

ESTUDOS GENÉTICOS NO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

Metarhizium anisopliae var *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

JOÃO ALENCAR PAMPHILE

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA

ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

DEZEMBRO - 1992

ESTUDOS GENÉTICOS NO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

Metarhizium anisopliae var *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

JOÃO ALENCAR PAMPHILE

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
DEZEMBRO - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Pamphile, João Alencar
P214e Estudos genéticos no fungo entomopatogênico
Metarhizium anisopliae var *anisopliae* (METSCH.)
Sorokin. Piracicaba, 1992.
105p.
Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.
1. Fungo entomopatogênico - Genética I. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.24

ESTUDOS GENÉTICOS NO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

Metarhizium anisopliae var *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

JOÃO ALENCAR PAMPHILE

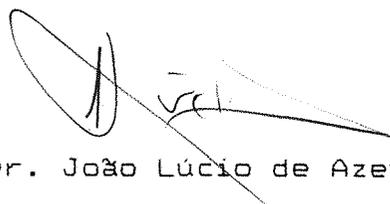
Aprovada em 02/02/93

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo ESALQ/USP

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner ESALQ/USP

Profa. Dra. Elza Machado Menezes UFRRJ



Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Orientador

Aos meus pais, GEORGE WILBERFORCER PAMPHILE

In memoriam e ADELYR TEIXEIRA PAMPHILE

DEDICO

Aos meus irmãos, Carla, Elizabeth,
George, Marta, Paulo e Ronald e aos
meus sobrinhos William, Jéssica,
Rodrigo e Bruno.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

Ao Prof. João Lúcio de Azevedo, exemplo maior de cientista, mestre e ser humano, pela amizade, orientação e apoio constantes. Por ter feito do meu mestrado uma excepcional viagem pelo orbe da ciência e do conhecimento.

À Prof.^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, pela amizade, estímulo e facilidades concedidas.

À Prof.^a Elza Machado Menezes, quem me iniciou na ciência, pela amizade, estímulo, e apoio constantes. Por ter primeiro me mostrado o quanto é bela a Genética de microrganismos.

Ao Prof. Cláudio Costa, pela grande amizade, pelas sugestões na elaboração do manuscrito. Por ter sido meu irmão em Piracicaba.

Ao Prof. Eduardo Bagagli, pelas linhagens que me foram cedidas gentilmente, pelas discussões bastante proveitosas sobre o *Metarhizium anisopliae*.

À Marisa Vieira de Queiroz, por existir e ser a amiga insubstituível que é. Pelas dicas e sugestões no meu trabalho que foram fundamentais para a realização do mesmo. Pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao José Odair Pereira, cuja excelente convivência no laboratório foi muito importante para a plena realização das atividades de pesquisa, pelos incentivos nas horas difíceis e sugestões proveitosas. Pela amizade.

À Sonia Lopes, minha primeira grande amiga em Piracicaba.

À Vanessa Kava-Cordeiro, pela grandiosa amizade, sugestões e apoio nos momentos difíceis.

À Isabel Cristina, pela amizade e auxílio na execução das eletroforeses de esterases.

Ao Adunias e ao Augusto, pelo auxílio na elaboração das curvas de regressão. Ao Sérgio pela plotagem dos gráficos.

À Gilda, pela amizade e pela gentileza de permitir que eu usasse o seu computador e periféricos na elaboração do original desta tese.

À Iara Fino Silva, pela revisão do original da dissertação.

À Adriana C. Longo, pela amizade e pela revisão do "summary".

Aos amigos do laboratório de genética de microrganismos: Adilson, André, Célia, Maria Helena, Marcelo, Cláudia, Renata e Rose. Aos amigos do Departamento de Genética da ESALQ e de outros Departamentos.

Ao técnico José Antônio da Silva do laboratório de microrganismos.

Aos Professores do Departamento de Genética, pela minha formação acadêmica.

Às bibliotecárias Teresinha, Rose, Silvana e Beth, pelas facilidades concedidas.

Aos meus tios Agadyr e Antônia Torres e a TODOS os integrantes do Grupo Saraí, pela sustentação e orientação espiritual.

À minha amiga Rosane Marques, pelo apoio nos momentos difíceis, por estar sempre disposta a me ajudar. Pelos inúmeros "help" que me deu.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> : classificação e descrição.....	3
2.2. <i>Metarhizium anisopliae</i> : variabilidade e genética.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>anisopliae</i> utilizadas.....	21
3.2. Meios de Cultura e Soluções.....	22
3.2.1. Meio mínimo (MM) (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953).....	22

3.2.2. Meio completo sólido (MC) (AZEVEDO & COSTA, 1973).....	23
3.2.3. Meio mínimo líquido (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953).....	23
3.2.4. Meio completo líquido.....	23
3.2.5. Meio mínimo mais 2% de meio completo e meio mínimo mais 4% de meio completo...	23
3.2.6. Meio mínimo líquido para crescimento de micélio.....	24
3.2.7. Solução de vitaminas.....	24
3.2.8. Suplementos adicionados ao meio mínimo.	25
3.2.9. Solução salina (0,85%).....	26
3.2.10. Solução de "Tween" 80 (0,1%).....	27
3.2.11. Solução de caseína hidrolisada.....	27
3.2.12. Solução estoque de Benlate (Benomil)..	27
3.2.13. Solução de albumina 50% (TANAKA <i>et alii</i> 1979).....	28
3.2.14. Solução de Giemsa.....	28
3.2.15. Solução de HCl 1N.....	29
3.2.16. Tampão Fosfato ph 6,9 (0,2M).....	29
3.2.17. Soluções de ácido perclórico.....	29
3.2.18. Solução de KOH 0,3 N.....	30
3.2.19. Solução de acetaldeído (1,6 mg/ml)....	30
3.2.20. Solução de difenilamina 4%.....	30
3.2.21. Solução estoque de DNA.....	31

3.2.22. Reagentes usados para eletroforese em gel de poliacrilamida (PACCOLA-MEIRELLES <i>et alii</i> , 1988).....	31
3.2.22.1. Solução estoque de Acrilamida.....	31
3.2.22.2. Tampão do gel separador pH 8,9.....	32
3.2.22.3. Tampão do gel empilhador pH 6,8.....	32
3.2.22.4. Tampão do Tanque - pH 8,9 (10X).....	32
3.2.22.5. Gel separador a 10 %.....	33
3.2.22.6. Gel empilhador a 4%	33
3.2.22.7. Tampão da amostra.....	34
3.2.22.8. Solução corante para esterase (SHAW & PRASAD, 1970).....	34
3.2.22.8.1. Estoques.....	34
3.2.22.8.2. Corante.....	35
3.3. Preparo de filtros, palitos de transferência e esterilização.....	35
3.3.1. Sistema de filtro para técnica de enriquecimento.....	35
3.3.2. Filtros Buchner para filtração de micélio.....	36
3.3.3. Uso de palitos para transferência de colônias.....	36

3.3.4. Esterilização e incubação.....	36
3.4. Sobrevivência à luz ultravioleta.....	37
3.4.1. Obtenção de mutantes auxotróficos.....	38
3.4.1.1. Irradiação e isolamento total..	38
3.4.1.2. Irradiação e enriquecimento por filtração.....	39
3.4.2 Teste de reversão.....	41
3.5. Obtenção de heterocários(INGLE & HASTIE,1974).	41
3.5.1. Obtenção de diplóides e recombinantes haplóides a partir de heterocários.....	42
3.6. Teste da estabilidade em MC com Benlate.....	42
3.7. Coloração de Núcleos de conídios (TANAKA <i>et alii</i> , 1979; modificado por Vega, 1990).....	43
3.7.1. Preparo da lâmina.....	43
3.7.2. Determinação do número de núcleos por conídio.....	44
3.8. Extração e quantificação de DNA de conídios...	44
3.8.1. Extração do DNA (VAN TUYL, 1977).....	44
3.8.2. Determinação da quantidade de DNA.....	46
3.8.3. Curva padrão.....	47
3.9. Caracterização para padrões de esterase (PACCO- LA-MEIRELLES <i>et alii</i> , 1988).....	47
3.9.1. Cultivo do fungo e extração de proteí- nas.....	47
3.9.2. Placas de gel de acrilamida.....	48

3.9.3. Coloração para revelação de esterase (SHAW & PRASAD, 1970).....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. Sobrevivência à luz ultravioleta.....	51
4.2. Obtenção de marcadores genéticos.....	54
4.3. Teste de reversão.....	57
4.4. Parassexualidade e paramiose.....	60
4.4.1. Obtenção de heterocário.....	60
4.4.2. Obtenção de recombinantes prototróficos e outros tipos de recombinantes.....	62
4.4.3. Obtenção de diplóides e segregantes.....	69
4.4.4. Análise da estabilidade e grau de ploi- dia dos recombinantes obtidos.....	70
4.4.4.1. Crescimento em meio contendo benlate.....	70
4.4.4.2. Análise citológica dos conídi- os.....	74
4.4.4.3. Determinação da quantidade de DNA.....	77
4.5. Caracterização eletroforética (padrão de este- rases) de linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i>	83
5. CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Curva de sobrevivência da linhagem
MT de *Metarhizium anisopliae* à luz U.V.....53
- Figura 2 - Genealogia dos mutantes da linhagem
designada MT.....59
- Figura 3 - Curva padrão de absorbância em função
da concentração de DNA.....82
- Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida.
Padrões de esterases em diferentes linha-
gens de *Metarhizium anisopliae*.....86
- Figura 5 - Esquema obtido a partir dos padrões de
esterases de linhagens de *Metarhizium
anisopliae* com 7 dias de crescimento.....87
- Figura 6 - Esquema obtido a partir dos padrões de
esterases de linhagens de *Metarhizium
anisopliae* com 10 dias de crescimento.....88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Porcentagem de conídios sobreviventes da linhagem MT em diferentes tempos de irradiação à luz ultravioleta.....52
- Tabela 2 - Mutantes da linhagem MT obtidos através de irradiação com ultravioleta.....56
- Tabela 3 - Teste de reverção espontânea dos mutantes da linhagem MT.....58
- Tabela 4 - Coloração dos conídios e vigor dos heterocários obtidos em diversos cruzamentos entre mutantes de E6, E9 e MT.....63
- Tabela 5 - Cruzamentos realizados e tipos de meios seletivos utilizados na semeadura dos conídios para a obtenção de diplóides e recombinantes.....66

- Tabela 6 - Frequência de colônias obtidas a partir da semeadura de conídios provenientes de heterocários, em Meio mínimo (MM) com diferentes suplementos nutricionais.....67
- Tabela 7 - Recombinantes obtidos nos diferentes meios seletivos, com confirmação por análise auxonográfica.....68
- Tabela 8 - Medidas de crescimento em milímetro (diâmetro maior/diâmetro menor) das linhagens MT6, MT12 e recombinante 1, em diferentes concentrações de benlate em MC (média de 3 repetições).....72
- Tabela 9 - Características de crescimento de alguns recombinantes em MC e em MC + benlate (1µg/ml).....73
- Tabela 10 - Medida (comprimento/largura) dos conídios de diferentes linhagens de *M. nisopliae* (média de 10 medidas).....75
- Tabela 11 - Frequência de conídios uninucleados e binucleados em diferentes linhagens e recombinantes - contagem de 400 conídios.....76

Tabela 12 - Absorbância observada em função da concentração de DNA em 595 e 700 nm, para a obtenção da equação de regressão (duas repetições).....80

Tabela 13 - Quantidade de DNA das diferentes linhagens obtida através da diferença da absorbância nos comprimentos de 595 e 700 nm e substituição na equação de regressão.....81

ESTUDOS GENÉTICOS NO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

Metarhizium anisopliae var *anisopliae* (Metsch.) Sorokin.

Autor: JOÃO ALENCAR PAMPHILE

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Marcadores genéticos foram obtidos na linhagem MT, utilizando-se a luz UV como mutagênico. Os mutantes foram isolados pelos métodos de isolamento total e enriquecimento por filtração. Foram obtidos mutantes simples, duplos e triplos. Também foram obtidos segregantes, pelo mecanismo parassexual, envolvendo mutantes da linhagem MT e E6. Os recombinantes foram analisados por auxonografia, alguns deles aquilatados quanto à estabilidade e grau de ploidia com a avaliação do crescimento em meio contendo Benlate (Benomil), determinação da quantidade de DNA e análise citológica dos conídios. Embora um possível diplóide tenha sido observado (onde um setor combinava marcas de ambos parentais) não foi confirmada sua diploidia. Provavelmente estaríamos diante de um diplóide altamente instável em que tenha sido analisado um recombinante prototrófico do mesmo. A eletroforese de esterases das linhagens selvagens, mutantes e recombinantes do heterocário E6.7 + MT12 mostrou uma grande homologia entre as linhagens MT e E6. Os recombinantes não apresentaram diploidia.

GENETICS STUDIES IN THE ENTOMOPHATOGENIC FUNGUS

Metarhizium anisopliae var *anisopliae* (Metsch.) Sorokin.

Author: JOÃO ALENCAR PAMPHILE

Adviser: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

Genetic markers were obtained in the MT strain, using U.V. light as mutagenic. The mutants were isolated with the methods of total isolation by the filtration enrichment technique. It was obtained simple, double and triple mutants. It was obtained segregants as well, from the parasexual mechanism, involving mutants from the MT strain and MT and E6 strains. The recombinants were analysed by auxonography, some of them evaluated for the stability and ploidy levels with evaluation of growth in Benlate (Benomyl) medium, determination of DNA quantity and citological analysis of the conidia. Although a possible diploid was setorized (where a setor combined markers from both parents), its diploid condition was not confirmed. Probably we might have a highly unstable diploid strain, in which have been analysed a prototrophic recombinant from the same strain. The sterase electrophoreses from wild, mutant and recombinant strains from the heterokaryons E6.7 + MT12 showed a wide homology between the MT and E6 strains. The recombinants did not presented a diploid state.

1. INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* possui uma grande importância para o controle biológico de pragas. Assim como ocorre com outros organismos com aplicações agrícolas, a eficiência na utilização do fungo em questão está ligada ao pleno conhecimento da biologia do mesmo, principalmente no que concerne aos seus aspectos genéticos.

Os estudos genéticos do *Metarhizium anisopliae* são de grande importância, a medida em que dão condições para a realização de programas de melhoramento da espécie, visando a obtenção de linhagens cada vez mais eficazes no controle de pragas em locais com características distintas.

Diversos isolados tem sido obtidos nas diferentes regiões do Brasil, e alguns destacam-se pela maior produção de esporos, maior virulência e maior resistência à luz ultravioleta. A existência de uma grande variabilidade natural nessa espécie, denota a

relevância em se estudar cada uma dessas linhagens.

Em vista dos fatores supracitados, teve-se como objetivo principal neste trabalho o estudo genético da linhagem designada MT, de *M. anisopliae*, bem como o estudo de parassexualidade e parameiose nessa espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Metarhizium anisopliae*: classificação e descrição

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um Deuteromiceto pertencente à ordem Moniliales, família Moniliaceae. Foi descrito pela primeira vez, por Metschnikoff, na Rússia, em 1879, parasitando larvas de *Anisopliae austriaca*, sendo então classificado como *Entomophthora anisopliae*. Após uma série de proposições de diversos sinônimos, foi classificado como *Metarhizium anisopliae* em 1883 por Sorokin.

TULLOCH (1976) em uma revisão sobre a taxonomia do gênero *Metarhizium*, considerou como aceitável a existência de somente duas espécies: *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride*, onde a primeira apresenta duas variedades, a var. *anisopliae* e a var. *major*. A var. *anisopliae* apresentando-se com conídios de 3,5 a 9,0 µm de

comprimento (usualmente 5,0 a 8,0 μm) e a var. *major* com conídios de 9,0 a 18,0 μm de comprimento (usualmente de 10 a 14 μm).

Segundo ROMBACH *et alii* (1987), TULLOCH (1976) usou somente a forma, o tamanho e a cor dos conídios para delimitar as espécies e variedades de *Metarhizium*; dando uma particular ênfase à variabilidade da cor dos conídios quando posicionou outras duas espécies, *M. album* e *M. brunneum* como sinônimos de *M. anisopliae*. Para esses autores, as cores do micélio e conídios em espécies de *Metarhizium* possuem somente um valor taxonômico secundário, além do que o tamanho dos conídios deve ser mais importante para separar variedades do que espécies.

Ainda segundo esses autores, características que possuem valores taxonômicos primários, sendo então importantes para a separação de fungos a nível de espécies são: a forma das células conidiógenas que podem ser ovais ou em forma de clava; a cadeia de conídios, que pode estar aderida lateralmente em colunas prismáticas (ou, eventualmente, em placas sólidas) ou permanecer relativamente separada; e a zona subhimenial dos corpos hifais inflados, que pode estar ausente ou presente. Em vista disso, contrariamente ao proposto por TULLOCH (1976), posicionaram o

Metarhizium album como uma espécie distinta dentro do gênero *Metarhizium*, colocando por sua vez, *M. album* como um sinônimo de *M. brunneum*.

RIBA *et alii* (1990), em um estudo filogenético, utilizando zimogramas e a análise de sequências 28s-rRNA, analisaram 20 linhagens de *Metarhizium*, isolados de 8 áreas diferentes e de 13 espécies de insetos, confirmando a separação do gênero *Metarhizium* em duas espécies. No entanto, ROMBACH *et alii* (1987) citaram que em estudos eletroforéticos de sistema isoenzimáticos em muitas linhagens de todos os taxa reconhecidos de *Metarhizium* (MAY, B. & ROBERTS, D.W., não publicado, citados por ROMBACH *et alii*, 1987) suportaram a validade de todos os taxa aceitos por eles.

A possibilidade de que a var. *major* seja um diplóide natural foi aventada por TINLINE & NOVIELLO (1971) e corroborada por SAMUELS *et alii* (1989). Segundo estes autores, o aumento na resistência à luz ultravioleta e o fracasso em se isolar mutantes auxotóficos, juntamente com a medida de esporos e volume nuclear, proporcionam evidências para a natureza diplóide estável dos isolados da var. *major*.

O fungo *Metarhizium anisopliae* apresenta-se geralmente com conídios uninucleados (TINLINE, 1971), com pequena proporção de binucleados (LUNA, 1985) ou mesmo multinucleados em algumas linhagens (LUNA, 1985). Durante a germinação os núcleos se dividem e um migra para o tubo germinativo enquanto o outro permanece no conídio (VEEN, 1967; ZACHARUK, 1970). Em conídios multinucleados, ocorrem mitoses sucessivas a partir de um núcleo, antes de migrarem para os tubos germinativos, sendo que, nestes casos, também podem ocorrer conídios septados com emissão de dois tubos germinativos (LUNA, 1985). As hifas são frequentemente uninucleadas em seus segmentos hifais, podendo ocorrer também dois ou mais núcleos, ou mesmo segmentos multinucleados em pontas de hifas (LUNA, 1985). A ocorrência de anastomoses entre hifas bem como entre conídios parece ser comum, o que facilita a obtenção de heterocários (TINLINE & NOVIELLO, 1971).

Esse fungo apresenta crescimento ótimo em temperaturas entre 25°C e 30°C, onde temperaturas acima de 30°C prejudicam o desenvolvimento enquanto que abaixo de 7°C não ocorre crescimento (VILACORTA, 1978). Segundo ALVES & NOGUEIRA (1984), em temperaturas abaixo de 16°C e acima de 36°C a germinação dos conídios é nula, havendo perda de viabilidade após exposição à 40°C por 24 horas. Já FERRON

(1978) considera que a temperatura ótima para o desenvolvimento e esporulação está entre 27°C e 28°C, onde à temperaturas inferiores há um retardo no desenvolvimento, aumento na formação do micélio e redução na formação de conídios.

Ele é tolerante a uma faixa de pH de 2,0 a 8,5, sendo que 6,9 é a melhor condição para o crescimento e esporulação (VEEN, 1968).

M. anisopliae, em relação à fonte nutritiva, é pouco exigente, com seu desenvolvimento em diversos meios de cultura, com a utilização como fonte de carbono do amido, glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina (HUBER, 1958; LIHNELL, 1944). O meio mínimo e o meio completo para *Aspergillus nidulans* de PONTECORVO (1953), ou de PONTECORVO (1953), modificados por AZEVEDO & COSTA (1973) constituem excelentes meios de cultura para *Metarhizium anisopliae*, tendo sido empregados por diversos autores (MESSIAS & AZEVEDO, 1980; SILVEIRA & AZEVEDO, 1984; BAGAGLI *et alii*, 1991).

Dentre os diversos agentes causadores de micose em insetos, o fungo *Metarhizium anisopliae* assume um importante papel (BURGES, 1981). Tendo sido usado desde 1880 procurando-se controlar uma variedade de insetos pragas

(MULLER-KOGLER, 1965; VEEN, 1968 apud AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978), como *Nilaparvata lugens*, importante praga do arroz (SAMUELS *et alii*, 1989); *Liriomyza* spp. mosca minadora de folhas de plantas cultivadas (BORDAT *et alii*, 1988); *Bron-tispa longissima*, praga das palmáceas (LIU *et alii*, 1989); *Perkinsiella saccharicida*, *Aeneolamia varia saccharina*, pragas em cana-de-açúcar (RICO & VICTORIA, 1988; ALLARD *et alii*, 1990); *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae), uma praga de muitas árvores incluindo as frutíferas (SAJAP & KAUR, 1990); *Glossina morsitans morsitans* conhecido como tsetse (KAAYA *et alii*, 1991), dentre outros.

No Brasil, este fungo vem sendo utilizado no controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* e *Mahanarva fimbriolata* (ALVES, 1986), e das pastagens, *Deois flavopicta* e *Zulia entreriana* (VEIGA, 1979). Também tem sido verificado sua patogenicidade em outros insetos pragas como *Diatraea saccharalis* (ALVES *et alii*, 1984); *Hypothenemus hampei* (LECUONA *et alii*, 1986); *Ceratitidis capitata* (GARCIA *et alii*, 1989); *Solenopsis* spp (STIMAC *et alii*, 1987); *Atta sexdens piriventris* (DIEHL-FLEIG *et alii*, 1988); *Debalus poecillus* (MARTINS *et alii*, 1987); bem como em insetos de interesse médico como *Rhodnius prolixus* (SILVA & MESSIAS, 1985) e *Pantronylus prolixus* (MARINHO *et alii*, 1987).

Além do interesse no controle de pragas, o fungo *M. anisopliae* também vem despertando interesse com relação à produção de substâncias farmacológicas como antibióticos e imunomoduladores (ITO-KAGAWA *et alii*, 1984; HINO *et alii*, 1985; KINO *et alii*, 1985).

Embora cada fungo e cada inseto hospedeiro possam apresentar características próprias na instalação e desenvolvimento da micose, geralmente tudo começa com o esporo do fungo entrando em contato com a cutícula do inseto. Encontrando aí condições favoráveis esse esporo germina e emite uma estrutura, o apressório que força a cutícula e nela penetra. São então produzidas hifas no interior do hospedeiro que, vencendo as barreiras naturais do mesmo tomam conta do corpo inteiro. Nesse processo estão envolvidas enzimas e toxinas produzidas pelo fungo cuja função é facilitar a penetração das hifas, causando desidratação e degeneração progressiva dos tecidos. Há finalmente a morte do hospedeiro que fica duro, com aspecto mumificado e pode ficar coberto de esporos que se formam a partir das hifas que emergem do inseto atacado (AZEVEDO & MESSIAS, 1985).

SAJAP & KAUR (1990), em um trabalho de histopatologia do *Metarhizium anisopliae* no termite *Copto-*

termes curvignathus mostraram a ontogenia do fungo. Decorridas 24 horas do contato dos conídios com a cutícula, houve a germinação dos mesmos. O tubo germinativo penetrou na cutícula e em seguida a hifa invadiu os tecidos. Os termite infectados morreram entre 36 e 48 horas após a inoculação. A completa colonização do termite, contudo, não foi histologicamente evidente até 72 horas após a inoculação. Neste estágio, todas as partes dos órgãos internos do inseto foram infectados. O micélio começou a emergir da cutícula a partir da 100ª hora e, massas compactadas de conidióforos produzindo conídios foram formados 120 horas após a inoculação.

A respeito da especificidade do fungo *Metarhizium* aos insetos, é válido citar que, segundo ST. LEGER *et alii* (1991), a topografia da superfície onde os esporos entram em contato, influencia a formação do apressório. Em cutículas de *Manduca* a germinação dos esporos ocorreu similarmente em superfícies irregulares e superfícies lisas, contudo, a formação do apressório foi favorecida por superfícies lisas. Em decorrência do fato de que a produção de apressório seja sensível aos detalhes da superfície do inseto, cutículas de insetos não hospedeiros poderiam possuir uma topografia que preveniria a formação apressorial ou causaria a sua formação em um lugar errado, então

providenciando uma barreira à infecção.

2.2. *Metarhizium anisopliae*: variabilidade e genética

Mutações gênicas e mutações estruturais e numéricas são as responsáveis pela variabilidade entre e dentro das espécies. A mutação tem então que ser levada em consideração como o principal fator de variabilidade (AZEVEDO, 1976).

Segundo AZEVEDO & MESSIAS (1985), diversas características pesquisadas em *Metarhizium anisopliae* tais como o tempo de germinação, o crescimento linear em diferentes meios de cultivo, a quantidade de esporos produzidos, o tamanho desses esporos, a influência de fatores do ambiente no crescimento e na produção de esporos (temperatura, diferentes intensidades de luz e comprimento de onda), a produção de enzimas exógenas (amilases, lipases, quitinases, etc.) a resistência à agentes físicos e químicos tais como radiação ultra-violeta, radiações ionizantes, fungicidas e outros inibidores, a virulência frente a diferentes hospedeiros, a variabilidade eletroforética nos isolados, etc., indicaram uma grande variabilidade natural já existente na espécie.

LUNA (1985) em um detalhado estudo citológico e morfológico de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *M. anisopliae*, observou uma ampla variabilidade genética entre estas linhagens. Detectando ainda duas linhagens (A4 e M5) bastante divergentes das demais, tendo sido sugerido como uma nova variedade ou mesmo uma nova espécie do gênero *Metarhizium*. Através de análises citológicas, a autora propôs a existência de 6 grupos de ligação, podendo este número variar nas diferentes linhagens.

Em todo o estudo com fungos deve-se levar em conta a mutação; principalmente em estudos de Genética de Fungos a mutação é o fator essencial sem o qual qualquer trabalho de pesquisa com fungos fica difícil de ser realizado. É devido a isso que os fungos mais bem estudados geneticamente apresentam um enorme número de mutantes obtidos espontaneamente ou induzidos por agentes mutagênicos (AZEVEDO, 1976).

Em *Metarhizium anisopliae*, diversos mutantes foram obtidos, seja com o uso de mutagênicos (AL-AIDROOS & SEIFERT, 1980; SILVEIRA & AZEVEDO, 1984; ROBERTS & MESSING-AL-AIDROOS, 1985; HEALE *et alii*, 1989; BAGAGLI *et alii*, 1991), seja naturalmente, com o isolamento de mutantes espontâneos (AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978).

AL-AIDROOS & ROBERTS (1978) isolaram mutantes espontâneos mais virulentos à larvas de mosquitos do que a linhagem selvagem de *M. anisopliae*. Os autores consideraram esses mutantes como sendo hipervirulentos. Ainda esses autores, consideraram que a hipervirulência estava associada com a germinação precoce, esporulação precoce e densa e aumento da produção de dextruxina.

AL-AIDROOS & SEIFERT (1980) descreveram mutantes deficientes para a degradação de amido eficientes em penetrar larvas de mosquito, germinar e esporular mais rapidamente e produzir mais toxinas que a linhagem selvagem, também sendo caracterizados como hipervirulentos.

SILVEIRA & AZEVEDO (1984) desenvolveram uma técnica de filtração para a obtenção de mutantes auxotópicos do fungo *M. anisopliae* com um incremento de 23 até 61 vezes no número de mutantes em relação ao processo de isolamento total.

Foram isolados em *M. anisopliae* mutantes morfológicos e auxotróficos com o objetivo de serem empregados como marcadores genéticos para estudos de heterocariose (TINLINE & NOVIELLO, 1971), parassexualidade (AL-AIDROOS, 1980; MESSIAS & AZEVEDO, 1980) e paramiose (BAGA-

GLI *et alii*,1991).

Os estudos genéticos em *M. anisopliae* realmente só tiveram início com a detecção de heterocariose por TINLINE & NOVIELLO (1971), que obtiveram heterocários através do emprego de mutantes auxotróficos.

Segundo AZEVEDO (1976), a heterocariose é o passo inicial para o ciclo parassexual que só pode ter início através da mesma.

Sendo um deuteromiceto e, portanto não possuindo ciclo sexual, o *M. anisopliae* teve na parassexualidade uma alternativa ao sexo, ampliando-se dessa forma a possibilidade de ser estudado geneticamente.

O ciclo parassexual foi descoberto pela primeira vez em fungos por PONTECORVO & ROPER em 1952 e, segundo AZEVEDO (1976), consiste (em resumo) na fusão de núcleos haplóides de genótipos diferentes em um heterocário, dando assim um núcleo diplóide. Este, por divisões mitóticas vai produzindo novos núcleos diplóides. Por sua vez, esses diplóides podem sofrer permuta mitótica resultando recombinantes que se diferenciam do diplóide original. Também por não-disjunção mitótica, o diplóide pode

passar por diversas fases de aneuploidia e originar haplóides .

O ciclo parassexual foi, pela primeira vez, descrito em *M. anisopliae* por MESSIAS & AZEVEDO (1980), esses autores utilizaram marcadores morfológicos (coloração dos conídios) e auxotróficos para o assinalamento do ciclo em questão com a obtenção de heterocáριο, diplóides e recombinantes, tendo sido confirmado quase que simultaneamente por AL-AIDROOS em 1980.

MESSIAS & AZEVEDO (1980), por isolarem majoritariamente setores haplóides do tipo parental, inferiram a existência de pelo menos 4 grupos de ligação nesse fungo.

BERGERON & AL-AIDROOS (1982) propuseram, via estudo parassexual, a existência de 5 grupos de ligação para *M. anisopliae*, relacionando as marcas morfológicas ylo e tan ao grupo de ligação 1 (g.1.1); a auxotrófica lisina (lys1) ao g.1.2; a resistência à acriflavina (ACR2) e a auxotrófica metionina (met1) ao g.1.3; a morfológica brn e a auxotrófica adenina (ade1) ao g.1.4 e a resistência à acriflavina (ACR5) ao g.1.5.

MAGOON & AL-AIDROOS (1986) descreveram um

mapa de ligação do *M. anisopliae* onde duas novas mutações (lem e ade2) foram localizadas e a ligação entre as marcas previamente estudadas por BERGERON & AL-AIDROOS (1982) foram confirmadas. Esses autores também apresentaram duas possíveis vias metabólicas para a formação da pigmentação selvagem verde nos esporos de *M. anisopliae*.

Outro processo de recombinação existente em *M. anisopliae* é a parameiose. Este termo foi proposto por BONATELLI *et alii* (1983) para designar o tipo de instabilidade que os núcleos diplóides apresentavam no fungo *Aspergillus niger*, com uma alta taxa de recombinação ocorrendo nos heterocários.

O processo parameiótico é uma variação do ciclo parassexual. Presumivelmente, em algumas espécies de fungos, os diplóides formados em heterocários são extremamente instáveis e, assim, sofrem haploidização e/ou permuta mitótica na própria hifa heterocariótica. Resultam assim, núcleos recombinantes, que são incorporados aos conídios produzidos pelo heterocário (AZEVEDO, 1989).

SILVEIRA & AZEVEDO (1987) detectaram a ocorrência desse processo em *M. anisopliae* quando, através de cruzamentos inter e intra-linhagens, via fusão de proto-

plastos, observaram a existência de produtos recombinantes com as características das duas linhagens parentais sem que houvesse um diplóide intermediário.

BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982) já haviam mostrado a possibilidade de haplóides recombinantes serem obtidos diretamente de heterocários, bem como a elevada instabilidade dos diplóides.

A ocorrência da parameiose em *M. anisopliae* foi estudada em maior profundidade por BAGAGLI *et alii* (1991) que, com a detecção de recombinantes haplóides no heterocário em alta frequência, além das evidências de permuta mitótica, consideraram a factualidade da mesma.

As possibilidades do melhoramento genético de fungos entomopatogênicos fica, assim, bastante ampliada com a existência da parameiose. Nesses casos, a simples construção de um heterocário e seleção em meio apropriado, de conídios recombinantes, permite a obtenção de linhagens que combinam características nucleares e citoplasmáticas dos pais envolvidos. Como recombinantes prototróficos são obtidos, os recombinantes podem aliar características favoráveis dos pais para o controle biológico, sem possuir marcadores auxotróficos e de colorações distintas da linha-

gem selvagem que, em geral, são deletérias para o crescimento e eficiência no ataque aos insetos-pragas (AZEVEDO, 1989).

Outra forma de recombinação em *M. anisopliae* é a fusão de protoplastos. Esta metodologia veio dar a instrumentalização necessária para o geneticista transpor as barreiras de incompatibilidade, a nível de parede, entre linhagens distintas dessa espécie no que concerne à obtenção de heterocários e, por conseguinte, de recombinantes.

A metodologia de fusão de protoplastos em *M. anisopliae* foi definida por SILVEIRA & AZEVEDO (1987). Os protoplastos foram obtidos após tratamento com enzimas líticas usando KCl como estabilizador osmótico. A frequência de regeneração variou de 1,2 a 3,0% e a frequência de fusão variou de 0,9 a 44,1 em 10^5 protoplastos.

FRIGO (1983), utilizando uma variação da técnica empregada pelos autores supracitados, a técnica do "doador morto", onde uma das linhagens utilizadas (MT) era morta por luz ultravioleta, evitando-se dessa forma o passo relacionado à obtenção de marcadores genéticos nessa linhagem, obteve uma frequência de fusão de 41,0 em 10^5 proto-

plastos, valor esse semelhante ao obtido por SILVEIRA & AZEVEDO (1987).

VEGA (1992), demonstrou que a capacidade de regeneração dos protoplastos de conídios é bem maior que a dos protoplastos oriundos de micélio.

O melhoramento genético fica dessa forma amplificado com a possibilidade de cruzamentos até mesmo inter-específicos.

Além das técnicas convencionais de melhoramento genético do fungo via ciclo parassexual e parameiose e de processos biotecnológicos como a fusão de protoplastos, a tecnologia do DNA recombinante, com o emprego de técnicas moleculares mais avançadas, veio ampliar ainda mais a possibilidade de se conseguir linhagens cada vez mais aptas ao controle biológico de pragas.

Em vista disso, L.BERNIER *et alii* (1989), transformaram o *M. anisopliae* para a resistência ao fungicida benomil usando o cosmídio pSV50 com o gene da β -tubulina clonado de um mutante resistente ao benomil de *Neurospora crassa*. Os transformantes retiveram a capacidade de infectar e matar larvas de *Manduca sexta*. Dois transforman-

tes foram menos virulentos do que o tipo selvagem e um deles mostrou uma menor germinação dos esporos *in vitro*. A resistência ao benomil persistiu nos reisolados dos insetos mortos.

GOETTEL *et alii* (1990), transformaram o *M. anisopliae* para a resistência ao mesmo fungicida usando o plasmídeo pBENA3 que continha o alelo benA3 de *Aspergillus nidulans*. Os transformantes também foram patogênicos à *Manduca sexta*. Esses autores ainda ressaltam o fato desses estudos demonstrarem o potencial do uso de linhagens transgênicas de fungos entomopatogênicos em conjunto com outros componentes do controle de pestes como os fungicidas. Dessa forma, as linhagens transgênicas poderiam ser usadas para o controle de pestes ao mesmo tempo em que fungicidas são aplicados para controlar fungos patógenos de plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens de *M.anisopliae* var *anisopliae* utilizadas

Linhagem	Fenótipos*	Observações
MT	selvagem	1
E6.2	vio ade ⁻ met ⁻	2
E6.7	vio met ⁻ bio ⁻	3
E9.20	ylo leu ⁻ ade ⁻	2

#1- Linhagem selvagem procedente do Estado do Mato Grosso do Sul.

#2- Mutante obtido por BAGAGLI (1987).

#3- Mutante obtido por SILVEIRA (1983).

* - ade, bio, leu, met, designam respectivamente requisitos

nutricionais para adenina, biotina, leucina e metionina.

- ylo e vio designam coloração amarela e violeta, em contraste à coloração verde selvagem.

As linhagens MT, E6.2 e E9.20 utilizadas foram as do estoque do Setor de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

A linhagem E6.7 foi cedida por Eduardo Bagagli do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNESP.

3.2. Meios de Cultura e Soluções

3.2.1. Meio mínimo (MM) (PONTECORVO *et alii.*, 1953).

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl.....	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
FeSO ₄	0,001g
ZnSO ₄	0,001g
Glicose.....	10,0g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1 litro
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%.	

3.2.2. Meio completo sólido (MC) (PONTECORVO, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Foi adicionado ao meio mínimo:

Extrato de levedura.....2,0g

Peptona.....2,0g

Caseína hidrolisada.....1,5g

Solução de vitaminas.....1,0ml

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%

3.2.3. Meio mínimo líquido (PONTECORVO et al., 1953)

Preparado segundo o item 3.2.1., não sendo adicionado ágar.

3.2.4. Meio completo líquido

Preparado segundo o item 3.2.2., não sendo adicionado o ágar.

3.2.5. Meio mínimo mais 2% de meio completo e meio mínimo mais 4% de meio completo.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo líquido e

meio mínimo mais 4% de meio completo líquido, respectivamente. Estes tubos foram autoclavados e conservados em refrigerador.

3.2.6. Meio Mínimo líquido para crescimento de micélio

Ao meio mínimo preparado segundo o item 3.2.3., foram adicionados requisitos para cada marca auxotrófica .

3.2.7. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico.....	100,0mg
Ácido p-aminobenzóico.....	10,0mg
Biotina.....	0,2mg
Piridoxina.....	50,0mg
Riboflavina.....	100,0mg
Tiamina.....	50,0mg
Água destilada esterilizada.....	100,0ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e guardada em frasco escuro, no refrigerador a 4°C.

3.2.8. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Estoques de suplementos foram preparados, adicionando-se cada um deles em frascos contendo água destilada esterilizada. Estes foram aquecidos em banho-maria (98°C) por 15 minutos e conservados em refrigerador a 4°C (os estoques de vitaminas foram conservados em frascos escuros).

SUPLEMENTO	SOLUÇÃO	QUANTIDADE	CONCENTRAÇÃO
	ESTOQUE	ADICIONADA	FINAL NO
	(quantidades adicionadas à 10ml de água destilada e esterilizada)	POR PLACA (19,9 ml de meio de cultura)	MEIO DE CULTURA
Adenina	50,0mg	0,1ml	25µg/ml
Metionina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Lisina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Prolina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Leucina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Cisteína	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Arginina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Cistina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Alanina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Valina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Isoleucina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Ác. Aspártico	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Ác. Glutâmico	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Treonina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Histidina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Serina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Fenilalanina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Triptofano	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Tirosina	100,0mg	0,1ml	50µg/ml
Biotina	0,4mg	0,1ml	0,20µg/ml
Pirodoxina	0,5mg	0,1ml	0,25µg/ml
Ác. p-aminobenzóico	0,5mg	0,1ml	0,25µg/ml
Tiamina	0,5mg	0,1ml	0,25µg/ml
Ác. Nicotínico	1mg	0,1ml	0,50µg/ml
Riboflavina	1mg	0,1ml	0,50µg/ml

3.2.9. Solução salina (0,85%)

Preparou-se uma solução de 8,5g de NaCl em 1000 ml de água destilada. A solução foi distribuída em frascos (9ml para cada frasco) autoclavada e conservada no

refrigerador a 4°C.

3.2.10. Solução de "Tween" 80 (0,1%)

Foram adicionados 0,1 ml de "Tween" 80 em 100 ml de água destilada com homogeneização e 2,5 ml da solução foram colocados em tubos de ensaio, que foram a seguir autoclavados e conservados no refrigerador a 4°C.

3.2.11. Solução de caseína hidrolisada

Preparou-se a solução, dissolvendo-se 100 mg de caseína hidrolisada em 10 ml de H₂O destilada esterilizada. Esta foi aquecida em banho-maria (98°C) por 15 minutos e a seguir conservada em refrigerador a 4°C.

3.2.12. Solução estoque de Benlate (Benomil)

Preparou-se a solução dissolvendo-se 30 mg de Benlate em um pouco de acetona, acertando-se o volume para 30 ml com água destilada esterilizada (concentração final de 1mg/ml). Esta foi aquecida em banho-maria (98°C) por 15 minutos e a seguir conservada em refrigerador a 4°C.

3.2.13. Solução de albumina 50% (TANAKA *et alii*,
1979)

Todo o volume da clara de um ovo foi colocado em um Becker e picotado com tesoura pequena por cerca de 1 hora, vagarosamente sem deixar formar espumas. Filtrou-se em gase (o processo é lento - cerca de 3 horas). Ao volume filtrado adicionou-se igual volume de glicerina (1:1). A solução foi guardada sob refrigeração a 4°C, adicionando-se uma pequena porção de cânfora (para ajudar na preservação).

3.2.14. Solução de Giemsa

Giemsa em pó.....	1,0 g
Glicerina.....	66,0 ml
Metanol.....	66,0 ml

Misturou-se o Giemsa com glicerina a 60°C. Após resfriamento foi adicionado o metanol. Filtrou-se e a solução corante foi armazenada em frasco escuro a temperatura ambiente.

3.2.15. Solução de HCl 1N

HCl concentrado.....82,50ml

Água destilada.....1000,0ml

A solução foi conservada à temperatura ambiente.

3.2.16. Tampão fosfato pH 6,9 (0,2M)

Solução A

NaH_2PO_4 24,0g

Água destilada.....1000,0ml

Solução B

Na_2HPO_4 28,4g

Água destilada.....1000,0ml

As soluções A e B foram conservadas no refrigerador sendo o tampão fosfato preparado no momento de uso, misturando 45,0ml de solução A com 55,0ml de solução B.

3.2.17. Soluções de ácido perclórico

A partir do ácido perclórico 11,64 N, foram

preparadas várias soluções com normalidades diferentes:

HClO₄ 0,2 N 1 ml de HClO₄: 57,2 ml de água

HClO₄ 1,5 N 1 ml de HClO₄: 6,8 ml de água

HClO₄ 3,75 N 1 ml de HClO₄: 2,1 ml de água

As soluções foram preparadas em banho gelo-
água, em frascos escuros e guardados sob refrigeração.

3.2.18. Solução de KOH 0,3 N

A um volume de 80 ml de água foi acrescentado 13,94 g de KOH.

3.2.19. Solução de acetaldeído (1,6 mg/ml)

A um volume de 100 ml de água, foi acrescentado 205,12 µl de acetaldeído P.A. (onde 1l de acetaldeído corresponde a 0,78 Kg). A solução foi guardada em frasco escuro com tampa esmerilhada, no refrigerador.

3.2.20. Solução de difenilamina 4%

Colocou-se 4 g de difenilamina pura em 100 ml de ácido acético glacial. Conservou-se no escuro e à temperatura ambiente. A solução foi preparada no dia de uso.

3.2.21. Solução estoque de DNA

Em 20 ml de ácido perclórico 1,5 N foram diluídas 30 mg de DNA purificado. A solução foi colocada em frasco escuro e guardada sob refrigeração.

3.2.22. Reagentes usados para eletroforese em gel de poliacrilamida (PACCOLA-MEIRELLES *et alii*, 1988)

3.2.22.1. Solução estoque de Acrilamida

Acrilamida.....75 g
Bis-acrilamida.....2 g
H₂O destilada.....250 ml

Filtrou-se a solução e manteve-se em refrigerador.

3.2.22.2. Tampão do gel separador pH 8.9

Tris-base.....45,75 g

H₂O destilada.....60,0 ml

Ajustou-se o pH para 8,9 com HCl 1N.

Completou-se o volume para 100 ml com H₂O destilada. A solução foi filtrada e mantida à temperatura ambiente.

3.2.22.3. Tampão do gel empilhador pH 6.8

Tris-base.....7,475 g

H₂O destilada.....60,0 ml

Ajustou-se o pH para 6.8 com HCl 1N e completou-se o volume para 100 ml com H₂O destilada.

3.2.22.4. Tampão do tanque - pH 8,9 (10 X)

Tris-base.....63,2 g
 Glicina.....39,9 g
 H₂O destilada.....900,0 ml

Sob agitação, dissolveu-se os produtos e completou-se o volume para 1000,0 ml. No momento do uso a solução foi diluída para 1X. A solução foi mantida em refrigerador.

3.2.22.5. Gel separador a 10%

Tampão do gel separador
 (item 3.2.23.2.).....1,5ml
 Acrilamida(item 3.2.23.1.)5,0ml
 Água destilada.....8,4 ml
 Perssulfato
 de amônia (10%).....0,113ml
 TEMED.....0,005ml

3.2.22.6. Gel empilhador a 4%

Tampão do gel empilhador

(item 3.2.23.3.).....0,75 ml
Acrilamida
(item 3.2.23.1.).....1,00 ml
Água destilada.....5,70 ml
Persulfato
de amônio..... (10%) 0,056ml
TEMED.....0,0075ml

3.2.22.7. Tampão da amostra

Glicerol.....5,0 ml
Tampão do gel empilhador...2,5 ml
Azul de bromofenol.....2,5 mg

Completou-se o volume para 25 ml com H₂O
destilada e manteve-se estocada a -20°C.

3.2.22.8. Solução corante para esterase

(SHAW & PRASAD, 1970).

3.2.22.8.1. Estoques

A) α -naftil acetato.....0,1 g
Acetona.....5,0 ml

H₂O destilada.....5,0 ml

B) β-naftil acetato.....0,1 g

Acetona.....5,0 ml

H₂O destilada.....5,0 ml

3.2.22.8.2. Corante

Fast Blue RR".....50,0 ml

Tris-HCl 0,5 M pH 7,1.....5,0 ml

α-naftil acetato.....0,75 ml

β-naftil acetato.....0,75 ml

H₂O destilada.....43,5 ml

3.3. Preparo de filtros, palitos de transferência e esterilização.

3.3.1. Sistema de filtro para técnica de enriquecimento.

No interior de filtros de vidro foram fixadas 6 camadas de gaze com o auxílio de fita crepe. Este

conjunto foi envolto em papel de alumínio e autoclavado por 15 minutos a 120°C.

3.3.2. Filtros Buchner para filtração de micélio.

Estes foram preparados, mantendo-se em seu interior duas folhas de papel de filtro. Envolveu-se em papel de alumínio e papel comum e autoclavou-se por 15 minutos a 120°C.

3.3.3. Uso de palitos para transferência de colônias.

Palitos roliços adquiridos no comércio foram lavados em água por 6 vezes consecutivas e então esterilizados em forno por 3 horas. Depois de usados, foram novamente lavados, secos e esterilizados para uso posterior.

3.3.4. Esterilização e incubação

Os meios de culturas e as soluções foram

esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 120°C (exceto nos casos assinalados). Os frascos que necessitaram ser utilizados e esterilizados, foram autoclavados a 120°C por 15 minutos. A temperatura de incubação foi de 28°C.

3.4. Sobrevivência à luz ultravioleta

Suspensão de conídios da linhagem selvagem MT em tween 80 foi observada ao microscópio com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, para se estimar o número de conídios por mililitro. Esta suspensão foi diluída em solução salina (1:10), colocada em placa de Petri esterilizada, irradiada com luz ultravioleta (Marca MINERALIGHT - Mod.R52 - Ultra-Violet Prod. INC. USA - 60 AMPS.), em diferentes tempos de exposição a uma distância de 12,5 cm da lâmpada. Após cada irradiação, diluições apropriadas foram feitas em solução salina 0,85% e 0,1 ml foi semeado em placa contendo MC. As placas foram incubadas a 28°C em ausência de luz. Findo este período, as colônias sobreviventes foram contadas e procedeu-se o cálculo da curva de sobrevivência, tomando-se o número de colônias obtidas no tempo 0 minutos como 100% de sobrevivência. Foi estimado deste modo, o tempo de irradiação que permitia 5% de sobrevivência para a linhagem.

3.4.1. Obtenção de mutantes auxotróficos

A obtenção de mutantes auxotróficos foi realizada por dois tipos de tratamentos: o primeiro por irradiação e isolamento total e o segundo por irradiação e enriquecimento por filtração.

3.4.1.1. Irradiação e isolamento total

Conídios da linhagem MT selvagem, com 8 dias de crescimento, foram transferidas para um tubo de ensaio contendo solução de tween 80 (0,1%). A concentração desta solução foi determinada como descrito no item 3.4., sendo irradiada da mesma forma no tempo de 3 min. e 37 seg.

A suspensão irradiada foi diluída e dessa diluição semeou-se 0,1 ml por placa de Petri, contendo MC. A seguir as placas foram incubadas a 28°C, por 7-8 dias. Após este tempo, conídios das várias colônias foram transferidos para placas de Petri contendo MM, sendo inoculados com o auxílio de palitos de madeira esterilizados na distribuição 5x5+1 (AZEVEDO et al., 1976). Colônias que não se desenvolveram neste meio foram consideradas como sendo

mutantes auxotróficos. O local do meio em que as mesmas foram inoculadas foi cortado e transferido para tubo contendo MC. Estes foram incubados a 28°C, conseguindo-se deste modo, conídios para ensaios de deficiências nutritivas.

Placas contendo MM sólido mais cada uma das soluções (caseína hidrolisada, ácidos nucleicos e vitaminas) foram preparadas. Conídios provenientes dos mutantes auxotróficos foram colocados de maneira equidistante nas referidas placas e nas controle (MM e MC). Assim, o crescimento dos mutantes em uma das placas, e não em MM, indicava a deficiência de cada um, sendo posteriormente ensaiados, conforme o caso, em cada aminoácido, vitamina ou base nitrogenada, procurando a caracterização final do mutante, o que levou à obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos simples. Para a obtenção de mutantes com dupla auxotrofia o mesmo procedimento foi realizado, adicionando-se o requisito para a primeira marca ao MM sólido adicionado de aminoácidos, vitaminas e ácidos nucleicos.

3.4.1.2. Irradiação e enriquecimento por filtração.

Suspensão de conídios obtida, quantificada e irradiada segundo os itens 3.5. e 3.5.1., foi transferida, sem diluir, para um frasco contendo 50ml de MM líquido que foi agitado por um período de 20-25 horas. Após este período, o MM foi filtrado através de gaze (item 3.4.2.) para um outro frasco erlenmeyer esterilizado e vazio e novamente agitado a 28°C no período acima citado. Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo que após a última filtração o MM foi transferido para tubos de centrifuga (tubos de 15 ml) e centrifugado na centrífuga "Excelsa Baby" nas posições 5 e 6 por cerca de 7 e 3 minutos respectivamente. O sobrenadante foi dispensado e o precipitado ressuspenso em cerca de 1,0 a 2,0 ml de solução salina esterilizada e semeado em MC (0,1 ml por placa). As placas foram incubadas (28°C) por um período de 7-8 dias. Todas as colônias que se desenvolveram nestas placas foram transferidas para placas contendo MM segundo o item 3.5.1.1., procedendo-se a caracterização dessas da mesma forma.

Para a obtenção de mutantes com dupla auxotrofia, o mesmo procedimento foi realizado, adicionando-se o requisito para a primeira marca ao MM líquido (usado para filtração) e ao MM sólido adicionado de aminoácidos, vitaminas e ácidos nucleicos.

3.4.2. Teste de reversão

As linhagens mutantes foram ensaiadas para reversão das marcas nutricionais. Para tal, utilizou-se MM, MM suplementado com o requisito nutricional (controle) ou um dos requisitos da linhagem e MC (controle). Semeou-se 0,1ml de uma solução de conídios (10^7 conídios/ml) nas placas preparadas da forma acima descrita e incubadas a 28°C por 7-8 dias. Após este período verificou-se a presença ou ausência de crescimento de colônias.

3.5. Obtenção de heterocários (INGLE & HASTIE, 1974)

Conídios de diferentes linhagens (com complementação para marcas auxotróficas e morfológicas) foram colocados em tubos de ensaio contendo cerca de 2,5 ml de MM líquido suplementado com 4% de MC líquido. Estes tubos foram agitados e, com o auxílio de uma pipeta, transferiu-se volumes bastantes reduzidos (gotas) de forma equidistante para a tampa maior de uma placa de petri plástica esterilizada cuja tampa menor continha um papel filtro umedecido com água esterilizada. A placa foi incubada a 28°C por um período de 24 a 48h. Após este tempo,

ressuspendeu-se as películas vertendo-se cerca de 9ml de solução salina (0,85%) na tampa maior da placa. Essas películas foram transferidas para placas contendo MM e incubadas a 28°C por cerca de 8 dias.

3.5.1. Obtenção de diplóides e recombinantes haplóides a partir de heterocários.

Suspensões de conídios provenientes das colônias heterocarióticas foram semeadas sem diluição e com diferentes diluições em placas contendo MM e MM suplementado com os requisitos nutricionais (aminoácidos e vitaminas) em diferentes combinações excetuando-se as do tipo parental. Estas foram incubadas a 28°C por 6-7 dias quando então foram contadas as frequências das colônias nas diferentes combinações. As colônias obtidas foram semeadas em MC ou MM + suplementos para purificação, sendo a seguir caracterizadas quanto à sua morfologia e necessidades nutricionais.

3.6. Teste da estabilidade em MC com Benlate.

Duas linhagens mutantes e um recombinante

foram inoculados em MC contendo concentrações de 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0 e 2,0 µg de Benlate/ml de meio de cultura para determinação das concentrações inibitórias de crescimento.

Recombinantes prototróficos ou possíveis diplóides foram inoculados (12 repetições para cada recombinante) em MC + Benlate (1 µg/ml de meio) onde se observou as características de crescimento das colônias (com ou sem emissão de setores).

3.7. Coloração de núcleos de conídios (TANAKA et al., 1979; modificado por Vega, 1990)

3.7.1. Preparo da lâmina

O material a ser corado foi aderido a uma lâmina previamente untada com albumina 50% e seca levemente sob um bico de Bunsen. A seguir foi fixado em metanol absoluto durante 15 minutos. Após a fixação as lâminas foram colocadas para hidrólise em HCl 1N a 60°C por 8 a 10 minutos. Lavou-se por três vezes consecutivas em água destilada e uma vez em tampão fosfato pH 6,9, sendo a

seguir efetuada a coloração do material com 1ml de solução corante Giemsa e 9 ml de tampão fosfato pH 6,9 durante 1/2 hora. Após a coloração, o material foi lavado rapidamente por 2 vezes em tampão fosfato pH 6,9 e a seguir procedeu-se a montagem provisória com as lamínulas, vedando as bordas da lamínula, procurando-se evitar bolhas de ar entre lâmina e lamínula.

3.7.2. Determinação do número de núcleos por conídio

Conídios com o mesmo tempo de crescimento foram observados no microscópio ótico e determinada a porcentagem média de núcleos por conídios. Foram empregados 400 conídios.

3.8. Extração e quantificação de DNA de conídios

3.8.1. Extração do DNA (VAN TUYL, 1977)

Utilizou-se uma suspensão de $1,07 \times 10^8$ conídios para cada linhagem. Estas foram transferidas para

tubos de centrífuga com fundo cônico e centrifugadas por 10 minutos na posição 5 da centrífuga Excelsa Baby (4000 rpm), sendo os precipitados lavados e centrifugados novamente por duas vezes em água destilada. Após a lavagem, os conídios foram incubados em 5 ml de ácido perclórico 0,2 N por 10 minutos em banho gelo-água e centrifugados por 10 minutos na posição 5 da centrífuga Excelsa Baby. Esse processo foi repetido mais uma vez. A seguir os precipitados foram ressuspensos em 4 ml de KOH 0,3 N e mantidos a 37°C por mais ou menos 16 horas. Após este período, adicionou-se 0,6 ml de ácido perclórico 3,75 N à suspensão, em banho gelo-água, para precipitação do material. A seguir, foi feita uma centrifugação por 10 minutos na posição 5, desprezando-se os sobrenadantes. Os precipitados foram então lavados e centrifugados por duas vezes com 4 ml de ácido perclórico 0,2 N em banho gelo-água. A seguir, foram tratados com 1 ml de ácido perclórico 1,5 N por 20 minutos a 70°C, para extração do DNA, sendo a seguir centrifugados de maneira idêntica às demais centrifugações. Coletou-se o sobrenadante e repetiu-se o tratamento de extração com mais 1 ml de ácido perclórico 1,5 N por 20 minutos a 70°C. Os sobrenadantes obtidos nas duas etapas foram combinados e o volume acertado para 3 ml com ácido perclórico 1,5 N, sendo que após esta etapa, procedeu-se a mais uma incubação a 70°C por 10 minutos seguido de centrifugação também por 10

minutos na posição 4 da centrífuga Excelsa Baby. Coletou-se o sobrenadante. A partir desta suspensão, procedeu-se a determinação da quantidade de DNA.

3.8.2. Determinação da quantidade de DNA

A determinação do DNA foi feita pelo método da difenilamina modificado (GILES & MYERS, 1965), usando uma solução de DNA de concentração conhecida como padrão.

Foram misturados 2 ml da solução de difenilamina (4%) com 2 ml da suspensão a ser analisada e adicionados 0,1 ml da solução de acetaldeído (1,6 mg/ml). Como solução " Branco", utilizada para calibrar o aparelho de modo que a esta solução corresponda a absorbância zero, misturou-se 2 ml de solução de difenilamina (4%) com 2 ml de ácido perclórico 1,5 N e adicionados 0,1 ml da solução de acetaldeído (1,6 mg/ml). Estas misturas foram deixadas a incubar a 30°C por 18 a 20 horas, sendo as leituras executadas a seguir em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 595 e 700 nm. A quantidade de DNA das amostras foi estimada pela diferença entre as duas leituras e pela comparação com a curva padrão.

3.8.3. Curva padrão

Foi retirada uma alíquota de 1 ml da solução estoque de DNA, adicionando-a a 37,5 ml de ácido perclórico 1,5 N, obtendo-se assim uma solução de 40 µg/ml. A partir desta, foram feitas diluições sempre com ácido perclórico 1,5 N, de modo a se obter concentrações de 20, 10 e 5 µg/ml. Com estas soluções, foi traçada a curva padrão, utilizando-se a metodologia descrita no item anterior, obtendo-se uma equação de reta a qual relaciona absorvância com concentração de DNA.

3.9. Caracterização para padrões de esterase (PACCOLA-MEIRELLES *et alii*, 1988)

3.9.1. Cultivo do fungo e extração de proteínas

Conídios das linhagens ensaiadas foram coletadas em solução de Tween-80 e inoculados em frascos erlenmeyers, contendo 50 ml de meio completo líquido (item 3.2.4.). Incubaram-se os frascos a 28°C por sete dias. O micélio produzido foi coletado em funil Buchner contendo papel filtro, com auxílio de bomba de vácuo. Lavou-se o

micélio duas vezes, para retirada do meio de cultivo, secou-se com papel de filtro e avaliou-se o peso.

A cada 300 mg de micélio, adicionou-se 1 ml de tampão do gel empilhador (item 3.2.23.3.) e triturou-se em homogeneizador elétrico por 5 minutos, mantendo-se as amostras sempre em banho gelo-água. O extrato obtido foi conservado em banho gelo-água, em refrigerador, por 12 horas, para completar a extração. Centrifugou-se as amostras por 40 minutos a 10000 rpm, em centrífuga refrigerada.

Os extratos protéicos, sobrenadantes, foram transferidos para frascos, vedados e conservados a aproximadamente -10°C , em refrigerador.

3.9.2. Placas de gel de acrilamida

As placas foram montadas em sistema vertical e vedadas com ágar-água (4%). Preparou-se o gel separador à 10% (item 3.2.23.5.), vertendo-o na placa com o auxílio de seringa de vidro. Completou-se o restante da placa com água, para polimerização, após o que a água foi retirada. Preparou-se o gel empilhador a 4% (item 3.2.23.6.) vertendo-o em seguida, acima do gel separador, também com

auxílio de seringa. Introduziu-se o pente sobre o gel empilhador e conservou-se à temperatura ambiente, para polimerização.

Polimerizado o gel, retirou-se o pente e o espaçador inferior das placas, limpou-se o ágar-água, fixou-se a placa à cuba de corrida e lavaram-se os poços deixados pelo pente, com o tampão de corrida. Vedou-se a superfície entre a placa e o tanque superior, com ágar-água e preencheu-se o tanque inferior da cuba, com tampão, tomando-se o cuidado de eliminar as bolhas.

As amostras, preparadas com tampão (item 3.2.23.7.), na proporção 1:1, foram aplicadas nos poços. Preencheu-se o tanque superior com tampão (item 3.2.23.4.), iniciou-se a corrida com 100V, sendo que ao final do gel empilhador, elevou-se a voltagem a 200V, mantendo-se até o final da corrida.

3.10.3. Coloração para revelação de esterase

(SHAW & PRASAD, 1970)

Ao término da corrida, o gel foi retirado da placa e colocado em solução corante (item 3.2.23.8) até o

aparecimento de bandas. Retirou-se o gel do corante, mantendo-o em água.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sobrevivência à luz ultravioleta

A porcentagem de sobrevivência dos conídios em diferentes tempos de irradiação para a linhagem MT está sumarizada na Tabela 1. Baseado nesses dados, foi obtida a equação de regressão e plotada a sua respectiva curva (Figura 1).

O tempo de exposição à U.V. necessário para inviabilizar 95% dos conídios foi determinado como sendo de 3 min. 37 seg.

Segundo CORREA & AZEVEDO (1986), a importância, do ponto de vista aplicado, da variabilidade genética para o caráter de resistência à luz ultra-violeta está na limitação da utilização dos fungos em condições de campo em decorrência da morte dos conídios provocada pela radiação ultra-violeta da luz solar.

Em vista disso, priorizou-se a obtenção de marcadores genéticos utilizando-se a U.V. como agente mutagênico. Obtendo-se dessa forma, marcas morfológicas e/ou auxotróficas associadas possivelmente a marcas de resistência à U.V.

Tabela 1. Porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem MT em diferentes tempos de irradiação à luz ultravioleta.

Tempo de irradiação (minutos)	Porcentagem de sobreviventes (%) Experimentos			
	1	2	3	Média
0	100	100	100	100
1	45,14	73,07	51,54	56,58
2	6,99	27,20	21,37	18,52
4	0,15	4,73	0,75	1,88
6	0,27	0,19	0,57	0,34

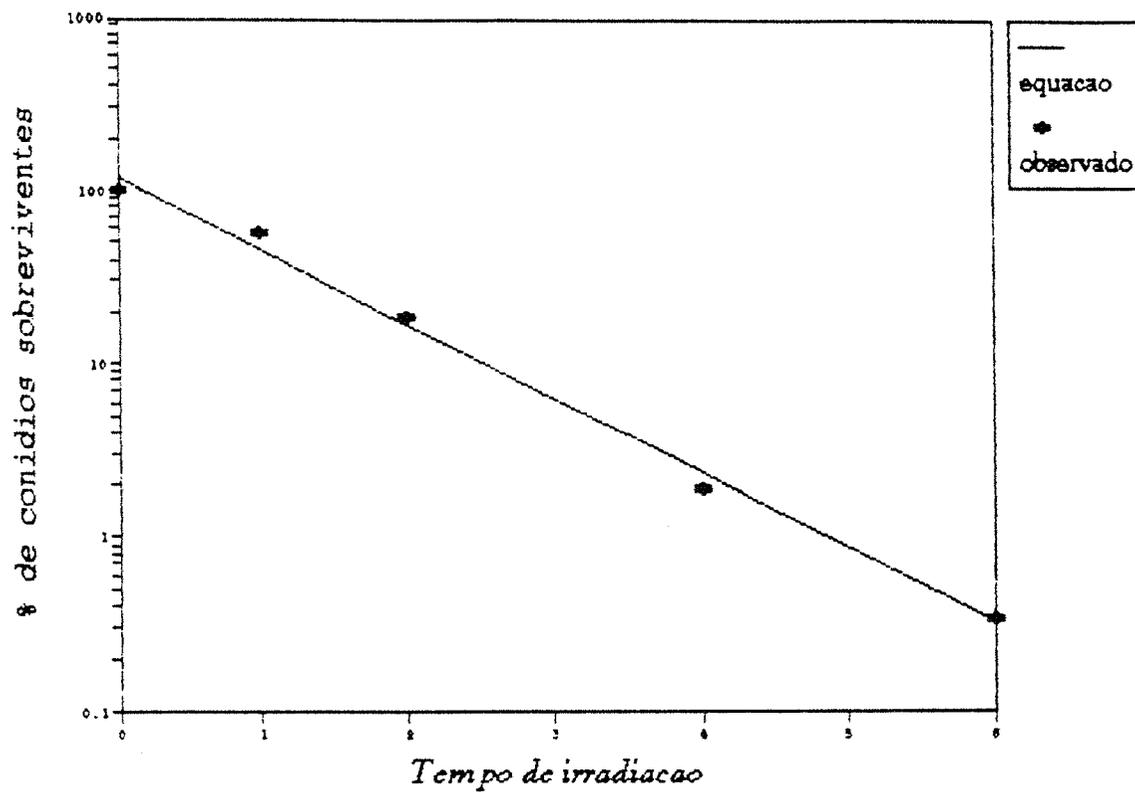


Figura 1. Curva de sobrevivência da linhagem MT de *Metarhizium anisopliae* à luz U.V.

4.2. Obtenção de marcadores genéticos

A obtenção de marcadores auxotróficos foi priorizada com o objetivo precípuo de se realizar cruzamentos intra e inter-linhagens.

Os mutantes obtidos estão relacionados na tabela 2. Vale ressaltar o fato de que o mutante MT2 portador de uma mutação morfológica para a coloração dos conídios (ylo) e uma auxotrófica para a síntese de aminoácido (met) foi obtido a partir de uma única irradiação com ultra-violeta. O mesmo aconteceu com os mutantes MT8 e MT10 que tiveram as mutações ylo e met obtidas a partir de uma irradiação do mutante MT5 (verde e nic), como pode ser observado na genealogia dos mutantes de *M. anisopliae*, linhagem MT (Figura 2).

Esse fato resultou em um ganho precioso de tempo, já que não houve a necessidade de uma primeira seleção de mutantes morfológicos para futuro tratamento com U.V. visando a obtenção de um duplo mutante (morfológico e auxotrófico). Isso é de cabal importância quando se extrapola para um programa de melhoramento genético, onde a redução de tempo em diferentes etapas do programa otimiza a obtenção de linhagens que combinem características favorá-

veis das parentais, em cruzamentos via mecanismo parassexual.

Ainda a respeito do programa de melhoramento genético do fungo entomopatogênico em questão, outro ponto a destacar é a importância de se obter marcadores genéticos sem que os mesmos alterem negativamente características sobejamente importantes para o mecanismo de infecção do fungo contra o inseto-hospedeiro, como por exemplo a esporulação. Em vista disso, vale ainda ressaltar a restauração do fenótipo selvagem no que tange à esporulação do mutante MT5, após um segundo tratamento (Figura 2), resultando em uma linhagem que manteve a marca nic sem perder o fenótipo supracitado (MT9).

Tabela 2. Mutantes da linhagem MT obtidos através da irradiação com ultravioleta.

Designação	Cor	Deficiência	Genótipo	OBS.
MT 1	verde	metionina (met)	met1	1
MT 2	amarelo	met	ylo1 met2	
MT 3	verde	lisina (lis)	lis1	1
MT 4	verde	lis	lis2	1
MT 5	verde	ác. nico- tínico (nic)	nic1	1
MT 6	amarelo	met lis	ylo1 met2 lis3	
MT 7	vio	met	vio1 met2	1
MT 8	amarelo	nic met	ylo2 nic1 met3	
MT 9	verde	nic	nic1	2
MT 10	amarelo	nic met	ylo3 nic1 met4	
MT 11	verde	nic lis	nic1 lis4	
MT 12	verde	nic tiamina (tia)	nic1 tia1	1

#1- mutante com baixa esporulação

#2- mutante com esporulação igual à selvagem

4.3. Teste de reversão

Alguns mutantes da linhagem MT foram ensaiados quanto à reversibilidade espontânea das suas marcas genéticas. Para tanto, não se semeou menos do que 10^6 conídios/placa em MM, exceto na linhagem MT3 com reduzida produção de esporos (tabela 2). O teste das marcas está relacionada na tabela 3.

Como pode ser observado pela tabela 3 os mutantes MT8 e MT10 reverteram a marca nic, não sendo por este motivo utilizados em outros experimentos.

No que concerne às linhagens que apresentaram crescimento residual, não tendo ocorrido o aparecimento de colônias em um ensaio inicial de reversão onde foram semeadas cerca de 10^5 colônias por placa, as mesmas foram consideradas aptas para experimentos *a posteriori*. O crescimento residual observado deve ter sido causado por uma possível contaminação de MC nas soluções de esporos em "Tween" 80 (0,1%).

Tabela 3. Teste de reversão espontânea dos mutantes da linhagem MT.

Mutantes	MM
MT2	-
MT3**	-
MT5	-
MT6	-
MT8	- *
MT9	-
MT10	- *
MT11	+/-
MT12	+/-

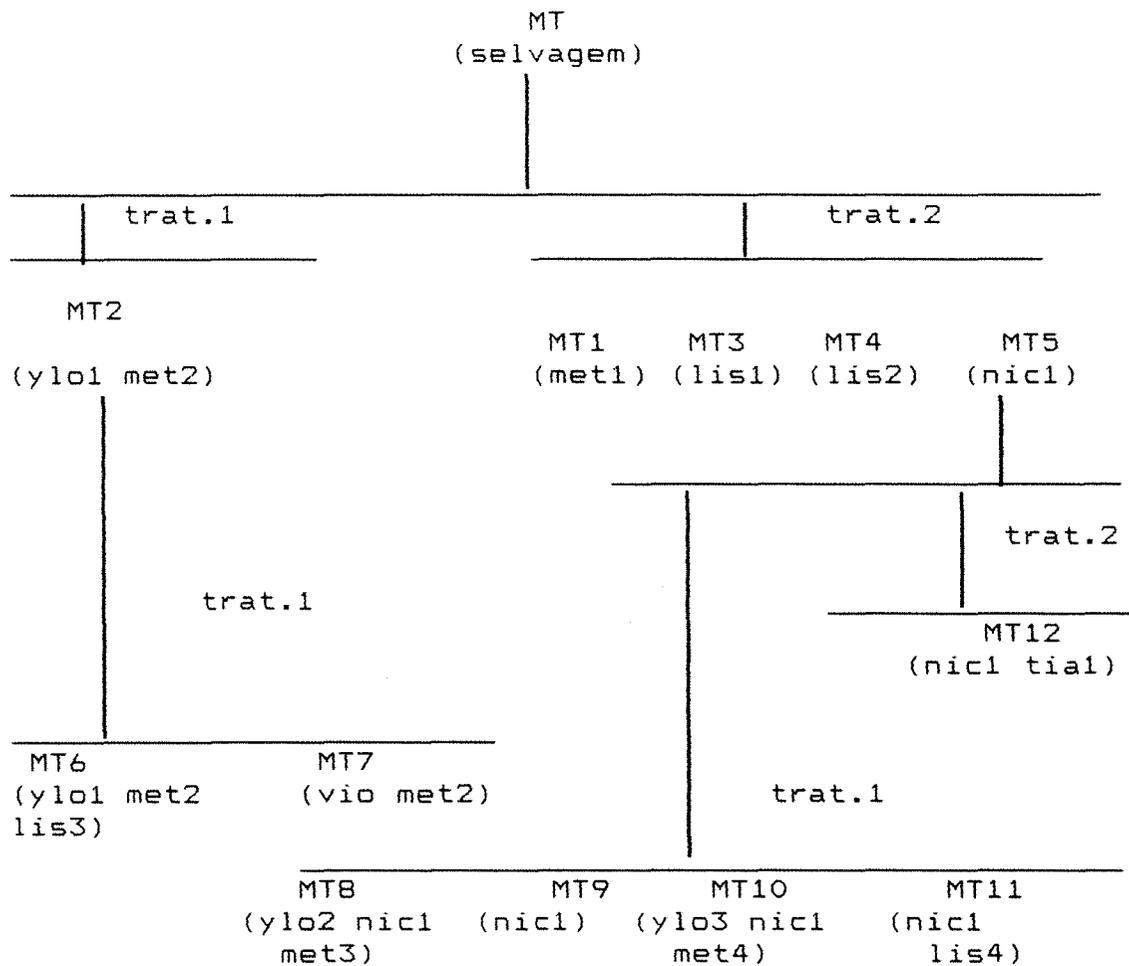
Legenda: - (= Ausência de crescimento)

+/- (= Crescimento residual)

* crescimento em MM+MET (reversão para a marca nic).

** foram semeados $2,35 \times 10^5$ conídios.

Figura 2. Genealogia dos mutantes da linhagem designada MT



LEGENDA: trat.1- irradiação com U.V. e isolamento total.
 trat.2- irradiação com U.V. e enriquecimento por
 filtração.

4.4. Parassexualidade e paramiose

4.4.1. Obtenção de heterocário

Heterocários foram obtidos segundo o item 3.6. e, como pode ser observado na tabela 4, no cruzamento intra-linhagem MT6+MT12 o heterocário apresentou-se pouco vigoroso, o mesmo ocorrendo com o cruzamento E6.7+MT12. Embora tenha sido obtido heterocário dentro da linhagem MT, este ocorreu com maior dificuldade do que os demais. Quando se tentou obter outros dentro da mesma linhagem original, estes só vieram a ocorrer numa frequência de 25% na segunda tentativa, não se logrando obtê-los em tentativas subsequentes.

SILVEIRA (1983) e SILVEIRA & AZEVEDO (1986) também relataram a não obtenção de heterocários dentro de uma linhagem (RJ) e entre linhagens (E6 e RJ), FRIGO (1983) também não obteve heterocário entre essas últimas, corroborando-se a dificuldade de se obter os mesmos em *M. anisopliae*.

No caso dos cruzamentos realizados no presente trabalho, uma explicação plausível para a dificuldade de obtenção de heterocários intra-linhagem, bem como o baixo

vigor apresentado pelos mesmos além do observado no heterocário E6.7+MT12, seja o fato do mutante utilizado nos mesmos (MT12) apresente auxotrofia para duas vitaminas que, em MM+4%MC (item 3.2.5.) dificulte a complementação das marcas ensaiadas devido ao crescimento residual das mesmas.

Ao contrário de SILVEIRA (1983), FRIGO (1983) e SILVEIRA & AZEVEDO (1986) que só obtiveram heterocário inter-linhagens através de fusão de protoplastos, conseguiu-se heterocários entre linhagens de diferentes origens via mecanismo parassexual. Estes últimos também foram obtidos por LUNA (1985), BAGALHI (1987) e VALADARES (1989).

Como controle para se verificar que os heterocários formados não resultaram de colônias revertentes de uma das linhagens cruzadas, tentou-se obter heterocários com cada linhagem em separado, sem a adição de uma outra linhagem com marcas complementares. A não obtenção de heterocários nessas condições indicou que a formação dos mesmos deveu-se à complementação das marcas empregadas. No caso do heterocário pouco vigoroso obtido intra-linhagem, como ocorreram dificuldades para a formação de outros semelhantes, poder-se-ia imaginar que os mesmos não eram decorrentes da complementação de marcas. Entretanto, como surgiram diferentes tipos de recombinantes, ficou demonstrado que era real-

mente um heterocário, e não efeito sinérgico entre linhagens.

4.4.2. Obtenção de recombinantes prototróficos e outros tipos de recombinantes.

Conídios coletados das colônias heterocarióticas foram semeados em diferentes meios (tabela 5) e a frequência de obtenção de colônias nos cruzamentos realizados entre as linhagens MT6+MT12 e E6.7+MT12 estão resumidos na tabela 6.

Não foi detectado recombinantes em MM com suplementação ou possíveis diplóides em MM nos cruzamentos entre as linhagens E9.20+MT11 e E6.2+MT11, onde as colônias oriundas dos heterocários supracitados só ocorreram em MC. VALADARES (1989) também observou o mesmo fenômeno em um outro cruzamento inter-linhagens (E6.8+E9.20).

Tabela 4. Coloração dos conídios e vigor dos heterocários obtidos em diversos cruzamentos entre mutantes de E6, E9 e MT

Cruzamento	Coloração dos conídios do heterocário	Vigor do heterocário
E9.20 + MT11 (ylo leu ade) +(nic lis)	amarelo esverdeado	vigoroso
MT.6 + MT.12 (ylo met ade) +(nic tia)	amarelo	pouco vigor
E6.2 + MT.11 (vio ade met) +(nic lis)	verde	vigoroso
E6.7 + MT.12 (vio met bio) +(nic tia)	verde	pouco vigor

Como pode ser observado na tabela 6, a frequência de colônias que cresceram nos meios nutritivos, no cruzamento MT6+MT12, variou entre $3,3 \times 10^{-3}$ a $6,1 \times 10^{-3}$, não ocorrendo diferença significativa na maioria dos meios, com ou sem suplementação. No cruzamento E6.7+MT12, a frequência variou de $4,3 \times 10^{-3}$ a 5×10^{-3} . Em alguns meios não houve crescimento (MM+met, MM+bio, MM+met+nic, MM+tia, MM+met+tia) talvez devido ao pequeno inóculo empregado (5×10^3). Algumas colônias obtidas nos diferentes meios seletivos foram caracterizadas quanto à morfologia e auxotrofia. Estes resultados estão na tabela 7. No cruzamento MT6+MT12, recuperou-se, pela sementeira de conídios do heterocário, somente recombinantes prototróficos em todos os meios seletivos empregados, ocorrendo prototróficos tanto de coloração verde selvagem quanto de coloração amarela, sendo que estes últimos foram os de maior incidência. Isso poderia ser explicado sob o ponto de vista de que por serem os diplóides de *M. anisopliae* relativamente instáveis (BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS, 1982), mais setores vigorosos (prototróficos) poderiam ser favorecidos (MAGOON & MESSING-AL-AIDROOS, 1986). VALADARES (1989), considerou que a alta frequência de tipos prototróficos ocorrida em um determinado cruzamento (E6.7+E6.8), poderia sugerir que esses se originaram de permuta mitóti-

ca. Essa hipótese também foi utilizada por BAGALHI (1987) para explicar a presença de recombinantes prototróficos selvagens em meio mínimo.

No cruzamento E6.7 + MT12 também foram encontrados recombinantes prototróficos, embora em um menor número do que no cruzamento anterior. As colônias provenientes do heterocário que cresceram em MC, foram transferidas para placas mestras em MC na disposição de 26 pontos e, com o auxílio de uma multialça, foram repicadas para MM mais os requisitos dos parentais em diferentes combinações (combinados dois a dois, três a três ou cada um individualmente), de tal maneira que pudessem ser determinadas as marcas recombinantes. Assim sendo feito, recuperou-se um recombinante que apresentava as marcas de um dos parentais mais a marca do outro parental (tabela 7) em uma frequência de 3,85% (analisadas 26 colônias).

Segundo SILVEIRA (1983), a ocorrência de um recombinante com mais marcadores genéticos que os presentes nas duas linhagens parentais evidencia a transferência gênica, sendo isso de fundamental importância em programas de melhoramento genético onde a transferência pode ser feita com marcadores de reconhecido valor em controle biológico.

Tabela 5. Cruzamentos realizados e tipos de meios seletivos utilizados na semeadura dos conídios para a obtenção de diplóides e recombinantes.

Cruzamentos	Meios seletivos
E9.20 + MT11	MM, MM+leu, MM+ade, MM+nic, MM+lis, MM+leu+nic, MM+leu+lis, MM+ade+nic, MM+ade+lis, MC
MT6 + MT12	MM, MM+met, MM+lis, MM+nic, MM+tia, MM+met+nic, MM+met+tia, MM+lis+nic, MM+lis+tia, MC
E6.2 + MT11	MM, MM+ade, MM+met, MM+nic, MM+lis, MM+ade+nic, MM+ade+lis, MM+met+nic, MM+met+lis, MC
E6.7 + MT12	MM+met, MM+bio, MM+met+nic, MM+nic+bio, MM+nic+tia, MM+met+bio, MM+tia, MM+tia+ bio, MM+nic, MM+met+tia, MM, MC

Tabela 6. Frequência de colônias obtidas a partir da semeadura de conídios provenientes de heterocários, em Meio Mínimo (MM) e em MM com diferentes suplementos nutricionais.

Heterocário	Meios seletivos
MT6+MT12	MC = $5,8 \times 10^{-1}$
	MM = $5,5 \times 10^{-3}$
	MM + Nic = $3,3 \times 10^{-3}$
	MM + LIS = $5,4 \times 10^{-3}$
	MM + TIA = $4,6 \times 10^{-3}$
	MM + MET = $5,2 \times 10^{-3}$
	MM + LIS + TIA = $5,2 \times 10^{-3}$
	MM + LIS + NIC = $6,1 \times 10^{-3}$
	MM + TIA + MET = $3,6 \times 10^{-3}$
	MM + MET + NIC = $5,3 \times 10^{-3}$
MT12+E6.7	MC = $1,1 \times 10^{-1}$
	MM = 1×10^{-4}
	MM + NIC = 5×10^{-5}
	MM + NIC + BIO = 5×10^{-5}
	MM + TIA + BIO = 5×10^{-5}
	MM + NIC + TIA = $4,7 \times 10^{-3}$
	MM + MET + BIO = $4,3 \times 10^{-2}$

Tabela 7. Recombinantes obtidos nos diferentes meios seletivos, com confirmação por análise auxonográfica .

Heterocário		Meio seletivo		Recombinantes obtidos	
				Tipos	Marca genética
MT6+MT12	MM+tia	prototrófico	amarelo	ylo	
	MM+lis	prototrófico	amarelo	ylo	
	MM+lis+nic	prototrófico	amarelo	ylo	
		prototrófico	verde	selvagem	
	MM+met+tia	prototrófico	amarelo	ylo	
	MM+met+nic	prototrófico	amarelo	ylo	
		prototrófico	verde	selvagem	
	MM+lis+tia	prototrófico	amarelo	ylo	
	MM+nic	prototrófico	amarelo	ylo	
		prototrófico	verde-claro		
MM	prototrófico	amarelo	ylo		
E6.7+MT12	MM+tia	prototrófico	verde	selvagem	
	MM+nic	prototrófico	verde	selvagem	
	MM	prototrófico	verde	selvagem	
	MC	auxotrófico	verde-claro(met		
				bio	tia)

4.4.3. Obtenção de diplóides e segregantes

LUNA (1985) sugeriu que colônias capazes de crescer em MM sem apresentar setores quando transferidas para MC, são diplóides estáveis, pois ao se comparar o diâmetro do núcleo destas com seus parentais observaram-se diferenças significativas, sendo os primeiros maiores.

No cruzamento MT6 + MT12, entre uma linhagem de coloração amarela e outra com coloração verde com pouca produção de esporos respectivamente, selecionou-se uma linhagem prototrófica verde com esporulação tipo selvagem. Este possível diplóide, proveniente do meio seletivo MM+met+nic, foi inoculado em MC + benlate nas concentrações de 1µg e 2µg/ml, vindo a setorizar na concentração de 2µg/ml.

Os setores foram analisados por auxonografia e, dos cinco segregantes do possível diplóide (R2), um apresentou-se com marcas de ambos parentais (a marca morfológica ylo do MT6 e a auxotrófica nic do MT12) e os quatro restantes apresentaram-se com a marca nic. Este tipo de segregação indicou ser esse recombinante prototrófico (R2) realmente um diplóide.

4.4.4. Análise da estabilidade e grau de ploidia dos recombinantes obtidos.

4.4.4.1. Crescimento em meio contendo benlate

UPSHALL *et alii* (1977), em um trabalho sobre a utilização do benlate para se distinguir entre linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus terreus*, verificaram que as linhagens haplóides são mais tolerantes do que as diplóides ao fungicida. Segundo eles, esta diferença propicia um meio fácil de se classificar a diploidia dos segregantes em análises pelo ciclo sexual e parassexual já que claramente, a tolerância ao fungicida é uma função da natureza haplóide do genoma, onde, após prolongada incubação, os diplóides tornam-se instáveis e setorizam, enquanto os haplóides permanecem estáveis.

Na tabela 8 estão sumarizados os resultados correspondentes ao crescimento das linhagens parentais e um recombinante prototrófico de coloração amarela (R1), durante 5 e 10 dias, em meio completo (MC) com diferentes concentrações de benlate, com que determinou-se as concentrações que inibiam o crescimento. Pôde ser observado que na concentração de 1 µg/ml de benlate houve uma considerável inibição do crescimento das colônias, tornando-se mais

acentuada em 2 µg/ml onde praticamente não houve crescimento. Isto foi semelhante ao encontrado por BAGALHI (1987), que também ensaiou dois mutantes e um recombinante prototrófico de coloração amarela.

Na tabela 9 estão os resultados atinentes ao tipo de crescimento das colônias de recombinantes prototróficos ou possíveis diplóides em MC ou MC + benlate (1 µg/ml de meio). Excetuando-se as linhagens R6, R7 e RH1, todas as demais produziram setores. Como os setores produzidos não eram vigorosos e/ou não apresentavam conidiação e/ou com um aspecto quase transparente, poder-se-ia inferir que as linhagens que setorizaram eram possivelmente hiperhaplóides ($n + x$) ainda em processo de haploidização, embora não se possa descartar a hipótese de serem diplóides.

Tabela 8. Medidas de crescimento em milímetro (diâmetro maior/diâmetro menor) das linhagens MT6, MT12 e recombinante 1, em diferentes concentrações de benlate em MC (média de 3 repetições).

conc. Benlate µg/ml meio	Linhagens					
	5 dias de cresc.			10 dias de cresc.		
	MT6	MT12	R1	MT6	MT12	R1
0,0	24/24	25/25	23/23	53/53	58/57	55/55
0,1	22/22	25/25	24/23	52/52	58/58	56/56
0,2	22/22	23/23	22/22	52/52	56/56	53/52
0,3	22/22	24/24	23/22	52/52	56/56	55/55
0,4	22/21	22/22	23/23	51/51	55/55	55/54
0,5	23/22	23/23	21/20	52/52	55/55	50/50
1,0	8/8	7/7	12/12	28/27	28/28	39/39
2,0	2/2	3/2	1/1	8/6	13/12	6/6

Tabela 9. Características de crescimento de alguns recombinantes em MC e em MC + benlate (1µg/ml).

Recombinante*		Característica de crescimento	
Designação protocolar	Tipo	MC	MC + benlate(1µg/ml)
R2	prot.verde	estável	com emissão de setor
R4	prot.amarelo	estável	com emissão de setor
R5	prot.amarelo	estável	com emissão de setor
R6	prot.amarelo	estável	sem emissão de setor
R7	prot.amarelo	estável	sem emissão de setor
R9	prot.amarelo	estável	com emissão de setor
RH1	prot.verde	estável	sem emissão de setor
RH2	prot.verde	estável	com emissão de setor
RH3	prot.verde	estável	com emissão de setor

* de R2 a R9 constituem recombinantes obtidos no cruzamento MT6+MT12, de RH1 a RH3 no cruzamento E6.7+MT12

4.4.4.2. Análise citológica dos conídios.

Na tabela 10 estão sumarizados os resultados das medidas dos conídios de dois mutantes e dois recombinantes com cerca de 10 dias de crescimento onde observou-se um comprimento maior dos conídios do R1 em relação aos parentais (MT6 e MT12), embora a largura dos conídios não tenha diferido. O R2 apresentou um comprimento dos conídios inferior às linhagens paternas embora com uma largura similar. Em geral, poder-se-ia dizer não haver diferenças significativas que denotem uma não similariedade quanto ao estado de diploidia das linhagens observadas.

MESSIAS & AZEVEDO (1980) e AL-AIDROOS (1980) não observaram diferenças significativas entre os conídios das linhagens diplóides e haplóides, enquanto BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982) verificaram que os conídios das linhagens diplóides eram significativamente maiores do que das haplóides, tendo sido essa característica utilizada para confirmarem a identificação de diplóides.

Tabela 10. Medida (comprimento/largura) dos conídios de diferentes linhagens de *M. anisopliae* (média de 10 medidas)

Linhagem	Medida (μm)
MT6	9,68/4,27
MT12	9,55/4,69
R1	11,22/4,97
R2	8,72/4,53

Na tabela 11 encontra-se a frequência de conídios uninucleados e binucleados em diferentes linhagens. Observou-se que praticamente 100% dos conídios são uninucleados. SILVEIRA (1983), confirmando os dados de MESSIAS & AZEVEDO (1980), verificou a inexistência de conídios binucleados entre linhagens diplóides e hiperhaplóides e presença de baixa frequência de conídios binucleados entre os haplóides parentais (variando de 2% a 4,75%).

Tabela 11. Frequência de conídios uninucleados e binucleados em diferentes linhagens e recombinantes - contagem de 400 conídios.

Linhagem	Conídios(%)	
	uninucleados	binucleados
MT12	99,75	0,25
MT6	99,75	0,25
R1	100,0	0,0
R2	99,75	0,25
R3	100,0	0,0
R4	100,0	0,0
R5	99,50	0,50
R6	100,0	0,0
R7	100,0	0,0

4.4.4.3. Determinação da quantidade de DNA

Na tabela 12 estão sumarizados os resultados obtidos da absorbância em função da quantidade de DNA, com os quais determinou-se a equação da reta e obteve-se a curva padrão (Figura 3). Na tabela 13 encontram-se os dados referentes à absorbância das linhagens parentais e recombinantes, além das quantidades de DNA (obtidas pela média das diferenças das absorbâncias em 595 e 700 nm nas duas repetições). Pelos resultados apresentados, onde não ocorreram diferenças significativas entre as quantidades de DNA das linhagens em questão, poderia-se dizer que estão todas no estado haplóide. A determinação da quantidade de DNA é o método mais seguro para se diferenciar diferentes graus de ploidia em fungos (VAN TUYLL, 1977; JACKSON & HEALE, 1985 e BAGAGLI, 1987).

De maneira semelhante a BAGALHI (1987), não foram detectados diplóides heterozigotos estáveis, com posterior haploidização e surgimento de setores haplóides, em oposição ao observado por MESSIAS (1979), MESSIAS & AZEVEDO (1980) e AL-AIDROOS (1980). Como o recombinante R2 não teve a sua condição diplóide confirmada pela quantificação de DNA dos conídios, apesar de ter sido assim classi-

ficado anteriormente devido à sua setorização na presença de benlate, dando um setor que combinava características de ambos parentais, poderia-se, em hipótese, afirmar que a linhagem que teve o seu DNA quantificado (R2), era na realidade um recombinante prototrófico haplóide do diplóide inicialmente tratado com benlate, que sendo altamente instável haploidizou-se rapidamente. Este fenômeno já foi observado em outros fungos com ciclo parassexual como por exemplo no fungo entomopatogênico *Verticillium* (HASTIE, 1962; HASTIE, 1964; TYPAS & HEALE, 1977; HASTIE & HEALE, 1984 e JACKSON & HEALE, 1987).

HASTIE (1962, 1964) estudando o ciclo parassexual em *Verticillium albo-atrum* observou uma alta frequência de conídios haplóides (95%) em diplóides com três semanas de crescimento, apontando uma alta instabilidade dos diplóides obtidos.

HASTIE & HEALE (1977), em um estudo sobre os níveis de ploidia em diferentes linhagens de *Verticillium* usando um "Coulter counter", detectaram uma rápida haploidização dos diplóides onde a proporção de conídios diplóides caía marcadamente na segunda e terceira semana de crescimento, sendo que no final da quarta semana quase todos os conídios eram haplóides.

JACKSON & HEALE (1987), trabalhando com o *Verticillium lecanii*, verificaram que os diplóides heterozigotos geralmente tendem a ser instáveis, haploidizando-se. Apesar disso, esses autores conseguiram isolar quatro diplóides que permanecerem estáveis por 3 a 4 semanas em meio artificial.

Tabela 12. Absorbância observada em função da concentração de DNA em 595 e 700 nm, para a obtenção da equação de regressão (duas repetições).

DNA($\mu\text{g/ml}$)	Absorbância						
	595nm		700nm		diferença (595-700nm)		
	1	2	1	2	1	2	média
5	.060	.214	.036	.137	.024	.077	.0505
10	.148	.257	.025	.142	.123	.115	.1190
20	.266	.325	.076	.125	.190	.200	.1950
40	.445	.465	.065	.123	.380	.342	.3610

Equação de regressão: $y = 0,0086 \cdot x + 0,0202$ *

Coefficiente de correlação: $r = 0,9968$

* y = Absorbância; x = quantidade de DNA

Tabela 13. Quantidade de DNA das diferentes linhagens obtida através da diferença da absorbância nos comprimentos de 595 e 700 nm e substituição na equação de regressão.

Linh. DNA	Absorbância						Quant. ($\mu\text{g/ml}$)	
	595nm		700nm		diferença (595-700nm)			
	1	2	1	2	1	2		média
MT6	.127	.158	.083	.108	.044	.050	.0470	3.1203
MT12	.125	.150	.086	.100	.039	.050	.0445	2.8295
R1	.173	.219	.123	.154	.050	.065	.0575	4.3416
R2	.143	.227	.106	.187	.037	.040	.0385	2.1316

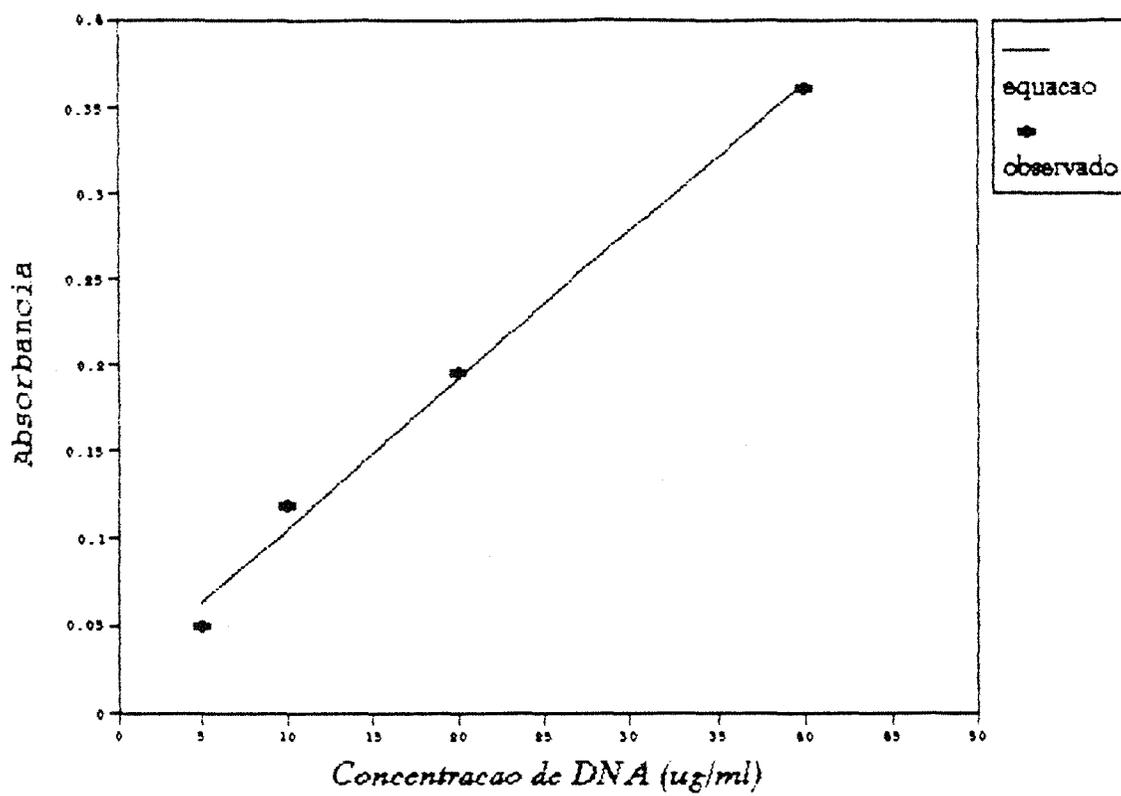


Figura 3. Curva padrão de absorvância em função da concentração de DNA.

4.5. Caracterização eletroforética (padrão de esterases) de linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

Padrões de esterases têm sido utilizadas para a caracterização de linhagens selvagens e mutantes de *Metarhizium anisopliae* (VALADARES, 1989). Realizou-se a caracterização eletroforética para esterases de linhagens selvagens, mutantes (tipos parentais) e recombinantes prototróficos do cruzamento E6.7 + MT12. As figuras 4 e 5 mostram o padrão de bandas de esterases para as linhagens em pauta.

Como pode ser observado na figura 5, não foram detectadas diferenças entre as linhagens selvagens MT e E6, indicando uma possível proximidade filogenética entre ambas, podendo ainda as duas linhagens constituir uma única que provavelmente foi transportada para o Mato Grosso do Sul a partir do Espírito Santo. Com o objetivo de dirimir dúvidas a cerca da similaridade do padrão dessas linhagens, realizou-se um eletroforese utilizando-se micélios de culturas com 10 dias de crescimento. Dessa forma esperar-se-ia o aparecimento de novas bandas nas referidas linhagens devido ao anabolismo diferenciado das mesmas em outras fases do crescimento. Como pode ser observado na figura 6, o mesmo não se confirmou, apresentando em contra-

partida uma ausência de bandas que se encontravam presentes na eletroforese em que foram utilizados micélios de culturas com 7 dias de crescimento.

Segundo ALFENAS *et alii* (1991), para a extração de proteínas para eletroforese em fungos, deve-se coletar o micélio de todas as culturas na fase exponencial de crescimento, para reduzir a ação de enzimas proteolíticas e a expressão de genes em função da diferenciação dos tecidos. A ação de enzimas proteolíticas pode ser uma explicação plausível para o desaparecimento de bandas na eletroforese de linhagens com 10 dias de crescimento em relação às de 7 dias. Eletroforese de proteínas utilizando-se culturas crescidas a 28°C durante 7 dias, foi empregada por De CONTI *et alii* (1980) para a caracterização de onze linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

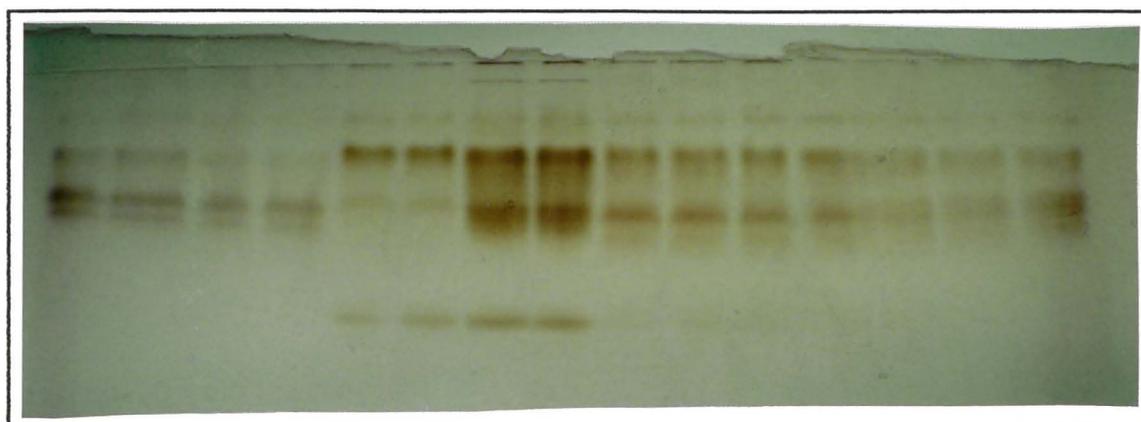
Como pode ser observado na figura 5, a linhagem mutante E6.7 apresenta um número de bandas superior à selvagem E6 da qual foi obtida. A linhagem MT12 não apresenta uma banda encontrada na linhagem selvagem MT (banda 4), embora possua uma banda de esterase, observada por De CONTI *et alii* (1980), como sendo característica nas diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Esta banda também encontra-se ausente na linhagem E6. VALADARES

(1989), utilizando a linhagem E6 obtida no mesmo estoque da linhagem empregada neste trabalho, observou um padrão de esterases semelhante, sugerindo, após comparar com o padrão da linhagem em questão reisolada em inseto (E6.01), que a ausência dessa banda na linhagem E6 pode estar ligada à sucessivas repicagens em laboratório. Ainda segundo essa autora, manipulações em laboratório podem produzir alterações nas linhagens de *Metarhizium anisopliae*, principalmente no que se refere à patogenicidade, podendo este fato estar relacionado à produção de enzimas.

Embora não tenha sido possível diferenciar as linhagens selvagens baseado nos seus respectivos padrões de esterases (culturas de 7 e 10 dias), essa diferenciação tornou-se presente no que tange às linhagens mutantes. Em vista disso, foi factível a distinção das linhagens recombinantes como sendo de um ou outro tipo parental. Como pode ser observado na figura 5, as linhagens recombinantes RH1 e RH2 possuem o mesmo padrão da linhagem parental E6.7, enquanto o recombinante RH3 não apresenta uma das bandas do parental supracitado, apontando um possível estado aneuoplóide do mesmo.

Segundo o observado nas figuras 4,5 e 6, nenhum dos recombinantes prototróficos de coloração verde

analisados quanto ao padrão de esterases, é diplóide.



1 1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 7

1. Linhagem selvagem MT

2. Linhagem selvagem E6

3. Linhagem mutante MT12

4. Linhagem mutante E6.7

5. Recombinante RH1

6. Recombinante RH2

7. Recombinante RH3

Figura 4: Eletroforese em gel de poliacrilamida. Padrões de esterases em diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

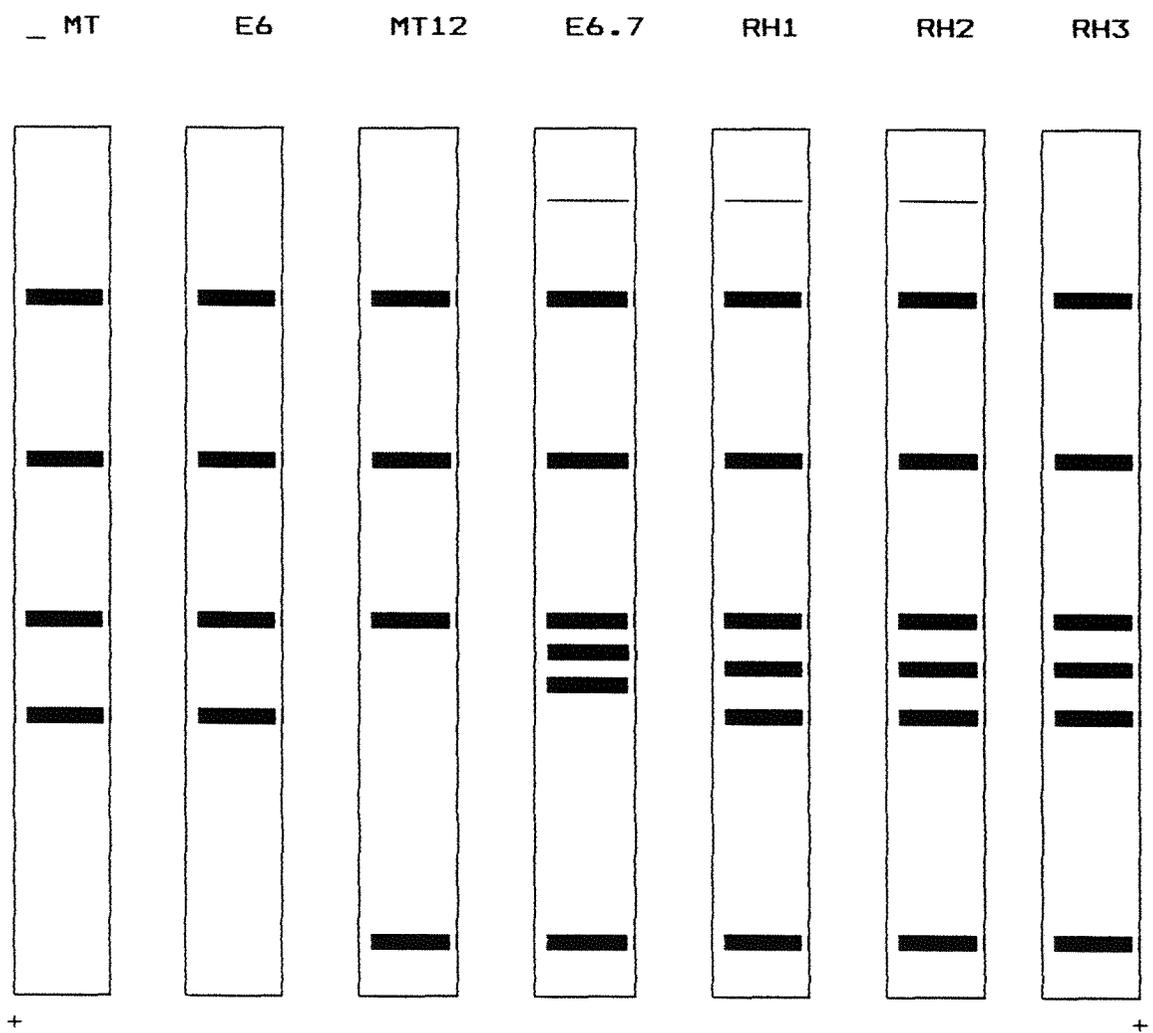


Figura 5: Esquema obtido a partir dos padrões de esterases de linhagens de *Metarhizium anisopliae* com 7 dias de crescimento.

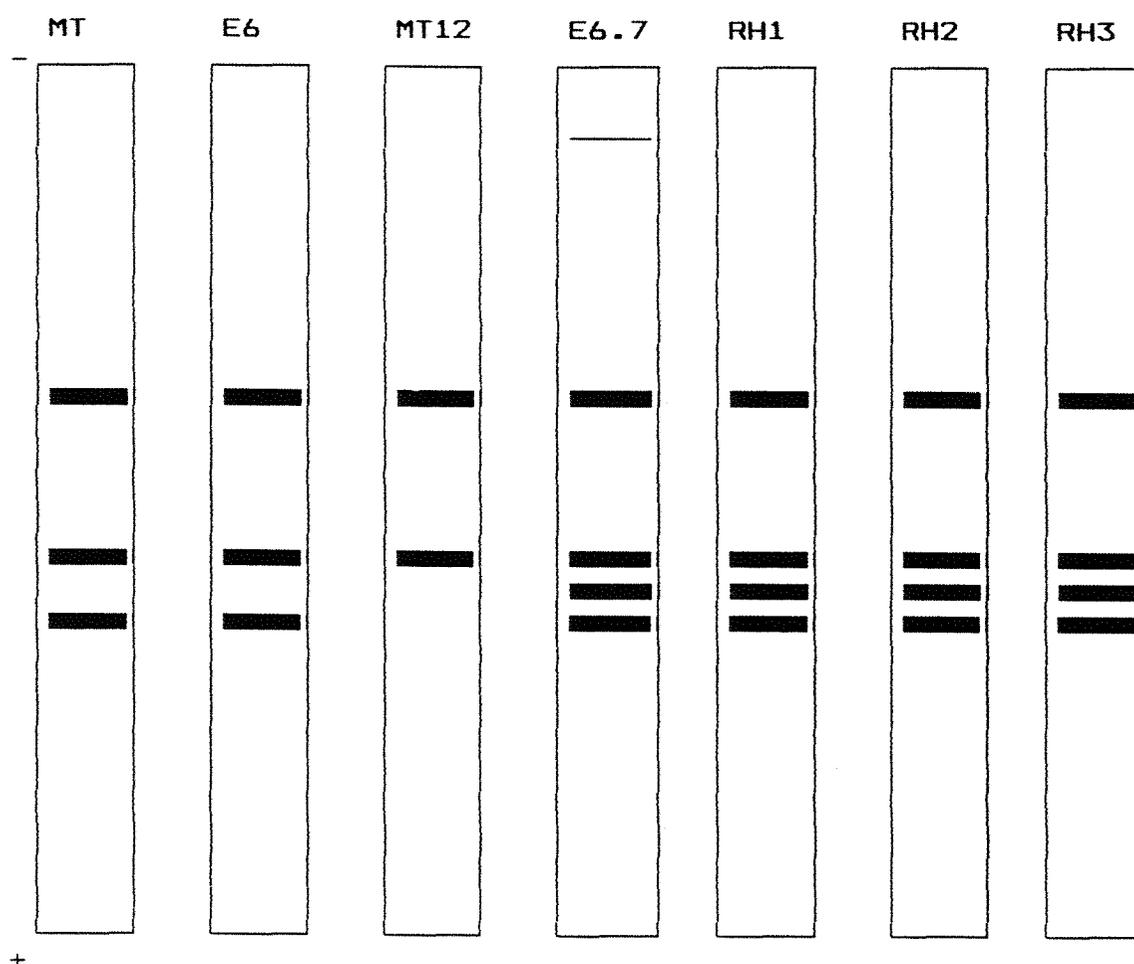


Figura 6: Esquema obtido a partir dos padrões de esterases de linhagens de *Metarhizium anisopliae* com 10 dias de crescimento.

5. CONCLUSÕES

1. A técnica de obtenção de heterocários de INGLE & HASTIE (1974), mostrou ser eficiente na obtenção de heterocários entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*.
2. A ocorrência de um diplóide instável, com uma rápida haploidização, bem como a recuperação de recombinantes sem o prévio isolamento de um diplóide estável, confirmam a ocorrência de parameiose nesta espécie.
3. Segundo o padrão de esterases, existe uma elevada homologia entre as linhagens MT e E6, podendo as mesmas virem a constituir uma única linhagem que tenha sido transportada de uma região (Espírito Santo) para outra (MT do Sul).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-AIDROOS, K. Demonstration of parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetic and Cytologia*, Ottawa, 22:309-14, 1980.
- AL-AIDROOS, K.M. & ROBERTS, D.W. Mutantes of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquitoes larvae. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, Ottawa, 20:211-9, 1978.
- AL-AIDROOS, K.M. & SEIFERT, A.M. Polysacharide an protein degradation, germination, and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 36:29-34, 1980.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. *Ele-troforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essên-cias florestais*. MinasGerais, Viçosa, U.F.V., 1991.242p.

ALLARD, G.B.; CHASE, C.A.; HEALE, J.B.; ISAAC, J.E.; PRIOR, C. Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a mycoinsecticide for control of sugarcane froghopper, *Aeneolamia varia saccharina* (Hemiptera: Cercopidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 55:41-6, 1990.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B., Coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. cap.6, p.73-126.

ALVES, S.B. & NOGUEIRA. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., Londrina, 1984. *Resumos*. Londrina, 1984. p.170.

ALVES, S.B.; RISCO, S.H.; SILVEIRA NETO, S.; MACHADO NETO, R. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. to *Diatrea saccharalis* (Fabr.). *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*, Hamburg, 97:403-6, 1984.

AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 2:3-15, 1976.

AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético de fungos utilizados no controle biológico de insetos: utilização do processo parameiótico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 84 (supl.III):27-9, 1989.

AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, Ed. Nacional, EDUSP, 1973. 288p.

AZEVEDO, J.L. & MESSIAS, C.L. Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos. In: Azevedo, J.L., coord. *Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*. Piracicaba, FEALQ, 1985. cap.I.4, p.111-4.

BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1987. 123p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP).

BAGAGLI, E.; VALADARES. M.C.C. and AZEVEDO, J.L. Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 14: 261-71, 1991.

BERGERON, D. & AL-AIDROOS, K.M. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomogenous fungus, *Metar-*

hizium anisopliae. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, Ottawa, 24:643-51, 1982.

BONATELLI JR., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 6:399-405, 1983.

BORDAT, D.; ROBERT, P.; RENAND, M. Sensibilité de *Liriomiza trifolii* (Burgess) et *L. sativae* Blanchard (Diptera, Agromyzidae) à onze souches de champignons entomopathogènes. *L'Agronomie Tropicale*, Paris, 43:68-73, 1988.

BURGES, H.D. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. London, Academic Press, 1981.949p

CORREA, G.S. & AZEVEDO, J.L. Influência da radiação solar na viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. *Rev. Agric.*, Piracicaba, 61:119-30, 1986.

De CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, Basel, 36:293-4, 1980.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; PACHECO, M.R. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria Bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 40:1103-5, 1988.

FERRON, P. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annual Review Entomological Society*, Stanford, 23:409-42, 1978.

FRIGO, S.M. Variabilidade e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, 1983. 119p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP).

GARCIA, A.T.E.; SOUZA, H.M.L.; MESSIAS, C.L.; PIEDRABUENA, A.E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* nas diferentes fases de desenvolvimento de *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera, Tephritidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, 33:17-23, 1989.

GILES, K.W. & MYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*, London, 206:93, 1965.

- GOETTEL, M.S.; S. LEGER, R.J.; BHAI RI, S.; JUNG, M.K.;
OAKLEY, B.R.; ROBERTS, D.W. and STAPLES, R.C. Pathogeni-
city and growth of *Metarhizium anisopliae* stably trans-
formed to benomyl resistance. *Current Genetics*, Berlin,
17:129-32, 1990.
- HASTIE, A.C. Genetic recombination in the hop-wilt fungus
Verticillium albo-atrum. *Journal of General Microbio-*
logy., London, 27:373-82, 1962.
- HASTIE, A.C. The parasexual cycle in *Verticillium albo-*
atrum. *Genet. Res.*, Cambridge, 5:305-15, 1964.
- HASTIE, A.C. & HEALE, J.B. Genetics of *Verticillium*. *Phyto-*
path. mediterr., 22:130-62, 1984.
- HEALE, J.B.; ISAAC, J.E.; CHANDLER, D. Prospects for strain
improvement in entomopathogenic fungi. *Pesticide Scien-*
ce, Essex, 26:79-92, 1989.
- HIND, M.; NAKAYAMA, O.; TSURUMI, Y.; ADACHI, K.; SHIBATA,
T.; TERANO, H.; KOHSAHA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H.
Studies of an immuno-modulator, swainsonine. I. Enhance-
ment of immune response by swainsonine in vitro. *J.*
Antibiotic., Tokyo, 38: 926-35, 1985.

- HUBER, J. Untersuchungen zur physiologie insektentotender pilze. *Archiv fur Mikrobiologie*, Berlin, 29: 257-76, 1958.
- INGLE, M.R. & HASTIE, A.C. Environmental factors affecting the formation of diploids in *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 62: 313-21, 1974.
- ITO-KAGAWA, M.; KOYAMA, Y.; KONDO, S. Peptide antibiotic K-582 production in relation to amino acid metabolism in *Metarhizium anisopliae*. *J. Antibiotic.*, Tokyo, 37: 487-93, 1984.
- JACKSON, C.W. & HEALE, J.B. Relationship between DNA content and spore volume in sixteen isolates of *Verticillium lecanii* and two new diploids of *V. dahliae* (= *V. dahliae* var. *longisporum* Stark). *Journal of General Microbiology*, London, 131:3229-36, 1985.
- JACKSON, C.W. & HEALE, J.B. Parasexual crosses by hyphal anastomosis and protoplast fusion in the entomopathogen *Verticillium lecanii*. *Journal of General Microbiology*, London, 133:3537-47, 1987.

KAAYA, G.P.; KOKWARD, E.D. and MURITHI, J.K. Mortalities in adult *Glossina morsitans morsitans* experimentally-infected with the entomogenous fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Discovery innovation*, 3:55-60, 1991. Apud *Biological Abstracts*, 93:AB-575, 1992. (Resumo)

KINO, T.; INAMURA, N.; NAKAHARA, K.; KIYOTO, S.; GOTO, T.; TERANO, H.; KOHSAKA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H. Studies of an immunomodulator, swainsonine. II. Effect of swainsonine on mouse immunodeficient system and experimental murine tumor. *J. Antibiot.*, Tokyo, 38:936-40, 1985.

LECUONA, R.E.; FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; BLEICHER, E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. à broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1887) (Coleoptera: Scolytidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Itabuna, 15:21-7, 1986. Suplemento.

LIHNELL, D. Grönmykos förorsakeo an *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. II. Fisiologiska Undersökningar över grönmykosens swamps. Stat. Växtskyodsanst. *Stockholm meddel*, 43:59-90. Apud: MESSIAS, C.L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979. 73p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura

"Luiz de Queiroz"/USP).

LIU, S.D.; LIN, S.C.; SHIAU, J.F. Microbial control of coconut leaf beetle (*Brontispa longissima*) with green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 53:307-14, 1989.

LUNA, E.A. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Rio de Janeiro, 1985. 260p. (Doutorado- Universidade Federal do Rio de Janeiro).

MAGOON, J. & MESSING AL-AIDROOS, K. Epistatic relationships and linkage among colour markers of the imperfect entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, Ottawa, 28: 96-100, 1986.

MARINHO, T.Q.; MacCORD, J.R.; PERES-MARQUES, L.M. Use of some strains of *Metarhizium anisopliae* as biological control of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835), (Hemiptera: reduviidae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 82:190, 1987.

(Suplemento)

MARTINS, J.F.S.; MAGALHÃES, B.P.; LORD, J.C.; FERREIRA, E.; ZIMMERMANN, F.J.P. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Heteroptera, Pentatomidae) percevejo do grão de arroz. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Itabuna, 16:81-91, 1987.

MESSIAS, C.L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979. 73p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Parassexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transaction of the British Mycological Society*, London, 75:473-7, 1980.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. Piracicaba, 1988. 193p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

PONTECORVO, G. & ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploid in *Aspergillus*

nidulans. *Journal of General Microbiology*, London, 6:VIII, 1952.

RIBA, G.; RAKOTONIRAINY, M.; BRYGOO, Y. Phylogenic relationships within the genus *Metarhizium*. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL , 5., Australia, 1990. *Proceedings*. Adelaide, Australia. p.125-31.

RICO, S. & VICTORIA, J.L. Evaluación e identificación de microorganismos patógenos de *Perkinsiella saccharicida* (Hom. Delphacidae) en caña de azúcar. *Acta Agronómica*, Palmira, 38:31-40, 1988.

ROBERTS, A. & MESSING-AL-AIDROOS, K. Acid production by *Metarhizium anisopliae*, effects on virulence against mosquitoes and on detection of "in vitro" amylase, protease and lipase activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 45:9-15, 1985.

ROMBACH, M.C.; HUMBER, R.A.; EVANS, H.C. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf and planthoppers of rice. *Transaction of the Britsch Mycological Society*, London, 88:451-9, 1987.

- SAJAP, A.S. and KAUR, K. Histopathology of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus, infection in the termite, *Coptotermes curvignathus*. *Pertanika*, 13:331-4. 1990. Apud *Biological Abstracts*, 92: AB-330,1991. (Resumo)
- SAMUELS, K.D.Z.; HEALE, J.B.; LLEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 53:25-31, 1989.
- SHAW, C.R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, 4:297-9, 1970.
- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. Virulência de mutantes e revertentes de exoenzimas de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 38:814, 1985.
- SILVEIRA, W.D. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, 1983. 153p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 7:1-8, 1984.
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 9:149-52, 1987.
- STIMAC, J.L.; CAMARGO, M.T.V.; ALVES, S.B. Suscetibilidade de *Solenopsis* spp. a diferentes espécies de fungos entomopatogênicos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Itabuna, 16 :377-88, 1987.
- ST. LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D.WW.; AND STAPLES, R.C. Prepenetration events during infection of host cuticule by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 58:168-79, 1991.
- TINLINE, R.D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, Lancaster, 63:713-21, 1971.
- TINLINE, R.D. & NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, Lan-

caster, 63:701-12, 1971.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium anisopliae*. *Transaction of the British Mycology Society*, London, 66:407-11, 1976.

TYPAS, M.A. & HEALE, J.B. Analysis of ploidy levels in strains of *Verticillium* using a Coulter Counter. *Journal of General Microbiology*, London, 101:177-80, 1977.

UPSHALL, A.; GIDDINGS, B.; MORTIMORE, I.D. The use of Benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *A. terreus*. *Journal of General Microbiology*, London, 100:413-8, 1976.

VALADARES, M.C.C. Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1989. 160p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VAN TUYL, J.M. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Meded. LandbHoogesch. wageningen*, 77:77-2, 1977.

VEEN, K.H. A technique for monospore cultures and determi-

nation of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 9:276-8, 1967.

VEEN, K.H. Reserches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Meded. LandbHogesch. Wageningen*, 68:1-77, 1968.

VEGA, M.E. Aspectos genéticos da parameiose via fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1990. 95p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VEGA, M.E., AZEVEDO, J.L. e PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Análise da Parameiose em *Metarhizium anisopliae* via fusão de protoplastos. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 18., São Paulo, 1992. *Programas e Resumos*. São Paulo, 1992. p.129.

VEIGA, A.F.S.L. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. como opção para o controle biológico das cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: *ceropidae*) no Estado de Pernambuco. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, (1):3-4, 1979.

VILACORTA, A. Efeito da temperatura e nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorok. In: III CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA e V CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, Bahia, 1978. *Resumos*, Bahia, 1978. p.70.

ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 53:307-14, 1989.