

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Caracterização da tolerância de diferentes propágulos de *Metarhizium* spp.
à radiação UV-B e avaliação da virulência de conídios expostos contra
larvas de *Rhipicephalus microplus*.**

Amanda Rocha da Costa Corval

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Caracterização da tolerância de diferentes propágulos de *Metarhizium* spp.
à radiação UV-B e avaliação da virulência de conídios expostos contra
larvas de *Rhipicephalus microplus*.**

AMANDA ROCHA DA COSTA CORVAL

Sob a Orientação da Professora
Patrícia Silva Gôlo

E coorientação do professor
Éverton Kort Kamp Fernandes

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica – RJ
Fevereiro de 2019

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C832c Corval, Amanda Rocha da Costa, 1984-
Caracterização da tolerância de diferentes
propágulos de *Metarhizium* spp. à radiação UV-B e
avaliação da virulência de conídios expostos contra
larvas de *Rhipicephalus microplus*. / Amanda Rocha da
Costa Corval. - 2019.
58 f.

Orientador: Patrícia Silva Gôlo.
Coorientador: Éverton Kort Kamp Fernandes.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Pós Graduação em Ciências
Veterinárias, 2019.

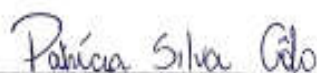
1. Carrapato dos Bovinos. 2. Fungos
entomopatogênicos. 3. Fatores abióticos. I. Gôlo,
Patrícia Silva, 1987-, orient. II. Fernandes, Éverton
Kort Kamp, 1978-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Pós Graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

AMANDA ROCHA DA COSTA CORVAL

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM



Patricia Silva Gólo UFRRJ



Aurea Maria Lage de Moraes FIOCRUZ



Vânia R. E. P. Bittencourt UFRRJ

“Nem tudo é fácil na vida... Mas, com certeza, nada é impossível
Precisamos acreditar, ter fé e lutar para que não apenas sonhemos,
Mas também tornemos todos esses desejos, realidade!”
(Cecília Meireles)

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais,
ao meu esposo e aos meus filhos .

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir chegar até aqui, por me dar forças em momentos difíceis, por ouvir minhas orações de súplicas e gratidão. Sem Ele, com certeza eu não estaria aqui.

Agradeço à minha família, em especial ao meu marido *Paulo* pela parceria, incentivo, conselhos, ajuda em tudo o que precisei. Você foi fundamental na minha caminhada. Tenho ao meu lado mais que um marido. Tenho um amigo e conselheiro, o melhor que poderia ter. Obrigada por me fazer feliz e por sonhar comigo. Te amo!

Agradeço também aos meus filhos *Mateus* e *Clara*. Minha razão de viver, o melhor de mim. Saibam que meu coração ficava partido quando precisava me ausentar, muitas vezes chegando tarde, saindo cedo. Vocês foram incríveis. Mesmo pequenos, entendiam que a mamãe precisava estudar e, algumas vezes, até se aventuraram no laboratório comigo. Hoje, sabem mais de carrapatos e fungos do que eu. Faça isso tudo por vocês.

Aos meus pais, *Jorge* e *Cleusa*, um agradecimento especial, por me criarem, mesmo em muitas dificuldades, sempre prezando pela minha educação, fazendo o impossível pra que eu tivesse as melhores oportunidades que poderiam me oferecer. Obrigada por toda a ajuda, das caronas aos almoços, passando pelo cuidado com meu marido e filhos. Sei que na minha ausência, vocês cuidaram muito bem deles. Não tenho como agradecer pelo apoio. Amo vocês.

Agradeço também aos meus sogros, *Dorasil* e *Sonia* por todo apoio. Obrigada pela companhia em congressos, pelo suporte com as crianças e com tudo que precisei neste período. Vocês moram no meu coração. Também amo vocês.

Não posso esquecer dos meus amigos *Ana Elisa*, *Moisés*, *Roberta* e *Allison*, pela companhia, pelas risadas, pelo ombro nos momentos de choro, pelos churrascos e brincadeiras até a madrugada, que me faziam mais leve e menos ansiosa. Nossa parceria é pro resto da vida. Vocês são mais que amigos, são minha família também.

Agradeço à minha igreja, pois senti o amor de cada irmão em cada oração e palavra de carinho comigo.

Obrigada, professora *Dra^a Vânia Bittencourt*, pelo apoio e suporte, por me acolher e me ajudar em tudo o que precisei.

Agradeço à minha orientadora, professora *Dr^a Patrícia Silva Gôlo*, que me acolheu mesmo sem me conhecer, acreditou em mim e me fez crescer demais profissionalmente. Você é um exemplo de profissional e me fez acreditar que conseguiria chegar até aqui, mesmo com as dificuldades enfrentadas.

Agradeço ao meu coorientador, professor *Dr. Éverton Fernandes* por toda a ajuda e suporte, sempre agregando conhecimento ao meu trabalho.

À Família LCM, por me ensinarem tanto! Vocês são incríveis. Saibam que cada um de vocês tem um lugar no meu coração. Obrigada pelo ambiente de trabalho sempre descontraído, leve, pelas risadas, ajudas em experimentos e por me fazerem acreditar que mesmo com dificuldades, a pesquisa pode ser maravilhosa. Em especial, à minha irmã *Emily*, que foi companheira nas horas difíceis, parceira nos experimentos, riu e chorou comigo em vários momentos e foi muito importante na minha caminhada. Obrigada por tudo!

Agradeço à *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* pelo apoio financeiro e técnico.

Aos professores e funcionários do PPGCV por todos os ensinamentos transmitidos e apoio.

E, por fim, a todos que de certa forma ajudaram direta ou indiretamente na elaboração deste manuscrito.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço, de igual forma, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!

BIOGRAFIA

Amanda Rocha da Costa Corval, filha de Jorge Leite da Costa e Cleusa Rocha da Costa, nasceu em 27 de março de 1984, na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

Estudou de 1999 a 2001 no Colégio MV1, onde concluiu o Ensino Médio.

Em fevereiro de 2003 ingressou na Universidade Castelo Branco, no curso de Ciências Biológicas, concluindo-o em março de 2007. Nos anos de 2006 e 2007 foi bolsista de Iniciação Científica (FAPERJ), na Universidade Estadual do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Patrícia Maria Lourenço Dutra.

No ano de 2009 ingressou na Secretaria Estadual de Saúde, onde trabalhou como bióloga no Hospital Rocha Faria, permanecendo no cargo até o ano de 2014. No ano de 2013 ingressou na Fundação Educacional Unificada Campograndense, onde atuou como professora de Biologia no Ensino Médio, permanecendo neste cargo até o ano de 2017. No ano de 2011 foi aluna do Curso de Especialização em Hematologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Em Março de 2017 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Durante todo o período de vida acadêmica, participou de Congressos e Simpósios, tendo publicado junto ao grupo de pesquisa resumos e trabalhos científicos em revistas especializadas.

RESUMO

CORVAL, Amanda Rocha da Costa. **Caracterização da tolerância de diferentes propágulos de *Metarhizium* spp. isolados de solo à radiação UV-B e sua virulência contra larvas de *Rhipicephalus microplus***. 2019. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Metarhizium anisopliae sl. é um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados no controle de pragas agrícolas e tem apresentado, também, resultados promissores em testes contra carrapatos, especialmente *Rhipicephalus microplus*. Porém, estes agentes podem sofrer com fatores abióticos, como altas temperaturas, flutuações de umidade e radiação UV-B. Desta maneira, o presente trabalho analisou dez isolados nativos de *Metarhizium* spp., com o objetivo de: 1) verificar a tolerância à UV-B dos isolados, estando eles em suspensões aquosas ou emulsões óleo-água; 2) verificar a tolerância à UV-B dos diferentes propágulos destes isolados; 3) verificar a viabilidade de conídios no solo após ação da radiação UV-B; 4) avaliar a mortalidade de larvas de *R. microplus* após exposição dos fungos à UV-B. Os propágulos (conídios, blastosporos e microescleródios) foram expostos à radiação UV-B com dose total de 4,0 kJ m⁻². Conídios suspensos em água ou em emulsões óleo-água foram avaliados quanto à germinação 24h e 48h após exposição à UV-B. Conídios adsorvidos em diferentes tipos de solo foram avaliados quanto à presença de unidades formadoras de colônias (UFC) após sete dias. Blastosporos e microescleródios foram avaliados quanto à presença de UFC (unidades formadoras de colônias) 72h e 6 dias após exposição à UV-B, respectivamente. Não observamos um padrão na tolerância dos diferentes propágulos de *Metarhizium* spp., assim como o óleo nem sempre protegeu os conídios da irradiação. Nossos resultados sugerem que os diferentes tipos de solo testados forneceram proteção à UV-B aos isolados de *Metarhizium* spp., exceto ao LCMS05, quando adsorvido no solo tipo I. Quanto aos blastosporos, LCMS05 foi o único isolado que obteve tolerância moderada à irradiação (63,2% de germinação). Três isolados (LCMS05, LCMS08 e LCMS10) foram mais tolerantes à UV-B, quando apresentados sob a forma de microescleródios, com taxa de UFC superior a 85%, porém somente o isolado LCMS10 foi estatisticamente igual ao controle não exposto, atingindo o mesmo número de UFC. No bioensaio para verificação da mortalidade de larvas de *R. microplus* após exposição dos fungos à irradiação UV-B, os isolados testados (LCMS03 e LCMS08) mesmo não apresentando diferenças estatísticas entre si, obtiveram bons resultados e demonstraram potencial para controlar larvas de *R. microplus*. Os dados sobre a tolerância à UV-B do mesmo isolado fúngico aqui observado para diferentes propágulos, ou o mesmo propágulo fúngico exposto à UV-B em diferentes circunstâncias, revelam informações importantes não apenas sobre a relevância da tolerância intrínseca de cada isolado, mas também variações que diferentes propágulos do mesmo fungo possuem. Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho analisando a tolerância à UV-B de diferentes propágulos do mesmo isolado fúngico. Este estudo pretende auxiliar pesquisas futuras sobre a descoberta de isolados fúngicos e propágulos promissores para o controle biológico.

Palavras-chave: carrapato dos bovinos, fungos entomopatogênicos, fatores abióticos

Apoio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

ABSTRACT

CORVAL, Amanda Rocha da Costa. **Characterization of the tolerance of different propagules of *Metarhizium* spp. isolated from soil to UV-B radiation and its virulence against *Rhipicephalus microplus* larvae.** 2019. 42 p. Dissertation (Master Science in Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Metarhizium anisopliae sl. is one of the most commonly used entomopathogenic fungi in the control of agricultural pests and has also shown promising results in tick tests, especially *Rhipicephalus microplus*. However, these agents may suffer from abiotic factors, such as high temperatures, fluctuations of humidity and UV-B radiation. In this way, the present work analyzed ten native isolates of *Metarhizium* spp., with the aim of: 1) verify the tolerance to the UV-B of the isolates, being in aqueous suspensions or oil-in-water emulsions; 2) to verify the tolerance to UV-B of the different propagules of these isolates; 3) to verify the viability of conidia in the soil after UV-B radiation; 4) to evaluate the mortality of *R. microplus* larvae after exposure of fungi to UV-B. The propagules (conidia, blastospores and microsclerotia) were exposed to UV-B radiation with a total dose of 4.0 kJ m⁻². Conidia suspended in water or oil-water emulsions were evaluated for germination 24 h and 48 h after exposure to UV-B. Conidia adsorbed on different soil types were evaluated for the presence of colony forming units (CFU) after seven days. Blastospores and microsclerotia were evaluated for the presence of CFUs (colony forming units) 72 h and 6 days after exposure to UV-B, respectively. We did not observe a pattern in the tolerance of the different propagules of *Metarhizium* spp., as the oil did not always protect the conidia of the irradiation. Our results suggest that the different types of soil tested provided UV-B protection to the isolates of *Metarhizium* spp., except for LCMS05, when adsorbed on soil type I. As for blastospores, LCMS05 was the only isolate that obtained moderate tolerance to irradiation (63.2% germination). Three isolates (LCMS05, LCMS08 and LCMS10) were more tolerant to UV-B when presented in the form of microsclerotia, with a CFC rate above 85%, but only the LCMS10 isolate was statistically equal to the non-exposed control, reaching the same number of CFUs. In the bioassay to verify the mortality of *R. microplus* larvae after exposure of the fungi to UV-B irradiation, the tested isolates (LCMS03 and LCMS08), although not showing statistical differences each other, obtained good results and showed potential to control *R. microplus* larvae. The data on UV-B tolerance of the same fungal isolate observed for different propagules, or the same fungal propagule exposed to UV-B in different circumstances, reveal important information not only on the relevance of the intrinsic tolerance of each isolate, but also different propagules of the same fungus. As far as we know, this is the first work analyzing the tolerance to UV-B of different propagules of the same fungal isolate. This study aims to support future research on the discovery of promising fungal isolates and propagules for biological control.

Key words: cattle tick, entomopathogenic fungi, abiotic factors

Financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Lista de isolados fúngicos de *Metarhizium* spp. utilizados no presente estudo, coletados de amostras de solo localizadas no Estado do Rio de Janeiro.....12
- Tabela 2** – Características granulométricas dos três diferentes tipos de solo utilizados para avaliação da germinação de conídios de *Metarhizium* spp. após ação da irradiação UV-B.....20
- Tabela 3** – Média de unidades formadoras de colônia (UFC) e desvio padrão dos conídios de *Metarhizium* spp. expostos à UV-B ($4,0 \text{ kJ m}^{-2}$) em diferentes tipos de solo.....22
- Tabela 4** – Porcentagem de mortalidade (%) e desvio padrão de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com conídios não expostos ou tratadas com conídios previamente expostos à irradiação UV-B ($4,0 \text{ kJ m}^{-2}$).....25

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Espectro de irradiância das lâmpadas da câmara de irradiação UV-B filtradas com diacetato de celulose. As lâmpadas forneceram $856,97 \text{ mW m}^{-2}$ de irradiação UV-B no nível de prateleira de exposição na câmara, com base na irradiância ponderada por Quaitte (Quaitte et al. 1992).....14
- Figura 2:** Três diferentes tipos de solos utilizados na avaliação da germinação dos conídios de *Metarhizium* spp. após irradiação UV-B.....15
- Figura 3:** Germinação Relativa de conídios de *Metarhizium* spp. 24 horas após a exposição à irradiação UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Os dados aquosos e os dados oleosos foram comparados entre si. ARSEF 2575 e ARSEF 324 foram usados como padrão. Barras de diferentes isolados com a mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$). Barras de diferentes isolados com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$).....17
- Figura 4:** Germinação relativa de conídios de *Metarhizium* spp. 24h após a exposição à irradiação UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Os dados aquosos e oleosos de cada isolado foram comparados entre si. ARSEF 2575 e ARSEF 324 foram usados como padrão. Barras do mesmo isolado com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$).....18
- Figura 5:** Germinação Relativa de conídios de *Metarhizium* spp. 48 horas após a exposição à irradiação UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Os dados aquosos e os dados oleosos foram comparados entre si. ARSEF 2575 e ARSEF 324 foram usados como padrão. Barras de diferentes isolados com a mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$). Barras de diferentes isolados com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$).....19
- Figura 6:** Germinação Relativa de conídios de *Metarhizium* spp. 48h após exposição à irradiação UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Os dados aquosos e oleosos de cada isolado foram comparados entre si. ARSEF 2575 e ARSEF 324 foram usados como padrão. Barras do mesmo isolado com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$).....19
- Figura 7:** Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) obtidas de placas não expostas e de placas expostas à UV-B, quando os isolados foram adsorvidos em solo do tipo 1.....20
- Figura 8:** Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) obtidas de placas não expostas e de placas expostas à UV-B, quando os isolados foram adsorvidos em solo do tipo 2.....21
- Figura 9:** Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) obtidas de placas não expostas e de placas expostas à UV-B, quando os isolados foram adsorvidos em solo do tipo 3.....21
- Figura 10:** Germinação de Microescleródios de *Metarhizium* spp. 6 dias após exposição à UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Médias seguidas da mesma letra não diferiram significativamente ($P \geq 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido por StudentNewman-Keuls.....23
- Figura 11:** Grânulo de ME.....23
- Figura 12:** Média e desvio padrão de unidades formadoras de colônias (UFC) de blastosporos de *Metarhizium* spp. 72h após exposição à UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Barras com a mesma letra

minúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey.....24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.2	Utilização de Fungos Entomopatogênicos no Controle Biológico	3
2.3	<i>Metarhizium</i> spp.	5
2.4	Efeitos da Radiação Ultravioleta	6
2.5	Ecologia de <i>Metarhizium</i> spp.	8
2.6	Uso de Propágulos no Controle Biológico de Carrapatos	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	Local de Realização dos Experimentos	12
3.2	Obtenção dos Isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	12
3.3	Preparo das Suspensões e Formulações Fúngicas Conidiais para o Teste de Tolerância à Irradiação UV-B	12
3.4	Efeito da Irradiação UV-B sobre a Germinação Relativa de Conídios suspensos em água ou formulados em óleo	13
3.5	Avaliação <i>in vitro</i> da Germinação dos Conídios de <i>Metarhizium</i> spp. no solo após ação da Irradiação UV-B	14
3.6	Avaliação <i>in vitro</i> da Germinação de Microescleródios de <i>Metarhizium</i> spp. após ação da Irradiação UV-B	15
3.7	Avaliação do Impacto da Irradiação UV-B em Blastosporos de <i>Metarhizium</i> spp.	15
3.8	Avaliação da Mortalidade de Larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> após exposição dos Fungos à Irradiação UV-B	16
3.9	Análise Estatística	16
4	RESULTADOS	17
4.1	Efeito da Irradiação UV-B sobre a Germinação Relativa de Conídios suspensos em água ou formulados em óleo	17
4.1.1	Efeito da Irradiação UV-B 24h após exposição	17
4.1.2	Efeito da Irradiação UV-B 48h após exposição	18

4.2 Avaliação <i>in vitro</i> da Germinação dos Conídios de <i>Metarhizium</i> spp. no solo após ação da Irradiação UV-B	20
4.3 Tolerância de Microescleródios de <i>Metarhizium</i> spp. à Irradiação UV-B	22
4.4 Tolerância de Blastosporos de <i>Metarhizium</i> spp. à Irradiação UV-B	24
4.5 Avaliação da Mortalidade de Larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> após exposição dos Fungos à Irradiação UV-B	24
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÕES	29
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

A pecuária exerce importante papel na economia global e, no Brasil, atinge diretamente o Produto Interno Bruto (PIB). Porém, diversos fatores podem afetar negativamente esta produção. Entre eles, o parasitismo, que é um dos responsáveis por prejuízos econômicos a pecuaristas e produtores rurais.

Uma das principais espécies de ectoparasitos em bovinos é *Rhipicephalus microplus*, que acarreta danos ao couro dos animais, estresse, predisposição a infecções secundárias, além de ser transmissor de patógenos como protozoários do gênero *Babesia* spp. e bactérias do gênero *Anaplasma* spp., causadores da Tristeza Parasitária Bovina. Estes microrganismos associados ao carrapato acarretam, além de anemia e perda de peso, uma depreciação no valor comercial desses bovinos.

A principal medida contra estes ectoparasitos é o uso de produtos químicos, que, a médio e longo prazo, pode levar a resistência química em algumas populações de carrapatos, além de causar danos ao meio ambiente e à saúde humana, já que estes produtos podem contaminar a carne e o leite dos bovinos.

Na busca por soluções, métodos alternativos tiveram que ser encontrados. Estudos sobre controle microbiano de artrópodes têm avançado e oferecem uma gama de alternativas, incluindo o uso de parasitos, predadores e microrganismos. Vírus, bactérias, fungos, entre outros, têm demonstrado eficácia no controle de diversas pragas agrícolas. Em relação à agropecuária, fungos entomopatogênicos têm sido bastante estudados e utilizados, devido à sua ampla dispersão, ao grande espectro de hospedeiros e sua habilidade de penetrar pela cutícula do artrópode. Espécies do complexo *Metarhizium anisopliae* têm comprovada eficiência contra um grande número de pragas de plantas cultivadas no Brasil e pesquisas mostram a ação patogênica deste agente para artrópodes.

Porém, como estes fungos são facilmente encontrados no solo, eles sofrem ação de fatores abióticos, como altas temperaturas, flutuações de umidade e irradiação UV. A radiação solar, apesar dos seus efeitos benéficos, pode ter efeitos deletérios sobre organismos vivos, podendo induzir mutações e/ou eliminar organismos simples.

Fungos entomopatogênicos e sua relação com a radiação solar tem sido alvo de estudos constantes, pois essa exposição aos raios UV e o calor excessivo reduzem a viabilidade do conídio no campo e retardam a sua germinação. O dano aos conídios e sua inativação causada pelos raios ultravioletas têm sido frequentemente apontados como fatores capazes de reduzir a eficiência dos fungos em programas de controle biológico.

O solo pode atuar na proteção dos conídios de fungos entomopatogênicos, já que sua estrutura física pode definir uma rede de poros, funcionando como um bloqueador solar. O solo pode ter grande influência na persistência dos conídios e as flutuações de umidade deste ambiente foram identificadas como um fator importante na longevidade dos conídios.

Além do solo, adjuvantes como o óleo, podem auxiliar na proteção do fungo contra fatores abióticos. Formulações com óleo resultam numa maior aderência dos conídios à cutícula do hospedeiro, além de serem compatíveis com conídios lipofílicos como os de *Metarhizium* sp.

Na busca por respostas para os problemas enfrentados pelos fungos entomopatogênicos a campo, diferentes propágulos têm sido testados. Além do conídio, que é a estrutura mais comumente utilizada em programas de bioconrole e que é a forma natural de dispersão de muitos fungos, blastosporos e microescleródios também estão sendo estudados quanto à sua tolerância a fatores abióticos. Este estudo é importante já que o artrópode-praga pode estar em diferentes habitats e a aplicação dos fungos entomopatogênicos deve ser

direcionada em cada um desses locais, sejam eles nas folhas, no solo ou em animais (como no controle biológico da fase parasitária do carrapato).

Assim, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o impacto da radiação UV-B em diferentes propágulos de *Metarhizium* spp., além de verificar, *in vitro*, a germinação de conídios de *Metarhizium* spp, após ação da radiação UV-B quando expostos em amostras de solo, e a virulência de conídios expostos à radiação UV-B, para larvas de *R. microplus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

Carrapatos são agrupados na classe Arachnida e são considerados um dos principais problemas para o agronegócio brasileiro, tendo em vista que eles transmitem vários patógenos ao gado bovino, podendo levar à sua morte. Os carrapatos também causam danos ao couro dos bovinos, aumentando a susceptibilidade a outros parasitos (FURLONG; PRATA, 2005). Causam, também, perdas econômicas consideráveis, especialmente para a indústria bovina e leiteira brasileira (PERINOTTO et al., 2011). Estes animais se alimentam de sangue e desenvolveram estruturas, como as quelíceras, que facilitam a penetração no tegumento do hospedeiro e a fixação para estabelecer um local de alimentação (FERREIRA et al., 2015).

O ciclo de vida dos carrapatos pode ser dividido em duas fases: parasitária e não parasitária. Na fase parasitária, machos e fêmeas copulam quando ainda estão sobre os bovinos e a fêmea começa seu processo de ingurgitação, através do qual ela retira do sangue do bovino nutrientes para produção dos seus ovos. Essa fêmea, após aumentar de tamanho cerca de duzentas vezes, desprende-se do hospedeiro e vai ao chão, iniciando a fase não parasitária. Ela, então, procura um lugar úmido e longe do sol, onde possa colocar seus ovos, cerca de 3.000 por fêmea. As larvas eclodem desses ovos e ficam de 2 a 3 dias ainda no solo para que a cutícula enrijeça. As larvas migram para as pastagens à espera dos hospedeiros. Elas são atraídas pelo gás carbônico liberado na respiração desses animais e também pelo deslocamento de ar que ocorre quando estes estão se aproximando. Essas larvas, então, se fixam no hospedeiro bovino, rompendo seu tecido com suas estruturas de fixação e começam a se alimentar dele, iniciando uma nova fase parasitária (FURLONG; PRATA, 2005). Após se fixar, esses parasitos se alimentam do sangue que flui da lesão do hospedeiro. Isto provoca reações como dor, inflamação, coceira, ativação do complemento, entre outros (TIRLONI et al., 2016).

O impacto econômico dos ectoparasitos bovinos está associado, principalmente, a infestações por *Rhipicephalus microplus*, *Haematobia irritans*, *Dermatobia hominis* e *Cochliomyia hominivorax*, sendo que *R. microplus* é uma das principais espécies causadoras de danos ao bovino que, no Brasil, pode chegar a mais de 3 milhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2014).

O carrapato *R. microplus* também atua como vetor de alguns patógenos, como protozoários do gênero *Babesia* spp. e bactérias do gênero *Anaplasma* spp. Estes microrganismos associados ao carrapato acarretam, além de anemia e perda de peso, uma depreciação no valor comercial desses bovinos (RODRÍGUEZ et al., 2016).

A fim de controlar esses ectoparasitos, agricultores utilizam indistintamente produtos químicos, que causam contaminação ao meio ambiente e resistência química em algumas populações de carrapatos. O impacto ambiental gerado pelos produtos químicos e a segurança de suas aplicações fazem com que métodos alternativos e sustentáveis para controle de carrapatos direcionem a pesquisa neste sentido, incluindo o controle biológico (ANGELO et al., 2010).

2.2 Utilização de Fungos Entomopatogênicos no Controle Biológico

O conceito de controle biológico vem sendo discutido há algum tempo. Segundo Alves (1998) esse controle tem como finalidade manter a população das pragas a níveis não-econômicos, utilizando-se racionalmente patógenos. A utilização de entomopatógenos data do

século XVII e, desde então, este processo tem sido aperfeiçoado e sua importância pode ser observada pelo número crescente de trabalhos publicados (ALVES, 1998).

O uso de carrapaticidas vem sendo utilizado há muito tempo na agricultura. Porém, este método de controle de pragas traz inúmeros malefícios ao bovino e também ao produtor, como resistência dos carrapatos ao produto químico, diminuição na produção de leite e carne, alto custo com equipamentos, além de deixar resíduos no solo e levar a um esgotamento de predadores de pragas naturais (BIEGELMEYER et al., 2012; TUPE et al., 2017). A partir da conscientização dos efeitos negativos relativos aos produtos químicos, métodos ecologicamente, economicamente e sustentavelmente corretos tiveram que ser encontrados. O controle biológico oferece uma gama de alternativas e inclui o uso de parasitas, predadores e microrganismos (TUPE et al., 2017).

A utilização de agentes entomopatogênicos como controladores de pragas, como o carrapato, tem sido uma boa opção, diminuindo assim o uso de pesticidas químicos (AHMED AND LEATHER, 1994). A Food and Agriculture Organization (FAO), das Nações Unidas, recomendou que fosse diminuído o uso de pesticidas químicos e encorajou o uso de mecanismos naturais de controle de pragas (ROBERTS; ST. LEGER, 2004).

Entre vírus, bactérias e fungos aplicados no controle de pragas, os últimos são bastante estudados e utilizados. Entre as razões para sua utilização estão a sua eficácia em matar seus hospedeiros, a sua grande biodiversidade e sua relativa segurança ambiental (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Fungos são ditos como principais patógenos dos carrapatos, devido a sua ampla dispersão, ao grande espectro de hospedeiros e sua habilidade de penetrar pela cutícula do carrapato (SAMISH, 1999). O modo de infecção dos fungos entomopatogênicos pode ser dividido em seis estágios: adesão, germinação, formação de apressório, penetração, colonização da hemolinfa e exteriorização com esporulação (AW; HUE, 2017).

A infecção pelo fungo se dá pela penetração da cutícula do hospedeiro por conídio, que é o seu estágio infeccioso. Os conídios entram em contato com a cutícula do hospedeiro, germinando na sua superfície e, para isso, devem estar em quantidade suficiente para infectá-lo e matá-lo. Assim, a concentração e a distribuição conidial no solo devem ser adequadas para que os hospedeiros que se deslocam pelo solo se contaminem com uma concentração fatal de conídios (JACKSON & JARONSKI, 2012).

Em condições naturais, os esporos que entram em contato com o carrapato invadem seu corpo por meio da produção de hifas. Os fungos também produzem enzimas que degradam a cutícula do hospedeiro, como proteases e esterases, produzidas nas primeiras 24 horas, além de quitinases e lipases 4 a 5 dias após a infecção. As hifas se proliferam no interior do corpo do hospedeiro e este morre após diminuição das reservas de nutrientes. Alguns fungos produzem toxinas que são letais ao carrapato (LONC et al., 2014).

Os fungos entomopatogênicos necessitam de alta umidade para germinarem. Em baixas temperaturas e baixa umidade podem parasitar o carrapato através do ânus e suas hifas penetram pelo poro genital (SAMISH; REHACEK, 1999).

Conídios de fungos entomopatogênicos aplicados nos hospedeiros podem controlar os carrapatos em condições naturais ou semi-naturais, especialmente quando a aplicação é feita em ambientes protegidos das condições adversas ao fungo (FERNANDES et al., 2012).

Fungos entomopatogênicos do complexo *Metarhizium anisopliae* têm sido bastante estudados no controle de pragas, já que estes atacam mais de duzentas espécies de insetos, e são muito utilizados como biocontroladores, ficando atrás somente de *Beauveria* spp. (ROBERTS; ST. LEGER, 2004; TUPE et al., 2017). Por mais de 25 anos, bioinseticidas que utilizam *Metarhizium* spp. em sua composição têm sido usado em todo o mundo (ZIMMERMAN, 2007). A eficácia de *M. anisopliae* s.l. em matar ninfas e adultos de muitos gêneros e espécies de carrapatos já foi mostrada em vários estudos. Porém, embora esses

estudos comprovam que os conídios de *M. anisopliae* reduziram a produção de ovos, o mecanismo preciso de como isto aconteceu ainda é desconhecido (AW; HUE, 2017).

Espécies do complexo *M. anisopliae* têm comprovada eficiência contra um grande número de pragas de plantas cultivadas no Brasil e já foi testada para controle de espécies das famílias Muscidae, Reduviidae e Culicidae (BITTENCOURT et al., 1992).

Provavelmente, a demora na adoção de estratégias de biocontrole se deve ao fato de ser muito trabalhoso isolar e identificar potenciais agentes de controle biológico e o desenvolvimento de formulações adequadas que maximizem a eficiência dos produtos (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

2.3 *Metarhizium* spp.

O gênero *Metarhizium* é composto por espécimes entomopatogênicas que são frequentemente isoladas do solo, sendo usadas como agentes controladores de infestações de insetos (BISCHOFF et al., 2009). Suas estruturas reprodutivas denominam-se conidióforos e conídios (TIAGO et al., 2014). Conídios são estruturas especializadas produzidas no fim do ciclo de vida assexuado da maioria dos fungos filamentosos. Eles são responsáveis pela disseminação de fungos e persistência ambiental. Em espécies patogênicas, eles também estão envolvidos no reconhecimento e infecção do hospedeiro (BRAGA et al., 2015).

Fungos do complexo *Metarhizium anisopliae* estão presentes em todos os continentes, com exceção da Antártica. A doença induzida por este fungo é chamada de muscardine verde, baseada no aspecto esverdeado de insetos mortos colonizados por eles (ROBERTS; ST. LEGER, 2004).

Baseado na relação filogenética multigênica, *Metarhizium anisopliae* foi descrito como sendo um complexo de nove espécies, que são: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum*, *M. lepidiotae*, *M. majus*, *M. brunneum*, *M. globosum* e *M. robertsii*. (BISCHOFF et al., 2009). Recentemente, uma nova espécie foi descrita e adicionada ao complexo *Metarhizium anisopliae*, denominada de *M. alvesii* (LOPES, et al., 2018).

Juntamente com *Beauveria bassiana* s.l. e *B. brongniartii*, a espécie *M. anisopliae* s.l. é um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados em todo o mundo (ZIMMERMANN, 2007).

A relação fungo-hospedeiro ocorre através da adesão e germinação de conídios na superfície do inseto, seguido de penetração das hifas através da cutícula. O processo de colonização inicia-se após a penetração, com as hifas tornando-se mais espessas e ramificadas dentro da hemocele do inseto, formando blastosporos. As hifas continuam crescendo e invadem vários órgãos internos após a morte do hospedeiro e após este processo, emergem do corpo do inseto, produzindo conídios que são disseminados e infectam outros indivíduos (ALVES, 1998).

O fungo *M. anisopliae* cresce vegetativamente como hifas que produzem conídios e micélio que são os propágulos infectantes no hospedeiro artrópode. Embora este fungo possa colonizar vários hospedeiros, cepas individuais podem atingir apenas hospedeiros específicos (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

A fim de melhor entender o processo de infecção do fungo, estudos foram realizados no sentido de encontrar moléculas ou substâncias que facilitassem essa infecção. Beys da Silva e colaboradores (2010) verificou que lipases estão envolvidas neste processo e quando em contato com ebelactona B, que é um inibidor de lipases, esse processo fica prejudicado. Espécies de *Metarhizium* utilizam suas abundantes enzimas hidrolíticas, que incluem quitinases, proteases, lipases e esterases para penetrar na cutícula de insetos hospedeiros (ZHOU et al., 2018). Após o conídio aderir à cutícula do hospedeiro, ele utiliza fontes exógenas de carbono e nitrogênio para iniciar a sua germinação. Presume-se que o fungo

utilize da trealose, encontrada na hemolinfa do hospedeiro, para fornecimento de glicose para produção de energia. Após a adesão, os conídios formam tubos germinativos, que se diferenciam em apressórios. Neste momento, então, as hidrofobinas são substituídas por adesinas, que no caso da espécie *M. anisopliae*, é a Mad1, que fixam mais firmemente o conídio na cutícula do hospedeiro, possibilitando a germinação destas estruturas e a formação do apressório. Para estes eventos acontecerem, as espécies de *Metarhizium* possuem genes específicos que são ativados no momento da infecção; no caso de *M. anisopliae* este gene é o Mad1 quinase (AW; HUE, 2017).

Vários estudos mostraram a eficácia de *M. anisopliae* no controle de *R. microplus* (BAHIENSE et al., 2007; LEEMON et al., 2008; LEEMON, JONSSON, 2008; GARCIA et al., 2011; CAMARGO et al., 2016). Isolados de *M. anisopliae* também foram bem sucedidos no controle de lagartas da espécie *Helicoverpa armigera* (Lepdoptera, Noctuidae), além de não mostrar toxicidade em plantações de ervilha após três aplicações (TUPE, 2017).

A aplicação de *M. anisopliae* s.l. na pastagem é importante especialmente para controle de carrapatos com ciclos de vida heteroxenos, já que eles passam a maior parte de sua vida fazendo ecdise ou em busca de novos hospedeiros (FERNANDES et al., 2011). Ojeda-Chi e colaboradores (2010) demonstrou que uma mistura de dois isolados de *M. anisopliae* resultou numa maior eficácia no controle de *R. microplus* (larvas e adultos) em condições de laboratório e, em campo, sendo a eficácia maior em larvas.

2.4 Efeitos da Radiação Ultravioleta

O uso de fungos entomopatogênicos no controle de insetos pragas é uma opção já consolidada, porém é preciso entender que alguns fatores podem afetar a sua resistência ao meio ambiente e a sua eficácia nesse controle. Um dos fatores que mais influenciam a estabilidade dos fungos entomopatogênicos é a irradiação ultravioleta presente na luz solar.

A radiação solar é de extrema importância para o ambiente e seus efeitos têm sido amplamente estudados (PAUL; GWYNN-JONES, 2003; JENKINS, 2009; JENKINS, 2017). Apesar de ser importante para o meio ambiente, seus componentes ultravioletas são prejudiciais tanto para os seres vivos quanto para a matéria não viva. A radiação ultravioleta (UV) pode ser dividida em três comprimentos de onda: UV-A (315 - 400 nm), UV-B (280 - 315 nm) e UV-C (100 - 280 nm), sendo que esta última, apesar de ser a mais danosa, é completamente filtrada pela atmosfera terrestre (WILLIAMSON et al., 2014). Somente os comprimentos de onda acima de 295 nm, aproximadamente, estão presentes no espectro da luz que chega até a Terra e o componente UV-B é normalmente inferior a 1% da luz incidente (JENKINS, 2017). Apesar de incidir em pequena quantidade na Terra, a fração UV-B regula uma ampla gama de processos fisiológicos e de desenvolvimento nas plantas, incluindo o crescimento, fotossíntese, regulação estomática e defesa contra pragas e patógenos (FRASER, et al., 2017). A fração UV-B modifica o metabolismo e promove a síntese de uma variedade de metabólitos secundários, incluindo flavonóides. Algumas alterações metabólicas não são compreendidas, embora se saiba que alguns desses metabólitos secundários ajudem a repelir a predação por insetos herbívoros (JENKINS, 2009).

Apesar dos seus efeitos benéficos, a radiação solar pode ter efeitos deletérios sobre os organismos vivos. Dependendo do comprimento de onda, da sua irradiância, da duração da exposição, bem como da complexidade dos organismos, as frações UV podem induzir mutações e/ou eliminar organismos simples, se forem absorvidos pelo DNA. Em função desse modo de ação, a radiação UV tem sido utilizada para desinfecção de água e ar (SUTHAPARAN et al., 2017).

A absorção da fração UV-B induz a produção de dímeros de pirimidina, que podem ser formados de duas maneiras: entre as ligações 5 e 6 de duas pirimidinas adjacentes ou pode

haver uma ligação estável entre as porções 6 e 4 de duas pirimidinas vizinhas (NASCIMENTO et al., 2010). A absorção de UV-A, por sua vez, gera um estresse oxidativo, formando espécies reativas de oxigênio (RANGEL et al., 2006). O dano oxidativo pode ocorrer em membranas e proteínas quando a produção de espécies reativas de oxigênio supera a capacidade das defesas antioxidantes celulares (GHANIZADEH-KAZEROUNI et al., 2017).

O nível de irradiação UV-B pode variar de acordo com a latitude, a estação e a hora do dia, pois, de acordo com o ângulo solar, a espessura da atmosfera que a UV-B penetra pode ser diferente. Além disso, a liberação de clorofluorcarbonos (CFCs) causou a depleção da camada de ozônio, resultando em elevações locais de UV-B (JENKINS, 2009).

Diferentemente do micélio vegetativo, conídios da maioria dos fungos são estruturas dormentes. Processos como transcrição e síntese de proteínas não ocorrem em conídios de *Metarhizium* até a sua germinação, o que limita sua adaptação fisiológica e resposta a mudanças ambientais. A presença de mRNA e proteínas em conídios presume a necessidade de tolerância a estresses ambientais e é essencial para a resposta a um estímulo ambiental, retomando atividades metabólicas (NASCIMENTO et al., 2010).

Um dos principais sistemas de proteção à radiação pelos fungos é a sua pigmentação. Fungos pigmentados tendem a ser mais tolerantes, pois os pigmentos bloqueiam a radiação (FERNANDES et al., 2015). A melanina é um polímero multifuncional de pigmentos escuros e pode ser encontrada desde bactérias até mamíferos. Ela é produzida como um mecanismo de defesa contra estresses ambientais causados pela radiação UV, radicais livres, raios gama, desidratação ou temperaturas extremas (PEREIRA-JUNIOR et al., 2018). Geralmente são sintetizados durante a formação dos conídios para deposição na parede celular, contribuindo para a resistência contra enzimas hidrolíticas, impedindo a lise celular (BRAGA et al., 2015; PEREIRA-JUNIOR et al., 2018). Este pigmento permite que os fungos cresçam sob influência de altas taxas de radiação, como, por exemplo, em regiões altas de montanhas, desertos e superfícies de plantas. Em condições extremas, a proporção de fungos melanizados geralmente aumenta (GESSLER et al., 2014). Estudos com *Beauveria bassiana* usaram um gene exógeno de tirosinase e os resultados mostraram que as cepas modificadas produziram quantidades maiores de pigmentos amarelados do que a cepa selvagem e foi-lhes conferido um aumento significativo da resistência à UV (SHANG et al., 2012).

Os pigmentos de melanina nos fungos podem ser detectados na parede celular e podem ser vistos como uma substância escura durante exame microscópico. No fungo do solo *Gaeumannomyces graminis*, a camada de melanina compõe quase metade da espessura da parede celular e está localizada entre esta e a camada interna quitinosa (GESSLER et al., 2014).

Pigmentos semelhantes à melanina e pequenos metabólitos citoplasmáticos não-cromogênicos atuam como protetores solares, inativando espécies reativas de oxigênio (NASCIMENTO et al., 2010). Porém, nem todo fungo pigmentado é tolerante à radiação. A pigmentação não está estritamente ligada à tolerância. Ela é importante, mas não crucial (FERNANDES et al., 2015). Além da melanina, catalases e peroxidases, presentes na superfície dos conídios, protegem essas estruturas contra espécies reativas de oxigênio formadas por radiação ultravioleta e calor no meio ambiente (AW; HUE, 2017).

Fungos entomopatogênicos e sua relação com a radiação solar tem sido alvo de estudos constantes, pois essa exposição aos raios UV e o calor excessivo reduzem a viabilidade do conídio no campo (FARGUES et al., 1997; RANGEL et al., 2008) e retardam a sua germinação (ZIMMERMANN, 1982). Muitas condições podem interferir na avaliação da tolerância dos conídios à UV, como os nutrientes da cultura, a exposição ou não à luz durante ou após a irradiação, tempo da cultura (FERNANDES et al., 2015). Vários estudos

demonstraram que esses agentes expostos à luz solar perdem, pelo menos, 50% de suas atividades em poucos dias (IGNOFFO et al., 1977).

O dano aos conídios e sua inativação causada pelos raios ultravioletas têm sido frequentemente apontados como fatores capazes de reduzir a eficiência dos fungos em programas de controle biológico (BRAGA et al., 2001 a; b).

A irradiação solar pode interferir na sobrevivência e na dispersão de importantes fungos e seus efeitos deletérios representam um sério impedimento ao uso de fungos entomopatogênicos como controladores biológicos. A exposição direta à radiação solar por algumas horas pode inativar os conídios de *Metarhizium*, que é a forma mais utilizada como inóculo em campo. Além de destruir os conídios, doses subletais de radiação UV podem causar outros efeitos adversos nos conídios, reduzindo a velocidade de germinação e também sua virulência (NASCIMENTO et al., 2010).

2.5 Ecologia de *Metarhizium* spp.

A demora no avanço de descobertas acerca do controle biológico de pragas está intimamente relacionada com a falta de conhecimento das restrições ecológicas do sistema biológico no qual esses agentes estão inseridos. E isso reflete no controle biológico realizado pelos fungos (BRUCK, 2004).

Fungos do gênero *Metarhizium* são naturalmente encontrados no solo ou podem sobreviver neste ambiente em um estado adormecido enquanto aguardam um hospedeiro suscetível. Presumivelmente, conídios produzidos nos cadáveres de insetos contribuem significativamente para o avanço das populações de espécies de *Metarhizium*. No entanto, populações microbianas presentes no solo são normalmente o resultado de substratos orgânicos produzidos em rizosferas das camadas superiores do solo (ST. LEGER, 2008).

A rizosfera é uma zona estreita de solo sujeita à influência de raízes vivas, onde exsudados de raiz estimulam ou inibem populações microbianas e suas atividades. A superfície radicular também oferece uma grande quantidade de nutrientes para muitas espécies de bactérias e fungos, em troca de solubilização de nutrientes inorgânicos ou controle biológico contra patógenos das plantas. Microrganismos que têm a habilidade de se estabelecer em rizosferas de raízes em desenvolvimento são definidos como rizosferas-competentes. Este atributo é importante quando consideramos o potencial uso comercial de agentes de controle biológico para patógenos transportados pelo solo (ST. LEGER, 2008).

M. robertsii é conhecido por habitar o solo em todo o mundo e tem sido estudado como um biocontrolador de insetos. Esta espécie, além de ser um patógeno para os insetos, também coloniza a rizosfera das plantas. Essa diferença de comportamento pode ser evidenciada quando a expressão diferencial de genes de adesina, como o MAD1 e o MAD2 é estudada. O primeiro é usado para adesão à cutícula do hospedeiro, enquanto que o MAD2 contribui para a adesão na planta (SASAN; BIDOCHKA, 2012).

Sasan e Bidochka (2012) verificaram que conídios de *M. robertsii* aderiram a raízes de gramíneas (*Panicum virgatum*) e de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), fazendo com que houvesse um aumento nos pêlos radiculares nas suas raízes. Não só houve uma diferença na aparência dos pêlos radiculares, mas também um aumento no seu desenvolvimento. As raízes das plantas tratadas com *M. robertsii* também foram significativamente mais longas em relação ao controle. *M. robertsii* penetrou na parede da raiz do feijoeiro, invadiu as células da raiz e cresceu dentro dos espaços intracelulares e dentro das células da raiz. Esta espécie de fungo entomopatogênico também foi associada a planta após 60 dias, sugerindo uma colonização endofítica.

O solo apresenta uma organização física definida. As partículas de argila, areia e silte, juntamente com espaços cheios de ar e água, matéria orgânica e microrganismos se combinam

para formar micro agregados, que são, então, organizados em macro agregados pela ligação de argila com hifas de micorriza e outros fungos do solo. Esta estrutura física define uma rede de poros, que é o habitat de toda a biota do solo (JARONSKI, 2007). A argila funciona como um protetor solar, bloqueando a radiação ultravioleta (FERNANDES et al., 2015). Já os solos arenosos, que possuem poros médios e grandes, contribuem para maior crescimento de fungos, já que esses poros facilitam a penetração das hifas, aumentando a absorção de nutrientes e as trocas gasosas (LANZA et al., 2004).

Estudos revelaram a interação entre formigas e fungos no solo. A contaminação do solo por patógenos tem um grande impacto na conformação do ninho de formigas, modificando a estrutura de escavação. A escavação do solo infectado seria um comportamento contra-intuitivo, já que o fungo *M. brunneum* é conhecido por ser eficiente em matar as formigas da espécie *Myrmica rubra* e também porque as formigas evitam ativamente o contato físico com os fungos, possivelmente por perceber substâncias químicas emitidas por seus esporos. Porém, as formigas podem estar sendo manipuladas por esses patógenos, que as atraem com sinais de odor, a fim de aumentar a probabilidade de contaminar toda a colônia de formigas. A presença de fungos também pode indicar condições ecológicas favoráveis, como solo úmido e rico em húmus (LECLERC et al., 2018).

Mochi e colaboradores (2006) avaliaram a patogenicidade de *M. anisopliae* para *Ceratitis capitata* num solo com presença de agrotóxicos e também o efeito das formas de aplicação da suspensão fúngica. Seus resultados mostraram que os pesticidas tiveram uma pequena influência na ação de *M. anisopliae*, os fungicidas diminuíram a ação patogênica sobre os insetos, por os atingirem somente quando estava na fase de pupa e, conseqüentemente, diminuindo a mortalidade das moscas nesses estágios. Esses estudos sugerem também que os conídios aplicados na superfície do solo ou incorporados a ele são capazes de controlar eficientemente as moscas das frutas.

Entender a proteção que o solo confere aos fungos é importante. Jaronski (2007) observou que o solo tem grande influência na persistência dos conídios e as flutuações de umidade nos solos foram identificadas como um fator importante na longevidade dos conídios.

Além do solo, adjuvantes como os óleos podem auxiliar na proteção do fungo contra fatores abióticos. Formulações com óleos podem ser mais eficazes do que suspensões à base de água porque resulta em maior aderência dos conídios à cutícula do hospedeiro e maior dispersão destes em locais de alta umidade, como as membranas intersegmentais. Além disso, os óleos são compatíveis com conídios lipofílicos, como os de *Metarhizium* sp., ideais para aplicação que produzem gotículas atomizadas, que não evaporam antes de chegar ao seu alvo (POLAR et al., 2005).

Luz e colaboradores (2015) testaram suspensões aquosas e formulações oleosas e diferentes tipos de aplicação em ovos de *R. sanguineus*. O aparecimento de micélio e novos conídios em aglomerados de ovos foram mais rápidos quando os conídios estavam formulados em óleo. Além disso, a maioria das larvas eclodidas sucumbiu à infecção fúngica e foi morta, especialmente se tratada com conídios formulados em óleo. A adição de óleo na formulação aumentou a adesão dos conídios na superfície dos ovos, estimulando sua germinação e desenvolvimento.

Estudos com ovos, larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* mostraram maior eficácia quando estes foram tratados com formulações fúngicas a base de óleo. Nas fêmeas ingurgitadas, o percentual de controle foi maior comparado ao grupo tratado somente com a suspensão aquosa; em relação aos ovos, o grupo tratado com as formulações à base de óleo teve período de incubação, período de eclosão e percentual de eclosão diminuídos em relação ao grupo tratado com suspensão aquosa; por último, quando as larvas foram tratadas com as

formulações a base de óleo, estas tiveram média de mortalidade próximo de 100% após 5 dias de tratamento (CAMARGO et al., 2012).

2.6 Uso de Propágulos no Controle Biológico de Carrapatos

Propágulos são formas de propagação vegetativa, produzidos pelos fungos em diferentes situações. Um desses propágulos é o conídio, uma estrutura maior que 9 µm de comprimento, não septado, cilíndrico ou ovoide e muitas vezes com um ligeiro estreitamento central. Formam cadeias usualmente agregadas em colunas prismáticas ou cilíndricas ou uma massa sólida de cadeias paralelas (HUMBER, 1997).

Os conídios são a forma natural de dispersão de muitos fungos entomopatogênicos e eles já são amplamente utilizados para controle de pragas agrícolas. Eles são produzidos por estruturas denominadas conidióforos na superfície de hospedeiros infectados. São geralmente resistentes à dessecação e podem permanecer em estágio de latência no solo por longos períodos (ALKHAIBARI et al., 2017).

Em condições naturais, *Metarhizium* spp. produzem conídios que são os responsáveis pela infecção do hospedeiro e pela dispersão ambiental. Após a infecção, produzem corpos hifais que vão colonizar toda a hemocele do hospedeiro invertebrado. Em condições laboratoriais, conídios são produzidos em meio sólido. Quando cultivados em meio líquido, produzem blastosporos, que são células vegetativas análogas aos corpos hifais formados naturalmente na hemolinfa (BERNARDO et al., 2018).

Blastosporos são esporos hidrofílicos, de parede fina, pleomórficos e geralmente germinam mais rápido que os conídios (2-8 horas), sendo este atributo um determinante da virulência (ALKHAIBARI et al., 2016). Blastosporos sofrem dessecação facilmente, o que aponta para seu uso em meio líquido (ALKHAIBARI et al., 2017).

Conídios e blastosporos têm vantagens e desvantagens em seus usos. A produção de blastosporos é mais barata em relação à produção de conídios, além de serem produzidos mais rapidamente (2-3 dias). Conídios são hidrofóbicos e precisam de um surfactante para suspê-los em água, enquanto que blastosporos são hidrofílicos e podem ser suspensos em água sem maiores problemas (ALKHAIBARI et al., 2017).

Outro propágulo investigado para o controle biológico é microescleródio, que são agregados compactos de hifas que se formam em condições ambientais e/ou nutricionais desfavoráveis. Possuem de 50-600 µm de diâmetro e são compostos de apenas algumas células. Estas estruturas são resistentes ao estresse oxidativo e à radiação UV, além de serem capazes de produzir compostos microbianos. Elas se tornam melanizadas à medida que se desenvolvem e se dessecam até certo ponto, guardando reservas nutricionais endógenas para usar quando as condições voltarem a ser favoráveis (JACKSON; PAYNE, 2016; SONG et al., 2016). Quando as condições de crescimento voltam à normalidade, os microescleródios retomam a germinação, podendo infectar e colonizar tecidos de plantas hospedeiras, além de produzirem conídios que serão capazes de infectar insetos hospedeiros ou plantas (JACKSON; PAYNE, 2016). Devemos diferenciar o termo microescleródio, que vem do inglês "*microsclerotia*" do termo esclerócio, que vem do grego "*sklerós*". O termo esclerócio designa uma estrutura que é produzida naturalmente por alguns fungos na natureza. O microescleródio utilizado no presente estudo foi produzido de forma artificial, já que fungos do gênero *Metarhizium* não produzem essas estruturas naturalmente.

A estabilidade dos microescleródios, assim como sua capacidade de formação de conídios em condições adequadas, fazem dessa estrutura uma alternativa promissora para o controle biológico de pragas. O uso de microescleródios no solo é favorável para sua sobrevivência, pois é um ambiente com condições de temperatura e umidade favoráveis a ele, além de conferir proteção contra a radiação ultravioleta. O interesse comercial no uso desses

propágulos aumentou quando se descobriu que algumas espécies de *Metarhizium* conseguiram produzir microescleródios por fermentação em cultura líquida (MASCARIN et al., 2013).

Esses propágulos já foram induzidos com sucesso em fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium brunneum* (BEHLE et al., 2013; GOBLE et al., 2016), *Metarhizium anisopliae* (JACKSON; JARONSKI, 2009), *Lecanicillium lecanii* (WANG et al., 2013), entre outros.

Segundo Mascarin e colaboradores (2018), há possibilidade de que os grânulos de microescleródio de *M. anisopliae* produzam esporos infecciosos, criando focos de inóculo ao longo do tempo e, assim, controlando a cigarrinha das pastagens (Hemiptera: Cercopidae), quando comparados com formulações de conídios.

Microescleródios foram usados para o controle de ninfas alimentadas e não alimentadas de *Ixodes scapularis*, que foram susceptíveis à infecção, obtendo-se taxas de mortalidade de 56 e 74%. Observou-se elevadas taxas de produção de conídios a partir de grânulos de microescleródio, além da mortalidade dos carrapatos (BEHLE et al., 2013).

A resistência do carrapato dos bovinos aos acaricidas químicos pode ser um ponto inicial para que se busquem novas alternativas para o controle desta espécie, já que não há nenhum produto a base de fungos registrado no Brasil para este fim. Apesar da elevada biodiversidade endêmica, somente três cepas de *M. anisopliae* (IBCB 425, IBCB 348 e ESALQ E9) são utilizadas entre 24 produtos comerciais. Alguns desafios precisam ser enfrentados com relação à utilização de fungos entomopatogênicos no controle de *R. microplus*, dentre os quais estão a comercialização de inseticidas e acaricidas químicos por empresas já consolidadas no Brasil, além da vida útil curta em condições não refrigeradas, que limita a distribuição dos micoinseticidas nas regiões tropicais do Brasil. Além disso, muitos usuários finais que utilizam produtos químicos tendem a ser reticentes com o uso exclusivo de produtos biológicos (MASCARIN et al., 2018). Por isso, estudos que visem a melhoria na produção e formulação de agentes microbianos aumentarão o potencial de desenvolvimento desses biocontroladores.

Vários trabalhos relatam o efeito da radiação UV-B em conídios de *Metarhizium* spp. (BRAGA et al., 2001a, b; RANGEL et al., 2004; 2005; 2006; 2008; 2011; FERNANDES et al., 2015). O presente estudo mostra aspectos novos envolvendo a compreensão de como diferentes ambientes podem influenciar a tolerância de conídios à irradiação UV-B, sendo este estudo relevante para o uso de fungos entomopatogênicos contra diferentes artrópodes em diferentes habitats. Dependendo de onde o artrópode-praga esteja, a aplicação de fungos deve ser realizada nas folhas, no solo ou mesmo em animais (controle biológico da fase parasitária dos carrapatos). O local de aplicação dos fungos pode implicar numa maior ou menor necessidade de proteção conidial. Neste sentido, buscar informações sobre como diferentes tipos de solo influenciam a tolerância dos conídios, ou como o óleo mineral os protege de condições abióticas estressantes pode ajudar a desvendar como o meio ambiente afeta a tolerância de fungos por fatores abióticos e a persistência ambiental dos fungos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Realização Dos Experimentos:

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Médico Veterinária (LCM), localizado na Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhemn Otto Daniel Neitz (EPPWON) no Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no Município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. O preparo dos microescleródios foi executado no Laboratório de Patologia de Invertebrados, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás.

3.2 Obtenção Dos Isolados de *Metarhizium* spp.

Os isolados utilizados de *Metarhizium* spp. foram obtidos a partir de 234 amostras de solo (autorização SISBIO #51948-2) coletadas no Estado do Rio de Janeiro, no período de março de 2015 a abril de 2016 (Tabela 1). Os isolados foram mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade (cultivado em meio Batata-Dextrose-Agar, temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa $\geq 80\%$ de durante 14 dias). Após esse período, as placas de Petri contendo os isolados foram armazenadas a 4°C.

Tabela 1: Lista dos isolados fúngicos de *Metarhizium* spp. utilizados no presente estudo, coletados de amostras de solo localizadas no Estado do Rio de Janeiro.

Isolado Fúngico	Espécie	Origem	Município onde foi realizada a coleta	Latitude	Longitude
LCMS01	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Seropédica – UFRRJ	22° 45' 54"	43° 41' 58"
LCMS02	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Seropédica – UFRRJ	22° 46' 05"	43° 40' 39"
LCMS03	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Seropédica – CTUR	22° 46' 04"	43° 40' 41"
LCMS04	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Seropédica – CTUR	22° 45' 58"	43° 40' 48"
LCMS05	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Seropédica – CTUR	22° 45' 58"	43° 40' 49"
LCMS06	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Seropédica – CTUR	22° 45' 58"	43° 40' 49"
LCMS07	<i>M. pingshaense</i>	Solo	Seropédica – CTUR	22° 45' 58"	43° 40' 48"
LCMS08	<i>M. anisopliae</i>	Solo	Seropédica – CTUR	22° 45' 58"	43° 40' 49"
LCMS09	<i>M. pingshaense</i>	Solo	Seropédica – CTUR	22° 45' 58"	43° 40' 49"
LCMS10	<i>Metarhizium</i> sp.	Solo	Rio de Janeiro	22° 49' 07"	43° 12' 09"

As espécies dos isolados LCMS01 ao LCMS09 foram determinadas de acordo com análises no gene EF1 alpha e o gênero do isolado LCMS10 foi definido baseado em características morfológicas.

3.3 Preparo Das Suspensões e Formulações Fúngicas Conidiais Para o Teste de Tolerância à Irradiação UV-B

Os isolados foram cultivados em meio batata dextrose ágar (Kasvi) suplementado com 0.1g L^{-1} de extrato de levedura (BDAL) (0,01% [p/v]) em placas de Petri (polipropileno, $90 \times$

15 mm, Kasvi) no escuro a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e por 14 dias. Os conídios foram raspados das placas de cultura e suspensos em uma solução de água estéril e monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80[®]) a 0,01%. As suspensões foram ajustadas para a concentração de 1×10^5 conídios mL^{-1} , utilizando câmara de Neubauer para o ajuste da concentração. As preparações foram conduzidas em fluxo laminar. As suspensões foram filtradas com algodão hidrofílico e funil de vidro estéreis para impedir a agregação de conídios. As formulações oleosas foram preparadas com as seguintes proporções: 89% de suspensão aquosa, 10% de óleo mineral estéril (Proquimios) e 1% de Tween 80[®]. Uma alíquota de 20 μL de cada suspensão aquosa ou formulação oleosa foi inoculada em 4 mL de meio BDAL acrescido de 0,002% (p/v) de benomyl com 25% de ingrediente ativo (Hi-Yield Chemical Company, Bonham, TX) (BRAGA et al., 2001a,b) em placas de Petri (35 x 10 mm, Kasvi). Para avaliação da viabilidade do fungo na formulação oleosa, o óleo foi retirado da formulação utilizando Solub'Oil (General Chemicals) seguindo a metodologia de Paixão et al. (2017); após a exposição à radiação UV-B, os conídios foram inoculados em BDAL acrescido de 0,002% (p/v) de benomyl. A baixa concentração de benomyl impede o crescimento exacerbado do tubo germinativo sem afetar negativamente o processo de germinação, possibilitando a contagem dos conídios germinados e não germinados. *Metarhizium robertsii* ARSEF 2575 e *M. acridum* ARSEF 324 foram utilizados como isolados padrão para validar os ensaios, uma vez que a sua tolerância conidial à UV-B já é conhecida.

3.4 Efeito da Irradiação UV-B Sobre a Germinação Relativa de Conídios Suspensos em Água ou Formulados em Óleo

Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento, com a irradiação UV fornecida por duas lâmpadas fluorescentes TL 20W/12 RS (Filipinas, Eindhoven, Holanda). Foram avaliadas suspensões aquosas e formulações oleosas contendo 10% de óleo mineral. Após a inoculação das suspensões e formulações nas placas de Petri, estas foram imediatamente expostas à radiação UV-B por aproximadamente 1 hora (4.0 kJ m^{-2}). O espectro de distribuição da irradiação na câmara é exibido na Figura 1. As placas foram cobertas com uma membrana de diacetato de celulose de 0,13 mm de espessura que bloqueia a radiação com comprimento de onda inferior a 290 nm. Isso permitiu a passagem da maior parte das radiações UV-A e UV-B, mas impediu a exposição à UV-C ($< 280 \text{ nm}$) e comprimentos curtos de UV-B. As distribuições espectrais dos filtrados das lâmpadas na câmara estão demonstrados em Braga e colaboradores (2001a). O espectro de ação de dano ao DNA (dimerização de pirimidinas) desenvolvido por Quate e colaboradores (1992) e normalizado para a unidade a 300 nm foi utilizado para calcular as irradiâncias UV. O espectro da irradiação foi mensurado com utilização do espectroradiômetro Ocean Optics USB 2000 (Dunedin, FL). As placas do grupo controle foram cobertas com folha de papel alumínio para bloquear qualquer radiação ultravioleta, e mantidas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Após irradiação, as placas foram incubadas por 24 e 48 horas a 27°C em ausência de luz. Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes, utilizando-se novas placas de conídios a cada repetição. A germinação relativa ($\text{GR} = (\text{TC}/\text{CG}) \times 100$, onde TC representa o número de conídios germinados em placa exposta à UV-B, e CG representa a quantidade de conídios germinados em placa não exposta) (BRAGA et al., 2001a) dos conídios foi observada utilizando microscópio a $400 \times$ após coloração com azul de metil.

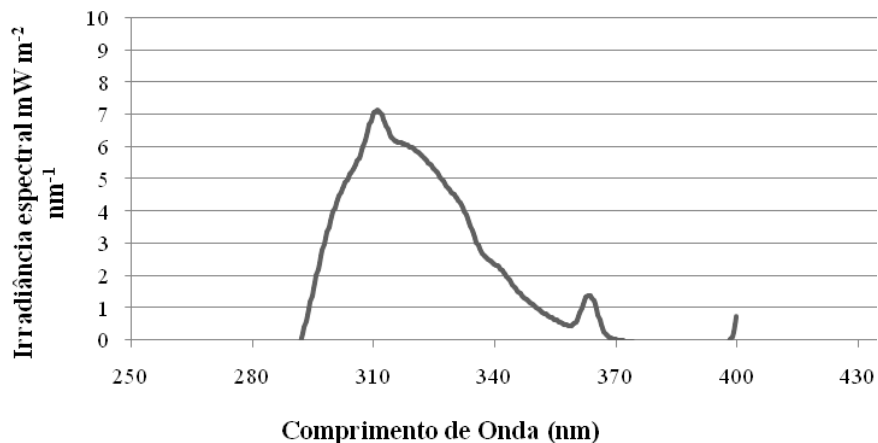


Figura 1: Espectro de irradiância das lâmpadas da câmara de irradiação UV-B filtradas com diacetato de celulose. As lâmpadas forneceram $856,97 \text{ mW m}^{-2}$ de radiação UV-B com base na irradiância ponderada por Quaité (Quaité et al. 1992).

3.5 Avaliação *in vitro* Da Germinação dos Conídios de *Metarhizium. spp.* No Solo Após Irradiação UV-B

Três diferentes tipos de solo foram utilizados: tipo I (uma mistura de pequenas partículas de argila e silte), tipo II (solo argiloso) e tipo III (solo arenoso) (Figura. 2). As suspensões fúngicas foram preparadas de acordo com o item 3.3 e na concentração de 1×10^4 conídios mL^{-1} . As suspensões foram filtradas com auxílio de funil de vidro e algodão hidrofílico estéreis e $50 \mu\text{l}$ foram inoculadas em 3 g de solo esterilizado em sacos plásticos (Talge – $7 \times 10,5 \text{ cm}$) e homogeneizadas com o auxílio das mãos. O solo contendo a suspensão foi colocado em placas de Petri, atingindo a altura de aproximadamente 8 mm e rapidamente exposto à radiação UV-B por aproximadamente 1 hora ($4,0 \text{ kJ m}^{-2}$), segundo descrito no tópico anterior (3.4). Imediatamente após a exposição, 0,35 g do solo irradiado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, acrescido de 1 ml de água destilada esterilizada com surfactante Tween 80[®] a 0,01% e agitado no vortex por 30 segundos. Uma alíquota de $50 \mu\text{l}$ de cada isolado foi retirada e posteriormente inoculada em placas com meio de cultura seletivo artificial CTC (BDA acrescido de Cloranfenicol, Tiabendazol e Cicloheximida) e espalhados com auxílio da Alça de Drigalski (FERNANDES et al., 2010). As placas foram incubadas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, em ausência de luz, e o aparecimento e contagem das colônias fúngicas de *Metarhizium spp.* foram verificados aos 7 dias. Os experimentos foram realizados em dias diferentes e em triplicata.

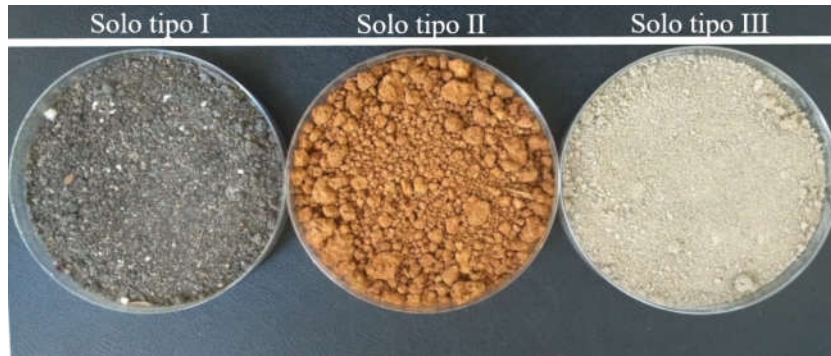


Figura 2: Três diferentes tipos de solos utilizados na avaliação da germinação dos conídios de *Metarhizium* spp. após radiação UV-B.

3.6 Avaliação *in vitro* Da Germinação De Microescleródios De *Metarhizium* spp. Após Ação Da Irradiação UV-B

Microescleródios (ME) dos dez isolados de *Metarhizium* spp. foram produzidos segundo Mascarin et al. (2014). Um mililitro da solução contendo ME foi adicionada a 9 ml de soro fisiológico estéril. Esta solução foi centrifugada por 3 vezes a 1788 G por 10 minutos, exceto no último ciclo, onde o tempo foi de 15 minutos. Após cada centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso em 9 ml de soro fisiológico estéril. Uma alíquota de 50 μ l da suspensão final de ME foi colocada sobre uma lâmina e coberta com lamínula de vidro para quantificação dos ME em microscópio óptico. Foi inoculado o equivalente a 100 ME por placa contendo meio de cultura ágar-ágar, com auxílio da alça de Drigalski. As placas foram expostas à radiação UV-B como descrito no item 3.4. Após 6 dias, a germinação dos ME foi observada. Grânulos de ME foram considerados germinados quando havia o desenvolvimento de hifas ao redor do grânulo de ME. O experimento só foi considerado válido quando as placas de controle continham pelo menos 100 ME germinados.

3.7 Avaliação Do Impacto Da Irradiação UV-B Em Blastosporos De *Metarhizium* spp.

Para produção de blastosporos, conídios de *Metarhizium* spp. foram cultivados em meio Batata Dextrose Ágar e uma suspensão conidial foi preparada para fornecer uma concentração inicial de 1×10^8 conídios ml^{-1} . Foram utilizados 50 mL de meio líquido batata dextrose, suplementado com 0.1g L^{-1} de extrato de levedura para cada frasco de tipo Erlenmeyer. Três mililitros das suspensões conidiais de cada isolado foram inoculadas nos respectivos frascos, que foram tampados com algodão hidrofóbico e colocados em agitador orbital (TE-424, Tecnal®) a 200 rpm por 72 horas, em temperatura de 25°C. Após o crescimento do fungo, o meio foi filtrado em funil com auxílio de gaze para remoção do micélio produzido durante o cultivo e colocado em tubos cônicos de 50 mL. O meio contendo os blastosporos passou por dois ciclos de centrifugação a 3410 G por 5 minutos. Após o primeiro ciclo, o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 10 mL de água com Tween 80® a 0,01%, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 5 mL de água com Tween 80® a 0,01%, seguido de homogeneização em vórtex. As suspensões foram ajustadas para uma concentração de 1×10^4 mL^{-1} . Para exposição dos blastosporos à radiação UV-B, 20 μ l da suspensão aquosa foram inoculados em placas de Petri com BDAL e espalhadas com auxílio

da alça de Drigalski. Imediatamente após a inoculação, foram expostas à irradiação UV-B, conforme descrito no item 3.4. Após irradiação, as placas foram incubadas a 27°C em ausência de luz. O aparecimento e contagem das colônias fúngicas de *Metarhizium* foram verificados após 72 horas.

3.8 Avaliação Da Mortalidade De Larvas De *Rhipicephalus microplus* Após Exposição Dos Fungos à Irradiação UV-B.

Para este experimento, foram selecionados dois isolados de *Metarhizium* spp. (LCMS03 e LCMS08), previamente estudados e escolhidos por terem taxas de virulência previamente avaliadas e estatisticamente iguais e tolerância à radiação UV-B diferentes. Para o grupo que foi exposto à radiação, as placas contendo os isolados fúngicos foram expostas à radiação UV-B, de acordo com o item 3.4. Após a exposição, os conídios foram raspados da placa com auxílio de uma espátula e foram preparadas suspensões fúngicas de acordo com o item 3.3 e ajustadas para a concentração de 1×10^7 conídios mL⁻¹. Para o grupo controle, as placas dos isolados não foram expostas à radiação UV-B e as suspensões fúngicas foram preparadas como descrito anteriormente. Foram separados 5 grupos (Controle; LCMS03 não exposto à radiação UV-B; LCMS03 exposto à radiação UV-B; LCMS08 não exposto à radiação UV-B e LCMS08 exposto à radiação UV-B) de 10 tubos cada, cada tubo contendo 50 mg de ovos de fêmeas de *R. microplus*, cujas larvas eclodiram previamente. As fêmeas foram coletadas do piso das baias de animais infestados artificialmente e mantidos estabulados (projeto aprovado pelo Comitê de Ética da UFRRJ (CEUA) sob o nº 037/2014). Após a coleta, as fêmeas ingurgitadas foram lavadas em água corrente e imersas por três minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,05% para a higienização da cutícula, sendo posteriormente secas, identificadas e pesadas. Cada tubo foi tratado com 1 ml da suspensão fúngica a 1×10^7 conídios mL⁻¹ referente a seu grupo. O grupo controle foi tratado com água acrescida de Tween 80® a 0,01%. A taxa de mortalidade das larvas foi observada após 5, 10 e 15 dias.

3.9 Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para distribuição da normalidade. Para dados paramétricos (tolerância à UV-B de conídios de *Metarhizium* suspensos em água ou formulados em óleo, tolerância de blastosporos de *Metarhizium* à UV-B) foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Para os dados não-paramétricos (tolerância à UV-B de ME, conídios em amostras de solo e mortalidade de larvas de *R. microplus*) foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo StudentNewman-Keuls. Para os dados de tolerância à UV-B de ME e para conídios em amostras de solo, a análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism, v.7.00, Inc. (GraphPad Software, EUA) e o teste de Kruskal Wallis foi realizado com o programa BioEstat, v. 5.0 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – Tefé – AM). O teste de Kruskal Wallis para a tolerância à UV-B de MS de *Metarhizium* foi realizado usando o pacote Easyanova através do software R (R Core Team, 2016).

4 RESULTADOS

4.1. Efeito Da Irradiação UV-B Sobre a Germinação Relativa De Conídios Suspensos Em Água Ou Formulados Em Óleo

4.1.1. Efeito da Irradiação UV-B 24 Horas Após Exposição

Os efeitos da germinação nos conídios dos 12 isolados de *Metarhizium* spp. (10 isolados de LCM mais dois isolados ARSEF padrão) após exposição à UV-B (4.0 kJ m^{-2}) são mostrados abaixo (Figura 3). A germinação relativa foi comparada estatisticamente entre isolados suspensos em água ou formulados em óleo.

A adição de óleo mineral nem sempre resultou em tolerância à UV-B significativamente superior em relação à suspensão aquosa do mesmo isolado. Neste sentido, 24 horas após exposição à irradiação, os isolados LCMS05, LCMS06, LCMS07, LCMS08 e LCMS10 obtiveram resultados iguais estatisticamente quando comparados em suas suspensões aquosas e formulações oleosas (Figura 4).

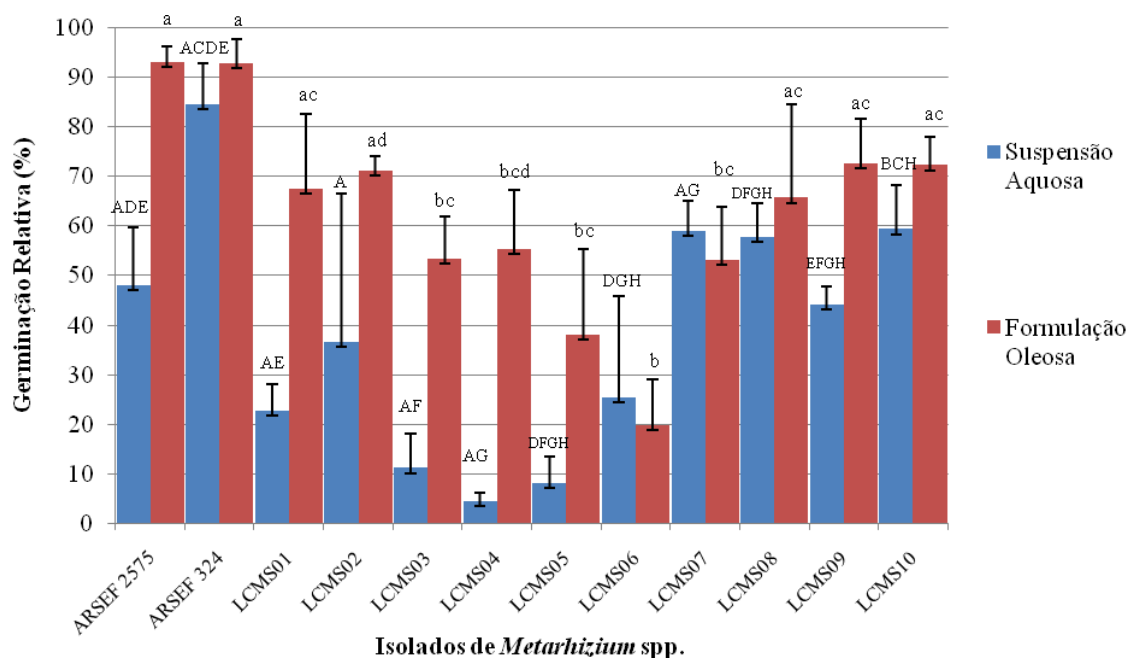


Figura 3: Germinação Relativa de conídios de *Metarhizium* spp. 24 horas após a exposição à irradiação UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Os dados das suspensões aquosas e os dados das formulações oleosas foram comparados entre si. ARSEF 2575 e ARSEF 324 foram usados como padrão. Barras de diferentes isolados com a mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$). Barras de diferentes isolados com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$).

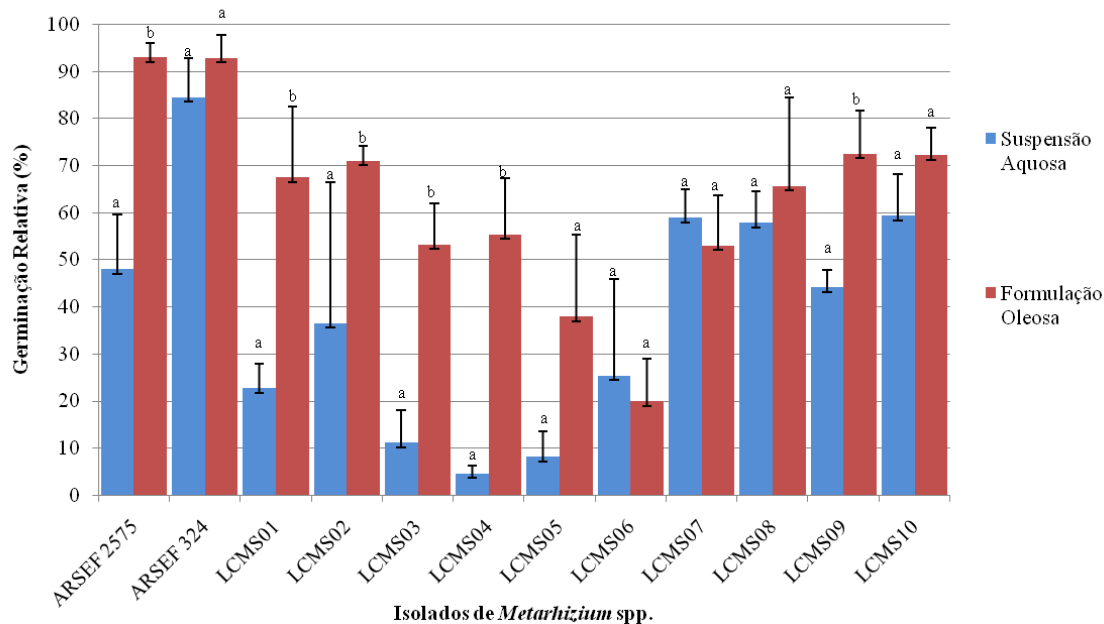


Figura 4: Germinação relativa de conídios de *Metarhizium* spp. 24h após a exposição à irradiação UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Os dados das suspensões aquosas e formulações oleosas de cada isolado foram comparados entre si. ARSEF 2575 e ARSEF 324 foram usados como padrão. Barras do mesmo isolado com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$).

4.1.2. Efeito da Irradiação UV-B 48 Horas Após Exposição

Conídios de *Metarhizium* spp. foram avaliados também 48 horas após a exposição à irradiação UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Podemos notar que alguns isolados com baixa tolerância à UV-B (ex. LCMS03 e LCMS04) tiveram considerável recuperação na germinação relativa, quando esta foi comparada entre 24h e 48h após a exposição à UV-B (Figura 5).

A tolerância de cada isolado suspenso em água ou formulado com óleo mineral também foi comparada (Figura 6). Os mesmos isolados que não diferiram estatisticamente 24 h após a exposição à UV-B (LCMS05, LCMS06, LCMS07, LCMS08 e LCMS10), também não tiveram diferença significativa 48 h após a exposição, quando comparados em suas suspensões aquosas e formulações oleosas.

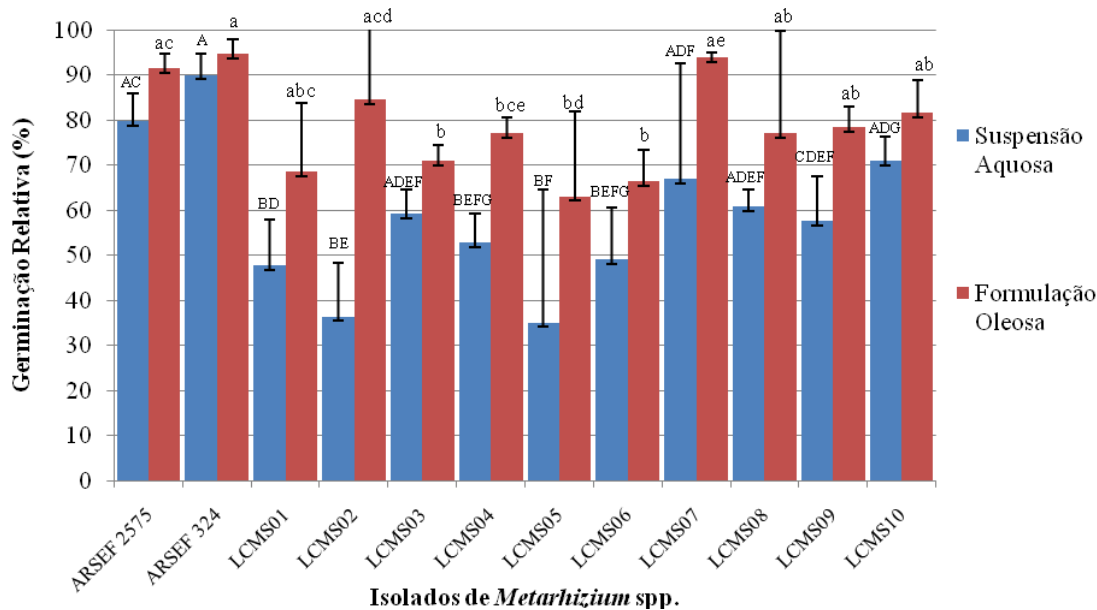


Figura 5: Germinação Relativa de conídios de *Metarhizium* spp. 48 horas após a exposição à irradiação UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Os dados das suspensões aquosas e os dados das formulações oleosas foram comparados entre si. ARSEF 2575 e ARSEF 324 foram usados como padrão. Barras de suspensões aquosas de diferentes isolados com a mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$). Barras de formulações oleosas de diferentes isolados com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$).

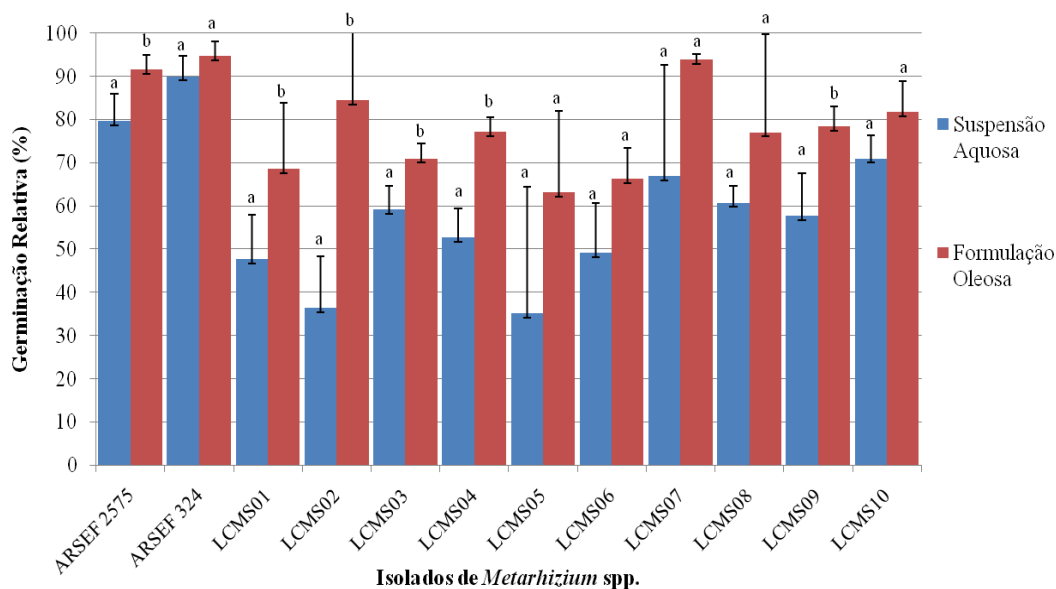


Figura 6: Germinação Relativa de conídios de *Metarhizium* spp. 48h após exposição à irradiação UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Os dados das suspensões aquosas e das formulações oleosas de cada isolado foram comparados entre si. ARSEF 2575 e ARSEF 324 foram usados como padrão. Barras de um mesmo isolado seguidas por mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si ($P \geq 0,05$).

4.2. Avaliação *in vitro* Da Germinação De Conídios De *Metarhizium* spp. No Solo Após Ação Da Irradiação UV-B.

Para a realização deste experimento, três diferentes tipos de solos foram utilizados. Suas características granulométricas estão descritas na Tabela 2 e suas análises foram realizadas no Departamento de Solos da UFRRJ.

Tabela 2: Características granulométricas dos três diferentes tipos de solos utilizados para avaliação da germinação de *Metarhizium* spp. após ação da irradiação UV-B.

Solo	Argila Total (%)	Areia Total (%)	Areia Fina (%)	Areia Grossa (%)	Silte (%)
1	14,7	59,1	15,7	4,4	26,2
2	18,4	55,8	10,3	45,5	25,8
3	17,1	60,0	53,5	6,5	22,9

Os efeitos da germinação nos conídios dos 10 isolados de *Metarhizium* spp. quando adsorvidos em diferentes tipos de solo, após exposição ou não (controle) à UV-B, são mostrados na Tabela 3. As Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) obtidas de placas não expostas e de placas expostas à UV-B, para o mesmo isolado, foram comparadas estatisticamente em cada tipo de solo. Para todos os tipos de solo, conídios adsorvidos em solo exposto à UV-B produziram a mesma quantidade de UFC que conídios em solo não exposto, exceto LCM S05 adsorvido em solo tipo I. A tabela 3 também mostra análise estatística de UFC obtida de placas de solo não expostas ou placas de solo exposto à UV-B, para cada isolado separadamente, considerando os três diferentes tipos de solo.

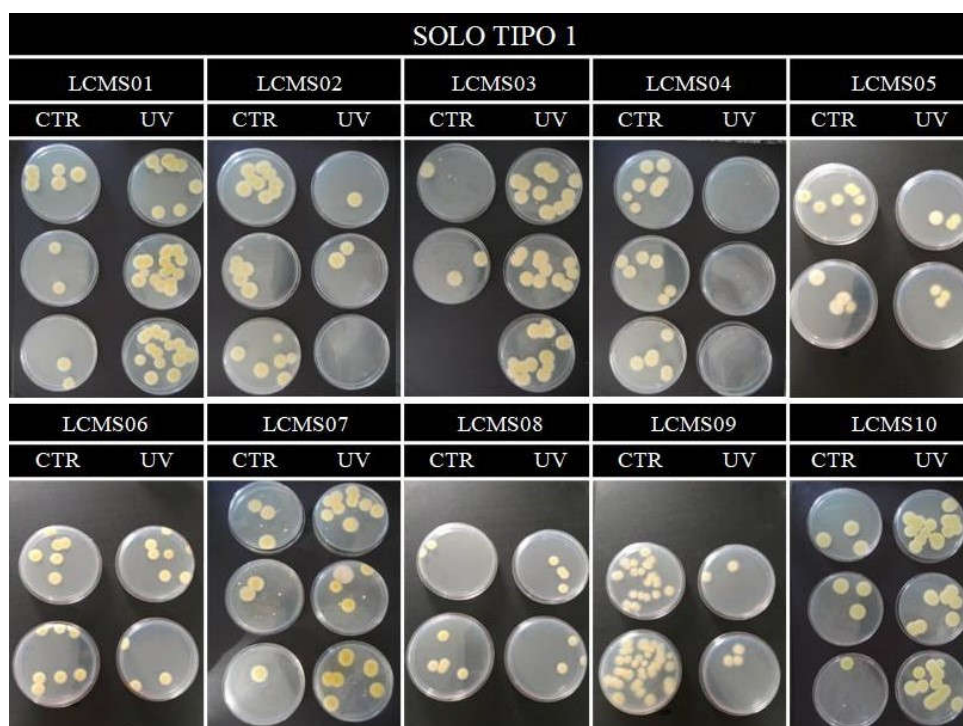


Figura 7: Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) obtidas de placas não expostas e de placas expostas à UV-B, quando os isolados foram adsorvidos em solo do tipo 1.

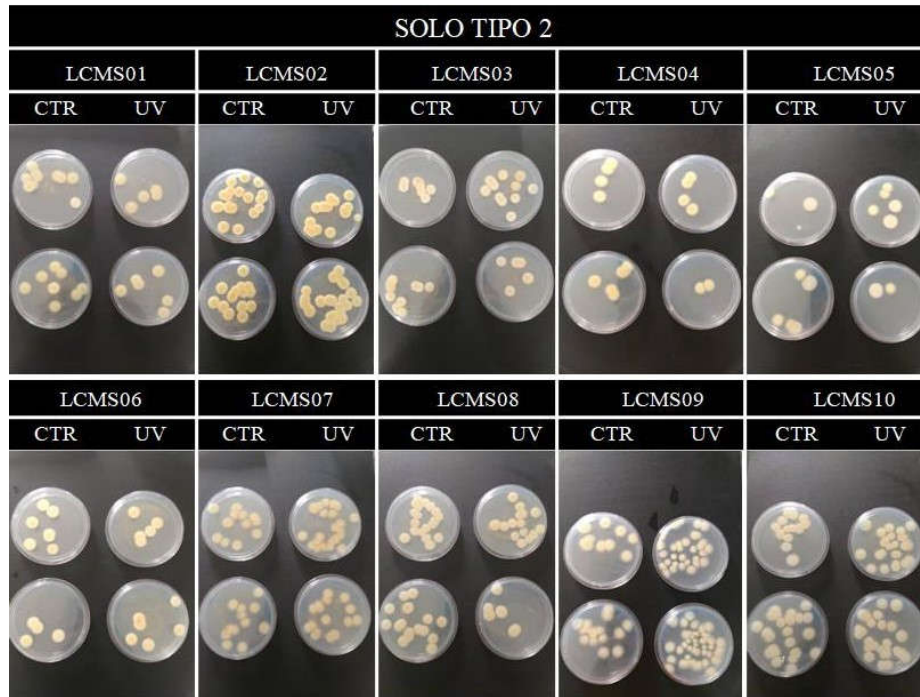


Figura 8: Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) obtidas de placas não expostas e de placas expostas à UV-B, quando os isolados foram adsorvidos em solo do tipo 2.

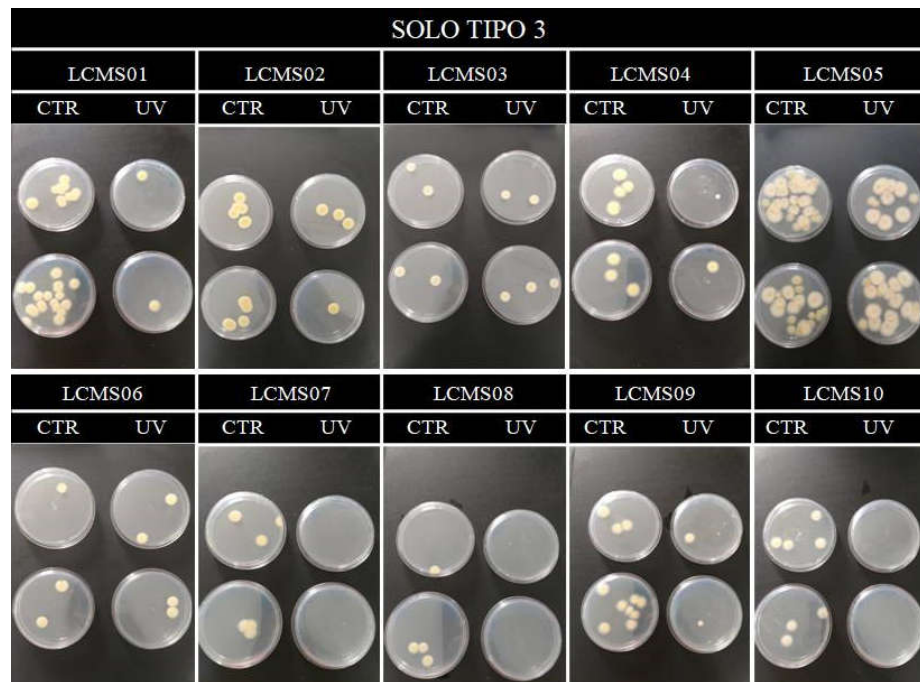


Figura 9: Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) obtidas de placas não expostas e de placas expostas à UV-B, quando os isolados foram adsorvidos em solo do tipo 3.

Tabela 3: Média de unidades formadoras de colônia (UFC) e desvio padrão dos conídios de *Metarhizium* spp. expostos ou não (controle) à UV-B (4,0 kJ m⁻²) em diferentes tipos de solo.

Isolados de <i>Metarhizium</i>	Grupos	UFC em cada tipo de solo		
		I	II	III
LCM S01	Não exposto	3,3 ±2,73 Aab	7,6 ±5,8 Aa	3,8 ±4,3 Ab
	Exposto	3,3 ±2,5 Aab	7,6 ±5,3 Aa	0,6 ±0,5 Ab
LCM S02	Não exposto	2,4 ±1,9 Aa	5,2 ±5,3 Aa	5,8 ±2,7 Aa
	Exposto	2,4 ±0,8 Aa	5,2 ±3,9 Aa	1,8 ±1,3 Aa
LCM S03	Não exposto	3,8 ±3,0 Aa	5,1 ±3,6 Aa	4,8 ±4,2 Aa
	Exposto	3,8 ±2,4 Aa	5,1 ±3,3 Aa	1,6 ±1,3 Aa
LCM S04	Não exposto	3,4 ±2,4 Aa	5,2 ±1,5 Aa	6,8 ±2,7 Aa
	Exposto	3,3 ±1,3 Aab	4,6 ±3,7 Aa	4,6 ±3,1 Ab
LCM S05	Não exposto	6,8 ±2,4 Aa	5,5 ±2,1 Ab	13 ±6 Ac
	Exposto	2,1 ±1,1 Ba	5,5 ±2,6 Ab	5 ±4,1 Ab
LCM S06	Não exposto	3,8 ±2,7 Aa	2,1 ±2,7 Aab	1,5 ±0,5 Ab
	Exposto	3,8 ±2,6 Aa	2,1 ±1,7 Aa	1,3 ±1,2 Aa
LCM S07	Não exposto	3,5 ±2,0 Aa	2,8 ±1,9 Aab	4,5 ±4,8 Ab
	Exposto	3,5 ±1,8 Aa	2,8 ±1,8 Aab	4,5 ±5,0 Ab
LCM S08	Não exposto	6,5 ±3,6 Aa	2,5 ±1,2 Aa	7 ±5,8 Aa
	Exposto	5,5 ±2,8 Aa	2,5 ±0,5 Aa	2 ±2,3 Aa
LCM S09	Não exposto	3,75 ±1,7 Aa	6,3 ±5,7 Aa	5 ±2,2 Aa
	Exposto	2,8 ±0,7 Aab	3,7 ±2,7 Aa	1 ±1,0 Ab
LCM S10	Não exposto	4,3 ±4,1 Aa	4,3 ±3,6 Aa	5,5 ±2,1 Aa
	Exposto	2,5 ±3,0 Aa	4,3 ±1,8 Aa	2,3 ±2,5 Aa

O ensaio foi realizado três vezes, em dias diferentes, utilizando novas preparações conidiais a cada dia. Médias obtidas de placas não expostas e de placas expostas à UV-B para o mesmo isolado foram comparadas estatisticamente para cada tipo de solo (a mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferiu significativamente; $P \geq 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de StudentNeumanKeuls); médias obtidas de placas não expostas ou placas expostas à UV-B para cada isolado foram comparadas estatisticamente nos três diferentes tipos de solo (a mesma letra minúscula para o mesmo isolado e grupo na mesma linha não diferem significativamente; $P \geq 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de StudentNeumanKeuls)

4.3. Tolerância De Microescleródios De *Metarhizium* spp. à Irradiação UV-B

Todas as placas não expostas com ME tiveram 100 colônias contadas (Figura 10). A maioria dos isolados expostos à irradiação UV-B mostrou estatisticamente menos grânulos germinados de ME que as placas não expostas, exceto LCMS10, que foi o mais tolerante à UV-B entre os isolados testados. Os isolados LCM S05 e LCM S08 também mostraram alta germinação após exposição à UV-B, embora estatisticamente diferentes dos grânulos de MS não expostos. Grânulos de ME foram considerados germinados quando havia o desenvolvimento de hifas ao redor do grânulo de ME (Figura 11).

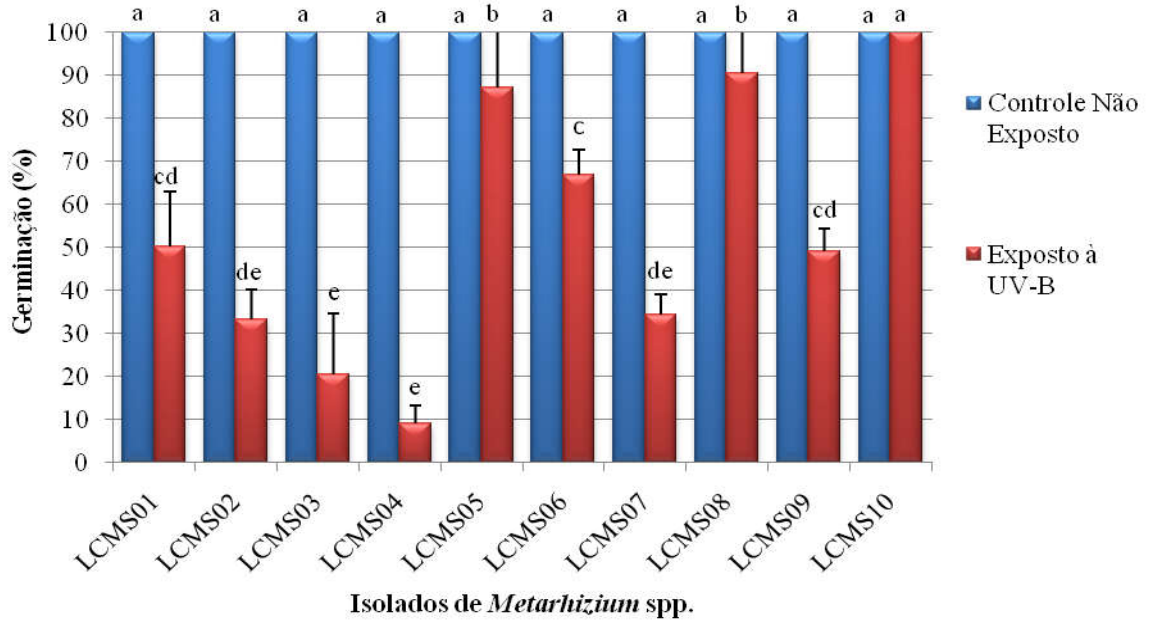


Figura 10: Germinação de Microescleródios de *Metarhizium* spp. 6 dias após exposição à UV-B (4.0 kJ m^{-2}). Médias seguidas da mesma letra não diferiram significativamente ($P \geq 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado, seguido por Student Newman-Keuls.

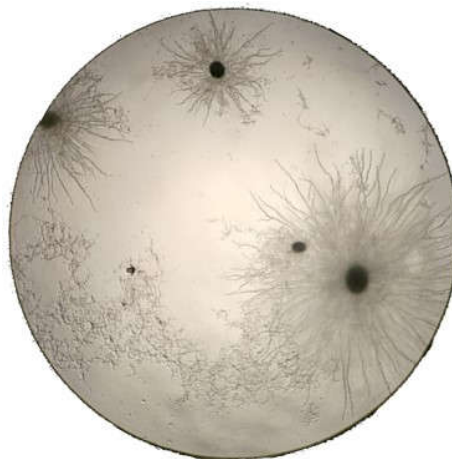


Figura 11: Grânulos de ME germinados

4.4. Tolerância De Blastosporos de *Metarhizium* spp. à Irradiação UV-B.

Os efeitos da germinação de blastosporos de isolados de *Metarhizium* spp. após exposição à UV-B são mostrados na Figura 12. Placas com blastosporos expostos à UV-B apresentaram estatisticamente menos UFCs do que placas não expostas para todos os isolados, exceto *M. anisopliae* LCM S05, considerado o isolado mais tolerante em formato de blastosporo (63,2% de germinação em relação ao controle não exposto). Em contraste, o LCM S09 de *M. pingshaense* foi o mais suscetível entre os isolados testados (1,7% de germinação em relação ao controle não exposto).

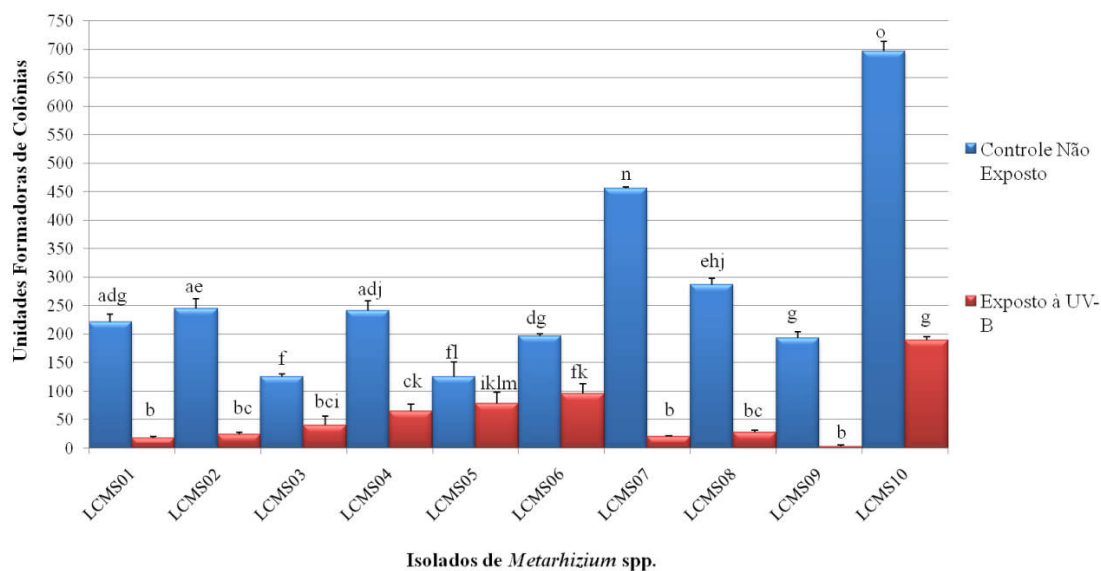


Figura 12: Média e desvio padrão de unidades formadoras de colônias (UFC) de blastosporos de *Metarhizium* spp. 72h após exposição à UV-B (4.0 kJ m⁻²). Barras com a mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si ($P \geq 0,05$). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey.

4.5. Avaliação Da Mortalidade De Larvas De *Rhipicephalus microplus* Após Exposição Dos Fungos à Irradiação UV-B.

As larvas tratadas com conídios não expostos ou conídios previamente expostos à UV-B tiveram maiores mortalidades ($P \leq 0,05$) do que aqueles no grupo controle (tratados com solução aquosa sem fungos). Os isolados não expostos ou expostos à UV-B obtiveram médias de mortalidade maiores ($P \leq 0,05$) em relação ao controle. Larvas no grupo controle permaneceram 93,7% vivas. Conídios do isolado LCMS08 das placas não expostas causaram os maiores níveis de mortalidade em relação às placas expostas. Conídios do isolado LCMS03 causaram mortalidade semelhante independente da exposição à UV-B (Tabela 4).

Tabela 4: . Porcentagem de mortalidade (%) e desvio padrão de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com conídios não expostos ou tratadas com conídios previamente expostos à irradiação UV-B (4,0 kJ m⁻²)

Grupos	Média de Mortalidade ±desvio padrão		
	5 dias	10 dias	15 dias
Controle	3,95 ±3,2195 a	4,45 ±4,6619 a	6,3 ±3,8539 a
LCMS03	13 ±5,2314 b	37,5 ±20,9322 b	49 ±26,3378 b
LCMS03 Exposto à UV-B	11 ±6,9962 bc	27,75 ±16,5015 b	45,75 ±29,4365 b
LCMS08	78,3 ± 17,69 d	94,5 ±9,74 c	96,7 ±5,22 c
LCMS08 Exposto à UV-B	8,35 ±5,05 c	20,5 ±10,3745 b	30,75 ±14,4436 b

Cada grupo continha dez tubos de ensaio, com aproximadamente 1000 larvas de *Rhipicephalus microplus* em cada tubo. O bioensaio foi conduzido duas vezes, em dois dias diferentes, usando novas preparações de conídios todos os dias. Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente ($P \geq 0,05$ - teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Student-Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

Metarhizium spp. são fungos entomopatogênicos filamentosos amplamente estudados e utilizados para o controle de pragas de insetos na agricultura. A ação dos fungos entomopatogênicos depende não apenas da virulência fúngica ao hospedeiro artrópode, mas também das condições ambientais. Conseqüentemente, uma vez liberados para o meio ambiente, os propágulos fúngicos devem sobreviver sob condições adversas, incluindo intensa radiação UV. No presente estudo, vários propágulos de *Metarhizium* (conídios, blastosporos e microscleródios) dos mesmos isolados fúngicos foram investigados quanto à sua tolerância à UV-B, para entender como diferentes propágulos do mesmo isolado toleram a mesma dose de UV-B. Esperava-se que os conídios em emulsão óleo-em-água expostos à UV-B tivessem maior germinação relativa do que os conídios em suspensão aquosa, corroborando com estudos anteriores (MOORE et al., 1993; ALVES et al., 1998). Apesar disso, no presente estudo, metade dos isolados testados (Figuras 4 e 6) apresentaram conídios não expostos e expostos, com germinação relativa estatisticamente similar 24 h e 48 h após o tratamento. Óleos minerais e vegetais são adjuvantes que podem ser usados em pesticidas químicos ou biológicos para aumentar sua eficácia, melhorar a facilidade de aplicação e até proteger o componente ativo de um produto biológico contra fatores abióticos (RANGEL et al., 2005; WANG et al., 2007; FERNANDES et al., 2010; MOSSA et al., 2017; PAIXÃO et al., 2017). No entanto, no presente estudo, sugere-se que a presença de 10% de óleo mineral nem sempre protege os isolados de *Metarhizium* spp. contra UV-B. A germinação reduzida de conídios após exposição à UV-B reflete a necessidade de reparo de células fúngicas após danos causados por estresse ambiental. Eles podem reduzir a atividade biológica consumindo reservas de energia para reparar danos no DNA e proteínas (ZHOU; ELLEDGE, 2000). Aqui, também foi evidenciado um atraso de crescimento pós-estresse quando a germinação relativa dos conídios, 24 h e 48 h após à exposição foi comparada; apesar de, no campo, essa recuperação na germinação dos conídios ser geralmente retardada, uma vez que os conídios podem ser expostos à irradiação solar diariamente. Assim, a seleção de cepas fúngicas com alta tolerância à UV-B é fundamental para o sucesso do controle biológico, especialmente porque a interação entre variáveis ambientais pode aumentar os efeitos negativos causados a este propágulo.

O presente estudo também analisou como diferentes tipos de solo beneficiam ou não os conídios adsorvidos nesses solos após exposição à UV-B. A estrutura do solo define uma rede de poros que é o habitat de toda a microbiota do solo (JARONSKI, 2007), que frequentemente inclui *Metarhizium* spp. Nossos resultados sugerem que o solo testado (independente do tipo de solo utilizado) forneceu proteção UV-B aos isolados de *Metarhizium* spp. que foram analisados (exceto LCMS05 adsorvido em solo Tipo I) (Tabela 3). A fotoproteção de conídios pode ser explicada pela absorção da irradiação UV pelos corantes aniônicos e pela atenuação da irradiância UV pelas partículas de argila presentes no solo. A fotoestabilização de fungos entomopatogênicos por matrizes de argila composta foi relatada. Esta fotoproteção foi atribuída à propriedade de dispersão da luz UV visível, que atenua a intensidade da irradiação, aumentando assim a fotoproteção (COHEN et al., 2003). Apesar dos tipos de solo utilizados no presente estudo terem aparência drasticamente diferente (com base em suas cores e aspectos visuais), a análise granulométrica mostrou quantidades similares de argila total (Tabela 2), areia total e silte, o que é sugerido para explicar a proteção UV-B análoga observada.

Os blastosporos são suscetíveis ao calor e ao estresse por UV, provavelmente porque são células vegetativas (BERNARDO et al., 2018, MASCARIN et al., 2018). Em estudos com conídios de *Isaria fumosorosea* e blastosporos, os conídios foram mais tolerantes a altas temperaturas do que os blastosporos (KIM et al., 2013). Essa diferença na tolerância ao

estresse ambiental pode ser devido ao fato de que essas duas estruturas são formadas de maneiras diferentes. Conídios são gerados por conidiogênese fialídica e contêm metabólitos resistentes a estresses ambientais (HALLSWORTH; MAGAN, 1996); por outro lado, os blastosporos são produzidos por brotamento de hifas, com membranas fracas, de paredes lisas (KIM et al., 2013). No presente estudo, a maioria dos isolados, como blastosporos, foram altamente suscetíveis à UV-B, exceto o LCM S05, que mostrou tolerâncias semelhantes à UV-B, independentemente da exposição (Fig. 8). Apesar disso, formular blastosporos com adjuvantes que proporcionam proteção contra fatores ambientais deletérios pode facilitar o uso desses propágulos contra pragas de artrópodes em detrimento de outros propágulos que são menos virulentos.

Microescleródios de fungos fitopatógenos são relatados como sendo menos afetados por temperaturas desfavoráveis do que as fases mais ativas desses fungos (COLEY-SMITH; COOKE, 1971). Pequenos escleródios (microescleródios) foram induzidos com sucesso também em fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium brunneum* (BEHLE et al., 2013), *M. anisopliae* (JACKSON; JARONSKI, 2009) e *Lecanicillium lecanii* (WANG et al., 2013). Caracterizar a tolerância de MS de fungos entomopatogênicos a fatores abióticos é fundamental para o sucesso do uso desses propágulos no campo. As descobertas de que a maioria dos microescleródios pesquisados aqui é suscetível à UV-B (exceto MS do LCMS10, Fig. 8), e metade deles mostrou germinação menor que 50% (isto é, LCMS02, LCMS03, LCMS04, LCMS07, e LCMS09) seis dias após a exposição à UV-B, sugerem que este propágulo também pode ser afetado negativamente pela irradiação solar. Não há estudos sobre a influência da irradiação UV-B em ME. Na literatura, encontramos estudos que mostram a susceptibilidade de ME a altas temperaturas. Miller e colaboradores (2018) demonstrou que ME de *Calonectria henricotiae* e *C. pseudonaviculata*, fungos fitopatógenos, quando expostos a temperaturas acima de 50 °C por pelo menos dez minutos, podem ser inativados, além de mostrar que o tempo necessário para inativar termicamente ME será maior do que o tempo necessário para conídios.

A eficácia dos propágulos de fungos é principalmente baseada no alto nível de patogenicidade contra o hospedeiro alvo (SONG et al. 2016). *Metarhizium anisopliae* é amplamente estudado no controle de carrapatos. Estudos têm demonstrado sua eficácia contra todas as fases parasitárias deste artrópode (LEEMON e JONSSON, 2008; GARCIA et al., 2011; QUINELATO et al., 2012; SAMISH et al., 2014; CAMARGO et al., 2014; WEBSTER et al., 2015; CAMARGO et al., 2016), corroborando com nossos resultados. Aqui, somente conídios de LCMS03 e LCMS08 foram utilizados para realização de testes *in vitro* de patogenicidade contra larvas de *R. microplus*. Eles foram escolhidos por terem as mesmas taxas de virulência (dados não publicados), mas diferentes tolerâncias à irradiação UV-B. Em nossos trabalhos, não observamos taxas de virulência iguais; pelo contrário, encontramos virulências diferentes entre os isolados LCMS03 e LCMS08, quando não expostos à irradiação UV-B. Devemos destacar aqui que no primeiro ensaio onde foram observadas taxas semelhantes, e em nossos experimentos, as populações de carrapatos utilizadas foram distintas. Estudos já demonstraram que existe diferença na susceptibilidade de diferentes populações de carrapatos ao mesmo fungo (FERNANDES et al., 2011; PERINOTTO et al., 2011). Estudos mostram alta mortalidade de larvas de *R. microplus* após tratamento com *M. anisopliae* ou *Beauveria bassiana* (BITTENCOURT et al., 1994; FERNANDES et al., 2003; LEEMON et al., 2008) e é importante ressaltar que aqui, ambos isolados demonstraram potencial para controlar larvas de *R. microplus* mesmo suspensos em água. Com relação à exposição à irradiação UV-B, os dois isolados foram estatisticamente iguais, indo de encontro aos resultados de tolerância à irradiação, onde o isolado LCMS08 foi mais tolerante à UV-B do que o isolado LCMS03. Aqui, vemos que o isolado mais afetado foi o mais tolerante. Provavelmente, a maneira como os conídios foram expostos à irradiação UV-B influenciou na

mortalidade das larvas, devido à sobreposição de camadas de conídios na placa. Sugere-se, portanto, que o modo como as placas são expostas não garante a uniformidade de recebimento da irradiação UV pelos conídios. Mesmo sendo mais tolerante, o fato do isolado LCMS08 não conseguir uniformizar a exposição pode ter interferido diretamente na quantidade de conídios afetados que entraram em contato com as larvas de *R. microplus*. Podemos observar que o isolado LCMS03 apresentou aumento na taxa de mortalidade durante os 15 dias do teste. Embora estatisticamente iguais, as taxas de mortalidade deste isolado obtiveram números crescentes, tanto no grupo em que os conídios não foram expostos quanto no grupo em que foram expostos à UV-B, corroborando com os dados de tolerância à UV-B vistos aqui, onde o isolado LCMS03 apresentou aumento na taxa de germinação quando comparamos os dados de tolerância 24 h e 48 h após exposição à UV-B.

Quando as tolerâncias à UV-B de propágulos do mesmo isolado (isto é, conídios, blastosporos e microescleródios) foram comparadas, não foi possível encontrar um padrão particular. Por exemplo, os conídios de LCMS07 mostraram alta tolerância à UV-B (a tolerância do LCMS07 foi estatisticamente similar a *M. acridum* ARSEF 324, um isolado altamente tolerante) em contraste com os mesmos blastosporos isolados ou microescleródios do mesmo isolado expostos à mesma dose de UV-B; enquanto o LCM S10 foi marcadamente mais suscetível apenas na forma de blastosporo (e não como microescleródio ou conídio). LCM S05 foi o único isolado que apresentou blastosporos tolerantes, independentemente da susceptibilidade de conídios e microescleródios. Por conseguinte, os dados sobre a tolerância à UV-B do mesmo isolado fúngico aqui observado para diferentes propágulos, ou o mesmo propágulo fúngico exposto à UV-B em diferentes circunstâncias, revelam informações importantes não apenas sobre a relevância da tolerância intrínseca de cada isolado, mas também variações que diferentes propágulos do mesmo fungo possuem. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que analisa a tolerância à UV-B de diferentes propágulos do mesmo isolado fúngico. Este estudo pretende auxiliar pesquisas futuras sobre a descoberta de isolados e propágulos fúngicos promissores para o controle biológico de carrapatos e outros artrópodes.

6 CONCLUSÕES

- Existe variabilidade de susceptibilidade à radiação UV-B entre diferentes propágulos de um mesmo isolado de *Metarhizium* spp.
- A adição de 10% de óleo mineral nem sempre protege os isolados de *Metarhizium* spp. contra ação da irradiação UV-B.
- Os tipos de solo utilizados neste estudo fornecem proteção a conídios de *Metarhizium* spp. à radiação UV-B.
- A exposição à radiação UV-B reduziu a virulência do isolado LCMS08 de *M. anisopliae*, mas não alterou a virulência do isolado LCMS03, de mesma espécie.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A radiação UV-B é um fator abiótico que aumenta os desafios para a disseminação do uso de fungos entomopatogênicos no controle de artrópodes. As questões aqui levantadas mostram como a radiação afeta diferentes propágulos de *Metarhizium* spp., e o entendimento de como esses propágulos respondem à UV-B podem fornecer ferramentas críticas para melhorar o sucesso do controle biológico, promovendo a adoção de técnicas-chave de produção em massa.

Algumas dúvidas ainda precisam ser sanadas, como, por exemplo, por que determinado isolado não sofreu alteração na virulência quando foi exposto à UV-B? Quais os mecanismos que tornam determinado propágulo mais tolerante à radiação? Essas perguntas precisam ser exploradas a fim de se obter respostas claras em relação à utilização destes organismos no controle de artrópodes. Para que a utilização de diferentes propágulos de *Metarhizium* spp. possa ser considerada uma nova abordagem no controle biológico, novos ensaios precisam ser realizados, objetivando testar os efeitos de condições estressantes nos diferentes isolados fúngicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.I.; LEATHER, S.R. Suitability and potential of entomopathogenic microorganisms for forest pest management—some points for consideration. **International Journal of Pest Management**, v. 40, n. 4, p. 287-292, 1994.

ALKHAIBARI, A.M.; CAROLINO, A.T.; YAVASOGLU, S.I.; MAFFEIS, T.; MATTOSO, T.C.; BULL, J.C.; SAMUELS, R.I.; BUTT, T.M. *Metarhizium brunneum* blastospore pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae :attack on several fronts accelerates mortality. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 7, 2016.

ALKHAIBARI, A.M.; CAROLINO, A.T.; BULL, J.C.; SAMUELS, R.I.; BUTT, T.M. Differential pathogenicity of *Metarhizium* blastospores and conidia against larvae of three mosquito species. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 3, 2017.

ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998, 1163p.

ALVES, R.T.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C.; LEATHER, S.R. Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. **Crop Protection**, v. 17, p. 675-679, 1998.

ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; BAHIANSE, T.C.; PERINOTTO, W.M.S.; MORAES, A.P.R.; TERRA, A.L.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 317-322, 2010.

AW, K.M.S.; HUE, S.M. Mode of infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 30, 2017.

BAHIANSE, T.C.; FERNANDES, E.K.K.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Avaliação do potencial de controle biológico do *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 4, p. 243-245, 2007.

BEHLE, R.W.; JACKSON, M.A.; FLOR-WEILER, L.B. Efficacy of a Granular Formulation Containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) Microsclerotia Against Nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixoididae). **Biological and Microbial Control**, v. 106, n.1, p.57-63, 2013.

BERNARDO, C.C, BARRETO L.P, e SILVA, C.d S.R., LUZ, C, ARRUDA, W, FERNANDES, E.K.K., Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*, **Ticks and Tick-borne Diseases** (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.001>.

BEYS DA SILVA, W.O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. **British Mycological Society**, v. 114, p. 10-15, 2010.

BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L.Q.; CARDOSO, F.F.; DIONELLO, N.J.L. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Archivos de zootecnia**. V. 61, p. 1-11, 2012.

BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Arquivo da Universidade Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 197-202, 1992.

BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. **Rev. Univ. Rural, Sér. Ciênc. da Vida**, v. 16, p. 49-55, 1994.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. **Mycology Research**, v. 105, n. 7, p. 874 – 882, 2001a.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MILLER, C.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Both Solar UVA and UVB Radiation Impair Conidial Culturability and Delay Germination in the entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 734-739, 2001b.

BRAGA, G.U.L.; RANGEL, D.E.N.; FERNANDES, E.K.K.; FLINT, S.D.; ROBERTS, D.W. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current Genetics**, v.61, n. 3, p. 405-425, 2015.

BRUCK, D.J. Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: implications for pest management. **Biological Control**, v. 32, p. 155-163, 2004.

CAMARGO, M.G.; GÔLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Effect of oil-based formulations of acaripatogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 140 – 147, 2012.

CAMARGO, M.G.; MARCIANO, A.F.; SÁ, F.A.; PERINOTTO, W.M.S.; QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 271-276, 2014.

CAMARGO, M.G.; NOGUEIRA, M.R.S.; MARCIANO, A.F.; PERINOTTO, W.M.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; SCOTT, F.B.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 38-42, 2016.

COHEN, E.; JOSEPH, T.; KAHANA, F.; MAGDASSI, S. Photostabilization of an entomopathogenic fungus using composite clay matrices. **Photochemistry and Photobiology**, v. 77, p. 180-185, 2003.

COLEY-SMITH, J.R.; COOKE, R.C. Survival and germination of fungal sclerotia. In: Horsfall JG, Baker KF, Zentmyer GA (eds), **Annual Review of Phytopathology**. Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA, USA, p. 65-92, 1971.

FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; SMITS, N.; COUSTERE, C.; ITIER, B. Inactivation of Conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by Near-Ultraviolet (UVB and UVA) and Visible Radiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 69, p. 70-78, 1997.

FERNANDES, E.K.K.; COSTA, G.L.; SOUZA, E.J.; MORAES, A.M.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Beauveria bassiana* isolated from engorged females and tested against eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J Basic Microbiol**, v. 43, n.5, 2003.

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, E.K.K.; ANGELO, I.C.; RANGEL, D.E.N.; BAHIENSE, T.C.; MORAES, A.M.L.; ROBERTS, D.W.; BITTENCOURT, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 307-318, 2011.

FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 300-305, 2012.

FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; ROBERTS, D.W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, 2015.

FERREIRA, L. L.; SOARES, S. F.; FILHO, J. G. O.; OLIVEIRA, T. T.; LÉON, A. A. P.; BORGES, L. M. F. Role of *Rhipicephalus microplus* cheliceral receptors in gustation and host differentiation. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v. 6, p. 228-233, 2015.

FRASER, D.P.; SHARMA, A.; FLETCHER, T.; BUDGE, S.; MONCRIEFF, C.; DODD, A.N.; FRANKLIN, K.A. UV-B antagonises shade avoidance and increases levels of the flavonoid quercetin in coriander (*Coriandrum sativum*). **Scientific Reports**, v.7, n.17758, 2017.

FURLONG, J.; PRATA, M.C.A. Conhecimento básico para controle do carrapato-dos-bovinos. In: FURLONG, J. (Org.). **Carrapatos: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. p. 9-20, 2005.

GARCIA, M.V.; MONTEIRO, A.C.; SZABÓ, M.P.J.; MOCHI, D.A.; SIMI, L.D.; CARVALHO, W.M.; TSURUTA, S.A.; BARBOSA, J.C. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 267-273, 2011.

GESSLER, N.N.; EGOROVA, A.S.; BELOZERSKAYA, T.A. Melanin Pigments of Fungi under Extreme Environmental Conditions (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.50, n.2, p.105-113, 2014.

GHANIZADEH-KAZEROUNI, E.; FRANKLIN, C.E.; SEEBACHER, F. Living in flowing water increases resistance to ultraviolet B radiation. **The Company of Biologists**. V. 220, p. 582-587, 2017.

GOBLE, T.A.; GARDESCU, S.; FISHER, J.J.; JACKSON, M.A.; HAJEK, A.E. Conidial production, persistence and pathogenicity of hydromulch formulations of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia under forest conditions. **Biological Control**, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.003>.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D.; LEÓN, A.A.P.; PEREIRA, J.B.; VILLELA, H.S. Reassessment of the potencial economic impact of cattle parasites in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal** v.23, n.2, p.150-156, 2014.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Culture Age, Temperature, and pH Affect the Polyol and Trehalose Contents of Fungal Propagules. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2435-2442, 1996.

HUMBER, R.A. Fungi: Identification. In: **Manual Of Techniques In Insect Pathology**, Academic Press, p. 153 – 185, 1997.

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SIKOROWSKI, P.P.; SUTTER, G.; BROOKS, W.M. Inactivation of Representative Species of Entomopathogenic Viruses, a Bacterium, Fungus, and Protozoan by an Ultraviolet Light Source. **Environmental Entomology**, v. 6, n. 3, p. 411-415, 1977.

JACKSON, M.A.; JARONSKI, S.T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **British Mycological Society**, v.113, p. 842-850, 2009.

JACKSON, M.A.; JARONSKI, S.T. Development of pilot-scale fermentation and stabilization processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 915-930, 2012.

JACKSON, M.A.; PAYNE, A.R. Liquid Culture Production of Fungal Microsclerotia. In: GLARE, T.T. and MORAN-DIEZ, M. E. (eds.) **Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, New York, v. 1477, p. 71-83, 2016.

JARONSKI, S.T. Soil Ecology of the Entomopathogenic Ascomycetes: A Critical Examination of What We (Think) We Know. In: EKESI, S. and MANIANIA, N.K., editors. **Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest management: Research Signpost**, p. 91-144, 2007.

JENKINS, G.I. Signal Transduction in responses to UV-B radiation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 407-431, 2009.

- JENKINS, G.I. Photomorphogenic responses to ultraviolet-B light. **Plant, Cell & Environment**, doi: 10.1111/pce.12934, 2017 [Epub ahead of print]
- KIM, J.S.; JE, Y.H.; SKINNER, M.; PARKER, B.L. An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera:Aleyrodidae). **Pest Manag Sci**, v. 69, p. 576-581, 2013.
- LANZA, L.M.; MONTEIRO, A.C.; MALHEIROS, E.B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1757-1762, 2004.
- LECLERC, J-B, PINTO SILVA, J, DETRAIN, C. Impact of soil contamination on the growth and shape of ant nests. **Royal Society open science**, 5, 2018.
- LEEMON, D.M.; JONSSON, N.N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 97, p. 40-49, 2008.
- LEEMOM, D.M.; TURNER, L.B.; JONSSON, N.N. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Veterinary Parasitology**, v. 156, p. 248-260, 2008.
- LONC, E.; GUZ-REGNER, K.; KIEWRA, D.; SZCZEPANSKA, A. Insight into tick biocontrol with special regard to fungi. **Annals of Parasitology**, v. 60, n. 3, p. 169-177, 2014.
- LOPES, R.B.; SOUZA, D.A.; ROCHA, L.F.N.; MONTALVA, C. LUZ, C.; HUMBER, R.A.; FARIA, M. The entomopathogenic genus *Metarhizium* has been defined morphologically by the presence of densely packed hymenia of candelabrum-like, broadly branched conidiophores with cylindrical to clavate phialides producing green conidia in prismatic columns to dense plates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.151, p. 165-168, 2018.
- LUZ, C.; D'ALESSANDRO, W.B.; RODRIGUES, J.; FERNANDES, E.K.K. Efficacy of water- and oil-in-water-formulated *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus sanguineus* eggs and eclosing larvae. **Parasitology Research**, 2015

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; VITAL, R.C.J.; JACKSON, M.A.; QUINTELA, E.D. Production of microsclerotia by brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 2013.

MASCARIN, G.M.; BIAGGIONI LOPES, R.; DELALIBERA, I. JR.; KORT KAMP FERNANDES, E.; 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.

MILLER, M.E.; SHISHKOFF, N.; CUBETA, M.A. Thermal sensitivity of *Calonectria henricotiae* and *Calonectria pseudonaviculata* conidia and microsclerotia. **Mycology**, v. 110, n. 3, p. 546-558, 2018.

MOCHI, D.A.; MONTEIRO, A.C., DE BORTOLI, S.A.; DÓRIA, H.O.S.; BARBOSA, J.C. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitidis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in Soil with Different Pesticides. **Neotropical entomology**, v. 35, n. 3, p. 382-389, 2006.

MOORE, D.; BRIDGE, P.D.; HIGGINS, P.M.; BATEMAN, R.P.; PRIOR, C. Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. **Annual Applied Biology**, v. 122, p. 605-616, 1993.

MOSSA, A.T.W.; AFIA, S.I.; MOHAFRASH, S.M.M.; ABOU-AWAD, B.A. Formulation and characterization of garlic (*Allium sativum* L.) essential oil nanoemulsion and its acaricidal activity on eriophyid olive mites (Acari: Eriophyidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v.25, p. 10526-10537, 2017.

NASCIMENTO, E.; SILVA, S.H.; MARQUES, E.R.; ROBERTS, D.W.; BRAGA, G.U.L. Quantification of Cyclobutane Pyrimidine Dimers Induced by UVB Radiation in Conidia of the Fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 1259-1266, 2010.

OJEDA-CHI, M.M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R.I.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. Laboratory and Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 348-354, 2010.

PAIXÃO, F.R.S.; MUNIZ, E.R.; BARRETO, L.P.; BERNARDO, C.C.; MASCARIN, G.M.; LUZ, C.; FERNANDES, E.K.K. Increased heat tolerance afforded by oil-based conidial formulations of *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii*. **Biocontrol Science and Technology**, DOI: 10.1080/09583157.2017.1281380, 2017.

PAUL, N.D.; GWYNN-JONES, D. Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. **TRENDS in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 1, p. 48-55, 2003.

PEREIRA-JUNIOR, R.R.; HUARTE-BENNET, C.; PAIXÃO, F.R.S.; ROBERTS, D.W.; LUZ, C.; PEDRINI, N.; FERNANDES, É.K.K. Riboflavin induces *Metarhizium* spp. to produce conidia with elevated tolerance to UV-B, and upregulates photolyases, laccases and polyketide synthases genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 159-171, 2018.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GOLO, P.S.; QUINELATO, S.; CAMARGO, M.G.; SÁ, F.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**. v.130, p. 257-260, 2011.

POLAR, P.; KAIRO, M.T.K.; MOORE, D.; PEGRAM, R.; JOHN, S-A. Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. **Mycopathologia**, v. 160, p. 151 – 157, 2005.

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.

QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; PERINOTTO, W.M.S.; SÁ, F.A.; CAMARGO, M.G.; ANGELO, I.C.; MORAES, A.M.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 556-565, 2012.

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 insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, p. 77-83, 2004.

RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W.) Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, p. 55-58, 2005.

RANGEL, D.E.N.; ANDERSON, A.; BRAGA, G.U.L.; ROBERTS, D.W. Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationship between conidial pigmentation and stress... **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 170-182, 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. **Mycological Research**, v. 112, p. 1362-1372, 2008.

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 Microbiology Letters**, v.315, p. 81-86, 2011.

ROBERTS, D.W.; ST.LEGER, R. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. **Advances in applied microbiology**, v. 54, 2004.

RODRÍGUEZ, P. B. R.; CRUZ, R. R.; GARCÍA, D. I. D.; GUTIÉRREZ, R. H.; QUINTANILLA, R. E. L.; SAHAGUN, D. O.; CASTILLO, C. G.; ORTEGA, A. G.; RODRÍGUEZ, S. E. H.; CARDONA, A. V.; VELÁZQUEZ, M. M. Identification of immunogenic proteins from ovarian tissue and recognized in larval extracts of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, through an immunoproteomic approach. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 227-235, 2016.

SAMISH, M.; REHACEK, J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. **Annual Reviews Entomology**, v. 44, p.159-182, 1999.

SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 206, p. 258-266, 2014.

SASAN, R.K. BIDOCHKA, M.J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, v. 99, n.1, p. 101 – 107, 2012.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, p. 1267-1274, 2010.

SHANG, Y.; DUAN, Z.; HUANG, W.; GAO, Q.; WANG, C. Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with na exogenous tyrosinase gene. **Journal of Invertebrate Pathology**, V.109, p.105-109, 2012.

SONG, Z.; ZHONG Q.; YIN, Y.; SHEN, L.; LI, Y.; WANG, Z. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate morphology, microsclerotia development, and virulence in *Metarhizium rileyi*. **Scientific Reports**, 2016.

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

SUTHAPARAN, A.; PATHAK. R.; SOLHAUG, K.A.; GISLEROD, H.R. Wavelength dependent recovery of UV-mediated damage: tying up the loose ends of optical based powdery mildew management. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.12.018 [Epub ahead of print].

TIAGO, P.V.; OLIVEIRA, N.T.; LIMA, E.A.L.A. Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 645-651, 2014.

TIRLONE, L.; KIM, T.K.; COUTINHO, M.L.; ALI, A.; SEIXAS, A.; TERMIGNONI, C.; MULENGA, A.; VAZ JR, I.S. The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, p. 12-28, 2016.

TUPE, S.G.; PATHAN, E.K.; DESHPANDE, M.V. Development of *Metarhizium anisopliae* as a Mycoinsecticide: From Isolation to Field Performance. **Journal of Visualized Experiments** (125), e55272, 2017.

WANG, H.; LEI, Z.; REITZ, S.; LI, Y.; XU, X. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Cordycipitaceae) as a biological control agent against soil-dwelling stages of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 234 – 238, 2013.

WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U.A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE, G.M.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; MARTINS, J.R.; SCHRANK, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 207, p. 302-308, 2015.

WILLIAMSON, C.E.; ZEPP, R.G.; LUCAS, R.M.; MADRONICH, S.; AUSTIN, A.T.; BALLARÉ, C.L.; NORVAL, M.; SULZBERGER, B.; BAIS, A.F.; MCKENZIE, R.L.; ROBINSON, S.A.; HÄDER, D-P.; PAUL, N.D.; BORNMAN, J.F. Solar ultraviolet radiation in a changing climate. **Nature Climate Change**, v. 4, p. 434-441, 2014.

YU, X.; HUO, L.; LIU, H.; CHEN, L.; WANG, Y.; ZHU, X. Melanin is required for the formation of the multi-cellular conidia in the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Microbiological Research**. V.179, p.1-11, 2015.

ZIMMERMANN, G. Effect of High Temperatures and Artificial Sunlight on the Viability of Conidia of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, p. 36-40, 1982.

ZIMMERMAN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007.

ZHOU, B-B.S.; ELLEDGE, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p. 433-439, 2000.

ZHOU, R.; ZHOU, X.; FAN, A.; WANG, Z.; HUANG, B. Differential functions of two metalloproteases, Mrmep1 and Mrmep2, in growth, sporulation, cell wall integrity, and virulence in the filamentous fungi *Metarhizium robertsii*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. 1528, 2018.