfato cúprico e sulfato de zinco foram 9,8 vezes mais tolerantes à menadiona do que os conídios produzidos apenas em SDA (Ali, Wang *et al.*, 2011).

## 7 CONCLUSÃO

Nossos estudos comparativos sobre tolerância ao estresse oxidativo de diversas espécies de fungos *Metarhizium* encontraram uma alta variação na tolerância à menadiona. Evidentemente que estes propágulos estão em uma batalha evolutiva para vencer os desafios do ambiente e o controle sustentável de pragas, na condição de bioinseticida ecológico. Concluimos que o fungo mais resistente ao estresse oxidativo foram *M. anisopliae* (ARSEF 4570) proveniente da Ilha de Macquarie na Austrália situado no círculo polar antártico e *M. brunneum* (ARSEF 5626) da Finlândia provavelmente por que eles evoluíram a intensa radiação ultravioleta, frio e outros estresses. O fungo mais susceptível ao estresse oxidativo foi *M. álbum* (ARSEF 2082) provavelmente por causa da sua falta de pigmentação.

## REFERÊNCIAS

- ABRASHEV, R. I.; PASHOVA, S. B.; STEFANOVA, L. N.; VASSILEV, S. V.; DOLASHKA-ANGELOVA, P. A.; ANGELOVA, M. B. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 54, n. 12, p. 977-83, Dec 2008.
- ALI, S.; WANG, Z. Q.; REN, S. X.; HUANG, Z. Superoxide dismutase production by *Isaria fumosorosea* on metals and its role in stress tolerance and fungal virulence. *Biocontrol Science and Technology*, v. 21, n. 12, 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. Ú. 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*, v. 124, n. 5, p. 273-288, 2020/05/01/ 2020.
- AUTEN, R. L.; DAVIS, J. M. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: The devills in the details. *Pediatric Research*, v. 66, n. 2, p. 121-127, 2009/08/01 2009.
- AZEVEDO, R. F. F.; SOUZA, R. K. F.; BRAGA, G. Ú. L.; RANGEL, D. E. N. Responsiveness of entomopathogenic fungi to menadione-induced oxidative stress. *Fungal Biol*, v. 118, n. 0, p. 990-995, 2014.
- BARBOSA, J. C.; MALDONADO JUNIOR, W. *Agroestat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaaios Agronômicos*. Jaboticabal:: Fcav/Unesp, 2015.
- BLANFORD, S.; THOMAS, M. B. Thermal behavior of two acridid species: Effects of habitat and season on body temperature and the potential impact on biocontrol with pathogens. *Environmental Entomology*, v. 29, n. 5, p. 1060-1069, Oct 2000.
- BORGES, A. A.; BORGES-PEREZ, A.; FERNANDEZ-FALCON, M. Induced resistance to Fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. *Crop Protection*, v. 23, n. 12, p. 1245-1247, Dec 2004.
- BRAGA, G. Ú. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium anisopliae* isolates from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 78, p. 98-108, 2001.

CHAMPELY, S.; CHESSEL, D. Measuring biological diversity using Euclidean metrics. *Environmental and Ecological Statistics*, v. 9, n. 2, p. 167-177, June 01 2002.

COOK, R. J.; BRUCKART, W. L.; COULSON, J. R.; GOETTEL, M. S.; HUMBER, R. A.; LUMSDEN, R. D.; MADDOX, J. V.; MCMANUS, M. L.; MOORE, L.; MEYER, S. F.; QUIMBY, J. P. C.; STACK, J. P.; VAUGHN, J. L. 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.

CUELLAR-CRUZ, M.; BRIONES-MARTIN-DEL-CAMPO, M.; CANAS-VILLAMAR, I.; MONTALVO-ARREDONDO, J.; RIEGO-RUIZ, L.; CASTANO, I.; DE LAS PENAS, A. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell*, v. 7, n. 5, p. 814-25, May 2008.

CUELLAR-CRUZ, M.; CASTANO, I.; ARROYO-HELGUERA, O.; DE LAS PENAS, A. Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n.4, p. 649-54, Jul 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. Ú. 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.; PUPIN, B.; ROBERTS, D. W.; RANGEL, D. E. N. Low- or high-white light irradiance induces similar conidial stress tolerance in *Metarhizium robertsii*. *Archives of Microbiology*, v. 204, n. 1, p. 83, 2021/12/27 2022.

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 Biol*, v. 125, n. 11, p. 891-904, 2021/11/01/ 2021.

ELLIOT, S. L.; BLANFORD, S.; THOMAS, M. B. Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, v. 269, n. 1500, p. 1599-607, Aug 7 2002.

FANG, W.; FERNANDES, E. K. K.; ROBERTS, D. W.; BIDOCHKA, M. J.; ST LEGER, R. J. A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence.

*Fungal Genetics and Biology*, v. 47, n. 7, p. 602-607, Jul 2010.

FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L. A.; LOMER, C. J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia*, v. 135, p. 171-181, 1996.

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

FERNANDES, E. K. K.; KEYSER, C. A.; CHONG, J. P.; RANGEL, D. E. N.; MILLER, M. P.; ROBERTS, D. W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p. 115-128, 2010.

FERNANDES, P. N.; MANNARINO, S. C.; SILVA, C. G.; PEREIRA, M. D.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Oxidative stress response in eukaryotes: effect of glutathione, superoxide dismutase and catalase on adaptation to peroxide and menadione stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report*, v. 12, n. 5, p. 236-244, 2007/10/01 2007.

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

FRIDOVICH, I. Oxygen free radicals and tissue damage: chairman's introduction. *Ciba Found Symp*, n. 65, p. 1-4, Jun 6-8 1978b.

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

GAO, Q.; JIN, K.; YING, S. H.; ZHANG, Y.; XIAO, G.; SHANG, Y.; DUAN, Z.; HU, X.; XIE, X. Q.; ZHOU, G.; PENG, G.; LUO, Z.; HUANG, W.; WANG, B.; FANG, W.; WANG, S.; ZHONG, Y.; MA, L. J.; ST LEGER, R. J.; ZHAO, G. P.; PEI, Y.; FENG, M. G.; XIA, Y.; WANG, C. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet*, v. 7, n. 1, p. e1001264, 2011.

GESSLER, N. N.; SOKOLOV, A. V.; BYKHOVSKY, V. Y.; BELOZERSKAYA, T. A. Superoxide dismutase and catalase activities in carotenoid-synthesizing fungi *Blakeslea trispora* and *Neurospora crassa* fungi in oxidative stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 38, n. 3, p. 205-209, May-Jun 2002.

GULSHAN, K.; LEE, S. S.; MOYE-ROWLEY, W. S. Differential oxidant tolerance determined by the key transcription factor Yap1 is controlled by levels of the Yap1-binding protein, Ybp1. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 39, p. 34071-81, Sep 30 2011.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231-55, May 2004.

HERDEIRO, R. S.; PEREIRA, M. D.; PANEK, A. D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, v. 1760, n. 3, p.340-346, Mar 2006.

HUMBER, R. A. Recent phylogenetically based reclassifications of fungal pathogens of invertebrates. In: HUMBER, R. A.; HANSEN, K. S. (Ed.). *USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures - Catalog of Isolates*. Ithaca: USDA-ARS Plant Protection Research Unit. US Plant, Soil & Nutrition Laboratory, 2007. p. 336.

HUMBER, R. A. Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, n. 3, p. 262-266, Jul 2008.

HUNT, V. L.; CHARNLEY, A. K. The inhibitory effect of the fungal toxin, destruxin A, on behavioural fever in the desert locust. *Journal of Insect Physiology*, v. 57, n. 10, p. 1341-1346, Oct 2011.

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.

JONES, J. T.; LIU, K. W.; WANG, X.; KOWALSKI, C. H.; ROSS, B. S.; MILLS, K. A. M.; KERKAERT, J. D.; HOHL, T. M.; LOFGREN, L. A.; STAJICH, J. E.; OBAR, J. J.; CRAMER, R. A. *Aspergillus fumigatus* Strain-Specific *Conidia* Lung Persistence Causes an Allergic Broncho-Pulmonary Aspergillosis-Like Disease Phenotype. *mSphere*, v. 6, n. 1, Feb 17 2021.

KAZMIERCZAK-BARANSKA, J.; KARWOWSKI, B. T. Vitamin K Contribution to DNA Damage-Advantage or Disadvantage? A Human Health Response. *Nutrients*, v. 14, n. 20, Oct 11 2022.

KIM, J. S.; JE, Y. H.; ROH, J. Y. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 37, n. 4, p. 419-423, Apr 2010.

KIM, J. S.; KASSA, A.; SKINNER, M.; HATA, T.; PARKER, B. L. Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grain. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 6, p. 697-704, Jun 2011.

KIM, J. S.; SKINNER, M.; HATA, T.; PARKER, B. L. Effects of culture media on hydrophobicity and thermotolerance of Bb and Ma conidia, with description of a novel surfactant based hydrophobicity assay. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 105, n. 3, p. 322-328, Nov 2010.

LACEY, L. A. (Ed.) **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**. San Diego: Academic Press, p.484ed. 2012.

LACEY, L. A.; FRUTOS, R.; KAYA, H. K.; VAIL, P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control*, v. 21, n. 3, p. 230-248, 2001/07/01/ 2001.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 132, p. 1-41, 2015/11/01/ 2015.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 32, n. 10, p. 1295-309, Oct 2002.

LI, J.; FENG, M. G. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycological Research*, v. 113, n. Pt 1, p. 93-9, Jan 2009.

LI, J.; YING, S.-H.; SHAN, L.-T.; FENG, M.-G. A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 4, p. 975-984, Jan 2010.

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.

LICONA-JUÁREZ, K. C.; ANDRADE, E. P.; MEDINA, H. R.; OLIVEIRA, J. N. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; RANGEL, D. E. N. Tolerance to UV-B radiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi*. *Fungal Biology*, v. 127, p. 1250-1258, 2023/04/21/ 2023.

LIMA, D. M. C. G.; COSTA, T. P. C.; EMRI, T.; PÓCSI, I.; PUPIN, B.; RANGEL, D. E. N. Fungal tolerance to Congo red, a cell wall integrity stress, as a promising indicator of ecological niche. *Fungal Biology*, v. 125, n. 8, p. 646-657, 2021/08/01/ 2021.

LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 89, n. 1, p. 19-29, May 2005.

MAGNANI, T.; SORIANI, F. M.; MARTINS VDE, P.; POLICARPO, A. C.; SORGI, C. A.; FACCIOLI, L. H.; CURTI, C.; UYEMURA, S. A. Silencing of mitochondrial alternative oxidase gene of *Aspergillus fumigatus* enhances reactive oxygen species production and killing of the fungus by macrophages. *J Bioenerg Biomembr*, v. 40, n. 6, p. 631-6, Dec 2008.

MILLER, C. D.; RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. Ú. L.; FLINT, S.; KWON, S. I.; MESSIAS, C. L.; ROBERTS, D. W.; ANDERSON, A. J. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 41-49, Jan 2004.

MILNER, R. J.; HUPPATZ, R. J.; SWARIS, S. C. A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 57, p. 121-123, 1991.

MISHRA, P. K.; PARK, I.; SHARMA, N.; YOO, C. M.; LEE, H. Y.; RHEE, H. W. Enzymatic Recording of Local Hydrogen Peroxide Generation Using Genetically Encodable Enzyme. *Anal Chem*, v. 94, n. 43, p. 14869-14877, Nov 1 2022.

MOURA MASCARIN, G.; BIAGGIONI LOPES, R.; DELALIBERA, Í.; KORT KAMP FERNANDES, É.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018/01/12/ 2018.

MUNIZ, E. R.; CATÃO, A. M. L.; RUEDA-PÁRAMO, M. E.; RODRIGUES, J.; LÓPEZ LASTRA, C. C. J. J. G.; FERNANDES, É. K. K.; LUZ, C. Impact of short-term temperature challenges on the larvicidal activities of the entomopathogenic water mold *Leptolegnia chapmanii* against *Aedes aegypti*, and development on infected dead larvae *Fungal Biol* v. This issue, 2017.

MUTOH, N.; KAWABATA, M.; KITAJIMA, S. Effects of four oxidants, menadione, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biochemistry*, v. 138, n. 6, p. 797-804, Dec 2005.

NA, Y. R.; HAN, K. C.; PARK, H.; YANG, E. G. Menadione and ethacrynic acid inhibit the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway by disrupting HIF-1 $\alpha$  interaction with p300. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 434, n. 4, p. 879-84, May 17 2013.

NIKOLAOU, E.; AGRAFIOTI, I.; STUMPF, M.; QUINN, J.; STANSFIELD, I.; BROWN, A. J. P. Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evolutionary Biology*, v. 9, Feb 2009.

NOVENTA-JORDÃO, M. A.; COUTO, R. M.; GOLDMAN, M. H. S.; AGUIRRE, J.; CAPLAN, A.; TARENZI, H. F.; GOLDMAN, G. H. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. *Microbiology*, v. 145, p. 3229-3234, 1999.

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

PENG, H.; GUO, C.-T.; TONG, S.-M.; YING, S.-H.; FENG, M.-G. Two white collar proteins protect fungal cells from solar UV damage by their interactions with two photolyases in *Metarhizium robertsii*. *Environmental Microbiology*, v. n/a, n. n/a, 2021.

PUNGARTNIK, C.; MELO, S. C. O.; BASSO, T. S.; MACENA, W. G.; CASCARDO, J. C. M.; BRENDEL, M. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 46, n. 6-7, p. 461-472, Jun-Jul 2009.

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 83, p. 96-103, Jun 2018.

R-CORE-TEAM. R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, . Vienna2021.

RAMOS-PEREZ, C.; LORENZO-CASTRILLEJO, I.; QUEVEDO, O.; GARCIA-LUIS, J.; MATOS-PERDOMO, E.; MEDINA-COELLO, C.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; MACHIN, F. Yeast cytotoxic sensitivity to the antitumour agent beta-lapachone depends mainly on oxidative stress and is largely independent of microtubule- or topoisomerase-mediated DNA damage. *Biochem Pharmacol*, v. 92, n. 2, p. 206-19, Nov 15 2014.

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.; 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.; BRAGA, G. Ú. 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. Ú. 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. Ú. 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.; DETTENMAIER, S. J.; FERNANDES, E. K. K.; ROBERTS, D. W. Susceptibility of *Metarhizium* spp. and other entomopathogenic fungi to dodine-based selective media. *Biocontrol Science and Technology*, v. 20, n. 4, p. 375-389, 2010.

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.; DETTENMAIER, S. J.; ROBERTS, D. W. Thermotolerance of germlings and mycelium of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium* spp. and mycelial recovery after heat stress. *Journal of Basic Microbiology*, v. 50, p. 344-350, 2010.

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.

RANGEL, D. E. N.; ROBERTS, D. W. Possible source of the high UV-B and heat tolerance of *Metarhizium acridum* (isolate ARSEF 324). *J. Invertebr. Pathol.*, v. 157, p. 32-35, 2018/09/01/ 2018.

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.; CAMPBELL, A. S. Stability of entomopathogenic fungi. *Miscell. Pub. Entomol. Soc. Am.*, v. 10, p. 19-76, June 1977.

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

RODRIGUES, A. Efeito de Hormesis da biologia à medicina, passando pela toxicologia. "Açoriano Oriental, Açores Magazine, *UAciência*", pp. 28-29. 2019.

SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B. G.; SAMSON, R. A.; TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J. Insect Sci.*, v. 4, n. 19, p. 1-24, 2004.

SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B. G.; TAKKEN, W. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Malaria Journal*, v. 3, n. 1, p. 45, Nov 28 2004.

SCHOLTE, E. J.; KNOLS, B. G.; TAKKEN, W. Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *J Invertebr Pathol*, v. 91, n. 1, p. 43-49, Jan 2006.

SCHOLTE, E. J.; NG'HABI, K.; KIHONDA, J.; TAKKEN, W.; PAAIJMANS, K.; ABDULLA, S.; KILLEEN, G. F.; KNOLS, B. G. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, v. 308, p. 1641-1642, 2005.

SCHOLTE, E. J.; NJIRU, B. N.; SMALLEGANGE, R. C.; TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar J*, v. 2, p. 29, Sep 15 2003.

SETLOW, B.; SETLOW, P. Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *J. Bacteriol.*, v. 178, p. 3486-3495, 1996.

SHA, W.; MARTINS, A. M.; LAUBENBACHER, R.; MENDES, P.; SHULAEV, V. The genome-wide early temporal response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by cumene hydroperoxide. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. e74939, 2013.

SILVA, A. M.; PEDRINI, N.; PUPIN, B.; ROBERTS, D. W.; RANGEL, D. E. N.

Asphyxiation of *Metarhizium robertsii* during mycelial growth produces conidia with increased stress tolerance via increased expression of stress-related genes. *Fungal Biology*, v. 127, p. 1209-1217, 2023/01/18/ 2023.

SINGER, M. A.; LINDQUIST, S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular Cell*, v. 1, n. 5, p. 639-648, Apr 1998.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. San Francisco: W.H. Freeman, 1973.

ST. LEGER, R. J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, n. 3, p. 271-276, 2008.

TOMASETTI, M.; NOCCHI, L.; NEUZIL, J.; GOODWIN, J.; NGUYEN, M.; DONG, L.; MANZELLA, N.; STAFFOLANI, S.; MILANESE, C.; GARRONE, B.; ALLEVA, R.; BORGHI, B.; SANTARELLI, L.; GUERRIERI, R. Alpha-tocopheryl succinate inhibits autophagic survival of prostate cancer cells induced by vitamin K3 and ascorbate to trigger cell death. *PLoS One*, v. 7, n. 12, p. e52263, 2012.

WANG, C.; DUAN, Z.; ST LEGER, R. J. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryot Cell*, v. 7, n. 2, p. 302-9, Feb 2008.

WANG, C.; ST. LEGER, R. J. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 103, n.17, p. 6647-6652, Apr 25 2006.

WATANABE, N.; FORMAN, H. J. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 411, n. 1, p. 145-57, Mar 1 2003.

YING, S. H.; FENG, M. G. Medium components and culture conditions affect the thermotolerance of aerial conidia of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. *Lett Appl Microbiol*, v. 43, n. 3, p. 331-335, 2006.

ZHANG, Y.; ZHAO, J.; FANG, W.; ZHANG, J.; LUO, Z.; ZHANG, M.; FAN, Y.; PEI, Y. Mitogen-activated protein kinase hog1 in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects. *Appl Environ Microbiol*, v. 75, n. 11, p. 3787-95, Jun 2009.

ZOU, C. G.; XU, Y. F.; LIU, W. J.; ZHOU, W.; TAO, N.; TU, H. H.; HUANG, X. W.; YANG, J. K.; ZHANG, K. Q. Expression of a serine protease gene prC is up-regulated by oxidative stress in the fungus *Clonostachys rosea*: implications for fungal survival. *PLoS One*, v. 5, n. 10, p. e13386, 2010.



**Tabela 3:** Desdobramento da Interação AxB, Estudando os Efeitos de B dentro de A - Variável: Germinação

| Causas de Variação | GL  | SQ           | QM           | F        | P        |
|--------------------|-----|--------------|--------------|----------|----------|
| Fator B d. A1      | 7   | 25053,267775 | 3579,0382536 | 142,97** | < 0,0001 |
| Fator B d. A2      | 7   | 16689,224844 | 2384,1749777 | 95,24**  | < 0,0001 |
| Fator B d. A3      | 7   | 25951,233000 | 3707,3190000 | 148,10** | < 0,0001 |
| Fator B d. A4      | 7   | 91,490675000 | 13,070096429 | 0,52NS   | 0,8165   |
| Fator B d. A5      | 7   | 115,48520000 | 16,497885714 | 0,66NS   | 0,7062   |
| Fator B d. A6      | 7   | 7059,8397750 | 1008,5485393 | 40,29**  | < 0,0001 |
| Fator B d. A7      | 7   | 17322,529644 | 2474,6470920 | 98,86**  | < 0,0001 |
| Fator B d. A8      | 7   | 21140,036275 | 3020,0051821 | 120,64** | < 0,0001 |
| Fator B d. A9      | 7   | 22314,453094 | 3187,7790134 | 127,34** | < 0,0001 |
| Fator B d. A10     | 7   | 19198,381400 | 2742,6259143 | 109,56** | < 0,0001 |
| Fator B d. A11     | 7   | 48,660443750 | 6,9514919643 | 0,28NS   | 0,9617   |
| Fator B d. A12     | 7   | 103,02870000 | 14,718385714 | 0,59NS   | 0,7648   |
| Fator B d. A13     | 7   | 13,949343750 | 1,9927633929 | 0,08NS   | 0,9992   |
| Fator B d. A14     | 7   | 25,348643750 | 3,6212348214 | 0,14NS   | 0,9944   |
| Fator B d. A15     | 7   | 11250,007844 | 1607,1439777 | 64,20**  | < 0,0001 |
| Fator B d. A16     | 7   | 15230,954775 | 2175,8506821 | 86,92**  | < 0,0001 |
| Resíduo            | 128 | 3204,1760500 | 25,032625391 | -        |          |