

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

TESE

**Caracterização do transcriptoma de blastosporos de um isolado nativo
de *Metarhizium pingshaense* expostos à UV-B e virulência para
*Rhipicephalus microplus***

Amanda Rocha da Costa Corval

2023



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

**Caracterização do transcriptoma de blastosporos de um isolado nativo
de *Metarhizium pingshaense* expostos à UV-B e virulência para
*Rhipicephalus microplus***

AMANDA ROCHA DA COSTA CORVAL

Sob a Orientação da Professora
Patrícia Silva Gôlo

E coorientação do Professores
Irene da Silva Coelho
Éverton Kort Kamp Fernandes

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

Seropédica – RJ

Fevereiro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

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

Corval, Amanda Rocha da Costa, 1984-

C832c Caracterização do transcriptoma de blastosporos de um
isolado nativo de *Metarhizium pingshanense* expostos à UV-B e
virulência para *Rhipicephalus microplus* / Amanda Rocha da
Costa Corval. - Rio de Janeiro, 2023.

100 f.

Orientadora: Patrícia Silva Gôlo. Tese (Doutorado).

-- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pós
Graduação em Ciências Veterinárias, 2023.

1. Carrapato dos bovinos. 2. Fungos entomopatogênicos. 3.
Fatores abióticos. I. Gôlo, Patrícia Silva, 1987-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós Graduação em
Ciências Veterinárias III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 694/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.009786/2023-58

Seropédica-RJ, 23 de fevereiro de 2023.

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

AMANDA ROCHA DA COSTA CORVAL

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor(a) em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 23/02/2023

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese.

(Assinado digitalmente em 23/02/2023 20:54)
ISABELE DA COSTA ANGELO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: ###602#7

(Assinado digitalmente em 24/02/2023 04:20)
PATRICIA SILVA GOLO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matrícula: ###218#5

(Assinado digitalmente em 24/02/2023 08:29)
WENDELL MARCELO DE SOUZA PERINOTTO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.188-##

(Assinado digitalmente em 24/02/2023 11:55)
RONALDO ALVES PEREIRA JUNIOR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.701-##

(Assinado digitalmente em 25/02/2023 11:54)
ALLAN FELIPE MARCIANO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.198-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 694, ano: 2023, tipo: ATA, data de emissão: 23/02/2023 e o código de verificação: 397ff5cf8b

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, a quem devo toda a honra, toda a glória e todo o louvor por ter me permitido finalizar esta etapa da minha vida. Tenho absoluta certeza de que não chegaria até aqui sozinha, sem a Sua misericórdia, graça e bondade.

Meu eterno agradecimento ao meu marido *Paulo (Paulinho)*, que me apoiou durante todo o meu percurso na pós-graduação. Obrigada pelo companheirismo, suporte, ombro amigo, compreensão e por toda a companhia nessa trajetória. Você é meu porto seguro. Te amo!

Aos meus filhos, que iniciaram essa trajetória comigo ainda pequenos, sem entender muito bem o porquê da mamãe se ausentar tanto, mas que hoje reconhecem que fiz tudo isso por amor e que me perguntam sempre como estão os carrapatos. Vocês são meu combustível para seguir em frente. Faço tudo por vocês. Amo vocês mais que tudo!

Um agradecimento especial aos meus pais, que, desde sempre, lutaram para que eu tivesse uma educação de qualidade, mesmo com suas limitações. Reconheço e honro vocês por isso. Obrigada pelo apoio incondicional sempre. Amo vocês!

Igualmente agradeço aos meus sogros pelo apoio. Sempre me perguntando como andavam as minhas análises, se preocupando com meus prazos e com o andamento do doutorado. Vocês também foram peças importantes neste processo. Também amo vocês!

Não posso deixar de citar meus amigos *Roberta, Ana Elisa e Moisés*, que estiveram junto comigo desde o início, me consolando quando estava triste, e se alegrando quando as coisas funcionavam. Quantas coisas passamos juntos nestes quatro anos! Parece que foi uma vida. Obrigada por estarem sempre comigo.

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

À minha orientadora *Dr^a Patrícia Gôlo*, não tenho palavras pra te agradecer por tudo o que fez por mim. Desde o primeiro dia que cheguei à Universidade, na sua sala, você foi muito acolhedora. Não me conhecia e me deu a oportunidade de realizar meus sonhos. Obrigada por toda a ajuda nos experimentos, nos projetos e, principalmente, por me entender e segurar a minha mão no momento mais difícil que passei durante o doutorado. Obrigada pela conversa naquela sala do anexo, pelo abraço apertado e por não me deixar desistir em nenhum momento. Teria mais coisas pra falar aqui, mas você sabe a importância que teve nessa minha trajetória. Só tenho a agradecer.

Não posso deixar de falar dos meus coorientadores. *Dr^a Irene Coelho*, que, de igual forma, me auxiliou em todas as análises, me aconselhou e me direcionou com todo o seu profissionalismo e respeito. Obrigada! E Dr. Éverton Fernandes, que também contribuiu para que este trabalho fosse realizado.

À minha família LCM, meu agradecimento mais que especial. Vocês tornam meus dias muito mais felizes. Como aprendo com vocês! Obrigada pela ajuda nos experimentos, pelas conversas sérias e outras nem tão sérias, pela companhia em dias que tínhamos que sair mais tarde, pelo café na cozinha e até por me levarem ao postinho quando precisei. Adriani, Emily, Laura, Mariana, Thaís, Victória (irmãs e amigas), os ICs (Helen, Joana, Júlia, Vinícius, Fabiano, Tauã), a galera dos mosquitos, Adonis. Todos vocês foram muito importantes na minha caminhada. Vou levá-los em meu coração pra sempre!!!

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.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

E, por fim, a todos que de certa forma ajudaram direta ou indiretamente na elaboração deste manuscrito. 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. Concluiu o Ensino Médio em 2001 e ingressou, em fevereiro de 2003, 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, onde foi bolsista CAPES durante 24 meses. Em 2019 ingressou no doutorado na mesma instituição. Possui artigos completos publicados em periódicos científicos e durante todo o período de vida acadêmica, participou de Congressos e Simpósios.

RESUMO

CORVAL, Amanda Rocha da Costa. **Caracterização do transcriptoma de blastosporos de um isolado nativo de *Metarhizium pingshaense* expostos à UV-B e virulência para *Rhipicephalus microplus***. 2022. 86 p. Tese (Doutorado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Metarhizium spp. é um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados no controle de pragas agrícolas e tem sido considerado uma alternativa promissora no controle de *Rhipicephalus microplus*. Porém, estes agentes podem ser negativamente afetados por fatores bióticos e abióticos, como a irradiação solar, principalmente a fração UV-B, que causa sérios danos aos fungos, diminuindo sua eficácia no controle de pragas. Este trabalho teve como objetivos: 1) identificar a espécie do isolado nativo de *Metarhizium* sp.; 2) verificar a tolerância à UV-B de conídios, blastosporos e microescleródios do isolado LCM S10 de *M. pingshaense*; 3) avaliar a sobrevivência de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com blastosporos de *M. pingshaense* LCM S10 e expostas à radiação UV-B por três dias consecutivos; 4) analisar o transcriptoma de blastosporos do isolado LCM S10 de *M. pingshaense*. Os propágulos (conídios, blastosporos e microescleródios) foram expostos à radiação UV-B com fluência total de 4,0 kJ/m². Conídios foram avaliados quanto à germinação 24h após exposição à UV-B. Microescleródios e blastosporos foram avaliados quanto à presença de unidades formadoras de colônias (UFC) 24 e 72h após exposição à UV-B, respectivamente. Todos os três propágulos demonstraram alta tolerância à radiação ultravioleta. O bioensaio para verificação da mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, bem como análise dos parâmetros biológicos mostrou que não houve diferença estatística entre o controle e o grupo de fêmeas tratadas com blastosporos e expostas à UV-B por três dias consecutivos, provando que a radiação ultravioleta oferece danos aos propágulos fúngicos. Em relação à sobrevivência das fêmeas, houve diferença estatística e as fêmeas do grupo tratadas com blastosporos e que não foram expostas à UV-B sobreviveram, em média, 12 dias, enquanto as fêmeas tratadas com blastosporos e expostas à radiação ultravioleta por três dias consecutivos teve uma média de sobrevivência de 18,5 dias. Todas as fêmeas do grupo controle tiveram média de sobrevivência de 23 dias. Para entender como a luz UV-B regula a expressão gênica em blastosporos de *M. pingshaense*, foi realizada uma análise transcricional, onde foram identificados 728 genes diferencialmente expressos, sendo 320 genes induzidos e 408 genes suprimidos na presença de UV-B. As categorias funcionais onde os genes que foram mais suprimidos se encontram são: transporte e metabolismo de aminoácidos; transporte e metabolismo de carboidratos e modificação pós-traducional, volume de proteínas e chaperonas. Já as categorias funcionais onde os genes mais induzidos se encontram são: biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, transporte e metabolismo de coenzimas e pós-traducional, volume de proteínas e chaperonas. Os dados sobre a tolerância à UV-B de um isolado fúngico revelam informações importantes sobre a sua tolerância intrínseca. Este é o primeiro trabalho analisando o transcriptoma de blastosporos de *M. pingshaense* quando expostos à UV-B.

Palavras-chave: Carrapato dos bovinos, Fungos entomopatogênicos, Fatores abióticos

ABSTRACT

CORVAL, Amanda Rocha da Costa. **Characterization of the transcriptome of blastospores of a native isolate of *Metarhizium pingshaense* exposed to UV-B and virulence for *Rhipicephalus microplus***. 2022. 86 p. Thesis (Doctor of Science, Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Metarhizium spp. is one of the most used entomopathogenic fungi to control agricultural pests and also presents positive results in tests against *Rhipicephalus microplus*. However, these agents can be negatively affected by biotic and abiotic factors, such as solar irradiation, especially the UV-B fraction, which causes serious damage to fungi, decreasing their effectiveness in controlling pests. This work analyzed the *M. pingshaense* isolate LCM S10 with the objective of: 1) to identify the native isolate of *Metarhizium* sp.; 2) verifying the UV tolerance of conidia, blastospores and microsclerotia of the isolate LCM S10; 3) to evaluate the survival of engorged females of *R. microplus* treated with *M. pingshaense* blastospores and exposed to UV-B radiation for three consecutive days; 4) analyze the transcriptoma of the *M. pingshaense* isolate LCM S10 after being exposed to UV-B radiation. The propagules (conidia, blastospores and microsclerotia) were exposed to UV-B radiation with a total fluency of 4.0 kJ/m². Conidia were evaluated for germination 24h after exposure to UV-B. Microsclerotia and blastospores were evaluated for the presence of colony forming units (CFU) 24 and 72h after exposure to UV-B, respectively. All three propagules demonstrated high tolerance to ultraviolet radiation. The bioassay to verify the mortality of engorged females of *R. microplus*, as well as the analysis of the biological parameters, showed that there was no statistical difference between the control and the group of females treated with blastospores and exposed to UV-B for three consecutive days, proving that ultraviolet radiation damages fungal propagules. Regarding female survival, there was a statistical difference and females in the group treated with blastospores and not exposed to UV-B survived, on average, 12 days, while females treated with blastospores and exposed to ultraviolet radiation for three consecutive days had a median survival of 18.5 days. All females in the control group had a mean survival of 23 days. To understand how UV-B light regulates gene expression in *M. pingshaense* blastospores, we performed a transcriptional analysis, where differential expression analysis identified 728 genes differentially expressed, 320 genes induced and 408 genes suppressed in the presence of UV-B. The functional categories where the genes that were most suppressed are: transport and metabolism of aminoacids; transport and metabolism of carbohydrates; and post-translational modification, proteins turnover and chaperones. The functional categories where the most induced genes are found are: biosynthesis, transport and catabolism of secondary metabolites; transport and metabolism of coenzymes; and post-translational modification, proteins turnover and chaperones. Data on the UV-B tolerance of a fungal isolate reveal important information about its intrinsic tolerance. This is the first work analyzing the blastospore transcriptoma of *M. pingshaense* when exposed to UV-B.

Key words: Cattle tick; Entomopathogenic fungi; Abiotic factors.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - *Primers* utilizados nas reações de amplificação dos genes EF-1 α e RPB1. 28

Tabela 2 - Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial das Fêmeas (P.I.F.), Percentual de Eclosão (%), Índice de Produção de Ovos (I.P.O.), Índice Nutricional (I.N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão de 1×10^8 blastosporos/mL⁻¹ do isolado LCM S10 de *Metarhizium pingshaense*. 35

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Top 15 genes mais induzidos após a exposição de blastosporos à UV-B. 52

Tabela 2 - Top 15 genes mais suprimidos após a exposição de blastosporos à UV-B. 53

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1** – Ciclo biológico do carrapato-do-boi *Rhipicephalus microplus*, ilustrando a fase de vida livre e a fase parasitária. (fonte: MAPA). 2
- Figura 2** – Ciclo de *Metarhizium anisopliae*. (fonte: adaptado de Alves *et al.* 1998 e Mascarin *et al.* 2010). 4
- Figura 3** – Linha do tempo das publicações sobre o impacto da UV em *Metarhizium*. 7

CAPÍTULO I

- Figura 1** – Isolado de *Metarhizium* sp. Cultivado em meio de cultura Batata Dextrose utilizado nos experimentos. 27
- Figura 2** - Espectro de irradiância das lâmpadas da câmara de irradiação UV-B filtradas com diacetato de celulose. As lâmpadas forneceram $967,01 \text{ mW m}^{-2}$ de radiação UV-B com base na irradiância ponderada por Quaité (QUAITE *et al.*, 1992). 30
- Figura 3** – Árvore filogenética construída pelo método Neighbour-joining baseada nas sequências dos genes EF1- α e RPB1 mostrando a posição do isolado LCM S10 de *Metarhizium pingshaense* em relação à outras espécies depositadas no banco de dados do NCBI. Foi utilizado o modelo de substituição Junker Cantor. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 réplicas e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$. 33
- Figura 4** - Média e erro padrão da Germinação Relativa de conídios (A), Viabilidade de Blastosporos (B) e Viabilidade de Microescleródios (C) de *Metarhizium pingshaense* após exposição à radiação UV-B ($4,0 \text{ kJ/m}^2$). 34
- Figura 5** - Média e erro padrão de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de blastosporos de *Metarhizium pingshaense* 48h após exposição à UV-B ($4,0 \text{ kJ/m}^2$). 34
- Figura 6** - Sobrevivência de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* à infecção fúngica. Os dados foram analisados pelo teste de Logrank. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os respectivos grupos tratados. 36

CAPÍTULO II

- Figura 1** - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do RNA total de blastosporos de *Metarhizium pingshaense*. CTR 1, CTR 2, CTR 3 e CTR 4 (amostras 1, 2, 3 e 4 de RNA total de blastosporos não expostos à UV-B); UV 1, UV 2, UV 3 e UV 4 (amostras 1, 2, 3 e 4 de RNA total de blastosporos expostos à UV-B). 50

Figura 2 - Representação gráfica do tipo “volcano plot” dos genes diferencialmente expressos em blastosporos de *Metarhizium pingshaense* expostos à UV-B versus controle. Pontos vermelhos indicam genes induzidos (“up-regulated”), azuis, os suprimidos (“down-regulated”) e cinzas aqueles que não foram significativos (p-valor ajustado por FDR de 0.05 – linha horizontal) e uma diferença de expressão mínima de Log₂Fold-Change de ±1 (linhas verticais). 51

Figura 3 - Análise de Componentes Principais (PCA) dos perfis de expressão diferencial revela a separação dos tratamentos (controle – preto; expostos à UV-B – laranja), cuja variação explicada acumulada dos *eigenvalues* dos dois primeiros PCs é de 88,01% (A). Os dez genes de maior carga (“loadings”) no PC1 (principal relacionado à separação dos tratamentos) (B) e suas descrições e diferença de expressão, onde números positivos indicam indução e negativos, supressão sob a exposição de luz UV-B (C). O asterisco (“*”) indica descrição baseada em ortólogos, obtida na anotação com EggNOG. 54

Figura 4 - Mapa de calor dos genes diferencialmente expressos entre as amostras expostas à UV-B (UV) e controle (CTR). Estão demonstrados os 100 genes com maior diferença de expressão segundo o valor de Log₂Fold-Change. Os valores de expressão em FPKM foram padronizados via computação de z-score. As linhas (genes) e colunas (amostras) foram clusterizadas hierarquicamente de acordo com a similaridade entre elas. 55

Figura 5 - Classificação funcional do COG (Cluster de Grupos Ortólogos) dos genes diferencialmente expressos (DEGs) de blastosporos de *Metarhizium pingshaense* expostos à UV-B em relação ao controle (não exposto à UV-B). São demonstradas as porcentagens dos genes suprimidos (“down-regulated”) e induzidos (“up-regulated”) em cada categoria funcional. 56

Figura 6 - Análise de enriquecimento de termos GO (Gene Ontólogo) dos genes diferencialmente expressos (DEGs) de blastosporos de *Metarhizium pingshaense* em relação à exposição à luz UV-B. São demonstradas as porcentagens de DEGs nos 10 termos mais expressivos de cada categoria funcional. 57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
3	REFERÊNCIAS	14

CAPÍTULO I

“Caracterização de um isolado de *Metarhizium* sp., avaliação da germinação relativa e viabilidade de diferentes propágulos e virulência para fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.” 23

Resumo	24
Abstract	25
1 Introdução	26
2 Material e Métodos	27
2.1 Isolado Utilizado e Local de Realização dos Experimentos	27
2.2 Identificação Molecular do Isolado LCM S10	27
2.2.1 Extração de DNA	27
2.2.2 Amplificação do DNA por PCR	27
2.2.3 Purificação dos produtos de PCR	28
2.2.4 Sequenciamento dos genes EF-1 α e RPB1	29
2.3 Exposição à Irradiação UV-B	29
2.4 Avaliação <i>in vitro</i> da Germinação Relativa de Conídios de <i>Metarhizium</i> sp. Após Ação da Irradiação UV-B	30
2.5 Avaliação <i>in vitro</i> da Viabilidade de Blastosporos de <i>Metarhizium</i> sp. Após Ação da Irradiação UV-B	30
2.6 Avaliação <i>in vitro</i> da Viabilidade de Microescleródios de <i>Metarhizium</i> sp. Após Ação da Irradiação UV-B	31
2.7 Bioensaio Com Fêmeas Ingurgitadas de <i>R. microplus</i> Tratadas Com Blastosporos de <i>Metarhizium</i> sp.	31
2.8 Avaliação <i>in vitro</i> da Viabilidade de Blastosporos Após Três Dias de Irradiação Consecutivos (Fluência Diária De 4,0 kJ/m ²)	32
2.9 Análise Estatística	32
3 Resultados	33
3.1 Análise Filogenética	33
3.2 Efeito da Radiação UV-B Sobre a Germinação Relativa de Conídios e Viabilidade de Blastosporos e Microescleródios de <i>M. pingshaense</i>	34
3.3 Avaliação da Mortalidade e Parâmetros Biológicos de Fêmeas de <i>R. microplus</i> Tratadas Com Blastosporos de <i>M. pingshaense</i> e expostos à Radiação UV-B Por Três Dias Consecutivos	35
4 Discussão	37
5 Referências	39

CAPÍTULO II

“Transcriptoma de blastosporos de *Metarhizium pingshaense* expostos à radiação UV-B.” 43

Resumo	44
Abstract	45
1 Introdução	46
2 Material e Métodos	47
2.1 Local de Realização dos Experimentos	47
2.2 Produção de Blastosporos	47
2.3 Exposição à Irradiação UV-B	47
2.4 Transcriptoma de Blastosporos Expostos à Luz UV	47
2.4.1 Extração de RNA total	47
2.4.2 RNA-seq	48
2.5 Análise dos Dados Gerados Pelo RNA-seq	48
2.5.1 Processamento dos dados	48
2.5.2 Determinação dos genes expressos	48
2.5.3 Identificação de genes diferencialmente expressos	49
2.5.4 Anotação e análise de enriquecimento funcional	49
2.5.5 Análise de componentes principais e representações gráficas	49
3 Resultados	50
3.1 Extração de RNA Total	50
3.2 Análise dos Dados do RNA-seq	50
4 Discussão	58
5 Referências	61

CONCLUSÕES GERAIS	65
CONSIDERAÇÕES GERAIS	66

ANEXOS

1. Resumo de 47 artigos publicados revisados por pares sobre a influência da radiação ultravioleta em <i>Metarhizium</i> spp.	67
2. Protocolo do kit de Extração de RNA Total – Rneasy Mini Kit – Qiagen	82
3. Contagem de leituras sequenciadas, após remoção de adaptadores de sequenciamento e remoção de bases e sequências de baixa qualidade, separadas com bibliotecas com leituras pareadas ("Leituras HQ (PE)") e leituras que perderam seus pares durante o processamento ("Leituras HQ (SE R1/R2)").	83
4. Contagem de leituras mapeadas contra o genoma de referência <i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF 23. São descritas as sequências que mapearam de forma única e múltipla, também aquelas que não foram mapeadas. As porcentagens referem-se à proporção de leituras de boa qualidade (pós-processamento) mapeadas.	84
5. Análise de enriquecimento de termos GO (Gene Ontólogo) dos genes induzidos (URGs) de blastosporos de <i>Metarhizium pingshaense</i> em relação à exposição à radiação UV-B. São demonstradas as porcentagens de URGs nos 10 termos mais expressivos de cada categoria funcional.	85
6. Análise de enriquecimento de termos GO (Gene Ontólogo) dos genes suprimidos (DRGs) de blastosporos de <i>Metarhizium pingshaense</i> em relação à exposição à radiação UV-B. São demonstradas as porcentagens de DRGs nos 10 termos mais expressivos de cada categoria funcional.	86

1 INTRODUÇÃO GERAL

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, como a presença de parasitos, que são responsáveis por importantes 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 *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp., causadores da Tristeza Parasitária Bovina. Estes microrganismos associados ao carrapato acarretam, além de anemia, perda de peso que pode evoluir a óbito, uma depreciação no valor comercial desses bovinos e elevados gastos com diagnóstico e controle.

Normalmente, estes ectoparasitos são controlados com carrapaticidas químicos, porém este método de controle de pragas pode trazer inúmeros malefícios ao meio ambiente, ao bovino e ao produtor, como seleção de populações de carrapatos resistentes, carência para consumo de leite e carne, além de deixar resíduos no solo e afetar organismos não alvos. O impacto ambiental gerado pelos carrapaticidas químicos e a falta de segurança de suas aplicações fazem com que novas tecnologias mais sustentáveis para controle de carrapatos, incluindo o controle biológico, que oferece uma gama de alternativas e inclui o uso de parasitos, sejam cada vez mais promissores.

Fungos entomopatogênicos já são amplamente utilizados para controle de pragas agrícolas. No entanto, não há produto comercial baseado em fungos que seja indicado para o controle de carrapatos. Espécies do gênero *Metarhizium* mostraram grande eficácia no controle de *R. microplus*, porém elas são bastante suscetíveis a fatores abióticos, como a radiação solar, principalmente a fração UV-B. A exposição aos raios UV podem reduzir a viabilidade dos conídios no campo e retardar a sua germinação, além de serem frequentemente apontados como fatores capazes de reduzir a eficiência dos fungos em programas de controle biológico.

Na busca por respostas para os problemas enfrentados pelo uso de fungos entomopatogênicos a campo, diferentes propágulos têm sido testados. Além do conídio, que é a estrutura mais comumente utilizada em programas de biocontrole 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 como objetivo identificar molecularmente um isolado de *Metarhizium* sp., avaliar o impacto da radiação UV-B em diferentes propágulos de *M. pingshaense*, além de verificar a tolerância de blastosporos expostos à radiação UV-B. Também foi avaliada a ação sobre os fatores reprodutivos de carrapatos que foram tratados com blastosporos de *M. pingshaense* expostos à radiação UV-B. Foram avaliadas ainda as alterações da expressão gênica de blastosporos nas primeiras 24h após exposição à radiação UV-B.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Rhipicephalus microplus*

Carrapatos são considerados um dos maiores problemas enfrentados por pecuaristas em áreas tropicais, sendo *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) uma das principais espécies ectoparasitas encontrada em bovinos. Estes ectoparasitos causam grandes perdas, como a redução da produção de leite e carne, danos ao couro dos animais, além de serem vetores de importantes agentes patogênicos, como protozoários do gênero *Babesia* spp. e bactérias do gênero *Anaplasma* spp. (PERINOTTO et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2016). Estes microrganismos associados ao carrapato acarretam, além de anemia e perda de peso, uma depreciação no valor comercial desses bovinos (FURLONG; PRATA, 2005; RODRÍGUEZ et al., 2016). Quando o nível de parasitismo por *R. microplus* é alto, causa grandes danos à economia que, no Brasil, pode ultrapassar 3 bilhões de dólares anualmente (GRISI et al., 2014).

O ciclo de vida dos carrapatos pode ser dividido em duas fases: parasitária e não parasitária (Figura 1).



Figura 1: Ciclo biológico do carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus*, ilustrando a fase de vida livre e a fase parasitária. (Fonte: MAPA)

Na fase parasitária, machos e fêmeas copulam quando ainda estão sobre os bovinos e a fêmea começa seu processo de ingurgitamento, 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 dois a três dias ainda no solo para que haja o enrijecimento da cutícula. As larvas sobem para as pastagens à espera dos hospedeiros. Elas são atraídas pelo gás carbônico liberado na respiração desses animais e 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, passando pelas fases de larva, ninfa e adulto (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).

A fim de controlar esses ectoparasitos, produtores 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 falta de 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 de 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).

Fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp., têm sido amplamente utilizados em programas de controle de insetos-praga, pois apresentam grande potencial na redução das populações de artrópodes. Entre as razões para utilização de fungos como biocontroladores estão sua eficácia em matar seus hospedeiros artrópodes, grande biodiversidade e segurança ambiental (STONE; BIDOCHKA, 2020; LITWIN et al., 2020).

Fungos, como os do gênero *Metarhizium*, apresentam um estilo de vida que pode variar muito, pois embora atuem como parasitos de insetos, também podem viver nos tecidos vegetais, estabelecendo uma simbiose complexa com as plantas. Portanto, são de grande importância econômica e ecológica, pois regulam as populações de pragas, além de atuarem no crescimento e produtividade das plantas (STONE; BIDOCHKA, 2020). O complexo de espécies de *Metarhizium anisopliae* está entre os fungos entomopatogênicos mais estudados e utilizados em todo o mundo (BAHIENSE et al., 2007; LEEMON; JONSSON, 2007; ZIMMERMANN, 2007; LEEMON et al., 2008; GARCIA et al., 2011; CAMARGO et al., 2016; GRIZANOVA et al., 2019; IWANICK et al., 2020; BITENCOURT et al., 2021).

A infecção por fungos entomopatogênicos pode ser dividida em seis estágios: adesão, germinação, formação de apressório, penetração, colonização da hemocele e exteriorização com esporulação (Figura 2). Em condições naturais, os esporos que entram em contato com os hospedeiros invadem seu corpo através do apressório, mas os fungos também produzem enzimas que degradam a cutícula do hospedeiro, como proteases e esterases, além de quitinases e lipases. As hifas se proliferam dentro do corpo do hospedeiro, que morre após a diminuição das reservas de nutrientes (BRANCINI et al. 2022).

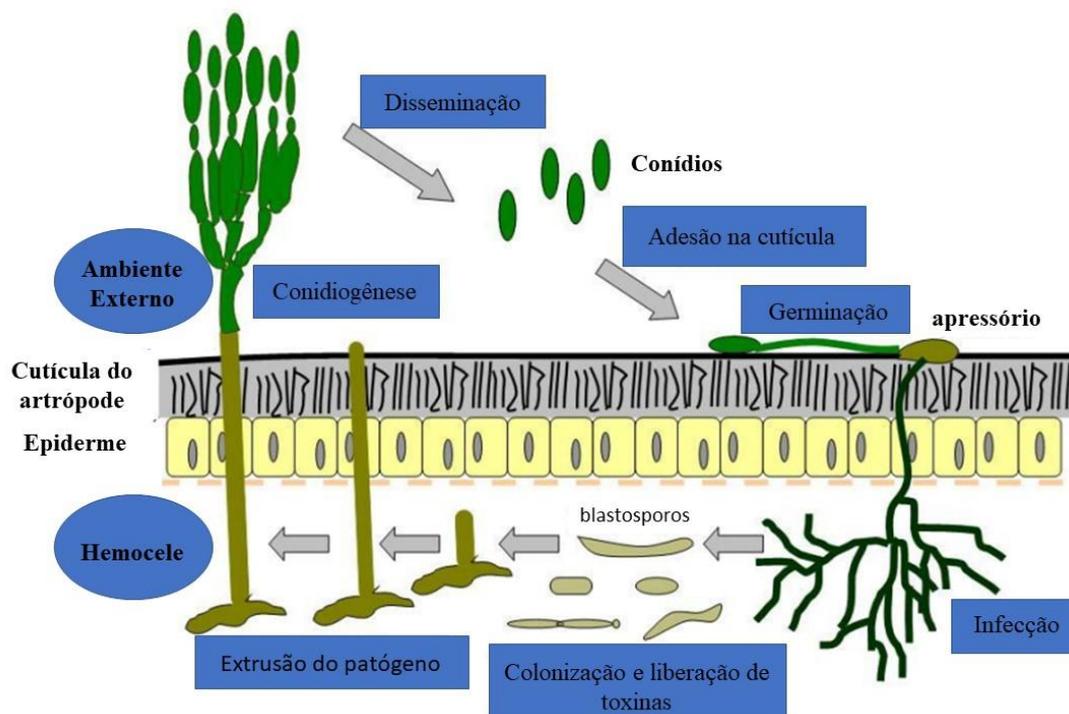


Figura 2: Ciclo de *Metarhizium anisopliae* (Fonte: adaptado de Alves *et al.* 1998 e Mascarin *et al.* 2010).

Conídios de fungos entomopatogênicos aplicados nos hospedeiros podem controlar os carrapatos em condições naturais ou seminaturais, 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).

2.3. Suscetibilidade de diferentes propágulos fúngicos à UV

Metarhizium spp. pode produzir ao menos três tipos de propágulos em condições naturais ou artificiais. O mais comum são os conídios aéreos, uma célula que germina para produzir estruturas que causam infecção em seus hospedeiros artrópodes e são responsáveis pela dispersão do fungo. Após a penetração na hemocele do hospedeiro invertebrado, os conídios se transformam em corpos hifais, colonizando todo o seu interior (ALKHAIBARI *et al.*, 2017). Essas estruturas vegetativas podem ser produzidas em meio líquido, em condições laboratoriais, sendo chamadas de blastosporos. Os blastosporos são esporos hidrofílicos, pleomórficos e de paredes finas que geralmente germinam mais rápido que os conídios (ALKHAIBARI *et al.*, 2016). Eles podem ser mais virulentos que os conídios, mas sofrem mais com estresses ambientais (ALKHAIBARI *et al.*, 2016; ALKHAIBARI *et al.*, 2017; BERNARDO *et al.*, 2018; MASCARIN *et al.*, 2019). Muitos fungos, especialmente patógenos de plantas, produzem naturalmente microescleródios, que são agregados compactos de hifas que se

formam sob condições ambientais e/ou nutricionais desfavoráveis e aumentam a resistência dos fungos no solo (COLEY-SMITH et al., 1971; JACKSON; PAYNE, 2016). Os microescleródios têm entre 50-600 µm de diâmetro e são compostos por apenas algumas células. À medida que se desenvolvem, tornam-se melanizadas e dessecam até certo ponto, mantendo reservas nutricionais endógenas para serem utilizadas quando as condições ambientais voltarem a ser favoráveis. Não há relatos de produção natural de microescleródios por fungos entomopatogênicos (JACKSON; PAYNE, 2016). No entanto, espécies de *Metarhizium* podem ser induzidas a produzir essas estruturas em meio de cultura líquido (MASCARIN et al., 2014).

Um estudo que comparou a tolerância à radiação em diferentes propágulos foi o de Bernardo e colaboradores (2020). Neste estudo, conídios e blastosporos foram expostos a uma fluência de radiação variando de 0 a 8,1 kJ/m². Conídios e blastosporos de um isolado de *M. robertsii* e outro de *M. anisopliae* não mostraram diferenças em suas tolerâncias à radiação UV-B. No entanto, os conídios do isolado ARSEF 324 de *M. acridum* sobreviveram por mais tempo e tiveram uma taxa de inativação mais lenta do que os blastosporos. Dentre todos os isolados testados, *M. acridum* ARSEF 324 mostrou-se o mais tolerante à UV-B, pois as diferenças na tolerância foram mais pronunciadas em fluências superiores a 8,1 kJ/m². A viabilidade relativa de *M. acridum* ARSEF 324 exposto a fluências aumentadas de UV-B revelou que os conídios são mais resistentes à radiação do que os blastosporos, pois a viabilidade dos conídios diminuiu drasticamente quando expostos a fluências superiores a 6,56 kJ/m², enquanto os blastosporos tiveram sua viabilidade diminuída mais rapidamente quando expostos a fluências variando de 1,4 a 8,1 kJ/m².

Outro estudo que comparou diferentes tipos de propágulos quanto à tolerância à radiação UV-B foi o de Corval e colaboradores (2021). Eles estudaram a tolerância à radiação UV-B de dez isolados de *Metarhizium* spp. Em relação aos conídios, eles foram expostos em meio aquoso ou em suspensões oleosas e muitos conídios apresentaram a mesma tolerância quando expostos a ambos os tratamentos. A germinação desses propágulos 24h após a exposição à UV-B sugeriu que os isolados que apresentaram baixa tolerância inata foram mais responsivos à adição de óleo na formulação. Alguns isolados também apresentaram atraso na germinação quando comparados os resultados de 24h e 48h após a exposição à radiação, mas essa recuperação fúngica não deve ser observada em condições de campo, uma vez que os conídios estão constantemente expostos à radiação solar. O estudo de Corval e colaboradores (2021) também analisou a resposta dos blastosporos à radiação ultravioleta, mostrando que esses propágulos, quando em suspensões aquosas, eram muito susceptíveis à UV-B, apresentando tolerância média ou baixa, exceto para um isolado de *M. anisopliae*. Com relação aos microescleródios, os isolados investigados variaram amplamente em suas respostas à UV-B, sugerindo que, embora essas estruturas sejam de resistência fúngica, nem sempre apresentam alta tolerância à radiação.

Ainda em relação aos estudos comparativos de propágulos quanto à tolerância à radiação ultravioleta, Paixão e colaboradores (2021) compararam o efeito da radiação UV-B sobre microescleródios e pellets de micélio de *M. robertsii* ARSEF 2575, observando a produção de conídios após a exposição. Eles descobriram que fungos expostos à radiação UV-B tiveram sua produção de conídios diminuída de maneira dependente do tempo. No geral, a susceptibilidade dos pellets de micélio foi consideravelmente maior do que nos microescleródios. Com base no número de

conídios produzidos, o estresse térmico (45°C) teve um efeito deletério maior do que a radiação UV-B em ambos os propágulos.

2.4 Tolerância de *Metarhizium* à Radiação Ultravioleta

2.4.1. Danos causados aos fungos entomopatogênicos pela radiação ultravioleta

Fatores ambientais, incluindo a radiação ultravioleta (UV), que é um dos componentes da radiação solar, podem afetar negativamente a sobrevivência dos fungos entomopatogênicos. Além de inativar os conídios e outros propágulos usados como inóculo em programas de controle biológico, as exposições subletais à radiação UV reduzem a velocidade de germinação dos conídios e a virulência, reduzindo a eficácia dos fungos como bioinseticida (BRAGA et al., 2001a,b,c; BRAGA et al., 2015; BRANCINI et al., 2022; SUTANTO et al., 2022).

O espectro UV é convencionalmente dividido em três regiões distintas: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-C (100-280 nm) (SLINEY, 2007). A radiação UV que atinge a superfície da Terra é composta exclusivamente de UV-A e UV-B, pois o ozônio atmosférico reduz drasticamente a penetração de comprimentos de onda menores que 320 nm e exclui completamente aqueles abaixo de 290 nm (CALDWELL; FLINT, 1997). Consequentemente, o componente UV-B é normalmente inferior a 1% da radiação que atinge a superfície da Terra (WILLIAMSON et al., 2014; JENKINS, 2017). Dentro do espectro UV incidente, a fração UV-B é mais nociva aos fungos, incluindo entomopatogênicos como *Metarhizium* spp., do que a UV-A (BRAGA et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2010; BRAGA et al., 2001d; DIAS et al., 2018).

A natureza e a intensidade dos danos ao DNA induzidos pela radiação UV dependem do comprimento de onda dos fótons incidentes (BRAGA et al., 2015; CADET et al., 2012; KARENTZ 2015; SCHUCH; MENCK, 2010). O dano ao DNA induzido pela radiação UV ocorre por uma fotoreação direta iniciada pela absorção de fótons UV-B ou UV-A ou por reações de fotossensibilização (BRAGA et al., 2015; CADET et al., 2012; 2015). A absorção direta de fótons UV-B pelo DNA induz principalmente a dimerização entre bases pirimídicas adjacentes e os dímeros ciclobutano pirimidina (CPD) e a pirimidina (6-4)-pirimidona (6-4PPs) são os dois principais fotoprodutos bipyrimídicos (CHELICO; KHACHATOURIANS 2008; NASCIMENTO et al., 2010; CADET et al., 2012). A radiação UV-B também induz vias de dano oxidativo (CADET et al., 2015). Produtos de oxidação, como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, são formados, porém em um baixo rendimento que é duas ou três ordens de grandeza menor do que CPDs ou 6-4PPs (CADET et al., 2012). Embora a radiação UV-A constitua a grande maioria da radiação UV incidente, ela é muito menos eficiente do que a radiação UV-B na indução de dano direto ao DNA (SCHUCH et al., 2009; CADET et al., 2012; 2015). Assim como a UV-B, a radiação UV-A também induz a formação de dímeros de pirimidina, porém de forma menos eficiente e por um mecanismo diferente daquele induzido pela UV-B. No entanto, os fotoprodutos da bipyrimidina são os principais fotodanos no DNA responsáveis pelo efeito genotóxico da radiação solar UV-A em células de mamíferos (DOUKI et al., 2003; MOURET et al., 2006). Danos no DNA gerados por oxidação são induzidos de forma mais eficaz com UV-A do que com UV-B (SCHUCH; MENCK, 2010; CADET et al., 2015). Os

principais fotoprodutos de oxidação de DNA induzidos por UV-A em células irradiadas são bases purinas oxidadas, como a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua), seguidas de quebras na fita de DNA que se formam em três vezes menos do que as purinas oxidadas (CADET et al., 2012). Pirimidinas oxidadas também são formadas, mas em níveis de menos da metade das quebras de cadeia (CADET et al., 2015). No entanto, a distribuição dos produtos de oxidação do DNA induzidos por UV-A depende tanto do comprimento e onda do fóton UV-A incidente quanto do tipo de célula (CADET et al., 2012; SCHUCH et al., 2012; SCHUCH; MENCK, 2010).

2.4.2. Linha do tempo dos estudos sobre o impacto UV em *Metarhizium*

Estudos envolvendo os efeitos da radiação ultravioleta sobre fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* spp. foram publicados pela primeira vez há mais de trinta anos (Anexo I) (ZIMMERMANN et al., 1982). Os primeiros estudos foram realizados para verificar a sobrevivência dos isolados à medida que aumentava a fluência e/ou tempo de exposição. Na década de 1990, estudos com formulações à base de óleo foram realizados para estudar o papel desses adjuvantes na proteção de propágulos fúngicos. No início dos anos 2000, foram iniciados estudos com o espectro da radiação solar, mas foi somente a partir de 2016 que os pesquisadores começaram a estudar como o cultivo sob diferentes tipos de luz (ou seja, luz branca, vermelha e azul) afetava a tolerância aos fungos. Até o final da década de 2010, apenas conídios e micélios haviam sido relatados nas publicações. Somente a partir do ano de 2020, outros propágulos, como blastosporos e microescleródios, foram incluídos nos estudos, mas, até onde sabemos, existem apenas cinco publicações sobre a tolerância desses propágulos à radiação UV (BERNARDO et al., 2020; CORVAL et al., 2021; PAIXÃO et al., 2021; SANTOS et al., 2021; YOUSEF-YOUSEF et al., 2022). O número de publicações sobre o tema vem crescendo ao longo dos anos, conforme observado na figura abaixo (Figura 3). Apesar de todos os estudos focarem em fungos do gênero *Metarhizium*, a maioria deles foi baseada na espécie *M. anisopliae* (27 artigos), seguido por *M. robertsii* (20 artigos).

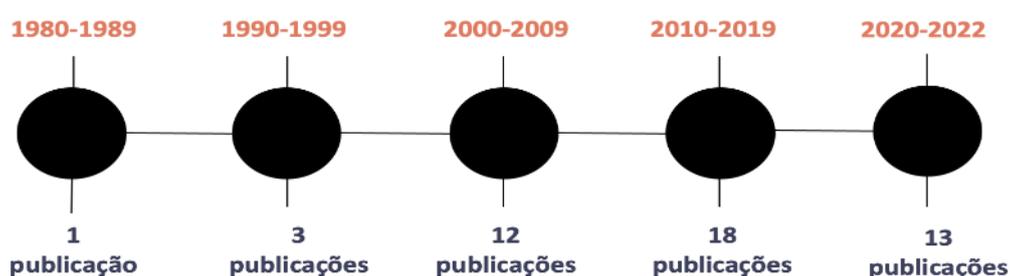


Figura 3: Linha do tempo das publicações sobre o impacto da UV em *Metarhizium*.

Os estudos publicados relataram que os conídios expostos à radiação ultravioleta germinam menos do que os não expostos (ZIMMERMANN et al., 1982; MORLEY-DAVIS et al., 1995; ALVES et al., 1998; BRAGA et al., 2001b; FALVO et al., 2016; SHIN et al., 2017; COUCEIRO et al., 2021). Vários autores verificaram que quanto

maior a fluência de radiação, menor a viabilidade dos conídios expostos e maior o atraso na germinação desses propágulos. Zimmermann e colaboradores (1982), por exemplo, relataram que quanto maior o tempo de exposição à radiação (UV-A e UV-B), menor a viabilidade dos conídios de *M. anisopliae*, bem como a diminuição do comprimento das hifas. Braga et al. (2001) verificaram que o atraso na germinação foi maior nos conídios expostos a fluências mais elevadas de radiação. O aumento nas fluências de UV também diminuiu a cultivo desses propágulos (BRAGA et al., 2001a,c).

Mais recentemente, estudos moleculares começaram a ser realizados para elucidar os efeitos da UV sobre os fungos do gênero *Metarhizium* spp. Por exemplo, as peptidases desempenham um papel crucial na adaptabilidade dos fungos, mas os papéis dessas enzimas na tolerância aos raios UV e ao calor ainda não estão claros. Li e colaboradores (2020) mostraram que a interrupção do gene MaPepDA, que codifica uma cisteína peptidase intracelular localizada no citosol, aumentou a germinação de conídios, a taxa de crescimento e aumentou significativamente a tolerância à UV-B e estresses induzidos pelo calor em *M. acridum*. No entanto, a deleção do gene não afetou a virulência e a produção de conídios.

As proteínas G são moduladoras ou transdutoras em sistemas de sinalização transmembrana e atuam em diversos processos biológicos em fungos, como crescimento, desenvolvimento de estruturas relacionadas à infecção, virulência e produção de conídios. No entanto, a função de uma proteína G em *Metarhizium* spp. ainda não foi demonstrada (TONG et al. 2020). O papel de MrGPA1, uma subunidade Gai da proteína G, foi elucidado na conidiação, resistência ao estresse e virulência de *M. robertsii*. A deleção de MrGPA1 reduziu a capacidade de conidiação e a virulência e diminuiu a sensibilidade dos fungos à radiação UV e ao estresse térmico (TONG et al. 2020). Assim, as publicações atuais frequentemente focam nos aspectos moleculares do comportamento do fungo após a exposição aos raios UV, principalmente com o objetivo de desvendar ferramentas biotecnológicas para melhorar o uso desses fungos como biopesticidas e promotores de crescimento vegetal. Alguns pontos críticos que podem contribuir para a melhoria da produção de *Metarhizium* spp. são descritos a seguir, a saber: fotoliasas, influência de outras luzes na tolerância à UV, pigmentos fúngicos, substratos para cultivo de fungos e adjuvantes e propágulos fúngicos.

2.4.3. Mecanismos de proteção e recuperação dos fungos à radiação ultravioleta

2.4.3.1. Fotoliasas

A absorção direta de UV-B e UV-A pelo DNA resulta na formação de dímeros de bases, que podem ser tanto os dímeros de pirimidina ciclobutano, mais frequentes, quanto os fotoprodutos de pirimidina (6-4) pirimidona, menos frequentes (NASCIMENTO et al. 2010; CADET et al. 2012; SCHUCH et al. 2013; FUENTES-LEÓN et al. 2020; NISHIMURA et al. 2021).

Em fungos, o reparo do dano ao DNA induzido pela UV é feito principalmente por meio de um ou mais desses três mecanismos de reparo de DNA: reparo geral por excisão de nucleotídeos, excisão de nucleotídeos específicos por UV endonucleases e fotorreativação (SINHA; HÄDER, 2002; AHMAD et al. 2020; BRANCINI et al. 2022). As duas primeiras não necessitam de luz para funcionar e são classificadas como reparo

escuro. Esta última é realizada por enzimas denominadas fotoliasas que utilizam radiação fotorreativadora (de 320 a 500 nm) para reverter as bases danificadas de volta ao seu estado original. A fotorreativação é muito mais rápida e eficiente do que o reparo por excisão de nucleotídeos (SINHA, HÄDER, 2002; BANAS et al. 2020; BRANCINI et al. 2022).

As fotoliasas se ligam especificamente a CPDs ou 6-4 PPs (SINHA, HÄDER, 2002). Essas enzimas são compostas por dois cromóforos. Um deles pode ser metenil tetraidrofolato (MTHF) ou 8-hidroxi-5-deazaflavina (8-HDF). O segundo cromóforo é FADH⁻. Em uma reação independente de luz, o primeiro cromóforo (MTHF ou 8-HDF) absorve um fóton visível e transfere essa energia de excitação para o FADH⁻, que, por sua vez, transfere um elétron para o dímero, induzindo sua reversão e separando os nucleotídeos (SANCAR, 1994; BRITT, 1995). A fotorreativação é um mecanismo importante para reparar danos ao DNA induzidos por UV em *Metarhizium* spp. (FANG, ST. LEGER, 2012; BRANCINI et al. 2016; BRANCINI et al. 2019; BRANCINI et al. 2021).

M. robertsii usa fotoliasas para remover CPDs e 6-4 PPs que foram induzidos por UV. Os genes (*phr1* e *phr2*) de duas fotoliasas são frequentemente estudados por sua ação sobre fungos entomopatogênicos. Em *M. robertsii*, a supressão desses dois genes (individualmente ou ambos) resultou em uma diminuição na germinação relativa dos conídios em comparação com a cepa selvagem, após exposição à UV e permanência no escuro por 48h, enquanto a superexpressão desses genes resultou em um aumento significativo na germinação relativa de conídios após exposição à UV mais 4h de fotorreativação (FANG; ST. LEGER, 2012). Quando cultivados em Batata Dextrose Ágar (BDA) suplementado com riboflavina, os conídios da mesma espécie obtiveram um aumento na expressão do gene *phr2* e altas taxas de germinação relativa após exposição à UV-B seguida de luz branca (WL) (PEREIRA-JUNIOR et al., 2018). Em *M. acridum*, os conídios tiveram sua germinação relativa aumentada quando expostos à UV-B seguida de WL, indicando fotorreativação (PEREIRA-JUNIOR et al., 2018).

Su e colaboradores (2020) estudaram a relação do gene *phr1* com dois genes de *M. acridum* relacionados ao estágio inicial da infecção fúngica (*Macwh1*) e integridade da parede celular (*Macwh43*) e descobriram que mutantes desses genes tiveram sua tolerância à UV diminuída, além de uma expressão diminuída do gene *phr1* nos mesmos mutantes.

Mais recentemente, Peng e colaboradores (2021) relataram que as proteínas de colarinho branco WC1 e WC2 regulam a expressão de fotoliase em *M. robertsii*, pois em mutantes desses genes ($\Delta wc1$ e $\Delta wc2$), a tolerância à UV diminuiu e a expressão de *phr1* e *phr2* foi deletada, provando que o papel das proteínas WC1 e WC2 está relacionado a interações com os genes *phr1* e *phr2*.

2.4.3.2. Influência da luz visível na tolerância de *Metarhizium* à UV

A luz é um sinal ambiental que regula o crescimento e desenvolvimento dos fungos, facilitando a produção de esporos, induzindo a pigmentação das hifas e regulando o metabolismo (CORROCHANO; GALLAND, 2006; COCHORRANO 2007; FULLER et al. 2013). Espécies de fungos respondem a diferentes tipos de luz, variando de ~450 nm (azul a ~700 nm (vermelho), assemelhando-se ao alcance do espectro visível humano (FULLER et al. 2015).

Várias classes de receptores azuis foram identificadas em fungos e a mais conhecida até hoje é a de Colarinho Branco. O Complexo de Colarinho Branco é o resultado de uma interação entre uma proteína WC1, que é um fotorreceptor de luz azul, e uma proteína WC2 (FULLER et al., 2016). Peng e colaboradores (2021) procuraram elucidar o papel de WC1 e WC2 na fotoproteção de *M. robertsii*. Os genes que codificam WC1 e WC2 foram expressos na cepa selvagem durante uma incubação de sete dias em BDA em um ciclo claro/escuro de 12:12h. Em comparação com os níveis de transcrição em culturas cultivadas no escuro por 72h, WC1 e WC2 foram moderadamente regulados por uma exposição de 5h à luz azul (450 nm) em vez de luz branca após 67h de incubação no escuro. WC1 foi regulado positivamente em culturas do tipo selvagem cultivadas por 72h sob luz azul mais do que sob luz branca, enquanto WC2 apresentou níveis de transcrição mais baixos do que WC1. Isso sugere uma maior sensibilidade do WC1 aos estímulos luminosos. Quando mutantes (Δ WC1 e Δ WC2) foram testados para tolerância à radiação UV-B, os conídios foram severamente comprometidos (PENG et al., 2021).

Com o objetivo de estudar se uma breve exposição à luz do micélio em crescimento poderia induzir uma maior tolerância de suas colônias a uma exposição posterior à UV-B, Brancini e colaboradores (2016) analisaram o comportamento do micélio do isolado de *M. acridum* ARSEF 324. 26h após a inoculação em uma placa com meio de cultura, as colônias foram expostas por 2h a diferentes tipos de luzes: lâmpadas fluorescentes brancas, luz LED vermelha ou LED azul/Luz UV-A. Um tratamento no escuro completo também foi preparado. Após a exposição à luz, as colônias foram expostas à radiação UV-B. Colônias de *M. acridum* expostas a 2h de luz branca ou azul/UV-A apresentaram maior tolerância à radiação do que colônias mantidas no escuro ou expostas à luz vermelha, além de crescerem mais rapidamente. Além disso, aumentar o tempo de incubação no escuro reduziu o atraso na germinação resultante da exposição à UV-B (BRANCINI et al., 2016).

Com o objetivo de observar se a luz pode influenciar a tolerância à radiação ultravioleta em diferentes momentos do desenvolvimento fúngico, Brancini e colaboradores (2021) verificaram quanto tempo de exposição à luz foi necessário para aumentar a tolerância dos conídios de *M. acridum* e concluíram que 72h de exposição à luz antes de ficar no escuro é suficiente para induzir tolerância neste isolado. Embora esses trabalhos tenham nos proporcionado uma maior compreensão do papel da luz na tolerância dos fungos à radiação ultravioleta, não havia informações sobre como a luz regula a expressão gênica em todo o genoma fúngico. Portanto, Brancini e colaboradores (2019) combinaram técnicas de sequenciamento de mRNA e proteômica para estudar a expressão gênica tanto transcricional quanto pós-transcricionalmente. Alterações foram observadas em 11% do genoma, mas foram relatadas alterações em apenas 57 proteínas, e pelo menos 347 alterações no nível do mRNA não foram traduzidas para o nível da proteína.

O estudo de Dias e colaboradores (2019) está de acordo com o estudo realizado por Brancini e colaboradores (2016), pois também mostra que os micélios do isolado ARSEF 2575 de *M. robertsii* cultivados sob luz azul e luz branca produziram conídios mais tolerantes à radiação ultravioleta. Os conídios produzidos sob estresse nutricional no escuro foram os mais tolerantes à radiação UV-B, seguidos pelos conídios produzidos sob luz azul de menor irradiância e pelos conídios produzidos sob luz branca contínua. Os conídios produzidos sob a maior irradiância das luzes azul, verde e vermelha foram menos tolerantes aos raios ultravioleta (DIAS et al., 2019).

2.4.3.3. Pigmentos fúngicos de *Metarhizium* spp.

Um dos principais sistemas de proteção contra a radiação por fungos é a sua pigmentação. A melanina é um polímero multifuncional de pigmentos escuros e pode ser encontrada desde bactérias até mamíferos. É produzido como mecanismo de defesa contra estresses ambientais causados por radiação UV, radicais livres, raios gama, desidratação ou temperaturas extremas (GESSLER et al., 2014). Geralmente são sintetizados durante a formação dos conídios para deposição na parede celular, contribuindo para a resistência contra enzimas hidrolíticas, impedindo a lise celular. Este pigmento permite que os fungos cresçam sob a influência de altas taxas de radiação, como em regiões de altas montanhas, desertos e superfícies vegetais. Em condições extremas, a proporção de fungos melanizados geralmente aumenta (GESSLER et al., 2014).

Existem dois mecanismos conhecidos de produção de melanina: a via DHN-melanina e a L-DOPA. Na primeira via, a acetilcoenzima A ou malonil-coenzima A são usados como substrato inicial pela PKS para formar tetrahidroxinaftaleno (THN), seguido por uma série de reduções e polimerizações em melanina. Na via da L-DOPA, o precursor (L-DOPA ou tirosina) é catalisado pela tirosinase ou catalase em dopaquinona, que é convertida em diidroxiindol para polimerização em melanina (WHEELER; BELL, 1988).

Há discordância entre autores quanto à produção de melanina pelos fungos. Enquanto muitos autores descrevem a produção de melanina por várias espécies de fungos entomopatogênicos, Chen e colaboradores (2015), por exemplo, estudaram dois genes Pks (que estão envolvidos na biossíntese de vários policetídeos, incluindo pigmentos e micotoxinas) de uma cepa de *M. robertsii* e relataram que ela não produz melanina. Segundo o autor, o fenótipo encontrado no mutante desse gene é marrom avermelhado, sugerindo a existência de enzimas adicionais envolvidas na biossíntese de pigmentos em *M. robertsii*. De acordo com Chen e colaboradores (2015) o pigmento encontrado nesta cepa não contribui pra sua resistência à radiação ultravioleta.

Por outro lado, Gao e colaboradores (2019) estudaram o gene da divisão celular (Cdc14) em *M. acridum* e verificaram que a cor da suspensão fúngica em mutantes desse gene (Δ MaCdc14) era mais escura que a cor da suspensão fúngica dos grupos sem deleção desse gene. Os autores relataram que a quantidade de melanina nos mutantes foi quase o dobro da encontrada em conídios em inativação do gene. Os níveis de transcrição de genes relacionados a DHN-melanina e DOPA-melanina foram avaliados e os resultados mostraram que alguns desses genes foram regulados positivamente em Δ MaCdc14, sugerindo que eles estão regulando a produção de melanina em *M. acridum* (GAO et al., 2019).

Uma importante evidência da pigmentação dos conídios para a tolerância à radiação ultravioleta foi descrita por Braga e colaboradores (2006) e Rangel e colaboradores (2006a). Os dois autores usaram a cepa selvagem de *M. anisopliae* ARSEF 23 e seu mutante colorido. Todos os mutantes coloridos foram menos tolerantes do que a cepa do tipo selvagem. Braga e colaboradores (2006) relataram que os mutantes albinos eram os menos tolerantes de todos os mutantes. Essa diferença de tolerância pode indicar algum bloqueio nas vias de síntese de melanina.

Nascimento e colaboradores (2010) também estudaram os efeitos da radiação ultravioleta na linhagem selvagem de ARSEF 23 e seus mutantes albinos e descobriram que as frequências de CPD no DNA do mutante albino eram 10 vezes maiores do que

nos conídios verdes do tipo selvagem, sugerindo que a pigmentação protege o DNA dos conídios dos danos causados pela radiação ultravioleta.

2.4.3.4. Substratos para cultivo de fungos e adjuvantes

Alguns mecanismos podem estar envolvidos na tolerância de *Metarhizium* spp. à radiação ultravioleta, incluindo a composição do substrato utilizado durante o crescimento fúngico. Conídios de *M. robertsii* ARSEF 23 e ARSEF 2575 apresentam maior culturabilidade relativa quando cultivados em meio rico de BDA mais extrato de levedura (BDAL), quando comparados a conídios crescidos em insetos como *Zhophobas morio* e *Galleria mellonella* (RANGEL et al., 2004). O isolado de *M. acridum* ARSEF 324 produzido em meio BDAL obteve a mesma tolerância à radiação ultravioleta que os conídios crescidos em cadáveres de *Melanoplus sanguinepes*, demonstrando maior estabilidade, pois seu habitat natural possui clima rigoroso e alguns de seus hospedeiros podem desenvolver febre comportamental, que aumenta a temperatura interna do corpo (THOMAS; JENKINS, 1997; RANGEL et al., 2005). O isolado ARSEF 2575, quando produzido sob estresse nutricional, apresenta tolerância à radiação ultravioleta pelo menos duas vezes maior que os conídios produzidos em meio BDAL, além de produzir maiores quantidades de trealose e manitol, dois carboidratos que protegem o fungo contra estresses (RANGEL et al., 2006; RANGEL et al., 2008).

Outro estudo foi realizado para verificar os efeitos da suplementação nutricional com riboflavina (Rb) durante a produção de duas espécies, *M. acridum* ARSEF 324 e *M. robertsii* ARSEF 2575 na tolerância dos conídios à radiação UV-B e na expressão de enzimas na fotorreativação por conídios (PEREIRA-JUNIOR et al., 2018). A expressão de enzimas fotorreativadoras também foi aumentada em ambas as espécies de *Metarhizium* spp., em conídios cultivados em BDA + Rb. Este estudo comprovou que a riboflavina é responsável pelo aumento da tolerância dos conídios à radiação UV-B, bem como pelo aumento da expressão dos genes fotorreativadores de fotoliase, lacase e policetídeo sintase (Phr, Lac e Pks, respectivamente). Em concordância com este estudo, Huarte-Bonnet e colaboradores (2020) avaliaram o efeito da riboflavina em meio de cultura de conídios de *M. acridum* e *M. robertsii* na tolerância à UV-A. A germinação de conídios produzidos em meio BDA suplementado com riboflavina e expostos à radiação solar UV-A e à radiação visível foi significativamente maior para ambos os isolados. Quando estes foram cultivados em meio suplementado com riboflavina, induziram diferentes padrões de genes envolvidos no reparo e fotoproteção do DNA, incluindo fotoliasas, lacases e policetídeos sintase.

Estudos também foram realizados para verificar se protetores solares adicionados à suspensão fúngica seriam capazes de proteger esses fungos contra a radiação ultravioleta. Hedimbi e colaboradores (2008) estudaram a influência de dois protetores solares comerciais, além do azeite de oliva, na capacidade dos conídios de germinar e formar colônias. Em relação à adição de azeite, os conídios germinaram mais quando formulados em óleo. Quando protetores solares foram adicionados, a taxa de germinação aumentou ainda mais. A formulação contendo conídios, azeite de oliva e protetores solares foi mais eficaz na proteção desses propágulos. A adição de protetores, tanto azeite de oliva quanto protetores solares comerciais, aumentou a capacidade dos conídios de germinar e formar colônias, provando que a eficácia de uma formulação aumenta com a incorporação de um protetor solar. Outro estudo relacionado a esse assunto foi o de Loong e colaboradores (2013) que formularam conídios em pó

molhável usando fibra de trigo como agente umectante, enquanto goma arábica e caulim foram usados como dispersante e diluente, respectivamente. Em relação à exposição à radiação UV-B, a germinação dos conídios não foi afetada em 1 hora e mesmo após 12 horas de exposição, a taxa de germinação dos conídios formulados foi superior a 80%. Este mesmo resultado pôde ser observado quando os conídios foram expostos à luz solar (LOONG et al., 2013).

Um estudo recente mostrou a diferença na tolerância à radiação UV-B de dez isolados de *Metarhizium* spp. quando suspensos em água ou formulados em óleo mineral à 10%, e os efeitos da radiação UV-B no cultivo de conídios misturados em três diferentes tipos de solo (CORVAL et al., 2021). Os conídios de vários isolados apresentaram a mesma tolerância, tanto em suspensões aquosas quanto em emulsões oleosas. O que foi observado neste trabalho é que nem sempre as formulações oleosas protegeram os conídios de *Metarhizium* spp. contra os raios UV-B. Também neste estudo, três tipos de solo (solo de plantio comercial, argiloso nativo e arenoso nativo) foram misturados com os conídios e essas misturas de solo-fungo foram expostas à radiação UV-B para verificar se o solo forneceu ou não algum tipo de proteção a este propágulo fúngico. Em geral, amostras dos solos expostos à UV-B apresentaram números semelhantes de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) quando comparados às amostras de solos não expostos, sugerindo que os solos testados forneceram proteção física para *Metarhizium* spp. analisados (CORVAL et al., 2021).

3 REFERÊNCIAS

- AHMAD, I., JIMÉNEZ-GASCO, M.M., LUTHE, D.S., SHAKEEL, S.N., BARBERCHECK, M.E. Endophytic *Metarhizium robertsii* promotes maize growth, suppresses insect growth, and alters plant defense gene expression. **Biol. Control**, 144, 104167, 2020.
- 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 Pathog.**, 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. **J. Med. Entomol.**, v. 54, n. 3, 2017.
- 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 Prot.**, v. 17, p. 675-679, 1998.
- ANGELO, I.C.; FERNANDES, E.K.K.; BAHIENSE, 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*. **Vet. Parasitol.**, v. 172, p. 317-322, 2010.
- BAHIENSE, 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. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, n.16, p.243-245, 2007.
- BANAS, A.K., ZGLOBICKI, P., KOWALSKA, E., BAZANT, A., DZIGA, D., STRZALKA, W. All you need is light: photorepair of UV-induced pyrimidine dimmers. **Genes**, 11, 1304, 2020.
- 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 Tick-borne Dis.** 2018, <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.001>.
- BERNARDO, C.C.; PEREIRA-JUNIOR, R.A.; LUZ, C.; MASCARIN, G.N.; FERNANDES, E.K.K. Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. **Fungal Biol.**, v. 124, p. 714-722, 2020.
- BITTENCOURT, R.O.B.; MALLET, J.R.S.; MESQUITA, E.; GOLO, P.S.; FIOROTTI, J.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; PONTES, E.G.; ANGELO, I.C. Larvicidal activity, route of interaction and ultrastructural changes in *Aedes aegypti* exposed to entomopathogenic fungi. **Acta Trop.**, v. 213, 2021.

BRAGA, G.U.L.; FLINT, S.D.; MESSIAS, C.L.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Effects of UVB Irradiance on Conidia and Germinants of the Entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A Study of Reciprocity and Recovery. **Photochem. Photobiol.**, v. 73, p. 140-146, 2001a.

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*. **Mycol. Res.**, v. 105, n. 7, p. 874 – 882, 2001b.

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*. **Photochem. Photobiol.**, v. 74, n. 5, p. 734-739, 2001c.

BRAGA, G.U.L.; RANGEL, D.E.N.; FLINT, S.D.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Conidial Pigmentation Is Important to Tolerance Against Solar-simulated Radiation in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochem. Photobiol.**, v. 82, p. 418-422, 2006.

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**, 61, 405-425, 2015.

BRANCINI, G.T.P., RANGEL, D.E.N. AND BRAGA, G.U.L. Exposure of *Metarhizium acridum* mycelium to light induces tolerance to UV-B radiation. **FEMS Microbiol Lett**, v. 363, doi:10.1093/femsle/fnw036, 2016.

BRANCINI, G.T.P.; FERREIRA, M.E.S.; RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L. Combining Transcriptomics and Proteomics Reveals Potential Post-transcriptional Control of Gene Expression After Light Exposure in *Metarhizium acridum*. **G3: Genes, Genomes, Genet.** , v. 9, p. 2951-2961, 2019.

BRANCINI, G.T.P., BACHMANN, L., BRAGA, G.U.L. Timing and duration of light exposure during conidia development determine tolerance to ultraviolet radiation. **FEMS Microbiol Lett**, 368, 2021.

BRANCINI, G.T.P., HALLSWORTH, J.E., CORROCHANO, L.M., BRAGA, G.U.L. Photobiology of the keystone genus *Metarhizium*. **J Photochem Photobiol B.**, 226, 2022.

BRITT, A.B. Repair of DNA Damage Induced by Ultraviolet Radiation. **Plant. Physiol.** v. 108, p. 891-896, 1995.

CADET, J., MOURET, S., RAVANAT, J., DOUKI, T. Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactions. **Photochem Photobiol.**, 88, 1048-1065, 2012.

- CADET, J., DOUKI, T., RAVANAT, J. Oxidatively Generated Damage to Cellular DNA by UVB and UVA Radiation. **Photochem Photobiol.**, 91, 140-155, 2015.
- CALDWELL, M.M., FLINT, S.D. Uses of biological spectral weighting functions and the need of scaling for the ozone reduction problem. **Plant Ecology.**, 128, 66-76, 1997.
- 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. **Vet. Parasitol.**, v.223, p. 38-42, 2016.
- CHELICO, L., KHACHATOURIANS, G.G. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **J Invert Pathol.**, 98, 93-100, 2008.
- CHEN, Y.; FENG, P.; SHANG, Y.; XU, Y.; WANG, C. Biosynthesis of non-melanin pigment by a divergent polyketide synthase in *Metarhizium robertsii*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 81, p. 142-149, 2015.
- COLEY-SMITH, J.R.; COOKE, R.C. Survival and germination of fungal sclerotia. In: HORSFALL, J.G, BAKER, K.F, ZENTMYER, G.A (eds), **Annu. Rev. Phytopathol.** Annual Reviews Inc., Palo Alto, CA, USA, p. 65-92, 1971.
- CORROCHANO, L.M. AND GALLAND, P. Photomorphogenesis and gravitropism in fungi. In: Kües, U, Fischer, R (eds), *The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality*. **Springer-Verlag**, Berlin, 233-259, 2006.
- CORROCHANO, L.M. Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. **Photochem. Photobiol. Sci.**, 6, 725-736, 2007.
- CORVAL, A.R.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T.A.; SILVA, C.S.R.; BITENCOURT, R.O.B.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W.; GOLO, P.S. UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi. **J. Basic Microbiol.**, v.61, p. 15-26, 2021.
- COUCEIRO, J.C.; FATORETTO, M.B.; DEMÉTRIO, C.G.B.; MEYLING, N.V.; JUNIOR, I.D. UV-B Radiation Tolerance and Temperature-Dependent Activity Within the Entomopathogenic Fungal Genus *Metarhizium* in Brazil. **Front. Fungal Biol.**, v. 2, 2021.
- DIAS, L.P.; ARAÚJO, C.A.S.; PUPIN, B.; FERREIRA, P.C.; BRAGA, G.U.L.; RANGEL, D.E.N. The Xenon Test Chamber Q-Sun® for testing realistic tolerances of fungi exposed to simulated full spectrum solar radiation. **Fungal Biol.**, v. 122, p. 592-601, 2018.
- DIAS, L.P.; PEDRINI, N.; BRAGA, G.U.L.; FERREIRA, P.C.; PUPIN, B.; ARAÚJO, C.A.S.; CORROCHANO, L.M.; RANGEL, D.E.N. Outcome of blue, Green, red, and White light on *Metarhizium robertsii* during mycelia growth on conidial stress tolerance and gene expression. **Fungal Biol.**, v. 124, p. 263-272, 2019.

DOUKI, T., REYNAUD-ANGELIN, A., CADET, J., SAGE, E. Bipyrimidine Photoproducts Rather than Oxidative Lesions Are the Main Type of DNA Damage Involved in the Genotoxic Effect of Solar UVA Radiation. **Biochem.** 42, 9221-9226, 2003.

FALVO, M.L.; PEREIRA-JUNIOR, R.A.; RODRIGUES, J.; LÓPEZ LASTRA, C.C.; GARCÍA, J.J.; FERNANDES, E.K.K.; LUZ, C. UV-B radiation reduces in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* s.l. but does not affect virulence in fungus-treated *Aedes aegypti* adults and development on dead mosquitoes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 121, p. 170-1717, 2016.

FANG, W.; ST. LEGER, R.J. Enhanced UV Resistance and Improved Killing of Malaria Mosquitoes by Photolyase Transgenic Entomopathogenic Fungi. **PLoS One**, v. 7, 2012.

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.

FUENTES-LEÓN, F., PERES DE OLIVEIRA, A., QUINTERO-RUIZ, N., MUNFORD, V., SATORU KAJITANI, G., COIMBRA BRUM, A., SCHUCH, A.P., COLEPICOLO, P., SÁNCHEZ-LAMAR, A., MENCK, C.F.M. DNA damage induced by late spring sunlight in Antarctica. **Photobiol.**, 96, 1215-1220, 2020.

FULLER, K.K.; RINGELBERG, C.S.; LOROS, J.J.; DUNLAP, J.C., HEITMAN, J. The Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Regulates Growth, Metabolism, and Stress Resistance in Response to Light. **mBio**, 4, doi: 10.1128/mBio.00142-13, 2013

FULLER, K.K., DUNLAP, J.C., LOROS, J.J. Fungal Light Sensing at the Bench and Beyond. **Advances in Genetics**, 96, <https://dx.doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.08.002>, 2015.

FULLER, K.K.; DUNLAP, J.C.; LOROS, J.J. Fungal Light Sensing at the Bench and Beyond. In: *Advances in Genetics*, v. 98, 2016.

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.

GAO, P., JIN, K., XIA, Y. The phosphatase gene *MaCdc14* negatively regulates UV-B tolerance by mediating the transcription of melanin synthesis-related genes and contributes to conidiation in *Metarhizium acridum*. **Curr. Genet.**, v. 66, p. 141-153, 2019.

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. **Vet. Parasitol.**, n.181, p. 267-273, 2011.

GARCIA, M.V., RODRIGUES, V.da S., KOLLER, W.W., ANDREOTTI, R. Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: ANDREOTTI, R., GARCIA, M.V., KOLLER, W.W. (Ed.). Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. **Embrapa**, Brasília, DF, p. 16-25, 2019.

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

GRIZANOVA, E.V.; COATES, C.J.; DUBOVSKIY, I.M.; BUTT, T.M. *Metarhizium brunneum* infection dynamics differ at the cuticle interface of susceptible and tolerant morphs of *Galleria mellonella*. **Virulence**, v.10, p. 999-1012, 2019.

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.

HEDIMBI, M., KAAYA, G.P., CHIMWAMUROMBE, P.M., GINDIN, G., GLAZER, I., SAMISH, M. Protection of *Metarhizium anisopliae* conidia from ultra-violet radiation and their pathogenicity to *Rhipicephalus evertsi evertsi* ticks. **Exp Appl Acarol**, v. 46, p. 149-156, 2008.

HUARTE-BONNET, C., PEREIRA-JUNIOR, R.A., PAIXÃO, F.R., BRAGA, G.U.L., ROBERTS, D.W., LUZ, C., PEDRINI, N. AND FERNANDES, E.K.K. *Metarhizium robertsii* and *M. acridum* conidia produced on riboflavin-supplemented medium have increased UV-A tolerance and upregulated photoprotection and photoreactivation genes. **BioControl**, v. 65, p. 211-222, 2020.

IWANICK, N.S.; MASCARIN, G.M.; MORENO, S.G.; EILENBERG, J.; JÚNIOR, I.D. Growth kinetic and nitrogen source optimization for liquid culture fermentation of *Metarhizium robertsii* blastospores and bioefficacy against the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, 2020.

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.

JENKINS, G.I. Photomorphogenic Responses to Ultraviolet-B light. **Plant Cell Environ.**, v. 40, p. 2544-2557, 2017.

KARENTZ, D. Beyond Xeroderma Pigmentosum: DNA Damage and Repair in an Ecological Context. **Photochem Photobiol.** 91, 460-474, 2015.

LEEMON, D.M.; JONSSON, N.N. Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticida for the cattle tick *Boophilus microplus*. **J. Invertebr. Pathol.**, n.97, p.40-49, 2008.

- LEEMON, D.M.; TURNER, L.B.; JONSSON, N.N. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Vet. Parasitol.**, v.156, p.248-260, 2008.
- LI, J.; GUO, M.; CAO, Y.; XIA, Y. Disruption of a C69-Family Cysteine Dipeptidase Gene Enhances Heat Shock and UV-B Tolerances in *Metarhizium acridum*. **Front. Microbiol.**, v. 11, 2020.
- LITWIN, A., NOWAK, M., RÓZALAKA, S. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. **Rev Environ Sci Biotechnol.**, 19, 23-42, 2020.
- LOONG, C.Y., SAJAP, A.S., NOOR, H.M., OMAR, D., ABOOD, F. Effects of UV-B and Solar Radiation on the Efficacy of *Isaria fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) for Controlling Bagworm, *Pteroma pendula* (Lepidoptera: Psychidae). **J. Entomol.**, v. 10, p. 53-65, 2013.
- 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 J. Microbiol. Biotechnol.**, 2014.
- MASCARIN, G.M., LOPES, R.B., JUNIOR, I.D., FERNANDES, E.K.K., LUZ, C., FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **J Invertebrat Pathol**, v. 165, p. 46-53, 2019.
- MORLEY-DAVIES, J.; MOORE, D.; PRIOR, C. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. **Mycol. Res.**, v. 1, p. 31-38, 1995.
- MOURET, S., BAUDOUIN, C., CHARVERON, M. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 103, 13765-13770, 2010.
- 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*. **Photochem. Photobiol.**, v. 86, p. 1259-1266, 2010.
- NISHIMURA, K., IKEHATA, H., DOUKI, T., CADET, J., SUGIURA, S., MORI, T. Seasonal differences in the UVA/UVB ratio of natural sunlight influence the efficiency of the photoisomerization of (6-4) photoproducts into their Dewar valence isomers. **Photochem. Photobiol.**, 97, 582-588, 2021.
- PAIXÃO, F.R.S.; HUARTE-BONNET, C.; RIBEIRO-SILVA, C.S.; MASCARIN, G.M.; FERNANDES, E.K.K.; PEDRINI, N. Tolerance to Abiotic Factors of Microsclerotia and Mycelial Pellets From *Metarhizium robertsii*, and Molecular and Ultrastructural Changes During Microsclerotial Differentiation. **Front. Fungal Biol.**, v. 2, 2021.

PENG, H., GUO, C., TONG, S., YING, S AND FENG, M. Two white collar proteins protect fungal cells from solar UV damage by their interactions with two photolyases in *Metarhizium robertsii*. **Environ. Microbiol.**, v. 23, p. 4925-4938, 2021.

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. **J. Appl. Microbiol.**, 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. **Exp. Parasitol.** v.130, p. 257-260, 2011.

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. **J. Invertebr. Pathol.**,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. **J. Invertebr. Pathol.**, 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... **J. Invertebr. Pathol.**, v. 93, p. 170-182, 2006a.

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

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 na immunoproteomic approach. **Exp. Parasitol.**, v. 170, p. 227-235, 2016.

SANCAR, A. Structure and function of DNA photolyase. **Biochemistry**, 33, 2-9, 1994.

SANTOS, T.R.; PAIXÃO, F.R.S.; CATÃO, A.M.L.; MUNIZ, E.R.; RIBEIRO-SILVA, C.S.; TAVEIRA, S.F.; LUZ, C.; MASCARIN, G.M.; FERNANDES, E.K.K.; MARRETO, R.N. Inorganic pellets containing microsclerotia of *Metarhizium anisopliae*: a new technological platform for the biological control of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 105, p. 5001-5012, 2021.

- SCHUCH, A.P., GAHARDO, R.S., LIMA-BESSA, K.M., SCHUCH, N.J., MENCK, C.F.M. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. **Photochem Photobiol. Sci.**, 8, 111-120, 2009.
- SCHUCH, A.P., MENCK, C.F.M. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. **J Photochem Photobiol B.**, 99, 111-116, 2010.
- SCHUCH, A.P., GARCIA, C.C.M., MAKITA, K., MENCK, C.F.M. DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. **Photochem. Photobiol.**, 12, 1259-1272, 2013.
- SHIN, T.Y.; BAE, S.M.; KIM, D.J.; YUN, H.G.; WOO, S.D. Evaluation of virulence, tolerance to environmental factors and antimicrobial activities of entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. **Mycoscience**, v. 58, p. 204-212, 2017.
- SINHA, R.P.; HÄDER, D. UV-induced DNA damage and repair: a review. **Photochem. Photobiol.**, v. 1, p. 225-236, 2002.
- SLINEY, D.H. Radiometric Quantities and Units Used in Photobiology and Photochemistry: Recommendations of the Commission Internationale de l'Eclairage (International Commission of Illumination). **Photochem Photobiol.**, 83, 425-432, 2007.
- STONE, L.B.L.; BIDOCHKA, M.J. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 104, 9935-9945, 2020.
- SU, X., YAN, X., CHEN, X., GUO, M., XIA, Y. AND CAO, Y. Calcofluor white hypersensitive proteins contribute to stress tolerance and pathogenicity in entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. **Pest. Manage. Sci.**, v. 77, p. 1915-1924, 2020.
- SUTANTO, K.D., HUSAIN, M., RASOOL, K.G., MALIK, A.F., AL-QAHTANI, W.H., ALDAWOOD, A.S. Persistency of Indigenous and Exotic Entomopathogenic Fungi Isolates under Ultraviolet B (UV-B) Irradiation to Enhance Field Application Efficacy and Obtain Sustainable Control of the Red Palm Weevil. **Insects**, 13, 103, 2022.
- THOMAS, M.B., JENKINS, N.E. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. **Mycol Res.**, 101, 1469-1474, 1997.
- 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 Biochem. Mol. Biol.**, v. 71, p. 12-28, 2016.
- TONG, Y.; WU, H.; LIU, Z.; WANG, Z.; HUANG, B. G-Protein Subunit $G\alpha_i$ in Mitochondria, MrGPA1, Affects Conidiation, Stress Resistance, and Virulence of Entomopathogenic Fungus *Metarhizium robertsii*. **Front. Microbiol.**, v. 16, 2020.

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.

WHEELER, M.H., BELL, A.A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: McGinnis, M.R. (Ed.) Current topics in medical mycology, Springer Verlag, New York, NY, pp. 338-387, 1988.

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.; PAUL, N.D.; BORNMAN, J.F. Solar ultraviolet radiation in a changing climate. **Nat. Clim. Change**, 2014.

YOUSEF-YOUSEF, M.; ROMERO-CONDE, A.; QUESADA-MORAGA, E.; GARRIDO-JURADO, I. Production of Microsclerotia by *Metarhizium* sp., and Factor Affecting Their Survival, Germination, and Conidial Yield. **J. Fungi**, v. 8, 2022.

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

CAPÍTULO I

**CARACTERIZAÇÃO DO ISOLADO LCM S10 DE *Metarhizium* sp.,
AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO RELATIVA E VIABILIDADE DE
DIFERENTES PROPÁGULOS E VIRULÊNCIA PARA FÊMEAS
INGURGITADAS DE *Rhipicephalus microplus***

RESUMO

Metarhizium spp. é um dos fungos mais utilizados no controle biológico de artrópodes. A sua ação nos hospedeiros depende de vários fatores, dentre eles a tolerância a estresses ambientais como a radiação ultravioleta. Neste aspecto, o presente trabalho objetivou caracterizar molecularmente um isolado nativo de *Metarhizium* sp., além de verificar a tolerância à UV-B de conídios, blastosporos e microescleródios do mesmo isolado. Por fim, o presente estudo objetivou também avaliar o efeito da luz UV-B na virulência de blastosporos para fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. A caracterização molecular do isolado de *Metarhizium* sp. foi realizada a partir do sequenciamento dos genes EF-1 α e RPB1. O isolado analisado possui similaridades com *M. pingshaense*, de acordo com as análises filogenéticas. Os propágulos (conídios, blastosporos e microescleródios) do isolado LCM S10 de *M. pingshaense* foram expostos à radiação UV-B por aproximadamente 1 hora, recebendo uma fluência total de 4,0 kJ/m². Todos os propágulos demonstraram alta tolerância à radiação UV-B. Para verificar a virulência de blastosporos do isolado LCM S10 de *M. pingshaense* contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, as fêmeas foram tratadas com uma suspensão na concentração de 1×10^8 blastosporos/mL⁻¹ e logo após foram expostas à radiação UV-B. Elas receberam uma fluência diária de 4,0 kJ/m² e foram expostas por três dias consecutivos, aproximadamente por 1 hora a cada dia. A análise dos parâmetros biológicos mostrou que não houve diferença estatística entre o controle e o grupo tratado. Em relação à mortalidade das fêmeas, houve diferença estatística e as fêmeas tratadas com blastosporos e expostas à radiação sobreviveram, em média, 18,5 dias, enquanto as fêmeas tratadas com blastosporos e não expostas à radiação sobreviveram, em média 12 dias. As fêmeas do grupo controle sobreviveram 23 dias, em média. Os dados de tolerância e virulência de um isolado nativo revelam informações importantes e nos permitem identificar isolados promissores para o controle biológico.

Palavras-chave: fungos entomopatogênicos; controle biológico; radiação ultravioleta

ABSTRACT

Metarhizium spp. is one of the most used fungi in the biological control of arthropods. Its action on hosts depends on several factors, including tolerance, environmental stress such as ultraviolet radiation. In this aspect, this study aimed to molecularly characterize a native isolate of *Metarhizium* sp., in addition to verifying the UV-B tolerance of conidia, blastospores and microsclerotia from *the same isolate*. Finally, this study also aimed to evaluate the effect of UV-B light on blastospore virulence for engorged females of *Rhipicephalus microplus*. The molecular characterization of *Metarhizium* sp. was performed from the sequencing of EF-1 α and RPB1 genes. The analyzed isolate has similarities with *M. pingshaense*, according to phylogenetic analyses. The propagules (conidia, blastospores and microsclerotia) of *M. pingshaense* LCM S10 isolate were exposed to UV-B radiation for approximately 1 hour, receiving a total fluency of 4.0 kJ/m². All propagules demonstrated high tolerance to UV-B radiation. To verify the virulence of blastospores of *M. pingshaense* LCM S10 isolate against engorged females of *R. microplus*, the females were treated with a suspension at a concentration of 1 \times 10⁸ blastospores/mL⁻¹ and then exposed to UV-B radiation. They received a daily fluency of 4.0 kJ/m² and were exposed for three consecutive days, approximately for 1 hour each day. The analysis of the biological parameters showed that there was no statistical difference between the control and the treated group. Regarding female survival, there was a statistical difference and females treated with blastospores and exposed to radiation survived, on average, 18.5 days, while females treated with blastospores and not exposed to radiation survived, on average, 12 days. Females in the control group survived 23 days on average. The tolerance and virulence data of a native isolate reveal important information and allow us to identify promising isolates for biological control.

Key words: entomopathogenic fungi; biological control; ultraviolet radiation

1 INTRODUÇÃO

Fungos entomopatogênicos do complexo *M. 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 possuem *Metarhizium* spp. em sua composição têm sido utilizados em todo o mundo (ZIMMERMANN, 2007). O gênero *Metarhizium* é frequentemente isolado do solo, e as espécies do complexo *M. anisopliae* estão presentes em todos os continentes, com exceção da Antártica.

O número de produtos à base de fungos entomopatogênicos destinado ao controle biológico tem aumentado em todo o mundo. Porém, no mercado brasileiro, são poucos os isolados disponíveis. Os micoinseticidas e micoacaricidas à base de fungos compreendem quase 50% dos produtos microbianos registrados no país e o fungo *M. anisopliae* s.str. representa o maior programa de controle microbiano usando um micoinseticida em todo o mundo (MASCARIN et al., 2019). Vários isolados de *Metarhizium* spp. já demonstraram que possuem alta virulência contra carrapatos em testes *in vitro* (BITTENCOURT et al., 1994; BAHIENSE et al., 2007; CAMARGO et al., 2016; MARCIANO et al., 2020). Isto reforça a importância da identificação de novos isolados potencialmente virulentos.

O sucesso do controle biológico de pragas depende de vários fatores, dentre eles o mecanismo pelo qual o fungo entomopatogênico se comporta frente a estresses variados. Um desses estresses ambientais é a incidência de raios UV na superfície terrestre, impactando a sobrevivência destes microrganismos no solo (RANGEL et al., 2006; JENKINS, 2009; NASCIMENTO et al., 2010). O espectro UV é dividido em três regiões diferentes: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) e UV-C (100-280 nm) (SLINEY, 2007). Destes três comprimentos de onda, somente UV-A e UV-B chegam à superfície terrestre e a fração UV-B é a mais danosa para os organismos, mesmo sendo menos que 1% da radiação que chega até nós (WILLIAMSON et al., 2014; JENKINS, 2017). A radiação ultravioleta pode causar danos irreversíveis aos fungos entomopatogênicos, induzindo a dimerização entre bases pirimídicas adjacentes (CHELICO; KHACHATOURIANS, 2008; CADET et al., 2012) e vias de danos oxidativos (CADET et al., 2015). Além de inativar os conídios e outros propágulos usados como inóculo em programas de controle biológico, as exposições subletais à radiação UV reduzem a velocidade de germinação dos conídios e a virulência, reduzindo a eficácia dos fungos como bioinseticida (BRAGA et al., 2001a,b,c; BRAGA et al., 2015; BRANCINI et al., 2022; SUTANTO et al., 2022).

Por isso, o presente trabalho objetivou caracterizar um novo isolado nativo de *Metarhizium* sp., além de verificar a tolerância à UV-B de conídios, blastosporos e microescleródios deste isolado. Por fim, o efeito da UV-B na virulência de blastosporos para fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foi avaliado.

foram executadas em termociclador de modelo Eppendorf Mastercycler® pro S, com volume final de 25 µL. As reações do gene EF1- α continham: 2,5µL de tampão 10×, MgCl₂ (1,5mM), dNTP (0,4mM), 0,4 µM cada *primer*, 2 U de Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 15ng de DNA e água ultrapura (Invitrogen) para completar o volume final da reação. As reações do gene RPB1 continham: 2,5µL de tampão 10×, MgCl₂ (2,5mM), dNTP (0,4mM), 0,5 µM cada *primer*, 1 U de Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 15ng de DNA e água ultrapura (Invitrogen) para completar o volume final da reação.

Tabela 1: *Primers* utilizados nas reações de amplificação dos genes EF-1 α e RPB1

<i>Genes</i>	<i>Primer</i>	Sequência (5' para 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
EF1- α	EF1T	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	20	Bischoff <i>et al.</i> 2006
	EF2T	GGARGTACCAGTSATCATGTT	21	
RPB1	RPB1F	GARTGYCCDGGDCAYYTY	18	Bischoff <i>et al.</i> 2006
	RPB1R	CCNGCDATNTRTTRTCCA	19	

A reação de PCR para o gene EF1- α foi realizada com uso de *Touchdown* segundo ciclo composto por: desnaturação à 94°C por cinco minutos, seguido de dez ciclos com amplificações em três partes (45s à 94°C para desnaturação, 45s à 66°C para anelamento reduzindo 1°C a cada ciclo e 1:30 min à 72°C para extensão) e 36 ciclos adicionais com a amplificação em três partes com a temperatura de anelamento de 56°C e por fim um ciclo de 72°C por 10 minutos.

A reação de PCR para o gene RPB1 foi realizada com uso de *Touchdown* segundo ciclo composto por: desnaturação à 94°C por três minutos, seguido de dez ciclos com amplificações em três partes (1 min. à 94°C para desnaturação, 1 min. à 60°C para anelamento reduzindo 0,5°C a cada ciclo e 1 min. à 72°C para extensão) e 30 ciclos adicionais com a amplificação em três partes com a temperatura de anelamento de 55°C e por fim um ciclo de 72°C por 1 minuto.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese a 75V por 60 minutos em gel de agarose 1,5% usando tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1× e marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen). Foram utilizados 10µL de produto de PCR com 1,5 µL de tampão de amostra 6×. Os géis foram corados com Brometo de Etídeo, visualizado por luz UV e revelado pelo fotodocumentador L. Pix Touch® (Loccus Biotecnologia).

2.2.3. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos amplificados foram excisados do gel de acordo com o peso molecular das bandas e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), de acordo com informações fornecidas pelo fabricante. Após purificação, as amostras foram quantificadas através de um gel de agarose a 2% usando tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1× e marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). O gel foi submetido à eletroforese a 75 V por 60 minutos, corado com brometo de etídeo, visualizado por luz UV e revelado pelo fotodocumentador L. Pix Touch® (Loccus Biotecnologia).

2.2.4. Sequenciamento dos genes EF-1 α e RPB1

As amostras purificadas foram enviadas ao setor de sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, de acordo com as recomendações disponibilizadas no endereço eletrônico <http://genoma.ib.usp.br/?pageid=979>. Os sequenciamentos foram realizados no aparelho ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies – Applied Biosystems) utilizando BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Os *primers* utilizados foram os mesmos utilizados na reação de PCR. Os cromatogramas foram editados pelo DNA Baser Assembler v5. (DNA Sequence Assembler, Heracle BioSoft). Sequências consenso do gene EF1- α e RPB1 foram selecionadas de diferentes espécies de *Metarhizium* do banco de dados GenBank (2018). Para os genes EF1- α e RPB1 as sequências consenso foram computadas e inspecionadas visualmente utilizando o pacote de software Stande (STADEN et al., 1998). Para a árvore filogenética, as sequências obtidas foram preliminarmente comparadas com sequências similares, depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. Posteriormente, foram alinhadas e editadas no MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016). A árvore filogenética foi gerada no cypres (<http://www.phylo.org/portal2/login!input.action>) seguindo os modelos pra cada marcador: TEF Likelihood do modelo de melhor ajuste selecionado pela AIC no MrModeltest 2.3; RPB2 Likelihood do modelo de melhor ajuste pela AIC no MrModeltest 2.3.

2.3. Exposição à Irradiação UV-B

Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento e a radiação UV foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes TL 20W/12 RS (Filipinas, Eindhoven, Holanda). As placas contendo conídios, blastosporos ou microescleródios foram colocadas na câmara de radiação UV cobertas com uma membrana de diacetato de celulose de 0,13 mm de espessura que bloqueia a radiação com comprimentos de onda inferiores a 290 nm e foram imediatamente expostas à radiação UV-B por aproximadamente uma hora (4,0 kJ m²). 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 (BRAGA et al., 2001) (Figura 2). As placas do grupo controle foram colocadas na câmara de UV e cobertas com folha de papel alumínio para bloquear qualquer radiação ultravioleta, e mantidas a 25 \pm 1°C.

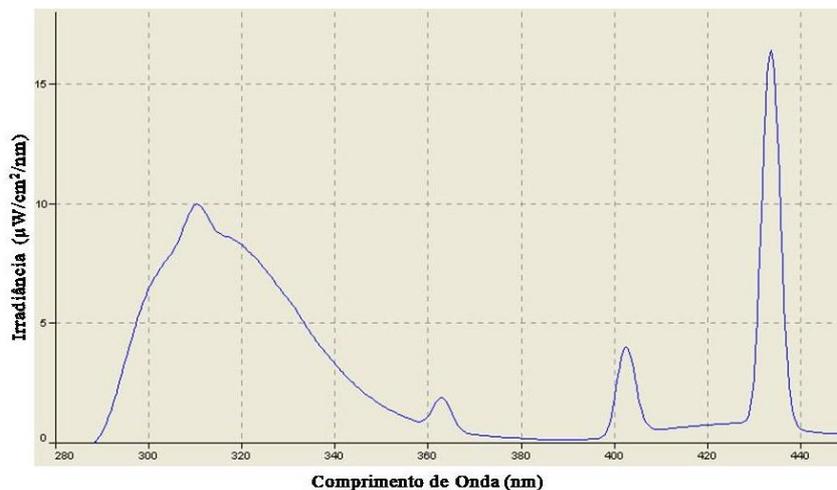


Figura 2: Espectro de irradiância das lâmpadas da câmara de irradiação UV-B filtradas com diacetato de celulose. As lâmpadas forneceram $967,01 \text{ mW m}^{-2}$ de radiação UV-B com base na irradiância ponderada por Quaité (QUAITE et al., 1992).

2.4. Avaliação *in vitro* da Germinação Relativa de Conídios de *Metarhizium* sp. Após Ação da Irradiação UV-B

O isolado foi cultivado em meio batata dextrose Ágar (Kasvi) suplementado com $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura (BDAL) (0,01% [p/v]) em placas de Petri (polipropileno, $90 \times 15 \text{ mm}$, Kasvi) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ por 14 dias, em câmaras climatizadas com sistema de fotoperíodo (12h de luz/12h de escuro). Placas contendo os conídios foram expostas à radiação UV-B, conforme descrito no item 2.3. Os conídios foram raspados das placas de cultivo e a concentração da suspensão foi ajustada para 1×10^5 conídios mL^{-1} , utilizando câmara de Neubauer para a estimativa da concentração. Uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ da suspensão aquosa foi inoculada sobre 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 ($35 \times 10 \text{ mm}$, Kasvi). 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. A germinação relativa dos conídios foi observada após 24h utilizando microscópio óptico com aumento de $400 \times$ após coloração com azul de metil (($\text{GR} = (\text{TC}/\text{CG}) \times 100$, 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).

2.5. Avaliação *in vitro* da Viabilidade de Blastosporos de *Metarhizium* sp. Após Ação da Irradiação UV-B

Para produção de blastosporos, conídios de *Metarhizium* sp. foram cultivados em meio Batata BDAL 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 $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura para cada frasco de tipo Erlenmeyer. Três mililitros da suspensão conidial foram inoculados 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 3410g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 10 mL de água com Tween[®] 80 a 0,01%, seguido de homogeneização em vórtex. Este procedimento foi repetido duas vezes. As suspensões foram colocadas em placas de Petri e expostas à radiação UV segundo o item 2.3. Após irradiação, as suspensões foram ajustadas para a concentração de 1×10^4 blastosporos mL⁻¹. Vinte µL da suspensão foram inoculados em placas de Petri com BDAL e espalhadas com auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 25°C em câmaras climatizadas com sistema de fotoperíodo (12h de luz/12h de escuro). O aparecimento e contagem das colônias fúngicas de *Metarhizium* sp. foram verificados após 72h.

2.6. Avaliação *in vitro* da Viabilidade de Microescleródios de *Metarhizium* sp. Após Ação da Irradiação UV-B

Os microescleródios (ME) foram produzidos segundo Mascarin e colaboradores (2014). Placas contendo os ME foram expostas à radiação UV-B, segundo o item 2.3. Os microescleródios foram retirados das placas e colocados em tubos cônicos de 15 mL, que foram centrifugados a 3410g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em água mais Tween[®] 80 a 0,01%. Este procedimento foi repetido duas vezes. Uma alíquota de 50 µL 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 30 ME por placa contendo meio de cultura batata dextrose ágar, com auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 25°C em câmaras climatizadas com sistema de fotoperíodo (12h de luz/12h de escuro). O aparecimento e contagem das colônias fúngicas de *Metarhizium* sp. foram verificados após 24h. Grânulos de ME foram considerados germinados quando havia o desenvolvimento de hifas ao redor do grânulo de ME.

2.7. Bioensaio Com Fêmeas Ingurgitadas de *R. microplus* Tratadas Com Blastosporos de *Metarhizium* sp.

Os blastosporos foram produzidos segundo o item 2.5. Foram separados 4 grupos: Controle (fêmeas tratadas com água mais Tween[®] 80 a 0,01%), Controle UV (fêmeas tratadas com água mais Tween[®] 80 a 0,01% e expostas à UV-B), S10 CTR (fêmeas tratadas com blastosporos de *Metarhizium* sp., sem exposição à UV-B) e S10 UV (fêmeas tratadas com blastosporos de *Metarhizium* sp. e expostas à UV-B) com 10 fêmeas ingurgitadas em cada. 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 9714220419). 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, sendo distribuídas de forma homogênea entre os grupos. As fêmeas foram coladas pelo dorso com fita adesiva em placas de Petri de vidro do seu grupo respectivo. Cada fêmea foi tratada com 20 µL de uma suspensão na concentração de 1×10^8 blastosporos mL⁻¹. Os grupos controle foram tratados com 20 µL de água acrescida de Tween[®] 80 a 0,01%. Para os grupos que foram expostos à radiação, as placas de Petri contendo as fêmeas já tratadas com blastosporos foram expostas à radiação UV-B, segundo o item 2.3., por três dias consecutivos, durante aproximadamente uma hora por dia, recebendo uma fluência diária de 4,0 kJ m². Após a exposição, as placas com as fêmeas permaneceram em câmara climatizada sob temperatura de 27 ± 1 °C e UR \geq

80%. Para avaliar o efeito das suspensões e comparar a eficácia, foram analisados os seguintes parâmetros biológicos de cada fêmea: 1) Peso Inicial das fêmeas, 2) Peso total da massa de ovos, 3) índice de produção de ovos, 4) índice nutricional, 5) percentual de eclosão das larvas e 6) percentual de controle. Cada fêmea tratada teve sua postura coletada, pesada e armazenada individualmente. Os ovos foram acondicionados em frascos de vidro, vedados com algodão hidrófilo e mantidos em câmara climatizada à temperatura de 27 ± 1 °C e UR $\geq 80\%$, para posterior avaliação do percentual de eclosão das larvas. As fêmeas foram observadas diariamente por um período de 30 dias para verificação da mortalidade. As fêmeas foram submetidas a estímulos nas patas a fim de verificar movimentos das mesmas. A fêmea foi considerada morta quando recebia estímulos e não demonstrava nenhum movimento.

2.8. Avaliação *in vitro* da Viabilidade de Blastosporos Após Três Dias de Irradiação Consecutivos (Fluência Diária De 4,0 kJ m²)

Blastosporos foram produzidos segundo o item 2.5. As suspensões foram ajustadas para a concentração de 1×10^4 mL⁻¹. Para exposição dos blastosporos à irradiação UV-B, 50 µL 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 2.3. A exposição à radiação foi realizada por três dias consecutivos e as placas com blastosporos receberam uma fluência diária de 4,0 kJ m². As placas foram incubadas a 25°C em câmaras climatizadas com sistema de fotoperíodo (12h de luz/12h de escuro). O aparecimento e contagem das colônias fúngicas de *Metarhizium* sp. foram verificados após 48h.

2.9. Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição da normalidade. Para dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Para dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Para análise da mortalidade das fêmeas de *R. microplus* foi utilizado o teste de Logrank. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism, v.7.00, Inc. (GraphPad Software, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Análise Filogenética

O alinhamento das sequências e as subseqüentes análises filogenéticas do isolado LCM S10 foram realizados com diferentes espécies de *Metarhizium* com sequências depositadas no Genbank. As análises revelaram que o isolado LCM S10 se agrupou com espécies de *M. pingshaense* (Figura 3).

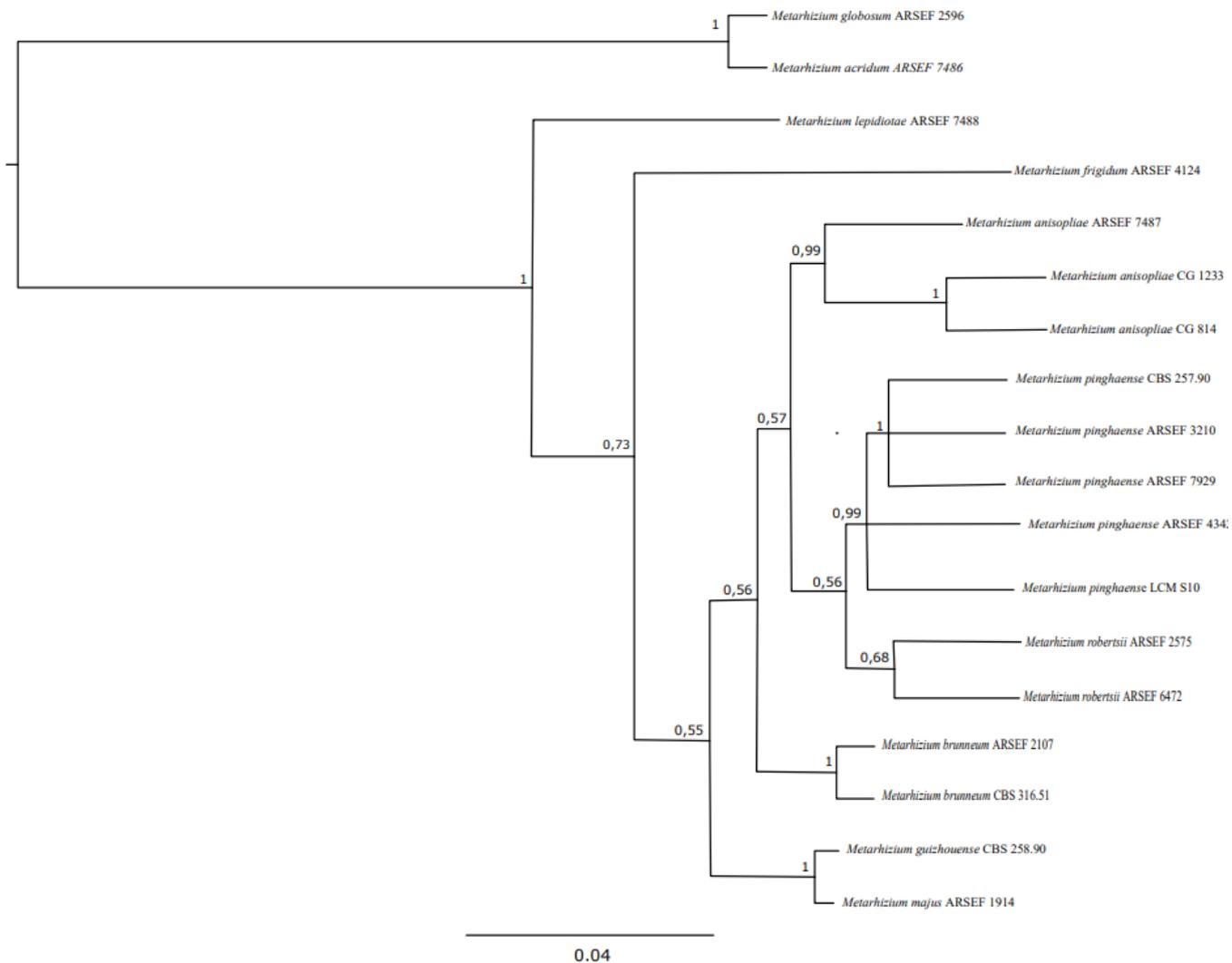


Figura 3: Árvore filogenética construída pelo método Neighbour-joining baseada nas sequências dos genes EF1- α e RPB1 mostrando a posição do isolado LCM S10 de *Metarhizium pingshaense* em relação à outras espécies depositadas no banco de dados do NCBI. Foi utilizado o modelo de substituição Junker Cantor. Os valores de bootstrap foram inferidos a partir de 500 réplicas e são indicados nos nós da árvore quando $\geq 50\%$.

3.2. Efeito da Radiação UV-B Sobre a Germinação Relativa de Conídios e Viabilidade de Blastosporos e Microescleródios de *M. pingshaense*:

Os efeitos da radiação sobre a germinação relativa dos conídios, bem como da viabilidade de blastosporos e microescleródios do isolado LCM S10 de *M. pingshaense* após exposição à UV-B (fluência total de 4,0 kJ/m²) são mostrados abaixo (Figura 4). Os dados foram comparados estatisticamente entre si. Todos os três propágulos mostraram alta tolerância à radiação UV-B, porém, blastosporos e microescleródios foram mais tolerantes que conídios, atingindo 100% de viabilidade relativa.

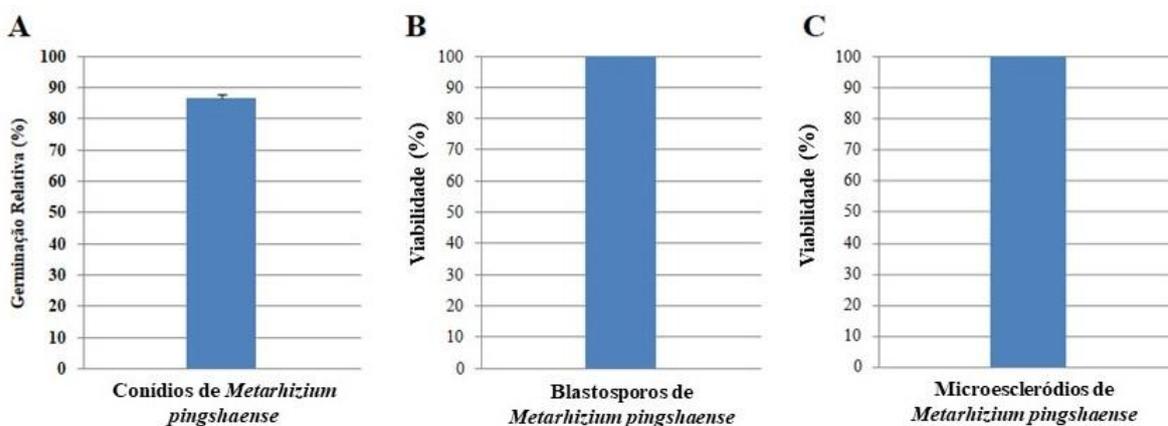


Figura 4: Média e erro padrão da Germinação Relativa de conídios (A), Viabilidade de Blastosporos (B) e Viabilidade de Microescleródios (C) de *Metarhizium pingshaense* após exposição à radiação UV-B (4,0 kJ/m²).

Quando blastosporos foram expostos por três dias consecutivos à UV-B, recebendo uma fluência diária de 4,0 kJ/m², a viabilidade diminuiu cerca de 43% (Figura 5). Foi utilizado o período de três dias de exposição porque este é o tempo médio em que o propágulo leva para penetrar na cutícula do carrapato.

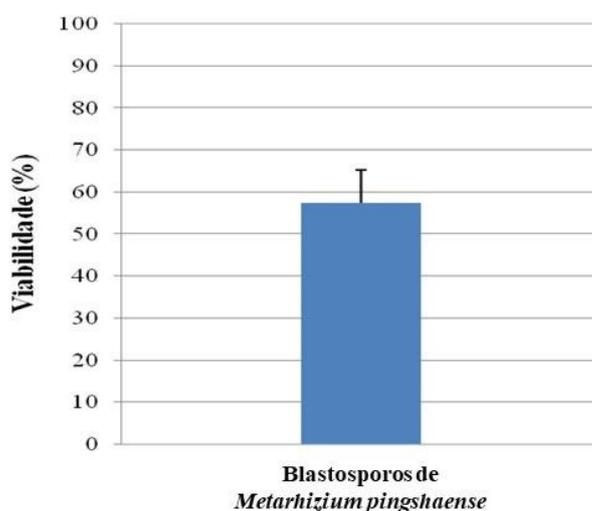


Figura 5: Média e erro padrão de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de blastosporos de *Metarhizium pingshaense* 48h após exposição à UV-B por três dias consecutivos (fluência de 4,0 kJ/m² diária).

3.3. Avaliação Da Mortalidade e Parâmetros Biológicos De Fêmeas De *R. microplus* Tratadas Com Blastosporos de *M. pingshaense* e Expostos à Radiação UV-B Por Três Dias Consecutivos:

Dos quatro grupos avaliados, o grupo LCM S10 não exposto à UV-B (S10 CTR) apresentou redução significativa de todos os parâmetros observados, com relação ao grupo controle (Tabela 2). Este mesmo grupo apresentou o maior percentual de controle, 45%.

Tabela 2: Valor médio e desvio padrão do Peso Inicial das Fêmeas (P.I.F.), Percentual de Eclosão (%), Índice de Produção de Ovos (I.P.O.), Índice Nutricional (I.N.) e Percentual de Controle (% Controle) de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com suspensão de 1×10^8 blastosporos/mL⁻¹ do isolado LCM S10 de *Metarhizium pingshaense*.

Grupo	P.I.F. (g)	P.E.(%)	I.P.O.	I.N.	% Controle
CTR	0,2778 ±0,0067 a	96 a	51,83 ±4,19 a	64 ±5,2 a	
CTR UV	0,2775 ±0,0066 a	95 a	47,73 ±4,29 ab	60,05 ±4,96 ab	
S10 CTR	0,2783 ±0,0064 a	81 b	33,42 ±2,43 b	44,47 ±2,86 b	45,41
S10 UV	0,2771 ±0,0065 a	89 b	48,35 ±3,36 ab	59,84 ±3,35 ab	13,73

CTR (Grupo controle – não tratado e não exposto à UV-B); CTR UV (Grupo controle UV – não tratado e exposto à UV-B); S10 CTR (Grupo tratado com blastosporos de *M. pingshaense* e não exposto à UV-B); S10 UV (Grupo tratado com blastosporos de *M. pingshaense* e exposto à UV-B).

Com relação à mortalidade das fêmeas de *R. microplus*, pode-se verificar uma diferença significativa entre os grupos tratados com o isolado LCM S10 de *M. pingshaense* (exposto ou não exposto à UV-B) em relação ao grupo controle. As fêmeas do grupo tratado com blastosporos fúngicos não expostas à UV-B tiveram uma média de 12 dias de sobrevivência, enquanto as fêmeas tratadas com o mesmo isolado e expostas à UV-B tiveram média de sobrevivência de 18,5 dias. Os grupos controle (exposto e não exposto à UV-B) apresentaram a mesma média de sobrevivência, 23 dias (Figura 6).

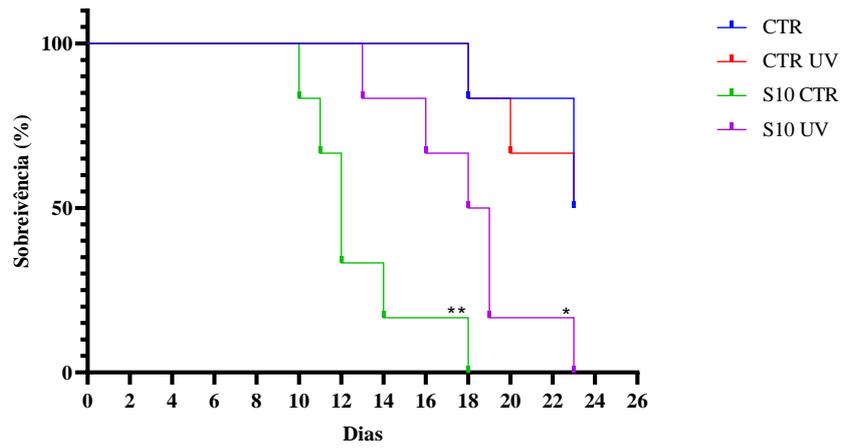


Figura 6: Sobrevivência de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* à infecção fúngica por *M. pingshaense*. Os dados foram analisados pelo teste de Logrank. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os respectivos grupos tratados.

4 DISCUSSÃO

Entre as razões para o uso de fungos entomopatogênicos estão a eficácia em matar seus hospedeiros artrópodes, sua grande biodiversidade e segurança ambiental (STONE, BIDOCHKA, 2020; LITWIN et al. 2020). Na natureza, os fungos entomopatogênicos são encontrados no solo e em cadáveres de insetos e necessitam ser isolados e purificados em meio de cultura. Por isso, a caracterização, identificação e constatação da patogenicidade de um isolado são essenciais para o controle biológico, pois nos fornecem informações importantes a respeito de isolados com potencial para serem empregados como biocontroladores. O isolado utilizado neste estudo foi coletado do solo do Estado do Rio de Janeiro, local com as mesmas condições climáticas onde o restante dos experimentos foi conduzido e identificado como *M. pingshaense*.

Foi observada a tolerância à radiação UV-B de diferentes propágulos de *M. pingshaense*. Conídios, blastosporos e microescleródios foram expostos a uma fluência de 4,0 kJ/m² e todos os propágulos mostraram-se muito tolerantes à radiação UV-B. Blastosporos e microescleródios apresentaram 100% de viabilidade, enquanto conídios apresentaram 86% de germinação relativa. Estes resultados diferem do que foi descrito por Corval e colaboradores (2021), onde o mesmo isolado foi testado, sob as mesmas condições, diferenciando apenas pela maneira como blastosporos e microescleródios foram expostos. No estudo de Corval e colaboradores (2021), estes propágulos foram espalhados com alça de Drigalski na placa de Petri antes de receberem a radiação. No presente estudo, todo o “caldo” contendo tanto blastosporos quanto microescleródios foi colocado na placa de Petri e exposto. Só depois da irradiação eles foram espalhados com alça de Drigalski em meio de cultura. Microescleródios também alcançaram 100% de viabilidade, porém a germinação relativa de conídios foi de 60% e a viabilidade de blastosporos foi bem menor, aproximadamente 30%. Sugere-se, portanto, que o modo como as placas são expostas não garante a uniformidade de recebimento da irradiação UV pelos propágulos.

No presente estudo, foram utilizados blastosporos de *M. pingshaense*, esporos hidrofílicos, de parede fina, pleomórficos que geralmente germinam mais rápido que os conídios, sendo este atributo um determinante da virulência (ALKHAIBARI et al., 2016). Em estudos com conídios e blastosporos de *Isaria fumosorosea*, 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 às diferenças no processo de formação dos dois propágulos. 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). Muitos produtos comerciais à base de fungos são baseados em conídios aéreos. Porém, Mascarin e colaboradores (2014) demonstraram que os blastosporos podem ser produzidos de forma barata e rápida, sendo essa uma vantagem na utilização destes propágulos a campo. Formulações adequadas podem proteger os blastosporos contra estresses abióticos e aumentar sua eficiência quando apresentados em forma de bioprodutos (KIM et al., 2013). Como blastosporos são estruturas hidrofílicas, podem absorver água mais rapidamente, germinando mais rápido. Outra vantagem na utilização de blastosporos é que eles são comprovadamente virulentos e são produzidos em menor tempo e com menos custo (MASCARIN et al., 2015; ALKHAIBARI et al., 2016), além de quando desidratados, podem se manter viáveis por longos períodos de tempo (MASCARIN et al., 2015, 2016). Por fim, a germinação rápida é uma grande vantagem

para um agente de biocontrole, já que quanto mais rápido o fungo for capaz de penetrar no hospedeiro, mais curto será o tempo em que os propágulos ficam expostos à fatores ambientais desfavoráveis, como calor, radiação ultravioleta, baixa umidade, entre outros, além de não permitir que o sistema imune do hospedeiro seja ativado para prevenir um ataque fúngico.

No presente estudo, a virulência de blastosporos expostos à radiação ultravioleta por três dias consecutivos contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* foi estudada. O estudo de Bernardo e colaboradores (2018) comparou a virulência de blastosporos e conídios de *Metarhizium* spp. e *Beauveria bassiana* contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* e os mecanismos de infecção de blastosporos em carrapatos. Em larvas, a virulência variou muito em relação aos isolados, porém, quando avaliado um isolado de *M. robertsii* em fêmeas ingurgitadas, blastosporos germinados foram vistos na cutícula do carrapato 4h após o tratamento com os fungos, enquanto nenhum conídio germinado foi visto neste mesmo período. Após 72h de infecção, blastosporos já tinham se desenvolvido e coberto a cutícula com uma camada de hifas. Alkhaibari e colaboradores (2016) demonstraram que blastosporos não dependem da diferenciação de um apressório para infectar seu hospedeiro e isto foi observado por Bernardo e colaboradores (2018), visto que blastosporos de *M. robertsii* não formaram apressório. No entanto, análises histológicas da cutícula dos carrapatos confirmaram que blastosporos germinaram e invadiram as fêmeas através da cutícula e de aberturas naturais na cutícula do hospedeiro. A formação de apressório por blastosporos de *M. pingshaense* não foi analisada neste estudo, porém foi possível observar que este propágulo tende a ser mais sensível à luz ultravioleta e isto, aqui, foi refletido na maneira como o estudo foi conduzido, submetendo o fungo por três dias consecutivos à UV, o tempo que geralmente é necessário para ocorrer penetração na cutícula do carrapato.

O bioensaio realizado neste trabalho mostrou que a sobrevivência dos carrapatos que receberam o tratamento com os blastosporos e foram expostos à UV foi estatisticamente diferente da sobrevivência das fêmeas do grupo tratado com blastosporos mas não exposto à radiação. O peso da massa de ovos produzida pelos carrapatos também foi significativamente menor que no controle. Esses dados nos mostram o impacto negativo da luz ultravioleta ao longo do tempo, mesmo entendendo que o blastosporo é um propágulo que penetra mais rapidamente na cutícula. Já foi reportado que conídios tiveram seu crescimento interrompido ou atrasado nas primeiras horas após a exposição a estresses abióticos, porém, após 48h esse crescimento foi retomado (KEYSER et al., 2014). Isto pode não ter acontecido com os blastosporos porque a cada 24h eles recebiam uma nova fluência de irradiação. A viabilidade destes blastosporos foi de 57%, ou seja, quase metade dos propágulos foram inviabilizados com a fluência de irradiação recebida.

O primeiro passo para sabermos se um isolado tem potencial para ser um biocontrolador é saber sua espécie e se ele é virulento. Conhecer e testar seus diferentes propágulos também é uma alternativa, já que no controle biológico podemos lançar mão de diferentes técnicas de utilização dos fungos entomopatogênicos. Por isso, este estudo nos mostra as primeiras análises de um isolado nativo de *M. pingshaense* e nos permite analisar se ele se tornará um biocontrolador eficaz.

5 REFERÊNCIAS

- 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 Pathog.**, v. 12, n. 7, 2016.
- BAHIENSE, 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. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, n.16, p.243-245, 2007.
- 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 Tick-borne Dis.** 2018, <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.001>.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. *Metarhizium frigidum* sp. Nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. **Mycol.**, v. 98, p. 737-745, 2006.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A.; HUMBER, R.A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycol.**, v. 101, n. 4, p. 512-530, 2009.
- 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. Effects of UVB Irradiance on Conidia and Germinants of the Entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A Study of Reciprocity and Recovery. **Photochem. Photobiol.**, v. 73, p. 140-146, 2001a.
- 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*. **Mycol. Res.**, v. 105, n. 7, p. 874 – 882, 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**, 61, 405-425, 2015.
- BRANCINI, G.T.P., HALLSWORTH, J.E., CORROCHANO, L.M., BRAGA, G.U.L. Photobiology of the keystone genus *Metarhizium*. **J Photochem Photobiol B.**, 226, 2022.
- CADET, J., MOURET, S., RAVANAT, J., DOUKI, T. Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactions. **Photochem Photobiol.**, 88, 1048-1065, 2012.

CADET, J., DOUKI, T., RAVANAT, J. Oxidatively Generated Damage to Cellular DNA by UVB and UVA Radiation. **Photochem Photobiol.**, 91, 140-155, 2015.

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. **Vet. Parasitol.**, v.223, p. 38-42, 2016.

CHELICO, L., KHACHATOURIANS, G.G. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **J Invert Pathol.**, 98, 93-100, 2008.

CORVAL, A.R.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T.A.; SILVA, C.S.R.; BITTENCOURT, R.O.B.; FERNANDES, E.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ROBERTS, D.W.; GOLO, P.S. UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi. **J. Basic Microbiol.**, v.61, p. 15-26, 2021.

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

JENKINS, G.I. Signal Transduction in Responses to UV-B Radiation. **Annu. Rev. Biol.**, 60, 407-431, 2009.

JENKINS, G.I. Photomorphogenic Responses to Ultraviolet-B light. **Plant Cell Environ.**, v. 40, p. 2544-2557, 2017.

KEYSER, C.A.; FERNANDES, E.K.K.; RANGEL, D.E.N.; ROBERTS, D.W. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy? **J. Invertebr. Pathol.**, n. 120, p. 67-73, 2014.

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.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol. Biol. Evol.**, v. 33, p. 1870–1874, 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

MARCIANO, A.F.; GOLO, P.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; CAMARGO, M.G.; FIOROTTI, J.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T.A.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) oil-in-water emulsions drastically reduced *Rhipicephalus microplus* larvae outbreak population on artificially infested grass. **Med. Vet. Entomol.**, 2020.

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 J. Microbiol. Biotechnol.**, 2014.

MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; KOBORI, N.N.; BEHLE, R.W.; DUNLAP, C.A.; JÚNIOR, I.D. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 99, p. 6653-6665, 2015.

MASCARIN, G.M., LOPES, R.B., JUNIOR, I.D., FERNANDES, E.K.K., LUZ, C., FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **J Invertebr Pathol**, v. 165, p. 46-53, 2019.

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*. **Photochem. Photobiol.**, v. 86, p. 1259-1266, 2010.

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

RANGEL, D.E.N.; 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... **J. Invertebr. Pathol.**, v. 93, p. 170-182, 2006a.

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

SLINEY, D.H. Radiometric Quantities and Units Used in Photobiology and Photochemistry: Recommendations of the Commission Internationale de l'Éclairage (International Commission of Illumination). **Photochem Photobiol.**, 83, 425-432, 2007.

STADEN, R.; BEAL, K.F.; BONFIELD, J.J. The staden package. In: MISENER, S.; KRAWETZ, S.A. (Eds.) Bioinformatics methods and protocols. **Human Press**, Totowa, EUA, 115-130, 1998.

SUTANTO, K.D., HUSAIN, M., RASOOL, K.G., MALIK, A.F., AL-QAHTANI, W.H., ALDAWOOD, A.S. Persistency of Indigenous and Exotic Entomopathogenic Fungi Isolates under Ultraviolet B (UV-B) Irradiation to Enhance Field Application Efficacy and Obtain Sustainable Control of the Red Palm Weevil. **Insects**, 13, 103, 2022.

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.

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.; PAUL, N.D.; BORNMAN, J.F. Solar ultraviolet radiation in a changing climate. **Nat. Clim. Change**, 2014.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Sci Tech**, v. 17, p. 879-920, 2007.

CAPÍTULO II

TRANSCRIPTOMA DE BLASTOSPOROS DE *Metarhizium pingshaense* EXPOSTOS À RADIAÇÃO UV-B

RESUMO

Transcriptoma é o conjunto completo de transcritos de um organismo, ou seja, é o reflexo direto da expressão dos genes. Diferentes estímulos podem afetar diretamente o transcriptoma. No presente capítulo, foi avaliado o transcriptoma de blastosporos do isolado LCM S10 de *Metarhizium pingshaense* expostos ou não à radiação UV-B. Os propágulos foram expostos à UV-B por aproximadamente 1 hora, recebendo uma fluência total de 4,0 kJ/m². Logo após a exposição, foi realizada a extração do RNA e o mRNA foi purificado e sequenciado utilizando a plataforma Illumina. Blastosporos expostos à UV-B apresentaram 320 genes induzidos e 408 genes suprimidos em relação aos blastosporos que não foram expostos à radiação ultravioleta. Genes relacionados à virulência e ao reparo de danos ao DNA foram induzidos e genes que atuam na infecção do hospedeiro pelo blastosporo foram suprimidos, dentre outros. Observou-se que 17,20% dos genes suprimidos tiveram sua função desconhecida, enquanto, nos genes induzidos, este valor foi de 27,41%. As categorias funcionais aonde os genes que foram mais suprimidos se encontram são: transporte e metabolismo de aminoácidos; transporte e metabolismo de carboidratos e modificação pós-traducional, volume de proteínas e chaperonas. Já as categorias funcionais onde os genes mais induzidos se encontram são: biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários, transporte e metabolismo de coenzimas e pós-traducional, volume de proteínas e chaperonas. Este estudo auxilia na busca pelas respostas em relação às mudanças ocorridas no fungo quando ele passa por um estresse grande, que pode impactar na sua virulência. O entendimento dessas mudanças pode proporcionar análises mais profundas quanto à utilização de fungos entomopatogênicos no controle biológico de artrópodes.

Palavras-chave: transcriptoma; blastosporos; expressão gênica

ABSTRACT

Transcriptome is the complete set of transcripts of an organism, that is, it is the direct reflection of gene expression. Different stimuli can directly affect the transcriptome. In the present chapter, the transcriptome of blastospores of the isolate LCM S10 of *Metarhizium pingshaense* exposed or not to UV-B radiation was evaluated. Propagules were exposed to UV-B for approximately 1 hour, receiving a total fluency of 4.0 kJ/m². Soon after exposure, RNA extraction was performed and the mRNA was purified and sequenced using the Illumina platform. Blastospores exposed to UV-B showed 320 genes induced and 408 genes suppressed compared to blastospores that were not exposed to ultraviolet radiation. Genes related to virulence and DNA damage repair were induced and genes that act in blastospore host infection were suppressed, among others. It was observed that 17.20% of the suppressed genes had their function unknown, while, in the induced genes, this value was 27.41%. The functional categories where the genes that were most suppressed are: transport and metabolism of aminoacids; transport and metabolism of carbohydrates; and post-translational modification, proteins turnover and chaperones. The functional categories where the most induced genes are found are: biosynthesis, transport and catabolism of secondary metabolites; transport and metabolism of coenzymes; and post-translational modification, proteins turnover and chaperones. This study helps in the search for answers regarding the changes that occur in the fungus when it undergoes severe stress, which can impact its virulence. Understanding these changes can provide deeper analyzes regarding the use of entomopathogenic fungi in the biological control of arthropods.

Key words: transcriptome; blastospores; gene expression

1 INTRODUÇÃO

Metarhizium spp. é um dos fungos mais utilizados nos programas de controle biológico de artrópodes (BITTENCOURT et al., 1994; CAMARGO et al., 2016; MARCIANO et al., 2020) sendo os blastosporos os propágulos mais promissores para seu uso em larga escala. A produção deste propágulo em laboratório é mais barata em relação à produção de conídios, além de serem produzidos mais rapidamente (2-3 dias) (ALKHAIBARI et al., 2017). Blastosporos são esporos hidrofílicos, podem ser suspensos em água, possuem uma parede fina, geralmente germinam mais rápido que conídios, sendo este último atributo um determinante da virulência (ALKHAIBARI et al., 2016). Como blastosporos são células muito mais ativas que conídios, esperávamos, neste trabalho, uma grande atividade por parte destes propágulos após o desafio com UV-B.

Para que este controle alternativo seja eficaz, é preciso que o fungo utilizado seja capaz de driblar as condições adversas do ambiente em que está inserido. Um dos principais causadores de estresse fúngico é a radiação ultravioleta, principalmente a fração UV-B, que causa sérios danos aos fungos, podendo causar atraso na germinação e até sua completa inativação (ZIMMERMANN, 1982; RANGEL et al., 2006; RANGEL et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2010).

Determinar quais mudanças ocorrem nos blastosporos quando estes são expostos à radiação UV-B é um caminho que precisa ser traçado pelos pesquisadores, pois é através da análise dessas mudanças que podemos identificar proteínas e moléculas que estão envolvidas no processo de infecção. Para isso, pode-se lançar mão do transcriptoma, que se trata de um conjunto completo de transcritos de um organismo, que reflete diretamente a expressão gênica do indivíduo. A técnica do RNA-seq possibilitou o estudo da relação entre genótipo e fenótipo. Brancini e colaboradores (2019) estudaram como a luz regula a expressão gênica transcricionalmente em conídios de *M. acridum* e observaram mudanças em 11,3% do genoma fúngico, resultando numa mudança de 57 proteínas.

Gao e colaboradores (2011) sequenciaram o genoma de duas espécies de *Metarhizium* spp. (*M. anisopliae* e *M. acridum*) com o intuito de fornecer uma lista de genes responsáveis por controlar a patogenicidade e a especificidade do hospedeiro. As análises de RNA-seq mostraram que as duas espécies possuem mecanismos altamente ajustados para regular as diferenciações celulares em resposta a diferentes insetos hospedeiros.

Portanto, este estudo objetivou realizar o transcriptoma do isolado LCM S10 de *M. pingshaense* e comparar os perfis transcriptômicos de blastosporos expostos e não expostos à radiação ultravioleta, identificando os genes mais expressos em cada perfil transcricional. Importante ressaltar que este é o primeiro estudo sobre a análise do transcriptoma de blastosporos de *M. pingshaense*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. 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.

2.2. Produção de Blastosporos

Para produção de blastosporos, conídios do isolado LCM S10 de *M. pingshaense* foram cultivados em meio Batata Dextrose Ágar, suplementado com 0,1g L⁻¹ de extrato de levedura e uma suspensão conidial foi preparada para fornecer uma concentração inicial de 1 × 10⁸ 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 da suspensão conidial foram inoculados 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 3410g por 5 minutos. Após o primeiro ciclo, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado 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 precipitado foi ressuspensionado novamente em 10 mL de água com Tween® 80 a 0,01%, seguido de homogeneização em vórtex. As suspensões foram transferidas para placas de Petri.

2.3. Exposição à Irradiação UV-B

Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento e a radiação UV foi fornecida por duas lâmpadas fluorescentes TL 20W/12 RS (Filipinas, Eindhoven, Holanda). As placas contendo blastosporos foram imediatamente expostas à radiação UV-B por aproximadamente uma hora (4,0 kJ/m²). As placas contendo os propágulos 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. 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 (BRAGA et al., 2001a). As placas do grupo controle foram cobertas com folha de papel alumínio para bloquear qualquer radiação ultravioleta. O experimento foi conduzido com dois grupos: Controle não exposto à UV-B (CTR) e Grupo exposto à UV-B (UV). Foram cinco placas de blastosporos para cada tratamento.

2.4. Transcriptoma de Blastosporos Expostos à Luz UV

2.4.1. Extração de RNA total

A extração do RNA dos blastosporos foi realizada imediatamente após à exposição à UV-B, conforme o protocolo do PureLink™ RNA Mini Kit (Anexo 2) e as amostras foram submetidas ao tratamento com DNase I (Thermo Fisher Scientific,

Wilmington, DE, USA). Uma corrida de eletroforese foi realizada para verificar a qualidade de extração das amostras. O RNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific). As amostras foram analisadas na empresa GenOne Soluções em Biotecnologia.

2.4.2. RNA-seq

O RNA mensageiro foi purificado a partir de RNA total usando esferas magnéticas poli-T oligo-ligadas. Após a fragmentação, o cDNA da primeira fita foi sintetizado usando *primers* hexâmeros aleatórios seguidos pela síntese de cDNA da segunda fita. A biblioteca foi construída após o reparo final, cauda A, ligação do adaptador, seleção de tamanho, amplificação e purificação. A biblioteca foi verificada com Qubit e qPCR para quantificação e um bioanalyzer para detecção de distribuição de tamanho. As bibliotecas quantificadas foram agrupadas e sequenciadas nas plataformas Illumina de acordo com a concentração efetiva da biblioteca e a quantidade de dados.

2.5. Análise dos Dados Gerados pelo RNA-seq

2.5.1. Processamento dos dados

Para a aferição inicial dos dados sequenciados, utilizou-se o programa "FastQC" (v.0.11.9; ANDREWS, 2010), o qual forneceu relatórios da distribuição de tamanhos e qualidades das sequências. Em seguida, o programa "Atropos" (v.1.1.24; DIDION et al., 2017) foi utilizado para remoção de adaptadores de sequenciamento residuais. Devido a utilização da estratégia "paired-end", implementou-se dois processamentos com o "Atropos", sendo o primeiro baseado no modo "insert", o qual checa por adaptadores nas sobressalências excedentes da sobreposição dos pares, e o segundo no modo "adapter", busca padrão por alinhamento entre a sequência do adaptador e a sequência alvo, de modo semi-global. Para a remoção de sequências e bases de baixa qualidade, utilizou-se o programa "PRINSEQ-lite" (v.0.20.4; SCHMIEDER; EDWARDS, 2011), onde removeu-se bases cuja janela composta por 3 bases consecutivas ("trim_qual_window 3"), tivessem valor de qualidade Phred (Q) inferior a 30 ("trim_qual_right 30"), bem como sequências completas cuja média de qualidade fosse inferior a Q30 ("min_qual_mean 30") ou menores que 50 bases ("min_len 50"). Sequências cujos seus respectivos pares foram perdidos durante as etapas de controle de qualidade ("singletons"), foram reservadas e utilizadas nas etapas posteriores.

2.5.2. Determinação dos genes expressos

As sequências de boa qualidade foram alinhadas contra o genoma de *Metarhizium robertsii* ARSEF 23 ([GCF_000187425.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000187425.2)) com o programa "STAR" (v.2.7.1a; DOBIN; GINGERAS, 2015). O programa foi configurado para considerar íntrons com tamanhos entre 30 ("alignIntronMin 30") e 300 ("alignIntronMax 300") pares de base (valores obtidos com base no arquivo de anotação de características gênicas do genoma de referência), e no máximo 20 alinhamentos múltiplos ("outFilterMultimapNmax 20"). Os arquivos de alinhamento das bibliotecas "paired-end" (PE) e "singletons" foram fundidos e submetidos ao programa "Cuffquant" (v.2.2.1; TRAPNELL et al., 2012) para a quantificação da expressão gênica de cada amostra com base no número de mapeamentos. Para evitar o viés de variação no tamanho das bibliotecas, os valores de expressão foram normalizados para FPKM ("Fragments per kilobase of exon per million mapped reads") com o programa "Cuffnorm" (v.2.2.1), o qual também estimou as contagens absolutas para serem utilizadas na análise de expressão diferencial.

2.5.3. Identificação de genes diferencialmente expressos

Os genes diferencialmente expressos ("DEGs") foram identificados com o pacote R "DESeq2" (v. 1.34.0; LOVE et al., 2014). Como limiar para ser considerado como DEG, estabeleceu-se um q-valor (p-valor ajustado por FDR) de 0.05. Adicionalmente, filtrou-se DEGs de baixa diferença de expressão, estabelecendo um valor mínimo de Log₂Fold-Change de ± 1 .

2.5.4. Anotação e análise de enriquecimento funcional

Além das informações de anotação gênica presentes no arquivo GFF do genoma-referência, realizou-se uma anotação adicional contra o banco de dados de ortólogos EggNOG (v. 5.0.2; HUERTA-CEPAS et al., 2016), através da ferramenta "eggNOG-mapper" (v.2.1.8; HUERTA-CEPAS et al., 2017). Com base nessa anotação, foram obtidas as associações dos genes expressos com os termos GO (Gene Ontology), que por sua vez foram submetidos a uma análise de enriquecimento com o auxílio da suíte de ferramentas "GOATOOLS" (v.1.2.3; KLOPFENSTEIN et al., 2018). A análise de enriquecimento foi realizada para os DEGs induzidos e suprimidos ("Up-" e "Down-regulated", respectivamente), mas também para os conjuntos de genes induzidos e suprimidos de forma separada, em ambos os casos considerando-se um p-valor de 0.05 como limiar de significância.

2.5.5. Análise de componentes principais e representações gráficas

Para reduzir a dimensionalidade e definir os componentes principais no que se refere à variação dos perfis de expressão diferencial das amostras, utilizou-se uma Análise de Componentes Principais (PCA), implementada pela função "prcomp" do pacote R "stats" (v. 4.1.2; R Core Team, 2020). O gráfico do tipo "heatmap" foi gerado com o pacote R "pheatmap" (v.1.0.12; KOLDE, 2019) e os demais, com o pacote R "ggplot2" (v.3.3.6; WICKHAM, 2016).

3 RESULTADOS

3.1. Extração De RNA Total

RNA total de alta qualidade foi extraído das 8 amostras (quatro do grupo CTR e quatro do grupo UV), com quantidade variando de 202,7 ng/μL a 986,7 ng/μL).

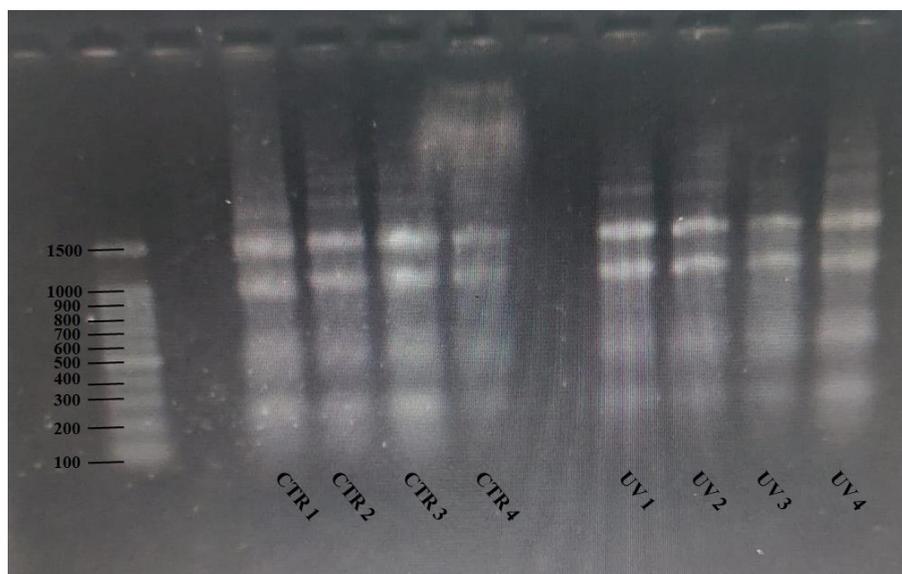


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% do RNA total de blastosporos de *Metarhizium pingshaense*. CTR 1, CTR 2, CTR 3 e CTR 4 (amostras 1, 2, 3 e 4 de RNA total de blastosporos não expostos à UV-B); UV 1, UV 2, UV 3 e UV 4 (amostras 1, 2, 3 e 4 de RNA total de blastosporos expostos à UV-B).

3.2. Análise dos Dados do RNA-seq:

O sequenciamento de alto rendimento gerou um total de 72.382.900 leituras, distribuídas entre 6 amostras (Controle e UV em triplicata, cada um). Em média, obteve-se 12.164.853 leituras por biblioteca de CTR e 11.962.780 para UV. Após as etapas de pré-processamento que compreendem os processos de remoção de adaptadores e controle de qualidade, observou-se uma redução de cerca de 1,38% das contagens originais (Anexo 3).

O alinhamento contra o genoma de referência (*Metarhizium robertsii* ARSEF 23) resultou em um alinhamento de mais de 99% das sequências de boa qualidade. Contudo, obteve-se uma média de 65,89% e 60,31% de alinhamentos únicos para as réplicas de CTR e UV, respectivamente (Anexo 4).

O genoma de referência contava com 11.688 genes preditos. Desses, o sequenciamento permitiu capturar a expressão de 10.002 (85,57%).

O processo de identificação de expressão diferencial constatou a presença de 739 Genes Diferencialmente Expressos (DEGs), considerando-se um p-valor ajustado por FDR de 0,05. Contudo, uma filtragem adicional para desconsiderar genes com diferença baixa, ou seja, com menos de duas vezes de expressão para CTR ou UV ($\text{Log}_2\text{Fold-Change} < 1$ ou > -1) resultou na retenção de 728 DEGs, cerca de 7,28% dos genes expressos (Figura 2).

Dos DEGs, 320 foram induzidos ("up-regulated") e 408 foram suprimidos ("down-regulated") na presença de UV-B (Figura 2). Em relação aos induzidos, 62

(19,37%) são descritos como proteínas hipotéticas ("hypothetical protein"), com um deles figurando entre os 15 mais induzidos (Tabela 1). Entretanto, 25 deles puderam ser identificados com base em anotação contra ortólogos, incluindo um dos mais induzidos (Tabela 1).

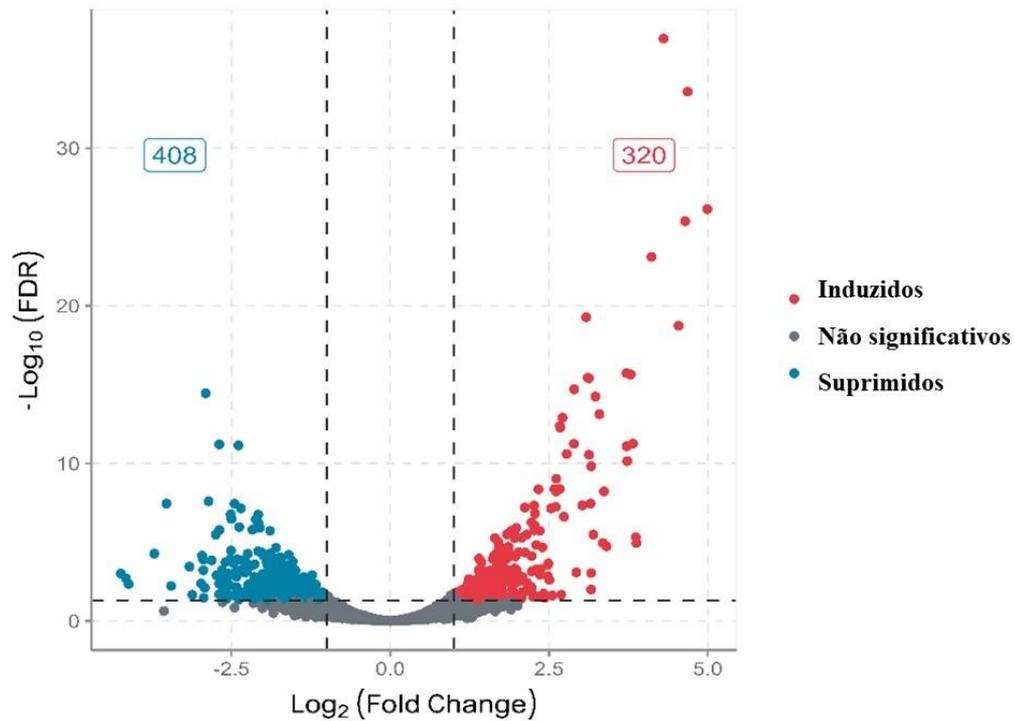


Figura 2: Representação gráfica do tipo “volcano plot” dos genes diferencialmente expressos em blastosporos de *Metarhizium pingshaense* expostos à UV-B versus controle. Pontos vermelhos indicam genes induzidos ("up-regulated"), azuis, os suprimidos ("down-regulated") e cinzas aqueles que não foram significativos (p-valor ajustado por FDR de 0.05 – linha horizontal) e uma diferença de expressão mínima de $\text{Log}_2\text{Fold-Change}$ de ± 1 (linhas verticais).

Tabela 1: Top 15 genes mais induzidos após a exposição de blastosporos à UV-B.

	Gene ID	Descrição	Log₂ FC
1	MAA_09668	WD40 repetição 2	4,99
2	MAA_06345	Proteína de domínio N-acetiltransferase (GNAT) relacionada à GCN5	4,68
3	MAA_08227	Proteína tipo proteína quinase	4,64
4	MAA_06093	aldo/ceto redutase	4,54
5	MAA_06437	Proteína tipo transportadora ABC	4,30
6	MAA_05864	Transportador ABC	4,11
7	MAA_11179	Proteína hipotética	3,88
8	MAA_02776	Fator de transcrição bZIP	3,87
9	MAA_07977	Proteína contendo domínio de metiltransferase	3,83
10	MAA_04139	RNA helicase dependente de ATP DHX8	3,82
11	MAA_09379	Proteína da família da epimerase/desidratase dependente de NAD	3,79
12	MAA_01222	Proteína da família dos transportadores de açúcar *	3,73
13	MAA_05538	Proteína de dedoC2HC5	3,72
14	MAA_06962	hidrolase	3,72
15	MAA_04884	Aminoglicosídeo fosfotransferase	3,41

* Descrição baseada em ortólogos, obtida na anotação com EggNOG

Dentre os genes suprimidos, também foram encontradas 62 descrições de proteínas hipotéticas (15,19%), com três deles figurando entre os 15 mais suprimidos (Tabela 2). Contudo, 28 puderam ser identificados com base em anotação contra ortólogos, incluindo dois dos mais suprimidos (Tabela 2).

Tabela 2: Top 15 genes mais suprimidos após a exposição de blastosporos à UV-B.

	Gene ID	Descrição	Log ₂ FC
1	MAA_10449	Zinco-desidrogenase de ligação *	-4,24
2	MAA_05024	Transportador de substrato geral	-4,16
3	MAA_06704	Acil-CoA desidrogenase	-4,12
4	MAA_06207	Proteína hipotética	-3,71
5	MAA_09617	Proteína dobrada tipo tioredoxina	-3,52
6	MAA_08119	Facilitador Principal de superfamília transportador	-3,45
7	MAA_08849	Cupredoxina	-3,16
8	MAA_06300	Transportador MFS	-3,11
9	MAA_03963	Proteína hipotética	-2,98
10	MAA_01580	Proteína hipotética	-2,96
11	MAA_09551	2-nitropropanodioxigenase, NPD	-2,94
12	MAA_02903	Proteína dedo de zinco do tipo AN1	-2,94
13	MAA_03170	Família de dobras de alfa beta hidrolase	-2,94
14	MAA_00060	Carnitil-CoA desidratase	-2,92
15	MAA_09839	Subunidade reguladora da protein fosfatase Gac1*	-2,90

* Descrição baseada em ortólogos, obtida na anotação com EggNOG

Com base nos perfis de expressão diferencial, nota-se uma separação considerável dos tratamentos (controle vs. exposto a UV-B). Tal diferença é notada na alta explicação da variação observada pelo eixo PC1 (74,74%), o principal relacionado a separação dos tratamentos. Nota-se, também, uma variação acentuada entre as amostras de controle, relacionados, principalmente, ao PC2 (13,27%) (Figura 3). Para explorar os principais genes relacionados à separação dos tratamentos, foi obtido um gráfico dos "loadings" (Figura 3B). Os principais genes relacionados à separação dos tratamentos são os genes MAA_03963 e MAA_07675 relacionados ao controle e MAA_02521, MAA_02624, MAA_09380, MAA_01567, MAA_09788, MAA_06644, MAA_04746 e MAA_10781 relacionados à exposição à UV-B (Figura 3C).

Em consonância ao observado pelo PCA, os agrupamentos obtidos entre os 100 genes com maior intensidade de diferença de expressão, exposto no mapa de calor (Figura 4), ressalta a coesão das amostras expostas à UV-B, enquanto aquelas oriundas do tratamento controle parecem apresentar perfil mais heterogêneo em relação a expressão dos genes suprimidos.

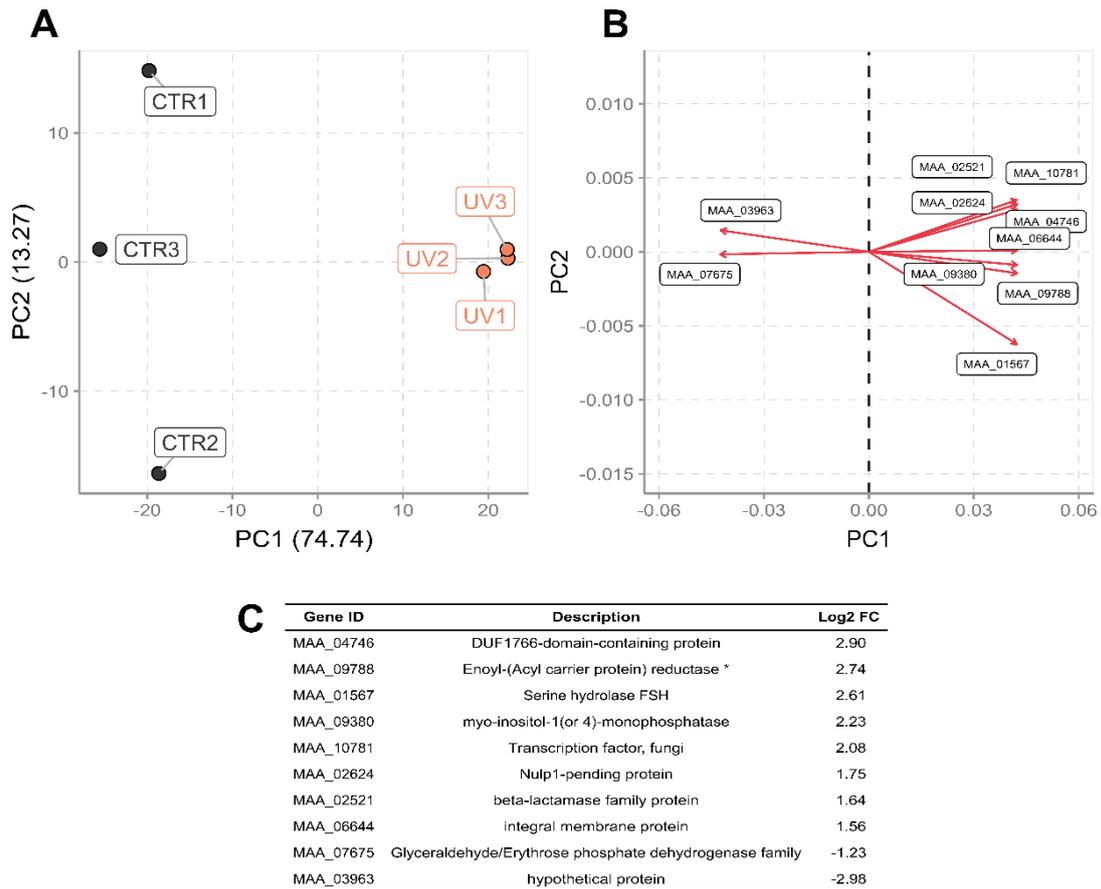


Figura 3: Análise de Componentes Principais (PCA) dos perfis de expressão diferencial revela a separação dos tratamentos (controle – preto; expostos à UV-B – laranja), cuja variação explicada acumulada dos *eigenvalues* dos dois primeiros PCs é de 88,01% (A). Os dez genes de maior carga ("loadings") no PC1 (principal relacionado à separação dos tratamentos) (B) e suas descrições e diferença de expressão, onde números positivos indicam indução e negativos, supressão sob a exposição de luz UV-B (C). O asterisco ("*") indica descrição baseada em ortólogos, obtida na anotação com EggNOG.

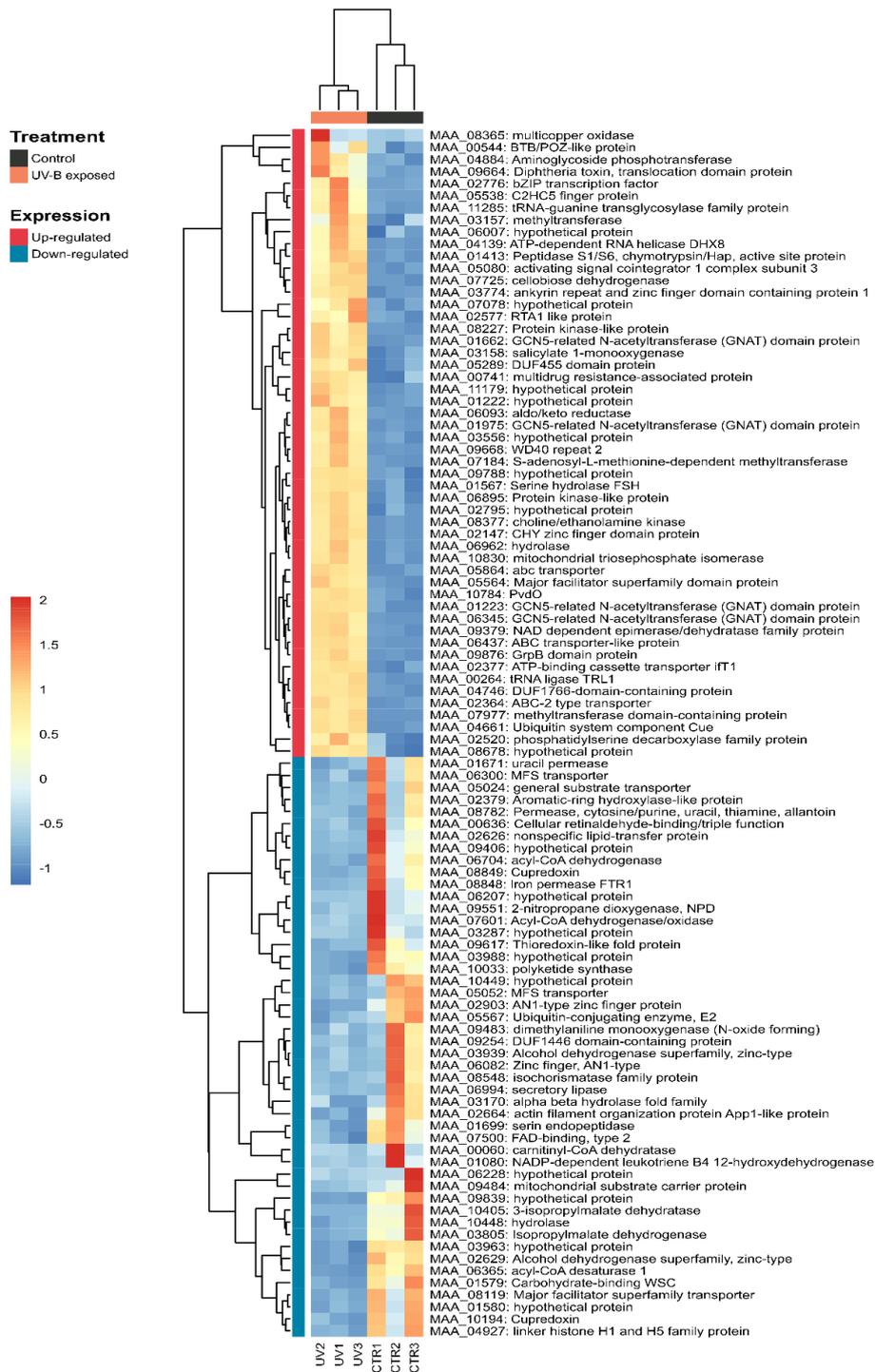


Figura 4: Mapa de calor dos genes diferencialmente expressos entre as amostras expostas à UV-B (UV) e controle (CTR). Estão demonstrados os 100 genes com maior diferença de expressão segundo o valor de Log₂Fold-Change. Os valores de expressão em FPKM foram padronizados via computação de z-score. As linhas (genes) e colunas (amostras) foram clusterizadas hierarquicamente de acordo com a similaridade entre elas.

A classificação funcional dos DEGs (Figura 5) revela que 89,45% e 84,94%, dos genes suprimidos e induzidos, respectivamente, puderam ser atribuídos à, ao menos, uma das categorias do COG. Contudo, nota-se que 17,20% dos genes suprimidos tiveram função desconhecida. Para os induzidos esse valor foi de 27,41%. As categorias com maior quantidade de genes suprimidos foram: "[E] "Transporte e metabolismo de aminoácidos" (10,32%), "[G] "Transporte e metabolismo de carboidratos" (9,17%) e "[O] "Modificação pós-traducional, volume de proteínas e chaperonas" (8,03%). Para os induzidos, as principais categorias foram: "[Q] "Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários" (5,72%), "[H] "Transporte e metabolismo de coenzimas" (5,42%) e "[O] "Modificação pós-traducional, volume de proteínas e chaperonas" (5,12%).

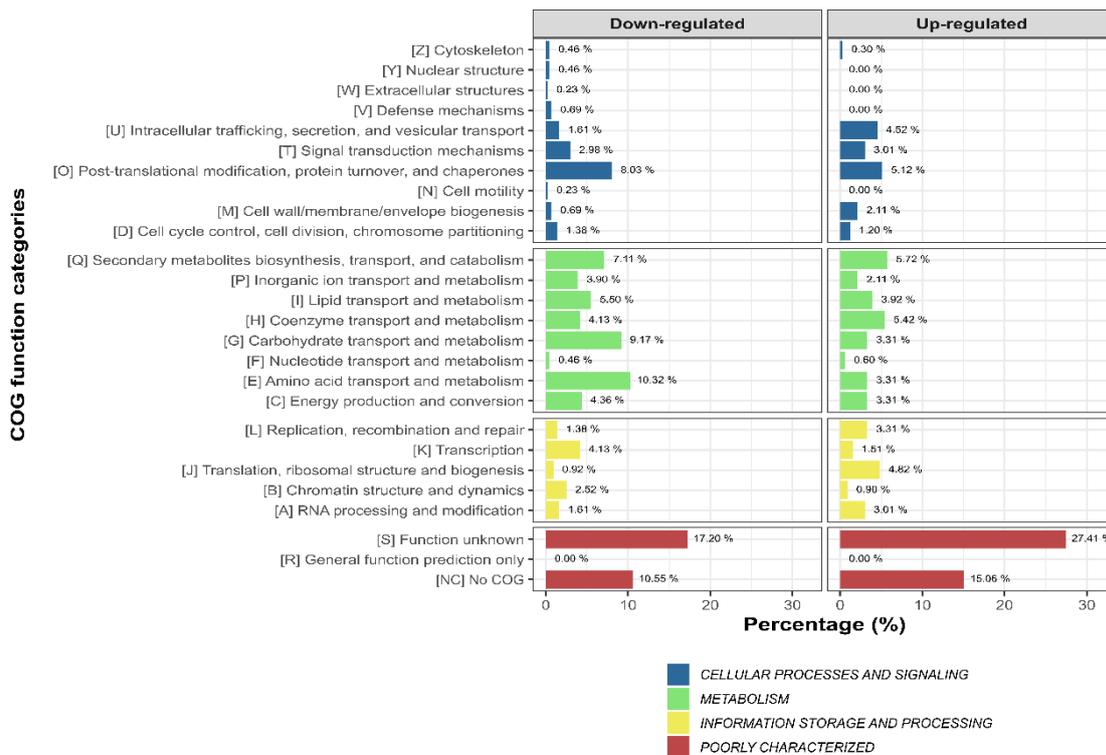


Figura 5: Classificação funcional do COG (Cluster de Grupos Ortólogos) dos genes diferencialmente expressos (DEGs) de blastosporos de *Metarhizium pingshaense* expostos à UV-B em relação ao controle (não exposto à UV-B). São demonstradas as porcentagens dos genes suprimidos (“down-regulated”) e induzidos (“up-regulated”) em cada categoria funcional.

Com base em todos os genes diferencialmente expressos, a análise de enriquecimento dos termos GO (Gene Ontólogo) resultou em um total de 459 termos significativamente enriquecidos (p -valor ≤ 0.05). Os termos com maior contagem de DEGs estão representados na Figura 6. Os DEGs foram avaliados separadamente para averiguar o enriquecimento de termos específicos naqueles que foram induzidos ou suprimidos. Como resultado, obteve-se um total de 218 termos GO enriquecidos para os genes induzidos e 787 termos GO, para os suprimidos. Os termos GO de maior relevância para cada parte se encontram nos anexos 5 e 6.

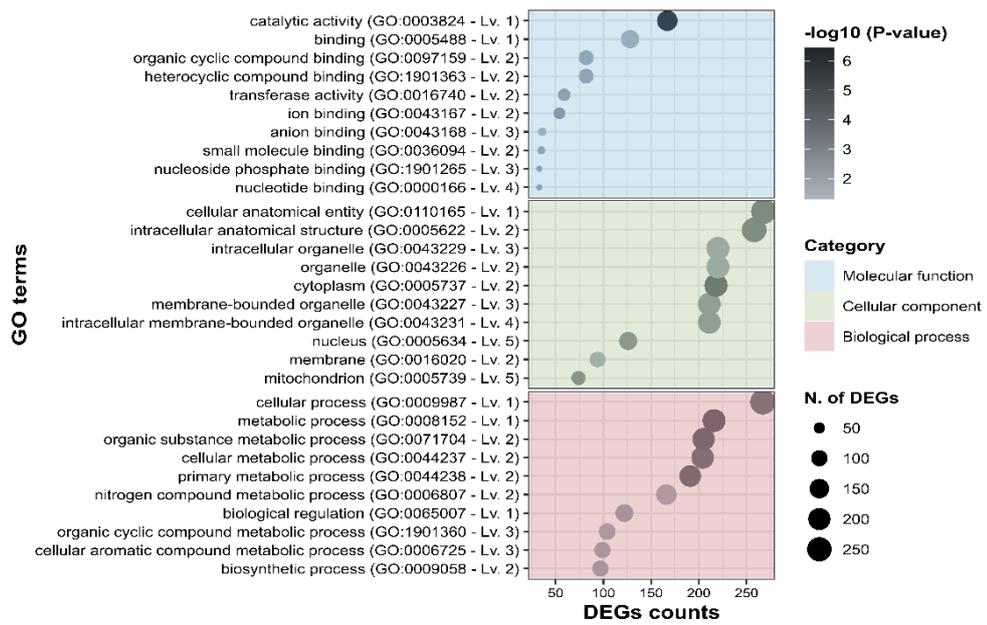


Figura 6: Análise de enriquecimento de termos GO (Gene Ontólogo) dos genes diferencialmente expressos (DEGs) de blastosporos de *Metarhizium pingshaense* em relação à exposição à luz UV-B. São demonstradas as porcentagens de DEGs nos 10 termos mais expressivos de cada categoria funcional.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou elucidar os mecanismos genéticos que ocorrem com o blastosporo expostos à radiação ultravioleta e qual o poder de virulência deste propágulo imediatamente após a exposição à UV. O isolado LCM S10 de *M. pingshaense* foi escolhido, pois já eram conhecidos alguns resultados prévios de sua tolerância à UV (CORVAL et al. 2021). O propágulo de escolha deste trabalho foi o blastosporo, já que ele possui uma atividade maior que os conídios e um dos objetivos era entender o que acontece com este propágulo logo após a exposição à UV. Não foi objeto de estudo saber o quanto este propágulo se recupera após o desafio pela UV, a intenção foi entender quais eram as primeiras mudanças neste isolado logo após a radiação.

Fungos, quando em contato com a cutícula do hospedeiro, se fixam por interação hidrofóbica intermediada pelas hidrofobinas. Proteases, esterases, lipases e N-acetilglicosidases atuam na camada mais externa da cutícula do hospedeiro, dando início ao processo de infecção. Durante a penetração, o fungo libera enzimas (esterases, proteases, lipases e quitinases) que facilitam a penetração mecânica, hidrolisando os componentes cuticulares do hospedeiro (ST. LEGER et al., 1989). A atividade das esterases, proteases, aminopeptidases e carboxipeptidases aparecem nas primeiras 24 horas, enquanto que a atividade de quitinases aumentam após três a cinco dias após a infecção fúngica (ST. LEGER et al., 1986). O sequenciamento por RNA-seq de blastosporos do isolado LCM S10 de *M. pingshaense* capturou a expressão de 10.002 genes, dentre os quais 728 foram diferencialmente expressos (cerca de 7,28%). Dentre os genes do grupo das esterases, protease e lipases, que atuam no início do processo de infecção, pelo menos cinco genes do grupo das esterases (MAA_01532, MAA_02848, MAA_05897, MAA_06962 e MAA_07118), um gene do grupo das proteases (MAA_10425) e três genes do grupo das lipases (MAA_01458, MAA_01532 e MAA_07090) foram induzidos, com o gene denominado MAA_06962 (hidrolase) figurando entre os 15 mais induzidos.

O gene mais induzido em nossos dados foi o WD40 repetição 2 (Tabela 4). O domínio WD40 em fungos afeta o nível de proteínas ribossomais e a expressão de genes que regulam o crescimento de hifas, virulência e patogenicidade, além de participar de vários processos como resposta ao dano ao DNA e modificações epigenéticas, dentre outras (JAIN; PANDEY, 2018). Um outro gene que foi induzido em nossa pesquisa foi o relacionado à proteína de domínio N-acetiltransferase relacionada a GCN5. As histonas acetiltransferases são enzimas que acetilam lisinas dentro das caudas amino terminais das proteínas histonas, neutralizando a carga positiva das lisinas e resultando em uma estrutura de cromatina mais relaxada, aberta e transcricionalmente ativa (LAI et al., 2022). GCN5 foi funcionalmente diferenciado nos fungos que se adaptam a diferentes hospedeiros e ambientes, podendo regular o ciclo celular, adaptação a estímulos ambientais e respostas ao estresse (LAI et al., 2022). Por último, destacam-se as RNA helicases, que, de igual forma, regulam a expressão de fatores que promovem a estabilidade genômica, previnem danos ao DNA, participando diretamente na resposta e reparo de danos ao material genético (CARGIL et al, 2021). Como visto, todos estes genes atuam de alguma forma reparando danos ao material genético dos fungos. A absorção da fração UV-B induz a produção de dímeros de pirimidina, podendo induzir mutações (NASCIMENTO et al., 2010). 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, fluências subletais de radiação UV podem causar outros efeitos adversos nos conídios, reduzindo a velocidade de germinação e também sua virulência (NASCIMENTO et al., 2010).

Com relação aos genes mais suprimidos, três estão relacionados com o “Major Facilitator Superfamily” (MAA_05024, MAA_06300 e MAA_08119). Os transportadores MFS são proteínas de membrana associadas com o transporte de monossacarídeos, aminoácidos, vitaminas, cofatores, ânions e cátions. Em leveduras do gênero *Candida* sp., vários transportadores MFS estão relatados na infecção do hospedeiro. Alguns transportadores MFS de fungos filamentosos também podem atuar como cofatores de virulência (LIU et al., 2018). Como podemos observar em nossos experimentos, no bioensaio com fêmeas de *R. microplus*, o fungo *M. pingshaense* sofreu com a radiação UV-B, não apresentando diferença significativa em alguns parâmetros biológicos analisados com relação ao grupo controle não tratado. Podemos inferir que, dentre outras causas possíveis, a supressão dos genes relacionados ao transportador MSF pode resultar em deficiência de transporte de compostos tóxicos, que poderiam se acumular nas células fúngicas, alterando a virulência deste isolado fúngico.

A classificação funcional dos DEGs revelou que mais de 80% dos genes induzidos e suprimidos puderam ser atribuídos à, pelo menos, uma das categorias do COG (Cluster of Orthologous Group). Porém, um número expressivo de DEGs tiveram função desconhecida (17,20% e 27,41% dos DEGs suprimidos e induzidos, respectivamente). Para estes genes, são necessários mais estudos a fim de identificar os genes e proteínas mais afetadas na condição de exposição à UV-B.

Para os genes induzidos, as categorias do COG (cluster of orthologous groups) com maior quantidade de genes foram: Q (estruturas secundárias), H (metabolismo de coenzimas) e O (modificação pós-traducional, renovação de proteínas, funções de chaperona). Dentre os 15 genes mais induzidos, os que estão dentro destas categorias são: ABC transporter (MAA_05864), methyltransferase domain-containing protein (MAA_07977) e aminoglycoside phosphotransferase (MAA_04884). Os transportadores ABC utilizam a energia química da hidrólise do ATP para facilitar o transporte de moléculas dentro da célula. Dentre as funções já estudadas desta proteína estão o metabolismo de ácidos graxos, proteção contra compostos tóxicos, além de estarem envolvidas na tradução do RNA mensageiro e na biogênese do ribossomo (PERLIN et al., 2014; BARAL, 2017). A capacidade antioxidante fúngica raramente foi associada aos transportadores ABC, mas é importante para o sucesso da infecção pelo fungo entomopatogênico *B. bassiana*. A tolerância fúngica à oxidação é correlacionada com a virulência e a resistência à UV de *B. bassiana* (XIE et al., 2012; XIE et al., 2013). Nem todos os transportadores ABC contribuem para a virulência fúngica, mas pelo menos alguns deles são necessários para a plena virulência de um patógeno fúngico (SONG et al., 2013). As metiltransferases são enzimas que transferem um grupo metil de uma molécula para outra. A metilação do DNA é um pré-requisito para a expressão gênica e reparo de mutações e esta reação modifica moléculas de RNA, DNA e proteínas para atividades reguladoras. Elas têm sido implicadas na regulação da transcrição, além de reparo de danos ao DNA (EHSAN et al., 2020).

Para os genes suprimidos, as categorias do COG (cluster of orthologous groups) com maior quantidade de genes foram: E (transporte de aminoácidos e metabolismo), G (transporte de carboidrato e metabolismo) e O (modificação pós-traducional, renovação de proteínas, funções de chaperona). Dentre os 15 genes mais suprimidos, os que estão

dentro destas categorias são: dois genes relacionados à Major Facilitator Superfamily (MAA_05024 e MAA_06300), já descritos anteriormente, além do acyl-CoA dehydrogenase (MAA_06704), thiredoxin-like fold protein (MAA_09617), 2-nitropropane dioxygenase (MAA_09551) e protein phosphatase regulatory subunit Gac1 (MAA_09839). As acil-CoA desidrogenases são proteínas peroxissomais e participam do processo de geração de energia, promovendo a desidrogenação em aminoácidos. O aumento desta proteína em *Penicillium italicum* indicou que o catabolismo de ácidos graxos e aminoácidos estava ativo (GUO et al., 2019). O estresse tende a romper as membranas celulares e organelas e causar um desequilíbrio das reações iônicas que estimulam a geração de espécies reativas de oxigênio (KHAN et al., 2015). Por isso, sugere-se que blastosporos de *M. pingshaense* utilizados neste estudo podem ter sofrido grande estresse provocado pela radiação UV-B e suas organelas estejam se rompendo, fazendo com que este gene esteja sendo suprimido. O gene 2-nitropropano dioxygenase codifica uma enzima que degrada hidrocarbonetos presentes na cutícula do hospedeiro. Durante a invasão do hospedeiro, na fusão miceliar e conidiogênese, este gene mantém níveis baixos de expressão (QUINTERO et al., 2020). Por último, a fosfatase subunidade Gac1 está relacionada com o metabolismo de glicogênio. Genes suprimidos diminuem os níveis de glicogênio (FRANÇOIS et al., 1992; WU et al., 2001).

O passo inicial para elucidar os mecanismos moleculares relativos ao desenvolvimento fúngico é a análise da expressão gênica. O sequenciamento de RNA é uma tecnologia poderosa que nos fornece uma estimativa precisa da expressão gênica, permitindo uma identificação de sequências de codificação, função do gene, dentre outros. Por isso, este trabalho tem um papel relevante no cenário do controle biológico, pois pode ser um ponto de partida para novos estudos, visando o aprimoramento de técnicas e formulações que utilizam fungos entomopatogênicos como forma de biocontrole.

5 REFERÊNCIAS

- 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 Pathog.**, 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. **J. Med. Entomol.**, v. 54, n. 3, 2017.
- ANDREWS, S. *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom. 2010.
- BARAL, B. Evolutionary Trajectories of Entomopathogenic Fungi ABC Transporters. In: **Advances in Genetics**, v.98, p.117-154, 2017.
- 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. Effects of UVB Irradiance on Conidia and Germinants of the Entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A Study of Reciprocity and Recovery. **Photochem. Photobiol.**, v. 73, p. 140-146, 2001a.
- BRANCINI, G.T.P.; FERREIRA, M.E.S.; RANGEL, D.E.N.; BRAGA, G.U.L. Combining Transcriptomics and Proteomics Reveals Potential Post-transcriptional Control of Gene Expression After Light Exposure in *Metarhizium acridum*. **G3: Genes, Genomes, Genet.** , v. 9, p. 2951-2961, 2019.
- 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. **Vet. Parasitol.**, v.223, p. 38-42, 2016.
- CARGIL, M.; VENKATARAMAN, R.; LEE, S. DEAD-Box RNA Helicases and Genome Stability. **Genes**, v.12, 2021.
- DIDION, J. P.; MARTIN, M.; COLLINS, F. S. Atropos: Specific, sensitive, and speedy trimming of sequencing reads. **Peer J**, 5, e3720. <https://doi.org/10.7717/peerj.3720>, 2017.
- DOBIN, A.; GINGERAS, T. R. Mapping RNA-seq Reads with STAR. **Current Protocols in Bioinformatics**, 51(1). <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1114s51>, 2015.
- EHSAN, M.; GADAH, J.A.; LIU, T.; WANG, Y.; HASAN, M.W.; HASEEB, M.; YAN, R.; XU, L.; SONG, X.; ZHU, X.; LI, X. Identification of a novel

methyltransferase-type 12 protein from *Haemonchus contortus* and its effects on functions of goat PBMCs. **Parasites & Vectors**, v.13, 2020.

FRANÇOIS, J.M.; THOMPSON-JAEGER, S.; SKROCH, J.; ZELLENKA, U.; SPEVAK, W.; TATCHELL, K. GAC1 may encode a regulatory subunit for protein phosphatase type 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, v.11, p.87-96, 1992.

GAO, Q.; JIN, K.; YING, S.; ZHANG, Y.; XIAO, G.; SHANG, Y.; DUAN, Z.; HU, X.; XIE, X.; ZHOU, G.; PENG, G.; LUO, Z.; HUANG, W.; WANG, B.; FANG, W.; WANG, S.; ZHONG, Y.; MA, L.; ST. LEGER, R.J.; ZHAO, G.; PEI, Y.; FENG, M.; XIA, Y.; WANG, C. Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium acridum*. **Plos Genet.**, v. 7, 2011.

GUO, M.; ZHANG, X.; LI, M.; DUAN, X.; ZHANG, D.; HU, L.; HUANG, R. Label-Free Proteomic Analysis of Molecular Effects of 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone on *Penicillium italicum*. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, 2019.

HUERTA-CEPAS, J.; SZKLARCZYK, D.; FORSLUND, K.; COOK, H.; HELLER, D.; WALTER, M.C.; RATTEI, T.; MENDE, D.R.; SUNAGAWA, S.; KUHN, M.; JENSEN, L.J.; VON MERING, C.; BORK, P. eggNOG 4.5: A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. **Nucleic Acids Res.**, 44(D1), D286–D293. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1248>, 2016.

HUERTA-CEPAS, J.; FORSLUND, K.; COELHO, L.P.; SZKLARCZYK, D.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C.; BORK, P. Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. **Mol. Biol. Evol.**, 34(8), 2115–2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>, 2017.

JAIN, B.P.; PANDEY, S. WD40 Repeat Proteins: Signalling Scaffold with Diverse Functions. **The Protein Journal**, v.37, p.391-406, 2018.

KHAN, A.R.; ULLAH, I.; WAQAS, M.; SHAHZAD, R.; HONG, S.; PARK, G.; JUNG, B.; LEE, I.; SHIN, J. Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.31, p. 1461-1466, 2015.

KLOPFENSTEIN, D.V.; ZHANG, L.; PEDERSEN, B.S.; RAMÍREZ, F.; WARWICK VESZTROCY, A.; NALDI, A.; MUNGALL, C.J.; YUNES, J.M.; BOTVINNIK, O.; WEIGEL, M.; DAMPIER, W.; DESSIMOZ, C.; FLICK, P.; TANG, H. GOATOOLS: A Python library for Gene Ontology analyses. **Sci. Rep.**, v.8, <http://doi.org/10.1038/s41598-018-28948-z>, 2018.

KOLDE, R. Pheatmap: Pretty heatmaps. <http://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>

LAI, Y.; WANG, L.; ZHENG, W.; WANG, S. Regulatory Roles of Histone Modifications in Filamentous Fungal Pathogens. **J. Fungi**, v.8, 2022.

LIU, J.; SUN, H.; YING, S.; FENG, M. Characterization of three mitogen-activated protein kinase-like proteins in *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, v.113, p.24-31, 2018.

LOVE, M.I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol.**, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>, 2014.

MARCIANO, A.F.; GOLO, P.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; CAMARGO, M.G.; FIOROTTI, J.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T.A.; PERINOTTO, W.M.S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) oil-in-water emulsions drastically reduced *Rhipicephalus microplus* larvae outbreak population on artificially infested grass. **Med. Vet. Entomol.**, 2020.

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*. **Photochem. Photobiol.**, v. 86, p. 1259-1266, 2010.

PERLIN, M.H.; ANDREWS, J.; TOH, S.S. Essential Letters in the Fungal Alphabet: ABC and MFS Transporters and Their Roles in Survival and Pathogenicity. In: **Advances in Genetics**, v.85, p. 201-252, 2014.

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.

QUINTERO, K.Y.C.; GUERRERO, I.E.P.; GUZMÁN, J.C.T.; MARTÍNEZ, B.G.V.; FÉLIX, A.V.; HERNÁNDEZ, G.A.G. Members of the nitronate monooxygenase gene family from *Metarhizium brunneum* are induced during the process of infection to *Plutella xylostella*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.104, p.2987-2997, 2020.

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... **J. Invertebr. Pathol.**, v. 93, p. 170-182, 2006a.

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

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, 27(6), 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>, 2011.

SONG, T.; ZHAO, J.; YING, S.; FENG, M. Differential Contributions of Five ABC Transporters to Multidrug Resistance, Antioxidation and Virulence of *Beauveria bassiana*, and Entomopathogenic Fungus. **PLoS One**, v.8, 2013.

ST. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Synthesis in Culture on Cuticle. **J. Invertebr. Pathol.**, v.48, p. 85-95, 1986.

ST. LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of Proteins Including a Cuticle-Degrading Protease during Differentiation of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Exp. Mycol.**, v.13, p. 253-261, 1989.

TRAPNELL, C.; ROBERTS, A.; GOFF, L.; PERTEA, G.; KIM, D.; KELLEY, D.R.; PIMENTEL, H.; SALZBERG, S.L.; RINN, J.L.; PACHTER, L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat. Protoc.**, 7(3), 562–578. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016>, 2012.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. **Springer-Verlag**, New York, <http://ggplot2.tidyverse.org>, 2016.

WU, X.; HART, H.; CHENG, C.; ROACH, P.J.; TATCHELL, K. Characterization of Gac1p, a regulatory subunit of protein phosphatase type I involved in glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Genet. Genomics**, v.265, p. 622-635, 2001.

XIE, X.; LI, F.; YING, S.; FENG, M. Additive Contributions of Two Manganese-Cored Superoxide Dismutases (MnSODs) to Antioxidation, UV Tolerance and Virulence of *Beauveria bassiana*. **PLoS One**, v. 7, 2012.

XIE, X.; GUAN, Y.; YING, S.; FENG, M. Differentiated functions of Ras1 and Ras2 proteins in regulating the germination, growth, conidiation, multi-stress tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. **Environ. Microbiol.**, v.15, p.447-462, 2013.

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

CONCLUSÕES GERAIS

1. O isolado utilizado neste estudo foi classificado taxonomicamente como *M. pingshaense*;
2. Conídios, blastosporos e microescleródios se mostraram tolerantes à radiação UV-B;
3. Os parâmetros biológicos de fêmeas de *R. microplus* não tiveram alteração no grupo tratado exposto à radiação UV-B em relação ao controle; a exposição à UV-B interferiu na virulência do isolado estudado.
4. As fêmeas de *R. microplus* tratadas com blastosporos de *M. pingshaense* tiveram 12 dias de sobrevivência média;
5. A exposição à radiação UV-B por três dias consecutivos inviabiliza metade dos blastosporos do isolado LCM S10.
6. A análise de expressão diferencial identificou 728 DEGs (7,28% dos genes expressos);
7. Foram identificados 320 genes induzidos (up-regulated) e 408 suprimidos (down-regulated) na presença de UV-B.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso do controle biológico passa pelos estudos que nos permitem entender quais são as implicações no uso de fungos entomopatogênicos. Dentre todos os fatores bióticos e abióticos que estão envolvidos no processo de interação parasito-hospedeiro, podemos citar a radiação UV-B, que 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 diretamente propágulos do isolado LCM S10 de *Metarhizium pingshaense* e o entendimento de como estes propágulos respondem à UV-B podem fornecer ferramentas críticas para melhorar o sucesso do controle biológico.

Para o isolado estudado aqui, blastosporos e microescleródios se mostraram muito tolerantes à UV, alcançando 100% de viabilidade após exposição à radiação UV. Porém, quando blastosporos são expostos à mesma fluência de radiação, por três dias consecutivos, esta viabilidade diminui para quase a metade. Isto nos mostra o efeito negativo que este fator tem sobre os propágulos.

Mesmo com quase 50% dos blastosporos do isolado LCM S10 de *M. pingshaense* morrendo após a radiação UV, podemos observar que os blastosporos que sobreviveram foram capazes de alterar os parâmetros biológicos da mesma forma que os blastosporos que não foram expostos à UV. A única diferença foi o percentual de controle, um parâmetro importante quando falamos de controle biológico, pois impacta diretamente o uso do isolado fúngico a campo. Neste caso, o percentual de controle do isolado LCM S10 de *M. pingshaense* exposto à UV foi muito baixo, em torno de 13%, inviabilizando o uso deste isolado a campo.

Neste estudo, podemos analisar também como os blastosporos do isolado LCM S10 de *M. pingshaense* se comportam geneticamente após receber uma única vez a radiação UV. Podemos perceber que vários genes foram alterados, sendo induzidos ou suprimidos. Genes ligados à penetração fúngica, no início do processo de infecção, bem como genes ligados à virulência e ao reparo de DNA foram induzidos. Já genes ligados ao transporte de substâncias, genes que participam da geração de energia, além de genes que regulam o nível de glicogênio foram suprimidos.

Todas essas informações reunidas nos fornecem uma perspectiva de uso de fungos entomopatogênicos no controle biológico. Todos os mecanismos relativos ao desenvolvimento fúngico são importantes para o aprimoramento de técnicas e formulações que utilizam algum propágulo fúngico no controle de pragas. E este trabalho contribui para o avanço de novos estudos no campo da parasitologia e do controle biológico.

ANEXOS

Anexo 1: Resumo de 47 artigos publicados revisados por pares sobre a influência da radiação ultravioleta em *Metarhizium* spp.

Espécies	Tipo de Radiação	Fluência	Propágulo	Parâmetro	Principais resultados	Referência
<i>M. anisopliae</i>	UV-A e UV-B	100 mW/cm ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa; Comprimento da hifa	Quanto maior o tempo de exposição (6, 12, 24 minutos) menor a viabilidade conidial. Atraso na germinação observado com 48h de incubação. Quanto maior a exposição, menor o comprimento da hifa. Morte e atraso na germinação. Conídios formulados em óleo germinaram mais do que conídios expostos em água. Os conídios formulados em óleo acrescido de 1% de oxibenzona germinaram 4 vezes mais que conídios formulados em óleo.	Zimmermann et al., 1982
<i>M. flavoviride</i>	UV-B	0,12, 10,32 e 84,0 J s ⁻¹ m ⁻²	Conídios de meio artificial formulados ou não em óleo	Germinação Relativa	As menores germinações após 4, 8, 16 e 24h foram 60,7; 318; 17,3 e 9,6%, respectivamente. Apenas	Moore et al., 1993
<i>Metarhizium</i> sp.; <i>M. anisopliae</i> e <i>M. flavoviride</i>	UV-A, UV-B e comprimentos de onda longos	1000 J s ⁻¹	Conídios produzidos por um método difásico envolvendo uma fase líquida e	Germinação Relativa	As menores germinações após 4, 8, 16 e 24h foram 60,7; 318; 17,3 e 9,6%, respectivamente. Apenas	Morley-Davis et al., 1995

			uma fase sólida.		um isolado apresentou germinação >50% após 24h de exposição. Quanto maior o tempo de exposição, menor a germinação dos conídios. Alguns adjuvantes, quando adicionados à suspensão fúngica, aumentaram significativamente a tolerância dos conídios à radiação. Houve diminuição da viabilidade, atraso na germinação foi maior durante a exposição à maior irradiância.	
<i>M. anisopliae</i>	UV-A e UV-B	Não informado	Conídios de meio artificial formulados ou não em óleo	Germinação Relativa	Diminuição da viabilidade; redução do tempo letal; atraso na germinação foi maior durante a exposição à maior irradiância.	Alves et al., 1998
<i>M. robertsii</i>	UV-B	6,6 e 17,3 kJ/m ²	Conídios de meio artificial	Viabilidade; Germinação Relativa e tempo letal	A exposição a ambos os espectros completos reduziu a capacidade de cultivo de todas as cepas. A exposição à UV-B retardou a germinação dos conídios sobreviventes.	Braga et al., 2001a
<i>M. album; M. anisopliae; M. flavoviride; M. taii</i>	UV-B	3,3 a 19,9 kJ/m ² (920 mW m ⁻²) e 4,3 a 25,9 kJ/m ² (1200 mW m ⁻²)	Conídios de meio artificial	Viabilidade e germinação relativa		Braga et al., 2001b

<i>M. anisopliae</i>	UV-B	3,3 a 26,4 kJ/ m ² (900 mW m ⁻²) e 4,3 a 34,6 kJ/ m ² (1200 mW m ⁻²)	Conídios de meio artificial	Viabilidade; crescimento da colônia; tempo letal e germinação relativa.	O aumento da irradiância causou diminuição da viabilidade e reduziu o TL ₅₀ . As colônias fúngicas apresentaram atraso no desenvolvimento e alta heterogeneidade tanto na forma quanto no tamanho. Quanto maior o tempo de exposição, maior o atraso na germinação.	Braga et al., 2001c
<i>M. anisopliae</i>	UV-A solar e UV-B	567 a 629 mW m ⁻² (luz solar de amplo espectro) e 189 a 210 mW m ⁻² (UV-A solar ao meio-dia)	Conídios de meio artificial	Viabilidade e germinação relativa	Quanto maior o tempo de exposição, menor o percentual de viabilidade. Atraso na germinação dos conídios sobreviventes de todas as cepas.	Braga et al., 2001d
<i>M. robertsii</i>	UV-B e luz solar	3,3, 6,6, e 13,2 kJ/ m ² Ou sob a luz solar	Esporos e fungos germinados (micélio após 20h ou 24h de crescimento	Germinação e atividade enzimática	ARSEF 324 foi mais tolerante do que ARSEF 2575. A exposição à UV-B reduziu a atividades de isoenzimas exibindo atividades de catalase- peroxidase e glutadiona redutase em 2575 mais do que em 324.	Miller et al., (2004)

<i>M. robertsii</i>	UV-B	2,8, 5,5, 8,3 e 11,1 kJ/ m ²	Conídios de meio artificial ou de cadáveres de insetos	Viabilidade	Conídios de cadavers de insetos germinaram mais lentamente do que aqueles de culturas em meio artificial.	Rangel et al. 2004
<i>M. anisopliae</i>	UV-B	2,8; 5,5; 8,3 e 11,1 kJ/ m ²	Conídios de meio artificial e em adultos de <i>Melanoplus sanguinipes</i> infectados	Viabilidade e Germinação Relativa	A tolerância à radiação UV-B de conídios produzidos em meio artificial não diferiu da tolerância de conídios crescidos em cadáveres de insetos. Os conídios de todos os mutantes foram inativados após a exposição à UV-B, exceto os conídios dos mutantes amarelos DWR 069 e DWR 142. Mutantes com conídios brancos foram mais sensíveis à radiação ultraviolet solar simulada do que mutantes com conídios roxos, seguidos por conídios amarelos, que foram mais sensíveis do que a cepa selvagem.	Rangel et al., 2005
<i>M. anisopliae</i> ; um mutante espontâneo e mutantes obtidos pela exposição dos conídios à radiação UV-B.	UV-A e UV-B	6,5 kJ/ m ²	Conídios de vários mutantes de cor de <i>Metarhizium</i> sp. cultivados em meio artificial	Germinação Relativa	Os conídios produzidos em meio mínimo (MM) com fontes de carvão não	Braga et al., 2006
<i>M. anisopliae</i>	UV-B	7,04 kJ/ m ²	Conídios de vários meios artificiais	Germinação Relativa		Rangel et al., 2006a

<p><i>M. anisopliae</i>: cepa selvagem e mutantes; <i>M. robertsii</i>: cepa selvagem e mutantes e <i>M. acridum</i></p>	<p>UV-A, UV-B e luz visível (radiação solar simulada)</p>	<p>7,14 kJ/ m²</p>	<p>Conídios de meio artificial</p>	<p>Germinação Relativa</p>	<p>preferidas ou em MM apresentaram tolerância à UV-B pelo menos duas vezes mais do que conídios produzidos em meio BDAY. Os mutantes de cor de ARSEF 23 foram menos tolerantes à radiação UV do que os conídios da cepa selvagem. A cor teve menos impacto no ARSEF 2575 e seus mutantes. Os tipos selvagens de ARSEF 23 e ARSEF 2575 foram igualmente tolerantes à UV-A, mas diferiram na tolerância à UV-B. Conídios produzidos sob estresse nutricional foram duas vezes mais tolerantes à radiação UV-B do que os conídios produzidos em meio rico em nutrientes. A tolerância à UV-B aumentou com o aumento da concentração de sal no meio artificial.</p>	<p>Rangel et al., 2006b</p>
<p><i>M. anisopliae</i></p>	<p>UV-A e UV-B</p>	<p>169 mW m² (UV-A); 7,04 kJ/ m² (UV-B)</p>	<p>Conídios de meio artificial</p>	<p>Germinação Relativa</p>	<p>Conídios produzidos sob estresse nutricional foram duas vezes mais tolerantes à radiação UV-B do que os conídios produzidos em meio rico em nutrientes. A tolerância à UV-B aumentou com o aumento da concentração de sal no meio artificial.</p>	<p>Rangel et al., 2008</p>
<p><i>M. anisopliae</i></p>	<p>UV-A, UV-B, e UV-C (200 a 400 nm)</p>	<p>Não informado Exposição por 0, 1, 2, 3,</p>	<p>Conídios formulados em água ou em azeite com dois protetores solares.</p>	<p>Viabilidade</p>	<p>O azeite de oliva e os dois protetores solares protegeram os conídios</p>	<p>Hedimbi et al., 2008</p>

		4, e 5h	contra os raios UV			
<i>Metarhizium</i> spp.	UV-A e UV-B	0,005 a 1,1 J cm ⁻² (UV-B) e 1,0 a 18,0 J cm ⁻²	Conídios	Germinação Relativa	Os isolados testados foram mais sensíveis à UV-B do que à UV-A. A mortalidade de pulgões causada pelos isolados aumentou significativamente com a diminuição das doses de UV-B.	Yao et al., 2010
<i>M. acridum</i> ; <i>M. robertsii</i> tipo selvagem e um mutante albino	UV-B	0,9; 1,8; 3,6 e 5,4 kJ/ m ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa; frequência de dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD)	Atrasos na germinação estão diretamente relacionados às doses de UV e às frequências de CPD. A frequência de CPDs no mutante albino foi aproximadamente 10 vezes maior do que na cepa verde após uma fluência subletal de 1,8 kJ/m ² de radiação UV.	Nascimento et al., 2010
<i>M. robertsii</i> e seus mutantes interrompidos Δ Mrphr1, Δ Mrphr2, e Δ Mrphr1 Δ Mrphr2	UV-B seguido de fotorreativação ou irradiação solar	6, 10, 20, e 30 nW/cm ²	Conídios	Germinação Relativa	Na dose mais baixa, a UV atrasou significativamente a germinação de Δ Mrphr1 Δ Mrphr2 e Δ Mrphr1, mas não teve impacto em Δ Mrphr2. A fotorreativação aumentou as taxas de germinação da	Fang; St.Leger (2012)

					cepa selvagem e dos mutantes de disrupção simples.	
<i>M. anisopliae</i>	UV-A e UV-B	7,2 kJ/m ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa	A estabilidade dos conídios irradiados aumentou significativamente quando os conídios foram secos antes da exposição aos raios UV.	Legrand et al., 2013
<i>M. anisopliae</i>	UV-B e luz solar	509,33 a 605,05 W m ⁻²	Conídios oriundos de nematoides formulados em pó molhável usando fibra de trigo, goma arábica e caulim, pó molhável mais 10% de Tinoal LPW ou conídios mais óleo de palma.	Germinação Relativa	As porcentagens de germinação de <i>M. anisopliae</i> em todas as formulações não foram significativamente afetadas quando expostas à luz solar ou à irradiação UV-B por 1h ou por períodos prolongados de exposição (4-12h). Após 24h, todos os conídios estavam inviáveis, excetos os do grupo controle.	Loong et al., 2013
<i>M. acridum</i>	UV-B e indução de luz (branco, vermelho e azul/UV-A)	1,0 W m ² (UV-B); 5,3 W m ² (luz branca), 54 W m ² (luz	Micélio de meio artificial	Sobrevivência e viabilidade	Colônias previamente expostas a 2h de luz branca ou azul/UV-A apresentaram maior	Brancini et al., 2016

		vermelha), 60 W m ⁻² (azul/UV-A)			tolerância e maior retardo de crescimento após exposição à UV-B, ao contrário de colônias mantidas no escuro ou expostas à luz vermelha.	
<i>M. anisopliae</i> e seu mutante MAUV-40.1	UV-A	120 J cm ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa	A exposição à UV por 40 minutos reduziu a germinação na cepa selvagem, mas não teve efeito no mutante.	Zhao et al., 2016
<i>M. anisopliae</i>	UV-B	0,69, 2,075, 4,15, 8,3, 12,45 e 16,6 kJ/m ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa	As telas de fibra de vidro não alteraram a germinação dos conídios. Não houve impacto da UV-B na atividade aduítica de <i>M. anisopliae</i> e na conidiogênese em cadáveres de <i>Aedes aegypti</i> .	Falvo et al., 2016
<i>M. anisopliae</i>	UV-B	0,1 e 0,2 J cm ²	Conídios isolados de cadáveres de ácaros	Germinação Relativa	Os isolados de <i>M. anisopliae</i> exibiram taxas de germinação abaixo de 25% após exposição de 0,1 J cm ⁻² . Após uma fluência maior, não houve	Shin et al., 2017

					germinação de conídios.	
<i>M. guizhouense</i> ; <i>M. robertsii</i> ; <i>M. brunneum</i>	UV-B	1200 mW m ⁻²	Conídios de meio artificial e de diferentes habitats (solo, filoplano)	Germinação relative, viabilidade e crescimento da colônia	Taxas de germinação abaixo de 30% e baixas taxas de recuperação de conídios foram observadas para todas as cepas. O tempo de exposição para o adulto de <i>Ceratitis capitata</i> atingir uma redução de 50% na mortalidade foi de 47,2h, mais do que o necessário para uma redução de 50% na viabilidade dos conídios, que foi de 5,6h.	Fernández-Bravo et al., 2017
<i>M. anisopliae</i>	Simulador solar artificial	1000 W m ⁻²	Conídios de meio artificial com fotoprotetores lipossolúveis	Germinação Relativa	A germinação dos conídios expostos à radiação foi influenciada pelos fotoprotetores e concentrações utilizadas	Mochi et al., 2017
<i>M. robertsii</i> ; <i>M. acridum</i> ; <i>M. brunneum</i> ; <i>M. anisopliae</i>	Radiação solar artificial de amplo espectro	8,01 a 16,82 kJ/m ² . O isolados de <i>M. acridum</i> foi exposto às doses de 17,62 a 28,83 kJ/m ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa	<i>M. acridum</i> ARSEF 324 apresentou a maior tolerância à radiação; <i>M. brunneum</i> ARSEF 1187, <i>M. robertsii</i> ARSEF 2575 e <i>M. anisopliae</i> ARSEF 5749 tiveram tolerância	Dias et al., 2018

					moderada	
<i>M. acridum</i> e <i>M. robertsii</i>	UV-B E luz branca	3,9 e 6,24 kJ/m ² (UV-B) e 16 klux (luz branca)	Conídios de meio artificial [batata dextrose Agar (BDA), BDA suplementado com extrato de levedura a 1% (BDAY)] suplementado ou não com riboflavina (Rb)	Germinação Relativa e expressão gênica	A germinação relative dos conídios produzidos em BDA+Rb ou em BDAY foi maior em comparação aos conídios cultivados em BDA sem Rb, ou aos conídios suspensos em solução de Rb imediatamente antes da exposição à UV-B.	Pereira-Junior et al., 2018
<i>M. anisopliae</i>	UV-B	0,657 a 15,768 kJ/m ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa	A virulência de conídios contra larvas de Segundo instar de <i>Aedes aegypti</i> não foi afetada por nenhum dos níveis testados de radiação UV-B.	Falvo et al., 2018
<i>M. acridum</i> e <i>M. robertsii</i>	UV-B	7,14 kJ/m ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa	<i>M. acridum</i> ARSEF 324 foi duas vezes mais tolerante à radiação UV-B do que os isolados de <i>M. robertsii</i> .	Rangel; Roberts, 2018
<i>M. anisopliae</i> s.s.	Radiação solar artificial de	0,7, 1,3 e 2,6	Conídios	Germinação Relativa	As fluências de 0,7 e 1,3 kJ/m ² não foram	Acheampong

<i>M. anisopliaes.l.</i>	amplo espectro	kJ/m ²				prejudiciais aos isolados 24h após as exposições. A germinação relativa foi marcadamente atrasada (menos de 5%) 24h após a exposição a 2,6 kJ/m ² , exceto para conídios do produto comercial.	et al. (2019)
Produto comercial Real <i>Metarhizium</i> 69							
<i>M. robertsii</i>	Irradiação solar simulada	3,5 a 7,5 kJ/m ²	Conídios cultivados no escuro em BDA ou estresse nutritivo ou sob diferentes luzes contínuas (branca, luz azul de baixa irradiância, luz azul de alta irradiância, luz verde e luz vermelha)	Germinação Relativa		Os conídios produzidos sob estresse nutricional no escuro foram os mais tolerantes à UV. Os conídios produzidos sob luz azul de baixa irradiância foram os segundos mais tolerantes seguidos pela luz branca. Os conídios produzidos sob maior irradiância azul, verde e vermelho foram os menos tolerantes aos raios UV e menos tolerantes do que os conídios produzidos no escuro.	Dias et al. (2019)
<i>M. acridum</i> e seu mutante Δ MaCdc14	UV-B	1350 mW/m ²	Conídios	Germinação Relativa		Um aumento na tolerância à UV-B foi observado no mutante Δ MaCdc14, em comparação com a cepa	Gao et al., 2019

						selvagem	
<i>M. acridum</i> e <i>M. robertsii</i>	UV-A, radiação solar filtrada e luz branca	28,8, 57,6, 86,4, 100,8 kJ/m ² (UV-A); 34,5, 68,9, 103,35, 137,8 kJ/m ² (luz solar filtrada); 16 Klux (WL)	Conídios de meio artificial suplementado ou não com riboflavina	Germinação Relativa e padrões de expressão de alguns genes relacionados à fotoproteção	A riboflavina aumentou a tolerância à UV-A de ambos os isolados, bem como aumentou a transcrição de fotolases, lacases e policetídeos sintase.	Huarte-Bonnet et al., 2020	
<i>M. robertsii</i> , <i>M. anisopliae</i> e <i>M. acridum</i>	UV-B	1,4 a 8,1 kJ/m ²	Conídios e blastosporos	Viabilidade	Os conídios de <i>M. acridum</i> sobreviveram por mais tempo e tiveram uma taxa de inativação mais lenta do que os blastosporos. Conídios e blastosporos de <i>M. robertsii</i> e <i>M. anisopliae</i> foram igualmente tolerantes à radiação UV-B.	Bernardo et al., 2020	
<i>M. acridum</i> e seu mutante Δ MaPepDA	UV-B	1350 mW/m ²	Conídios	Germinação Relativa e padrões de expressão do gene MaPepDa	O gene MaPepDA afetou negativamente a tolerância à UV-B. Δ MaPepDA teve 40% e 18% de germinação após 3h e 4,5h de tratamento à UV-B, respectivamente, o que foi significativamente maior do que na cepa selvagem.	Li et al., 2020	
<i>M. robertsii</i> e seu mutante Δ MrGpa1	UV-B	100 μ J/cm ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa	A interrupção de MrGpa1 resultou em diminuição da	Tong et al., 2020	

<i>M. acridum</i> e seus mutantes Δ Macwh1, Δ Macwh43	UV-B	1350 mW/m ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa; padrões de expressão do gene da fotoliase phr1 e do gene da endonuclease UV uve-1	sensibilidade fúngica à irradiação UV. Em comparação com a cepa selvagem as taxas de germinação de Δ MrGpa1 após 16h aumentaram 83%, mas apenas 8% após 24h. Δ Macwh1 and Δ Macwh43 mostraram uma diminuição significativa na tolerância à radiação UV. O gene da fotoliase phr1 e o gene da endonuclease UV uve-1 foram significativamente sub-regulados em Δ Macwh43 and Δ Macwh1 versus a linhagem do tipo selvagem. Não foi possível prever qual tipo de propágulo seria o mais tolerante à UV-B para cada isolado fúngico. Em geral, os conídios misturados com o solo irradiado produziram um número semelhante de colônias aos conídios do solo não exposto.	Su et al., 2020
<i>M. acridum</i> ; <i>M. robertsii</i> ; <i>M. anisopliae</i> ; <i>M. pingshaense</i> ; <i>Metarhizium</i> sp.	UV-B	4,0 kJ/m ²	Conídios de meio artificial, suplementado ou não com óleo mineral; conídios misturados com 3 tipos diferentes de solo; blastosporos e microescleródios.	Germinação Relativa e viabilidade	Não foi possível prever qual tipo de propágulo seria o mais tolerante à UV-B para cada isolado fúngico. Em geral, os conídios misturados com o solo irradiado produziram um número semelhante de colônias aos conídios do solo não exposto.	Corval et al., 2021
<i>M. robertsii</i> e seus mutantes Δ wc1 and	UV-B	0,1 a 0,5 J cm ⁻²	Conídios de meio artificial	Conidiação e taxa de	Ambos os mutantes foram severamente	Peng et al., 2021

$\Delta wc2$				crescimento		
<i>M. anisopliae</i> ; <i>M. robertsii</i> ; <i>M. brunneum</i>	UV-B	4,76, 9,52, 14,28 e 19,04 kJ/m ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa	comprometidos quanto à resistência dos conídios à radiação UV-B. As proteínas WC1 e WC2 interagem para formar um fator de resgate responsivo à luz, regulando a fotoliase necessária para a resistência à radiação UV. Após 4h de exposição, as taxas de germinação foram superiores a 70% para todos os isolados. Após 6h de exposição, a maioria dos isolados apresentou declínio na germinação dos conídios. Após 8h de exposição, nove isolados apresentaram germinação abaixo de 5%. A produção de conídios diminuiu de maneira dependente do tempo. A radiação UV-B afetou a	Couceiro et al., 2021
<i>M. robertsii</i>	UV-B	2,31 a 23,10 kJ/m ²	Pellets miceliais e microescleródios	Germinação Relativa	esporogênese dos microescleródios. A susceptibilidade dos grânulos miceliais foi maior do que a dos microescleródios.	Paixão et al., 2021
<i>M. anisopliae</i>	UV-B	0,65 a 7,8 kJ/ m ²	Conídios e microescleródios	Germinação Relativa	A viabilidade dos conídios começou a diminuir	Santos et al., 2021

<i>M. brunneum</i> ; <i>M. robertsii</i> ; <i>M. anisopliae</i>	UV-B	3,5 a 7,5 kJ/m ²	Conídios de meio artificial	Germinação Relativa	<p>abruptamente na fluência de 3,9 kJ/m²; os microescleródios mostraram-se mais tolerantes que os conídios e sua viabilidade começou a diminuir na fluência de 10 kJ/m².</p> <p>O crescimento micelial sob luz branca constant aumentou a tolerância à radiação UV nos conídios do isolado <i>M. robertsii</i>. O crescimento micelial sob estresse nutricional induziu um aumento da tolerância à UV nos conídios.</p>	Dias et al., 2021
<i>M. anisopliae</i>	UV-B	Não informado	Conídios de meio artificial	Viabilidade	<p>Todos os isolados testados foram afetados pela irradiação UV-B com taxas variáveis de sobrevivência.</p> <p>Não houve efeito significativo da exposição de microescleródios à UV-B na germinação e rendimento de UFC dos isolados.</p>	Sutanto et al., 2022
<i>M. brunneum</i> ; <i>M. robertsii</i>	UV-B	1200 mWm ⁻²	Microescleródios no solo	Germinação Relativa	<p>Não houve efeito significativo da exposição de microescleródios à UV-B na germinação e rendimento de UFC dos isolados.</p>	Yousef-Yousef et al., 2022

Anexo 2: Protocolo do Kit de Extração de RNA Total – Rneasy Mini Kit - Qiagen

Antes de iniciar a extração:

- A. B-mercaptoetanol (β -ME) deve ser adicionado ao tampão RLT antes do uso. Adicionar 10 μ l de β -ME para 1 mL de tampão RLT. Recomenda-se o uso de 600 μ l de tampão para cada amostra.

Extração:

1. Adicionar 600 μ l de tampão RLT, já com β -ME em tubos de 1,5mL.
2. Adicionar a amostra.
3. Centrifugar o lisado por 3 minutos a 18.000g
4. Remover o sobrenadante com a pipeta e transferir para um novo tubo de 1,5mL.
5. Adicionar um volume igual do sobrenadante de etanol a 70% com DEPC, homogeneizar imediatamente por inversão e ir para a próxima etapa.
6. Transferir 700 μ l da amostra para coluna de sílica com tubo coletor de 2mL. Centrifugar por 30 segundos a 8.000g, descartar o líquido e reutilizar o tubo. *Se o volume da amostra exceder 700 μ l, repita o passo 6
7. Adicionar 700 μ l do tampão RW1 na coluna. Centrifugar por 30 segundos a 8.000g, descartar o líquido e reaproveitar o tubo.
8. Adicionar 500 μ l do tampão RPE na coluna. Centrifugar por 30 segundos a 8.000g, descartar o líquido e reutilizar o tubo.
9. Adicionar 500 μ l do tampão RPE na coluna. Centrifugar por 2,15 minutos a 8.000g, descartar o tubo coletor junto com o líquido e colocar a coluna em um novo tubo de 2mL.
10. Centrifugar a 8.000g por mais 1 minuto para secagem da sílica, invertendo a posição da coluna em 180° na centrífuga.
11. Colocar a coluna em um novo tubo de 1,5mL. Adicionar 50 μ l de RNase-free water diretamente na membrana da coluna e centrifugar por 1 minuto a 8.000g.

Anexo 3:

Contagem de leituras sequenciadas, após remoção de adaptadores de sequenciamento e remoção de bases e sequências de baixa qualidade, separadas com bibliotecas com leituras pareadas ("Leituras HQ (PE)") e leituras que perderam seus pares durante o processamento ("Leituras HQ (SE R1/R2)").

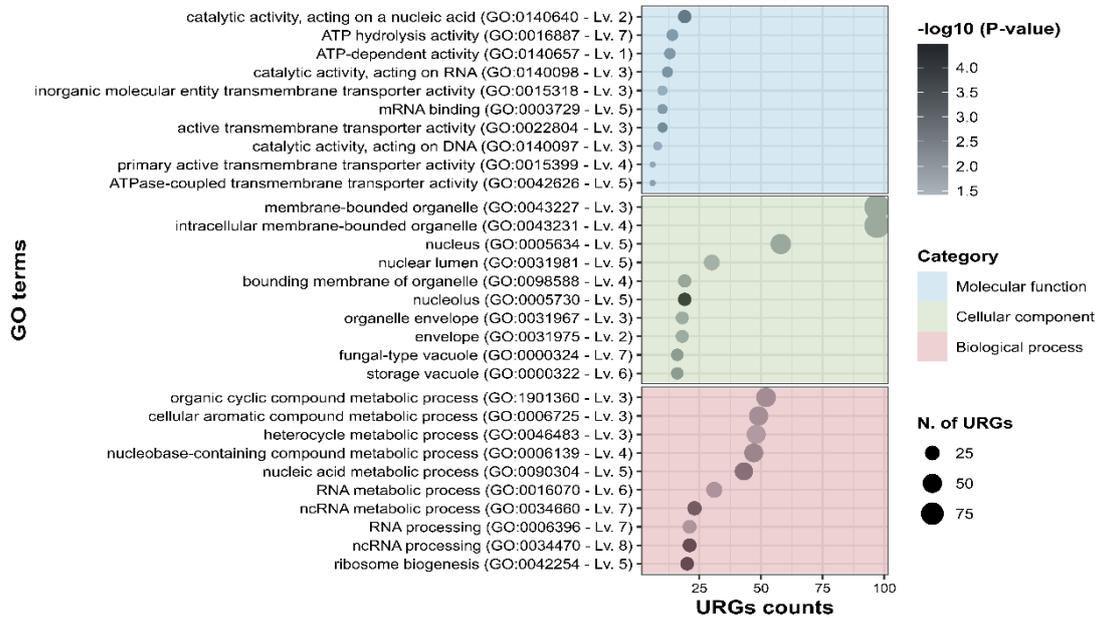
Amostra	Leituras Sequencia das (PE)	Sem adaptadores (PE)	Sem bases e sequências de baixa qualidade (PE)	Leituras HQ (SE R1)	Leituras HQ (SE R2)
CTR1	12.067.090	12.066.612	11.387.444	289.326	208.383
CTR2	12.963.598	12.963.404	12.376.447	257.608	189.565
CTR3	11.463.871	11.463.482	10.912.505	245.233	112.422
UV1	12.008.768	12.008.731	11.336.856	297.842	192.746
UV2	11.799.179	11.799.124	11.172.738	256.377	193.122
UV3	12.080.394	12.080.184	11.541.795	228.264	181.805

Anexo 4:

Contagem de leituras mapeadas contra o genoma de referencia *Metarhizium robertsii* ARSEF 23. São descritas as sequências que mapearam de forma única e múltipla, também aquelas que não foram mapeadas. As porcentagens referem-se à proporção de leituras de boa qualidade (pós-processamento) mapeadas.

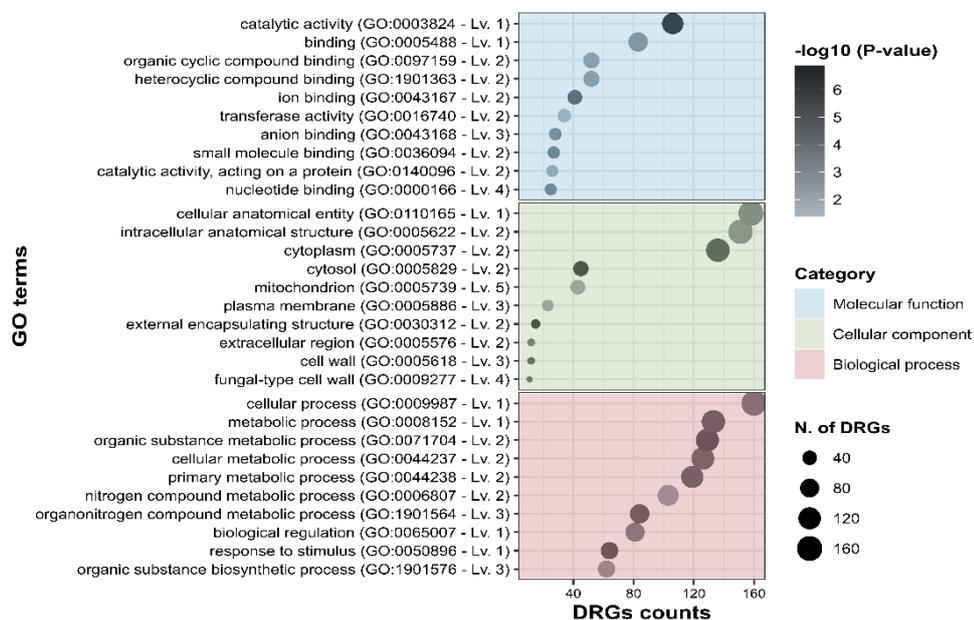
Amostra	Mapeamento Único		Mapeamentos Múltiplos		Não Mapeado	
	(PE + SE)		(PE + SE)		(PE + SE)	
CTR1	7.248.491	(60,99%)	4.633.686	(38,99%)	2.976	(0,03%)
CTR2	8.717.577	(67,98%)	4.103.174	(32,00%)	2.869	(0,02%)
CTR3	7.742.276	(68,70%)	3.526.382	(31,29%)	1.502	(0,01%)
UV1	7.048.345	(59,59%)	4.775.899	(40,38%)	3.200	(0,03%)
UV2	7.028.707	(60,48%)	4.590.561	(39,50%)	2.969	(0,03%)
UV3	7.275.685	(60,87%)	4.672.910	(39,10%)	3.269	(0,03%)

Anexo 5:



Análise de enriquecimento de termos GO (Gene Ontólogo) dos genes induzidos (URGs) de blastosporos de *Metarhizium pingshaense* em relação à exposição à radiação UV-B. São demonstradas as porcentagens de URGs nos 10 termos mais expressivos de cada categoria funcional.

Anexo 6:



Análise de enriquecimento de termos GO (Gene Ontólogo) dos genes suprimidos (DRGs) de blastosporos de *Metarhizium pingshaense* em relação à exposição à radiação UV-B. São demonstradas as porcentagens de DRGs nos 10 termos mais expressivos de cada categoria funcional.