

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

***Metarhizium* spp.: Seleção de isolados, ação antimicrobiana e eficácia de formulações granulares no controle de *Rhipicephalus microplus*.**

**ALLAN FELIPE MARCIANO**

**2021**



**UFRRJ**

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

***Metarhizium* spp.: SELEÇÃO DE ISOLADOS, AÇÃO  
ANTIMICROBIANA E EFICÁCIA DE FORMULAÇÕES  
GRANULARES NO CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus*.**

**ALLAN FELIPE MARCIANO**

*Sob a Orientação da Professora PhD*  
**Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2021

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

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

MM319m Marciano, Allan Felipe , 1990-  
Metarhizium spp.: Seleção de isolados, ação antimicrobiana e eficácia de formulações granulares no controle de Rhipicephalus microplus. / Allan Felipe Marciano. - São José do Campos, 2021.  
92 f.: il.

Orientadora: Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt. Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Pós-graduação em Ciências Veterinárias , 2021.

1. biopesticidas. 2. carrapato dos bovinos. 3. fungo entomopatogênico. I. Bittencourt, Vânia Rita Elias Pinheiro , 1959-, 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 166 / 2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.008111/2021-20

Seropédica-RJ, 05 de fevereiro de 2021.

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

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

TESE APROVADA EM 04/02/2021

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 05/02/2021 15:59 )*  
ISABELE DA COSTA ANGELO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DESP (12.28.01.00.00.00.52)  
Matricula: 2860277

*(Assinado digitalmente em 05/02/2021 16:31 )*  
PATRICIA SILVA GOLO  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matricula: 2221855

*(Assinado digitalmente em 05/02/2021 16:22 )*  
VANIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matricula: 387922

*(Assinado digitalmente em 05/02/2021 17:38 )*  
GABRIEL MOURA MASCARIN  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 319.270.758-58

*(Assinado digitalmente em 05/02/2021 16:05 )*  
CAIO MÁRCIO DE OLIVEIRA MONTEIRO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 058.965.206-03

Para verificar a autenticidade deste documento entre em  
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **166**, ano:  
**2021**, tipo: **ATA**, data de emissão: **05/02/2021** e o código de verificação: **745a2618ee**

## AGRADECIMENTOS

A.gra.de.cer – “mostrar ou manifestar gratidão, render graças; penhorar, reconhecer”. E é com o coração cheio que venho tentar externalizar todo meu sentimento de gratidão e reconhecimento por tantas pessoas que agregaram de alguma forma na minha jornada. Me tornar um doutor é muito além de uma conquista acadêmica, é uma realização pessoal que, sem dúvidas, me faz ser um profissional maduro.

Quando paro, olho para trás e tento nomear todas as pessoas que contribuíram na minha caminhada, é impossível lembrar de todos. Afinal, toda e qualquer experiência de vida me faz ser um ser humano melhor, e acredito muito que não há distinção entre vida pessoal e profissional, todo esse emaranhado, todas as experiências constrói um só ser humano, fortifica em mim todos os meus valores e que serão levados para onde quer que eu vá.

Se há um contexto no qual é imprescindível que haja um desenvolvimento de competências emocionais, é o da família. Eles me ensinam diariamente a ser emocionalmente inteligente com o objetivo de viver com maior bem-estar, me dão forças para seguir. Sendo assim, me faltam palavras para agradecer a quem nunca me deixa falta amor, exemplo de fé e perseverança. Aos meus pais, Antonio e Fátima, fica aqui demonstrado o meu eterno amor e gratidão por vocês. Ao meu irmão Felix e minha cunhada Luana, ao meu irmão Altieres, a minha irmã Fernanda e meu cunhado Rogério, obrigado por acreditarem em mim, por viverem comigo todos os meus sonhos e por compartilharem experiências que sempre me permitiram errar menos. O companheirismo, a torcida de vocês foram fundamentais na minha trajetória. Aos meus sobrinhos, Andrew, Naila, João Pedro, Ana Beatriz e Ana Lúcia, obrigado por sempre despertar em mim a criatividade de uma criança, obrigado por me mostrarem que a vida pode ser mais leve, obrigado por tirarem sorrisos largos do meu rosto. Ainda no âmbito familiar, não posso deixar de agradecer a Maryella, com quem venho planejando o meu futuro, com quem vou construir a minha família. Quanto mais o casal ama, mais de aproxima de Deus. No amor conjugal, um deve saber aceitar sofrer pelo outro. Isso significa saber amar, saber doar-se, e isso me fez amadurecer muito como homem. Também não posso deixar de agradecer à família da Maryella que sempre me acolheu tão bem, me deram um amor como de filho.

Aos meus professores, que me ensinaram muito além da intelectualidade eles contribuíram fortemente para o meu desenvolvimento social e emocional, eles foram peças chaves na minha formação. À Professora Vânia Bettencourt (UFRRJ), que sempre confiou em mim e no meu trabalho, foram quase 10 anos de convivência, ela conseguiu acompanhar meu processo de amadurecimento, ela depositou em mim esperança e eu espero muito ter conseguido retribuir de alguma forma com as minhas entregas. Professora, levarei para sempre comigo o seu nome, os seus ensinamentos o seu exemplo de dedicação e profissionalismo, me faltará sempre palavras para externalizar a minha gratidão por tudo o que a senhora se dispôs a fazer por mim. À Professora Patrícia Golo (UFRRJ) que exemplo de garra, de perseverança, obrigado por me agregar tanto, obrigado por todo o seu intermédio para que eu conseguisse umas das maiores experiências da minha vida, ir para o Canadá. Aproveitando, minha gratidão se estende à Deborah Henderson pelo período de experiência no Kwantlen's Institute for Sustainable Horticulture (KPU-ISH). À professora Isabelle Angelo, que mesmo na correria do dia a dia sempre lembrou de mim com carinho e fez contribuições importantíssimas na minha carreira. Gostaria de agradecer a professora Shana Matos (UFRRJ) e sua equipe de pesquisa, em especial a Thereza Patrício que me ajudou diretamente nos ensaios e ao Professor Harrison Azevedo (UFRRJ) e a todos do LASAV que foram colaboradores importantes nas pesquisas que envolveram microbiologia e biologia molecular respectivamente. A todos os professores/pesquisadores, que mesmo longe, contribuíram, e muito, para o meu desenvolvimento, Everton Fernandes (UFG), Wendell Perinotto (UFRB), Simone Quinelato (Fiocruz), Caio Monteiro (UFG), sem vocês seria muito mais difícil chegar aqui. Obrigado!

Aos meus amigos do LCM (Mariana, Michel, Maria, Fillipe, Paula, Caio, Jessica, Zé, Emily, Ricardo, Laura, Amanda, Thais, Adriani, Nathalia, Julie, Pamela, Fernanda, Victoria, Lucas, Matheus, Iury, Haika, Gabi), vocês estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis, vocês foram amigos, vocês consolaram, riram, choraram, se desesperaram, viraram noites, fizeram café, pediram comida... Só vocês viveram comigo todas as emoções desse doutorado, vocês contribuíram muito tanto tecnicamente como emocionalmente, vocês estiveram PRESENTES e não cabe em mim a satisfação, a gratidão e o orgulho de tudo o que vivemos, vocês são incríveis! Essa vitória é de vocês! Ao Zeca, Sr. Onofre, Adonis e todos os técnicos e funcionários do Departamento de Parasitologia Animal que nunca mediram esforços para me ajudar, obrigado! Ao Marcos e o Renato e todos do laboratório do IPTSP - UFG pela a parceria e suporte nos estudos com a formulação granular, vocês foram muito parceiros, muito disponíveis e esse caminho seria muito mais tortuoso se não fossem vocês. Aos meus colegas e amigos de Alojamento, conviver em comunidade é sempre o desafio e vocês me ensinaram muito sobre empatia, sobre trabalho em equipe, sobre cuidar do próximo. Estar no alojamento por tantos anos me ensinou muito e me permitiu, sem dúvidas, me tornar um ser humano mais humano, mais solidário. Ao Gabriel Mascarin, com quem eu tive o imenso prazer te trocar muitas experiências nessa reta final, o meu agradecimento é especial. Gabriel, você chegou, sentiu minhas dores, e me conduziu muito bem rumo a publicação do artigo. Você é um exemplo de líder. Você se empenhou, de abdicou para me ajudar. Reconheço todo o seu esforço e serei eternamente grato a todas as suas contribuições na minha vida. Gostaria muito de agradecer ao Stefan Jaronski pela disponibilidade e presteza, por todos os ensinamentos e pela contribuição no artigo, foi uma experiencia muito lucrativa e valiosa, obrigado! A toda equipe Lallemand Plant Care que dividiu comigo esses últimos meses a esperança dessa conquista, me deram mais conhecimento e suporte para chegar até aqui. Obrigado por acreditarem no meu potencial para somar ao time, na busca de ferramentas cada vez mais fortes para o controle biológico de pragas no mundo. À Terryn Goble, obrigado pela confiança depositada em mim diariamente, obrigado por me desenvolver, por me tirar da zona de conforto, obrigado por me desejar bem e contribuir para o meu sucesso.

Por fim, e não menos importante, obrigado DEUS por ter me dado a chance de viver tudo isso. Obrigado por ter colocado no meu caminho pessoas tão especiais que contribuíram muito para o meu desenvolvimento. Obrigado DEUS, por sua proteção diária, por me guiar sempre para o melhor caminho.

Agradecimento à CAPES: "O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)-Código de Financiamento 001"

## **BIOGRAFIA**

Allan Felipe Marciano, filho de Antônio Fernandes Marciano e Maria Aparecida de Fátima Marciano, nasceu em 06 de abril de 1990, no município de São José dos Campos, SP. Em setembro de 2009 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária e em 2011, ingressou no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária, como bolsista de Iniciação Científica e sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia R. E. P. Bittencourt permanecendo até o final de sua graduação.

Após obter o título de bacharel, em março de 2015 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) na UFRRJ, se tornando mestre em ciências em 2016. No mesmo ano, participou de uma seleção interna do PPGCV e foi selecionado para realizar a mudança de nível para Doutorado, tendo iniciado seus estudos em 2017, quando foi também contemplado pelo programa canadense Emerging Leaders in the Americas Program (ELAP), para desenvolver pesquisas relacionadas a sua tese no Institute for Sustainable Horticulture da Kwantlen Polytechnic University.

Durante o doutorado também teve a oportunidade de integrar um programa de intercâmbio em ecologia e manejo de recursos naturais na Universidade de Maryland – EUA. Em sua trajetória participou de congressos e foi premiado em simpósios, participou de bancas de conclusão de curso e publicou artigos científicos em periódicos nacionais e internacionais.

## RESUMO

MARCIANO, Allan Felipe. ***Metarhizium* spp.: Seleção de isolados, ação antimicrobiana e eficácia de formulações granulares no controle de *Rhipicephalus microplus***. 2021. 92p. Tese (Doutorado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

*Metarhizium* sp. é encontrado no solo e em raízes de plantas e a pastagem é um ambiente propício para o desenvolvimento desse entomopatogênico, tornando a rizosfera de forrageiras e a presença de hospedeiros como o carrapato *Rhipicephalus microplus* um nicho ecológico ideal. Porém, fatores bióticos e abióticos interferem na persistência fúngica, sendo fundamental selecionar bons isolados, considerar as interações ecológicas com outros microrganismos e formulá-los. Baseado nisso, o presente trabalho apresenta estudos aplicados ao gênero *Metarhizium* no controle de pragas. Foram avaliados: a tolerância térmica e a capacidade de diferentes isolados do fungo em colonizar tecidos da planta *Vigna radiata*; a expressão do gene de adesão na planta em diferentes substratos; o efeito antimicrobiano e acaricida do exsudato fúngico; e a eficácia de formulações granulares de microescleródios (MS) e blastosporos (BLS) para o controle *R. microplus*. No ensaio de tolerância térmica, suspensões conidiais foram expostas a 25°C, 40°C e 45°C, por 2h, 4h, 8h e 12h, e posteriormente a germinação foi avaliada após incubação por 48h a 25 ± 1°C, para a atividade dos isolados no frio esses foram submetidos à temperatura de 5°C durante 14 dias, selecionando assim os termotolerantes. Para o estudo de colonização endofítica, sementes, raiz, caule e folha de *V. radiata* foram tratadas com suspensões de diferentes isolados, e a colonização dos tecidos do vegetal foi avaliada. No ensaio de expressão gênica, após o cultivo do fungo sobre meio mínimo (MM), meio batata dextrose ágar (BDA) e sobre a planta, a expressão do Gene *mad2* foi observada. Para avaliar o efeito do exsudato de *Metarhizium* sp. no carrapato e em bactérias, o líquido resultante da exsudação de colônias foi coletado e a partir do teste de difusão em disco sobre cepas de duas bactérias isoladas do solo e sobre cepas resistentes e sensíveis de *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli* foi avaliado. Para o efeito acaricida, o exsudato fúngico foi inoculado nas fêmeas do carrapato e parâmetros biológicos, mortalidade e resposta celular do artrópode foram avaliadas. Por último, no teste de eficácia de formulações granulares de MS e BLS, vasos contendo *Urochloa decumbens* foram tratados com os grânulos, e posteriormente fêmeas de *R. microplus* foram introduzidas. Foram avaliados, a mortalidade, o número de larvas infestantes, assim como a persistência do fungo no solo. Quanto aos resultados, no teste de tolerância térmica, todos os isolados de *Metarhizium* spp testados germinaram mais que 90% após 12h a 40 °C e após a incubação no frio. Foram considerados bons isolados, aqueles que não sofreram variação drástica na germinação ao longo do tempo de exposição. Ao avaliar a capacidade de colonizar *V. radiata*, todos os isolados testados foram capazes de colonizar raízes, caules e folhas, havendo variação na colonização dos diferentes tecidos. Quando o fungo se desenvolveu sobre a planta o gene *mad2* foi mais expresso que em BDA, porém foi no MM que o gene foi mais expresso. O exsudato fúngico foi capaz de inibir o crescimento das cepas resistente e sensível de *Staphylococcus* spp., e afetou mais as cepas de bactérias isoladas do solo do que as demais quando comparadas entre si. O exsudato também afetou diretamente o carrapato, reduzindo a resposta celular, causando morte e diminuição da postura de ovos. As formulações granulares de *M. robertsii* mostraram-se eficazes em controlar o carrapato nas condições testadas e o isolado fúngico colonizou a rizosfera da de *U. decumbens*. Este estudo fornece dados sobre a aplicação de isolados de *Metarhizium* spp. no solo e contribui para futuras pesquisas e bioprospecção desse microrganismo.

**Palavras-chave:** biopesticidas, carrapato dos bovinos, fungo entomopatogênico.

## ABSTRACT

MARCIANO, Allan Felipe. ***Metarhizium* spp.: Isolates screening, antimicrobial action and granular formulations efficacy in the control of *Rhipicephalus microplus***. 2021. 92 p. Thesis (Doctor in Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

*Metarhizium* sp. species could be found in soil and plant roots, and the pasture is ideal environment for this fungus development, where the plant's rhizosphere and the presence of hosts such as the tick *Rhipicephalus microplus* make the best ecological niche. However, biotic and abiotic factors interfere on its persistence been essential to select good isolates, consider ecological interactions with other microorganisms, and formulate them. Based on this, the present study considers the applicability of the genus *Metarhizium* spp. in pest control. Were evaluated: thermal tolerance and the ability of different isolates of the fungus to colonize tissues of the *Vigna radiata* plant; the antimicrobial and acaricidal effect of fungal exudate; and the effectiveness of granular formulations of microsclerotia (MS) and blastospores (BLS) to control cattle ticks. In the thermal tolerance test, conidial suspensions of the fungus were exposed to 25 ° C, 40 ° C and 45 ° C, for 2h, 4h, 8h and 12h, the germination was evaluated after incubation for 48h at 28 ± 1 ° C, and also the cold activity of the isolates (at 5 ° C for 14 days) were evaluated, based on that, thermal tolerant isolates were selected. For the study of endophytic colonization, seeds, root, stem, and leaf of *V. radiata* were treated with fungus suspensions, and the colonization of the plant tissues by different isolates was evaluated. In the gene expression assay, after cultivating the fungus on minimal medium (MM), potato dextrose agar (BDA) and on the plant, the expression of the *mad2* gene was observed. To assess the effect of *Metarhizium* sp. exudate on ticks and bacteria, the liquid resulting from colonies exudation was collected. Then, using disk diffusion test, the effect on strains of two bacteria isolated from the soil and on resistant and sensitive strains of *Staphylococcus* and *Escherichia coli* was evaluated. For the action on ticks, the fungal exudate was inoculated in tick females and the biological parameters, mortality, and immune response of the arthropod were evaluated. Finally, for the test with MS and BLS granular formulations, pots containing *Urochloa decumbens* were used and their soil was treated with the granular formulations, where later *R. microplus* females were introduced and the mortality, the number of larvae obtained in each group, as well as the persistence of the fungus in the soil were evaluated. As regards to the results, in the thermal tolerance test, all *Metarhizium* spp. isolates tested germinated more than 90% after 12h at 40 ° C and after the be cooled, been considered good isolates those that did not suffer drastic variation in germination over the time of exposure. When evaluated the ability to colonize *V. radiata*, all tested isolates were able to colonize roots, stems, and leaves, with variation in the colonization of different tissues. When the fungus developed on the plant, the *mad2* gene was more expressed than in PDA, but it was in the MM that the gene obtained greater expression. The fungal exudate was also able to inhibit the growth of the resistant and sensitive strains of *Staphylococcus* spp., and it affected more the strains of bacteria isolated from the soil than the others. The exudate also directly affected engorged *R. microplus* females, reducing the cellular response, causing death, and decreased egg production. The treatment with different concentrations of granular formulations of *M. robertsii* proved to be effective in controlling the cattle tick under the conditions tested and the fungus isolate colonized *U. decumbens* rhizosphere. This study provides data about the application of *Metarhizium* spp. in the soil and contributes to future research, showing the bioprospecting of this microorganism.

**Keywords:** biopesticide, cattle tick, entomopathogenic fungus.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1** – Isolados de *Metarhizium* spp. utilizados para testes de colonização endofítica e isolados selecionados para o ensaio de tolerância térmica (\*). Os fungos foram agrupados de acordo com a identificação na coleção do Kwantlen's Institute for Sustainable Horticulture (ISH) e seguidos pelo gênero ou espécie, substrato e região de origem. **28**

**Tabela 2** - Genes utilizados nos ensaios de expressão, seguidos da sequência de primers e tamanho dos produtos e eficiência da PCR. **32**

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Cepas de bactérias utilizadas no ensaio para avaliação do efeito antimicrobiano do exsudato produzido pelo isolado CG146 de *Metarhizium anisopliae* s.l.. Cepas padrões para testes de sensibilidade oriundas do American Type Culture Collection (ATCC), do Culture Collection University of Gothenburg (CCUG) e cepas isoladas do solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **52**

**Tabela 2.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros reprodutivos e porcentagem de mortalidade de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com exsudato de *Metarhizium anisopliae* s.l. (IN) e três grupos controle: sem inoculação (SIN), grupo inoculado apenas com água destilada estéril (INA) e grupo perfurado com a agulha sem inoculação (PSIN). **53**

### CAPÍTULO III

**Tabela 1** Rendimento conidial (germinação esporogênica) pelas formulações granulares de microesclerotia (MS) ou blastosporos (BLS) de *Metarhizium robertsii* (IP 146) em diferentes tipos de substratos. **72**

**Tabela 2** – Eficácia relativa (%) dos tratamentos sobre a geração de carrapato, obtido em três períodos de avaliações após a exposição das fêmeas de *Rhipicephalus microplus* ao solo tratado com 0,5 ou 0,25 mg/cm<sup>2</sup> de formulações granulares contendo microesclerotia (MS-G) ou blastosporos (BLS-G) de *Metarhizium robertsii*. Na primeira e segunda avaliações, foi avaliado o efeito imediato e residual da primeira aplicação do fungo no solo, respectivamente, enquanto na terceira avaliação foi registrado o efeito de uma nova aplicação desses tratamentos fúngicos. **75**

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1-** Cultivo de feijão mungo (*Vigna radiata*) em sala climatizada para utilização nos ensaios de capacidade endofítica de *Metarhizium* spp. A. Vasos contendo três mudas de 7 dias, antes da seleção da planta mais vigorosa. B. Grupos formados com cinco vasos contendo uma muda selecionada em cada após o surgimento das folhas verdadeiras. C. Grupos de vasos, recobertos com saco plástico para favorecer a internalização fúngica, após o tratamento do solo e das mudas com *Metarhizium* spp. **29**

**Figura 2** - Colonização endofítica de *Vigna radiata* (feijão mungo) por *Metarhizium* spp., após o tratamento de diferentes partes da planta com suspensões aquosas do fungo. A parte superior da imagem mostra placas do grupo controle contendo folhas (A), Caules (B) e Raízes (C) que não apresentaram crescimento fúngico após 14 dias de incubação. Na parte inferior da imagem mostra placas do grupo tratado com folhas (D), caule (E) e raízes (F) apresentando o crescimento de *Metarhizium* spp. após 14 dias de incubação. **33**

**Figura 3** - Percentual da colonização endofítica por diferentes isolados de *Metarhizium* spp. em *Vigna radiata* (Feijão Mungo) considerando todos os tecidos analisados (raiz, caule e folhas), após o tratamento da planta com as suspensões conidiais. Letras diferentes indicam significância estatística na comparação entre isolados fúngicos e barras indicam desvio padrão. **34**

**Figura 4** - Porcentagem média da colonização das diferentes partes de *Vigna radiata* (Feijão Mungo) por *Metarhizium* spp. após serem tratadas com os diferentes do fundo. Dados médios consideram a colonização observadas em todos os isolados. Letras diferentes indicam significância estatística na comparação entre tecidos e barras indicam desvio padrão. **35**

**Figura 5** - Colonização endofítica observada na folha, caule e raiz de *Vigna radiata* (Feijão Mungo) após o tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium* spp. Letras diferentes indicam significância estatística na comparação entre tecidos no mesmo tratamento (isolado) e barras indicam desvio padrão. **35**

**Figura 6** - Média da porcentagem relativa da germinação de isolados de *Metarhizium* spp. após exposição ao calor úmido a temperaturas de 40 ° C (barras abertas) e 45 ° C (barras fechadas) por 2, 4, 8 e 12 h. A germinação relativa foi calculada em relação aos controles não expostos. Letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa na comparação entre isolados expostos à mesma temperatura. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa na comparação das temperaturas para um mesmo isolado. Erro padrão a 95% ( $p = 0,05$ ). **37**

**Figura 7** – Expressão relativa e desvio padrão do gene *mad2* de conídios do isolado ISH 90 crescidos em meio mínimo (mm), meio batata dextrose ágar (BDA) ou sobre *Vigna radiata* (planta). Os genes *gpd* e *tef* foram utilizados como genes de referência. As quantidades relativas foram baseadas em níveis de expressão calculado pelo geNorm qbase PLUS®. Asteriscos indicam  $p < 0,05$  na comparação da expressão do gene *mad2* entre as três condições testada. **38**

## CAPÍTULO II

**Figura 1** - Concentração de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* obtida 24 horas após a inoculação de fêmeas do carrapato com o exsudato produzido por *Metarhizium anisopliae* s.l.. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \geq 0,05$ ). Kruskal-Wallis seguido por Dunn. **53**

**Figura 2** - Comparação do tamanho médio de halos de inibição, formados após a aplicação do exsudato do isolado CG 148 de *Metarhizium anisopliae* s.l. no teste de difusão em disco, sobre cepas de bactérias sensíveis (S) ou resistentes (R) a antibióticos e sobre duas cepas de bactérias isolados do solo. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \geq 0,05$ ). **54**

## CAPÍTULO III

**Figura 1** - Linha do tempo ilustrando os períodos climáticos e parâmetros ambientais, assim como os dias em que ocorreram as aplicações das formulações granulares de *Metarhizium robertsii*, os períodos de avaliação sobre o carrapato, dias das coletas do solo, das coletas de raízes, das exposições das fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus* ao solo tratado e das coletas de larvas ao longo dos 337 dias de teste em condições seminaturais. Os pontos indicam o valor médio da variável climática nos dias indicados. **65**

**Figura 2** - Arranjo de potes contendo *Urochloa decumbens* cv. Basilisk distribuídos aleatoriamente nos quatro grupos de tratamento (BLS-G 0,25; BLS-G 0,5; MS-G 0,25; MS-G 0,5 g/cm<sup>2</sup>) e um grupo de controle (CTRL), em condições de campo na Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica Wilhelm Otto Neitz (EPPWON) - UFRRJ (22° 45' 54,9" Sul e 43° 41' 57,2" Oeste, 24 m a.s.l.). A) Grânulos distribuídos sobre a superfície do solo dos vasos; B) Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* no solo tratado com a formulação granular de *Metarhizium robertsii* durante o período de postura e formulação granular (cor branca) na massa de ovos; C) Larvas no ápice do capim após eclodir. **66**

**Figura 3** - Grânulos do isolado de *Metarhizium robertsii* IP 146 apresentando esporulação micelial (A) e conidiogênica (B) visualizado durante a avaliação da viabilidade fúngica sob um microscópio estereoscópio. Barra de escala = 0,5 mm. **67**

**Figura 4** - Viabilidade conidial após a germinação esporogênica de grânulos de *Metarhizium robertsii* incubados em diferentes tipos de substrato (água de ágar, solo não estéril e solo estéril). As barras verticais (médias  $\pm$  95% DE CI = intervalo de confiança) seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes, dentro de cada propagule fúngico (MS = microescleródio e BLS = blastosporos)(Tukey HSD,  $P < 0,05$ ). **72**

**Figura 5.** Impacto de formulações granulares de microescleródio e blastosporos de *Metarhizium robertsii* na densidade de larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus* em vasos contendo *Urochloa decumbens*. Número de larvas do carrapato contadas após a aplicação no solo de 0,5 ou 0,25 mg/cm<sup>2</sup> de grânulos à base de microclerotia (MS-G) ou blastosporos (BLS-G). A) O número médio de larvas comparadas entre os tratamentos em três períodos de avaliações, quando fêmeas de *R. microplus* foram expostas ao ambiente tratado. Na primeira e segunda avaliação, foi avaliado o efeito imediato e residual da primeira aplicação fúngica, respectivamente, na terceira avaliação o efeito de uma nova aplicação das formulações foi

verificado. **B)** Efeito global obtido no número de larvas de carrapato nas três avaliações ao longo do período de teste, considerando os dois tratamentos fúngicos. Médias ( $n = 8$ ) são pontos e as barras representam intervalos de confiança de 95%. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas (teste de Tukey HSD  $P < 0,05$ ). Dados brutos são pontos sombreados. **74**

**Figura 6** - Probabilidade de sobrevivência de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* ao longo dos dias, após a exposição ao solo tratado com diferentes doses (0,5 e 0,25 g/cm<sup>2</sup>) das formulações granulares de microscleródio (MS) e blastosporos (BLS) de *Metarhizium robertsii*. A linha tracejada indica o tempo letal mediano (50%). P-valor é mostrado e não é significativo em 5% de probabilidade (Teste de razão de probabilidade (LRT) = 0,88,  $df = 4$ ,  $P = 0,95$ ). **76**

**Figura 7** - Persistência fúngica no solo de vasos tratados com formulações granulares de *M. robertsii*. Box plot de unidades formadoras de colônias (UFC) de *M. robertsii* por grama de solo obtido após a 1ª e 2ª aplicação dos grânulos no solo em condições seminaturais. As caixas mostram a mediana, 25º e 75º percentis, enquanto as barras de erro mostram 10º e 90º percentis. As médias ( $n = 8$ ) são losangos negros e seguidos por letras distintas que indicam diferença significativa entre os tratamentos (teste Tukey HSD  $P < 0,05$ ). BLS-G: formulação granular de blastosporos; MS-G: formulação granular de microescleródios. **78**

**Figura 8** - A correlação de Spearman entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) /g solo e variáveis abióticas, incluindo temperaturas, umidade relativa, temperatura do solo e radiação solar durante o curso de tempo experimental. A) Correlação de dados após a primeira aplicação de formulações fúngicas (dia 8 ao dia 210). B) Correlação de dados após a segunda aplicação de formulações fúngicas (dia 225 ao dia 336). **79**

**Figura 9** – A. Raízes de *Urochlua decumbens* não colonizadas (esquerda) e colonizadas (direita) por *Metarhizium robertsii*, providas de solo tratado com formulações granulares de blastosporos e microescleródios deste entomopatógeno. B. Taxa de sucesso na colonização radicular no final do experimento (dia 336) após o tratamento do solo com microescleródio (MS) ou blastosporos (BLS) de *M. robertsii* em formulações granulares e aplicada em duas doses (0,5 e 0,25 g/cm<sup>2</sup>). O grupo controle não tinha colonização radicular por nenhuma espécie de *Metarhizium* nativo. **80**

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
-------------------------	----------

<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>2</b>
------------------------------	----------

### **CAPÍTULO I**

#### **CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Metarhizium* spp.: CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO ENDOFITICA, TOLERÂNCIA TÉRMICA E EXPRESSÃO GÊNICA**

RESUMO	25
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Local de execução dos experimentos e obtenção dos isolados	27
2.2. Colonização endofítica de <i>Vigna radiata</i>	28
2.2.1 Preparo das suspensões fúngicas para o teste de colonização endofítica	28
2.2.2 Cultivo e tratamento de <i>Vigna radiata</i>	28
2.2.3 Isolamento fúngico dos tecidos de <i>Vigna radiata</i>	29
2.3. Efeito do calor úmido e do frio sobre a germinação dos isolados fúngicos	30
2.3.1 Preparo das suspensões fúngicas para o teste de tolerância térmica	30
2.3.2 Exposição dos isolados fúngicos ao frio e ao calor	30
2.4. Expressão do gene <i>mad2</i> pelo fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	31
2.5. Análises estatísticas	32
3 RESULTADOS	33
3.1 Capacidade da colonização endofítica de isolados de <i>Metarhizim</i> spp.	33
3.1. Tolerância térmica de isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	36
3.3 Expressão do gene <i>mad2</i>	37
4 DISCUSSÃO	38
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

### **CAPÍTULO II**

#### **ATIVIDADE DO EXSUDATO PRODUZIDO POR COLÔNIAS DE *Metarhizium anisopliae* s.l. SOBRE *Rhipicephalus microplus* E BACTÉRIAS AMBIENTAIS**

RESUMO	47
1 INTRODUÇÃO	49
2 MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1. Cultivo fúngico e obtenção do exsudato	49
2.2. Efeito sobre fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	50
2.2.1 Obtenção das fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	50
2.2.2 Avaliação dos parâmetros biológicos de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	50
2.2.3 Avaliação do efeito do exsudato sobre os hemócitos de fêmeas <i>Rhipicephalus microplus</i>	51
2.3. Efeito inibitório sobre bactérias ambientais	52
2.4. Análises estatísticas	52
3 RESULTADOS	53
3.1 Exsudato fúngico	53

3.2 Efeito do exsudato fúngico sobre os parâmetros biológicos de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	53
3.3 Efeito do exsudato fúngico sobre os hemócitos de fêmeas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	54
3.4 Efeito antimicrobiano do exsudato fúngico sobre bactérias ambientais	54
4 DISCUSSÃO	55
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

### CAPÍTULO III

## EFICÁCIA DE FORMULAÇÕES GRANULARES À BASE DE BLASTOSPOROS OU MICROESCLERÓDIOS DE *Metarhizium robertsii* NO CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* EM CONDIÇÕES SEMINATURAIS

RESUMO	63
1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1. Local de realização dos experimentos e coleta dos dados climáticos	64
2.2 Formulações granulares	68
2.3. Testes em condições seminaturais	69
2.4. Isolamento de <i>Metarhizium robertsii</i> de fêmeas do carrapato	70
2.5 Isolamento de <i>Metarhizium robertsii</i> do solo	70
2.6 Isolamento de <i>Metarhizium robertsii</i> de raízes de <i>Urochloa decumbens</i>	71
2.7 Análise estatística	71
3 RESULTADOS	72
3.1 Produção conidial e viabilidade fúngica em formulações granulares	72
3.2 Eficácia das formulações granulares no controle de <i>Rhipicephalus microplus</i> em condições seminaturais	74
3.3 Persistência fúngica no solo e isolamento de <i>Metarhizium robertsii</i> das raízes de <i>Urochloa decumbens</i>	77
4 DISCUSSÃO	81
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
6 CONCLUSÕES GERAIS	91
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	92

## INTRODUÇÃO GERAL

Muitas pesquisas discutem a eficácia e o desenvolvimento de biopesticidas à base de fungos para o controle de insetos e ácaros em diversos ambientes, assim como a forma de aplicação, a patogênese, as tendências futuras. Entre os fungos entomopatogênicos, as espécies pertencentes ao gênero *Metarhizium* possuem distribuição mundial e são membros comuns da comunidade microbiana do solo, colonizando principalmente a rizosfera de plantas e cadáveres de artrópodes.

Por sua capacidade de causar doenças em populações de insetos praga, esse microrganismo é um dos agentes de biocontrole mais utilizados no mundo, exercendo um importante papel em programas de manejo integrado de pragas. Na busca por diferentes abordagens que possam contribuir para avanços no controle biológico, atentou-se para os fungos entomopatogênicos que possuem a capacidade de se desenvolver no interior de plantas e de produzirem metabólitos secundários com atividade sobre artrópodes.

Por crescerem em ecossistemas únicos e com características ambientais diversas, os fungos endofíticos produzem substâncias de grande potencial, como moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Metabólitos produzidos por esses microrganismos possuem atividades biológicas como antivirais, antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas e pesticidas.

Outra possibilidade a ser explorada na simbiose entre o fungo e planta é a possibilidade do fungo, que está presente no solo e próximo a rizosfera, de encontrar artrópodes praga que habitam o mesmo nicho ecológico. Neste contexto, o ambiente de pastejo que é composto em sua maioria por uma cobertura vegetal e que alberga 95% dos carrapatos de um rebanho, torna-se um alvo interessante de investigação da relação entre a ocorrência de *Metarhizium* spp. no ambiente (solo, rizosfera e planta) e a sua viável utilização no controle do carrapato dos bovinos.

No entanto, para o emprego de agentes microbianos em sistemas agrícolas, deve ser levado em consideração possíveis interferências do ambiente sobre a sua viabilidade, devendo esses serem formulados a fim de se obter resultados satisfatórios no armazenamento, na aplicação e na eficácia. Da mesma forma, também é fundamental o conhecimento destes microrganismos, a fim de selecioná-los quanto a resistência a fatores abióticos, ao tipo de ambiente, cultura ou praga em que serão empregados e formas de produção em massa.

Visto isso, o presente estudo, abordará em 3 capítulos que em comum abordam o gênero *Metarhizium* e seu envolvimento com o solo e plantas, considerando diferentes aspectos importantes para a bioprospecção desse entomopatógeno e utilização para o controle de *Rhipicephalus microplus*. No capítulo 1, são apresentados testes que envolveram a seleção de diferentes isolados quanto a capacidade endofítica e a tolerância térmica, assim como um ensaio de expressão do gene *mad2*, responsável pela adesão do fungo, a fim de se investigar a modulação desse gene em diferentes substratos. No capítulo 2, é feita uma abordagem com relação ao líquido de exsudação produzido por colônias de um isolado de *M. anisopliae* s.l. após ser isolado do solo, buscando-se avaliar o efeito acaricida sobre o carrapato *R. microplus* e sobre a resposta celular desse artrópode, assim como a ação antimicrobiana do exsudato sobre bactérias ambientais. Já no capítulo 3, são reportados testes com enfoque na aplicação de formulações granulares de *M. robertsii* em pastagens, para o controle da fase não parasitária do carrapato dos bovinos.

## REVISÃO DE LITERATURA

### *Rhipicephalus microplus*

O carrapato *R. microplus* é um ectoparasito pertencente ao Filo Artropoda, Classe Aracnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Metastigmata e Família Ixodidae (FLECHTMANN, 1990). Até o início do século XXI, o carrapato dos bovinos era descrito como *Boophilus microplus*, porém estudos moleculares, morfológicos e análises filogenéticas, indicaram que algumas das espécies do gênero *Rhipicephalus* (Koch, 1844) estavam mais relacionadas a espécies do gênero *Boophilus* (Curtice, 1891) (MURRELL; BARKER, 2003). A partir disso, foi sugerido que *Boophilus* se tornasse um subgênero de *Rhipicephalus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* passou a ser uma sinonímia para *Boophilus microplus* (GUGLIEMONE; ROBBINS; APANASKEVICH; PETNEY *et al.*, 2010).

Uma vez que essa nova proposta taxonômica foi aceita pela comunidade científica, e utilizada por anos, a literatura vinha sugerindo uma separação biogeográfica e ecológica da espécie (ALI; PARIZI; FERREIRA; VAZ JUNIOR, 2016). E a partir de análises morfológicas e genéticas, as populações de *R. microplus* encontradas nas regiões Afrotropical e Neotropical, mostrou-se diferentes das encontradas na Austrália (LABRUNA; NARANJO; MANGOLD; THOMPSON *et al.*, 2009).

Apesar dessa separação de espécies, o carrapato *R. microplus* é amplamente distribuído em rebanhos bovinos das Américas do Norte (México), Central e Sul, na África e no sudoeste da Ásia (ESTRADA-PEÑA; VENZAL; NAVA; MANGOLD *et al.*, 2012). O continente asiático parece ter sido a origem desse artrópode, que se adaptou perfeitamente a temperatura e umidade das áreas tropicais ocidentais, que deram condições ideais para a sobrevivência e manutenção da espécie (POWELL; REID, 1982).

Uma vez bem estabelecidos nestas regiões, o carrapato causa grandes prejuízos econômicos. No Brasil os prejuízos associados ao parasitismo por *R. microplus* chegam a custar ao produtor de carne bovina 34,61 dólares por animal em fase de recria (CALVANO; BRUMATTI; GARCIA; BARROS *et al.*, 2019), e a perda econômica gerada pelas infestações no rebanho brasileiro pode chegar a 3,2 milhões de dólares anualmente (GRISI; LEITE; MARTINS; BARROS *et al.*, 2014).

Os prejuízos não estão ligados apenas aos danos diretos ocasionados pelo parasitismo, como a perda de peso, danos ao corô, espoliação sanguínea e predisposição a outros parasitismos (GRISI; LEITE; MARTINS; BARROS *et al.*, 2014; RECK; MARKS; RODRIGUES; SOUZA *et al.*, 2014) mas também estão associados a fatores indiretos como o acometimento dos animais pela transmissão de hemoparasitos como os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a rickettsia *Anaplasma marginale* (GIGLIOTI; DE OLIVEIRA; BILHASSI; PORTILHO *et al.*, 2018) e gastos com carrapaticidas, medicamentos, infraestrutura e mão de obra no controle do carrapato.

Esse parasito é um dos maiores desafios para a pecuária, pois à medida que se intensifica a bovinocultura, mudanças ocorrerão nos aspectos parasitológicos (ANDREOTTI; BARROS; GARCIA; RODRIGUES *et al.*, 2018). Principalmente quando o método de criação é extensivo, no qual os animais ficam o tempo todo no pasto, onde 95% dos carrapatos, que estão na fase de vida não parasitária estão na vegetação (fêmeas ingurgitadas em postura, ovos e larvas esperando o hospedeiro), enquanto 5% estão na fase parasitária, sendo encontradas sobre os bovinos (larvas, ninfas e adultos) (POWELL; REID, 1982). Essa dinâmica do ciclo de vida do carrapato é uma ferramenta para o desenvolvimento de estratégias de controle ambiental ou para guiar aplicações estratégias de acaricidas químicos nos animais (MASTROPAOLO; MANGOLD; GUGLIEMONE; NAVA, 2017).

A fase não parasitária do carrapato, que domina o ambiente de pastagem se inicia com o desprendimento da fêmea ingurgitada do hospedeiro, e a partir disso a mesma inicia o período de pré-postura, que tem duração de até três dias, até o início da postura de ovos, que podem chegar em a três mil por fêmea (FURLONG, 2005). Esses se desenvolvem e originam as larvas num período médio de 13 dias dependendo das condições de temperatura e umidade e depois de dois a três dias após a eclosão, as larvas apresentam a cutícula fortalecida e estão aptas a subir nas pastagens por geotropismo negativo (FURLONG, 2005; SONENSHINE, 1991).

No Brasil, registros de longevidade larval no Rio Grande do Sul mostraram capacidade de sobrevivência larval por até 36 semanas (GUGLIELMONE; SZABÓ; MARTINS; ESTRADA-PENÃ, 2006). Por outro lado, em períodos de verão no Sudeste do Brasil, a maioria das larvas morre ou perde seu poder infestante, a partir de 60 dias, devido ao clima mais quente e seco (GUGLIELMONE; SZABÓ; MARTINS; ESTRADA-PENÃ, 2006).

Quando a larva se fixa no hospedeiro, a fase de vida parasitária se inicia e dura em média 21 dias. Neste período, sempre após a alimentação ocorre a troca da cutícula e o desenvolvimento para o estágio subsequente de ninfa ou adulto (GARCIA; RODRIGUES; KOLLER; ANDREOTTI, 2019). Uma vez fecundada, a fêmea inicia o ingurgitamento rápido, que acontece dentro de 24 horas, e após aumentar cerca de duzentas vezes o seu peso, a fêmea se desprende do animal, de preferência nas primeiras horas da manhã para dar início a fase seguinte e o macho permanece por um período maior sobre o hospedeiro (cerca de 1,5 a 2 meses) copulando com outras fêmeas (FURLONG, 2005).

É importante ressaltar que, durante todo o período de parasitismo, as infestações por carrapatos em diferentes estágios geralmente se sobrepõem. Ou seja, infestações com novas larvas ocorrem antes do desprendimento das primeiras fêmeas ingurgitadas, tornando-se perpétua a formação de novos adultos e exponencialmente o surgimento a de novos descendentes nas pastagens (FACCINI; BARROS-BATTESTI, 2006).

O crescimento populacional de *R. microplus* no ambiente dependerá de diversos fatores, mas principalmente das condições climáticas, do tipo de forrageira que constitui a pastagem e das estratégias de controle adotadas (GAUSS; FURLONG, 2002). Para o controle populacional do carrapato muitas estratégias tem sido desenvolvidas ao longo dos anos (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). O controle químico é o método mais comum dentre as técnicas disponíveis, porém a falta do conhecimento da ecologia e epidemiologia do parasito levou o desenvolvimento da resistência de boa parte dos produtos disponíveis no mercado (SPAGNOL; PARANHOS; ALBUQUERQUE, 2010).

A resistência observada em *R. microplus* ocorre por modificações genéticas, capazes de alterar o local de ação dos compostos químicos, de modificar a forma que o organismo sequestra essas moléculas ou ainda causar redução na capacidade do acaricida em penetrar a cutícula do carrapato (GUERRERO; LOVIS; MARTINS, 2012). Diversos trabalhos têm relatado novos caminhos celulares e moleculares que o carrapato usa para driblar a ação desses defensivos, cujo processo de detoxificação é multifatorial e complexo (GUERRERO; LOVIS; MARTINS, 2012; POHL; CARVALHO; DAFFRE; DA SILVA VAZ JR *et al.*, 2014; POHL; KLAFKE; JÚNIOR; MARTINS *et al.*, 2012).

A dificuldade de controlar o carrapato apenas com os químicos, deu lugar a novas abordagens para o manejo desse ectoparasita, sendo a estratégia de integrar duas ou mais tecnologias de controle a forma mais eficaz de combater o parasitismo (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). Existem diversas formas de controle integrado para este parasita, como: utilização de animais geneticamente resistentes; controle imunológico através do desenvolvimento de vacinas e homeopatia; gerenciamento de pastagem com alternância de espécies animais e utilização de forrageiras; controle biológico; rotação de pastagem;

introdução de carrapatos machos estéreis na população (LEAL; FREITAS; VAZ JR., 2003; RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018).

O conhecimento sobre a ecologia do carrapato, o seu tipo de habitat, sua relação com o hospedeiro e respostas ao ambiente são fatores essenciais para o desenvolvimento de pesquisas que visam o gerenciamento de infestações desse ectoparasito (WHITE; GAFF, 2018). Além disso, um melhor entendimento sobre a evolução desse artrópode proporciona avanços importantes para melhorar as estratégias de controle (ALI; PARIZI; FERREIRA; VAZ JUNIOR, 2016).

### ***Metarhizium* spp.**

O início dos estudos com o gênero *Metarhizium* datam o ano de 1879 com Metschnikoff batizando-o como *Entomophthora anisopliae*, após isolá-lo de lavas do besouro *Anisopliae austríaca*. Posteriormente, em 1880, o mesmo foi descrito como *Isaria destructor* e em 1833 Sorokin classificou esse fungo como *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, permanecendo assim até os dias de hoje (LIMA, 1989).

Entretanto, novas classificações têm sido propostas, desde revisões ortográficas nomenclaturais, como reportado por ROBERTS e ST. LEGER (2004) até modificações taxonômicas baseadas em características morfológicas como em 1976, por TULLOCH (1976) admitindo no gênero apenas duas espécies, *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium anisopliae*, sendo esta última dividida nas variedades *major* e *anisopliae*.

Com o avanço dos estudos de filogenética, BISCHOFF; REHNER e HUMBER (2009) denominou *Metarhizium anisopliae* como um complexo de espécies que atualmente é composta por quatorze espécies (LUZ; ROCHA; MONTALVA; SOUZA *et al.*, 2019), e KEPLER; HUMBER; BISCHOFF e REHNER (2014) destacaram a importância dessa ferramenta para a compreensão da diversidade de do gênero *Metarhizium*, a partir de então inúmeros estudos tem reportado novas espécies (BRUNNER-MENDOZA; REYES-MONTES; MOONJELY; BIDOCHKA *et al.*, 2019; CHU; CHEN; WEN; LIANG *et al.*, 2016; GUTIERREZ; LECLERQUE; MANFRINO; LUZ *et al.*, 2019; LUZ; ROCHA; MONTALVA; SOUZA *et al.*, 2019; MONGKOLSAMRIT; KHONSANIT; THANAKITPIPATTANA; TASANATHAI *et al.*, 2020; MONTALVA; COLLIER; ROCHA; INGLIS *et al.*, 2016).

Existe diversidade morfológica entre esses ascomicetos, os quais variam entre isolados quanto à coloração, tamanho de conídios e crescimento vegetativo (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; SHAH; WANG; BUTT, 2005). Deforma geral, microscopicamente o gênero apresenta hifas hialinas e septadas, com conidióforos característicos sob os quais surgem fiáides cilíndricas, as quais sustentam cadeias de conídios de coloração normalmente esverdeada, uninucleados e cilíndricos (DRIVER; MILNER, 1998). Macroscopicamente, as colônias de coloração branca em sua fase inicial, ficando normalmente amarela durante as fases de desenvolvimento dos conídios e verde quando os conídios se encontram maduros (BISCHOFF *et al.*, 2009).

Os isolados não variam apenas nas características genéticas e morfológicas, mas também podem apresentar variação quanto a quesitos importantes para o emprego em programas de controle biológico, como virulência, tolerância a fatores abióticos, crescimento em meios de cultivo, formação de propágulos, seletividade de hospedeiros e outros (AYELE; MULETA; VENEGAS; ASSEFA, 2020; FERNANDES; RANGEL; BRAGA; ROBERTS, 2015; PETLAMUL; PRASERTSAN, 2012; RANGEL; BRAGA; ANDERSON; ROBERTS, 2005; XU; LUO; LI; SHANG *et al.*, 2016). Além disso também são versáteis quanto a seus habitats, podendo ser encontrados no solo de florestas, em matéria orgânica, em solo agricultáveis e em rizosfera de plantas e colonizando insetos (BRUNNER-MENDOZA;

REYES-MONTES; MOONJELY; BIDOCHKA *et al.*, 2019; NISHI; SATO, 2019; RIGUETTI ZANARDO BOTELHO; ALVES-PEREIRA; COLONHEZ PRADO; ZUCCHI *et al.*, 2019).

Por sua capacidade de causar epizootias em populações de artrópodes, esse microrganismo é um dos agentes de biocontrole mais utilizados no mundo em programas de manejo integrado de pragas (MASCARIM; QUINTELA, 2013). A prática da utilização em massa deste microrganismo no mundo começou entre 1880 e 1890, quando Metschnikoff, e mais tarde Krassiltschik, realizaram várias experiências de controle contra diversos insetos-praga na antiga União Soviética, produzindo uma grande quantidade de esporos de *M. anisopliae* s. l. em laboratório (próximo de 55 kg / 4 meses) que foram utilizados com sucesso para o controle de *Cleonus punctiventris* (ZIMMERMANN, 2007).

O processo de infecção das espécies do gênero *Metarhizium* é semelhante a outros fungos entomopatogênicos, devendo ocorrer por contato. Após a ligação do esporo com a cutícula do hospedeiro, o conídio inicia o processo de germinação e essa etapa sofre influência de fatores externos, como: umidade, temperatura, pH, oxigênio, nutrientes, podendo ainda ser afetada pela presença de substâncias químicas da superfície do artrópode e pela microbiota saprofítica (ARRUDA; LÜBECK; SCHRANK; VAINSTEIN, 2005; AW; HUE, 2017).

Posteriormente, inicia-se a germinação com o surgimento do tubo e formação do apressório, que são responsáveis pela pressão mecânica exercida sobre a superfície cuticular (ARRUDA; LÜBECK; SCHRANK; VAINSTEIN, 2005) e química através da ação digestiva de enzimas proteolíticas, lipolíticas e quitinolíticas (ARRUDA; LÜBECK; SCHRANK; VAINSTEIN, 2005; AW; HUE, 2017; BEYS DA SILVA; SANTI; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Após penetrar a cutícula, há formação de corpos hifais, também conhecidos como blastosporos, responsáveis pela nutrição do fungo com a degradação das fontes de carbono da hemolinfa dos hospedeiros (BERNARDO; BARRETO; E SILVA; LUZ *et al.*, 2018; BEYS DA SILVA; SANTI; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010)

Com a colonização bem-sucedida e sob condições ambientais apropriadas ao desenvolvimento, inicia-se a fase saprofítica de exteriorização e conidiogênese sobre o artrópode cadáver, para posterior disseminação dos conídios sobre outros hospedeiros, e desta forma perpetuar o ciclo na natureza (CHANDLER; DAVIDSON; PELL; BALL *et al.*, 2000). Caso as condições ambientais não estejam favoráveis, o fungo pode persistir como hifas dentro do cadáver. O período de incubação depende da espécie do hospedeiro, a fase de vida do mesmo, da temperatura e umidade ambiental, assim como a virulência do isolado fúngico (ZIMMERMANN, 2007).

Apesar do efeito patogênico para artrópodes pragas, o gênero *Metarhizium* oferece segurança para humanos e demais vertebrados. Diversas investigações sobre a segurança e o efeito de *M. anisopliae* s.l. contra mamíferos foram conduzidas desde o início de sua produção massal, primeiramente por Schaerffenberg (1968), e mais tarde vários aspectos relacionados à segurança da aplicação de *Metarhizium* spp. para o homem, outros vertebrados e organismos benéficos não-alvos foram publicados por diversos autores certificando seu uso como defensivo agrícola (FISCHHOFF; KEESING; OSTFELD, 2017; GOETTEL; JARONSKI, 1997; STRASSER; VEY; BUTT, 2000; VESTERGAARD; CHERRY; KELLER; GOETTEL, 2003; ZIMMERMANN, 2007)

## **Controle biológico e formulações comerciais de fungos entomopatogênicos**

Controle biológico, em um sentido amplo, é a introdução única ou repetida de organismos vivos em áreas agricultáveis, ou na manipulação do ambiente para aumentar a população de inimigos naturais de pragas, como ervas daninhas, patógenos de plantas ou artrópodes pestes (CARLSON, 1988). Esses inimigos são entomófagos, como predadores e

parasitoides ou entomopatógenos, que são microrganismos causadores de doenças em insetos (COSTA; BERTI FILHO; SATO, 2006).

O controle biológico pode ocorrer de forma natural ou aplicada na qual existem três formas de liberação destes agentes de controle microbiano no ambiente, sendo elas a forma clássica, conservativa ou aumentativa. A forma clássica trata-se de controlar uma praga por meio de inimigos naturais exóticos (CALTAGIRONE, 1981). Já na forma conservativa, busca-se manipular o ambiente para favorecer os inimigos naturais ali presentes e assim suprimir a praga alvo (STRAUB; FINKE; SNYDER, 2008). Sendo o método de controle biológico aumentativo o mais popular entre os agricultores e o mais incentivado com relação a redução do uso de pesticidas químicos, nessa técnica visa a produção massal e a introdução periódica destes agentes controladores nas culturas (VAN LENTEREN; BUENO, 2003).

No entanto isso não é uma prática recente, desde o século III, os chineses já usavam formigas para controlar pragas em lavouras (GUTIERREZ; MESSENGER; BOSCH, 1982). Porém, registros datam que o nome “controle biológico” foi utilizado pela primeira vez pelo pesquisador Harry S. Smith, em 1919 (HUFFAKER; MESSENGER, 1977). Oito décadas depois, em todo o mundo existiam cerca de 85 produtos comerciais de inimigos naturais e mais de 100 espécies comercialmente disponíveis para uso no campo (VAN LENTEREN; BUENO, 2003). Dez anos mais tarde, somente o Brasil passava a ter 40 companhias nacionais e internacionais que investiam na produção massal de biocontroladores (PARRA, 2014).

A criação em massa de inimigos naturais na Europa, no final dos anos 90, era geralmente feita em pequenas empresas com pouco conhecimento e entendimento, condições que influenciam o desempenho destes agentes, gerando produtos de baixa qualidade e causando falhas nos programas de controle biológico (VAN LENTEREN; ROSKAM; TIMMER, 1997). Já no Brasil, a falta de conhecimento especializado sobre controle de pragas somado ao importante espaço mundial na produção alimentos, motivou a mobilização de recursos humanos com estabelecimento de programas de pós-graduação em estudos entomológicos na década de 1960, o que alavancou o controle biológico no país (PARRA, 2014), que hoje se destaca pelo uso tradicional do controle biológico e por ter um dos maiores programas de aplicação de fungos entomopatogênicos no mundo (MASCARIN; LOPES; DELALIBERA; FERNANDES *et al.*, 2019).

A utilização destes organismos controladores traz muitos benefícios ambientais e oferece segurança aos humanos e a espécies não alvo, além de reduzir o uso de agrotóxicos nos alimentos (LACEY; FRUTOS; KAYA; VAIL, 2001; ZIMMERMANN, 2007). No entanto, existem também algumas desvantagens, principalmente relacionadas à persistência, velocidade em causar morte do hospedeiro, especificidade (faixa de hospedeiros muito ampla ou muito estreita) e custo em relação aos inseticidas químicos convencionais (LACEY; FRUTOS; KAYA; VAIL, 2001; SIMBERLOFF, 2012).

Para reverter essas desvantagens e manter a expansão do controle biológico, é necessário a seleção e recombinação genética de organismos mais tolerantes aos efeitos abióticos e virulentos, somados a métodos econômicos de produção e formulação em massa (MASCARIN; JARONSKI, 2016). Visto isso muitas pesquisas com os entomopatógenos abrangem desde pontos chaves da ecologia até o desenvolvimento de técnicas avançadas para produção e uso no campo (FARIA; WRAIGHT, 2007; MASCARIN; LOPES; DELALIBERA; FERNANDES *et al.*, 2019).

A formulação é um ponto crucial na comercialização dos biocontroladores, uma vez que esta técnica busca mantê-los viáveis durante a produção, armazenamento, distribuição, e manuseio, além de proteger o microrganismo de fatores ambientais prejudiciais no campo (ALVES, 1998). Certamente, a potência da formulação é o microrganismo, seu princípio ativo, no entanto é importante que esse seja favorecido quanto a fatores físicos e nutricionais,

garantindo assim seu antagonismo contra a peste alvo (KESWANI; BISEN; SINGH; SARMA *et al.*, 2016).

Entre os microrganismos patogênicos para os artrópodes, os fungos possuem larga variabilidade genética e capacidade de atuar em diversos estágios de seus hospedeiros, possuindo relativa especificidade, dando-os a qualidade de eficientes agentes para o controle de pragas (SAMISH *et al.*, 2004), além disso estes podem agir por contato, não havendo a necessidade de serem ingeridos como é o caso dos vírus e bactérias. No Brasil, dentre os biopesticidas, *M. anisopliae* é o fungo mais utilizado como ingrediente ativo, presente em 24% dos produtos registrados, seguido por *B. bassiana* (13%), e *Trichoderma harzianum* (4%) (MASCARIN; LOPES; DELALIBERA; FERNANDES *et al.*, 2019).

Segundo ALVES (1998), no Brasil, *M. anisopliae* s.l. foi empregado a partir de 1975, reduzindo cerca de 72% das infestações de *Mahanarva spectabilis* sobre pastagens. Desde então é considerado o fungo mais utilizado nos programas de controle biológico, em virtude de ser um excelente agente no combate para pragas da cana-de-açúcar e da pastagem (LI; ALVES; ROBERTS; FAN *et al.*, 2010; MICHEREFF FILHO; FARIA; WRAIGHT; SILVA, 2009).

No início dos anos 2000, fungos entomopatogênicos eram produzidos em sua maioria por laboratórios setoriais de associações de produtores, centros de pesquisa, órgãos federais e em usinas de cana-de-açúcar, que na sua maioria o sistemas de produção é artesanal (ALVES; LOPES; VIEIRA; TAMAI, 2008). Atualmente existe diversas empresas especializadas na produção em massa desses organismos, que é feita principalmente com a utilização de meios sólidos, a fim de se obter conídios aéreos, porém a fermentação líquida é uma forma alternativa e atraente para a produção mais robusta de propágulos igualmente eficazes, estáveis e que podem ser facilmente formulados (MASCARIN; JARONSKI, 2016).

No processo de fabricação, as formulações ainda têm sido o gargalo para a desenvolvimento de micoInseticidas que sejam estáveis e efetivos (MASCARIN; JARONSKI, 2016) e esse processo deve seguir rigorosos padrões de qualidade, a fim de se garantir a eficiência do produto, segurança do ambiente e a padronização do sistema de produção, isso garantirá a confiança no método de controle pelo o usuário (JENKINS; GRZYWACZ, 2000). Porém nem toda produção de fungos entomopatogênicos possui sistemas rigorosos de qualidade e a negligência no processo de produção é o principal fator que influencia o avanço no controle microbiano (ALVES; LOPES; VIEIRA; TAMAI, 2008; JENKINS; GRZYWACZ, 2000).

Existem diversas tipos de formulações micoInseticidas/micoacaricidas, que podem ser encontradas nas seguintes formas: Pó molhável (WP), Granulado (GR), Isca (RB); Grânulos dispersáveis em água (WG); Pó para contato (CP), Suspensão concentrada (SC); Suspensão concentrada miscível em óleo (OF); Suspensão para aplicação a ultra baixo volume (ULV) Suspensão (SU); Dispersão oleosa (OD) (FARIA; WRAIGHT, 2007). Essas formulações podem conter o fungo na forma de hifa (micélio), blatosporos ou conídios (FARIA; WRAIGHT, 2007), e mais recentemente na também na forma de microescleródios para o gênero *Metarhizium* (JACKSON; JARONSKI, 2009).

De forma geral, as formas mais comumente encontradas no mercado são as líquidas, em pó ou em grânulos (SINGH; SINGH; SARMA; UPADHYAY, 2014). Sendo que as formulações líquidas são utilizadas para técnicas que permitem a imersão, encharcamento ou pulverização, as formulações em pó podem ser em alguns casos molháveis ou então aplicadas diretamente no alvo de forma mecânica ou manual; já as formulações granulares podem ser lançadas no ambiente também de foram manual ou mecanizada (KESWANI; BISEN; SINGH; SARMA *et al.*, 2016). As formulações granulares são as mais práticas, se assemelham a muitas formulações pesticidas comumente utilizadas na agricultura e por isso são mais adequadas a equipamentos já utilizados no plantio (JARONSKI; JACKSON, 2008).

Desenvolver melhorias técnicas que aumentem o potencial de utilização dos agentes microbianos faz com que os pesticidas biológicos sejam capazes de competir com os inseticidas

químicos no mercado (BEHLE; JACKSON; FLOR–WEILER, 2013). Além disso é importante ser destacado que o controle biológico pode ser integrado com outras técnicas de manejo (SCHOLLER, 2012) e a agricultura sustentável dependerá cada vez mais de alternativas que não agridam o meio ambiente e reduzam o contato humano com substâncias químicas pesticidas (LACEY; FRUTOS; KAYA; VAIL, 2001).

### **Fungos e ação antimicrobiana.**

A interação entre fungos, bactérias e outros microrganismos acontece em diversos nichos ecológicos, podendo essa relação ser mutualística ou antagonista (DEVEAU; BONITO; UEHLING; PAOLETTI *et al.*, 2018). Por serem muitas vezes decompositores e oportunistas, esses organismos acabam por competirem por alimento e nesse processo os fungos secretam substâncias bioativas que favorecem o seu desenvolvimento no ambiente (BOER; FOLMAN; SUMMERBELL; BODDY, 2005; KELLER, 2019). E não só nos processos competitivos, mas também na associação com hospedeiros a secreção de substâncias também está relacionada (SCHULZ; BOYLE; DRAEGER; RÖMMERT *et al.*, 2002), como por exemplo a liberação de enzimas, que são fundamentais no processo de colonização.

Os fungos entomopatogênicos são normalmente mais sensíveis a ação de outros microrganismos, e de forma geral quando inserido no ambiente tem baixo impacto na comunidade microbiana como um todo, o que é uma característica desejável (PENG; TANG; HONG; XIE, 2020; SHIMAZU; MAEHARA; SATO, 2002; VIEIRA TIAGO; PORTO CARNEIRO-LEÃO; MALOSSO; TINTI DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). No entanto, o efeito antagonista frente a outros microrganismos também é conhecido, havendo estrita relação com a secreção de moléculas bioativas (LOZANO-TOVAR; GARRIDO-JURADO; QUESADA-MORAGA; RAYA-ORTEGA *et al.*, 2017; TONG; LI; KEYHANI; LIU *et al.*, 2020; WAGENAAR; GIBSON; CLARDY, 2002).

Alguns trabalhos têm relatado o potencial antimicrobiano de substâncias providas de fungos entomopatogênicos (BENNETT, 1974; GOETTEL; KOIKE; KIM; AIUCHI *et al.*, 2008; LEE; NAKAJIMA; IHARA; KINOSHITA *et al.*, 2005), pelo fato deles terem uma intensa e frequente interação com outros organismos, o que estimula a produção de metabólitos secundários, como por exemplo a ação antimicrobiana para proteger a carcaça do hospedeiro contra competidores oportunistas (ZHANG; FASOYIN; MOLNÁR; XU, 2020).

Apesar de ser conhecido que estes compostos secretados são regulados por sinas externos e internos, a importância e o mecanismo de regulação ainda não estão bem claros (MACHELEIDT; MATTERN; FISCHER; NETZKER *et al.*, 2016). Tem sido observado que a biossíntese desses produtos estão geralmente associada à diferenciação ou desenvolvimento celular, enquanto a secreção de metabólitos tóxicos está ligada a colônias em crescimento e na fase de esporulação (KOMBRINK; TAYYROV; ESSIG; STÖCKLI *et al.*, 2019).

Sabendo disso, os estudos se atem a extração dos metabolitos a partir de meios de cultura, e diversos isolados de fungos entomopatogênicos já foram testados quanto a atividade antimicrobiana (SHIN; BAE; WOO, 2016). Dentre 342 isolados de fungos entomopatogênicos, 170 isolados (49,7%) e 186 isolados (54,4%) inibiram o crescimento de *B. cereus* e *B. cinerea*, respectivamente, e a partir desses isolados vários tipos de substâncias antimicrobianas foram identificadas (SHIN; BAE; WOO, 2016). Ao avaliar o extrato bruto da fermentação líquida de *Beauveria bassiana*, SAHAB (2012) demonstrou que diferentes concentrações do produto obtido apresentou atividade antibacteriana para *B. cereus*, *B. subtilis*, *Micrococcus leteus*, *Streptococcus* sp., *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp., assim como atividade antifúngica moderada para *Alternaria tenuis*, *Fusarium avenaceum* and *F. graminearum* (SAHAB, 2012). Da mesma forma XIAO; XIAO; ZHANG e SUN (2010) reportaram que frações do meio de cultura de *Metarhizium tii* (= *M. guizhouense*) apresentaram efeito antimicrobiano em culturas

de *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*, nesse mesmo estudo os fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* também foram afetados.

Mais de 1500 compostos isolados de fungos foram isolados entre 1993 e 2001 e mais da metade apresentaram atividade antimicrobiana (SCHUEFFLER; ANKE, 2014). Devido ao grande potencial de exploração, os metabólitos secretados por microrganismos chamam a atenção da indústria, pois são moléculas com grande potencial para a aplicação na agricultura, na medicina e na produção de alimentos (SETTE; PASSARINI; DELARMELINA; SALATI *et al.*, 2006).

Fungos entomopatogênicos são uma rica fonte de compostos bioativos naturais e estes devem ser explorados, a fim de estabelecer condições de cultivo que facilitem a produção dessas substâncias (LEE; NAKAJIMA; IHARA; KINOSHITA *et al.*, 2005). Visto que utilizar apenas seus metabólitos pode ser uma vantagem, já que esses produtos podem ser empregados independentemente da localização geográfica, diferente da aplicação direta de organismos exóticos, que por vezes é uma limitação (KESWANI; BIEN; SINGH; SARMA *et al.*, 2016).

Outra vantagem é que os metabólitos secundários antimicrobianos não só têm uma vida útil mais longa, mas também uma maior eficiência contra fitopatógenos do solo, particularmente contra bactérias (KESWANI; BIEN; SINGH; SARMA *et al.*, 2016). Sendo assim, é fundamental o conhecimento das substâncias produzidas por estes microrganismos, a fim de se formar novas estratégias medidas que também possam se extrapoladas para a agropecuária (HIROSE *et al.*, 2001).

### **Capacidade endofítica e implicações genéticas**

Além de controlar artrópodes, diversos estudos apontam que fungos entomopatogênicos desempenham outros papéis na natureza, esses também podem ser agentes endofíticos, antagonistas de patógenos de plantas e promotores de crescimento por apresentarem associações benéficas com a rizosfera (BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015; QUESADA-MORAGA; LÓPEZ-DÍAZ; LANDA, 2014; SAIKKONEN; FAETH; HELANDER; SULLIVAN, 1998; VEGA; GOETTEL; BLACKWELL; CHANDLER *et al.*, 2009). O mais investigado e compreendido grupo dos fungos endofíticos são os Clavicipitaceus, que são verticalmente transmitidos por semente e são sistemicamente associados com a parte superior de vegetações possuindo interação mútua com a planta hospedeira (KULDAU; BACON, 2008). Porém a simbiose não está restrita apenas a este grupo especializado de microrganismo endofíticos (JABER; VIDAL, 2010).

Em uma interação mutualística o fungo vive no interior da planta, sem causar dano a mesma, recebendo abrigo, nutrição e auxílio na dispersão (SAIKKONEN; FAETH; HELANDER; SULLIVAN, 1998), por outro lado fornece ao vegetal proteção contra inimigos naturais, maior interação com o solo e influencia diretamente na ecologia da planta (KEYSER; THORUP-KRISTENSEN; MEYLING, 2014; RODRIGUEZ; WHITE JR; ARNOLD; REDMAN, 2009; SAIKKONEN; FAETH; HELANDER; SULLIVAN, 1998)

Entre os fungos patogênicos para artrópode muitas espécies têm sido isoladas como endofíticas, tais como as dos gêneros *Hypocrea*, *Gibberella*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Cordyceps*, *Akanthomyces* e *Aspergillus* (AKUTSE; MANIANIA; FIABOE; VAN DEN BERG *et al.*, 2013; GURULINGAPPA; SWORD; MURDOCH; MCGEE, 2010; KEYSER; THORUP-KRISTENSEN; MEYLING, 2014; VEGA; GOETTEL; BLACKWELL; CHANDLER *et al.*, 2009). A concomitante capacidade endofítica e patogenicidade para artrópodes fazem ainda mais provável a relação de simbiose entre estes fungos e plantas, uma vez que esses agem conduzindo nutrientes dos insetos colonizados para o vegetal hospedeiro (BARELLI; MOONJELY; BEHIE; BIDOCHKA, 2016).

Alguns estudos reportam essa habilidade de *Metarhizium* spp. e *Beauveria bassiana* em conduzir compostos nitrogenados aos vegetais (BEHIE; BIDOCHKA, 2014; BEHIE; ZELISKO; BIDOCHKA, 2012) e por sua vez estes utilizam de carboidratos disponíveis da planta para o crescimento (FANG; ST LEGER, 2010; PAVA-RIPOLL; ANGELINI; FANG; WANG *et al.*, 2011). A grande maioria dos fungos endofíticos formam infecções localizadas internas, em folhagem, raízes, caules e cascas e são transmitidos horizontalmente via esporos (FAETH; FAGAN, 2002; SAIKKONEN; FAETH; HELANDER; SULLIVAN, 1998) porém também podem estabelecer uma infecção sistêmica de longo prazo e atuar contra patógenos da planta hospedeira, tal interação tem sido um desafio e o foco de estudos (OWNLEY; GRIFFIN; KLINGEMAN; GWINN *et al.*, 2008).

Apesar da ocorrência de colonização (natural ou artificial) endofítica por fungos entomopatogênicos, detalhes do processo de penetração desses endófitos e os mecanismos envolvidos na colonização ainda são pouco conhecidos e devem ser mais explorados (STONE; BIDOCHKA, 2020; VEGA; POSADA; CATHERINE AIME; PAVA-RIPOLL *et al.*, 2008). Questões importantes para o desenvolvimento desta associação fungo-planta incluem quais seriam as portas primárias de entrada do fungo em tecidos vegetais, a extensão da disseminação fúngica (especialmente migração ascendente) dentro da planta hospedeira após a infecção primária da raiz e a persistência fúngica na planta (RESQUÍN-ROMERO; GARRIDO-JURADO; DELSO; RÍOS-MORENO *et al.*, 2016).

LANDA; LÓPEZ-DÍAZ; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ; MONTES-BORREGO *et al.* (2013) sugeriram a migração ascendente de uma estirpe endofítica de *Beauveria bassiana* após tratar sementes de papoula com uma suspensão de conídios e obter plantas maternas colonizadas endofiticamente, demonstrando a transmissão vertical do fungo entomopatogênico. No mesmo trabalho de LANDA; LÓPEZ-DÍAZ; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ; MONTES-BORREGO *et al.* (2013) quando a técnica de inoculação não foi o tratamento de sementes, mas a pulverização foliar com a mesma estirpe de *B. bassiana* marcada com Green Fluorescent Protein (GFP), apenas um estabelecimento endofítico temporal foi detectado e que diminuiu gradualmente até desaparecer completamente. Esses achados também foram detectados em várias culturas por diferentes pesquisadores (BATTA, 2013; GURULINGAPPA; SWORD; MURDOCH; MCGEE, 2010; POSADA; VEGA, 2006).

Uma desvantagem atual ao uso de fungos entomopatogênicos endófitos como agentes de biocontrole é a variabilidade observada na persistência endofítica após inoculação (RESQUÍN-ROMERO; GARRIDO-JURADO; DELSO; RÍOS-MORENO *et al.*, 2016). O método de inoculação, a estirpe fúngica utilizada e o genótipo da planta hospedeira são fatores chave para determinar a persistência do fungo e a compatibilidade de associações com o vegetal (QUESADA-MORAGA; LÓPEZ-DÍAZ; LANDA, 2014).

A maioria dos fungos endofíticos conhecidos parece colonizar as plantas hospedeiras de uma forma não padrão (RODRIGUEZ; WHITE JR; ARNOLD; REDMAN, 2009; SÁNCHEZ MÁRQUEZ; BILLS; HERRERO; ZABALGOGEAZCOA, 2012), provavelmente devido a um "antagonismo equilibrado" no qual a planta hospedeira pode restringir o crescimento do fungo, e o fungo pode modular a eficácia dos mecanismos de defesa das plantas (SCHULZ; BOYLE; DRAEGER; RÖMMERT *et al.*, 2002). Como resultado, poderia esperar-se que a pulverização de tecidos de plantas com uma suspensão fúngica pudesse produzir o estabelecimento endofítico temporário na área tratada em muitos casos, tanto em padrões de colonização sistêmica como não sistêmica (RESQUÍN-ROMERO; GARRIDO-JURADO; DELSO; RÍOS-MORENO *et al.*, 2016).

As associações de algumas plantas hospedeiras com fungos de menor especialidade endofítica não são bem compreendidas e sabe-se pouco sobre as interações envolvidas (HARTLEY; GANGE, 2009). Os mecanismos subjacentes a essas interações são atribuídos, na maioria das vezes, à alteração da qualidade nutricional e crescimento do vegetal (BEHIE;

BIDOCHKA, 2014; SASAN; BIDOCHKA, 2012; VEGA; GOETTEL; BLACKWELL; CHANDLER *et al.*, 2009) ou outros sinais, como metabólitos secundários (KULDAU; BACON, 2008) que podem ter impactos importantes nos organismos que se alimentam da planta hospedeira colonizada pelo fungo, dando a ela maior habilidade competitiva e resistências aos fatores de estresse bióticos e abióticos (FAETH; FAGAN, 2002; KULDAU; BACON, 2008; SASAN; BIDOCHKA, 2012; VEGA; GOETTEL; BLACKWELL; CHANDLER *et al.*, 2009). Em contrapartida o fungo também ganha da planta nutrientes adquiridos durante a colonização saprófita, quando ela ou partes dela morrem (POSADA; VEGA, 2006) ou através de um sistema mútuo em que a planta transfere carbono provindo da fotossíntese para o microrganismo (BEHIE; MOREIRA; SEMENTCHOUKOVA; BARELLI *et al.*, 2017).

Alguns fungos entomopatogênicos possuem um comportamento multifuncional, atuando como saprófitos, colonizadores de plantas ou patógenos de artrópodes (HU; ST LEGER, 2002; ST. LEGER; WANG, 2010; STONE; BIDOCHKA, 2020), o que explica a persistência no solo por longos períodos de tempo na ausência de um inseto hospedeiro (BIDOCHKA; KAMP; LAVENDER; DEKONING *et al.*, 2001). Essa bifuncionalidade está estritamente relacionada com a expressão diferencial de genes, que são modulados conforme o hospedeiro em que o fungo está em contato (PAVA-RIPOLL; ANGELINI; FANG; WANG *et al.*, 2011; WANG; HU; ST. LEGER, 2005).

*M. anisopliae* s.l. adere a artrópodes ou plantas usando duas proteínas diferentes encontradas na superfície de seus conídios, *mad1* e *mad2*, que são induzidas diferencialmente pela hemolinfa do hospedeiro invertebrado ou pelo exsudato das raízes da planta respectivamente (WANG; ST LEGER, 2007). O gene da adesina para plantas *mad2* é mais variável que o gene da adesina para artrópodes *mad1*, e a região promotora no DNA pode variar entre as espécies, um fator que pode ter contribuído diferencialmente na evolução das espécies do gênero *Metarhizium*, as quais provavelmente evoluíram a partir do hospedeiro vegetal (WYREBEK; BIDOCHKA, 2013).

Nas comparações genômicas, o gênero *Metarhizium* parece estar mais próximo dos fungos endofíticos do que dos patógenos vegetais ou animais, indicando uma evolução dos fungos associados às plantas e que a patogenicidade para os insetos é uma aquisição adaptativa recente (GAO; JIN; YING; ZHANG *et al.*, 2011). A característica de colonizar a rizosfera e sua capacidade de permanecer ativo, proliferar e beneficiar a planta hospedeira fazem desse microrganismo ser mais do que um entomopatógeno (KEYSER, 2014).

Baseado nisso, pesquisas sobre fungos entomopatogênicos como agentes de controle biológico requerem consideração de seu papel no ecossistema. E explorar a história genética desses fungos, nos leva à pesquisas e aplicações industriais mais poderosas que podem ser exploradas de maneira positiva (BARELLI *et al.* 2016).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKUTSE, K. S.; MANIANIA, N. K.; FIABOE, K. K. M.; VAN DEN BERG, J. *et al.* Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). **Fungal Ecology**, 6, n. 4, p. 293-301, 2013/08/01/ 2013.

ALI, A.; PARIZI, L. F.; FERREIRA, B. R.; VAZ JUNIOR, I. d. S. A revision of two distinct species of *Rhipicephalus*: *R. microplus* and *R. australis* %J *Ciência Rural*. 46, p. 1240-1248, 2016.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p. 85-7133-004-2.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; VIEIRA, S. A.; TAMAI, M. A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. *In*: ALVES, S. B. e LOPES, R. B. (Ed.). **Controle Microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba : FEALQ, 2008. cap. 3, p. 69-110.

ANDREOTTI, R.; BARROS, J.; GARCIA, M.; RODRIGUES, V. *et al.* Cattle tick infestation in Brangus cattle raised with Nellore in central Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, 39, n. 3, p. 1099-1113, 2018.

ARRUDA, W.; LÜBECK, I.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Morphological Alterations of *Metarhizium anisopliae* During Penetration of *Boophilus microplus* Ticks. **Experimental & Applied Acarology**, 37, n. 3, p. 231-244, 2005/12/01 2005.

AW, K. M. S.; HUE, S. M. Mode of Infection of *Metarhizium* spp. Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, 3, n. 2, p. 30, 2017.

AYELE, B. A.; MULETA, D.; VENEGAS, J.; ASSEFA, F. Morphological, molecular, and pathogenicity characteristics of the native isolates of *Metarhizium anisopliae* against the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Ethiopia. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, 30, n. 1, p. 59, 2020/05/18 2020.

BARELLI, L.; MOONJELY, S.; BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. **Plant Molecular Biology**, 90, n. 6, p. 657-664, 2016/04/01 2016.

BATTA, Y. A. Efficacy of endophytic and applied *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) against larvae of *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) infesting *Brassica napus* plants. **Crop Protection**, 44, p. 128-134, 2013/02/01/ 2013.

BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and environmental microbiology**, 80, n. 5, p. 1553-1560, 2014.

BEHIE, S. W.; JONES, S. J.; BIDOCHKA, M. J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecology**, 13, p. 112-119, 2015/02/01/ 2015.

BEHIE, S. W.; MOREIRA, C. C.; SEMENTCHOUKOVA, I.; BARELLI, L. *et al.* Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. **Nature communications**, 8, p. 14245-14245, 2017.

BEHIE, S. W.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Endophytic Insect-Parasitic Fungi Translocate Nitrogen Directly from Insects to Plants. 336, n. 6088, p. 1576-1577, 2012.

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

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida : Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, 16, n. 1, p. 52-61, 1974.

BERNARDO, C. C.; BARRETO, L. P.; E SILVA, C. d. S. R.; LUZ, C. *et al.* Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 9, n. 5, p. 1334-1342, 2018/07/01/ 2018.

BEYS DA SILVA, W. O.; SANTI, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* infection. **Fungal Biology**, 114, n. 1, p. 10-15, 2010/01/01/ 2010.

BIDOCHKA, M. J.; KAMP, A. M.; LAVENDER, T. M.; DEKONING, J. *et al.* Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect-Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering Cryptic Species? 67, n. 3, p. 1335-1342, 2001.

BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, 101, n. 4, p. 512-530, 2009/07/01 2009.

BOER, W. d.; FOLMAN, L. B.; SUMMERBELL, R. C.; BODDY, L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, n. 4, p. 795-811, 2005/09/01/ 2005.

BRUNNER-MENDOZA, C.; REYES-MONTES, M. d. R.; MOONJELY, S.; BIDOCHKA, M. J. *et al.* A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. **Biocontrol Science and Technology**, 29, n. 1, p. 83-102, 2019/01/02 2019.

CALTAGIRONE, L. E. Landmark examples in classical biological control. **Annual Review of Entomology**, 26, p. 213-232, 1981.

CALVANO, M. P. C. A.; BRUMATTI, R. C.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C. *et al.* Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. **Experimental and Applied Acarology**, 79, n. 3, p. 459-471, 2019/12/01 2019.

CARLSON, G. A. Economics of biological control of pests. **American Journal of Alternative Agriculture**, 3, n. 2-3, p. 110-116, 1988.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V. *et al.* Fungal Biocontrol of Acari. **Biocontrol Science and Technology**, 10, n. 4, p. 357-384, 2000/08/01 2000.

CHU, H.-L.; CHEN, W.-H.; WEN, T.-C.; LIANG, Z.-Q. *et al.* Delimitation of a novel member of genus *Metarhizium* (Clavicipitaceae) by phylogenetic and network analysis. **Phytotaxa**; Vol 288, No 1: 9 December 2016, 2016.

COSTA, V. A.; BERTI FILHO, E.; SATO, M. E. Parasitóides e predadores no controle de pragas. *In: Controle biológico de pragas: na prática*: CP 2, 2006.

DEVEAU, A.; BONITO, G.; UEHLING, J.; PAOLETTI, M. *et al.* Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. **FEMS Microbiology Reviews**, 42, n. 3, p. 335-352, 2018.

DRIVER, F.; MILNER, R. J. PCR applications to the taxonomy of entomopathogenic fungi. *In: BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K., et al (Ed.). Applications in PCR mycology*. Cambridge: CABI Publishing, 1998. cap. 8, p. 153-186.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; NAVA, S.; MANGOLD, A. *et al.* Reinstatement of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *australis* (Acari: Ixodidae) With Redescription of the Adult and Larval Stages. **Journal of Medical Entomology**, 49, n. 4, p. 794-802, 2012.

FACCINI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI, D. Aspectos gerais da biologia e identificação e carrapatos. *In: BARROS-BATTESTI, D. M. e ARZUA, M. B., G. H. (Ed.). Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo: Instituto Butantan, 2006. p. 5-12.

FAETH, S. H.; FAGAN, W. F. Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists<sup>1</sup>. **Integrative and Comparative Biology**, 42, n. 2, p. 360-368, 2002.

FANG, W.; ST LEGER, R. J. Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*. **Plant physiology**, 154, n. 3, p. 1549-1557, 2010/11// 2010.

FARIA, M. R. d.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, 43, n. 3, p. 237-256, 2007/12/01/ 2007.

FERNANDES, É. K. K.; RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ROBERTS, D. W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, 61, n. 3, p. 427-440, 2015/08/01 2015.

FISCHHOFF, I. R.; KEESING, F.; OSTFELD, R. S. The tick biocontrol agent *Metarhizium brunneum* (= *M. anisopliae*) (strain F52) does not reduce non-target arthropods. **PloS one**, 12, n. 11, p. e0187675-e0187675, 2017.

FURLONG, J. **Carrapatos: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 65 p.

GAO, Q.; JIN, K.; YING, S.-H.; ZHANG, Y. *et al.* Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **PLOS Genetics**, 7, n. 1, p. e1001264, 2011.

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

GAUSS, C. L. B.; FURLONG, J. Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ciência Rural**, 32, p. 467-472, 2002.

GIGLIOTI, R.; DE OLIVEIRA, H. N.; BILHASSI, T. B.; PORTILHO, A. I. *et al.* Estimates of repeatability and correlations of hemoparasites infection levels for cattle reared in endemic areas for *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, 250, p. 78-84, 2018/01/30/ 2018.

GOETTEL, M. S.; JARONSKI, S. T. SAFETY AND REGISTRATION OF MICROBIAL AGENTS FOR CONTROL OF GRASSHOPPERS AND LOCUSTS. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, 129, n. S171, p. 83-99, 1997.

GOETTEL, M. S.; KOIKE, M.; KIM, J. J.; AIUCHI, D. *et al.* Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98, n. 3, p. 256-261, 2008/07/01/ 2008.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. d. S.; BARROS, A. T. M. d. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 23, p. 150-156, 2014.

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* %J *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 21, p. 1-6, 2012.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N. *et al.* The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa; Vol 2528, No 1: 6 Jul. 2010DO - 10.11646/zootaxa.2528.1.1**, 07/06/ 2010.

GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PENÃ, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. *In*: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M., *et al* (Ed.). **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Instituto Butantan, 2006. p. 5-2.

GURULINGAPPA, P.; SWORD, G. A.; MURDOCH, G.; MCGEE, P. A. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. **Biological Control**, 55, n. 1, p. 34-41, 2010/10/01/ 2010.

GUTIERREZ, A. C.; LECLERQUE, A.; MANFRINO, R. G.; LUZ, C. *et al.* Natural occurrence in Argentina of a new fungal pathogen of cockroaches, *Metarhizium argentinense* sp. nov. **Fungal Biology**, 123, n. 5, p. 364-372, 2019/05/01/ 2019.

GUTIERREZ, A. P.; MESSENGER, P. S.; BOSCH, R. v. d. **An Introduction to Biological Control**. 1 ed. New York: Springer US, 1982. 978-0-306-40706-2.

HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of Plant Symbiotic Fungi on Insect Herbivores: Mutualism in a Multitrophic Context. 54, n. 1, p. 323-342, 2009.

HU, G.; ST LEGER, R. J. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and environmental microbiology**, 68, n. 12, p. 6383-6387, 2002.

HUFFAKER, C. B.; MESSENGER, P. S. **Theory and Practice of Biological Control**. 1 ed. New York: Academic Press, 1977. 810 p. (Theory and practice of biological control. 9780323142441.

JABER, L. R.; VIDAL, S. Fungal endophyte negative effects on herbivory are enhanced on intact plants and maintained in a subsequent generation. 35, n. 1, p. 25-36, 2010.

JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological Research**, 113, n. 8, p. 842-850, 2009/08/01/ 2009.

JARONSKI, S. T.; JACKSON, M. A. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. **Biocontrol Science and Technology**, 18, n. 8, p. 849-863, 2008/10/01 2008.

JENKINS, N. E.; GRZYWACZ, D. Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents - Assurance of Product Performance. **Biocontrol Science and Technology**, 10, n. 6, p. 753-777, 2000/12/01 2000.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, 17, n. 3, p. 167-180, 2019/03/01 2019.

KEPLER, R. M.; HUMBER, R. A.; BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, 106, n. 4, p. 811-829, 2014/07/01 2014.

KESWANI, C.; BISEN, K.; SINGH, V.; SARMA, B. K. *et al.* Formulation Technology of Biocontrol Agents: Present Status and Future Prospects. *In: ARORA, N.; MEHNAZ, S., et al (Ed.). Bioformulations: for Sustainable Agriculture.* New Delhi: Springer, 2016. cap. 2, p. 35-51.

KEYSER, C. A.; THORUP-KRISTENSEN, K.; MEYLING, N. V. Metarhizium seed treatment mediates fungal dispersal via roots and induces infections in insects. **Fungal Ecology**, 11, p. 122-131, 2014/10/01/ 2014.

KOMBRINK, A.; TAYYROV, A.; ESSIG, A.; STÖCKLI, M. *et al.* Induction of antibacterial proteins and peptides in the coprophilous mushroom *Coprinopsis cinerea* in response to bacteria. **The ISME Journal**, 13, n. 3, p. 588-602, 2019/03/01 2019.

KULDAU, G.; BACON, C. Clavicipitaceous endophytes: Their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. **Biological Control**, 46, n. 1, p. 57-71, 2008/07/01/ 2008.

LABRUNA, M. B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; THOMPSON, C. *et al.* Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, 9, n. 1, p. 46, 2009/02/25 2009.

LACEY, L. A.; FRUTOS, R.; KAYA, H. K.; VAIL, P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? **Biological Control**, 21, n. 3, p. 230-248, 2001/07/01/ 2001.

LANDA, B. B.; LÓPEZ-DÍAZ, C.; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, D.; MONTES-BORREGO, M. *et al.* In-plant detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, 114, n. 2, p. 128-138, 2013/10/01/ 2013.

LEAL, A. T.; FREITAS, D. R. J.; VAZ JR., I. S. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 31, n. 1, p. 1-11, 2003.

LEE, S.-Y.; NAKAJIMA, I.; IHARA, F.; KINOSHITA, H. *et al.* Cultivation of Entomopathogenic Fungi for the Search of Antibacterial Compounds. **Mycopathologia**, 160, n. 4, p. 321-325, 2005/11/01 2005.

LI, Z.; ALVES, S. B.; ROBERTS, D. W.; FAN, M. *et al.* Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, 20, n. 2, p. 117-136, 2010/01/01 2010.

LIMA, E. A. L. A. Aspectos taxonômicos e citológicos de hyphomicetes (Duteromycotina) entomopatogênicos **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**, 84, p. 17-20, 1989.

LOZANO-TOVAR, M. D.; GARRIDO-JURADO, I.; QUESADA-MORAGA, E.; RAYA-ORTEGA, M. C. *et al.* *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens. **Crop Protection**, 100, p. 186-195, 2017/10/01/ 2017.

LUZ, C.; ROCHA, L. F. N.; MONTALVA, C.; SOUZA, D. A. *et al.* *Metarhizium humberi* sp. nov. (Hypocreales: Clavicipitaceae), a new member of the PARB clade in the *Metarhizium anisopliae* complex from Latin America. **Journal of Invertebrate Pathology**, 166, p. 107216, 2019/09/01/ 2019.

MACHELEIDT, J.; MATTERN, D. J.; FISCHER, J.; NETZKER, T. *et al.* Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. 50, n. 1, p. 371-392, 2016.

MASCARIM, G. M.; QUINTELA, E. D. **Técnica de Produção do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para uso em Controle Biológico - Documentos 289**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32, n. 11, p. 177, 2016/09/15 2016.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA, Í.; FERNANDES, É. K. K. *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 165, p. 46-53, 2019/07/01/ 2019.

MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Non-parasitic life cycle of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Panicum maximum* pastures in northern Argentina. **Research in Veterinary Science**, 115, p. 138-145, 2017/12/01/ 2017.

MICHEREFF FILHO, M.; FARIA, M. R. d.; WRAIGHT, S. P.; SILVA, K. F. A. S. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, 76, n. 4, p. 769-779, 2009.

MONGKOLSAMRIT, S.; KHONSANIT, A.; THANAKITPIPATTANA, D.; TASANATHAI, K. *et al.* Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. **Studies in Mycology**, 95, p. 171-251, 2020/03/01/ 2020.

MONTALVA, C.; COLLIER, K.; ROCHA, L. F. N.; INGLIS, P. W. *et al.* A natural fungal infection of a sylvatic cockroach with *Metarhizium blattodeae* sp. nov., a member of the *M. flavoviride* species complex. **Fungal Biology**, 120, n. 5, p. 655-665, 2016/05/01/ 2016.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, 56, n. 3, p. 169-172, 2003/11/01 2003.

NISHI, O.; SATO, H. Isolation of *Metarhizium* spp. from rhizosphere soils of wild plants reflects fungal diversity in soil but not plant specificity. **Mycology**, 10, n. 1, p. 22-31, 2019/01/02 2019.

OWNLEY, B. H.; GRIFFIN, M. R.; KLINGEMAN, W. E.; GWINN, K. D. *et al.* *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98, n. 3, p. 267-270, 2008/07/01/ 2008.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: an overview %J Scientia Agricola. 71, p. 420-429, 2014.

PAVA-RIPOLL, M.; ANGELINI, C.; FANG, W.; WANG, S. *et al.* The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudate. 157, n. 1, p. 47-55, 2011.

PENG, Y.; TANG, J.; HONG, M.; XIE, J. Suppression of Rice Planthopper Populations by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* without Affecting the Rice Microbiota. 86, n. 21, p. e01337-01320, 2020.

PETLAMUL, W.; PRASERTSAN, P. Evaluation of Strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the Basis of Their Virulence, Germination Rate, Conidia Production, Radial Growth and Enzyme Activity. **Mycobiology**, 40, n. 2, p. 111-116, 2012/06/01 2012.

POHL, P. C.; CARVALHO, D. D.; DAFFRE, S.; DA SILVA VAZ JR, I. *et al.* In vitro establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism. **Veterinary Parasitology**, 204, n. 3, p. 316-322, 2014/08/29/ 2014.

POHL, P. C.; KLAFKE, G. M.; JÚNIOR, J. R.; MARTINS, J. R. *et al.* ABC transporters as a multidrug detoxification mechanism in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Parasitology Research**, 111, n. 6, p. 2345-2351, 2012/12/01 2012.

POSADA, F.; VEGA, F. E. Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycoscience**, 47, n. 5, p. 284-289, 2006/10/01 2006.

POWELL, R. T.; REID, T. J. Project tick control [*Boophilus microplus*, cattle breeds, prevention, resistance, Australia]. **Queensland agricultural journal**, 108, n. 6, p. 279-300, 1982.

QUESADA-MORAGA, E.; LÓPEZ-DÍAZ, C.; LANDA, B. B. The Hidden Habit of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*: First Demonstration of Vertical Plant Transmission. **PLOS ONE**, 9, n. 2, p. e89278, 2014.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, 88, n. 2, p. 116-125, 2005/02/01/ 2005.

RECK, J.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, R. O.; SOUZA, U. A. *et al.* Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? **Preventive Veterinary Medicine**, 113, n. 1, p. 59-62, 2014/01/01/ 2014.

RESQUÍN-ROMERO, G.; GARRIDO-JURADO, I.; DELSO, C.; RÍOS-MORENO, A. *et al.* Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, 136, p. 23-31, 2016/05/01/ 2016.

RIGUETTI ZANARDO BOTELHO, A. B.; ALVES-PEREIRA, A.; COLONHEZ PRADO, R.; ZUCCHI, M. I. *et al.* Metarhizium species in soil from Brazilian biomes: a study of diversity, distribution, and association with natural and agricultural environments. **Fungal Ecology**, 41, p. 289-300, 2019/10/01/ 2019.

ROBERTS, D. W.; ST. LEGER, R. J. Metarhizium spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *In: Advances in Applied Microbiology*: Academic Press, 2004. v. 54, p. 1-70.

RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; JONSSON, N. N.; BHUSHAN, C. Strategies for the control of Rhipicephalus microplus ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, 117, n. 1, p. 3-29, 2018/01/01 2018.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.

SAHAB, A. F. Antimicrobial efficacy of secondary metabolites of Beauveria bassiana against selected bacteria and phytopathogenic fungi. **Journal of Applied Sciences Research**, n. No.March, p. 1441-1444, 2012.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. FUNGAL ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 29, n. 1, p. 319-343, 1998/11/01 1998.

SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S.; BILLS, G. F.; HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, Í. Non-systemic fungal endophytes of grasses. **Fungal Ecology**, 5, n. 3, p. 289-297, 2012/06/01/ 2012.

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

SCHOLLER, M. Biological control: Insect pathogens, parasitoids, and predators. *In: HAGSTRUM, D. W.; PHILLIPS, T. W., et al (Ed.). Stored Product Protection*. Manhattan, KS: Kansas State University, 2012. p. 203-212.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Metarhizium anisopliae enzymes and toxins. **Toxicon**, 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010/12/15/ 2010.

SCHUEFFLER, A.; ANKE, T. Fungal natural products in research and development. **Natural Product Reports**, 31, n. 10, p. 1425-1448, 2014. 10.1039/C4NP00060A.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.-K. *et al.* Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SETTE, L. D.; PASSARINI, M. R. Z.; DELARMELENA, C.; SALATI, F. *et al.* Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 22, n. 11, p. 1185-1195, 2006/11/01 2006.

SHAH, F. A.; WANG, C. S.; BUTT, T. M. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. 251, n. 2, p. 259-266, 2005.

SHIMAZU, M.; MAEHARA, N.; SATO, H. Density dynamics of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) introduced into forest soil, and its influence on other soil microorganisms. **Applied Entomology and Zoology**, 37, n. 2, p. 263-269, 2002.

SHIN, T. Y.; BAE, S. M.; WOO, S. D. Screening and characterization of antimicrobial substances originated from entomopathogenic fungi. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, 19, n. 4, p. 1053-1059, 2016/12/01/ 2016.

SIMBERLOFF, D. Risks of biological control for conservation purposes. **BioControl**, 57, n. 2, p. 263-276, 2012/04/01 2012.

SINGH, H. B.; SINGH, A.; SARMA, B. K.; UPADHYAY, D. N. *Trichoderma viride* 2% WP (Strain No. BHU-2953) formulation suppresses tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and chilli damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* effectively under different agroclimatic conditions. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, 7, n. 2, p. 313-320, 2014.

SONENSHINE, D. E. **Biology of Ticks**. Oxford University Press, 1991. v. v. 1). 9780195059106.

SPAGNOL, F. H.; PARANHOS, E. B.; ALBUQUERQUE, G. R. AVALIAÇÃO IN VITRO DA AÇÃO DE ACARICIDAS SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* CANESTRINI, 1887 (ACARI: IXODIDAE) DE BOVINOS LEITEIROS NO MUNICÍPIO DE ITAMARAJU, BAHIA, BRASIL. **Ciência Animal Brasileira**, 11, n. 3, p. 731 - 736, 10/02 2010.

ST. LEGER, R. J.; WANG, C. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 85, n. 4, p. 901-907, 2010/01/01 2010.

STONE, L. B. L.; BIDOCHKA, M. J. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020/10/21 2020.

STRASSER, H.; VEY, A.; BUTT, T. M. Are There any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? **Biocontrol Science and Technology**, 10, n. 6, p. 717-735, 2000/12/01 2000.

STRAUB, C. S.; FINKE, D. L.; SNYDER, W. E. Are the conservation of natural enemy biodiversity and biological control compatible goals? **Biological Control**, 45, n. 2, p. 225-237, 2008/05/01/ 2008.

TONG, S.; LI, M.; KEYHANI, N. O.; LIU, Y. *et al.* Characterization of a fungal competition factor: Production of a conidial cell-wall associated antifungal peptide. **PLOS Pathogens**, 16, n. 4, p. e1008518, 2020.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transactions of the British Mycological Society**, 66, n. 3, p. 407-411, 1976/06/01/ 1976.

VAN LENTEREN, J. C.; BUENO, V. H. P. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **BioControl**, 48, n. 2, p. 123-139, 2003/04/01 2003.

VAN LENTEREN, J. C.; ROSKAM, M. M.; TIMMER, R. Commercial Mass Production and Pricing of Organisms for Biological Control of Pests in Europe. **Biological Control**, 10, n. 2, p. 143-149, 1997/10/01/ 1997.

VEGA, F. E.; GOETTEL, M. S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D. *et al.* Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, 2, n. 4, p. 149-159, 2009/11/01/ 2009.

VEGA, F. E.; POSADA, F.; CATHERINE AIME, M.; PAVA-RIPOLL, M. *et al.* Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, 46, n. 1, p. 72-82, 2008/07/01/ 2008.

VESTERGAARD, S.; CHERRY, A.; KELLER, S.; GOETTEL, M. Safety of Hyphomycete Fungi as Microbial Control Agents. *In*: HOKKANEN, H. M. T. e HAJEK, A. E. (Ed.). **Environmental Impacts of Microbial Insecticides: Need and Methods for Risk Assessment**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 35-62.

VIEIRA TIAGO, P.; PORTO CARNEIRO-LEÃO, M.; MALOSSO, E.; TINTI DE OLIVEIRA, N. *et al.* Persistence and effect of *Metarhizium anisopliae* in the fungal community of sugarcane soil. **BioControl**, 57, n. 5, p. 653-661, 2012/10/01 2012.

WAGENAAR, M. M.; GIBSON, D. M.; CLARDY, J. Akanthomycin, a New Antibiotic Pyridone from the Entomopathogenic Fungus *Akanthomyces gracilis*. **Organic Letters**, 4, n. 5, p. 671-673, 2002/03/01 2002.

WANG, C.; HU, G.; ST. LEGER, R. J. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, 42, n. 8, p. 704-718, 2005/08/01/ 2005.

WANG, C.; ST LEGER, R. J. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. **Eukaryotic cell**, 6, n. 5, p. 808-816, 2007.

WHITE, A.; GAFF, H. Review: Application of Tick Control Technologies for Blacklegged, Lone Star, and American Dog Ticks. **Journal of Integrated Pest Management**, 9, n. 1, 2018.

WYREBEK, M.; BIDOCHKA, M. J. Variability in the Insect and Plant Adhesins, Mad1 and Mad2, within the Fungal Genus *Metarhizium* Suggest Plant Adaptation as an Evolutionary Force. **PLOS ONE**, 8, n. 3, p. e59357, 2013.

XIAO, D.-M.; XIAO, J.-H.; ZHANG, Z.-M.; SUN, Z.-H. [Antimicrobial potential of *Metarhizium taii* in vitro]. **Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials**, 33, n. 6, p. 952-957, 2010/06// 2010.

XU, Y.-J.; LUO, F.; LI, B.; SHANG, Y. *et al.* Metabolic Conservation and Diversification of *Metarhizium* Species Correlate with Fungal Host-Specificity. 7, n. 2020, 2016-December-16 2016. Original Research.

ZHANG, L.; FASOYIN, O. E.; MOLNÁR, I.; XU, Y. Secondary metabolites from hypocrealean entomopathogenic fungi: novel bioactive compounds. **Natural Product Reports**, 37, n. 9, p. 1181-1206, 2020. 10.1039/C9NP00065H.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, 17, n. 9, p. 879-920, 2007/10/01 2007.

## **CAPÍTULO I**

### **CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Metarhizium* spp.: CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO ENDOFITICA, TOLERÂNCIA TÉRMICA E EXPRESSÃO GÊNICA**

## RESUMO

O estudo da biologia dos fungos entomopatogênicos, assim como a seleção de isolados são passos fundamentais no desenvolvimento do controle biológico de pragas. Baseado nisso, os testes descritos neste capítulo objetivaram a seleção de isolados de *Metarhizium* spp. a partir capacidade em colonizarem plantas de feijão mungo (*Vigna radiata*) e de serem tolerantes ao estresse térmico, além disso buscou-se avaliar também a influência de diferentes substratos sobre a expressão do gene *mad2*, envolvido no processo de adesão e internalização do fungo em plantas. Para os testes de colonização de *V. radiata*, oito isolados de *Metarhizium* spp. provindos do solo da região Sudoeste da Colúmbia Britânica – Canada foram testados. Sementes da leguminosa foram tratadas por imersão em suspensões dos diferentes isolados do fungo contendo  $10^6$  conídios/mL. Posteriormente as mudas produzidas e o solo também foram tratados com suspensões de  $10^8$  conídios/mL. Duas semanas depois, a colonização pelos respectivos isolados fúngicos foi então verificada nas folhas, caules e raízes das plantas. Para os ensaios de tolerância térmica os cinco isolados mais endofíticos foram selecionados e dois ensaios paralelos foram realizados, um de tolerância ao calor e outro de atividade no frio. Para isso foram preparadas suspensões aquosas contendo  $10^5$  conídios/mL de cada isolado e posteriormente um volume de 2 mL de cada suspensão foi direcionado para o ensaio de tolerância ao calor, no qual os conídios foram submetidos ao calor úmido de 40 e 45 °C por 2, 4, 8 e 12h. Para avaliar a atividade no frio uma alíquota 20 µL de cada suspensão conidial foi deposita em meio de cultura e a germinação fúngica foi avaliada após 15 dias de incubação à 5 °C. Quanto ao ensaio de expressão gênica, um dos isolados utilizados no teste de capacidade endofítica foi selecionado e por meio da técnica de qPCR, a expressão relativa do gene *mad2*, no fungo crescido sobre os tecidos de *V. radiata*, foi comparada com a expressão do gene em conídios cultivados em meio mínimo e em meio batata dextrose ágar. A partir dos resultados obtidos no teste de tolerância térmica, foi possível observar que apesar dos isolados terem resistido a exposição ao calor de 40 °C, houve variação na tolerância, permitindo a seleção dos que foram menos impactados no percentual de germinação. Quanto ao ensaio de colonização endofítica, todos os isolados testados foram capazes de colonizar raízes, caules e folhas da leguminosa, permitindo a triagem dos isolados em relação aos tecidos de preferência. Na avaliação da expressão gênica do fungo nos diferentes substratos, notou-se que o cultivo do fungo em meios pouco nutritivos aumenta a expressão do gene *mad2*, sugerindo que o cultivo do fungo em determinadas culturas pode servir de estratégia para o desenvolvimento de estruturas fúngicas mais adaptadas para a interação com vegetais. De forma geral os resultados obtidos nesse capítulo agregam conhecimento sobre os isolados fúngicos utilizados e servem de ferramenta para futuras pesquisas e aplicações do gênero *Metarhizium*.

**Palavras-chave:** fungos entomopatogênicos, tolerância térmica, adesão em plantas.

## ABSTRACT

Investigate the biology of the entomopathogenic fungi, as well as select them are mainly steps in the development of biological pest control strategies. Based on that, the trials described in this chapter aimed the selection of *Metarhizium* spp. isolates focused on the ability of the isolates colonizes mung bean plants (*Vigna radiata*) and be thermal tolerant, and also sought to evaluate the influence of different substrates on the expression of the *mad2* gene, involved in the process of adhesion and internalization of the fungus in plants.

To assess the colonization of *V. radiata*, eight isolates of *Metarhizium* spp. from soil in the South West region of British Columbia - Canada were tested. Plant seeds were treated with different *Metarhizium* spp isolates by immersion in aqueous suspensions containing  $10^6$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . Subsequently, the soil and the seedlings produced were also treated with aqueous suspensions containing  $10^8$  conidia  $\text{mL}^{-1}$ . Two weeks later, colonization by the respective fungal isolates was then verified in the leaves, stems and roots of the plants. For the thermotolerance tests, the five most endophytic isolates were selected, and two independent essays were performed, one for heat tolerance and the other for cold activity. First, aqueous suspensions were prepared containing  $10^5$  conidia  $\text{mL}^{-1}$  of each isolate and later a volume of 2 mL of each suspension was used for the heat tolerance test, in which the conidia were exposed to humid heating at 40 and 45 °C for 2, 4, 8 and 12 h. To assess cold activity, a 20  $\mu\text{L}$  aliquot of each conidial suspension was deposited in culture medium and fungal germination was evaluated after 15 days of incubation at 5 °C. The gene expression assay was performed with one of the isolates used in the endophytic capacity test. Using the qPCR technique, the relative expression of the *mad2* gene was evaluated in conidia recovered from *V. radiata* tissues, grown in minimal medium and in potato dextrose agar medium. From the results obtained in the thermal tolerance test, it was possible to observe that the isolates resisted exposure to heat of 40 °C, however the heat tolerance varied between them and allowed the selection of those that were less impacted on the germination percentage. In the evaluation of gene expression, it was found that the cultivation of the fungus in low-nutrient media increases the expression of the *mad2* gene, suggesting that the cultivation of the fungus in certain cultures could be used as a strategy for the development of fungal structures more adapted for interaction with plants. In general, the results obtained in this chapter add knowledge about the fungal isolates and can be used for future research and applications.

Keywords: entomopathogenic fungi, themotolerance, plant adhesion.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Metarhizium* é um dos principais agentes utilizado no controle biológico de artrópodes no mundo (FARIA; WRAIGHT, 2007). Seu uso promissor no combate a pestes está relacionado a seu estilo de vida multifuncional, uma vez que esse agente pode estabelecer relações simbióticas com espécies vegetais e ao mesmo tempo infectar artrópodes pestes (BIDOCHKA, MICHAEL J.; KAMP, ANDRENA M.; LAVENDER, T. MICHAEL; DEKONING, JASON *et al.*, 2001). No entanto, antes de serem empregados em programas de controle de pragas, análises que envolvam a seleção de isolados são fundamentais para o sucesso destes entomopatógenos no ambiente (BARELLI; MOONJELY; BEHIE; BIDOCHKA, 2016).

Uma das características mais importantes na triagem de isolados para o uso em programas de controle biológico é resistência ao desafio térmico (alta e baixa temperatura) (FERNANDES; KEYSER; CHONG; RANGEL *et al.*, 2010), uma vez que o frio e o calor afetam diretamente as atividades bioquímicas e celulares do fungo, que irão refletir desde a germinação e esporulação, até a infecção e interação patógeno-hospedeiro (CABANILLAS; JONES, 2009; FEOFILOVA; TERESHINA; MEMORSKAYA; KHOKHLOVA, 2000; KEYSER; FERNANDES; RANGEL; ROBERTS, 2014).

Outro ponto importante na seleção de isolados e relativamente novo para o do gênero *Metarhizium* é a capacidade endofítica, essa habilidade permite novas abordagem na aplicação desse entomopatógeno (PATIL; SARRAF; KHARKWAL, 2020). No entanto é importante conhecer o comportamento dos diferentes isolados a fim de aprofundar as pesquisas e direcioná-los para aplicação no campo, que pode ter como alvo a filosfera ou na rizosfera de plantas, levando em consideração hábito de uma praga alvo, visto que gênero *Metarhizium* pode colonizar diferentes tecidos vegetais dependendo das espécie, do isolado e do local de aplicação (BARELLI; MOREIRA; BIDOCHKA, 2018; GARCÍA; POSADAS; PERTICARI; LECUONA, 2011; LOVETT; ST. LEGER, 2015) apesar de ser mais esperado que isso ocorra nas raízes e do hipocótilo (BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015; LAHEY; ANGELONE; DEBARTOLO; COUTINHO-RODRIGUES *et al.*, 2020).

Visto isso, o presente capítulo reporta três ensaios. O primeiro aborda a tolerância ao calor de isolados originários de um país de clima frio, com o objetivo de classificá-los a fim de serem empregados em sistemas agrícolas que oferecem estresse térmico. O segundo ensaio, também trata da seleção de isolados de *Metarhizium* spp., porém com o objetivo de investigar sua capacidade em colonizar endofiticamente feijão mungo (*Vigna radiata*) e de classificá-los. Já o terceiro ensaio, trata-se da análise de expressão gênica, com a finalidade de avaliar a modulação do gene *mad2* (envolvido no processo de adesão do conídio a plantas) quando o fungo se desenvolve em diferentes substratos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local de execução dos experimentos e obtenção dos isolados

Os experimentos de capacidade endofítica, tolerância ao calor, e expressão gênica foram realizados no Institute for Sustainable Horticulture (ISH) pertencente a Kwantlen Polytechnic University (KPU), localizado na província de British Columbia, Canada. O período de realização dos experimentos se deu entre os meses de fevereiro a agosto de 2017.

Os isolados de *Metarhizium* spp. utilizados no presente capítulo foram selecionados para a investigação, devido uma demanda do Kwantlen's Institute for Sustainable Horticulture

para a geração de um banco de dados. Oito isolados foram utilizados nos testes de capacidade endofítica (Tabela 1) e a partir desse, cinco foram selecionados para a avaliação da tolerância térmica. Os isolados foram cultivados em batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos para crescimento sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1$  °C) e umidade relativa ( $UR \geq 80\%$ ).

**Tabela 1** - Isolados de *Metarhizium* spp. utilizados para testes de colonização endofítica e isolados selecionados para o ensaio de tolerância térmica (\*). Os fungos foram agrupados de acordo com a identificação na coleção do Kwantlen's Institute for Sustainable Horticulture (ISH) e seguidos pelo gênero ou espécie, substrato e região de origem.

Isolado	Gênero/Espécie	Substrato	Origem
ISH 90*	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Solo	BC, Canada
ISH 133	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Solo	BC, Canada
ISH 188	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Solo	BC, Canada
ISH 257*	<i>Metarhizium</i> sp.	Solo	BC, Canada
ISH 258*	<i>Metarhizium</i> sp.	Solo	BC, Canada
ISH 261*	<i>Metarhizium</i> sp.	Solo	BC, Canada
ISH 262*	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Solo	BC, Canada
ISH 277	<i>Metarhizium anisopliae</i> s.l.	Solo	BC, Canada

## 2.2. Colonização endofítica de *Vigna radiata*

### 2.2.1 Preparo das suspensões fúngicas para o teste de colonização endofítica

Os isolados foram cultivados Meio Batata Dextrose Ágar suplementado com extrato de levedura (0,01% [p/v]) (BDAL) e crescidos sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1$ °C) e umidade relativa ( $UR \geq 80\%$ ) por 14 dias em escotofase. Após o período de cultivo, os conídios foram raspados das placas de cultura, suspensos em uma solução de água destilada estéril e Tween 80<sup>®</sup> 0,1 % (v/v) e homogêneos em agitador tipo vórtex por 5 min. As suspensões conidiais foram ajustadas na concentração de  $10^6$  ou  $10^8$  conídios/mL de acordo com os diferentes tratamentos descritos na seção 2.2.2..

A viabilidade dos isolados fúngicos foi avaliada em todos os tratamentos. Para isso, uma alíquota de 20µL de cada suspensão a  $1 \times 10^6$  conídios/mL foi aplicada sobre o meio BDAL acrescido de 0,002% (p/v) de benomyl com 25% de ingrediente ativo e a germinação foi avaliada em microscópio óptico (400x) a partir da contagem de no mínimo 300 conídios (germinados e não germinados) após 24h de incubação a  $25 \pm 1$  °C e  $UR \geq 80\%$ .

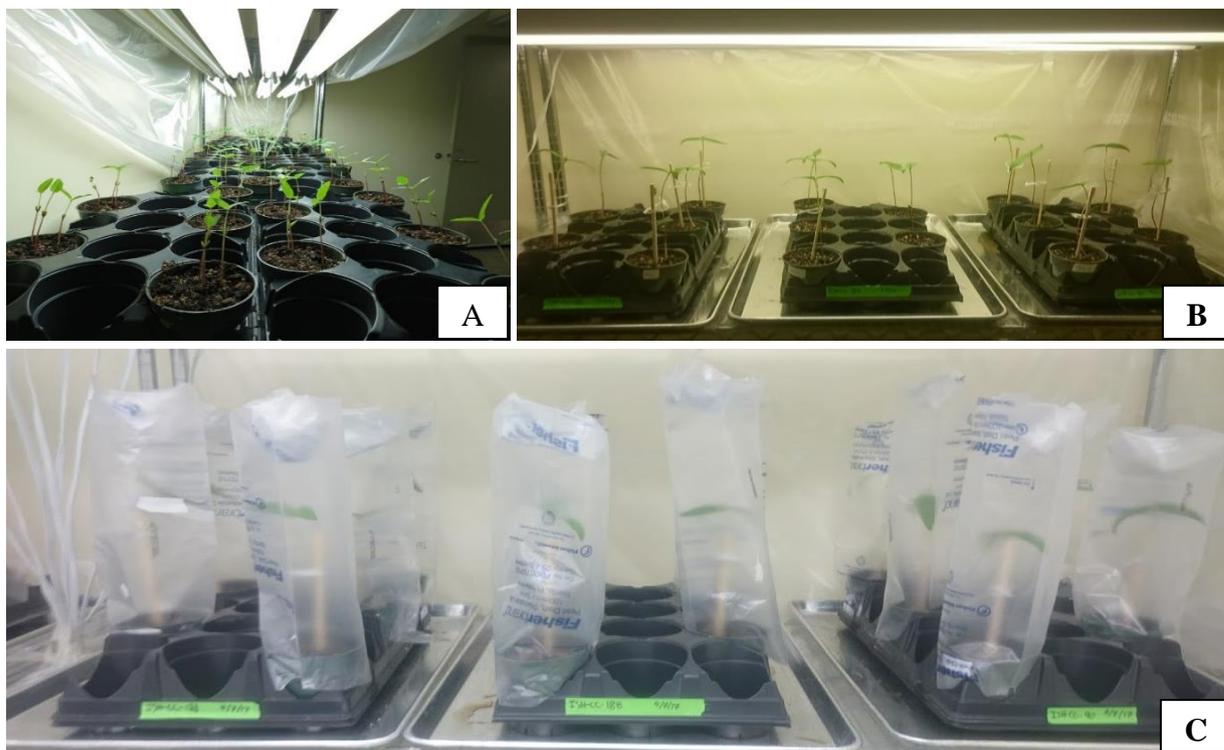
### 2.2.2 Cultivo e tratamento de *Vigna radiata*

Para esse ensaio, sementes, caules, folhas e o solo foram tratados. Primeiramente, as sementes de feijão mungo convencionais foram desinfetadas através da imersão por 2 min em etanol a 95%, depois enxaguadas em água destilada estéril e transferidas para peróxido de hidrogênio a 30% por 1 min, e novamente lavadas três vezes em água destilada estéril (SASAN; BIDOCHKA, 2012). Para avaliar o sucesso da esterilização das sementes, 100 µL da última água de lavagem foram aplicados em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e as placas foram incubadas durante 10 dias a 25 °C (PARSA; ORTIZ; VEGA, 2013).

Após a esterilização da superfície, 20 sementes foram imersas em 20mL das suspensões conidiais à  $1 \times 10^6$  conídios/mL ou em solução de água destilada estéril e Tween 80<sup>®</sup> 0,1 %

(v/v) (grupo controle) por 1h (SASAN; BIDOCHKA, 2012) e posteriormente três sementes foram plantadas por vasos de polipropileno, com 12 cm de diâmetro, 10 cm de altura e preenchidos de substrato para planta estéril. Cada grupo foi composto por 5 vasos e todo o ensaio foi repetido duas vezes.

O cultivo das plantas foi feito em salas climatizadas a  $25 \pm 1$  °C e 50% UR, com fotoperíodo de 12 h (Figura 1A). As sementes foram regadas a cada 2-3 dias com água destilada estéril, uma semana após a germinação, duas mudas menos vigorosas de cada vaso foram eliminadas. O tratamento das plantas selecionadas e do solo com suspensões conidiais foi feito quando as mudas atingiram o primeiro estágio de folhas verdadeiras (Figura 1B) (PARSA; ORTIZ; VEGA, 2013). Folhas e caule da mesma planta foram tratados com  $1 \times 10^8$  conídios/mL ou Tween 80<sup>®</sup> 0,1 % (v/v) (controle) utilizando-se um pulverizador manual até toda a superfície dos tecidos do vegetal estarem completamente molhados e saturados pelo líquido. O solo foi tratado com 10 mL das suspensões de conídios à  $1 \times 10^8$  conídios/mL ou Tween 80<sup>®</sup> 0,1 % (v/v) (controle), 1 cm distante da base da planta. Logo após o tratamento, as plantas foram cobertas com um saco plástico por 24h (Figura 1C), para manter um alto nível de umidade e facilitar a internalização do fungo (PARSA; ORTIZ; VEGA, 2013) e foram mantidas em sala climatizada a  $25 \pm 1$  °C e 50% UR, com fotoperíodo de 12 h.



**Figura 1.** Cultivo de feijão mungo (*Vigna radiata*) em sala climatizada para utilização nos ensaios de capacidade endofítica de *Metarhizium* spp. **A.** Vasos contendo três mudas de 7 dias, antes da seleção da planta mais vigorosa. **B.** Grupos formados com cinco vasos contendo uma muda selecionada em cada após o surgimento das folhas verdadeiras. **C.** Grupos de vasos, recobertos com saco plástico para favorecer a internalização fúngica, após o tratamento do solo e das mudas com *Metarhizium* spp.

### 2.2.3 Isolamento fúngico dos tecidos de *Vigna radiata*

Para avaliar a colonização dos tecidos de *V. radiata* pelos isolados fúngicos inoculados, as plantas foram cuidadosamente removidas dos vasos 2 semanas após o tratamento e foram

lavadas com água corrente. De cada planta, foram removidas duas folhas; duas amostras de caule com 3 cm de comprimento, contados a partir do meio da planta até a região próxima à superfície do solo; e duas amostras de raiz principal, com 3 cm de comprimento contados do meio da raiz até 1 cm atrás da ponta da raiz (PARSA; ORTIZ; VEGA, 2013).

As amostras obtidas foram lavadas e a superfície dos tecidos esterilizada em capela de fluxo laminar por imersão durante dois minutos em hipoclorito de sódio a 0,5%, dois minutos em etanol 70% e enxaguados três vezes em água destilada estéril, foram dissecadas e descartadas bordas, onde os endófitos podem ter sido eliminados devido ao contato com desinfetantes. A última água de enxágue também foi aplicada para avaliar a eficácia do procedimento de esterilização da superfície, conforme descrito anteriormente (PARSA; ORTIZ; VEGA, 2013).

As amostras foram cortadas em quatro seções, com média de 6 mm de comprimento para caules e raízes, das folhas foram retirados segmentos com auxílio de um perfurador tipo “punch” (número 4). As seções foram colocadas em placa de Petri de 90 mm sobre meio seletivo CTC (BDAL, suplementado com cloranfenicol, tiabendazol e cicloheximida) (FERNANDES; KEYSER; RANGEL; FOSTER *et al.*, 2010).

As placas foram incubadas em câmara climatizada a  $25 \pm 1$  °C e UR  $\geq 80\%$  por 21 dias e inspecionadas a cada 2-3 dias para observar e registrar o crescimento fúngico. A colonização dos diferentes tecidos da planta foi registrada contando o número de segmentos que apresentavam crescimento fúngico de acordo com os postulados de Koch (PETRINI; FISHER, 1986) e apenas a presença de colônias características de *Metarhizium* spp. foi pontuada. Para a identificação morfológica, amostras das colônias crescidas sobre os tecidos vegetais foram coletadas e lâminas de microcultivo foram preparadas para posterior análise das características segundo (HUMBER, 2012). Todo o ensaio de colonização endofítica foi repetido duas vezes e de forma independente. A taxa de colonização fúngica da planta hospedeiras foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de colonização} = \frac{\text{Número de plantas exibindo crescimento de fungos}}{\text{Número total de plantas}} \times 100$$

### **2.3. Efeito do calor úmido e do frio sobre a germinação dos isolados fúngicos**

#### **2.3.1 Preparo das suspensões fúngicas para o teste de tolerância térmica**

Os isolados foram cultivados meio batata dextrose ágar suplementado com 0.1g/L de extrato de levedura (BDAL) (0,01% [p/v]) e crescidos sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1$  °C) e umidade relativa (UR  $\geq 80\%$ ) por 14 dias em escotofase. Após o período de cultivo, os conídios foram raspados das placas de cultura, suspensos em uma solução de água destilada estéril e monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80<sup>®</sup>) a 1% (v/v) e homogeneizados em agitador tipo vórtex por 5 min.

As suspensões foram filtradas em papel filtro Whatman<sup>™</sup> (90mm de diâmetro, com poros de 1  $\mu$ m) para impedir a agregação de conídios, e então foram ajustadas à concentração de  $1 \times 10^5$  conídios/mL usando câmara Neubauer. Imediatamente após o preparo, 2 mL de cada suspensão foi adicionada em tubos de vidro com parede delgada e com rosca, que foram então expostos às condições de teste.

#### **2.3.2 Exposição dos isolados fúngicos ao frio e ao calor**

Para avaliar o efeito da baixa temperatura sobre a germinação conidial os ensaios foram adaptados da metodologia descrita por FERNANDES; RANGEL; MORAES; BITTENCOURT

*et al.* (2008), após a preparação das suspensões fungicas de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.1, uma alíquota de 20µL foi depositada sobre o meio BDAL acrescido de 0,002% (p/v) de benomyl com 25% de ingrediente ativo (BRAGA; FLINT; MILLER; ANDERSON *et al.*, 2001), as placas foram imediatamente alocadas em um pote fechado de metal, que foi embalado em papel alumínio e incubado à  $5 \pm 1$  °C por 15 dias. A temperatura e a umidade foram monitoradas com o auxílio de um aparelho HOBOTM data logger dentro do mesmo ambiente que as placas. A avaliação da germinação relativa foi verificada imediatamente após a retirada das placas do frio e também depois de 24h e 48h de incubação à  $25 \pm 1$ °C e umidade relativa (UR)  $\geq 80\%$ . A germinação dos conídios do grupo controle foi avaliada após 48h de incubação à  $25 \pm 1$ °C e umidade relativa (UR)  $\geq 80\%$ .

Os testes de tolerância ao calor foram conduzidos em incubadoras banho maria, onde as suspensões foram expostas ao calor úmido de 40 °C ou 45 °C por 2h, 4h, 8h e 12h. As suspensões de conídios do grupo controle foram mantidas à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). Após os tempos de incubação, a germinação foi avaliada através da transferência de uma alíquota de 20 µL das suspensões para o meio BDAL acrescido de 0,002% (p/v) de benomyl com 25% de ingrediente ativo (BRAGA; FLINT; MILLER; ANDERSON *et al.*, 2001) e as placas foram incubadas por 48h no escuro à  $25 \pm 1$ °C e umidade relativa (UR)  $\geq 80\%$  antes de observar a germinação.

Os testes de tolerância ao frio e calor foram realizados em triplicatas e os ensaios repetidos duas vezes. A porcentagem de germinação relativa (GR) dos conídios foi determinada contando aleatoriamente 300 conídios (germinados e não-germinados) sob microscópio de luz (400×) e calculada segundo BRAGA; FLINT; MILLER; ANDERSON *et al.* (2001) usando a seguinte equação:

$$GR (\%) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de conídios germinados no grupo exposto ao tratamento térmico}}{\text{n}^\circ \text{ de conídios germinados no grupo controle}}$$

#### 2.4. Expressão do gene *mad2* pelo fungo *Metarhizium anisopliae*

Foi comparada a expressão do gene responsável pela colonização de plantas, *mad2*, pelo fungo *M. anisopliae* quando crescido em três substratos, sendo eles: meio batata dextrose ágar (BDA), meio mínimo (PONTECORVO; ROPER; CHEMMONS; MACDONALD *et al.*, 1953) e o tecido da planta *V. radiata*. A partir dos experimentos prévios de colonização endofítica, selecionou-se o isolado ISH 90 de *M. anisopliae*, que apresentou boa porcentagem de colonização e material suficiente para processar as análises moleculares. O material fúngico utilizado na análise foi proveniente das colônias crescidas dos tecidos de *V. radiata* (descrito no item 2.2.2) ou foi obtido a partir do cultivo em meio BDA ou em meio mínimo sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1$ °C) e umidade relativa (UR  $\geq 80\%$ ) por 14 dias em escotofase.

Utilizando uma lâmina de bisturi estéril, o material fúngico foi raspado da superfície dos meios de cultura ou dos tecidos vegetais. Sendo que as amostras fúngicas providas de *V. radiata*, apenas o material fúngico em contato com a planta foi utilizado, evitando assim possíveis interferências do meio de cultura nos resultados. Aproximadamente 30 mg de conídios e micélios foram utilizados para a extração de RNA.

Para romper as células fúngicas foram utilizados tubos de matriz de lise (fabricado por FastPrep<sup>®</sup>-24) com 600 µL de tampão RTL (fornecido pelo RNeasy Mini kit QIAGEN<sup>®</sup>), o material foi agitado durante dois minutos à velocidade máxima no aparelho FastPrep<sup>®</sup>-24. O RNA foi isolado usando o kit RNeasy Mini (QIAGEN<sup>®</sup>) de acordo com as instruções do fabricante, e as concentrações foram medidas usando um espectrômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific<sup>®</sup> USA). Após a mensuração da concentração de RNA, imediatamente o

cDNA foi sintetizado a partir do kit de RNA-cDNA high capacity (Life Technologies®) de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA foi subsequentemente diluído com água isenta de nuclease a 50 ng/μl.

Para o PCR em tempo real (RTqPCR) foi utilizado o kit KAPA SYBR FAST qPCR. A mistura de amplificação (20 μL) de RTqPCR continha 50 ng de cDNA, 2 × Mistura Principal KAPA SYBR FAST qPCR (10 μL; Life Technologies®) e 200 nM de cada par de primers. A reação será realizada no sistema 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems®). O protocolo de reação seguiu as temperaturas: 20 segundos de ativação / desnaturação a 95°C, seguido por 40 ciclos de 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. Após a amplificação por PCR, a análise da curva de massa determinou a produção de dímeros. As amplificações por PCR foram realizadas duas vezes com cada cDNA analisado em triplicado em cada teste.

A expressão do gene *mad2* foi analisada a partir da comparação da expressão dos genes de referência *gpd* e *tef* (Tabela 2) descritos como padrões em *Metarhizium anisopliae* para análises de real-time RT-PCR (FANG; BIDOCHKA, 2006). A estabilidade de expressão de todos os genes foi avaliada através do software geNorm qbase<sup>PLUS</sup> (disponível em <http://www.biogazelle.com/>) que utiliza a equação descrita por (VANDESOMPELE; DE PRETER; PATTYN; POPPE *et al.*, 2002).

**Tabela 2** – Genes utilizados nos ensaios de expressão, seguidos da sequência de primers e tamanho dos produtos e eficiência da PCR.

Gene	Nome do gene	Forward (F) e Reverse (R) primers	Tamanho do produto (bp)	Eficiência da PCR
<i>mad2</i>	Proteína de adesão tipo 2	F (5'–3'): GCCTCGTCTCCCGCAGTTGTCG TTCTC R (5'–3'): CCCCCTCCCCCTCCTCTCCAGT TTTACAC	370	95,6 %
<i>gpd</i>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	F (5'–3'): GACTGCCCGCATTGAGAAG R (5'–3'): AGATGGAGGAGTTGGTGTG	149	96.2 %
<i>tef</i>	Fator de alongação na tradução 1α	F (5'–3'): AGGACGACAAGACTCACATC R (5'–3'): G TTCAGCGGCTTCCTTCTC R (5'–3'): CAAAGAGTGGTATCGAGTTAC	268	95.4 %

## 2.5. Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando-se o software R versão 4.0.2. Para análise da capacidade endofítica dos isolados e dos efeitos do frio (5 °C), do calor (40 °C e 45 °C) e do tempo de exposição (2, 4, 8 e 12 h) na germinação relativa dos mesmos foi utilizado ANOVA seguido por Tukey-Kramer HSD para dados que atenderam os pressupostos de normalidade e homogeneidade. Para os conjuntos de dados não paramétricos o teste de Kruskal Wallis seguido por Dunn foi utilizado (OGLE; WHEELER; DINNO, 2021).

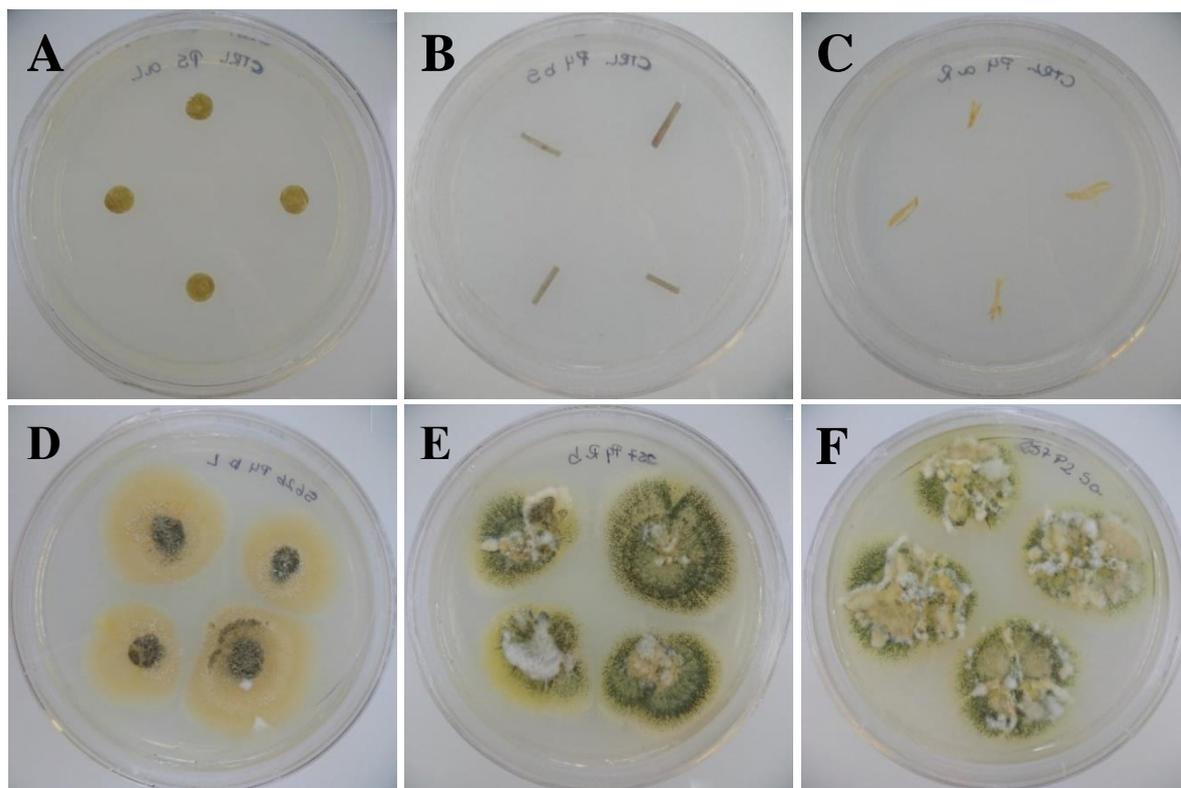
A percentagem média de colonização de folhas, caules, raízes e todas as partes de plantas foi comparada para todos os isolados utilizando uma Análise de Variância Univariada (ANOVA), seguida por testes de comparação múltipla de Tukey-Kremer HSD (JMP Versão 13). Para comparação da expressão de *mad2* nos diferentes substratos (Meio mínimo, BDA e Planta) foi utilizada ANOVA unidirecional, seguida da classificação com sinal de Wilcoxon (geNorm qbase<sup>PLUS</sup>).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Capacidade da colonização endofítica de isolados de *Metarhizium* spp.

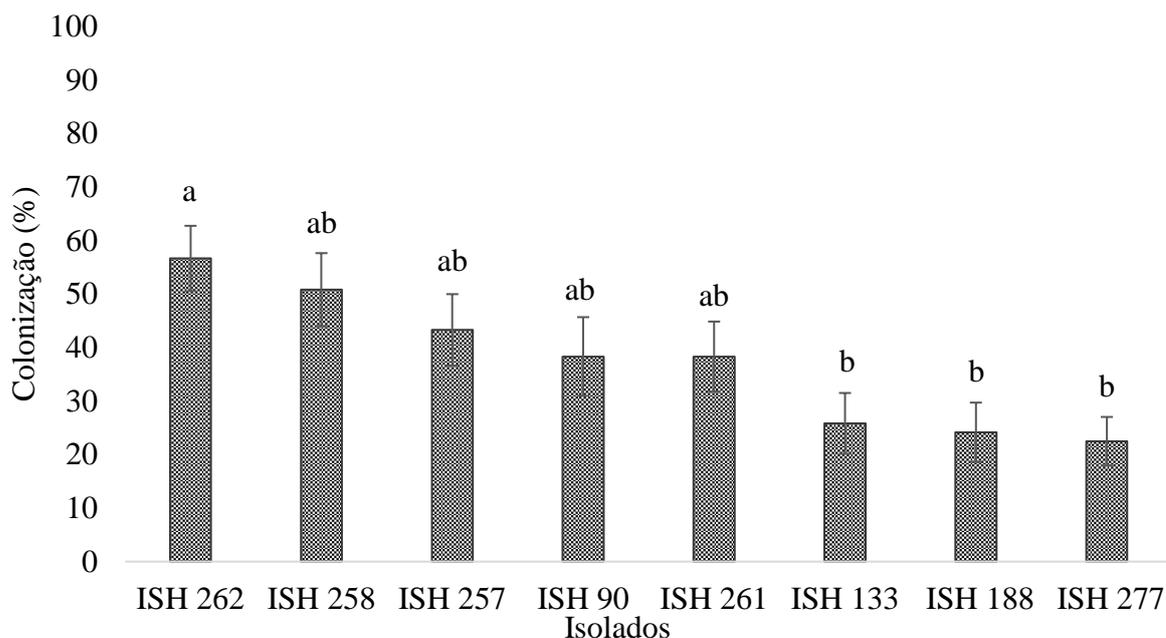
Nos testes de viabilidade das suspensões conidiais utilizadas para tratar *V. radiata*, todos os isolados fúngicos germinaram mais que 90%. Além disso, também foi possível confirmar a esterilidade da última água utilizada no enxague dos tecidos vegetais ao final do processo de assepsia, uma vez que não houve crescimento de nenhum microrganismo após 14 dias da inoculação da água em placas de BDA.

Duas semanas depois na inoculação das diferentes partes da planta em meio seletivo, foi possível observar a formação de colônias de *Metarhizium* spp. nos diferentes tecidos de *V. radiata* (Figura 2). Todos os isolados testados foram capazes de colonizar as plantas, no entanto a porcentagem de colonização observada variou entre eles (Figura 3). As plantas do grupo controle não apresentaram crescimento fúngico.



**Figura 2** - Colonização endofítica de *Vigna radiata* (feijão mungo) por *Metarhizium* spp., após o tratamento de diferentes partes da planta com suspensões aquosas do fungo. A parte superior da imagem mostra placas do grupo controle contendo folhas (A), Caules (B) e Raízes (C) que não apresentaram crescimento fúngico após 14 dias de incubação. Na parte inferior da imagem mostra placas do grupo tratado com folhas (D), caule (E) e raízes (F) apresentando o crescimento de *Metarhizium* spp. após 14 dias de incubação.

Considerando a média de colonização de todos os tecidos da planta, o tratamento feito com o isolado ISH 262 foi o que resultou em mais fragmentos de *V. radiata* colonizados, apresentando 56,66% das amostras de plantas tratadas com o crescimento de *Metarhizium* spp., diferindo estatisticamente dos isolados ISH 133 ( $P = 0,019$ ), ISH 188 ( $P = 0,009$ ) e ISH 277 ( $P = 0,006$ ) que apresentaram entre 25,83%, 24,16% e 22,5% respectivamente (Figura 3). O isolado 262 não diferiu dos isolados ISH 258 ( $P = 1,0$ ), ISH 257 ( $P = 1,0$ ), ISH 90 ( $P = 0,64$ ), ISH 261 ( $P = 0,87$ ), que obtiveram 50,83%, 43,33%, 38,33% e 38,33 respectivamente (Figura 3).

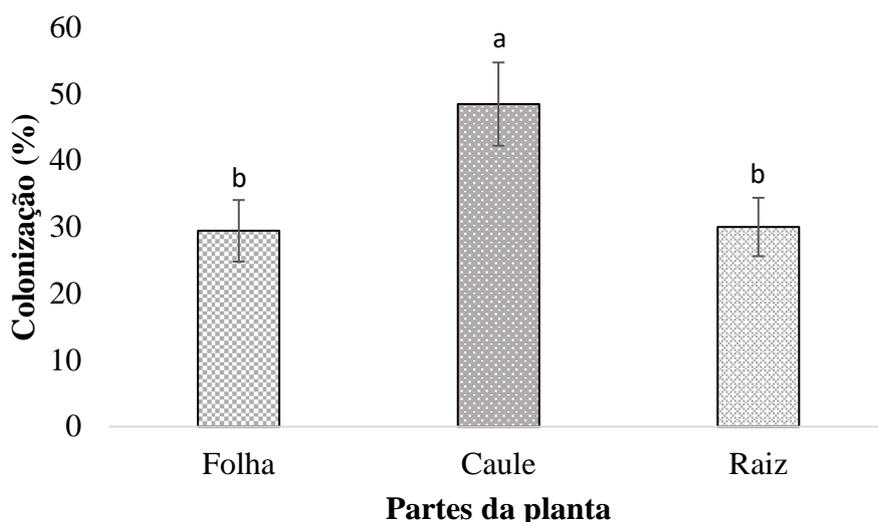


**Figura 3** - Percentual da colonização endofítica por diferentes isolados de *Metarhizium* spp. em *Vigna radiata* (Feijão Mungo) considerando todos os tecidos analisados (raiz, caule e folhas), após o tratamento da planta com as suspensões conidiais. Letras diferentes indicam significância estatística na comparação entre isolados fúngicos e barras indicam desvio padrão.

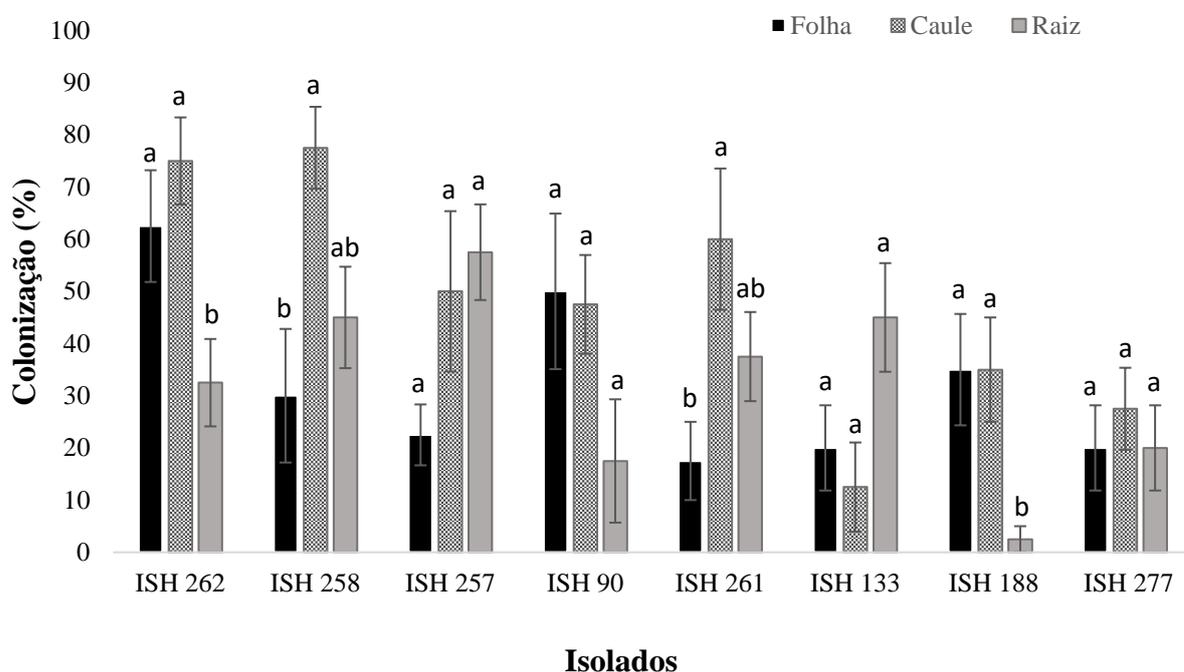
A partir da metodologia aplicada, também foi possível observar que os isolados testados foram capazes de colonizar as raízes, caules e folhas de *V. radiata*. Ao comparar o percentual de colonização das diferentes partes, o caule foi a região mais colonizada com 45% dos fragmentos apresentando exteriorização de *Metarhizium* spp., diferindo da raiz ( $P = 0,04$ ) e da folha ( $P = 0,03$ ), e não havendo diferença estatística entre estes dois últimos tecidos ( $P = 0,99$ ) (Figura 4).

No entanto, ao analisar individualmente a porcentagem de colonização dos tecidos por cada isolado, a maioria deles (ISH 257, ISH 90, ISH 133, ISH 277) não diferiram quanto as partes da planta colonizada (Figura 4).

Apesar disso, corroborando os resultados mostrados na figura 4, os isolados ISH 258, ISH 261 obtiveram a colonização do caule significativamente maior do que a colonização das folhas,  $P = 0,01$  e  $P = 0,03$  respectivamente, porém não diferindo na colonização dessas regiões quando comparado à raiz (Figura 5). Por outro lado, os isolados ISH 262 e ISH 188 foram os que apresentaram as porcentagens de colonização da raiz mais baixas quando comparado ao caule  $P = 0,004$  e  $P = 0,02$  respectivamente e a folha  $P = 0,02$  e  $P = 0,02$  respectivamente (Figura 5).



**Figura 4**– Porcentagem média da colonização das diferentes partes de *Vigna radiata* (Feijão Mungo) por *Metarhizium* spp. após serem tratadas com os diferentes do fundo. Dados médios consideram a colonização observadas em todos os isolados. Letras diferentes indicam significância estatística na comparação entre tecidos e barras indicam desvio padrão.



**Figura 5** – Colonização endofítica observada na folha, caule e raiz de *Vigna radiata* (Feijão Mungo) após o tratamento com diferentes isolados de *Metarhizium* spp. Letras diferentes indicam significância estatística na comparação entre tecidos no mesmo tratamento (isolado) e barras indicam desvio padrão.

### 3.1. Tolerância térmica de isolados de *Metarhizium* spp.

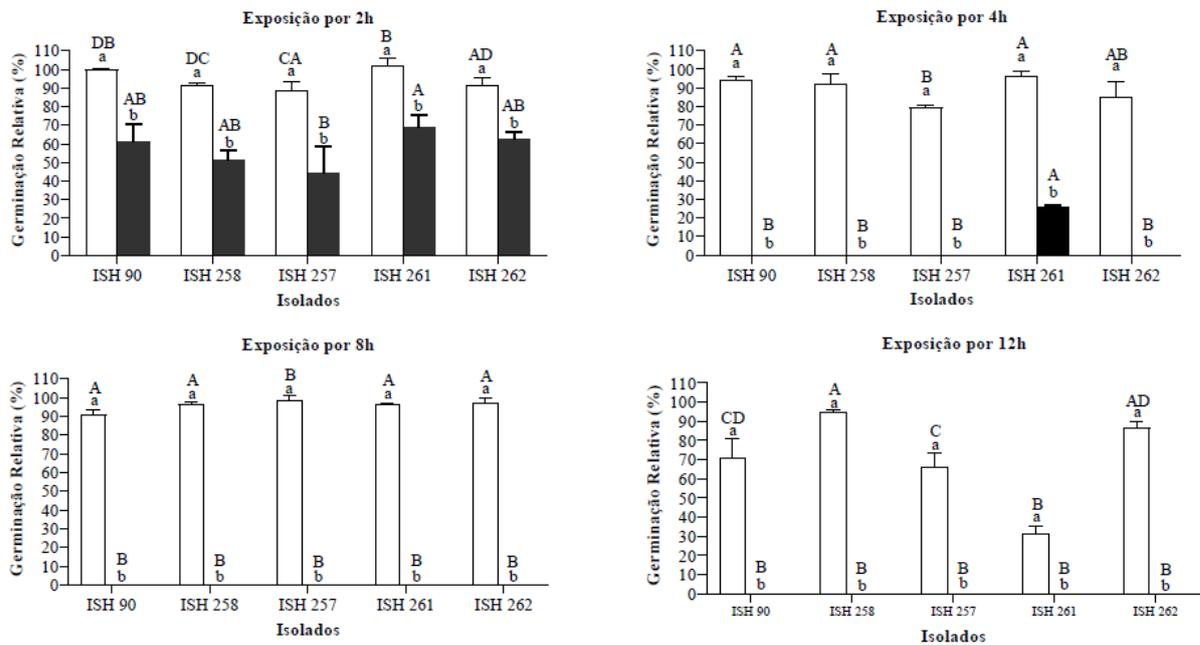
Os conídios das suspensões controles, mantidos a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C), obtiveram mais que 92.6% de germinação em todos os tempos de exposição, não diferindo entre os isolados em 2h ( $\chi^2_{4} = 8,4$ ,  $P > 0.07$ ), 4h ( $\chi^2_{4} = 10,1$ ,  $P > 0.05$ ), 8h ( $\chi^2_{4} = 11,9$ ,  $P > 0.05$ ) e 12h ( $\chi^2_{4} = 11,5$ ,  $P > 0.05$ ). Os isolados também não apresentaram variação significativa entre os tempos, ISH 90 ( $F_{3,8} = 0,349$ ,  $P > 0,7$ ), ISH 258 ( $\chi^2_{3} = 3,93$ ,  $P > 0.2$ ), ISH 257 ( $F_{3,8} = 0,205$ ,  $P > 0,8$ ), ISH 261 ( $\chi^2_{3} = 3,93$ ,  $P > 0.2$ ), ISH 262 ( $F_{3,8} = 1,172$ ,  $P > 0,3$ ).

Todos os isolados germinaram após a exposição ao calor de 40 °C independente do tempo de exposição. Após duas horas de exposição ao calor úmido, a germinação variou entre 87,4 a 100% e quando expostos a 45°C a porcentagem de germinação diminuiu variando entre 43,9 a 69% (Figura 6A).

Porém foi possível notar que períodos mais longos de exposição causou entre os isolados uma maior variabilidade no percentual de germinação ( $F_{4,10} = 48,8$ ,  $P > 0,0001$ ) (Figura 5). No maior tempo de exposição (12h) à 40 °C, os isolados ISH 258 foi o mais tolerante apresentando 94% de germinação, não diferindo do isolado ISH 262 ( $P = 0.48$ ) que obteve 86,5%, média de germinação também equivalente ao isolado ISH 90 que alcançou 70.1% de germinação ( $P = 0.06$ ) (Figura 6D). O isolado ISH 257 foi mais sensível ao calor 65,7 % dos conídios germinaram após a exposição à 40 °C por 12h, no entanto diferiu do isolado ISH 90 ( $P = 0.83$ ) (Figura 6D). Apresentando média de germinação ainda mais baixa e significativamente e significativamente menor que a dos isolado ISH 257, o isolado ISH 261 teve germinação igual à 31% ( $P > 0,0001$ ) sendo o menos tolerante ao aquecimento (Figura 6D).

Houve uma interação significativa entre tempo, temperatura e germinação os isolados ( $F_{72,228} = 9,38$ ;  $P < 0,0001$ ), evidenciando que a germinação decresce de acordo que a temperatura e o tempo de exposição aumentam. Ao contrário disso, apenas o isolado ISH 257 apresentou maior germinação após 8h de exposição a 40 °C do que quando exposto a mesma temperatura por 4h ( $F_{1,4} = 91,92$ ;  $P < 0,001$ ).

O aumento da temperatura de 40 para 45 °C afetou consideravelmente todos os isolados logo no tempo de exposição por 2 horas, ISH 90 ( $P < 0,0001$ ), ISH 258 ( $P < 0,0001$ ), ISH 257 ( $P < 0,0001$ ), ISH 261 ( $P < 0,0001$ ), ISH 262 ( $P < 0,0001$ ) (Figura 6A). Sob a temperatura de 45°C, a maior germinação alcançada foi de 69% pelo isolado ISH 261, não diferindo dos isolados ISH 90 ( $P = 0,87$ ), ISH 258 ( $P = 0.08$ ), ISH 262 ( $P > 0.96$ ), mas sim do isolado ISH 257 ( $P = 0.005$ ) (Figura 6A). A exposição ao calor por 4h a 45 °C impediu a germinação de todos os isolados, com exceção do isolado ISH 261 que obteve 26% de germinação relativa, que o fez diferir dos isolados ISH 90 ( $P < 0,0001$ ), ISH 258 ( $P < 0,0001$ ), ISH 257 ( $P < 0,0001$ ), ISH 262 ( $P < 0,0001$ ) (Figura 6B).



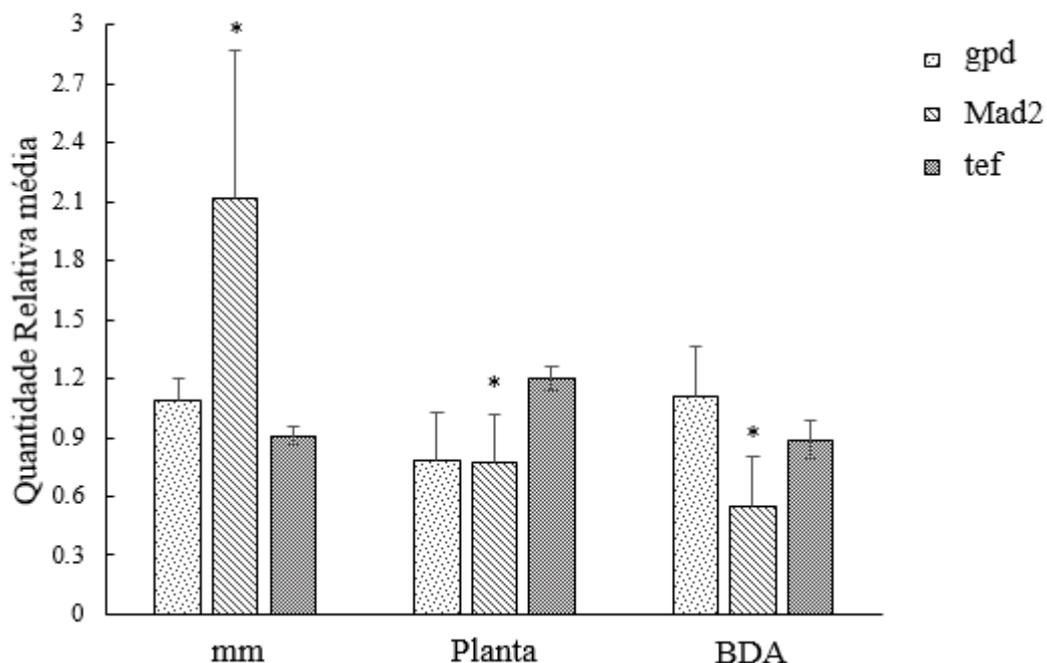
**Figura 6-** Média da porcentagem relativa da germinação de isolados de *Metarhizium* spp. após exposição ao calor úmido a temperaturas de 40 ° C (barras abertas) e 45 ° C (barras fechadas) por 2, 4, 8 e 12 h. A germinação relativa foi calculada em relação aos controles não expostos. Letras maiúsculas iguais indicam que não há diferença significativa na comparação entre isolados expostos à mesma temperatura. Letras minúsculas iguais indicam que não há diferença significativa na comparação das temperaturas para um mesmo isolado. Erro padrão a 95% ( $p = 0,05$ ).

Nos ensaios de atividade dos isolados no frio, nenhum dos isolados apresentou germinação quando expostos a 5°C por 15 dias. No entanto, após este período no frio, ao serem realocados à 25 ± 1 °C, 80 ± 1 % UR todos os isolados testados obtiveram mais que 97,8% de germinação após 24h, não diferindo estatisticamente dos conídios provindos das mesmas suspensões, porém incubadas à 25 ± 1 °C e 80 ± 1 % UR por 48h ( $F_{9,20} = 0,82$ ;  $P = 0,598$ ).

### 3.3 Expressão do gene *mad2*

Os genes *gpd* e *tef* apresentaram alta estabilidade (média geNorm  $M \leq 0,5$ ), os valores de geNorm  $M$  para *gpd* e *tef* foram de 0,364 com coeficientes de variação 0,123 e 0,129 respectivamente.

Quanto a análise da expressão do gene *mad2*, foi possível observar que esse gene estava 2,7 vezes mais expresso nos conídios provindos do meio mínimo, quando comparado aos extraídos da superfície da planta e 3,8 vezes mais expresso do que os cultivados em meio BDA (Figura 1).



**Figura 7** – Expressão relativa e desvio padrão do gene *mad2* de conídios do isolado ISH 90 crescidos em meio mínimo (mm), meio batata dextrose ágar (BDA) ou sobre *Vigna radiata* (planta). Os genes *gpd* e *tef* foram utilizados como genes de referência. As quantidades relativas foram baseadas em níveis de expressão calculado pelo geNorm qbase PLUS®. Asteriscos indicam  $p < 0,05$  na comparação da expressão do gene *mad2* entre as três condições testadas.

#### 4 DISCUSSÃO

Com o objetivo de selecionar isolados para o emprego em futuros programas de controle de pragas, o primeiro experimento descrito nesse capítulo buscou avaliar a capacidade de isolados em colonizar a planta *V. radiata*. E a partir disso, prospectar o uso dos mesmos em ambientes de cultivo vegetal, onde a associação com as plantas poderá contribuir para a persistência do fungo no solo, facilitando o controle de artrópodes que vivem neste ambiente ou até mesmo combater pragas herbívoras que também atacam as partes aéreas de vegetais.

Sendo assim, os oito isolados fúngicos de *Metarhizium* spp. investigados se mostram capazes de colonizar as diferentes partes da planta nas condições testadas, sugerindo que a interação desse gênero fúngico vá além da rizosfera, como bem descrita na espécie *M. robertsii* (BEHIE; JONES; BIDOCHKA, 2015; SASAN; BIDOCHKA, 2012). Porém também não é uma novidade que este entomopatógeno possa ser encontrado em outros tecidos vegetais, como demonstrado nos resultados aqui descritos e também em outros trabalhos (AKUTSE; MANIANIA; FIABOE; VAN DEN BERG *et al.*, 2013; BEHIE; MOREIRA; SEMENTCHOUKOVA; BARELLI *et al.*, 2017; GOLO; GARDNER; GRILLEY; TAKEMOTO *et al.*, 2014; GREENFIELD; GÓMEZ-JIMÉNEZ; ORTIZ; VEGA *et al.*, 2016; SASAN; BIDOCHKA, 2012)

Além disso pode-se observar que houve uma variabilidade entre os isolados quanto a região da planta colonizada. Este resultado permite que estes sejam selecionados de acordo com a predileção tecidual, com a ecologia da praga alvo (abaixo ou acima do solo) e com o método desejado para a aplicação no campo, visto que a inoculação destes agentes em plantas deve considerar o local em que o fungo precisa estar para de atingir a praga alvo (PARSA; ORTIZ; VEGA, 2013).

Porém, a variabilidade observada pode estar associada a outros fatores, que não a predileção por uma área específica da planta. A maioria dos fungos entomopatogênicos e endofíticos parecem colonizar plantas em um sistema não-padrão (RODRIGUEZ; WHITE JR; ARNOLD; REDMAN, 2009; SÁNCHEZ MÁRQUEZ; BILLS; HERRERO; ZABALGOGEAZCOA, 2012) provavelmente devido a um "antagonismo balanceado" no qual a planta hospedeira pode restringir o crescimento fúngico, e o fungo pode modular a eficácia dos mecanismos de defesa da planta (SCHULZ; BOYLE; DRAEGER; RÖMMERT *et al.*, 2002).

Muitos são os fatores que podem influenciar o resultado específico de um experimento para estabelecer um entomopatógeno fúngico como um endófito. Por exemplo a espécie da planta, as espécies do fungo, o isolado usado, a concentração do inóculo, a idade da planta durante as inoculações, as condições de crescimento das plantas e o método de inoculação (PARSA; ORTIZ; VEGA, 2013). Por outro lado, esses fatores também são fundamentais para determinar a persistência do fungo e a compatibilidade das associações com a planta (QUESADA-MORAGA; LÓPEZ-DÍAZ; LANDA, 2014).

Baseado nisso, para alcançar a colonização da leguminosa *V. radiata*, os protocolos de tratamentos utilizados no ensaio foram adaptados de metodologias bem estabelecidas para este tipo de teste, abrangendo o tratamento da semente, da planta propriamente dita e do solo. Isso permitiu que os resultados apresentados nesse capítulo abordassem de forma inédita a colonização endofítica de *Metarhizium* spp. em *V. radiata*, apesar de já ser conhecido a capacidade desse gênero fúngico em promover o crescimento dessa espécie vegetal (REKADWAD; KHOBRADE; JADHAV; KADAM, 2016). Além disso, os testes apresentados permitiram classificar os isolados individualmente quanto à capacidade endofítica, e dessa forma servirão de guia para futuras aplicações em programas de controle de pragas.

Para aprofundar ainda mais o conhecimento sobre os isolados ISH, o segundo ensaio desse capítulo buscou avaliar resistência térmica dos cinco isolados que apresentaram melhores resultados na colonização endofítica. Apesar da posição geográfica do país de origem dos mesmos (Canada), não permitir que as temperaturas ambientais cheguem a 40 °C, é importante avaliar o limite de resistência dos isolados quando se considera o uso comercial e a campo (FERNANDES; RANGEL; MORAES; BITTENCOURT *et al.*, 2007; RANGEL; BRAGA; ANDERSON; ROBERTS, 2005) visto que durante o processo de formulação, algumas tecnologias possuem etapas que exigem o emprego do calor e também porque o solo de áreas agricultáveis geralmente atingem temperaturas altas com incidência direta de sol.

Os isolados testados suportaram a exposição ao calor de 40 °C até 12h. Por outro lado, a temperatura de 45 °C foi mais deletéria, praticamente anulando a germinação nas primeiras 4h. Mesmo assim, os isolados ISH que são originários de um país com baixas temperaturas superaram a expectativa, obtendo comportamento melhor ou similar ao de isolados de regiões de baixa e média latitude como México, Brasil e Austrália, que apresentaram baixa germinação (menos de 20%) após 2h a 45 °C (RANGEL; BRAGA; ANDERSON; ROBERTS, 2005). Os resultados sugerem que apesar de isolados originários de países de alta latitude costumarem demonstrar maior suscetibilidade ao calor (RANGEL; BRAGA; ANDERSON; ROBERTS, 2005) esse comportamento não é uma regra.

A maior resistência ao calor observada por alguns isolados testados pode estar associada a um resultado interessante descrito por BIDOCHKA, M. J.; KAMP, A. M.; LAVENDER, T. M.; DEKONING, J. *et al.* (2001), os quais observaram que isolados canadenses de habitats agrícolas são mais tolerantes ao calor do que os de ambiente florestal. Essa informação justifica tolerância obtida pelos isolados testados, uma vez todos eles são provenientes de áreas agrícolas.

Sendo assim, os resultados obtidos também chamam a atenção quanto uma prévia seleção natural dos isolados. Observa-se que apesar do clima ambiental mais ameno, existem condições agrícolas que podem proporcionar um ambiente desafiador ao fungo provocando nesse uma adaptação. Exemplo disso é o solo de áreas agricultáveis, como os de origem da maioria dos isolados testados, pois superfície do solo pode receber incidência direta da luz solar, atingindo altas temperaturas. RANGEL; BRAGA; ANDERSON e ROBERTS (2005) observaram que as superfícies do solo submetidas à luz solar alcançaram 60 °C em campos de milho irrigado em Logan, UT USA.

Essa adequação ao meio, pôde ser observada quando o tempo de incubação das suspensões a 40 °C subiu de 4h para 8h e causando ao isolado ISH 257 um aumento na germinação. Esse mesmo fenômeno foi relatado por NICHOLSON; MUNAKATA; HORNECK; MELOSH *et al.* (2000) com *Bacillus* spp. e com *Metarhizium* spp. (FERNANDES; KEYSER; CHONG; RANGEL *et al.*, 2010) expostos a tensões físicas, como UV e temperatura. Nesses trabalhos, os autores justificaram este efeito baseado na resposta do mecanismo celular às condições de estresse. Intervalos de tempo de duas e quatro horas podem não ter sido suficientes para reparar os danos celulares antes da germinação, porém com um tempo maior (8h) os conídios do isolado ISH 257 se adaptaram e assim conseguiram alcançar um percentual de germinação mais alto que menores tempos de exposição.

Esse mesmo processo adaptativo não foi observado ao expor as suspensões fúngicas ao calor de 45 °C. Com o aumento do período de 2h para 4h houve drástica queda na germinação, essa condição possivelmente causou danos às células fúngicas e a maioria dos isolados perderam irreversivelmente a função celular. O calor quando acompanhado por alta umidade causa a desnaturação de proteínas e desorganização da membrana, sendo estes os principais problemas para a germinação de microrganismos (RANGEL; BRAGA; ANDERSON; ROBERTS, 2005).

Esse resultado observado está dentro dos padrões esperados, visto que para *M. anisopliae* a temperatura limite para o desenvolvimento vegetativo é de 37 a 40 °C, sendo 49 °C por uma hora o ponto de morte para conídios (OUEDRAOGO; FARGUES; GOETTEL; LOMER, 1997; RANGEL; BRAGA; ANDERSON; ROBERTS, 2005). O comportamento observado dos os isolados ISH está de acordo com os já relatado para outros isolados os quais mantem a germinação até 12h de exposição ao calor úmido de 40°C (RANGEL; BRAGA; ANDERSON; ROBERTS, 2005). Baseado nisso, o ensaio permitiu selecionar os que mantiveram germinação  $\geq 70\%$  como mais indicados para uma futura aplicação em ambientes, que foram o isolado ISH 262 e ISH 258.

Quanto ao impacto do frio nos isolados testados foi possível notar que à 5 °C estes não possuem atividade vegetativa, o que também é esperado para isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. que tendem a não apresentar germinação em baixas temperaturas, diferente por exemplo de outros isolados de *M. frigidum* e *Beauveria bassiana* (FERNANDES; KEYSER; CHONG; RANGEL *et al.*, 2010; FERNANDES; RANGEL; MORAES; BITTENCOURT *et al.*, 2008). Apesar das características geográficas parecerem ter pouca correlação com a tolerância térmica (RANGEL; BRAGA; ANDERSON; ROBERTS, 2005) este resultado também vai de acordo com os reportados por BIDOCHKA, MICHAEL J.; KAMP, ANDRENA M.; LAVENDER, T. MICHAEL; DEKONING, JASON *et al.* (2001) que observaram que isolados de *Metarhizium* spp. originários de regiões mais ao norte e frias do Canadá eram mais ativos no frio, diferente dos estudados aqui, que foram recuperados de uma região ao sul da Columbia Britânica. No entanto, o que chama a atenção foi a rápida germinação dos isolados após retornarem para temperaturas ótimas, tal observação é um bom indicador para isolados que são candidatos ao controle de praga, uma vez que o vigor em germinar após o estresse tem uma alta correlação com a virulência de isolados (KEYSER; FERNANDES; RANGEL; ROBERTS, 2014).

A temperatura, juntos outros fatores ambientais podem causar danos aos conídios e contribuem para falhas em programas de controle biológico de artrópodes. Portanto, a seleção de isolados tolerantes a variação térmica ajudará a melhorar a eficácia dos fungos quando expostos a situações adversas, e testes como o apresentado auxilia na a escolha do isolados de acordo com o propósito e área a ser empregada.

Por último, este capítulo também envolveu ensaios que abordam da expressão do gene *mad2*, que está relacionado a adesão do fungo em hospedeiros vegetais. O entendimento da expressão desse gene, tem o objetivo de fornecer subsídios e técnicas para a seleção de isolados mais competentes em colonizar plantas ou até mesmo para produzi-los em massa, de forma a induzir a maior expressão/transcrição de moléculas responsáveis pela colonização do vegetal.

O resultado desse ensaio mostrou como as diferentes fontes nutricionais podem influenciar e modular a expressão do gene *mad2*. Aqui foram utilizados três tipos diferentes de substratos, um pobre em nutrientes, como meio mínimo; um considerado suficientemente nutritivo, como o meio BDA e uma fonte natural, a planta, que está comumente relacionado ao ciclo de vida do fungo, podendo promover o desafio e estresse na busca por nutrientes.

A partir disso foi possível observar, que a expressão do gene *mad2* é menor quando o fungo é cultivado em meios mais nutritivos como o BDA, do que quando este cresce sobre o tecido vegetal. Sendo que, se o fungo for cultivado em meios poucos nutritivos, como o meio mínimo, a expressão do gene é significativamente maior do que nos outros substratos testados.

A modulação do gene *mad2* é regulada principalmente pelo estresse nutricional (BARELLI; MOONJELY; BEHIE; BIDOCHKA, 2016), sendo assim, sugere-se que nesse ensaio a planta pode ser considerada um fator de stress, porém não provocando a expressão do gene *mad2* a níveis superiores do que o provocado pelo meio mínimo, sendo assim o vegetal serviu de alguma forma como fonte nutricional para o desenvolvimento fúngico.

Esse resultado corrobora com outros estudos que buscam entender as vantagens da simbiose com a planta. A principal hipótese é que nas simbioses planta-fungo, os parceiros fúngicos transferem nutrientes limitantes do solo, como fósforo e nitrogênio (BEHIE; BIDOCHKA, 2014; GOVINDARAJULU; PFEFFER; JIN; ABUBAKER *et al.*, 2005) para a planta hospedeira em troca de derivados dos carboidratos do vegetal (BEHIE; MOREIRA; SEMENTCHOUKOVA; BARELLI *et al.*, 2017; BONFANTE; GENRE, 2010)

Além disso, os resultados aqui reportados podem contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo do fungo, uma vez que a estratégia de cultivar esses agentes em condições de estresse, faz com que eles se tornem mais virulentos e vigorosos (RANGEL; ALSTON; ROBERTS, 2008). Logo, baseado no resultado de que conídios crescidos sob estresse nutritivo possuem uma maior expressão do gene *mad2*, podemos inferir que isolados de *Metarhizium* spp. cultivados sob estresse nutritivo terão mais proteínas de adesão e consequentemente poderão ter mais sucesso na colonização da planta no campo.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKUTSE, K. S.; MANIANIA, N. K.; FIABOE, K. K. M.; VAN DEN BERG, J. *et al.* Endophytic colonization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) by fungal pathogens and their effects on the life-history parameters of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). **Fungal Ecology**, 6, n. 4, p. 293-301, 2013/08/01/ 2013.
- BARELLI, L.; MOONJELY, S.; BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. **Plant Molecular Biology**, 90, n. 6, p. 657-664, 2016/04/01 2016.
- BARELLI, L.; MOREIRA, C. C.; BIDOCHKA, M. J. Initial stages of endophytic colonization by *Metarhizium* involves rhizoplane colonization. 164, n. 12, p. 1531-1540, 2018.
- BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and environmental microbiology**, 80, n. 5, p. 1553-1560, 2014.
- BEHIE, S. W.; JONES, S. J.; BIDOCHKA, M. J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecology**, 13, p. 112-119, 2015/02/01/ 2015.
- BEHIE, S. W.; MOREIRA, C. C.; SEMENTCHOUKOVA, I.; BARELLI, L. *et al.* Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. **Nature communications**, 8, p. 14245-14245, 2017.
- BIDOCHKA, M. J.; KAMP, A. M.; LAVENDER, T. M.; DEKONING, J. *et al.* Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and environmental microbiology**, 67, n. 3, p. 1335-1342, 2001.
- BIDOCHKA, M. J.; KAMP, A. M.; LAVENDER, T. M.; DEKONING, J. *et al.* Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect-Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering Cryptic Species? 67, n. 3, p. 1335-1342, 2001.
- BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications**, 1, n. 1, p. 48, 2010/07/27 2010.
- BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J. *et al.* Variability in Response to UV-B among Species and Strains of *Metarhizium* Isolated from Sites at Latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, 78, n. 2, p. 98-108, 2001/08/01/ 2001.
- CABANILLAS, H. E.; JONES, W. A. Effects of Temperature and Culture Media on Vegetative Growth of an Entomopathogenic Fungus *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) Naturally Affecting the Whitefly, *Bemisia tabaci* in Texas. **Mycopathologia**, 167, n. 5, p. 263, 2009/01/06 2009.

FARIA, M. R. d.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, 43, n. 3, p. 237-256, 2007/12/01/ 2007.

FEOFILOVA, E. P.; TERESHINA, V. M.; MEMORSKAYA, A. S.; KHOKHLOVA, N. S. Different mechanisms of the biochemical adaptation of mycelial fungi to temperature stress: Changes in the lipid composition. **Microbiology**, 69, n. 5, p. 509-515, 2000/09/01 2000.

FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; CHONG, J. P.; RANGEL, D. E. N. *et al.* Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. 108, n. 1, p. 115-128, 2010.

FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, R. N. *et al.* CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, 54, n. 3, p. 197-205, 2010/09/01/ 2010.

FERNANDES, É. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, Á. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *et al.* Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, 96, n. 3, p. 237-243, 2007/11/01/ 2007.

FERNANDES, É. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, Á. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. *et al.* Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98, n. 1, p. 69-78, 2008/05/01/ 2008.

GARCÍA, J. E.; POSADAS, J. B.; PERTICARI, A.; LECUONA, E. R., 2011, ***Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin Promotes Growth and Has Endophytic Activity in Tomato Plants.**

GOLO, P. S.; GARDNER, D. R.; GRILLEY, M. M.; TAKEMOTO, J. Y. *et al.* Production of destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. **PloS one**, 9, n. 8, p. e104946-e104946, 2014.

GOVINDARAJULU, M.; PFEFFER, P. E.; JIN, H.; ABUBAKER, J. *et al.* Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Nature**, 435, n. 7043, p. 819-823, 2005/06/01 2005.

GREENFIELD, M.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, M. I.; ORTIZ, V.; VEGA, F. E. *et al.* *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. **Biological Control**, 95, p. 40-48, 2016/04/01/ 2016.

HUMBER, R. A. Chapter VI - Identification of entomopathogenic fungi. *In*: LACEY, L. A. (Ed.). **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2012. p. 151-187.

KEYSER, C. A.; FERNANDES, É. 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? **Journal of Invertebrate Pathology**, 120, p. 67-73, 2014/07/01/ 2014.

LAHEY, S.; ANGELONE, S.; DEBARTOLO, M. O.; COUTINHO-RODRIGUES, C. *et al.* Localization of the insect pathogenic fungal plant symbionts *Metarhizium robertsii* and *Metarhizium brunneum* in bean and corn roots. **Fungal Biology**, 124, n. 10, p. 877-883, 2020/10/01/ 2020.

LOVETT, B.; ST. LEGER, R. J. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. **Current Genetics**, 61, n. 3, p. 253-261, 2015/08/01 2015.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J. *et al.* Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

OGLE, M. H.; WHEELER, P.; DINNO, A. FSA: Fisheries Stock Analysis. . **R package version 0.8.32**, 2021.

OUEDRAOGO, A.; FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; LOMER, C. J. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Mycopathologia**, 137, n. 1, p. 37-43, 1997/01/01 1997.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F. E. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 74, p. 50360, 2013.

PATIL, S.; SARRAF, G.; KHARKWAL, A. C. Panorama of *Metarhizium*: Host Interaction and Its Uses in Biocontrol and Plant Growth Promotion. *In*: SHRIVASTAVA, N.; MAHAJAN, S., *et al* (Ed.). **Symbiotic Soil Microorganisms: Biology and Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 289-318.

PETRINI, O.; FISHER, P. J. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. **Transactions of the British Mycological Society**, 87, n. 4, p. 647-651, 1986/12/01/ 1986.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; CHEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D. *et al.* The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *In*: DEMEREC, M. (Ed.). **Advances in Genetics**: Academic Press, 1953. v. 5, p. 141-238.

QUESADA-MORAGA, E.; LÓPEZ-DÍAZ, C.; LANDA, B. B. The Hidden Habit of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*: First Demonstration of Vertical Plant Transmission. **PLOS ONE**, 9, n. 2, p. e89278, 2014.

RANGEL, D. E. N.; ALSTON, D. G.; ROBERTS, D. W. Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. **Mycological Research**, 112, n. 11, p. 1355-1361, 2008/11/01/ 2008.

RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. **Journal of Invertebrate Pathology**, 88, n. 2, p. 116-125, 2005/02/01/ 2005.

REKADWAD, B. N.; KHOBRADE, C. N.; JADHAV, V. G.; KADAM, S. U. Enhancing Growth of *Vigna radiata* in the Presence of *Pseudomonas aeruginosa* Biopolymer and *Metarhizium anisopliae* Spores. **Advances in Agriculture**, 2016, p. 4314958, 2016/12/12 2016.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.

SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S.; BILLS, G. F.; HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, Í. Non-systemic fungal endophytes of grasses. **Fungal Ecology**, 5, n. 3, p. 289-297, 2012/06/01/ 2012.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.-K. *et al.* Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, 3, n. 7, p. research0034.0031, 2002/06/18 2002.

## **CAPÍTULO II**

**ATIVIDADE DO EXSUDATO PRODUZIDO POR COLÔNIAS DE *Metarhizium anisopliae* s.l. SOBRE *Rhipicephalus microplus* E BACTÉRIAS AMBIENTAIS**

## RESUMO

O fungo *Metarhizium* spp. pode produzir gotículas de exsudato com metabólitos tóxicos para artrópodes e com atividade antimicrobiana. Neste capítulo foi avaliado o efeito do exsudato produzido por colônias do isolado CG148 de *M. anisopliae* s.l. sobre o carrapato *Rhipicephalus microplus*, e também sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* sensíveis e resistentes à meticilina e  $\beta$ -lactâmicos respectivamente, bem como em duas cepas gram-negativas e gram-positivas isoladas do solo (não identificadas). Primeiro, uma suspensão de solo não estéril contendo o isolado CG148 de *M. anisopliae* foi inoculado em meio seletivo e o exsudato produzido sobre as colônias do fungo foi coletado e esterilizado por filtração. Posteriormente, o exsudato foi inoculado em fêmeas do carrapato *R. microplus* para avaliar o efeito sobre a resposta celular, parâmetros biológicos e mortalidade do carrapato. Para testar o efeito antimicrobiano, foi utilizado o método de difusão em disco, no qual 5  $\mu$ L do exsudato fúngico foram aplicados sobre cepas das bactérias previamente inoculadas no meio de cultura. Foi possível observar que o exsudato fúngico causou mortalidade de 70% das fêmeas e afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) os parâmetros biológicos do carrapato. A quantidade de hemócitos circulantes na hemocele das fêmeas inoculadas com o exsudato foram sete vezes menores em comparação aos grupos controle. O exsudato do isolado fúngico também afetou o desenvolvimento das bactérias do solo e teve atividade antimicrobiana sobre as cepas sensíveis e resistentes de *S. aureus*, bem como sobre a cepa sensível de *E. coli*. Os resultados apontam de forma inédita que o exsudato produzido por *M. anisopliae* pode ser tóxico para o carrapato dos bovinos e pode afetar bactérias ambientais, sensíveis e resistentes a medicamentos, abrindo caminhos para bioprospecção.

**Palavras-chave:** carrapato, biopesticida, gutação de fungos, metabólito secundário.

## ABSTRACT

*Metarhizium* spp. can produce exudate droplets with metabolites toxic to arthropods and with antimicrobial activity. This chapter concerns the effect of the exudate produced by colonies of the *M. anisopliae* s.l. isolate CG148 on the tick *Rhipicephalus microplus*, on methicillin and  $\beta$ -lactams sensitive and resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* respectively, as well as on two unknown gram-negative and gram-positive strains isolated from soil. First, a suspension in non-sterile soil of the CG148 isolate of *M. anisopliae* was inoculated in the donide-free selective medium and the exudate produced on the fungal colonies was collected and sterilized by filtration. Thereafter, the exudate was inoculated into the tick to evaluate the effect on the immune response, biological parameters and mortality of the *R. microplus* tick females. To test the antimicrobial effect, the disk diffusion method was performed using 5  $\mu$ L of the fungal liquid on the bacteria strains. The fungal exudate caused 70% mortality of the tick and significantly affected ( $p < 0.05$ ) the biological parameters of the females. The circulating hemocytes of the hemocele of the females inoculated with the exudate were reduced seven times in comparison to the control groups. The exudate of the fungal isolate affected the development of soil bacteria and had antimicrobial activity on the sensitive and resistant strains of *S. aureus*, as well as on the sensitive strain of *E. coli*. These results pointing out in an unprecedented way that the exudate produced by *M. anisopliae* could be toxic for the cattle tick and affect drug-resistant and sensitive environmental bacteria, opening ways for new and deeper bioprospecting investigations.

Keywords: tick, biopesticide, fungus guttation, secondary metabolite.

## 1 INTRODUÇÃO

A formação de gotas sobre colônias de diversas espécies de fungos é comumente observado e trata-se de um processo chamado gutação (MCPHEE; COLOTELO, 1977). Pouco se sabe sobre esse fenômeno, mas acredita-se que esse processo esteja relacionado com situações de estresse, a fim de inibir outros microrganismos ou para reservar nutrientes e água em caso de escassez (GAREIS; GOTTSCHALK, 2014; HUTWIMMER; WANG; STRASSER; BURGSTALLER, 2010). Por essa razão o exsudato secretado por fungos pode estar repletos de metabólitos secundários e enzimas, e isso tem chamado a atenção de diversos pesquisadores a respeito da sua composição e efeitos biológicos (GAREIS; GOTTSCHALK, 2014).

Sabe-se por exemplo, que para colonizar o ambiente e o hospedeiro, fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* produzem diversos compostos bioativos que atuam tanto na sua manutenção vital, quanto na modulação fisiológica de hospedeiros (DONZELLI; KRASNOFF, 2016). Os compostos mais conhecidos são as enzimas extracelulares e moléculas de baixo peso molecular (toxinas) que possuem papel chave no sucesso de colonização do hospedeiro e do ambiente. Essas moléculas desempenham ações antibióticas, citotóxicas, digestivas, repelentes, imunomoduladoras, e neurofisiológicas (DONZELLI; KRASNOFF, 2016; RAVINDRAN; SATHISHKUMAR; RAJKUBERAN; SIVARAMAKRISHNAN, 2014; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; TIAN; LI; LI; SUN *et al.*, 2016).

Substâncias produzidas por microrganismos já deram origem a muitos produtos biotecnológicos que hoje são utilizados na indústria farmacêutica, na produção vegetal e na produção animal. Exemplo disso é uma das mais recentes classes de inseticidas introduzidas no mercado, as espinocinas, representado pelo spinosad, que é um metabólito obtido da fermentação de *Saccharopolyspora spinosa* (DAS, 2013), que assim como *Metarhizium* sp. é um microrganismo que habita o solo. Outro bom exemplo são as lactonas macrocíclicas, que deu origem a um dos mais bem sucedidos fármacos anti-helmínticos, as avermectinas, naturalmente produzidas por cepas de *Streptomyces* sp., organismo também saprófito (JACOBS; SCHOLTZ, 2015). Diante ao crescente cenário de resistência dos carrapatos as moléculas químicas hoje disponíveis, torna-se importante a investigação da biologia dos entomopatógenos, os estudo de seus metabólitos e a compreensão de seus efeitos em outros organismos, a fim de contribuir para o desenvolvimento do controle biológico e para abrir novas perspectivas para a produção de fármacos e biopesticidas (SAKUDA; KIMURA, 2010)

Baseado nisso, o objetivo dos ensaios descritos no presente capítulo foi investigar o efeito do exsudato produzido por colônias do isolado CG148 de *Metarhizium anisopliae* s.l em fêmeas do carrapato *R. microplus* e em cepas de bactérias ambientais. A mortalidade e a resposta celular (hemócitos totais) do carrapato foram avaliadas, assim como a inibição de cepas de bactérias isoladas do solo e de cepas sensíveis e resistentes *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cultivo fúngico e obtenção do exsudato

O isolado CG 148 de *Metarhizium anisopliae* s.l. utilizado do presente capítulo foi gentilmente cedido Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia - CENARGEM) ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes (LCM) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). O isolado fúngico foi primeiramente cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidos para crescimento durante 14 dias sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1$  °C) e umidade relativa (UR  $\geq 80$  %).

Em meios de culturas comuns como BDA ou até mesmo em meios seletivos como o BDA acrescido de Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida (CTC) (FERNANDES; KEYSER; RANGEL; FOSTER *et al.*, 2010) as colônias do isolado CG148 não produzem exsudação. Então para estimular esse processo foi necessário expor o isolado fúngico por um ambiente não estéril a fim de desafiá-lo (fenômeno que observado em outros estudos, não descritos) e então obter as gotículas de exsudato. Para isso, após o cultivo em BDA, os conídios foram raspados do meio de cultura e suspensos em uma solução estéril de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween<sup>®</sup> 80) a 0,1% (v/v) obtendo-se uma suspensão na concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL. Uma alíquota de 3 mL da suspensão foi espalhada sobre a superfície de placas de Petri (50 × 10 mm) contendo 10 g de solo não estéril (triplicata), e então as placas foram incubadas por 7 dias sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 1$  °C) e umidade relativa (UR  $\geq 80$  %).

Após o período de incubação, o solo de cada placa foi diluído em 15 mL de Tween 80<sup>®</sup> a 0,01 % (v/v) sob agitação em vórtex por 2 minutos. Em seguida 50µL da mistura foram inoculados em placas de Petri (triplicata) contendo meio seletivo CTC e distribuídos de forma homogênea com auxílio da alça de Drigalski. Todas as placas foram incubadas em câmaras climatizadas a  $25$  °C  $\pm 1$  °C e UR > 80 % durante 14 dias.

Após o crescimento fúngico, foram seleciona olho nu, as placas que continha apenas colônias características de *Metarhizium* sp. (sem sinal de contaminação por qualquer outro microrganismo) e posteriormente para confirmação foi feita a identificação macro e micro morfológico segundo HUMBER (2012) para a confirmação do gênero fúngico. As gotículas de exsudato formadas sobre as colônias foram coletadas com auxílio de uma seringa agulhada e estéril, e o material obtido foi imediatamente esterilizado através filtros com membrana porosa de 0,22µm (k18-230, Kasvi<sup>®</sup>) a fim de excluir qualquer tipo de contaminação por outros microrganismos ou eliminar possíveis conídios capturados. Todo o volume de exsudato fúngico obtido foi alíquotado em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20 °C para os posteriores ensaios. Para confirmar a esterilidade do material e do processo, 5µL do exsudato filtrado foi inoculado em meio BDA e incubado a  $25$  °C  $\pm 1$  °C e UR > 80 % por 14 dias.

## **2.2. Efeito sobre fêmeas de *Rhipicephalus microplus***

### **2.2.1 Obtenção das fêmeas de *Rhipicephalus microplus***

Bezerros foram submetidos a infestações artificiais com larvas provenientes de 150 mg de ovos de *R. microplus*, por três dias consecutivos (CEUA – do Instituto de Veterinária da UFRRJ, protocolo 9714220419). Vinte e um dia após a infestação, fêmeas ingurgitadas foram coletadas do piso das baias e levadas ao laboratório. No LCM, estas foram devidamente higienizadas em água corrente e imersas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% para assepsia da cutícula e secas em papel toalha.

### **2.2.2 Avaliação dos parâmetros biológicos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus***

Para o ensaio biológico, após a assepsia da cutícula as fêmeas foram pesadas individualmente e divididas em quatro grupos contendo 10 carrapatos com a mesmas faixas de peso, segundo a fórmula de Yule (SAMPAIO, 2002). Foram formados os seguintes grupos: fêmeas inoculadas com 3 µL do exsudato fungico (grupo IN), grupo sem inoculação (SIN), um grupo inoculado apenas com 3 µL água destilada estéril (INA) e um grupo perfurado com a agulha sem inoculação (PSIN). Os grupos SIN, INA e PSIN foram elaborados para excluir qualquer efeito do processo de inoculação, que não fosse o do exsudato.

As inoculações foram feitas na quarta perna do carrapato, na articulação entre a coxa e o corpo da fêmea utilizando microscópio estereoscópio e uma seringa de insulina ultrafina de 1 mL acoplada a uma agulha de 0,3 mm. (FIOROTTI; GÔLO; MARCIANO; CAMARGO *et al.*, 2019). A região definida para inoculação teve o objetivo de não comprometer os órgãos relacionados com a reprodução, fato que poderia comprometer os parâmetros avaliados.

Após a inoculação as fêmeas foram fixadas em placa de Petri, com auxílio de fita adesiva dupla face, e acondicionadas sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  durante todo o período de avaliação dos parâmetros biológicos. Todo o teste foi repetido três vezes de forma independente.

A mortalidade das fêmeas foi acompanhada diariamente até a morte de todas as fêmeas do grupo controle e foram avaliados o peso inicial das fêmeas, peso da massa de ovos, percentual de eclosão das larvas e peso residual das fêmeas. A partir disso foram feitos os seguintes cálculos:

#### **Índice de produção de ovos (BENNETT, 1974)**

$$\text{IPO} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial da fêmea ingurgitada (g)}} \times 100$$

#### **Índice nutricional (BENNETT, 1974)**

$$\text{IN} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial da fêmea ingurgitada (g) - peso residual da fêmea (g)}} \times 100$$

#### **Eficiência Reprodutiva (DRUMMOND; GLADNEY; WHETSTONE; ERNST, 1971)**

$$\text{ER} = \frac{\text{peso da massa de ovos (g)}}{\text{peso inicial da fêmea ingurgitada (g)}} \times \% \text{ eclosão}$$

### **2.2.3 Avaliação do efeito do exsudato sobre os hemócitos de fêmeas *Rhipicephalus microplus***

Para a avaliação do efeito do exsudato sobre os hemócitos totais do carrapato, foi realizado a quantificação dessas células em fêmeas inoculadas e não inoculadas com o exsudato fúngico. Neste ensaio, seguindo o mesmo delineamento proposto para a avaliação dos parâmetros biológicos, foram formados quatro grupos supracitados (IN, SIN, INA e PSIN) cada um contendo 20 fêmeas do carrapato com peso previamente homogeneizado ( $p < 0.05$ ). A obtenção das fêmeas de *R. microplus* foi realizada como descrito no item 2.2.1.

O volume de  $3\mu\text{L}$  de exsudato ou água destilada estéril utilizado na inoculação foi mantido, porém nesse ensaio a inoculação foi realizada pelo forame situado entre o capítulo e o escudo dorsal do artrópode devido a maior praticidade do método (FIOROTTI; GÔLO; MARCIANO; CAMARGO *et al.*, 2019). Realizadas as inoculações, as fêmeas foram mantidas em placas de Petri e acondicionadas sob temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  durante 24h.

Dado o tempo de incubação, foi então realizada a coleta de hemolinfa através da superfície dorsal da cutícula das fêmeas (ANGELO *et al.*, 2010). As amostras foram alocadas em microtubos contendo  $30\mu\text{L}$  de coquetel de inibidores de protease (Inhibit® Sigma-Aldrich) e  $82\mu\text{L}$  de tampão salino (NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM) e mantidas no gelo durante toda a coleta.

Imediatamente após as coletas, as amostras foram centrifugadas a  $500 \times g$  durante três minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e os hemócitos foram separados do plasma e ressuspensos em PBS (tampão fosfato 0,1M, NaCl 1.5 M, pH 7.4) (DE PAULO; CAMARGO; COUTINHO-RODRIGUES; MARCIANO *et al.*, 2018). A quantificação dos hemócitos foi feita após sua ressuspensão em  $50\ \mu\text{L}$  de meio Leibovitz L-15 com pH 7,0 e com auxílio de Câmara de Neubauer (FIOROTTI; GÓLO; MARCIANO; CAMARGO *et al.*, 2019). O teste foi repetido por três vezes.

### 2.3. Efeito inibitório sobre bactérias ambientais

Esse ensaio foi realizado em conjunto com o Laboratório de Bacteriologia Veterinária - UFRRJ. Onde foram feitos os testes de difusão em disco, para detectar a ação do exsudato fúngico sobre cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis a beta-lactâmicos e meticilina respectivamente, e também sobre outras duas cepas isoladas do solo da Estação Experimental para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz – UFRRJ (tabela 1).

Foi realizado o teste de difusão em disco (antibiograma) utilizando ágar Mueller-Hinton, conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com um swab estéril, os inóculos bacterianos foram espalhados uniformemente sobre a superfície do meio de cultura em placas de Petri ( $90 \times 15\text{ mm}$ ), que foram deixadas em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente 3 minutos.

Utilizando-se pinça esterilizada, três discos de papel filtro com 6 mm de diâmetro previamente impregnados com  $5\ \mu\text{L}$  do exsudato fúngico foram colocados sobre a superfície do ágar contendo as cepas bacterianas e as placas foram incubadas em estufa a  $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Posteriormente halo de inibição do crescimento foi medido utilizando régua milimétrica, descartando-se o diâmetro de leitura do disco. Os testes foram realizados em triplicata e repetido duas vezes.

**Tabela 1.** Cepas de bactérias utilizadas no ensaio para avaliação do efeito antimicrobiano do exsudato produzido pelo isolado CG146 de *Metarhizium anisopliae* s.l.. Cepas padrões para testes de sensibilidade oriundas do American Type Culture Collection (ATCC), do Culture Collection University of Gothenburg (CCUG) e cepas isoladas do solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Cepa	Espécie / Identificação
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> (Sensível)
ATCC 43300	<i>Staphylococcus aureus</i> (Resistente)
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> (Sensível)
CCUG 58543	<i>Escherichia coli</i> (Resistente)
CEPA I – Solo	Gram-positiva
CEPA II – Solo	Gram-negativa

### 2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software R versão 4.0.2. Os dados obtidos na avaliação do efeito do exsudato sobre os parâmetros biológicos e sobre os hemócitos das fêmeas do carrapato não seguiram os pressupostos de homoscedasticidade e foram submetidos ao teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis seguido por Dunn utilizando o

pacote FSA (OGLE; WHEELER; DINNO, 2020). Os dados obtidos na avaliação do efeito antimicrobiano, seguiram os padrões de normalidade e por isso foram analisados utilizando a ANOVA seguido do teste de Tukey-HSD. Em todas as análises foi considerado nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Exsudato fúngico

A esterilidade do exsudato fúngico, obtido das colônias do isolado CG148, foi confirmada a partir do cultivo do líquido em meio BDA. Após 14 dias de incubação das placas não foi possível observar o crescimento de nenhuma colônia de microrganismos.

#### 3.2 Efeito do exsudato fúngico sobre os parâmetros biológicos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*

As fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, nos diferentes tratamentos diferiram entre si na produção de ovos ( $\chi^2_3 = 19,68$ ,  $P < 0.0001$ ), assim como no índice nutricional ( $\chi^2_3 = 21,41$ ,  $P < 0.0001$ ) e na eficiência reprodutiva ( $\chi^2_3 = 19,38$ ,  $P = 0.0002$ ). Em todos os parâmetros biológicos avaliados, apenas o grupo de fêmeas que recebeu a inoculação do exsudato fúngico (grupo IN) foi afetado e os demais grupos (SIN, INA e PSIN) não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 2).

A produção de ovos das fêmeas do carrapato do grupo IN foi menor que a dos grupos SIN ( $P = 0.0006$ ), INA ( $P = 0.0026$ ), PSIN ( $P = 0.0020$ ). A inoculação do exsudato também afetou o índice nutricional do grupo IN que diferiu dos grupos SIN ( $P = 0.0001$ ), INA ( $P = 0.0008$ ), PSIN ( $P = 0.0009$ ). Consequentemente, a eficiência reprodutiva das fêmeas do grupo IN também foi afetada e diferiu significativamente dos grupos SIN ( $P = 0.0007$ ), INA ( $P = 0.0018$ ), PSIN ( $P = 0.0034$ ).

Após 24h da inoculação foi possível notar que todas as fêmeas que receberam o tratamento com o exsudato fúngico ficaram tumefeitas e em um estado de paralisia, que perdurou até o quinto dia após a inoculação. A partir de então algumas fêmeas passaram a apresentar movimento e iniciar a postura de ovos, porém não resistindo por muito tempo, atingindo 70% de mortalidade já no sétimo dia. Isso impactou consideravelmente os IPO, IN, e a ER (Tabela 2).

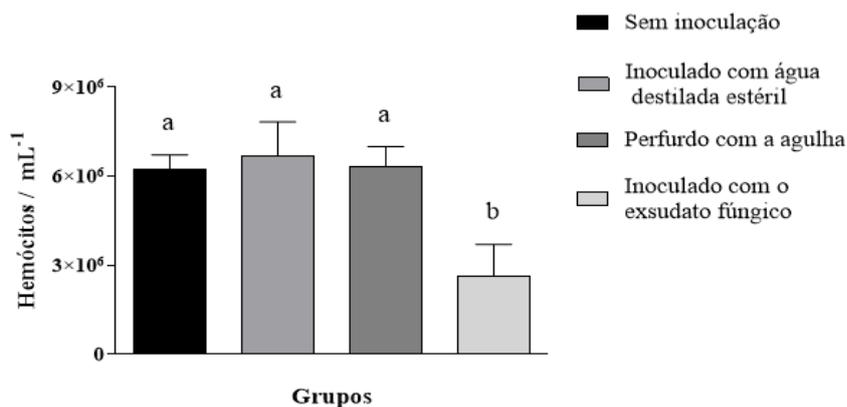
**Tabela 2.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão dos parâmetros reprodutivos e porcentagem de mortalidade de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* inoculadas com exsudato de *Metarhizium anisopliae* s.l. (IN) e três grupos controle: sem inoculação (SIN), grupo inoculado apenas com água destilada estéril (INA) e grupo perfurado com a agulha sem inoculação (PSIN).

Grupos	Índice de Produção de Ovos	Índice Nutricional	Eficiência Reprodutiva	Mortalidade (%)
IN	11,95 $\pm$ 17.56 <sup>a</sup>	20,14 $\pm$ 26.55 <sup>a</sup>	7,16 $\pm$ 13.36 <sup>a</sup>	70
SIN	61,08 $\pm$ 11.82 <sup>b</sup>	78,66 $\pm$ 15.29 <sup>b</sup>	58,19 $\pm$ 20.73 <sup>b</sup>	0
INA	61,61 $\pm$ 5.75 <sup>b</sup>	75,77 $\pm$ 6.61 <sup>b</sup>	61,61 $\pm$ 5.72 <sup>b</sup>	0
PSIN	58,35 $\pm$ 27.52 <sup>b</sup>	72,91 $\pm$ 34.17 <sup>b</sup>	57,92 $\pm$ 27.47 <sup>b</sup>	0

O IPO e o IN foram calculados considerando todas as fêmeas do grupo (as fêmeas que não fizeram postura tiveram zero em peso de ovos no cálculo do IPO). Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

### 3.3 Efeito do exsudato fúngico sobre os hemócitos de fêmeas de *Rhipicephalus microplus*

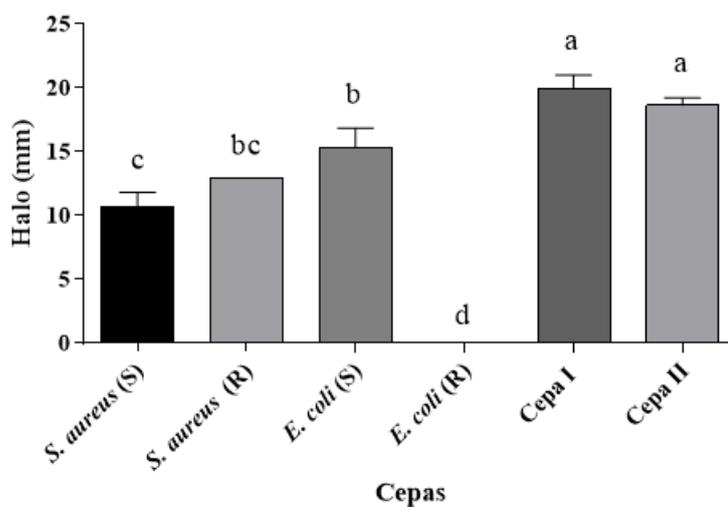
Foi possível observar significativa redução no número de hemócitos presentes na hemolinfa das fêmeas que receberam a inoculação do exsudato (Figura 1). Não ocorreu diferença no número de hemócitos no tratamento com a inoculação de água destilada estéril e nem com a perfuração com a agulha, e a quantidade de hemócitos nas fêmeas de *R. microplus* não diferiu entre os grupos controles (SIN, INA, PSIN) (Figura 1).



**Figura 1** - Concentração de hemócitos de *Rhipicephalus microplus* obtida 24 horas após a inoculação de fêmeas do carrapato com o exsudato produzido por *Metarhizium anisopliae* s.l.. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \geq 0,05$ ). Kruskal-Wallis seguido por Dunn.

### 3.4 Efeito antimicrobiano do exsudato fúngico sobre bactérias ambientais

O exsudato produzido pelas colônias do isolado CG148 de *M. anisopliae* s.l. também apresentou atividade antimicrobiana e o tamanho do halo de inibição variou significativamente entre as diferentes cepas testadas ( $F_{5-12} = 187,9$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 2).



**Figura 2** - Comparação do tamanho médio de halos de inibição, formados após a aplicação do exsudato do isolado CG 148 de *Metarhizium anisopliae* s.l. no teste de difusão em disco, sobre cepas de bactérias sensíveis (S) ou resistentes (R) a antibióticos e sobre duas cepas de bactérias isolados do solo. Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente ( $P \geq 0,05$ ).

As cepas de *S. aureus* sensível e resistente à metilina não diferiram entre si quanto a ao tamanho do halo sobre suas colônias, no entanto a zona de inibição formada permitiu identificar uma ação antimicrobiana considerável nestas cepas quando comparada à de *E. coli* resistente à beta-lactâmicos, que não foi inibida e por isso estatisticamente menos afetada do que a cepa sensível ( $P = < 0,0001$ ) e resistente ( $P = < 0,0001$ ) de *S. aureus*. O exsudato apresentou efeito antimicrobiano sobre a cepa de *E. coli* sensível, que teve um halo maior que a cepa resistente ( $P = < 0,0001$ ), e também maior do que a cepa de *S. aureus* sensível ( $P = < 0,0004$ ).

Os maiores halos de inibição formados foram observados sobre as cepas de bactérias isoladas do solo, as quais não diferiram em si. A Cepa I diferiu estatisticamente das cepas de *S. aureus* sensível ( $P = < 0,0001$ ) e resistente ( $P = < 0,0001$ ), e também das cepas de *E. coli* sensível ( $P = < 0,0004$ ), e resistente ( $P = < 0,0001$ ). Da mesma forma, as áreas de inibição formada sobre as colônias da Cepa II foram maiores que as formadas sobre as cepas de *S. aureus* sensível ( $P = < 0,0001$ ) e resistente ( $P = < 0,0001$ ), e de *E. coli* sensível ( $P = < 0,0076$ ), e resistente ( $P = < 0,0001$ ).

#### 4 DISCUSSÃO

Os ensaios realizados nesse capítulo abordam a utilização do fungo *Metarhizium* spp. em uma perspectiva diferente da mais habitual e de forma geral os resultados aqui apresentados abordam de forma inédita a atividade tóxica do exsudato de *M. anisopliae* s.l. ao carrapato *R. microplus*. Os resultados chamam a atenção que o exsudato é uma fonte promissora de biomoléculas.

Apesar desse secretado fúngico ser comumente observado sobre colônias de fungos ascomicetos, até mesmo ser utilizado na caracterização de algumas espécies (GAREIS; GAREIS, 2007; MCPHEE; COLOTELO, 1977) o isolado CG148 de *M. anisopliae* s.l não possui essa característica quando cultivado em nos meios comumente utilizados, como o BDA ou até mesmo em meios seletivos como o CTC, como utilizado na metodologia aqui descrita. No entanto, quando o fungo foi exposto ao solo não estéril o mesmo passou a realizar o processo de exsudação, possivelmente em resposta a um ambiente menos favorável, no qual o citoplasma busca excretar de forma seletiva resíduos nocivos ao fungo (SINGH, 2014).

Existe pouca informação sobre a formação, composição e funções dessas gotículas de exsudação (PEREIRA; OLIVEIRA; BAPTISTA, 2012). A formação do exsudato por colônias de *Metarhizium* spp. parece estar associada às condições nutricionais, no qual a presença de alguns derivados de carbono tem influência direta no processo de exsudação, no entanto também pode estar associado à adaptação do fungo ao ambiente. (HUTWIMMER; WANG; STRASSER; BURGSTALLER, 2010). Para alguns autores a composição do exsudato é por fatores ambientais (por exemplo, temperatura, pH), sendo frequentemente rica em metabólitos primários e secundários, substâncias inorgânicas, proteínas e enzimas (GAREIS; GAREIS, 2007; RANGEL-CASTRO; DANELL; PFEFFER, 2002).

Sabe-se que o gênero *Metarhizium* é capaz de produzir inúmeros extrólitos, dentre eles swainsoninas, serinoclinas, citocalasinas e a mais estudada destruxina (DONZELLI; KRASNOFF, 2016; KRASNOFF; KERESZTES; GILLILAN; SZEBENYI *et al.*, 2007). Estas substâncias possuem funções imunossupressoras ou tóxicas que ajudam os fungos a invadir seus hospedeiros, superando seus sistemas de defesa (ROHLFS; CHURCHILL, 2011).

Ao inocular o exsudato nas fêmeas do carrapato, foi possível observar o efeito tóxico e inibidor celular de fêmeas de *R. microplus*. Os carrapatos inoculados com o líquido fúngico

tiveram suas células significativamente reduzidas, seus parâmetros reprodutivos alterados e uma alta mortalidade foi observada, refletindo a toxicidade causada ao artrópode.

Algumas destruxinas tem sido apontadas como protagonista na supressão das células do sistema imune de insetos por causarem apoptose (GILLESPIE; BAILEY; COBB; VILCINSKAS, 2000). Além disso, há evidências de que esta substância também leva a paralisia momentânea de artrópodes, como visto nos resultados apresentados aqui, em que as fêmeas ficaram em estado tetânico por cinco dias e depois voltaram a apresentar movimento e iniciaram a oviposição.

A paralisia pode ter sido acarretada pela ação da destruxina, que age no influxo de cálcio das células do artrópode e inibe a ação de ATP-ases, o que leva ao estado de paralisia (BANDANI; AMIRI; BUTT; GORDON-WEEKS, 2001; DUMAS; ROBERT; PAIS; VEY *et al.*, 1994). Possivelmente, a partir de um sistema de detoxificação as fêmeas do carrapato conseguiram reverter a ação tóxica e então retornaram ao estado de normalidade.

Este tipo de resposta já foi reportado em lagartas de *Galleria mellonella*. Quando inoculadas com destruxina A, o inseto conseguiu reverter substancialmente a paralisia em poucas horas, não sendo possível detectar a substância nos tecidos das larvas após a inoculação (AMIRI-BESHELI; KHAMBAY; CAMERON; DEADMAN *et al.*, 2000; JEGOROV; MĀTHA; HRADEC, 1992).

A ação inibitória da produção de ovos em outra artrópode causado por exsudato fúngico foi reportado por ROSAS-ACEVEDO; BOUCIAS; LEZAMA; SIMS *et al.* (2003). Os autores relataram que o exsudato produzido pelo fungo entomopatogênico *Hirsutella thompsonii* inibiu transitoriamente a oviposição do ácaro rajado *Tetranychus urticae*, porém não afetou outros comportamentos do artrópode, sugerindo uma ação seletiva sobre os órgãos reprodutivos do artrópode.

Embora as fêmeas de *R. microplus* tenham aparentemente revertido a toxicidade, retornando à mobilidade e a realizarem postura, isso não foi o suficiente para evitar os danos causados na eficiência reprodutiva. Provavelmente pela ação combinada das várias outras substâncias nocivas contidas no exsudato. Dentre essas, também podemos destacar o efeito enzimático de proteases como a Pr1, comumente relacionadas a infecção fúngica no hospedeiro e encontradas no exsudato produzido por *M. anisopliae* var. *anisopliae* (HUTWIMMER; WANG; STRASSER; BURGSTALLER, 2010).

Outra ação possível do exsudato no carrapato é o efeito antimicrobiano, visto que bactérias são microrganismos onipresentes e algumas evoluíram junto com os carrapatos de forma simbiótica (MAINA; GALADIMA; GAMBO; ZAKARIA, 2018). O gênero *Coxiella* por exemplo é um endosimbionte essencial para *R. microplus*, encontrado abundantemente nos ovários e túbulos de malpigh, sendo transmitida verticalmente (GUIZZO; PARIZI; NUNES; SCHAMA *et al.*, 2017).

Bactérias de importância médica e ambiental já mostraram sensibilidade a compostos produzidos por fungos entomopatogênicos (LEE; NAKAJIMA; IHARA; KINOSHITA *et al.*, 2005; RAVINDRAN; SATHISHKUMAR; RAJKUBERAN; SIVARAMAKRISHNAN, 2014; SONYOT; LAMLERTTHON; LUANGSA-ARD; MONGKOLSAMRIT *et al.*, 2020; TIAN; LI; LI; SUN *et al.*, 2016). Entre os metabólitos conhecidos, o flavanoide glicosídeos de isocumarina obtido de culturas de *M. anisopliae* demonstrou atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, que tem como habitat o solo e frequentemente está associada a infecções hospitalares e resistência a antibióticos (TIAN; LI; LI; SUN *et al.*, 2016). Em outro estudo, metabólitos secundários separados por HPLC (high performance liquid chromatography) de um isolado de *M. anisopliae* apresentaram efeito sobre isolados de bactérias patogênicas para humanos como *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *S. aureus*, *E.coli*, *Shigella* spp. e *Enterococci* spp. (RAVINDRAN; SATHISHKUMAR; RAJKUBERAN; SIVARAMAKRISHNAN, 2014).

Já no presente capítulo, a maior atividade antimicrobiana foi observada nas cepas isoladas do mesmo solo em que o fungo foi exposto. Isso sugere que por se tratar de um organismo saprófito, faz parte da adaptação do *Metarhizium* spp. desenvolver atividades antimicrobianas a antagonistas frequentes em seu habitat. Uma vez que, o fluido liberado por suas hifas deve influenciar a composição da comunidade bacteriana no solo circundante (HUTWIMMER; WANG; STRASSER; BURGSTALLER, 2010).

Essa observação é importante, pois deve-se salientar que o exsudato só foi produzido pelo isolado CG148 quando esse foi cultivado em meio ao solo não estéril. Essa condição possivelmente estimulou a produção do exsudato e ainda fez com que sua composição tivesse atividade antimicrobiana. Não apenas o solo, mas a presença de materiais derivados de artrópodes hospedeiros parece estimular a atividade antimicrobiana de fungos entomopatogênicos. Isolados de *M. anisopliae* produziram atividade antimicrobiana contra *Bacillus* sp. e *Saccharomyces* sp. apenas na presença em meio de cultura acrescido de bicho da seda em pó (LEE; NAKAJIMA; IHARA; KINOSHITA *et al.*, 2005).

Essas e outras abordagens demonstram o quanto o gênero *Metarhizium* pode ser explorado e que apesar de ser comumente utilizado na sua forma clássica como entomopatógeno, esse fungo pode oferecer diversas possibilidades de bioprospecção. De modo particular o capítulo demonstrou que o exsudato do isolado CG 148 de *M. anisopliae* s.l. possui efeito antimicrobiano sobre bactérias ambientais resistentes e sensíveis a antibióticos além disso que possui características acaricidas. Baseado nestes achados, novas hipóteses poderão ser investigadas para fazer desse líquido fúngico uma fonte útil de metabólitos para a indústria farmacêutica.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRI-BESHELI, B.; KHAMBAY, B.; CAMERON, S.; DEADMAN, M. L. *et al.* Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. **Mycological Research**, 104, n. 4, p. 447-452, 2000/04/01/ 2000.

BANDANI, A. R.; AMIRI, B.; BUTT, T. M.; GORDON-WEEKS, R. Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1510, n. 1, p. 367-377, 2001/02/09/ 2001.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida : Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, 16, n. 1, p. 52-61, 1974.

DAS, S. K. Mode of action of pesticides and the novel trends – A critical review. **International Research Journal Of Agricultural Science And Soil Science**, 3, n. 11, p. 393-401, 2013.

DE PAULO, J. F.; CAMARGO, M. G.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; MARCIANO, A. F. *et al.* *Rhipicephalus microplus* infected by *Metarhizium*: unveiling hemocyte quantification, GFP-fungi virulence, and ovary infection. **Parasitology Research**, 117, n. 6, p. 1847-1856, 2018/06/01 2018.

DONZELLI, B. G. G.; KRASNOFF, S. B. Chapter Ten - Molecular Genetics of Secondary Chemistry in *Metarhizium* Fungi. *In*: LOVETT, B. e ST. LEGER, R. J. (Ed.). **Advances in Genetics**: Academic Press, 2016. v. 94, p. 365-436.

DRUMMOND, R. O.; GLADNEY, W. J.; WHETSTONE, T. M.; ERNST, S. E. Laboratory Testing of Insecticides for Control of the Winter Tick<sup>13</sup>. **Journal of Economic Entomology**, 64, n. 3, p. 686-688, 1971.

DUMAS, C.; ROBERT, P.; PAIS, M.; VEY, A. *et al.* Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, 108, n. 2, p. 195-203, 1994/07/01/ 1994.

FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, R. N. *et al.* CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, 54, n. 3, p. 197-205, 2010/09/01/ 2010.

FIOROTTI, J.; GÔLO, P. S.; MARCIANO, A. F.; CAMARGO, M. G. *et al.* Disclosing Hemolymph Collection and Inoculation of *Metarhizium* Blastospores into *Rhipicephalus Microplus* Ticks Towards Invertebrate Pathology Studies. **JoVE**, n. 148, p. e59899, 2019/06/01/ 2019.

GAREIS, M.; GAREIS, E.-M. Guttation droplets of *Penicillium nordicum* and *Penicillium verrucosum* contain high concentrations of the mycotoxins ochratoxin A and B. **Mycopathologia**, 163, n. 4, p. 207-214, 2007/04/01 2007.

GAREIS, M.; GOTTSCHALK, C. *Stachybotrys* spp. and the guttation phenomenon. **Mycotoxin Research**, 30, n. 3, p. 151-159, 2014/08/01 2014.

GILLESPIE, J. P.; BAILEY, A. M.; COBB, B.; VILCINSKAS, A. Fungi as elicitors of insect immune responses. 44, n. 2, p. 49-68, 2000.

GUIZZO, M. G.; PARIZI, L. F.; NUNES, R. D.; SCHAMA, R. *et al.* A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 17554, 2017/12/14 2017.

HUMBER, R. A. Chapter VI - Identification of entomopathogenic fungi. *In*: LACEY, L. A. (Ed.). **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2012. p. 151-187.

HUTWIMMER, S.; WANG, H.; STRASSER, H.; BURGSTALLER, W. Formation of exudate droplets by *Metarhizium anisopliae* and the presence of destruxins. **Mycologia**, 102, n. 1, p. 1-10, 2010/01/01 2010.

JACOBS, C. T.; SCHOLTZ, C. H. A review on the effect of macrocyclic lactones on dung-dwelling insects: Toxicity of macrocyclic lactones to dung beetles. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, 82, n. 1, p. 858-858, 2015.

JEGOROV, A.; MATĀHA, V.; HRADEC, H. Detoxification of destruxins in *Galleria mellonella* L. larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, 103, n. 1, p. 227-229, 1992/09/01/ 1992.

KRASNOFF, S. B.; KERESZTES, I.; GILLILAN, R. E.; SZEBENYI, D. M. E. *et al.* Serinocyclins A and B, Cyclic Heptapeptides from *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Natural Products**, 70, n. 12, p. 1919-1924, 2007/12/01 2007.

LEE, S.-Y.; NAKAJIMA, I.; IHARA, F.; KINOSHITA, H. *et al.* Cultivation of Entomopathogenic Fungi for the Search of Antibacterial Compounds. **Mycopathologia**, 160, n. 4, p. 321-325, 2005/11/01 2005.

MAINA, U. M.; GALADIMA, I. B.; GAMBO, F. M.; ZAKARIA, D. J. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 6, n. 1, p. 27-32, 2018.

MCPHEE, W. J.; COLOTELO, N. Fungal exudates. I. Characteristics of hyphal exudates in *Fusarium culmorum*. **Canadian Journal of Botany**, 55, n. 3, p. 358-365, 1977/02/01 1977.

OGLE, D. H.; WHEELER, P.; DINNO, A. FSA: Fisheries Stock Analysis. **R package version 0.8.31**, 2020.

PEREIRA, E.; OLIVEIRA, I.; BAPTISTA, P. Guttation droplets of the edible mushroom *Suillus bovinus* as a new source of natural antioxidants. **Scientia Horticulturae**, 148, p. 89-92, 2012/12/04/ 2012.

RANGEL-CASTRO, J. I.; DANELL, E.; PFEFFER, P. E. A <sup>13</sup>C-NMR study of exudation and storage of carbohydrates and amino acids in the ectomycorrhizal edible mushroom *Cantharellus cibarius*. **Mycologia**, 94, n. 2, p. 190-199, 2002/03/01 2002.

RAVINDRAN, K.; SATHISHKUMAR, G.; RAJKUBERAN, C.; SIVARAMAKRISHNAN, S. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF INDIGENOUS ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *METARHIZIUM ANISOPLIAE* AGAINST CLINICALLY ISOLATED HUMAN PATHOGENS. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 6, n. 7, 07/28 2014.

ROHLFS, M.; CHURCHILL, A. C. L. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, 48, n. 1, p. 23-34, 2011/01/01/ 2011.

ROSAS-ACEVEDO, J. L.; BOUCIAS, D. G.; LEZAMA, R.; SIMS, K. *et al.* Exudate from sporulating cultures of *Hirsutella thompsonii* inhibit oviposition by the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. **Experimental & Applied Acarology**, 29, n. 3, p. 213-225, 2003/03/01 2003.

SAKUDA, S.; KIMURA, M. 4.10 - Toxins of Microorganisms. *In*: LIU, H.-W. e MANDER, L. (Ed.). **Comprehensive Natural Products II**. Oxford: Elsevier, 2010. p. 411-455.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010/12/15/ 2010.

SINGH, S. Guttation: Quantification, Microbiology and Implications for Phytopathology. *In*: LÜTTGE, U.; BEYSCHLAG, W., *et al* (Ed.). **Progress in Botany. Progress in Botany (Genetics - Physiology - Systematics - Ecology)**. Heidelberg: Springer, 2014. v. 75, p. 187-214.

SONYOT, W.; LAMLERTTHON, S.; LUANGSA-ARD, J. J.; MONGKOLSAMRIT, S. *et al.* *In Vitro* Antibacterial and Anti-Inflammatory Effects of Novel Insect Fungus *Polycephalomyces phaothaiensis* Extract and Its Constituents against *Propionibacterium acnes*. **Antibiotics**, 9, n. 5, p. 274, 2020/05/25 2020.

TIAN, J.-F.; LI, P.-J.; LI, X.-X.; SUN, P.-H. *et al.* New antibacterial isocoumarin glycosides from a wetland soil derived fungal strain *Metarhizium anisopliae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 26, n. 5, p. 1391-1396, 2016/03/01/ 2016.

### **CAPÍTULO III**

**EFICÁCIA DE FORMULAÇÕES GRANULARES À BASE DE BLASTOSPOROS OU MICROESCLERÓDIOS DE *Metarhizium robertsii* NO CONTROLE DE *Rhipicephalus microplus* EM CONDIÇÕES SEMINATURAIS**

## RESUMO

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é considerado um dos principais agentes de parasitismo na pecuária, responsável por significativas perdas econômicas em rebanhos de áreas tropicais e subtropicais. Na busca de tecnologias eficazes para o controle desse artrópode o fungo *Metarhizium* spp é um dos agentes dos agentes mais eficazes no controle microbiano. Para que este microrganismo possa ser empregado na pecuária, é necessário formulá-lo, de forma que esse seja facilmente aplicado no campo, resista as adversidades ambientais e seja eficaz no controle da praga alvo. O presente capítulo buscou avaliar a eficácia, em condições seminaturais, de formulações granulares contendo blastosporos ou microescleródios de *Metarhizium robertisii* para o controle do carrapato dos bovinos. Os vasos contendo a forrageira *Urochloa decumbens* (Syn. *Brachiaria*) e expostos as condições ambientais foram tratados com 5 mg/cm<sup>2</sup> ou 0,25 mg/cm<sup>2</sup> de cada formulação granular e posteriormente fêmeas de *R. microplus* foram colocadas sobre o solo tratado. O teste durou 336 dias, nesse intervalo três gerações de fêmeas foram expostas ao ambiente tratado e foram realizados dois tratamentos, um no período quente e úmido e outro no período frio e seco. Foram acompanhados os parâmetros climáticos, a eficácia das formulações sobre o artrópode, a persistência no ambiente e colonização das raízes de *U. decumbens*. Os grânulos contendo tanto microescleródios como blastosporos apresentaram produção de conídios sob as condições ambientais e foram capazes de colonizar tanto a superfície do solo quanto a rizosfera da forrageira no vaso. Nos dois períodos do ano, em que foram realizados os tratamentos do solo, foi observado a redução significativa do número de larvas provenientes das fêmeas expostas ao solo tratado. Os resultados obtidos, demonstram que a formulação proposta foi eficaz para o controle de *R. microplus* nas condições testadas e indicam seu uso promissor para o tratamento de áreas de pastagens, a fim de exercer o controle da fase não parasitária do carrapato *R. microplus*.

**Palavras-chave:** propágulos fúngicos, tratamento do solo, carrapato do boi

## 1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são potentes vetores de patógenos e por isso a espécie *Rhipicephalus microplus*, que tem como seu principal hospedeiro os bovinos, é apontada como um dos principais problemas na criação de gado em regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente na América Latina.

O aumento do rebanho bovino intensificou consideravelmente e o uso de recursos na produção desses animais tem exigido a criação de novas tecnologias e práticas de manejo (FETROW; CADY; JONES, 2005). Nesse contexto, novas estratégias de controle de ectoparasitos se fazem necessárias, sendo a utilização de fungos uma opção para o controle de infestações de carrapatos no ambiente (NCHU; MANIANIA; HASSANALI; ELOFF, 2010).

O sucesso do uso de microrganismos no controle de pragas depende do desenvolvimento de técnicas e formulações que os façam melhores ou equivalentes às opções de pesticidas químicos disponíveis no mercado (BEHLE; JACKSON; FLOR-WEILER, 2013) e além disso, devem levar em consideração as condições ambientais, a ecologia do patógeno e a do hospedeiro e também as possíveis limitações e formas de aplicação do bioproduto no ambiente (VEGA; GOETTEL; BLACKWELL; CHANDLER *et al.*, 2009). Entre os fungos entomopatogênicos, as espécies do gênero *Metarhizium* se destacam no controle biológico de pragas, por serem os agentes mais comuns na produção de micoinseticidas e micoacaricidas no mundo (FARIA; WRAIGHT, 2007).

*Metarhizium* spp. pode apresentar diferentes formas infectantes, como conídios e blastosporos (JACKSON; DUNLAP; JARONSKI, 2010), e algumas espécies quando submetidas à cultura em meio líquido podem produzir agregados de hifas melanizadas, mais resistentes a dessecação, denominadas microescleródios (JACKSON; JARONSKI, 2009) estrutura que confere ao fungo maior resistência e persistência, características de interesse do mercado que buscam o controle de artrópodes que habitam o solo (MASCARIN; LOPES; DELALIBERA; FERNANDES *et al.*, 2019).

Neste mesmo contexto, a dispersão rápida de propágulos capazes de infectar o hospedeiro alvo no momento necessário também é um atributo necessário (JACKSON; DUNLAP; JARONSKI, 2010). O solo nas pastagens utilizadas na pecuária bovina é o microambiente onde são encontradas as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, que se desprenderam do bovino para realizar a ovipostura. Durante a fase não parasitária (fêmeas, ovos e larvas no ambiente), o carrapato é totalmente influenciado pelos fatores ambientais (MASTROPAOLO; MANGOLD; GUGLIELMONE; NAVA, 2017). Com base nesse contexto, o presente estudo investigou a eficácia de formulações granulares de microescleródios (MS) ou blastosporos (BLS) do fungo *Metarhizium robertsii* (isolado IP146) em duas diferentes concentrações contra o carrapato *R. microplus*, em condições seminaturais de pastagem. Em paralelo, também se determinou a persistência do fungo no solo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local de realização dos experimentos e coleta dos dados climáticos

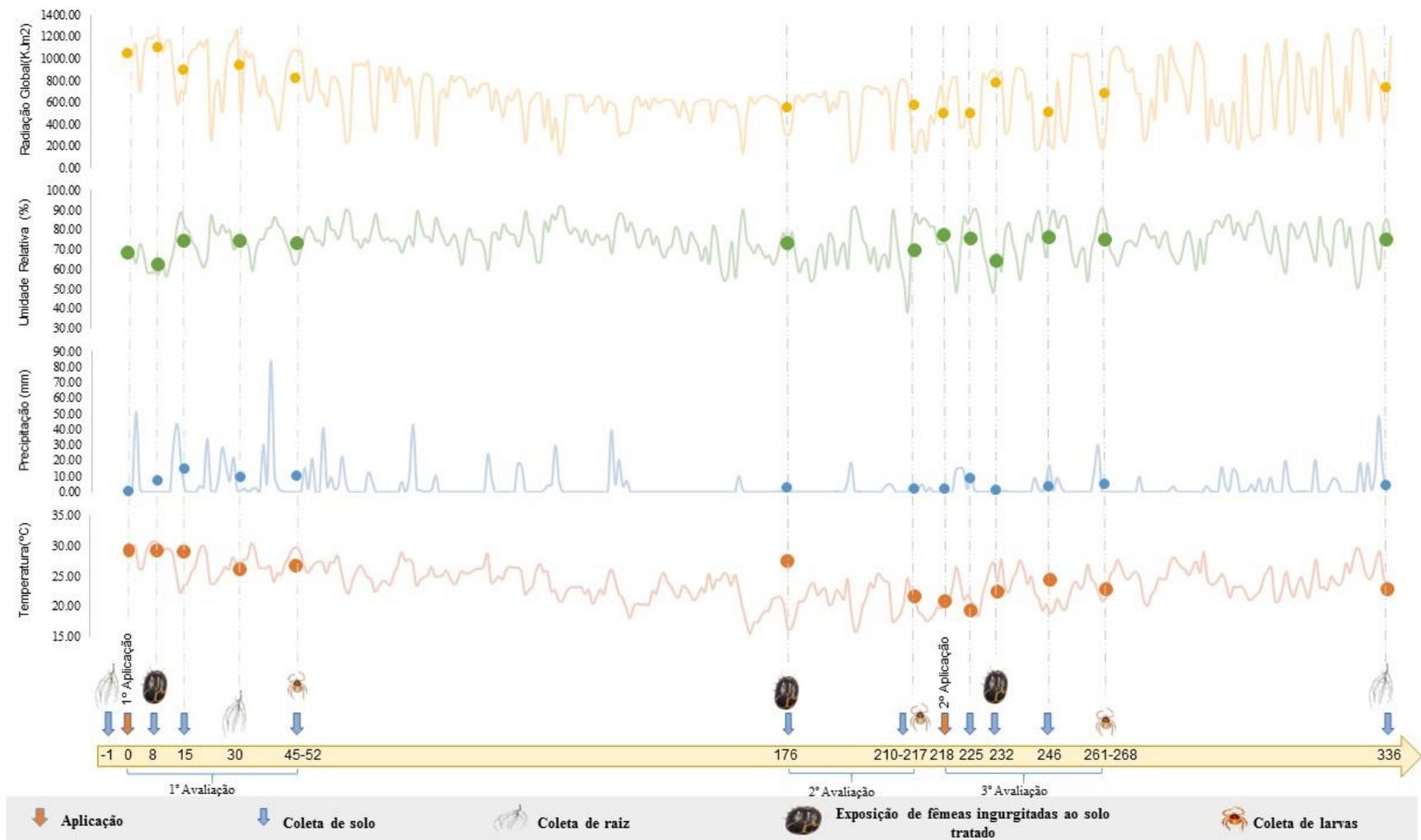
O estudo foi realizado por 337 dias consecutivos (Figura 1), com início em 23 de janeiro de 2019 e término em 25 de dezembro do mesmo ano. Neste intervalo, foram contempladas duas condições climáticas distintas: uma no período caracterizado por dias quentes (média de  $27,24 \pm 2,10$  °C) e alto volume de precipitação (média de  $9,52 \pm 16,82$  mm), e outra na estação

com temperaturas amenas (média de  $22,12 \pm 2,86$  °C) e menos chuva (média de  $2,21 \pm SD 5,08$  mm).

O ensaio em condições seminaturais foi realizado na Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica Wilhelm Otto Neitz (EEPPWON), localizada na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil ( $22^{\circ} 45' 54,9''$  Sul e  $43^{\circ} 41' 57,2''$  Oeste, 24 m s.n.m) a 1 km de distância da área experimental. As condições climáticas como precipitação, umidade relativa e radiação ultravioleta global foram monitoradas utilizando dados da Estação Meteorológica da Fazenda Agroecológica localizada na mesma área onde o estudo foi realizado. As sementes de *Urochloa decumbens* cv. Basilisk (sementes de lobo<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, SP) foram semeadas em vasos de polipropileno com 22 cm de altura, 24 cm de largura e 24 cm de comprimento.

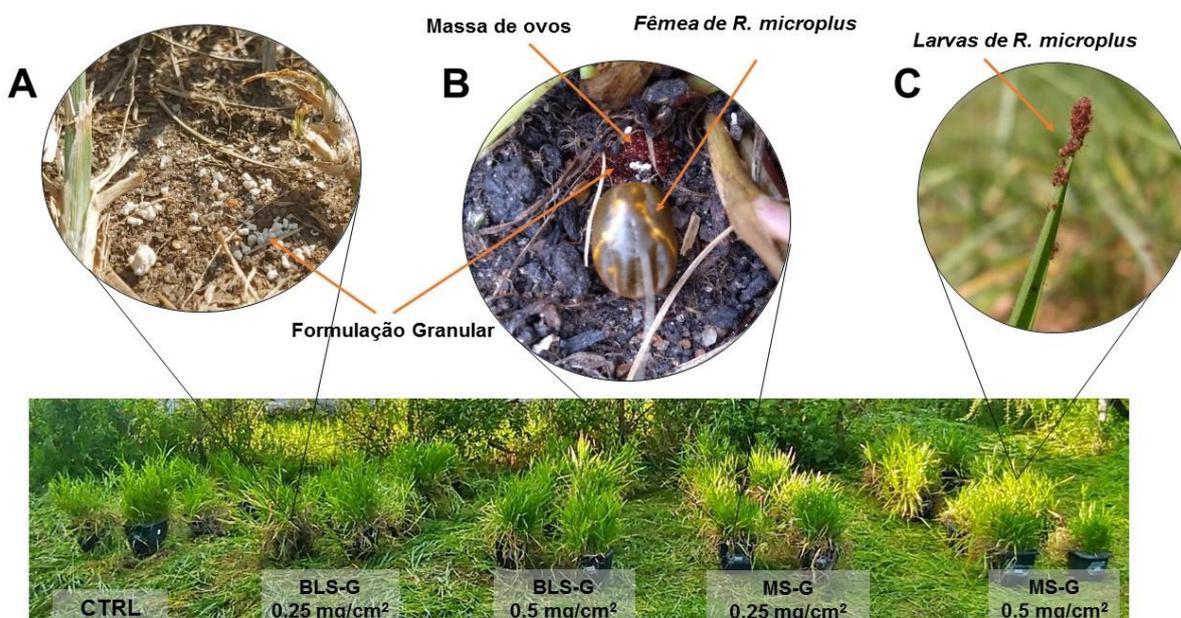
O solo utilizado para encher os vasos foi obtido a partir da camada superficial (aproximadamente 10 cm de profundidade) de um solo classificado como planosolo da área externa de EEPPWON. O solo foi autoclavado com dois ciclos a 120 °C por 20 min, a fim de eliminar outros isolados de *Metarhizium* spp. selvagem que poderiam estar presentes nele, posteriormente foi realizado o plantio da forrageira e o experimento foi perfomado apenas três meses depois, após o crescimento da vegetação, dando tempo suficiente para restaurar parcialmente a comunidade microbiana no solo.

Após preenchimento dos vasos, a área obtida da superfície do solo foi de 576 cm<sup>2</sup>. A temperatura do solo nos vasos foi registrada manualmente com um termômetro analógico, que foi introduzido 5 cm de profundidade no solo. Um pote de cada grupo foi selecionado aleatoriamente para medir a temperatura às 8:00h, 12:00h e 17:00h todos os dias após o tratamento até o último dia de recuperação das larvas de *R. microplus*.



**Figura 1** - Linha do tempo ilustrando os períodos climáticos e parâmetros ambientais, assim como os dias em que ocorreram as aplicações das formulações granulares de *Metarhizium robertsii*, os períodos de avaliação sobre o carrapato, dias das coletas do solo, das coletas de raízes, das exposições das fêmeas do carrapato *Rhipicephalus microplus* ao solo tratado e das coletas de larvas ao longo dos 337 dias de teste em condições seminaturais. Os pontos indicam o valor médio da variável climática nos dias indicados.

Sete dias antes do início dos testes, foram selecionados os vasos com cobertura vegetal homogênea, e a forrageira foi podada com 35 cm de altura. Os potes foram colocados aleatoriamente em grupos que seguiram um desenho de blocos completamente randomizados sob incidência direta de sol e chuva (Figura 2). Durante todo o período de experimentação, os potes não foram manuseados, e só foram irrigados quando necessário para a sobrevivência da forrageira.



**Figura 2** - Arranjo de potes contendo *Urochloa decumbens* cv. Basilisk distribuídos aleatoriamente nos quatro grupos de tratamento (BLS-G 0,25; BLS-G 0,5; MS-G 0,25; MS-G 0,5 g/cm<sup>2</sup>) e um grupo de controle (CTRL), em condições de campo na Estação Experimental de Pesquisa Parasitológica Wilhelm Otto Neitz (EPPWON) - UFRRJ (22° 45' 54,9" Sul e 43° 41' 57,2" Oeste, 24 m a.s.l.). A) Grânulos distribuídos sobre a superfície do solo dos vasos; B) Fêmeas de *Rhipicephalus microplus* no solo tratado com a formulação granular de *Metarhizium robertisii* durante o período de postura e formulação granular (cor branca) na massa de ovos; C) Larvas no ápice do capim após eclodir.

Com base em experimentos prévios (não publicados), foram estabelecidas duas concentrações de cada formulação granular: 0,5 mg/cm<sup>2</sup> (50 kg/ha) e 0,25 mg/cm<sup>2</sup> (25 kg/ha). Cinco grupos foram formados com oito potes cada. Dois grupos foram tratados com a formulação granular contendo microscleródia (MS): um com 0,5 mg/cm<sup>2</sup> (MS-G 0,5 mg/cm<sup>2</sup>) e outro com 0,25 mg/cm<sup>2</sup> (MS-G 0,25 mg/cm<sup>2</sup>). Da mesma forma, dois grupos foram tratados com a formulação granular contendo blastosporos (BLS): um com 0,5 mg/cm<sup>2</sup> (BLS-G 0,5 mg/cm<sup>2</sup>) e outro com 0,25 mg/cm<sup>2</sup> (BLS-G 0,25 mg/cm<sup>2</sup>). O grupo controle (CTRL) foi tratado com a maior concentração (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) de grânulos formulados sem fungos. Baseado nas dimensões dos vasos, a área da superfície do solo foi de 576 cm<sup>2</sup>, exigindo 288 mg ou 144 mg de grânulos por pote para obtenção das concentrações de 0,5 e 0,25 mg/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

## 2.2 Formulações granulares

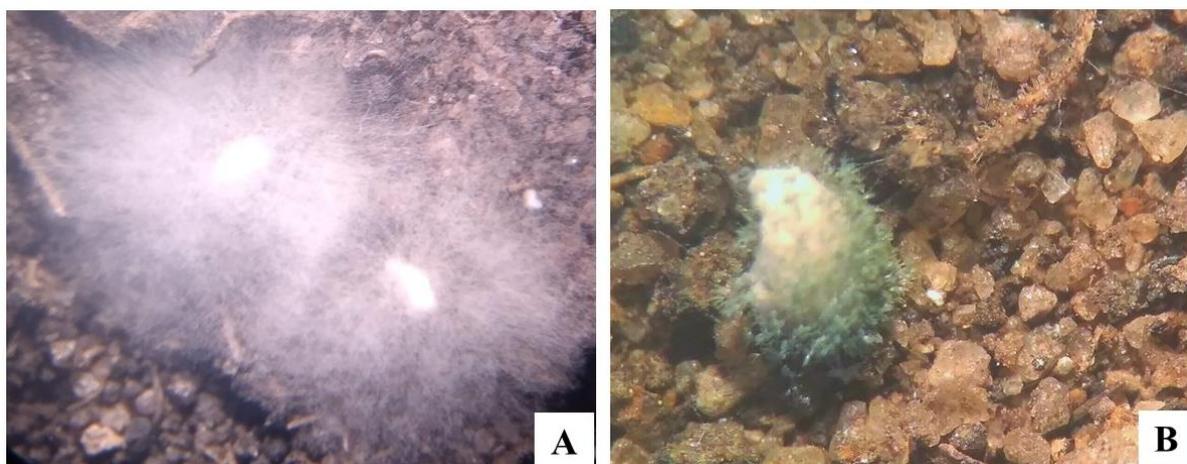
As formulações granulares, compostas por MS ou BLS de *M. robertsii* IP-146, foram produzidas na Universidade Federal de Goiás – UFG (Fernandes et al., 2017 - Patente: BR 10 2017 004061 5). A cepa fúngica foi obtida a partir do solo uma amostra coletada em Goiás, Centro-Oeste do Brasil, mantida e armazenada na Coleção de Pesquisa Fúngica do Laboratório de Patologia invertebrada, UFG.

BLS foram produzidos em frascos de 250 mL contendo meio Adámek modificado (ADAMEK, 1965) inoculado com 2 mL de uma suspensão conidial a  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL, e agitado por 4 dias (BERNARDO; BARRETO; E SILVA; LUZ *et al.*, 2018). A biomassa obtida foi centrifugada e resuspendida em 0,01% Tween 80<sup>®</sup> (Labsynth, Brasil) duas vezes; posteriormente BLS foram quantificados em uma câmara de Neubauer e a concentração ajustada para  $1,0 \times 10^8$  BLS/mL.

MS foram cultivados em meio basal (MASCARIN; KOBORI; DE JESUS VITAL; JACKSON *et al.*, 2014), em que 10 mL da suspensão fúngica ( $5,0 \times 10^7$  conidia/mL) foi adicionados para completar o volume final de 100 mL, em frascos de 250 mL. As culturas foram agitadas por 4 dias (JARONSKI; JACKSON, 2008; MASCARIN; JARONSKI, 2016) e biomassa obtida centrifugada e resuspendida em 0,01% Tween 80<sup>®</sup> duas vezes. A concentração de MS foi determinada de acordo com JARONSKI e JACKSON (2008).

A biomassa líquida ( $1,0 \times 10^4$  MS/mL ou  $2,0 \times 10^8$  BLS/mL) foi filtrada através de um papel filtro de 70 mm de diâmetro, sob vácuo e o material foi então misturado com 950 mg de celulose microcristalina 101 (Mingtai Chemical<sup>®</sup>, Taiwan) e 50 mg de Psyllium (Natural do Norte, Brasil) para cada mL de biomassa. O conteúdo foi então homogenizado e prensado manualmente em uma peneira de 1 mm para a formação dos grânulos, os quais foram secos em leito fluidizado ( $1000 \times 1850 \times 630$  mm,  $1,5 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$ ) (modelo FBD 1.0, LabMaq<sup>™</sup>, Ribeirão Preto, SP, Brasil) até que a umidade final atingisse  $5 \pm 1\%$ . Após o processo foi obtido 80g de grânulos com  $1,25 \times 10^4$  MS/g ou  $2,5 \times 10^6$  BLS/g, que foram armazenados a  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  em tubos tipo falcom selados até a execução dos testes.

Os lotes da formulação de grânulos fúngicos utilizados na primeira e segunda aplicação fúngica foram avaliados para viabilidade antes do uso nos ensaios de semi-campo; portanto, germinação hifal (miceliogênica) e germinação esporogênica (produção conidial) foram determinadas (JARONSKI; JACKSON, 2009) (Figura 3).



**Figure 3** – Grânulos do isolado de *Metarhizium robertsii* IP 146 apresentando esporulação micelial (A) e conidiogênica (B) visualizado durante a avaliação da viabilidade fúngica sob um microscópio estereoscópio. Barra de escala = 0,5 mm.

Primeiro, 7 mg de cada formulação granular fúngica foram espalhadas sobre a superfície das placas de Petri (90 × 15 mm) contendo meio de ágar de água ou em placas de Petri (50 × 10 mm) contendo 10 g do mesmo solo seco (estéril ou não estéril) usado para encher os potes utilizados no ensaio em condições seminaturais; o teor de água nos substratos do solo foi ajustado para 30% (w/w). As placas de Petri foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C e a  $RH \geq 80\%$ . Cada placa foi examinada sob um microscópio estéreo para avaliação de germinação micelial e posteriormente, a quantificação de conídio produzida pelos grânulos foi realizada, 7 dias após o início da germinação esporogênica em cada condição testada (em meio ágar água, ou sobre amostras de solo, estéril ou não estéril). Cada condição foi realizada em triplicata e o teste foi repetido duas vezes.

Para enumerar a quantidade de conídios produzida pelos grânulos em substratos de solo estéreis ou não estéreis, cada amostra de solo contendo grânulos esporulados foi diluída individualmente em 15 mL de monooleto de polioximetileno sorbitan (Tween 80<sup>®</sup>) 0,01 % (v/v) e agitado em vortex por 2 min. Para quantificar os conídios produzidos pelos grânulos nas placas de ágar água, grânulos esporulados foram lavados com 5 mL de 0,01 % (v/v) de Tween 80<sup>®</sup> e os conídios que cobriam os grânulos foram removidos usando uma alça de platina estéril. Depois disso, a suspensão aquosa formada em cada placa foi pipetada em e o volume total registrado. Imediatamente após a obtenção da suspensão conidial, uma alíquota de 10 µl foi pipetado na câmara de Neubauer e a concentração conidial avaliada microscopicamente; o número de conídios por placa foi então calculado. Para determinar o número de conídios produzida por grama de grânulos secos, o número de conídios por placa foi dividido pelo peso dos grânulos (7,0 mg) que havia sido adicionados a cada placa e multiplicado pela diluição final.

A viabilidade dos conídios produzida pelos grânulos foi avaliada a partir da preparação de suspensões conidiais (ajustadas a  $10^3$  conídio/mL) de cada placa, e 50 µl (volume necessário para atingir 50 conidia da alíquotade suspensão) foi distribuído sobre meio semi-seletivo CTC (FERNANDES; KEYSER; RANGEL; FOSTER *et al.*, 2010) em placas de Petri (90 × 15 mm), utilizando um alça de Drigalski. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C e  $RH > 80\%$  por 3 a 4 dias. Posteriormente, foi contado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) e o percentual de germinação calculado dividindo o número de UFC contados na placa por 50 (número de UFCs esperados em 50 µl da suspensão a  $10^3$  conídio/mL).

### 2.3. Testes em condições seminaturais

O solo dos vasos contendo *U. decumbens* foram tratado com os grânulos à tarde (16h). A aplicação foi feita manualmente espalhando os grânulos o mais uniformemente possível sobre a superfície do solo anteriormente irrigado. A esporulação fúngica no solo estéril e não estéril foi monitorada em condições laboratoriais (descritas acima) e nos grânulos sobre o solo dos vasos para determinar o dia da exposição das fêmeas ingurgitadas, que ocorreu 8 dias depois do tratamento.

As fêmeas de *R. microplus* utilizadas neste estudo foram obtidas de uma colônia de laboratório, mantida com bezerros infestados artificialmente (previamente aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da UFRRJ, protocolo nº 9714220419). Vinte e um dias após a infestação, fêmeas ingurgitadas foram coletadas do chão das baias, lavadas em água corrente, imersas em uma solução de hipoclorito de sódio 0,05% (v/v) por 3 minutos para desinfetar a cutícula e depois secas em toalhas de papel estéreis. Após a limpeza da cutícula dos carrapatos, as fêmeas ingurgitadas foram pesadas individualmente e separadas em cinco classes de acordo com seus pesos. Posteriormente, quarenta grupos de peso homogêneo, contendo cinco fêmeas (um carrapato de cada classe) foram formados e colocados no solo dos vasos, totalizando oitenta fêmeas por grupo.

Durante o experimento, três gerações de *R. microplus* foram adicionadas nos potes (Figura 1). A primeira avaliação começou com a introdução de fêmeas ingurgitadas nos vasos, oito dias após a primeira aplicação dos granulos no solo (Figura 1). Em uma segunda etapa, 176 dias após o primeiro tratamento, uma nova geração de fêmeas ingurgitadas foi exposta ao solo nos vasos (segunda avaliação) sem repetir a aplicação do fungo, isso foi feito para avaliar o possível efeito residual da primeira aplicação fúngica (Figura 1). Posteriormente, 218 dias após o primeiro tratamento, uma nova aplicação fúngica foi realizada (segunda aplicação fúngica) e uma terceira geração de fêmeas ingurgitadas foi exposta ao solo tratado (terceira avaliação) (Figura 1).

Após a exposição das fêmeas de *R. microplus* ao solo tratado, foram realizadas inspeções diárias em cada vaso para monitorar produção de ovos e avaliar o percentual de mortalidade cumulativa das fêmeas do carrapato. Vinte e nove dias após a introdução de fêmeas do carrapato, foi feita a recuperação de larvas do ápice do capim, sempre no período da manhã (aproximadamente 10:00h), em intervalos de dois dias, até que não fossem observadas mais larvas. A ausência de larvas nas folhas foi confirmada diariamente por duas semanas. As larvas recuperadas foram colocadas em sacos plásticos, lacrados, identificados e congelados. As larvas foram quantificadas com uso de uma pipeta de 1000 µL presa a uma bomba de vácuo. A eficácia relativa (RE) para controlar as larvas do carrapato e as comparações entre os grupos de tratamento foram calculadas com base na densidade populacional de larvas contadas em cada pote, utilizando-se a fórmula descrita por BITTENCOURT; BAHIESE; FERNANDES e E.J. (2003)

$$RE = \frac{(Lc - Lt)}{Lc} \times 100$$

Onde *Lc* é o número médio de larvas recuperadas do vaso de controle, e *Lt* é o número médio de larvas recuperadas dos vasos tratados.

#### **2.4. Isolamento de *Metarhizium robertsii* de fêmeas do carrapato**

Ao final da coleta de larvas, as fêmeas mortas encontradas nos vasos foram coletadas e colocadas individualmente em sacos e identificados de acordo com o número do vaso e grupo. Em condições laboratoriais, a cutículas dos cadáveres do carrapato foram lavadas em água corrente e a assepsia foi feita por imersão em hipoclorito de sódio 0,5 % (3 min) e enxaguados três vezes em água destilada estéril. Os cadáveres de fêmeas do carrapato foram mantidas em câmaras úmidas a  $25 \pm 1$  °C e RH > 80% até a exteriorização fúngica para confirmação da infecção e colonização por *Metarhizium* spp. Após o crescimento fúngico sobre o carrapato, pequenas quantidades do material fúngico foram transferidas para placas médias de Batata Dextrose Agar (BDA) para assim obter colônias puras, facilitando a identificação fúngica com base em características morfológicas macro e microscópicas (BISCHOFF; REHNER; HUMBER, 2009; HUMBER, 2012).

#### **2.5 Isolamento de *Metarhizium robertsii* do solo**

Para avaliar a presença ou ausência de *M. robertsii* no solo, a CFU foi monitorada a partir de amostras de solo coletadas um dia antes do primeiro tratamento (dia -1) e nos dias 8, 15, 30, 176, 210, 225, 232, 246 e 336 após o primeiro tratamento (dia 0). Foram coletadas três amostras de solo de cada pote, armazenadas e homogeneizadas em recipientes estéreis, formando uma única amostra composta que foi selada e identificada para posterior análise. As alíquotas das amostras de solo ( $0,35 \pm 0,05$  g) foram pesadas em microtubos de 2 mL e diluídas

em 1 mL 0,01% (v/v) Tween 80<sup>®</sup> e misturadas vigorosamente para 30s; depois disso, 50 µL foi pipetado em meio CTC (FERNANDES; KEYSER; RANGEL; FOSTER *et al.*, 2010) em placas de Petri (90 × 15 mm) e espalhados uniformemente com um alça de Drigalski (FERNANDES; KEYSER; RANGEL; FOSTER *et al.*, 2010). As placas de Petri foram incubadas a 25 ± 1 °C e RH > 80% e após 7, 14 e 21 dias, as colônias de *Metarhizium* spp. foram identificadas morfológicamente de acordo com HUMBER (2012), e o número de UFC por grama de solo foi calculado.

## 2.6 Isolamento de *Metarhizium robertsii* de raízes de *Urochloa decumbens*

Para monitorar a colonização radicular por *M. robertsii*, raízes de três plantas de *U. decumbens* foram removidas cuidadosamente de cada vaso nos dias -1, 30, 176 e 336. As amostras de raiz foram identificadas e depois lavadas em água corrente para remover o solo. As raízes primárias foram cortadas manualmente em pequenos pedaços (aprox. 0,6 mm) utilizando uma tesoura de laboratório e sua superfície foi esterilizada dentro de capela de fluxo laminar, onde os fragmentos foram imersos em hipoclorito de sódio de 0,5% por 2 min, depois em álcool 70% por 2 min, e finalmente enxaguados três vezes em diferentes águas destiladas estéreis; as bordas externas das raízes foram dissecadas asepticamente para facilitar a exteriorização fúngica (PARSA; ORTIZ; VEGA, 2013). A água (100 µL) utilizada para enxaguar as raízes pela última vez também foi inoculada em meio BDA e incubada a 25 ± 1°C e RH > 80% por 10 dias para validar o protocolo de esterilização.

Três pedaços de cada raiz da planta foram inoculados em meio CTC. As placas foram incubadas a 25 ± 1°C e RH > 80% durante 21 dias e inspecionadas a cada três dias para verificar e registrar o crescimento fúngico. A taxa de sucesso na colonização das raízes de *U. decumbens* foi calculada contando o número de plantas que apresentaram raízes positivas ao crescimento de *M. robertsii*. Para confirmar que as colônias fúngicas cultivadas a partir das raízes se tratavam realmente de *M. robertsii*, a morfologia fúngica foi confirmada com base no exame microscópico de acordo com HUMBER (2012). Como forma de determinar o potencial endofítico desse fungo, a proporção de plantas com *M. robertsii* associada à raiz foi então calculada da seguinte forma:

$$\text{Proporção de plantas colonizadas} = \frac{\text{Nº de plantas apresentando crescimento de } \textit{Metarhizium} \text{ sp.}}{\text{Total de plantas plaqueadas}}$$

## 2.7 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software *R Core Team*, versão 4.0.2 (R CORE TEAM, 2020). A contagem de larvas de carrapato foi encaixada em um modelo misto linear generalizado com distribuição binomial negativa para erros e função de Log, implementado com o pacote "glmmTMB" (BROOKS; KRISTENSEN; VAN BENTHEM; MAGNUSSON *et al.*, 2017), incluindo a exposição das fêmeas de carrapato (infestação), tratamento (formulações fúngicas e controle) e seu termo de interação como efeitos fixos e bloco como efeito aleatório no preditor linear. Quanto à eficácia relativa (%), os dados foram ajustados ao modelo misto linear com distribuição normal, incluindo período de avaliação, formulação e interação como fatores fixos e bloqueio aleatório no preditor linear. O efeito das formulações de *M. robertsii* sobre as fêmeas de carrapato sobreviventes da probabilidade foi determinado usando uma análise de sobrevivência usando o método não paramétrico Kaplan-Meier e as curvas de sobrevivência foram então comparadas com o teste de proporção de registro -probabilidade ( $P < 0,05$ ) (pacote "sobrevivência") (TERRY, 2020). Os dados sobre a

colonização das raízes por *M. robertsii* foram ajustados a um modelo linear generalizado com distribuição binomial para erros e função de log, incluindo o tratamento como efeito fixo. O controle não foi incluído nesta análise, uma vez que a variância foi nula, pois não foi detectada colonização de fungos em raízes de vasos não tratados.

Os dados sobre viabilidade fúngica (proporção de UFC) dos grânulos foram ajustados a um modelo misto linear generalizado com distribuição binomial para erros e função de ligação log, incluindo tipo de propagulo, tipo de substrato e seu termo de interação como efeitos fixos e nível observacional e tempo experimental como efeitos aleatórios no preditor linear. Os dados sobre a produção conidial foram  $\log_{10}$  transformados antes da análise. O rendimento conidial transformado no  $\log_{10}$  foi ajustado com um modelo linear misto com distribuição gaussiana para erros, incluindo tipo de propagulo, tipo de substrato e seu termo de interação como efeitos fixos e bloco experimental como efeito aleatório no preditor linear.

Observações normalmente distribuídas com variância heterogênea quanto ao número de UFCs por grama de solo foram instaladas em modelos lineares generalizados usando a função generalizada menos quadrada (gls) pacote "nlme" (PINHEIRO; BATES; DEBROY; SARKAR *et al.*, 2020) e empregando estimativa máxima de probabilidade, implementada separadamente para cada conjunto de dados representado pela primeira aplicação fúngica durante o verão e segunda aplicação fúngica durante o inverno. O modelo incluiu tratamentos, data de avaliação e seu termo de interação como fatores fixos no preditor linear, enquanto a variância heterogênea foi atribuída a cada tratamento  $\times$  tempo. A correlação entre fatores climáticos registrados durante o experimento semi-campo e os dados sobre persistência fúngica no solo foram realizados com método de classificação Spearman não paramétrico.

Todas as comparações múltiplas de meios de tratamento foram realizadas com o teste Tukey HSD ( $P < 0,05$ ), implementado com pacote R "emmeans" (RUSSELL, 2020).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Produção conidial e viabilidade fúngica em formulações granulares

Os grânulos contendo MS ou BLS mostraram claramente as primeiras projeções de hifais 2 dias após a incubação no meio de água-ágar. Em contraste, quando esses grânulos foram expostos a solo estéril e não estéril, o crescimento hifal ocorreu 3 e 5 dias após a incubação, respectivamente.

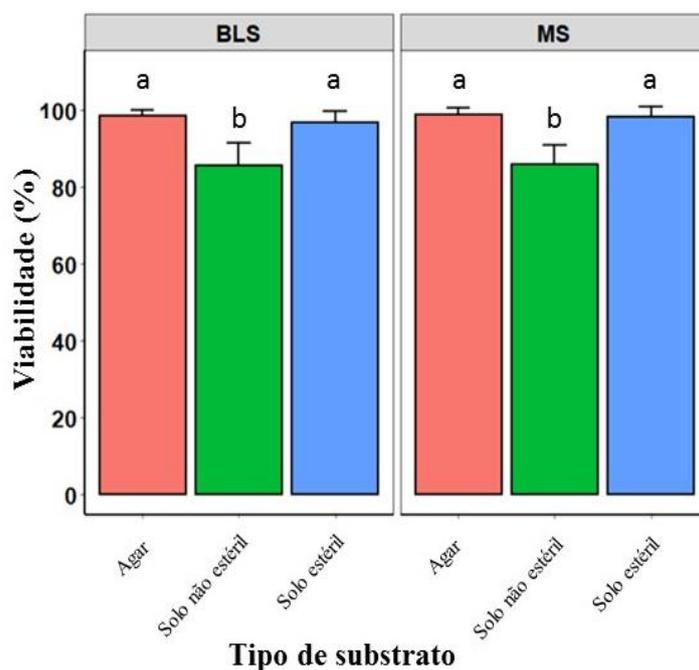
A produção conidial por formulações granulares foi fortemente afetada pelo tipo de substrato e tipo de propagule fúngico (interação:  $F_{2,29} = 55,04$ ,  $P < 0,0001$ ). Para ambos os tipos de propagulos fúngicos, a germinação esporogênica de *M. robertsii* IP 146 sempre foi maior em grânulos inoculados no meio de água-ágar seguido pelo solo estéril, enquanto os rendimentos conidiais mais baixos foram atingidos pelos grânulos incubados em solo não estéril (natural), independentemente do tipo propagulo (Tabela 1).

Os grânulos de MS produziram números consideravelmente maiores de conídio do que os grânulos de BLS quando inoculados em solo não estéril, e essa superioridade foi mais acentuada quando incubada em meio de ágar-água (Tabela 1). A viabilidade conidial produzida por grânulos MS e BLS atingiu  $\geq 85\%$  e foi fortemente afetada pelo tipo de substrato ( $\chi^2_{2} = 77,82$ ,  $P < 0,0001$ ), independentemente do tipo propagulo, evidenciado taxas de viabilidade mais baixas quando os grânulos foram inoculados em solo não estéril do que no estéril ou no meio ágar água (Figura 4). Os grânulos de MS produziram  $1,07 \pm 0,07 \times 10^7$  e  $8,39 \pm 0,67 \times 10^5$  conidia/g de solo estéril e não estéril, respectivamente. Os grânulos BLS atingiram  $1,01 \pm 0,06 \times 10^7$  em solo estéril e  $4,13 \pm 0,66 \times 10^5$  em solo não estéril.

**Tabela 1** - Rendimento conidial (germinação esporogênica) pelas formulações granulares de microesclerotia (MS) ou blastosporos (BLS) de *Metarhizium robertsii* (IP 146) em diferentes tipos de substratos.

Tipo de propágulo	Tipo de substrato	Conídio/g de grânulos		
MS	Solo estéril	$153 \times 10^8 \pm 6.41 \times 10^8$	a	A
	Solo não estéril	$1.19 \times 10^8 \pm 0.50 \times 10^8$	b	B
	Agar água	$671 \times 10^8 \pm 282 \times 10^8$	c	C
BLS	Solo estéril	$143 \times 10^8 \pm 6.01 \times 10^8$	a	A
	Solo não estéril	$5.83 \times 10^8 \pm 0.24 \times 10^8$	b	D
	Agar água	$612 \times 10^8 \pm 25.7 \times 10^8$	c	C

Médias ( $\pm$ SE) na mesma coluna seguido de diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes entre os tipos de substrato, e seguidos por diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes entre os tipos de propagulo. Foram realizadas comparações múltiplas em pares com o teste Tukey HSD em  $P < 0,05$ .



**Figura 4** - Viabilidade conidial após a germinação esporogênica de grânulos de *Metarhizium robertsii* incubados em diferentes tipos de substrato (água de ágar, solo não estéril e solo estéril). As barras verticais (médias  $\pm$  95% DE CI = intervalo de confiança) seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes, dentro de cada propagule fúngico (MS = microesclerotio e BLS = blastosporos)(Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

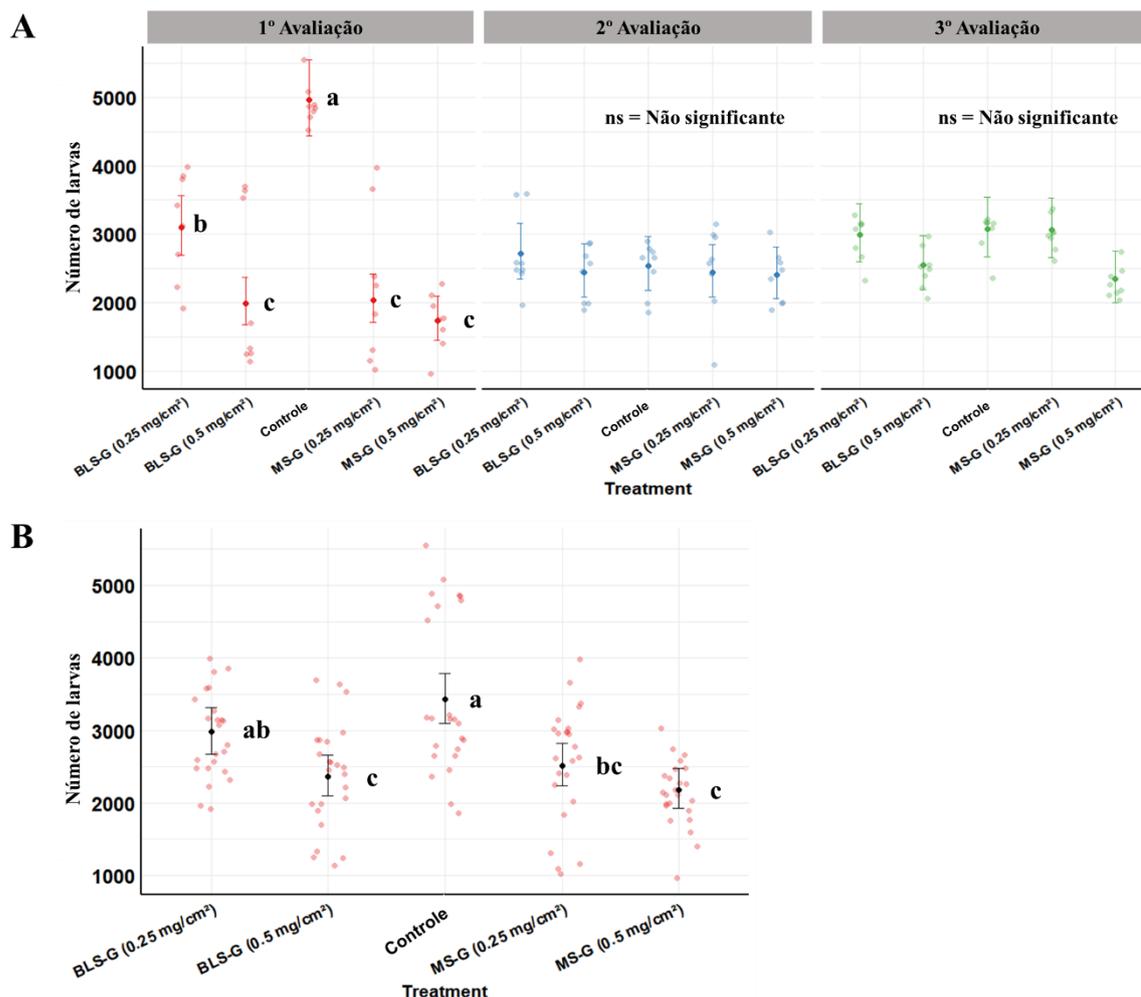
### 3.2 Eficácia das formulações granulares no controle de *Rhipicephalus microplus* em condições seminaturais

Ambas as concentrações de formulações granulares contendo MS ou BLS diminuíram significativamente o número de larvas do carrapato, mas apenas durante o primeiro período de avaliação após a primeira aplicação fúngica ( $\chi^2_8 = 78,83$ ,  $P < 0,0001$ ) em comparação com o grupo controle (Figura 5 A). Após a primeira aplicação fúngica, houve reduções consideráveis no número de larvas após os tratamentos com 0,5 mg/cm<sup>2</sup> dos grânulos à base de BLS (BLS-G 0,5), com 0,5 mg/cm<sup>2</sup> e 0,25 mg/cm<sup>2</sup> dos grânulos de MS, grupo MS-G 0,5 e MS-G 0,25 respectivamente, enquanto o tratamento com 0,25 mg/cm<sup>2</sup> dos grânulos de BLS (BLS-G 0,25) não foi tão eficaz quanto os tratamentos com BLS-G 0,5, MS-G 0,5 ou MS-G 0,25, embora apresentasse significativamente menos larvas do que o grupo controle (Figura 5 A).

Após cinco meses do primeiro tratamento, uma segunda geração de fêmeas carrapatos (segunda avaliação) foi colocada nos vasos e todos os grupos apresentaram um número semelhante de larvas. Portanto, não foi observado nenhum efeito residual da primeira aplicação (Figura 5 A). Então uma segunda aplicação dos grânulos sobre o solo foi realizada em uma estação diferente do ano, com um clima mais frio e seco, no entanto o resultado demonstrou que um novo tratamento com as formulações granulares foi insuficiente para reduzir o surto de larvas nos vasos quando comparado ao grupo controle (Figura 5 A). No geral, agrupando os dados das duas aplicações fúngicas nas três gerações de carrapatos avaliados ao longo dos testes, as bio-formulações *M. robertsii* afetaram negativamente a carga larval no ambiente ( $\chi^2_4 = 42,77$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 5 B). O número médio de larvas de carrapato foi menor nos vasos tratados com as altas doses (0,5 mg/cm<sup>2</sup>) de MS-G ( $P < 0,0001$ ) e BLS-G ( $P = 0,0001$ ), bem como com a dose inferior (0,25 mg/cm<sup>2</sup>) de MS-G ( $P = 0,0012$ ) em comparação com o grupo controle. No tratamento com BLS 0,25 mg/cm<sup>2</sup> ( $P = 0,3305$ ) não diferiu do controle não tratado, que por sua vez teve efeito semelhante ao de MS-G 0,25 mg/cm<sup>2</sup> ( $P = 0,2258$ ) (Figura 5 B).

Quanto à eficácia relativa, houve interação significativa da aplicação com o período de avaliação sobre larvas de carrapato ( $\chi^2_6 = 3,23$ ,  $P = 0,0395$ ). Os melhores percentuais de eficácia relativa foram alcançados na primeira exposição de fêmeas (primeira avaliação) ao solo tratado com fungos, com eficácia variando de 38,36% a 64,64% correspondente aos tratamentos com BLS-G 0,25 ou MS-G 0,5, respectivamente (Tabela 2). Sem aplicar as formulações fúngicas novamente, a eficácia relativa foi substancialmente reduzida no segundo período de avaliação em todos os tratamentos em comparação com os grupos de controle, sem distinção estatística entre os grupos de tratamento ( $P > 0,05$ ), e médias variando de 4,14% (BLS-G 0,25) a 12,42% (MS-G 0,25). Após a segunda aplicação fúngica dos grânulos fúngicos, verificou-se um aumento significativo da eficácia relativa para a terceira geração de carrapatos expostos à MS-G 0,5 em contraste com a MS-G 0,25, e a eficácia relativa média entre os tratamentos variou entre 1,73% e 23,89% (Tabela 2).

Durante as três exposições de carrapatos ao solo tratado com fungos, a mortalidade de fêmeas ingurgitadas apenas foi registrada após o período de postura dos ovos (morte natural). Não ocorrendo efeito significativo das formulações de *M. robertsii* sobre as taxas de sobrevivência das fêmeas do carrapato ( $\chi^2_4 = 0,88$ ,  $P = 0,95$ ) (Figura 6). Dos cadáveres de carrapato encontrados durante o período experimental, apenas fungos filamentosos que não *metarhizium* spp. foram isolados.

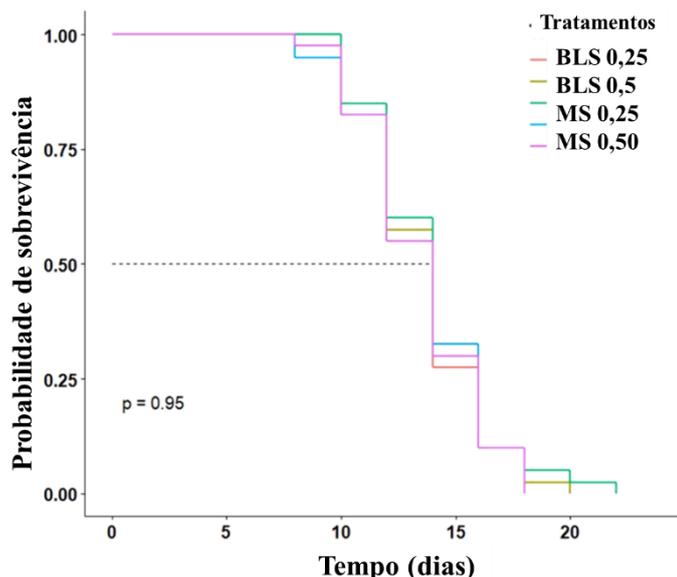


**Figura 5** - Impacto de formulações granulares de microescleroto e blastosporos de *Metarhizium robertsii* na densidade de larvas do carrapato *Rhipicephalus microplus* em vasos contendo *Urochloa decumbens*. Número de larvas do carrapato contadas após a aplicação no solo de 0,5 ou 0,25 mg/cm<sup>2</sup> de grânulos à base de microclerotia (MS-G) ou blastosporos (BLS-G). **A**) O número médio de larvas comparadas entre os tratamentos em três períodos de avaliações, quando fêmeas de *R. microplus* foram expostas ao ambiente tratado. Na primeira e segunda avaliação, foi avaliado o efeito imediato e residual da primeira aplicação fúngica, respectivamente, na terceira avaliação o efeito de uma nova aplicação das formulações foi verificado. **B**) Efeito global obtido no número de larvas de carrapato nas três avaliações ao longo do período de teste, considerando os dois tratamentos fúngicos. Médias (n = 8) são pontos e as barras representam intervalos de confiança de 95%. Médias seguidas de letras distintas indicam diferenças significativas (teste de Tukey HSD P < 0,05). Dados brutos são pontos sombreados.

**Tabela 2.** Eficácia relativa (%) dos tratamentos sobre a geração de carrapato, obtido em três períodos de avaliações após a exposição das fêmeas de *Rhipicephalus microplus* ao solo tratado com com 0,5 ou 0,25 mg/cm<sup>2</sup> de formulações granulares contendo microesclerotia (MS-G) ou blastosporos (BLS-G) de *Metarhizium robertsii*. Na primeira e segunda avaliações, foi avaliado o efeito imediato e residual da primeira aplicação do fungo no solo, respectivamente, enquanto na terceira avaliação foi registrado o efeito de uma nova aplicação desses tratamentos fúngicos.

Período de avaliação	Tratamentos	Eficácia Relativa (%)*	95% IC**		
1º Avaliação	MS-G 0.5	64.75	54.84, 74.7	A	a
	MS-G 0.25	56.05	46.14, 66.0	A	a
	BLS-G 0.5	55.77	45.86, 65.7	A	a
	BLS-G 0.25	36.26	26.34, 46.2	B	a
2º Avaliação	MS-G 0.5	10.79	0.88, 20.7	A	b
	MS-G 0.25	12.42	2.51, 22.3	A	b
	BLS-G 0.5	8.73	-1.18, 18.6	A	b
	BLS-G 0.25	4.14	-5.77, 14.0	A	b
3º Avaliação	MS-G 0.5	23.89	13.97, 33.8	A	b
	MS-G 0.25	1.73	-8.18, 11.6	B	b
	BLS-G 0.5	18.84	8.92, 28.8	AB	b
	BLS-G 0.25	7.12	-2.79, 17.0	AB	b

(\*)Médias (n= 8) na mesma coluna seguido de diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes entre os grupos de tratamento, dentro do mesmo período de avaliação. Médias (n = 8) na mesma coluna seguido de diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes comparando o mesmo grupo de tratamento entre os períodos de avaliação. Comparações múltiplas foram realizadas com teste de HSD tukey em  $P < 0,05$ . (\*\*) Nível de confiança.



**Figure 6** - Probabilidade de sobrevivência de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* ao longo dos dias, após a exposição ao solo tratado com diferentes doses (0,5 e 0,25 g/cm<sup>2</sup>) das formulações granulares de microscleródio (MS) e blastosporos (BLS) de *Metarhizium robertsii*. A linha tracejada indica o tempo letal mediano (50%). *P*-valor é mostrado e não é significativo em 5% de probabilidade (Teste de razão de probabilidade (LRT) = 0,88, df = 4, *P* = 0,95).

### 3.3 Persistência fúngica no solo e isolamento de *Metarhizium robertsii* das raízes de *Urochloa decumbens*

Em todos os grupos tratados com as formulações fúngicas, *Metarhizium* spp. não foi recuperado das amostras de solo e de raízes antes da aplicação, indicando a ausência desse gênero fungico no ambiente experimental testado. No entanto, após a aplicação dos grânulos fúngicos nos potes, foi possível recuperar o isolado IP-146 do solo de todos os grupos fúngicos tratados ao longo do período experimental (Figura 7). Como não houve recuperação de *Metarhizium* spp. das amostras de solo do grupo controle, não tratado durante todo o experimento, isso indica que *M. robertsii* foi a única espécie recuperada das amostras do solo após o tratamento com as formulações fúngicas testadas.

O maior número de UFC obtidas em ambas as condições climáticas avaliadas foi na primeira amostragem do solo logo após a primeira e a segunda aplicação fúngica (dia 8 e dia 225) (Figura 7). Após a primeira aplicação fúngica, durante o verão, o maior número de UFC produzido pelos grânulos fúngicos coincidiu com as temperaturas mais altas e índice global de radiação registrado (Figura 8 A), resultando em correlação positiva. Por outro lado, o número de UFC diminuiu abruptamente como avanço do tempo (Figura 7); uma alta pluviométrica acumulada ocorreu acompanhada de altos índices de UR e o número de UFC apresentou

correlação negativa com essas duas variáveis abióticas (Figura 8 A). Da mesma forma, a persistência do IP *M. robertsii* -146 diminuiu após a segunda aplicação fúngica de todas as formulações fúngicas testadas, mas em uma tendência mais lenta em comparação com a primeira aplicação fúngica (Figura 7). A segunda aplicação fúngica foi realizada no meio do inverno do sudeste brasileiro, e foi caracterizada por dias mais frios ocorridos logo após a aplicação dos grânulos fúngicos, que também coincidiu com o alto número de UFC de *M.*

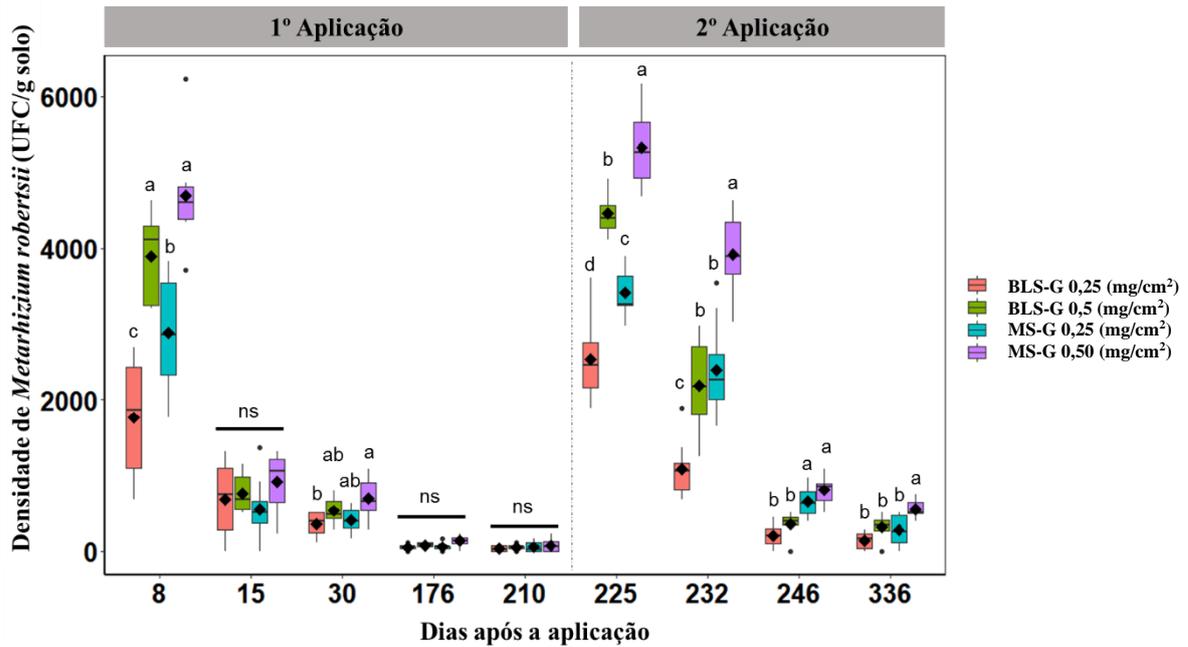
*robertsii* registrados durante o experimento (Figura 7). Aqui houve uma correlação negativa substancial entre os números da UFC e a temperatura mínima ambiental (Figura 8 B). Apesar do tempo mais frio no segundo período experimental, as temperaturas do solo medidos nos vasos de grama foram mais elevados no início da avaliação do que no final, o que resultou em uma correlação positiva com o alto número de UFC (Figura 8 B).

Durante o período experimental após a primeira aplicação fúngica (do dia 8 ao dia 210), a persistência do solo de *M. robertsii* diminuiu significativamente e variou entre as formulações fúngicas testadas. Aqui foi um efeito de interação significativo entre o tratamento e as datas de amostragem do solo sobre persistência fúngica medida pelo número de UFC ao longo do tempo ( $F_{12,140} = 6,66$ ,  $P < 0,0001$ ). Após a primeira aplicação fúngica, no dia 8, o número de UFC obtido com a maior dose de grânulos fúngicos por  $\text{cm}^2$  (MS-G 0,5 e BLS-G 0,5) superou significativamente as formulações com metade da dose (MS-G 0,25 e BLS-G 0,25). Além disso, os vasos tratados com grânulos de MS na menor dose (MS-G 0,25) apresentou significativamente mais UFC do que o grupo tratado com a taxa correspondente de grânulos de BLS (Figura 7). A persistência do solo de *M. robertsii* diminuiu significativamente 15 dias após a primeira aplicação fúngica e igualou o número de UFC em todos os grupos de tratamento (Figura 7). Na avaliação seguinte (dia 30), o tratamento MS-G 0,5 apresentou maior número de UFC no solo do que o tratamento BLS-G 0,25 ( $P = 0,0387$ ), mesmo com as UFC em declínio. Os tratamentos BLS-G 0,5 e MS-G 0,25 apresentaram números semelhantes de UFC e não diferiram dos outros tratamentos. Na quarta (dia 176) e quinta (dia 210) amostragem do solo, o número de UFC por grama de solo em todos os grupos de tratamento diminuiu significativamente em relação às amostras anteriores do solo, mas foi estatisticamente semelhante entre esses dois pontos amostrais (Figura 7).

Da mesma forma, durante o período experimental seguinte, após a segunda aplicação fúngica (do dia 225 ao dia 336), a persistência do solo de *M. robertsii* em vasos de grama diminuiu progressivamente em diferentes graus entre as formulações fúngicas, havendo um efeito de interação significativo entre as aplicações e as datas de amostragem do solo em relação à persistência fúngica no solo ( $F_{9,112} = 24,47$ ,  $P < 0,0001$ ).

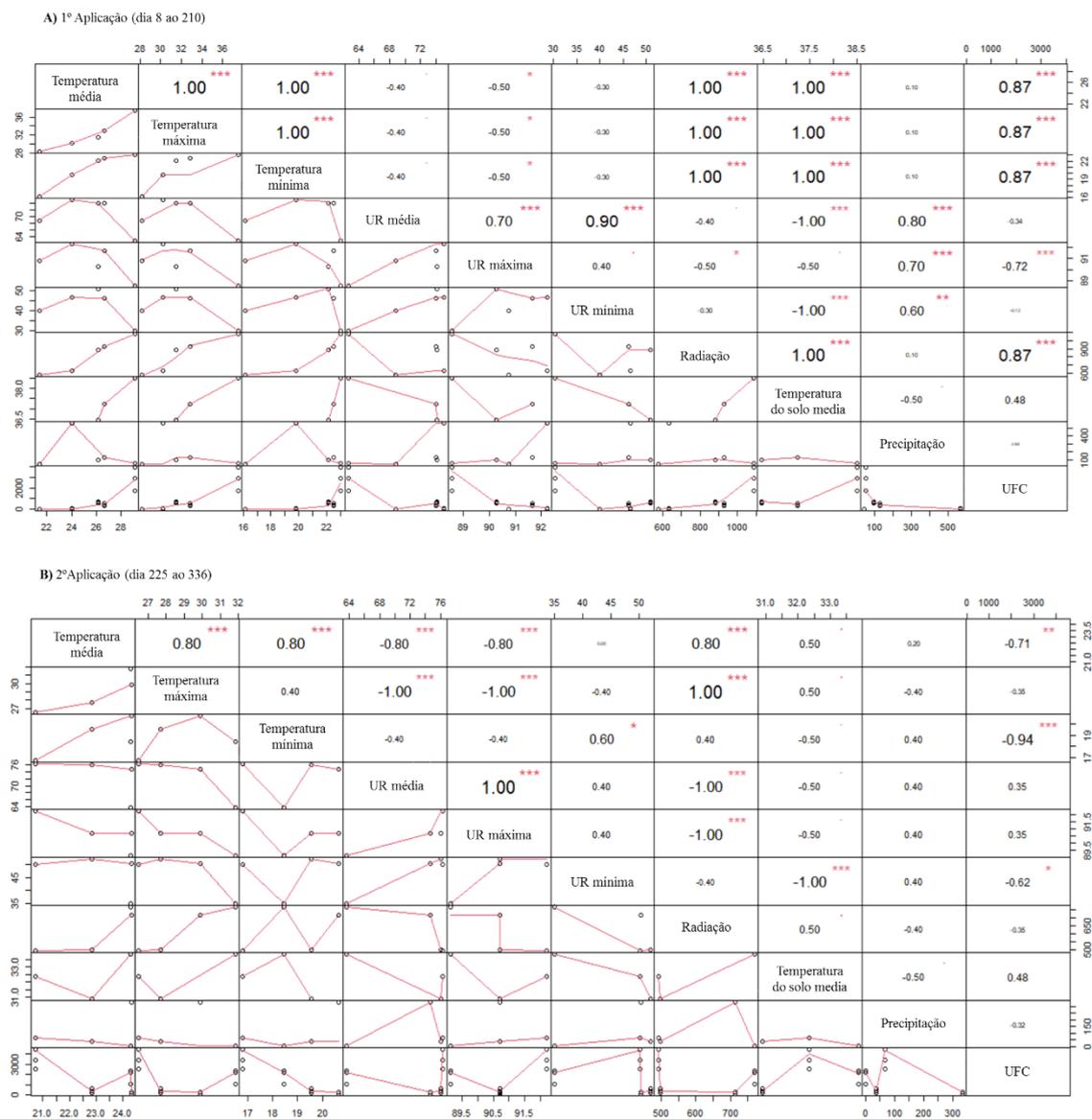
No dia 225, sete dias após a segunda aplicação fúngica, o maior número de UFC foi alcançada com a maior dose de grânulos testados (MS-G 0,5 e BLS-G 0,5), seguida pelo tratamento com MS-G 0,25, que tinha mais *M. robertsii* isolado do solo do que o grupo BLS-G 0,25 (figura 7). No dia 232, o grupo MS-G 0,5 apresentou mais UFC de *M. robertsii* no solo do que os grupos MS-0,25 ( $P = 0,0005$ ), BLS-G 0,5 ( $P = 0,0001$ ) ou BLS-G 0,25 ( $P = 0,0001$ ). Os grupos BLS-G 0,5 e o MS-G 0,25 produziram CFUs semelhantes por grama de solo apresentaram significativamente mais *M. robertsii* do que o grupo tratado com BLS-G 0,25,  $P = 0,0023$  e  $P = 0,0012$ , respectivamente. Na coleta de solo seguinte (dia 246), as UFC foram mais numerosas nos vasos tratada com grânulos de MS do que naqueles tratados com formulação granular de BLS; o grupo MS-G 0,25 foi significativamente diferente do BLS-G 0,25 ( $P = 0,0006$ ) e BLS-G 0,5 ( $P = 0,0250$ ), bem como o tratamento MS-G 0,5 apresentou mais UFC/g de solo do que BLS-G 0,25 ( $P = 0,0001$ ) e BLS-G 0,5 ( $P = 0,0001$ ). Na última avaliação (dia 336), mais uma vez o grupo MS-G 0,5 apresentou significativamente mais UFC do que os grupos MS-0,25 ( $P = 0,0165$ ), BLS-G 0,5 ( $P = 0,0154$ ) e BLS-G 0,25 ( $P = 0,0001$ ), que não diferiu um do outro (Figura 7).

Em relação à recuperação de *M. robertsii* das raízes *U. decumbens* como forma de medir sua capacidade de ser rizosfera copetente, amostras dos grupos tratados coletados após a primeira aplicação fúngica (dia 30) não tiveram crescimento fúngico detectado em raízes esterilizadas pela superfície, inclusive nas amostras de plantas de controle. Embora *M. robertsii* tenha sido recuperado das raízes *U. decumbens* somente após a segunda aplicação fúngica e no final do experimento (dia 336), nenhum *Metarhizium* spp. foi recuperado de raízes nos potes de controle.

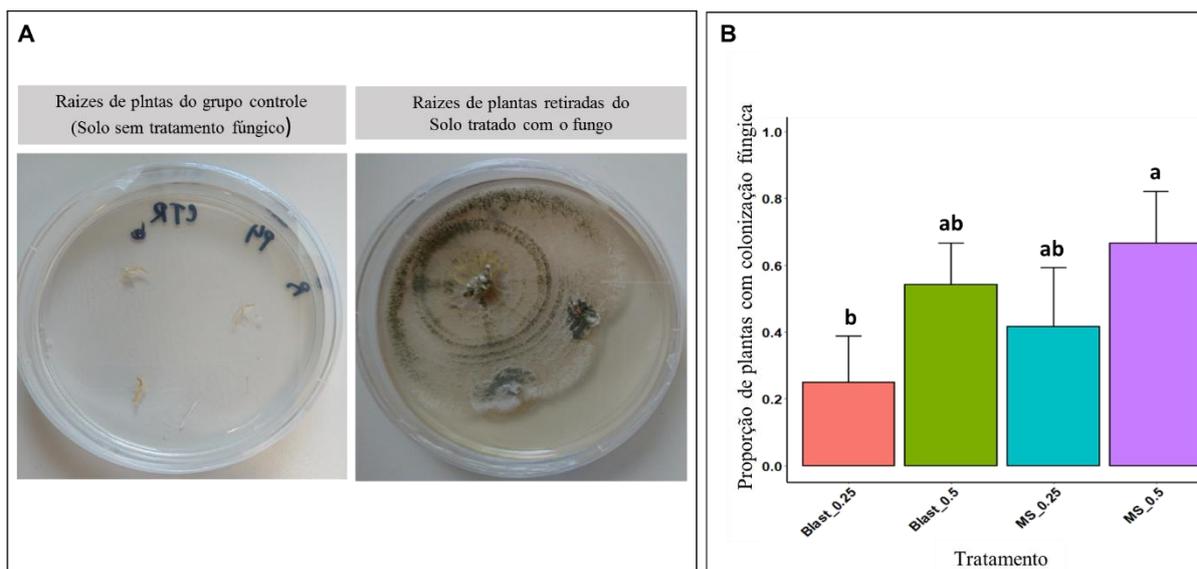


**Figura 7** - Persistência fúngica no solo de vasos tratados com formulações granulares de *M. robertsii*. Box plot de unidades formadoras de colônias (UFC) de *M. robertsii* por grama de solo obtido após a 1ª e 2ª aplicação dos grânulos no solo em condições seminaturais. As caixas mostram a mediana, 25º e 75º percentis, enquanto as barras de erro mostram 10º e 90º percentis. As médias (n = 8) são losangos negros e seguidos por letras distintas que indicam diferença significativa entre os tratamentos (teste Tukey HSD P < 0,05). BLS-G: formulação granular de blastosporos; MS-G: formulação granular de microescleródios.

A única diferença notável na proporção de plantas com *M. robertsii* foi detectada após a aplicação da maior dose de grânulos de MS (MS-G 0,5 g/cm<sup>2</sup>) que resultou em 66,7 ± 9,6% (média ± SE) das plantas com raízes colonizadas, e isso foi significativamente maior do que o tratamento com BLS-G 0,25 g/cm<sup>2</sup>, que alcançou apenas 25,0 ± 8,8% de plantas positivas para a colonização radicular ( $\chi^2_3 = 9,46$ ,  $P = 0,0238$ ). Os tratamentos fúngicos BLS-G 0,5 e MS-G 0,25 não diferem em seu sucesso de colonização da raiz em relação aos outros tratamentos, e sua incidência variou de 41,7 a 54,2% (Figura 9).



**Figura 8** - A correlação de Spearman entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) /g solo e variáveis abióticas, incluindo temperaturas, umidade relativa, temperatura do solo e radiação solar durante o curso de tempo experimental. A) Correlação de dados após a primeira aplicação de formulações fúngicas (dia 8 ao dia 210). B) Correlação de dados após a segunda aplicação de formulações fúngicas (dia 225 ao dia 336).



**Figure 9** – A. Raízes de *Urochluia decumbens* não colonizadas (esquerda) e colonizadas (direita) por *Metarhizium robertsii*, providas de solo tratado com formulações granulares de blastosporos e microescleródios deste entomopatógeno. B. Taxa de sucesso na colonização radicular no final do experimento (dia 336) após o tratamento do solo com microescleródio (MS) ou blastosporos (BLS) de *M. robertsii* em formulações granulares e aplicada em duas doses (0,5 e 0,25 g/cm<sup>2</sup>). O grupo controle não tinha colonização radicular por nenhuma espécie de *Metarhizium* nativo.

#### 4 DISCUSSÃO

Existe na literatura diversos estudos que apontam os gêneros fúngicos *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. como agentes capazes de controlar carrapatos, e além disso, muitos trabalhos destacam a importância do desenvolvimento de tecnologias de formulação, que possam melhorar a eficácia, a persistência no meio ambiente e a facilidade de aplicação pelos pecuaristas (BEYS-DA-SILVA; ROSA; BERGER; COUTINHO-RODRIGUES *et al.*, 2020; FERNANDES; BITTENCOURT; ROBERTS, 2012; MASCARIN; LOPES; DELALIBERA; FERNANDES *et al.*, 2019; SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2004). O presente estudo apresenta resultados nessa linha de investigação, demonstrando pela primeira vez a eficácia e persistência de formulações granulares com microescleródios e blastosporos, de *M. robertsii* para controle de *R. microplus* em fase não parasitária, por meio de estudo em condições de semi-campo.

A composição da formulação granular desenvolvida, que basicamente possui uma matriz carreadora de baixo custo, possibilitou o desenvolvimento e a alta viabilidade de conídios providos dos MS e BLS contidos nelas, mostrando-se mais promissora que grânulos de alginato de cálcio relatados anteriormente para o encapsulamento de blastosporos de *M. pemphigi*, nos quais BLS não sobreviveram ao processo de secagem dos grânulos e não esporularam ao serem reidratados (LORENZ; HUMBERT; PATEL, 2020), diferentemente das formulações aqui estudadas. No entanto, ao buscar compreender como os fatores bióticos e abióticos poderiam afetar a germinação e esporulação dos grânulos fúngicos, foi possível notar que a germinação miceliogênica e conidiogênica foi afetada ao expor as granulações ao solo não estéril em laboratório e também ao solo dos vasos em condições seminaturais.

O fato dos grânulos de MS e BLS terem apresentado germinação mais rápida e maior produção de conídios quando incubados em meio de ágar água, possivelmente está relacionado

ao fato deste meio de cultura fornecer condições ideais para o crescimento fúngico, especialmente por conter um microcosmo estéril e de alta umidade (JACKSON; WHIPPS; LYNCH, 1991), o que garante um microclima estável quando comparado ao solo estéril ou não estéril, principalmente com relação ao solo dos vasos, que ainda contaram com as variações climatológicas (temperatura, umidade e radiação solar) encontradas à campo, que interferem no desenvolvimento dos fungos.

Além disso, as características físico-químicas heterogêneas do solo e a presença de competidores microbianos, que fazem parte da microbiota natural do ambiente, possivelmente reduziu a germinação miceliogênica, a produção de conídios, e consequentemente o estabelecimento do isolado IP 146 no ambiente (GHINI; MORANDI, 2006; JARONSKI, 2010; PARSA; ORTIZ; GÓMEZ-JIMÉNEZ; KRAMER *et al.*, 2018; SINGH; DAWSON; MACDONALD; BUCKLAND, 2009).

O isolamento de outros fungos saprófitos (diferentes do gênero *Metarhizium*) nas placas do meio seletivo (CTC) durante a avaliação da persistência do isolado de *M. robertsii*, sugere que a competição pelo mesmo nicho ecológico entre a comunidade microbiana impactou a viabilidade e a produção de conídios pelos grânulos do IP 146, refletindo na persistência do fungo em condições menos controladas e não homogêneas. Isso é claramente confirmado pela comparação da concentração de conídios/g de solo obtida em laboratório e em condições de seminaturais na primeira coleta de solo após a aplicação do fungo.

Apesar do BLS serem consideradas estruturas ambientalmente sensíveis e menos adaptadas ao solo (BERNARDO; BARRETO; E SILVA; LUZ *et al.*, 2018) e MS serem propágulos resistentes e mais adequados para o controle de artrópodes que vivem nesse ambiente (JACKSON; JARONSKI, 2009; MASCARIN; KOBORI; DE JESUS VITAL; JACKSON *et al.*, 2014) a formulação granular de BLS aqui testada permitiu o crescimento miceliogênico e esporogênico dessa estrutura fúngica, levando a produção de um número de conídios considerável e comparável aos grânulos de MS. No entanto, em solo não estéril, grânulos de MS obtiveram um rendimento de conídios significativamente maior do que grânulos de BLS, o que sugere uma possível vantagem desse propágulo em lidar com a fungistase do solo em comparação com BLS. Este resultado também corrobora com a resiliência natural de MS de *Metarhizium* spp. à condições abióticas adversas, conforme relatado anteriormente por JARONSKI e JACKSON (2008). Apesar disso, já foi observado que dependendo do isolado de *Metarhizium* spp., BLS pode ser mais tolerante a UV-B do que outros propágulos (CORVAL; MESQUITA; CORRÊA; SILVA *et al.*). Com base nisso a produção de BLS ainda é interessante para ser utilizado em formulações granulares, considerando seu rendimento de produção na fermentação líquida (IWANICKI; PEREIRA; BOTELHO; REZENDE *et al.*, 2019; JACKSON; JARONSKI, 2009), mas futuras investigações são necessárias para validar a eficiência de grânulos desse propágulo.

O experimento em condições seminaturais revelou um declínio significativo na persistência de fungos no solo ao longo do tempo, um comportamento esperado para fungos entomopatogênicos aplicados no ambiente, e que também é desejado em processos regulatórios, pois assim atingem níveis basais seguros após a aplicação (SCHEEPMAKER; BUTT, 2010). Esse fenômeno é provavelmente influenciado por fatores intrínsecos, edáficos, bióticos, culturais e climáticos (SCHEEPMAKER; BUTT, 2010). Diversas variáveis climáticas foram registradas ao longo do teste, e foi observado que as duas estações no ano, em que ocorreram as aplicações de fungos, divergiram notavelmente em termos de persistência e eficácia contra o carrapato bovino. Altas temperaturas combinadas com alta incidência de chuvas marcaram o período após a primeira aplicação do fungo, enquanto após a segunda aplicação, as temperaturas foram amenas juntamente com a redução da precipitação esperada para o sudeste do Brasil durante o verão e inverno, respectivamente.

O fungo apresentou maior persistência durante o período chuvoso, que garantiu a umidade do solo adequada para seu desenvolvimento, mesmo sob alta radiação solar global, um dos principais fatores ambientais deletérios à sobrevivência de fungos entomopatogênicos no meio ambiente (FERNANDES; RANGEL; BRAGA; ROBERTS, 2015). Como os vasos estavam preenchidos com *U. decumbens*, a vegetação possivelmente bloqueou a radiação solar direta sobre aos grânulos depositados na superfície do solo, funcionando como um tampão e impedindo mudanças extremas no microclima, logo favorecendo a ação patogênica de *M. robertsii* (SAMISH; ROT; MENT; BAREL et al., 2014). A correlação positiva dos níveis de fungo no solo com os maiores valores de temperatura, bem como a correlação negativa com a umidade relativa e a precipitação acumulada ocorreram devido ao período de transição do verão para o outono, em que os dias imediatamente após a aplicação do fungo e com a maior produção de conídios não coincidiu com os fatores climáticos registrados. Após a segunda aplicação do fungo, as temperaturas e precipitação foram mais baixas, a falta de chuva tornou o solo mais seco e possivelmente impediu a germinação dos propágulos (MS e BLA) afetando o desempenho do fungo. Uma vez que o teor de umidade influencia a esporulação dos grânulos e interfere na sobrevivência dos conídios (EKESI; MANIANIA; LUX, 2003; ZHANG; LEI; REITZ; WU et al., 2019), impactando também no processo de infecção do fungo no artrópode hospedeiro (JARONSKI, 2010; MUNIZ; PAIXÃO; BARRETO; LUZ et al., 2020). Interpretações semelhantes em relação à correlação entre a densidade do fungo e os fatores climáticos também devem ser considerados na segunda aplicação do fungo. Observamos uma correlação negativa entre a densidade das UFC e a temperatura pelo fato dos grânulos dos fungos produzirem mais conídios logo após a aplicação, mas a persistência dos fungos diminuiu substancialmente na transição do inverno para a primavera (condições mais quentes e úmidas), momento em que os conídios produzidos estavam desprotegidos sobre o solo.

Apesar do decréscimo do número de UFC no solo, após as aplicações, foi possível isolar *M. robertsii* das raízes das forrageira em todos os tratamentos fúngicos após as duas aplicações fúngicas, 336 dias da primeira aplicação. Esse destino de *Metarhizium* spp. para regiões mais profundas e próximas às raízes, após a diminuição da densidade do inóculo na superfície do solo, já foi relatado por estudos anteriores (BRUCK, 2010; YANG; QIN; CHEN; ZHANG et al., 2018). Nas camadas mais profundas do solo, a longevidade do fungo também está relacionada à capacidade desse microrganismo em estabelecer relações benéficas com a rizosfera da planta (LIAO; O'BRIEN; FANG; ST. LEGER, 2014). Este achado corrobora com outros que indicam que há uma tendência do fungo migrar das partes mais superficiais para camadas mais profundas e mais próximas do sistema radicular após a aplicação no solo, sugerindo que *M. robertsii* (IP 146) muda o estilo de vida de patógeno para endófito para tentar sobreviver e persistir no solo. Os resultados evidenciaram que os grânulos fúngicos permitem não apenas a colonização superficial do solo, mas também em camadas mais profundas ocupadas pela rizosfera da planta, estendendo a persistência do fungo em ecossistemas agrícolas, conforme documentado anteriormente por BARELLI; WALLER; BEHIE e BIDOCHKA (2020) sendo *M. robertsii* um colonizador preferencial de pastagens e terras aráveis, possivelmente devido à sua ampla habilidade de adaptação a esse nicho ecológico (BIDOCHKA; KAMP; LAVENDER; DEKONING et al., 2001).

Além de permitir a germinação dos MS e dos BLS, garantindo a dispersão do fungo frente dos desafios ambientais, as formulações granulares proporcionaram um nível notável de controle de carrapatos após a primeira aplicação do fungo, quando os tratamentos com MS-G 0,5, MS-G 0,25 e BLS-G 0,5 mg/cm<sup>2</sup> reduziram mais de 50% das larvas de carrapato durante a estação mais quente e úmida. Em contraste, uma resposta mais fraca foi observada com BLS-G 0,25 mg/cm<sup>2</sup>, possivelmente devido à menor resiliência do BLS associada à sua baixa dose aplicada, que não rendeu a quantidade adequada de conídios para reduzir a densidade do carrapato. Uma possível estratégia para melhorar o rendimento de conídios em solos naturais

diz respeito ao aumento da biomassa fúngica utilizada como ingrediente ativo na formulação encapsulada (CLIFTON; GARDESCU; BEHLE; HAJEK, 2019).

Outra observação importante que deve ser considerada diz respeito à atividade residual da primeira aplicação das formulações fúngicas, quando uma nova geração de carrapatos foi introduzida nos vasos, sem reaplicar os grânulos. Nesta segunda geração de carrapatos a eficácia do controle não se repetiu, sendo considerada insuficiente e indicando a necessidade da reaplicação, no entanto tal resultado é interessante para prospectar futuros protocolos de controle. Ao realizar a segunda aplicação do fungo, outra baixa eficácia foi observada, mesmo com temperatura e radiação mais baixas, consideradas favoráveis ao entomopatógeno fúngico. Quanto a isso, sugere-se que, as escassas chuvas no inverno podem ter diminuído a umidade do ambiente, alterando o microclima do solo e afetando o sucesso da infecção fúngica em carrapatos. como já discutido anteriormente a respeito da influência da umidade sobre a patogenicidade fungica (JARONSKI, 2010; MUNIZ; PAIXÃO; BARRETO; LUZ *et al.*, 2020).

Embora *M. robertsii* não tenha sido reisolado de cadáveres de carrapatos devido ao crescimento excessivo de fungos sapróbios oportunistas, a redução de larvas de grupos tratados com fungos é presumida por infecção subletal de fêmeas que possivelmente reduziu sua produção de ovos; essa baixa produção de ovos por fêmeas *R. microplus* infectadas com *Metarhizium* é sustentada por diversos autores (BERNARDO; BARRETO; E SILVA; LUZ *et al.*, 2018; CAMARGO; GOLO; ANGELO; PERINOTTO *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ - SALAS; ALONSO-DÍAZ; ALONSO-MORALES; LEZAMA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; MESQUITA; MARCIANO; CORVAL; FIOROTTI *et al.*, 2020; PERINOTTO; ANGELO; GOLO; QUINELATO *et al.*, 2012). Além disso acredita-se que o fungo pode ter infectado ovos e larvas, que são fases da vida mais suscetíveis do que os carrapatos adultos (GINDIN; SAMISH; ZANGI; MISHOUTCHENKO *et al.*, 2002). Com relação à aplicação de *Metarhizium* spp. em ambientes de pastagem e seu controle de *R. microplus*, bem como de outras espécies de carrapatos, os resultados aqui relatados corroboram estudos anteriores (BEHLE; JACKSON; FLOR-WEILER, 2013; GINDIN; SAMISH; ZANGI; MISHOUTCHENKO *et al.*, 2002; MARCIANO; GOLO; COUTINHO-RODRIGUES; CAMARGO *et al.*, 2020; MESQUITA; MARCIANO; CORVAL; FIOROTTI *et al.*, 2020; OJEDA-CHI; RODRIGUEZ-VIVAS; GALINDO-VELASCO; LEZAMA-GUTIÉRREZ, 2010; WASSERMANN; SELZER; STEIDLE; MACKENSTEDT, 2016) que também mostraram relativo sucesso no controle desta fase não parasitária desta espécie de carrapato bovino.

Os resultados destacam a estratégia inovadora de usar biofórmulas granulares secas através do encapsulamento de BLS ou MS de *M. robertsii* com o objetivo de suprimir a carga de *R. microplus* na pastagem, e também revela a persistência desse fungo no ambiente através da colonização das raízes de gramíneas. Os resultados aqui apresentados avançam o conhecimento sobre novas formas estratégicas de baixo custo para a aplicação de BLS no solo e também expande a utilidade dos grânulos de MS como ferramentas alternativas para acaricidas químicos, no intuito de impedir o avanço da resistência à acaricida. Esta tecnologia de formulação pode ser facilmente ampliada para produzir propágulos fúngicos industrialmente, por terem ingredientes baratos na formulação, que podem contribuir para sua produção massiva e ampla aplicação em biopesticidas comerciais que visam pragas artrópodes que vivem no solo. Os desafios futuros a serem enfrentados poderiam se concentrar na persistência prolongada do fungo após a aplicação e doses mais baixas de grânulos (<25 kg/ha) aplicadas ao solo.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMEK, L. SUBMERSE CULTIVATION OF THE FUNGUS METARRHIZIUM ANISOPLIAE (METSCH.). **Folia microbiologica**, 10, p. 255-257, 1965/07// 1965.
- BARELLI, L.; WALLER, A. S.; BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Plant microbiome analysis after Metarhizium amendment reveals increases in abundance of plant growth-promoting organisms and maintenance of disease-suppressive soil. **PLOS ONE**, 15, n. 4, p. e0231150, 2020.
- BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A.; FLOR-WEILER, L. B. Efficacy of a Granular Formulation Containing Metarhizium brunneum F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) Microsclerotia Against Nymphs of Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae). **Journal of Economic Entomology**, 106, n. 1, p. 57-63, 2013.
- BERNARDO, C. C.; BARRETO, L. P.; E SILVA, C. d. S. R.; LUZ, C. *et al.* Conidia and blastospores of Metarhizium spp. and Beauveria bassiana s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick Rhipicephalus microplus. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 9, n. 5, p. 1334-1342, 2018/07/01/ 2018.
- BEYS-DA-SILVA, W. O.; ROSA, R. L.; BERGER, M.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B. *et al.* Updating the application of Metarhizium anisopliae to control cattle tick Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, 208, p. 107812, 2020/01/01/ 2020.
- BIDOCHKA, M. J.; KAMP, A. M.; LAVENDER, T. M.; DEKONING, J. *et al.* Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect-Pathogenic Fungus Metarhizium anisopliae: Uncovering Cryptic Species? **Applied and Environmental Microbiology**, 67, n. 3, p. 1335-1342, 2001.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. A multilocus phylogeny of the Metarhizium anisopliae lineage. **Mycologia**, 101, n. 4, p. 512-530, 2009/07/01 2009.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; BAHIESE, T. C.; FERNANDES, E. K. K.; E.J., S. Avaliação da ação in vivo de Metarhizium anisopliae (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre Brachiaria decumbens infestada com larvas de Boophilus microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 12, p. 38-42, 2003.
- BROOKS, M. E.; KRISTENSEN, K.; VAN BENTHEM, K. J.; MAGNUSSON, A. *et al.* glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. **The R Journal**, 9, p. 400, 2017.
- BRUCK, D. J. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *In*: ROY, H. E.; VEGA, F. E., *et al.* (Ed.). **The Ecology of Fungal Entomopathogens**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 103-112.

CAMARGO, M. G.; GOLO, P. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S. *et al.* Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, 188, n. 1, p. 140-147, 2012/08/13/ 2012.

CLIFTON, E. H.; GARDESCU, S.; BEHLE, R. W.; HAJEK, A. E. Asian longhorned beetle bioassays to evaluate formulation and dose-response effects of *Metarhizium microsclerotia*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 163, p. 64-66, 2019/05/01/ 2019.

CORVAL, A. R. C.; MESQUITA, E.; CORRÊA, T. A.; SILVA, C. d. S. R. *et al.* UV-B tolerances of conidia, blastospores, and microsclerotia of *Metarhizium* spp. entomopathogenic fungi. n/a, n. n/a.

EKESI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. **Journal of Invertebrate Pathology**, 83, n. 2, p. 157-167, 2003/06/01/ 2003.

FARIA, M. R. d.; WRIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, 43, n. 3, p. 237-256, 2007/12/01/ 2007.

FERNANDES, É. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, R. N. *et al.* CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, 54, n. 3, p. 197-205, 2010/09/01/ 2010.

FETROW, J.; CADY, R.; JONES, G. Dairy Production Medicine in the United States. Retrieved from the **University of Minnesota Digital Conservancy**, 38, p. 57-64, 2004/06/18 2005.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, 130, n. 3, p. 300-305, 2012/03/01/ 2012.

FERNANDES, É. K. K.; RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; ROBERTS, D. W. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. **Current Genetics**, 61, n. 3, p. 427-440, 2015/08/01 2015.

FERNÁNDEZ -SALAS, A.; ALONSO-DÍAZ, M. A.; ALONSO-MORALES, R. A.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. *et al.* Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. 31, n. 1, p. 36-43, 2017.

GHINI, R.; MORANDI, M. A. B. Biotic and abiotic factors associated with soil suppressiveness to *Rhizoctonia solani* %J Scientia Agricola. 63, p. 153-160, 2006.

GINDIN, G.; SAMISH, M.; ZANGI, G.; MISHOUTCHENKO, A. *et al.* The Susceptibility of Different Species and Stages of Ticks to Entomopathogenic Fungi. **Experimental & Applied Acarology**, 28, n. 1, p. 283-288, 2002/05/01 2002.

HUMBER, R. A. Chapter VI - Identification of entomopathogenic fungi. *In*: LACEY, L. A. (Ed.). **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2012. p. 151-187.

IWANICKI, N. S. A.; PEREIRA, A. A.; BOTELHO, A. B. R. Z.; REZENDE, J. M. *et al.* Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp in insects, soil and sugarcane roots. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 4443, 2019/03/14 2019.

JACKSON, A. M.; WHIPPS, J. M.; LYNCH, J. M. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 7, n. 4, p. 494-501, 1991/07/01 1991.

JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological Research**, 113, n. 8, p. 842-850, 2009/08/01/ 2009.

JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, 55, n. 1, p. 129-145, 2010/02/01 2010.

JARONSKI, S. T. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. **BioControl**, 55, n. 1, p. 159-185, 2010/02/01 2010.

JARONSKI, S. T.; JACKSON, M. A. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. **Biocontrol Science and Technology**, 18, n. 8, p. 849-863, 2008/10/01 2008.

LIAO, X.; O'BRIEN, T. R.; FANG, W.; ST. LEGER, R. J. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98, n. 16, p. 7089-7096, 2014/08/01 2014.

LORENZ, S.-C.; HUMBERT, P.; PATEL, A. V. Chitin increases drying survival of encapsulated *Metarhizium pempighi* blastospores for *Ixodes ricinus* control. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 11, n. 6, p. 101537, 2020/11/01/ 2020.

MARCIANO, A. F.; GOLO, P. S.; COUTINHO-RODRIGUES, C. J. B.; CAMARGO, M. G. *et al.* *Metarhizium anisopliae* sensu lato (s.l.) oil-in-water emulsions drastically reduced *Rhipicephalus microplus* larvae outbreak population on artificially infested grass. **Medical and Veterinary Entomology**, n/a, n. n/a, 2020/04/15 2020.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32, n. 11, p. 177, 2016/09/15 2016.

MASCARIN, G. M.; KOBORI, N. N.; DE JESUS VITAL, R. C.; JACKSON, M. A. *et al.* Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30, n. 5, p. 1583-1590, 2014/05/01 2014.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA, Í.; FERNANDES, É. K. K. *et al.* Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 165, p. 46-53, 2019/07/01/ 2019.

MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Non-parasitic life cycle of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Panicum maximum* pastures in northern Argentina. **Research in Veterinary Science**, 115, p. 138-145, 2017/12/01/ 2017.

MESQUITA, E.; MARCIANO, A. F.; CORVAL, A. R. C.; FIOROTTI, J. *et al.* Efficacy of a native isolate of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against larval tick outbreaks under semifield conditions. **BioControl**, 2020/03/02 2020.

MUNIZ, E. R.; PAIXÃO, F. R. S.; BARRETO, L. P.; LUZ, C. *et al.* Efficacy of *Metarhizium anisopliae* conidia in oil-in-water emulsion against the tick *Rhipicephalus microplus* under heat and dry conditions. **BioControl**, 65, n. 3, p. 339-351, 2020/06/01 2020.

NCHU, F.; MANIANIA, N. K.; HASSANALI, A.; ELOFF, J. N. Performance of a *Metarhizium anisopliae*-treated semiochemical-baited trap in reducing *Amblyomma variegatum* populations in the field. **Veterinary Parasitology**, 169, n. 3, p. 367-372, 2010/05/11/ 2010.

OJEDA-CHI, M. M.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; GALINDO-VELASCO, E.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, 170, n. 3, p. 348-354, 2010/06/24/ 2010.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, M. I.; KRAMER, M. *et al.* Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Biological Control**, 116, p. 74-81, 2018/01/01/ 2018.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F. E. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 74, p. 50360, 2013.

PERINOTTO, W. M. S.; ANGELO, I. C.; GOLO, P. S.; QUINELATO, S. *et al.* Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. **Experimental Parasitology**, 130, n. 3, p. 257-260, 2012/03/01/ 2012.

PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D. *et al.* nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. **R package version 3.1-149**, 2020.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Versão 4.0.2. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020.

RUSSELL, L. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. **R package version 1.4.8**, 2020.

TERRY, M. T. A Package for Survival Analysis in R. **R package version 3.2-3**, 2020.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, 129, n. S1, p. S389-S403, 2004.

SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S. *et al.* Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology**, 206, n. 3, p. 258-266, 2014/12/15/ 2014.

SCHEEPMAKER, J. W. A.; BUTT, T. M. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. **Biocontrol Science and Technology**, 20, n. 5, p. 503-552, 2010/01/01 2010.

SINGH, B. K.; DAWSON, L. A.; MACDONALD, C. A.; BUCKLAND, S. M. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. **Applied Soil Ecology**, 41, n. 3, p. 239-248, 2009/03/01/ 2009.

VEGA, F. E.; GOETTEL, M. S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D. *et al.* Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, 2, n. 4, p. 149-159, 2009/11/01/ 2009.

WASSERMANN, M.; SELZER, P.; STEIDLE, J. L. M.; MACKENSTEDT, U. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 7, n. 5, p. 768-771, 2016/07/01/ 2016.

YANG, H.; QIN, C.-s.; CHEN, Y.-m.; ZHANG, G.-y. *et al.* Persistence of *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) in Tobacco Soils and Potential as Biocontrol Agents of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, 48, n. 1, p. 147-155, 2018.

ZHANG, X.; LEI, Z.; REITZ, S. R.; WU, S. *et al.* Laboratory and Greenhouse Evaluation of a Granular Formulation of *Beauveria bassiana* for Control of Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis*. **Insects**, 10, n. 2, p. 58, 2019.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

- 1- Todos os isolados de *Metarhizium* spp. originários do Kwantlen's Institute for Sustainable Horticulture (ISH) – Canada foram capazes de colonizarem os tecidos (folha, caule e raiz) de plantas de feijão mungo (*Vigna radiata*).
- 2- Os isolados ISH apresentaram variação quanto a tolerância ao calor e o ensaio permitiu selecionar os que mantiveram germinação  $\geq 70\%$  como mais indicados para uma futura aplicação em ambientes, que foram o isolado ISH 262 e ISH 258.
- 3- A temperatura de 5 °C impediu a atividade vegetativa dos isolados ISH e exposição ao frio não inviabilizou a germinação fúngica quando estes foram expostos a condições ideais de temperatura e umidade.
- 4- A expressão do gene *mad2* nos conídios do o isolado ISH-90 de *Metarhizium anisopliae* s.l. foi menor quando o fungo foi cultivado em meio BDA, comparado com conídios crescidos sobre o tecido vegetal. No cultivo em meio mínimo, a expressão do gene foi significativamente maior do que nos outros substratos testados (BDA e planta).
- 5- O exsudato produzido pelo isolado CG148 de *M. anisopliae* s.l. afetou os parâmetros biológicos de fêmeas do *Rhipicephalus microplus*, reduziu a quantidade de hemócitos circulantes na hemocele e causou significativa mortalidade do carrapato.
- 6- O exsudato produzido pelo isolado CG148 de *M. anisopliae* s.l. afetou o desenvolvimento das bactérias do solo e teve atividade antimicrobiana sobre as cepas sensíveis e resistentes de *Staphylococcus aureus*, bem como sobre a cepa sensível de *Escherichia coli*.
- 7- Os grânulos contendo microescleródios ou blastosporos do isolado IP 146 de *Metarhizium robertsii* apresentaram produção de conídios sob condições seminaturais. O tratamento do ambiente, com as formulações granulares, obteve maior eficácia de controle do carrapato *R. microplus* no período de maior precipitação do ano e os conídios persistiram no solo temporariamente, sendo capazes de colonizar a rizosfera da forrageira *Urochloa decumbens*.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese abordou diferentes aspectos relacionados a prospecção de isolados de *Metarhizium* spp. para o mercado agrícola, pecuário e até mesmo farmacêutico. Estudos investigativos como os apresentados nesses três capítulos é de grande valia frente a crescente resistência, das pragas agrícolas e de importância veterinária, às moléculas químicas. Para solucionar esse problema, é importante conhecer a fundo os inimigos naturais dessas pragas e criar ferramentas eficazes e menos agressivas ao meio ambiente, garantindo a produção de alimentos e a promoção da saúde ambiental, humana e animal.

Alguns dos resultados aqui descritos, trazem grande inovações e ineditismo, exemplos destes são os dados relacionados a capacidade de isolados de *Metarhizium* spp. em colonizar tecidos de plantas, tema que ainda gera muita discussão e divergência na literatura global; a descoberta que o exsudato fúngico pode ser uma possível fonte acaricida e antibiótica trás novos horizontes quanto a utilização deste gênero fúngico; e sem dúvida, as formulações granulares testadas, mostraram-se promissoras em controlar o carrapato, inovando e viabilizando o controle desse artrópode em sua área de maior ocorrência, as pastagens, principalmente por serem de fácil aplicação, por utilizarem uma matéria prima de baixo custo e terem como ingrediente ativo propágulos de fácil produção massal.

Baseado no presente estudo outras pesquisas poderão ser realizadas, buscando conhecer ainda mais a relação *Metarhizium* spp, plantas e artrópodes, assim como os mecanismos moleculares envolvidos, que poderão auxiliar na seleção e produção desse agente biológico. Além disso, a investigação sobre a composição do exsudato fúngico poderá ser realizada, uma vez que esse líquido se mostrou uma rica fonte de metabólitos acaricidas e antibióticos. Por último, também se faz necessário mais estudos para potencializar a formulação granular testada, a fim de se alcançar maior esporulação, persistências no solo e eficiência, garantindo a boa performance em futuros testes à campo.