

PARAMEIOSE EM *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

EDUARDO BAGALHI

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
SETEMBRO - 1987

Aos meus pais,

Francisco Bagalhi e

Eunice Squarça Bagalhi,

irmãos e

amigos

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

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

- . Ao Dr. *João Lúcio de Azevedo*, pela orientação exemplar, amizade e apoio constante.
- . Aos *Colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos*, pelos auxílios nas horas difíceis, trocas de experiência e saudável convivência.
- . À Dra. *Aline A. Pizzirani Kleiner* e ao Dr. *Itamar Soares de Melo*, pelos estímulos, apoio e boa amizade.
- . Ao Dr. *Yoshitaka Tanaka*, pelo auxílio e sugestões nas análises citológicas.
- . Aos Pesquisadores, *Bonifácio Peixoto Magalhães*, *Eliane Dias Quintela* e ao Dr. *Francisco J.P. Zimmermann*, do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão - EMBRAPA, pelas facilidades e sugestões apresentadas na reali-

zação do bioensaio de patogenicidade.

- . À Dra. *Terue Sadatsune*, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IBBMA - UNESP - Botucatu, pela revisão do texto e sugestões apresentadas.
- . Aos Funcionários, *Antonio Rocha Campos*, *Carlo A. Nolasco* e *Sandra R. Campos*, do Laboratório de Genética de Microrganismo, pela valiosa ajuda na execução de toda a parte experimental.
- . Ao Dr. *Carlos Roberto Padovani*, do Departamento de Bioestatística - IBBMA - UNESP - Botucatu, pelo auxílio nas análises estatísticas.
- . Ao Dr. *Fausto Foresti* e Dr. *Wilham Jorge*, do IBBMA - UNESP - Botucatu, pela amizade e incentivo no ingresso da Pós-Graduação.
- . Ao Prof. *Claúdio Costa*, do Departamento de Genética, do IBBMA - UNESP - Botucatu, pela amizade e versão do "Summary".
- . À Bibliotecária *Nilce T.P. Sigrist* e as Funcionárias, Dna. *Olivia* e *Terezinha*, da

Biblioteca do Instituto de Genética, ESALQ, por todas as facilidades oferecidas na localização de material bibliográfico.

- . À Bibliotecária *Enilze de S. Nogueira Volpato* e aos Funcionários, *Alice, Petry e Tereza*, da Biblioteca da UNESP - Botucatu, também pelos auxílios nos trabalhos de bibliografia.
- . Aos Professores e Funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBBMA - UNESP - Botucatu, pela boa acolhida e facilidades oferecidas na elaboração da dissertação.
- . Aos amigos, *Ana, Arnaldo, Bel, Ima e Tânia*, pela amizade e convivência.
- . Aos colegas da Associação de Pós-Graduandos da ESALQ, pelas lutas e conquistas em prol dos pós-graduandos.
- . À *Andrêa Claudia Pagliarini*, pelo carinho, apoio e estímulo.
- . À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão de bolsa no início do mestrado.

- . À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão de bolsa.

- . À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, pelos auxílios e facilidades oferecidas na realização do projeto.

- . À Sra. *Ivonete Aparecida Dorini de Aguiar e Silva*, pelo excelente trabalho de datilografia.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xviii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	4
2.2. O ciclo parassexual	8
2.3. A parameiose em fungos	13
2.4. Obtenção de linhagens melhoradas de <i>M. anisopliae</i> para o controle biológico	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Linhagens utilizadas	20
3.2. Meios de cultura e soluções uti- lizadas	20
3.3. Preparo de filtros, palitos de transferência e esterilização	30
3.4. Sobrevivência à luz ultravioleta	31

3.5. Produção de protoplastos (SILVEIRA & AZEVEDO, 1987)	35
3.6. Obtenção de heterocários (MESSIAS & AZEVEDO, 1980)	36
3.7. Teste da estabilidade em MC com Benlate	38
3.8. Coloração de conídios e protoplastos (TANAKA et al., 1979)	38
3.9. Extração e quantificação de DNA de conídios	39
3.10. Avaliação da patogenicidade de linhagens selvagens e recombinantes de <i>M. anisopliae</i> em larvas e adultos do inseto <i>Chalcodermus bimaculatus</i> , manhoso, praga de Caupi	42
4. RESULTADOS	48
4.1. Sobrevivência à luz ultra violeta	48
4.2. Mutantes morfológicos obtidos	52
4.3. Mutantes auxotróficos obtidos	54
4.4. Obtenção, regeneração e citologia de protoplastos	59
4.5. Teste de reversão	65
4.6. Obtenção de heterocários	65
4.7. Detecção da ocorrência de paramiose	68
4.8. Virulência de linhagens selvagens e recombinantes de <i>M. anisopliae</i>	

	ix.
em larvas de <i>C. bimaculatus</i>	92
4.9. Virulência de linhagens selvagens e recombinantes de <i>M. anisopliae</i> em adultos de <i>C. bimaculatus</i>	103
5. CONCLUSÕES	105
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema dos tratamentos utilizados para a obtenção dos mutantes auxotróficos 34
- Figura 2 - Torre calibrada de pulverização direta. CNPAF, Goiânia, GO. 1987. 45
- Figura 3 - Curva de sobrevivência dos isolados E6, E9 e RJ de *M. anisopliae* em diferentes tempos (minutos) de irradiação à luz ultravioleta 51
- Figura 4 - Protoplastos de *M. anisopliae* linha gem RJ *viol*, aumento 1000 x, obtidos após 3 horas de digestão com enzimas Sturge + Novozym. Foto 1 - sem coloração; fotos 2 a 6, com fixação e coloração em Giemsa HCl (Merck)..... 64
- Figura 5 - Curva padrão de Absorbância em função da concentração de DNA 84
- Figura 6 - Curvas de tempo mortalidade para larvas do último instar de *Chalcodermus*

bimaculatus, após exposição, por pulverização (10^6 conídios/ml) das linhagens E6, E9 e seus recombinantes 98

Figura 7 - Curvas de tempo mortalidade para larvas do último instar de *Chalco^odermus bimaculatus*, após exposição, por pulverização (10^7 conídios/ml), das linhagens E6, E9 e seus recombinantes 99

Figura 8 - Curvas de tempo mortalidade para larvas do último instar de *Chalco^odermus bimaculatus*, após exposição, por pulverização (10^8 conídios/ml), das linhagens E6, E9 e seus recombinantes 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem E6 em diferentes tempos de irradiação à luz ultravioleta	49
Tabela 2 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem E9 em diferentes tempos de irradiação à luz ultravioleta	49
Tabela 3 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem RJ em diferentes tempos de irradiação à luz ultravioleta	50
Tabela 4 - Mutantes morfológicos das linhagens E6, E9 e RJ obtidos através da irradiação com ultravioleta	53
Tabela 5 - Frequência de obtenção de mutantes auxotróficos em <i>M. anisopliae</i> nos diferentes tratamentos em diversas linhagens	55

Tabela 6 - Frequência dos tipos de mutantes auxo- tróficos obtidos nos diversos trata- mentos	56
Tabela 7 - Total de mutantes obtidos, com dupla deficiência auxotrófica	58
Tabela 8 - Número de protoplastos obtidos e fre- quência de regeneração em diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i>	60
Tabela 9 - Distribuição da frequência de número de núcleos/protoplastos na linhagem de <i>M. anisopliae</i> RJ <i>viol</i>	63
Tabela 10 - Frequência de reversão espontânea dos mutantes com dupla deficiência auxo - trófica das linhagens de E6 e E9	66
Tabela 11 - Coloração dos conídios e vigor dos he- terocários obtidos em diversos cruza- mentos entre mutantes de E6, E9 e RJ com marcas auxotróficas complementares	67
Tabela 12 - Cruzamentos realizados e tipos de meios seletivos utilizados na semeadu- ra dos conídios para obtenção de di- plóides e recombinantes	70

Tabela 13 - Frequência de colônias obtidas a partir de semeadura de conídios provenientes de heterocários simples e de heterocários de pontas de hifas, em Meio Mínimo (MM) e em MM com diferentes suplementos nutricionais - Cruzamentos E6 x E6	71
Tabela 14 - Recombinantes obtidos nos diferentes meios seletivos, com confirmação por análise auxonográfica - Cruzamentos E6 x E6	72
Tabela 15 - Frequência de colônias obtidas a partir da semeadura de conídios provenientes de heterocários simples, em diferentes meios seletivos - Cruzamento E9 x E9	74
Tabela 16 - Frequência de colônias obtidas a partir da semeadura de conídios provenientes de heterocários de pontas de hifas, em Meio Mínimo (MM) com diferentes suplementações nutricionais - Cruzamentos E6 x E9	75
Tabela 17 - Recombinantes obtidos nos diferentes	

meios seletivos, com confirmação por análise auxonográfica - Cruzamentos E6 x E9	77
Tabela 18 - Medidas de crescimento em centímetro (diâmetro maior - diâmetro menor da colônia), das linhagens 1 e 8 e <u>re</u> combinante 1 x 8, em diferentes concentrações de Benlate e Meio Completo (MC)	80
Tabela 19 - Características de crescimento de <u>al</u> guns recombinantes, em Meio Completo (MC) e em MC + Benlate (1 µg/ml)	81
Tabela 20 - Absorbância observadas em função da concentração de DNA em 595 e 700 nm, para obtenção de equação de regressão	83
Tabela 21 - Quantidade de DNA das diferentes <u>li</u> nhagens obtidas através da diferença de absorbância nos comprimentos de onda de 595 e 700 nm e substituição na equação da reta	85
Tabela 22 - Porcentagem de conídios uni e binucleados nas diferentes linhagens e	

recombinantes - Contagem de 400 coní- dios	86
Tabela 23 - Taxas de mortalidade acumuladas de larvas de <i>C. bimaculatus</i> nos 4º, 7º e 12º dias após a aplicação do fungo	93
Tabela 24 - Tempo Letal (TL ₅₀), Tempo Letal(TL ₉₀) e Taxa de Potência das diversas li- nhagens, na concentração de 10 ⁶ coní- dios/ml, em larvas do último instar de <i>C. bimaculatus</i>	95
Tabela 25 - Tempo Letal (TL ₅₀), Tempo Letal(TL ₉₀) e Taxa de Potência das diversas li- nhagens, na concentração de 10 ⁷ coní- dios/ml, em larvas do último instar de <i>C. bimaculatus</i>	96
Tabela 26 - Tempo letal (TL ₅₀), Tempo Letal(TL ₉₀) e Taxa de Potência das diversas li- nhagens, na concentração de 10 ⁸ coní- dios/ml, em larvas do último instar de <i>C. bimaculatus</i>	97
Tabela 27 - Tempo letal (TL ₅₀), Tempo letal(TL ₉₀) das diversas linhagens, na concentra	

ção de 10^8 conídios/ml, em adultos de
C. bimaculatus 104

PARAMEIOSE EM *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

Autor: EDUARDO BAGALHI

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Com o objetivo de estudar o ciclo parassexual e detecção da parameiose em *Metarhizium anisopliae*, mutantes morfológicos e auxotróficos foram obtidos nas linhagens E6, E9 e RJ, para possibilitar a formação de heterocários, seleção de diplóides e recombinantes, bem como para análise genética da segregação destas marcas. Observou-se uma maior frequência de obtenção de mutantes no método de irradiação e enriquecimento por filtração, o qual apresentou um aumento de 2,6 a 10,7 vezes, quando comparado com o método de isolamento total.

Conídios provenientes de heterocários obtidos entre linhagens com marcas auxotróficas complementares semeados em placas contendo MM e MM com diferentes suplementações nutricionais, propiciaram o crescimento de recombinantes prototróficos e auxotróficos, mas não dos parentais auxotróficos. Observou-se a ocorrência de recombinantes prototróficos e auxotróficos haplóides no heterocário, em fre

quências de 1.10^{-1} a $3,5.10^{-6}$, com evidências de recombinação mitótica, o que comprova a ocorrência de parameiose nesta espécie. A parameiose foi interpretada como um possível mecanismo natural de amplificação da variabilidade genética em fungos filamentosos imperfeitos.

Recombinantes híbridos, obtidos por parameiose entre as linhagens E6 e E9 e compostos formados pela mistura de conídios de diversos recombinantes, bem como os parentais auxotróficos e selvagens, foram avaliados com relação à eficiência em atacar o inseto *Chalco~~der~~mus bimaculatus*. Enquanto larvas se mostraram susceptíveis de serem atacadas pelo fungo, o mesmo não foi observado nos insetos adultos. Observou-se, na aplicação com concentração de 10^7 conídios/ml, uma maior virulência de um dos compostos, o que demonstra o potencial deste método na obtenção de linhagens melhoradas para o controle biológico de insetos.

PARAMEIOSIS IN *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

Author: EDUARDO BAGALHI

Adviser: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

The present research was carried out aiming to study the parasexual cycle and to detect parameiosis in *M. anisopliae*. Morphological and auxotrophic mutants were obtained from E6, E9 and RJ strains to get heterokaryons, to select diploids and recombinants, and to obtain the genetical analysis of these markers segregation. A higher frequency in getting mutants was obtained in using irradiation and the enrichment method. It showed an improvement of 2.6 to 10.7 times when it was compared with the method of total isolation.

Heterokaryons obtained between strains with complementar auxotrophic markers produced conidia, that were plated in MM and MM with different nutritional supplementation, to allow the growing of the auxotrophic and prototrophic recombinants but not the parental ones. It was observed prototrophic and auxotrophic recombinants haploids in heterokaryons, at the frequencies of 1×10^{-1} to 3.5×10^{-6} ,

evidencing mitotic recombination, and comparing the occurrence of parameiosis in this species. Parameiosis was interpreted as a possible natural mechanism in amplification of the genetic variability in imperfect filamentous fungi.

It was evaluated the performance of attacking the insect *Chalcoedermus bimaculatus* by parameriotic hybrid recombinants between E6 and E9 strains and a pool obtained by conidia of various recombinants, and the auxotrophic and wild parental strains as well. Larvae were susceptible to the fungus attack but not the adult insects. Concentrations of 10^7 conidia/ml showed higher virulence in one of the mixtures. These results show the potentiality of this method in getting improved strains for insect biological control.

1. INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, pelas suas características entomopatogênicas, vem se mostrando ser muito valioso no combate a uma série de insetos pragas. No Brasil este fungo é largamente utilizado no controle de cigarrinhas de cana-de-açúcar e de pastagens. Pela sua grande importância em termos econômicos e ecológicos, torna-se indispensável a realização de estudos fundamentais da biologia desta espécie.

Um grande número de linhagens, com grande variabilidade genética, já foi detectada nesta espécie, parasitando diferentes insetos hospedeiros. Por se tratar de um fungo imperfeito, a descrição do ciclo parassexual e o desenvolvimento de metodologias de fusão de protoplastos neste fungo, abriu a possibilidade de recombinação de material genético entre as diferentes linhagens, muito embora poucas informações ainda existem sobre os detalhes destes processos. Informações sobre o número de grupos de ligação, sobre a estabilidade dos diplóides obtidos, bem como sobre os eventos de recombinação mitótica e surgimento de recomb

nantes, são ainda mais escassos. Embora haja evidências de variações nos processos parassexuais em *M. anisopliae*, há necessidade de um estudo mais aprofundado, inclusive para verificar a ocorrência de processos do tipo paramiótico, já relatados para outros fungos.

O fungo *M. anisopliae* e outros fungos entomopatogênicos, apesar do seu enorme valor e potencial, tem sido sub explorado no controle dos insetos pragas, devido a fatores que dificultam o seu uso. Dentre outros, podem ser destacados os custos elevados de produção, curto tempo de vida útil, exigências de condições ambientais específicas, alta especificidade ao hospedeiro e longo tempo para provocar a morte dos insetos. Essas dificuldades podem ser em grande parte sanadas pela melhoria dos métodos de produção do fungo e pelo melhoramento genético das linhagens. O melhoramento genético das linhagens para o controle biológico, utilizando-se de processos de hibridação por parassexualidade, apesar de ser uma metodologia já disponível, tem sido muito pouco utilizada.

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Obter mutantes morfológicos e auxotróficos em diversas linhagens de *M. anisopliae*, para facilitar os processos de recombinação entre elas.

3.

- Aprimorar a metodologia de obtenção, regeneração e efetuar estudos citológicos em protoplastos desta espécie.

- Fazer cruzamentos dentre e entre as linhagens pelo processo clássico do ciclo parassexual e verificar a ocorrência da paramiose nestes organismos.

- Avaliar a patogenicidade de linhagens selvagens, auxotróficas e recombinantes híbridos de *M.anisopliae*, sobre o inseto *Chalcodermus bimaculatus*, praga do caupi, *Vigna unguiculata*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O fungo *Metarhizium anisopliae*

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um Deuteromyceto pertencente a 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 (citado por PETCH, 1931 e KENDRICK, 1971)..

TULLOCH (1976) revisou a taxonomia do gênero *Metarhizium* e manteve duas espécies: *Metarhizium flavoviride* Gams (Rozsypal) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, sendo que esta última apresenta duas variedades, a *anisopliae* (também conhecida como *minor*) e a *major*. Segundo este autor, a variedade *anisopliae* apresenta-se com conídios de 3,5 a 9,0 µm de comprimento, (usualmente 5,0 a 8,0 µm) e a variedade *major* com conídios de 9,0 a 18,0 µm de comprimento, (usualmente de 10,0 a 14,0 µm).

O fungo apresenta-se geralmente com conídios uninucleados (TINLINE, 1971), com pequena proporção de binucleados (MESSIAS, 1979) 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 pode 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; MESSIAS, 1979).

Este fungo apresenta crescimento ótimo em temperaturas entre 25° a 30°C (VILACORTA, 1978). É tolerante a uma faixa de pH de 2,0 a 8,5, sendo que 6,9 é a melhor condição para crescimento e esporulação (VEEN, 1968). Com relação à fonte nutritiva é um microrganismo pouco exigente, desenvolvendo-se em diversos meios de cultura, utilizando como fonte de carbono o amido, glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina (HUBER, 1958; LIHNELL, 1944), e também apresenta um ótimo desenvolvimento em meio

mínimo e meio completo para *Aspergillus nidulans* (MESSIAS, 1979).

Dentre os diversos agentes causadores de micose em insetos, o fungo *M. anisopliae* assume um importante papel (BURGES, 1981). No Brasil, este fungo vem sendo bastante utilizado nos últimos anos no controle biológico de insetos vulgarmente conhecidos como cigarrinhas, da ordem *Homoptera*, destacando-se *Mahanarva posticata* para cana-de-açúcar (GUAGLIUMI et al., 1974; AQUINO et al., 1975) e *Deois flavopicta* e *Zulia entreciana* para pastagens (VEIGA, 1979). Também tem sido verificado a sua patogenicidade em outros importantes insetos pragas como a *Diatraea saccharalis*, broca-de-cana (ALVES et al., 1984), ao *Chalcoedermus aneus* (= *C. bimaculatus*), "manhoso" (LORD, 1986), ao *Hypothenemus hampei*, broca-do-café (LECUONA et al., 1986), a *Ceratitidis capitata* (GARCIA et al., 1984) e outros (ALVES, 1986), bem como em insetos de interesse médico como o *Rhodnius prolixus*, barbeiros transmissores da doença-de-Chagas (SILVA & MESSIAS, 1986).

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

Um grande número de linhagens ou isolados, provenientes de diversas fontes e várias regiões do país,

já foi obtido e estudo com relação a uma série de características como crescimento e produção de esporos, produção de exoenzimas, patogenicidade, resistência à agentes físicos e químicos, variabilidade eletroforética, padrões em cromatografia gasosa, onde se observou uma grande variabilidade natural na espécie (MESSIAS et al., 1978; HADDAD & MESSIAS, 1979; DE CONTI et al., 1980; VALE et al., 1980; ROSATO et al., 1981; SANTOS & AZEVEDO, 1982; CORREA, 1983; FRIGO, 1983; MATOS, 1983; MESSIAS et al., 1983; AZEVEDO & MESSIAS, 1985; LUNA, 1985; SILVA, 1985; FRIGO & AZEVEDO, 1986).

LUNA (1985) em um extensivo estudo de caracterização citológica e morfológica de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *M. anisopliae*, detectou uma grande variabilidade genética entre estas linhagens. Duas delas (A4 e M5) apresentaram uma grande divergência das demais, sendo sugerido como uma nova variedade ou mesmo uma nova espécie dentro do gênero *Metarhizium*. Através de análises citológicas, a autora propôs a existência de 6 grupos de ligação, podendo este número variar nas diferentes linhagens.

ALVES et al. (1986) empregaram um sistema de análise fenética para a separação e agrupamento de isolados de *M. anisopliae*, em que 16 caracteres foram analisados através de taxonomia numérica, com ordenação dos componentes principais. Observou-se uma grande variabilidade natu

ral entre os isolados e uma forte influência do hospedeiro de origem na determinação dos agrupamentos.

RIBA et al. (1986) fizeram um estudo de caracterização de 96 isolados de *M. anisopliae* provenientes de vários insetos e de diversos países, sendo 33 da América do Sul, principalmente do Brasil. Os caracteres, analisados por análise fatorial, foram o tamanho de conídios, a patogenicidade ao inseto *Ostrinia nubilalis* e padrões isoenzimáticos. Observou-se uma certa homogeneidade entre os isolados de *M. anisopliae* var. *major* e uma grande heterogeneidade entre os isolados da var. *anisopliae*, havendo porém uma certa uniformidade nos isolados do Brasil e de isolados provenientes de insetos da família Curculionidae; detectou-se também a ocorrência de uma terceira variedade "intermediária", composta de isolados com conídios de tamanhos intermediários, com um pequeno espectro de hospedeiros e padrões típicos de isoenzimas, os quais, segundo estes autores, poderiam ter sido originados por processos de hibridação entre as linhagens de variedade *major* com linhagens da variedade *anisopliae*, através do ciclo parassexual.

2.2. O ciclo parassexual

Com a descoberta do ciclo parassexual em fungos por PONTECORVO & ROPER em 1952, a genética de fungos en

trou em uma nova fase, principalmente para os fungos imperfeitos que, por não apresentarem um mecanismo conhecido de recombinação genética pelo ciclo sexual, não possibilitavam seus estudos genético (SILVEIRA, 1983).

O ciclo parassexual, segundo PONTECORVO(1956) se caracteriza por apresentar: anastomose de hifas com núcleos diferentes (heterocariose), fusão de núcleos haploides, permuta mitótica e haploidização. Além de ser um sistema que favorece aos estudos de ordem genética, possibilitando o mapeamento de grupos de ligação, o ciclo parassexual oferece ainda a possibilidade de variação para os fungos que não apresentam ciclo sexual. Com relação ao mapeamento de genes, FORBES (1959) obteve uma linhagem de *Aspergillus nidulans* contendo marcadores em todos os oito grupos de ligação. Desta maneira, tendo-se uma linhagem mutante com um gene a ser localizado em um grupo de ligação, basta que se proceda uma análise pelo ciclo parassexual e, com a haploidização, este gene será mapeado juntamente com alguns marcados da linhagem mestre (McCULLY & FORBES, 1965). Em *A. nidulans*, KAFER (1958), usando esta técnica de mapeamento, localizou cerca de 40 genes nos 8 grupos de ligação, sendo que a localização destes genes foram confirmados com o uso de análise meiótica.

O ciclo parassexual também tem se mostrado útil nos estudos de dominância e recessividade de genes em

um mesmo núcleo, ou em citoplasma comum (ROPER, 1966; AZEVEDO, 1972) e também nos estudos sobre instabilidade mitótica (AZEVEDO, 1972; NIFFINEGER & SOUZA, 1979). Do ponto de vista aplicado, o ciclo parassexual possibilitou a recombinação e melhoramento genético em fungos economicamente importantes e que não apresentam ciclo sexual (SERMONTI, 1969; BONATELLI JR., 1981; MESSIAS, 1979) e também permitiu explicar o aparecimento de novas raças fisiológicas em fungos fitopatogênicos (BUXTON, 1956, 1962; AZEVEDO, 1976).

A descrição do ciclo parassexual em *M. anisopliae*, com ocorrência de heterocário, diplóides e recombinantes estáveis, foi feita pela primeira vez por MESSIAS (1979) e MESSIAS & AZEVEDO (1980), sendo confirmado quase simultaneamente por AL-AIDROOS (1980). Os autores trabalharam com marcas para resistência (AL-AIDROOS, 1980) e marcas para coloração e auxotrofia (AL-AIDROOS, 1980; MESSIAS & AZEVEDO, 1980). Os diplóides obtidos não apresentavam diferenças significativas dos haplóides com relação ao tamanho dos conídios, porém eram diferentes quanto ao número de núcleos por conídios (os diplóides são sempre uninucleados), quanto ao diâmetro dos núcleos dos conídios (nos diplóides era maior) e também quanto à quantidade de DNA (nos diplóides era praticamente o dobro). Os setores haplóides obtidos por MESSIAS & AZEVEDO (1980) eram em sua maioria do tipo parental, porém, alguns eram recombinantes, o que fez concluir que o número dos grupos de ligação é pequeno, não

superior a quatro.

BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982), também trabalhando com o ciclo parassexual em *M. anisopliae*, observaram que o tamanho dos conídios dos diplóides era significativamente maior do que os haplóides, o que é contrastante com os trabalhos iniciais de AL-AIDROOS (1980) e MESSIAS & AZEVEDO (1980). Os autores fizeram a análise da segregação de oito marcas genéticas e o mapeamento destes genes, propondo a existência de cinco grupos de ligação. Estes autores também observaram a ocorrência de haplóides recombinantes no heterocárdio, sem, no entanto, esclarecer a sua frequência.

MAGOON & MESSING-AL-AIDROOS (1984) descreveram critérios para diferenciar diplóides, haplóides e recombinantes obtidos pelo ciclo parassexual em *M. anisopliae*, utilizando-se do tamanho dos conídios, da relação entre o diâmetro dos núcleos/tamanho dos conídios, da morfologia das colônias e da estabilidade das colônias na presença de benlate. O tamanho dos conídios entre haplóides e diplóides apresentaram diferenças estatisticamente significante. Duas linhagens que apresentavam tamanhos conidiais intermediários os quais os autores consideraram como sendo uma hiperhaploidia ($n + x$) e uma translocação, se cruzavam com grande dificuldade e o possível diplóide obtido apresentava um padrão anormal de segregação. Duas outras linhagens pro

venientes de cruzamentos entre parentais haplóides também apresentavam conídios com tamanhos intermediários, sendo que os resultados genéticos e a morfologia destas colônias diferiam das demais.

MAGOON & MESSING-AL-AIDROOS (1986) pela análise dos segregantes obtidos no ciclo parassexual em *M. anisopliae*, fizeram o mapeamento de mais duas marcas genéticas nos 5 grupos de ligação já propostos por BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982) e também propuseram a existência de 2 vias metabólicas para a biossíntese da pigmentação dos conídios.

LUNA & AZEVEDO (1985) utilizando duas linhagens (A4 e E6) de *M. anisopliae* com características divergentes e com marcas auxotróficas complementares obtiveram, pelo ciclo parassexual, possíveis diplóides que apresentavam um volume nuclear maior que as linhagens parentais e que mantinham a capacidade de atacar insetos.

Ainda com relação ao ciclo parassexual em *M. anisopliae*, uma limitação desta metodologia clássica é o fato de que parece haver uma forte incompatibilidade entre linhagens distintas desta espécie, de modo que não se observa a formação de heterocários entre linhagens muito diferentes (SILVEIRA, 1983; FRIGO, 1983). SILVEIRA (1983) também observou que mesmo dentro de uma linhagem (RJ), havia dificuldades na obtenção do heterocáριο. Este problema foi resol-

vido quando se desenvolveu uma metodologia de fusão de protoplastos para esta espécie. SILVEIRA (1983) e SILVEIRA & AZEVEDO (1987), empregando esta metodologia de fusão de protoplastos em *M. anisopliae*, observaram uma alta frequência de fusão dentro e entre linhagens, com a ocorrência de fusão nuclear, segregação e recombinação mitótica. FRIGO (1983) empregou em *M. anisopliae*, uma variação desta técnica que foi a utilização da linhagem selvagem morta, técnica esta conhecida como a do "doador morto" (FERENCZY, 1981; HOPWOOD & WRIGHT, 1981), que mostrou ser efetiva na obtenção de diplóides e segregantes entre linhagens distintas.

2.3. A parameiose em fungos

O termo parameiose foi proposto por BONATELLI JR. et al. (1983) para designar um certo tipo de instabilidade dos núcleos diplóides heterozigotos, os quais apresentariam uma alta taxa de recombinação e haploidização nas hifas heterocarióticas, guardando semelhanças com o processo meiótico. Estes autores descreveram o fenômeno através do estudo de cruzamentos pelo ciclo parassexual de linhagens auxotróficas de *Aspergillus niger* utilizadas na produção de ácido cítrico. Utilizando-se da medida dos diâmetros dos conídios e do comportamento das colônias em meio contendo Benlate, observaram que as colônias obtidas no heterocário eram

dos tipos diplóides heterozigotos para todas as marcas auxotróficas e heterozigotos para apenas algumas marcas e também recombinantes haplóides. Segundo estes autores, a ocorrência de diplóides instáveis e estáveis em *A. niger*, relatadas por outros autores (LHOAS, 1967; CHANG & TERRY, 1973 e DAS & ILCZUK, 1978), bem como a instabilidade observada em *Penicillium patulum* (CALAM et al., 1973) e a alta instabilidade dos diplóides de *Cephalosporium acremonium* (BALL & HAMLYN, 1982) podem ser interpretadas com base na parameiose.

Evidências da ocorrência da parameiose podem ser tiradas de diversos outros trabalhos descritos na literatura. Observa-se, no entanto, que a detecção dos recombinantes haplóides no heterocário nem sempre é precisa, sendo muito confundida pelos autores como sendo "diplóides" (que não segregam) ou como parentais auxotróficos revertentes.

HASTIE (1962, 1964) estudou o ciclo parassexual em *Verticillium albo-atrum* e detectou uma alta instabilidade dos diplóides obtidos - culturas de colônias diplóides, com três semanas de idade, apresentavam 95% de conídios haplóides. O autor também detectou altas taxas de permutas mitóticas.

TYPAS & HEALE (1977) utilizaram o sistema automático "Coulter counter" para avaliação do tamanho de conídios de linhagens de *Verticillium* e detecção da proporção

de conídios diplóides/haplóides, obtidos pelo ciclo parasse
xual. Estes autores verificaram uma alta frequência de ha
ploidização dos diplóides, que aumentava em função do tempo
de crescimento - a proporção de conídios diplóides diminuía
marcadamente na segunda e terceira semana de crescimento, sen
do que no final da quarta semana, todos os conídios eram
haplóides.

TYPAS (1983) realizou estudos de fusão de pro
toplasto e microinjeção para obtenção de heterocários inter
e intraespecífico de *Verticillium albo-atrum* e *V. dahliae*.
Ambas as técnicas se mostraram eficientes na quebra da bar-
reira da parede celular para a hibridação. A frequência
de formação de diplóides nestes heterocários artificiais
foi de aproximadamente 850-2000 vezes maior do que em hete-
rocários naturais. Este autor observou também uma alta fre
quência de emissão de setores diretamente do heterocário os
quais eram diplóides, prototróficos haplóides e aneuplói
des. Esta alta frequência de prototróficos haplóides, se-
gundo o autor, seria devido a uma alta frequência de rever
são dos parentais auxotróficos.

HASTIE & HEALE (1984) fizeram uma extensiva re
visão sobre a genética do gênero *Verticillium* onde relatam
que os diplóides heterozigotos, obtidos do heterocário, são
geralmente muito instáveis, embora alguns tipos estáveis te
nham sido descritos.

Evidências mais conclusivas da ocorrência de paramiose podem ser observadas nos trabalhos de BALL & HAMLYN (1982) e HAMLYN et al. (1985), os quais, estando atentos para a ocorrência de recombinantes no heterocário, utilizaram meios seletivos com diferentes suplementações para detectá-los. Ambos os trabalhos foram realizados através de fusão de protoplastos entre linhagens auxotróficas de *Cephalosporium acremonium*, empregando meio mínimo com diferentes suplementações para seleção de produtos de fusão. As colônias regeneradas eram de dois tipos principais: recombinantes haplóides estáveis e aneuplóides ou diplóides heterozigotos instáveis. A maior parte era recombinante haplóide, sendo este grau de ploidia sugerido pela análise da estabilidade destas colônias em meios com agentes haploidizantes, com confirmação através da medida da quantidade de DNA. Através da análise genética da frequência destes recombinantes, HAMLYN et al. (1985) obtiveram evidências da existência de 8 grupos de ligação, sendo que detectaram também uma alta taxa de permuta mitótica. A frequência de fusão nuclear, estimada por HAMLYN et al. (1985), foi de $1 \cdot 10^{-4}$ em 10^5 protoplastos viáveis. Os diplóides obtidos, segundo estes autores, deveriam estar apresentando um crescimento desbalanceado e lento, de forma que os produtos originados da não disjunção apresentariam uma velocidade de crescimento bem maior, fazendo com que rapidamente tomassem toda a colônia. Os autores (BALL & HAMLYN, 1982 e HAMLYN et al., 1985) relacionam

seus resultados obtidos em *C. acremonium* com a instabilidade dos diplóides das espécies relacionadas de *Cephalosporium mycophilum* e *Emericellopsis salmosynnemata*, descritas por TUVESON & COY (1961) e FANTINI (1962), respectivamente, considerando a possibilidade de ser esta uma característica deste grupo de organismos.

Em *M. anisopliae*, o fenômeno da paramiose também parece estar ocorrendo. TINLINE & NOVIELLO (1971), os quais foram os primeiros a tentar descrever o ciclo parassexual neste fungo, utilizando-se de marcas auxotróficas e de resistência à drogas, lograram obter possíveis colônias diplóides, mas que, no entanto, não segregavam os componentes parentais.

RIBA et al. (1980) fizeram a obtenção de recombinantes mitóticos estáveis, do tipo intermediário, por hibridação de biotipos selvagens.

BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982), fazendo estudos do ciclo parassexual nesta espécie, observaram a ocorrência de haplóides recombinantes no heterocário, sendo que discutem sobre a possibilidade de estar ocorrendo uma rápida haploidização dos diplóides, num processo de instabilidade dos mesmos.

SILVEIRA & AZEVEDO (1987) utilizando-se de fusão de protoplastos intra e interlinhagens de *M. anisopliae*,

com marcas auxotróficas e morfológicas, observaram que os produtos de fusão eram altamente instáveis, emitindo setores recombinantes. Estes autores, na sua discussão, interpretam seus resultados com base na parameiose proposta por BONATELLI JR. et al. (1983).

2.4. Obtenção de linhagens melhoradas de *M. anisopliae* para o controle biológico

Embora o ciclo parassexual em *M. anisopliae* já tenha sido descrita (AL-AIDROOS, 1980; MESSIAS & AZEVEDO, 1980), com metodologias de fusão de protoplastos também já desenvolvidas para esta espécie (FRIGO, 1983; SILVEIRA, 1983; SILVEIRA & AZEVEDO, 1987), poucos trabalhos foram feitos no sentido de se explorar a virulência de produtos de cruzamentos.

GARCIA et al. (1985) realizaram trabalho de avaliação da patogenicidade da linhagem selvagem E9, de dois mutantes auxotróficos de E9 e um diplóide obtido pelo ciclo parassexual, sobre *Ceratitidis capitata*. O diplóide e os mutantes não diferiram com relação à patogenicidade, sendo a linhagem selvagem E9 2,54 vezes mais efetiva que o diplóide.

VALADARES et al. (1985) utilizando as linhagens parentais A4 e A6 de *M. anisopliae* e diplóides A4 x A6,

obtidos pelo ciclo parassexual, em ensaio para a patogenicidade, demonstraram que os diplóides eram muito mais efetivos do que as linhagens parentais em causar a mortalidade em *Nezara viridula* (aumento de 7 vezes) e em *Spodoptera frugiperda* (aumento de 2,25 vezes).

RIBA et al. (1985) avaliaram a patogenicidade de linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae* var. *minor* e *M. anisopliae* var. *major*, bem como de possíveis diplóides obtidos entre estas linhagens, sobre os insetos *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Culex pipiens* e *Ostrinia nubilalis*. Possíveis diplóides obtidos entre linhagens auxotróficas provenientes de uma mesma linhagem selvagem da variedade *minor*, apresentaram patogenicidades semelhante ao parental selvagem. Os autores também lograram obter possíveis diplóides entre as variedades *minor* x *major*, utilizando linhagens com apenas marcas morfológicas sem auxotrofia, sendo que estes eram avirulentos nas espécies de insetos para as quais as linhagens parentais eram patogênicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* utilizadas foram:

E 6 - (Espírito Santo)

E 9 - (Espírito Santo)

RJ - (Rio de Janeiro)

Estas linhagens foram originariamente isolados de insetos adultos de *Deois flavopicta* (Homoptera, Cercopidae).

3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

3.2.1. Meio mínimo (MM) (PONTECORVO et al., 1953)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g

MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,02 g
ZnSO ₄	0,02 g
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000,0 g

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

3.2.2. Meio completo sólido (MC) (AZEVEDO & COSTA, 1973)

Meio mínimo adicionado de:

Extrato de levedura	0,5 g
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml
Solução de ácidos nucleicos	1,0 ml

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

A solução de ácidos nucleicos só foi adicionado eventualmente.

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 completo 2x concentrado

Preparado segundo o item 3.2.2., onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada, com exceção da água.

3.2.7. Meio mínimo líquido para crescimento de micélio

Ao meio mínimo preparado segundo o item 3.2.1., foram adicionados requisitos para cada marca auxotrófica.

3.2.8. Meio para crescimento de micélio

Ao meio mínimo líquido preparado segundo o item 3.2.1., foram adicionados 2,0 g/l de caseína hidrolisada e 5,0 g/l de extrato de levedura.

3.2.9. Meio completo com KCl (MCKCl) para obtenção de crescimento de células totais (protoplastos, micélio e conídios não digeridos)

Preparado segundo o item 3.2.6., onde o mesmo foi diluído no momento de uso com KCl 1,4M em tampão fosfato pH 5,8 na proporção de 1:1.

3.2.10. Solução de vitaminas

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

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

3.2.11. Solução de ácido nucléico de leveduras

- a) Ácido nucléico de leveduras: 2,0 g em 15,0 ml de HCl 1N
- b) Ácido nucléico de leveduras: 2,0 g em 15,0 ml de NaOH 1N

Ambas as soluções foram aquecidas a 98°C durante 20 minutos, misturadas, o pH ajustado para 6,0 com NaOH 4% e filtradas. Completou-se o volume para 40 ml e manteve-se em refrigerador a 4°C.

3.2.12. Suplementos adicionados ao meio mínimo

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

Suplemento	Solução Estoque (10 ml de água)	Quantidade adicionada por placa (20 ml de meio de cultura)	Concentração final no meio de cultura
Adenina	50,0 mg	0,1 ml	25 µg/ml
Guanina	50,0 mg	0,1 ml	25 µg/ml
Arginina	100,0 mg	0,1 ml	50 µg/ml
Cisteína	100,0 mg	0,1 ml	50 µg/ml
Leucina	100,0 mg	0,1 ml	50 µg/ml
Lisina	100,0 mg	0,1 ml	50 µg/ml
Metionina	100,0 mg	0,1 ml	50 µg/ml
Prolina	100,0 mg	0,1 ml	50 µg/ml
Biotina	0,4 mg	0,1 ml	0,20 µg/ml
Ácido nicotínico	1,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Riboflavina	1,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml
Pirodoxina	0,5 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml

3.2.13. Solução Salina (0,85%)

Preparou-se uma solução de 8,5 g de NaCl em 1000 ml de água destilada. 9 ml desta solução foram colocados em frascos e a seguir os mesmos foram autoclavados e conservados em refrigerador a 4°C.

3.2.14. Solução de "Tween" 80 (0,1%)

Foram adicionados 0,1 ml de "Tween" 80 em 100,0 ml de água destilada com homogeneização e 2,5 ml da solução foram colocados em tubos de ensaio, que após autoclavagem foram mantidos em geladeira a 4°C.

3.2.15. 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.

3.2.16. Tampão fosfato pH 5,8 (0,2 M)

. Solução A

NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	31,2 g
Água destilada	1000,0 ml

. Solução B

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	35,6 g
Água destilada	1000,0 ml

As soluções A e B foram conservadas no refrigerador sendo o tampão fosfato preparado no momento de uso, misturando 920 ml de solução A com 80 ml de solução B.

3.2.17. Tampão fosfato pH 6,9

. Solução A

NaH ₂ PO ₄	27,8 g
Água destilada	1000,0 ml

. Solução B

Na₂HPO₄ 53,65 g
Água destilada 1000,0 ml

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

3.2.18. Soluções de álcool etílico.

As soluções foram preparadas nas concentrações de 95, 70 e 50%. As diluições do álcool para a produção das soluções foram realizadas com água destilada.

3.2.19. Solução de Giemsa

Uma parte de Giemsa foi diluída em 66 partes de glicerina e 60 ° C, sendo que após o resfriamento, misturou-se com 66 partes de metanol. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.2.20. Solução de fixação

Esta solução foi preparada no momento de uso, na proporção de 3 álcool etílico absoluto: 1 ácido acético glacial.

3.2.21. Solução de KCl 1,4M pH 5,8

Para o preparo desta solução, 104,38 g de KCl foram dissolvidos com agitação e aquecimento em 500 ml de solução A (tampão fosfato pH 5,8). Levou-se ao potenciômetro e adicionou-se solução B (tampão fosfato pH 5,8) até atingir pH 5,8. O volume final foi acertado para 1000 ml com tampão fosfato pH 5,8. A solução foi autoclavada e conservada em refrigerador.

3.2.22. Solução de KCl 0,7 pH 5,8

Para preparo desta solução, um volume de KCl 1,4M foi diluído em igual volume de tampão fosfato pH 5,8. A solução foi autoclavada e armazenada em refrigerador.

3.2.23. Solução de enzimas para produção de protoplastos

Para cada 1,0 ml de KCl 0,7M em tampão fosfato pH 5,8 foram adicionados 5,0 mg de enzima lítica, sendo 2,5 mg de "celulase CP" e 2,5 mg de "NOVO" (HAMLIN et al., 1981). Utilizou-se também o complexo lítico formado por: "Zimoliase" (1 mg/ml)+ "Macerozim R.10"(5mg/ml)+"Celulase onozuka"(20mg/ml).

3.2.24. Solução de albumina 50%

Todo o volume da clara de um ovo foi colocado em um Becker e picotado com uma tesoura pequena por

ca de 1 hora, vagorosamente sem deixar formar espumas. Filtrou-se em papel de filtro (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).

3.2.25. Soluções de ácido perclórico

A partir do ácido perclórico 11,64N, foram preparadas várias soluções com normalidades diferentes:

HClO ₄ 0,2 N	1 ml de HClO ₄ :	57,2 ml de água
HClO ₄ 1,5 N	1 ml de HClO ₄ :	6,8 ml de água
HClO ₄ 3,75 N	1 ml de HClO ₄ :	2,1 ml de água

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

3.2.26. Solução de KOH 0,3 N

A um volume de 80 ml de água, foi acrescentado 1,34 g de KOH.

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

A um volume de 100 ml de água, foi acrescentado 160 mg/ml de acetaldeído. A solução foi guardada em

frasco escuro com tampa esmerilhada, na geladeira.

3.2.28. Solução estoque de DNA

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

3.3. Preparo de filtros, palitos de transferência e esterilização

3.3.1. Sistema de filtro para técnica de enriquecimento

No interior de filtros plásticos foram fixadas 6 camadas de gaze (mantidas esticadas) 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 Whatman n° 1. 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 posterior uso.

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 35 minutos (filtros, frascos de produção de protoplastos, etc.). A temperatura de incubação foi de 28°C, exceto quando foi necessário deixar o material à temperatura ambiente.

3.4. Sobrevivência à luz ultravioleta

Suspensões de conídios das linhagens selvagens E₆, E₉ e RJ em "Tween"80 foram observados ao microscópio com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, para se determinar o número de conídios por mililitro. Estas suspensões foram diluídas em solução salina (1:10), colocadas em placas de Petri esterilizadas, irradiadas com luz ultravioleta (Marca MINERALIGHT - Mod R52 - Ultra-Violet Prod Inc. USA),

em diferentes tempos de exposição. 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 as diferentes linhagens.

3.4.1. Obtenção de mutantes morfológicos

Suspensões de conídios das linhagens selvagens (E₆, E₉ e RJ), contendo 10⁷ conídios/ml, foram diluídas em solução salina 0,85% (1:10) e irradiadas na luz ultravioleta no tempo que propiciasse 95% de morte.

As suspensões irradiadas foram diluídas e semeadas em placa contendo MC de modo que crescesse de 30 a 100 colônias por placa. Estas placas foram incubadas a 28°C por 7-8 dias. Findo este período, as colônias que possuíam coloração ou morfologia alteradas e que também cresciam em MM foram consideradas mutantes morfológicos.

3.4.2. Obtenção de mutantes auxotróficos

A obtenção de mutantes auxotróficos foi rea-

lizada por diversos tratamentos (Figura 1):

Tratamento 1 - irradiação e isolamento total;

Tratamento 2 - irradiação e enriquecimento por filtração;

Tratamento 3 - protoplastização e isolamento total;

Tratamento 4 - protoplastização e enriquecimento por fil
tração;

Tratamento 5 - protoplastização, irradiação e enriquecimento
por filtração.

Nos tratamentos em que houve irradiação, a fonte utilizada foi luz U.V., com tempo de exposição de 1,5 a 2 minutos.

O tratamento mais utilizado foi o Tratamento 2, de irradiação com enriquecimento por filtração (SILVEIRA & AZEVEDO, 1984).

3.4.3. Teste de reversão

Suspensões de conídios dos mutantes auxotróficos obtidos foram feitas em solução de "Tween" 80, de tal modo que as mesmas tinham 10^7 conídios/ml. Estas foram semeadas em MM e incubadas a 28°C por 7-8 dias. Após este período foi verificado a presença ou ausência de crescimento de colônias.

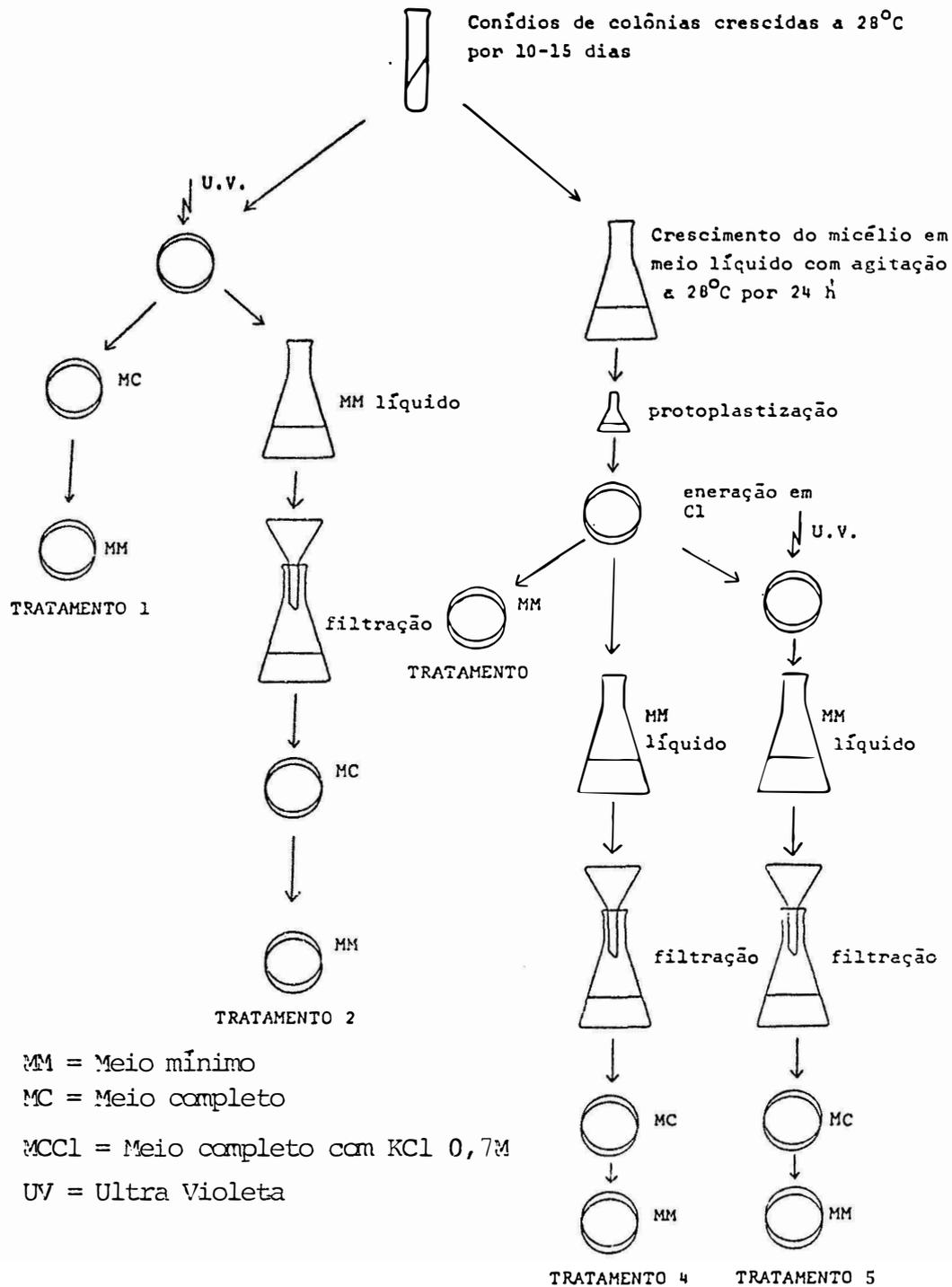


Figura 1. Esquema dos tratamentos utilizados para a obtenção dos mutantes auxotróficos.

3.5. Produção de protoplastos (SILVEIRA & AZEVEDO, 1987)

Conídios crescidos em MC inclinado a 28°C por 7-8 dias foram suspensos em solução salina onde se determinou suas concentrações (conídios/ml) com o auxílio de Câmara de Neubauer e microscópio. Estas foram adicionadas em meio para produção de micélio (ítem 3.2.8.) mais os requisitos de cada mutante para uma concentração final de 10⁶ conídios/ml. O meio assim obtido foi mantido em agitador rotatório (150 rpm) a 28°C por 24 horas. Findo este período, o micélio desenvolvido foi filtrado em filtro Buchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado em KCl 1,4M (tampão fosfato pH 5,8). Determinou-se a seguir, seu peso úmido. Este micélio foi colocado em presença de KCl 0,7M (tampão fosfato pH 5,8) e complexo de enzimas líticas na proporção de 50 mg de micélio: 1,0 ml de KCl 0,7M: 5 mg de enzima (50% de celulase CP e 50% de NOVO) (HAMLYN et al., 1981). Utilizou-se também o complexo lítico formado por: Zimoliase (1 mg/ml) + Macerozim R-10 (5 mg/ml) + Celulase Onozuka (20 mg/ml). Agitou-se em agitador recíproco (120 rpm) por 2:30 a 3:00 horas. Após este período, verificou-se a presença de protoplastos com o auxílio de microscópio (uma gota da suspensão que havia sido colocada entre lâmina e lamínula). Uma vez observada a presença de protoplastos, centrifugou-se a suspensão por 30 segundos a 500 rpm, sendo o sobrenadante retirado e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrena

dante foi desprezado, o "pellet" ressuspensado em KCl 0,7M esterilizado e centrifugou-se novamente (4000 rpm; 15 minutos). Repetiu-se esta operação mais 2 vezes.

3.5.1. Contagem de protoplastos

Os protoplastos obtidos no item 3.5. ("pellet") foram ressuspensos em KCl 0,7 M (tampão fosfato pH 5,8) (volume fixo) e contados em Câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico.

3.5.2. Verificação da presença de hifas, esferoplastos e conídios na suspensão de protoplastos

Os protoplastos obtidos foram semeados por "pour plate" em MC e MCKCl (45 - 50°C). O crescimento de colônias neste meio de cultura (MC), indicou o número de hifas e conídios que existiam na solução de protoplastos quando comparado com a suspensão semeada em placas com MCKCl. A semeadura foi feita em diversas diluições.

3.6. Obtenção de heterocários (MESSIAS & AZEVEDO, 1980)

Conídios das diferentes linhagens (com complementação para marcas auxotróficas e morfológicas) foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de MM líquido

suplementado com 2% e 4% de MC líquido (permite uma germinação inicial dos conídios). Estes tubos foram incubados por 10 dias (28°C) e a película formada na superfície do meio foi transferida para placas contendo MM sólido. Após incubação (28°C 10 dias) uma extremidade desta película foi novamente transferida para placas contendo MM sólido e novamente incubadas a 28°C por mais 10 dias, para evitar-se crescimento devido a resquícios de MC vindos dos tubos.

3.6.1. 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 com MM suplementado com os requisitos nutricionais (aminoácidos e vitaminas) em diferentes combinações. Estas foram incubadas a 28°C por 6-7 dias quando então foram contados 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, necessidades nutricionais e o grau de ploidia.

3.7. 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; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0 e 4,0 μg de Benlate/ml de meio de cultura para determinação das concentrações inibitórias de crescimento.

Recombinantes prototróficos ou possíveis diploides foram inoculados (12 repetições para cada recombinante) em MC e em MC + Benlate (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de meio) onde se observou as características de crescimento das colônias (com ou sem emissão de setores).

3.8. Coloração de conídios e protoplastos (TANAKA et al., 1979)

O material a ser corado (conídios e protoplastos) foi aderido a lamínulas previamente untadas com albumina 50% e secadas levemente sob um bico de Bunsen. Para a coloração de protoplastos, utilizou-se uma gota da suspensão de protoplastos em KCl 0,7 M bem como os restos de hifas após digestão com o complexo enzimático. As lamínulas contendo o material foram fixadas em álcool-ácido acético (3:1) por 30 minutos no mínimo e no máximo 24 horas. Após a fixação, as lamínulas foram colocadas em álcoois 95% e 70%,

5 minutos em cada; podendo ser mantidas em álcool 70%, em geladeira, por vários dias. Após os álcoois, as lamínulas foram lavadas em água destilada por 3 vezes, sendo a seguir colocadas para hidrólise em HCl 1 N a 60°C por 1 a 2 minutos (para protoplastos) e de 3 a 5 minutos (para conídios). Após a hidrólise, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes em água destilada e uma última vez em tampão fosfato pH 6,8 a 7,0, sendo a seguir coradas em GIEMSA a 10% (18 gotas da solução-mãe em 10 ml de tampão fosfato pH 6,8 a 7,0), por 40 a 60 minutos. Após a coloração, o material foi lavado rapidamente por 2 vezes em tampão fosfato e a seguir procedeu-se a montagem (provisória) em lâminas, passando parafina nas bordas da lamínula, com o auxílio de um bastão de metal aquecido e papel de filtro, procurando evitar bolhas de ar entre lâmina e lamínula.

3.9. Extração e quantificação de DNA de conídios

3.9.1. Extração do DNA (VAN TUYLL, 1977)

Utilizou-se uma suspensão de 5.10^8 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 (4.000 rpm), sendo as "pellets" lavadas e centrifugadas 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, as "pellets" foram ressuspensas em 4 ml de KOH 0,3 N e mantidas a 37°C por mais ou menos 16 horas. A p^os 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. As "pellets" foram então lavadas e centrifugadas por duas vezes com 4 ml de ácido perclórico 0,2 N em banho de gelo-água. A se guir, foram tratadas com 1 ml de ácido perclórico 1,5 N por 20 minutos a 70°C, para extração do DNA, sendo a seguir centrifugadas 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 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. A par tir desta suspensão, procedeu-se a determinação da quantidade de DNA.

3.9.2. 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). Esta mistura foi deixada 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 é estimada pela diferença entre as duas leituras e pela comparação com a curva padrão.

3.9.2.1. Curva padrão

Foi retirado 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 da reta a qual relaciona absorvância com concentração de DNA.

3.10. Avaliação da patogenicidade de linhagens selvagens e recombinantes de *M. anisopliae* em larvas e adultos do inseto *Chalcoedermus bimaculatus*, manhoso, praga de Caupi

3.10.1. Linhagens utilizadas

E6

E9

E6 *ylo8 pir8 lis8*

E9 *ylo1 leu6 ade9*

D2 - Recombinante híbrido prototrófico de coloração verde

D4 - Recombinante híbrido prototrófico de coloração amarela

Composto 1 - Obtido pela mistura de conídios de 16 colônias recombinantes híbridas prototróficas verdes

Composto 2 - Obtido pela mistura de conídios de 16 colônias recombinantes híbridas prototróficas verdes

Com exceção do Composto 2, em que as colônias foram crescidas em MM, todas as demais foram crescidas em MC.

3.10.2. Determinação da viabilidade das linhagens

Esta foi feita semeando-se 0,1 ml de uma suspensão com aproximadamente 10^4 conídios/ml, de cada isolado, em placas de Petri (2 placas/isolado) contendo BDAY e incubado a 27°C por 12 horas. As leituras foram efetuadas pela contagem microscópica de 200 esporos por placa, considerando germinado o conídio cujo tubo germinativo fosse facilmente visualizado.

3.10.3. Preparo das suspensões

Conídios de cada linhagem foram adicionados a soluções de "Tween"80 a 0,1% em água destilada e uniformizadas através de um macerador de tecidos de vidro de 15 ml (Wheaton, U.S.A.), sendo em seguida filtrada em gazes. A contagem do número de conídios/ml foi efetuada em câmara de Newbauer, sendo repetida 2 vezes. As concentrações utilizadas foram de 10^8 , 10^7 e 10^6 conídios/ml, sendo que esta foi corrigida nos casos em que a viabilidade era inferior a 100%.

3.10.4. Obtenção dos insetos

Vagens de Caupi provenientes do campo, infestadas por larvas do inseto foram colocadas em sacos de papel de 26-18 cm e colocados sob recipientes cilíndricos, com 21 cm de diâmetro por 8 cm de altura, contendo solo orgânii

co úmido esterilizado no fundo. Estes recipientes foram mantidos em casa de vegetação. As larvas que desciam ao solo, último instar larval, eram coletadas diariamente e colocadas em recipientes de 21 cm de diâmetro por 8 cm de altura contendo solo orgânico úmido esterilizado (aproximadamente 10 cm de solo), e trazidas ao laboratório, onde foram utilizadas no bioensaio de patogenicidade. Para a obtenção dos adultos, as larvas trazidas ao laboratório eram mantidas em recipientes com solo, cobertos com pano de filó amarrados com atílio de borracha, até atingirem a fase adulta, sendo que eram então transferidos para gaiolas de acrílico, de forma cilíndrica, com 17 cm de diâmetro e 34 cm de altura, com tela de arame na parte inferior e pano de filó na parte superior. Vagens verdes trazidas do campo eram adicionadas dentro das gaiolas para a alimentação destes adultos até a utilização dos mesmos no bioensaio.

3.10.5. Aplicação do fungo e manutenção dos insetos

A aplicação do fungo foi feita em grupos de 10 larvas ou 10 adultos, através da pulverização de 0,3 ml da suspensão de conídios ou 0,3 ml de "Tween" 80 0,1% para a testemunha, em uma torre calibrada de pulverização direta (Figura 2). Após a aplicação, as larvas foram colocadas em placas de Petri (10 insetos/placa) contendo 30 g de solo or

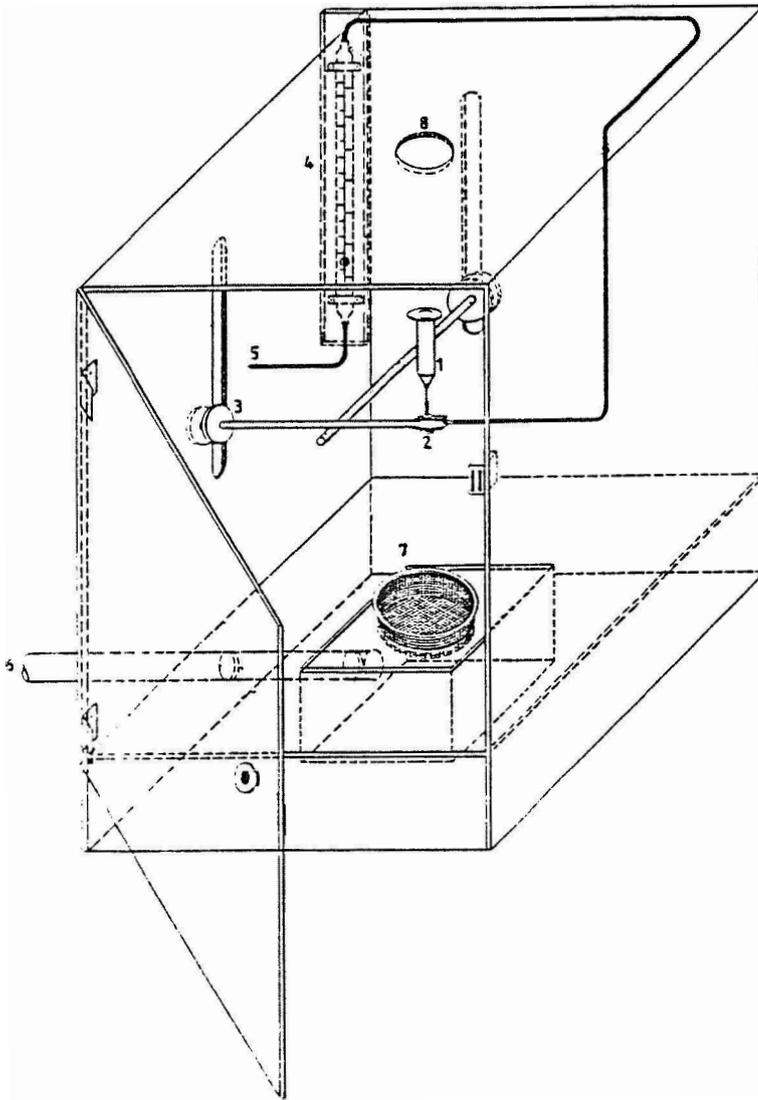


Figura 2. Torre calibrada de pulverização direta. CNPAF, Goiânia, GO. 1987.

Legenda:

- | | |
|--|--|
| 1. Seringa | 5. Tubo de conexão ao compressor |
| 2. Bico de pulverização | 6. Tubo de conexão ao aspirador |
| 3. Regulagem da altura de pulverização | 7. Suporte (peneira) para a superfície a ser pulverizada |
| 4. Manômetro | 8. Orifício para introdução da pipeta. |

gânico esterilizado (estufa a 160°C, 4 horas) umedecidas com 10-12 ml de água destilada esterilizada, e os adultos foram colocados em placas de Petri (10 insetos/placa) com fundo revestido com papel filtro umedecido com água destilada e pedaços de vagens de caupi. As placas foram mantidas em estufas B.O.D. a 24 ± 1°C. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Insetos do Centro Nacional de Pesquisa do Arroz e Feijão - CNPAF - Goiânia - GO

3.10.6. Delineamento experimental

Cada linhagem foi aplicada em 3 níveis de concentração de conídios (10^8 , 10^7 , 10^6 conídios/ml), sendo que se utilizou 5 repetições para cada tratamento, com 10 larvas/repetição, em experimento inteiramente casualizado.

As avaliações foram iniciadas no 3º dia após a aplicação, sendo realizadas diariamente no experimento com larvas e de dois em dois dias no experimento com adultos. Os insetos mortos foram retirados e colocados em placas de Petri com fundo revestido com papel filtro umedecido com água destilada, para confirmação da infecção.

As comparações entre as taxas de mortalidades dos diferentes tratamentos, realizadas em cada um dos períodos, foram analisadas segundo o teste de comparações entre proporções multinomiais, proposto por GOODMAN (1964), ao ní

vel de 5% de significância. Análises de probits (FINNEY, 1971) também foram realizadas para o cálculo do TL₅₀ e TL₉₀ (tempo letal 50% e tempo letal 90%) e obtenção das curvas de tempo mortalidade. A Taxa de Potência foi calculada, segundo ALVES (1986), adotando-se a linhagem E9 como padrão, sendo expressa por Unidades de Potência (U.P.), utilizando a fórmula:

$$TP = \frac{TL_{50} \text{ da linhagem padrão}}{TL_{50} \text{ da amostra}} \times 1000 \text{ (U.P.)}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sobrevivência à luz ultra-violeta

A frequência de sobrevivência dos conídios em diferentes tempos de irradiação, para as três linhagens (E6, E9 e RJ), estão sumarizados nas Tabelas 1, 2 e 3. A partir destes dados, foram obtidas as curvas de sobrevivência destas linhagens (Figura 3).

As linhagens E6 e RJ parecem não ser diferentes entre si para a resistência a luz UV, enquanto que a linhagem E9 se mostrou mais resistente que as demais. Esta maior resistência da linhagem E9 pode refletir uma possível seleção automática deste caráter, em função da mesma já ter sido amplamente utilizada a nível de campo e, consequentemente, submetida aos efeitos seletivos da radiação solar.

A existência de variabilidade genética para o caráter de resistência à luz ultra-violeta é muito importante do ponto de vista aplicado, pois uma das limitações na utilização dos fungos em condições de campo é a da morte

Tabela 1 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem E6 em diferentes tempos de irradiação à luz ultravioleta.

Tempo de irradiação (minutos)	Número de sobreviventes	Porcentagem de sobreviventes
0	$1,9 \times 10^6$	100,00
2	$1,6 \times 10^4$	0,84
4	$6,6 \times 10^2$	0,03
8	$3,3 \times 10^3$	0,17
16	$5,8 \times 10^2$	0,03

Tabela 2 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem E9 em diferentes tempos de irradiação à luz ultravioleta

Tempo de irradiação (minutos)	Número de sobreviventes	Porcentagem de sobreviventes
0	$3,9 \times 10^6$	100,00
2	$3,8 \times 10^5$	10,00
4	$2,3 \times 10^4$	0,60
8	$5,7 \times 10^3$	0,14
16	$5,4 \times 10^3$	0,13

Tabela 3 - Número e porcentagem relativa de conídios sobre-
vivos da linhagem RJ em diferentes tempos de
irradiação à luz ultravioleta.

Tempo de irradiação (minutos)	Número de sobreviventes	Porcentagem de sobreviventes
0	$2,4 \times 10^6$	100,00
2	$1,0 \times 10^4$	0,42
4	$3,3 \times 10^3$	0,14
8	$2,5 \times 10^3$	0,10
16	$2,0 \times 10^3$	0,08

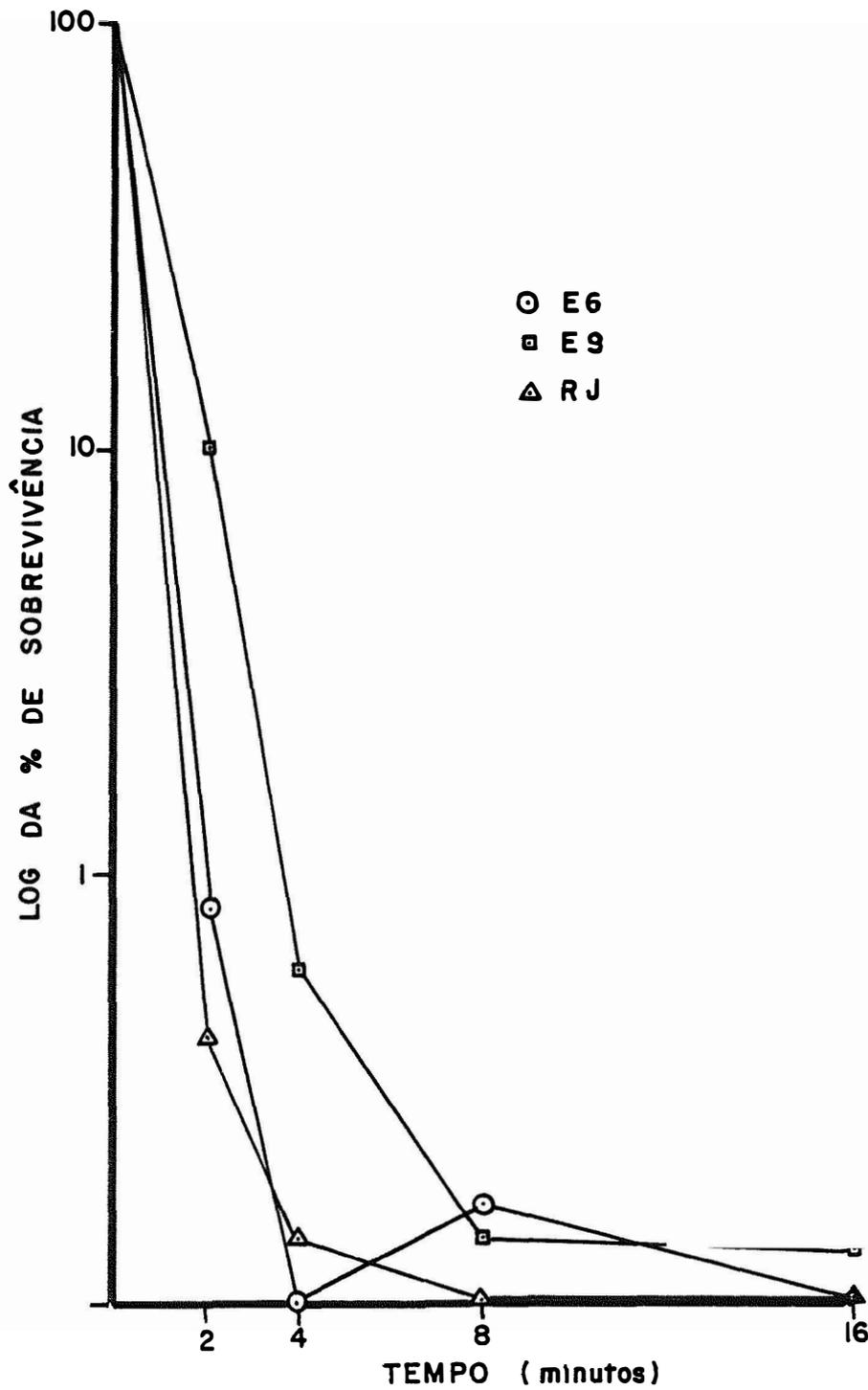


Figura 3 - Curva de sobrevivência dos isolados E6, E9 e RJ de *M. anisopliae* em diferentes tempos (minutos) de irradiação à luz ultravioleta.

dos conídios provocada pela radiação ultra-violeta da luz solar (CORREA & AZEVEDO, 1986). A possibilidade de se combinar, em uma mesma linhagem, o caráter de maior resistência à radiação, com outros relacionados à patogenicidade e maior viabilidade do fungo no ambiente, é promissor em termos de melhoramento genético.

4.2. Mutantes morfológicos obtidos

Os mutantes morfológicos obtidos para as três linhagens estão sumarizados na Tabela 4. Estes mutantes foram selecionados visualmente, escolhendo-se aqueles que apresentavam coloração diferente das linhagens selvagens e que ainda mantinha características de bom crescimento e produção de conídios.

Estes mutantes para coloração podem ser agrupados em duas classes, quais sejam: amarelo e violeta ou cinza. Na classe amarela, de maior ocorrência, observa-se uma variação na tonalidade da coloração, indo do amarelo bem forte até o amarelo quase verde; já na classe violeta ou cinza, observa-se uma maior uniformidade entre os mesmos. Estas duas classes de mutantes morfológicos podem estar relacionados à existência de duas possíveis vias biossintéticas (MAGOON & MESSING -AL-AIDROOS, 1986) envolvidas na produção do pigmento verde, característico da coloração selvagem. Uma destas vias, provavelmente com mais passos metabólicos, esta-

Tabela 4 - Mutantes morfológicos das linhagens E6, E9 e RJ obtidos através da irradiação com ultravioleta.

Linhagem selvagem irradiada	Morfologia da colônia	Denominação do mutante
E ₆	amarelo-forte	E ₆ <i>ylo1</i>
E ₆	violeta cinza	E ₆ <i>vio2</i>
E ₆	amarela verdeada	E ₆ <i>ylo3</i>
E ₆	amarela verdeada	E ₆ <i>ylo4</i>
E ₆	amarela com bordos verdes	E ₆ <i>ylo5</i>
E ₆	amarela com bordos verdes	E ₆ <i>ylo6</i>
E ₆	amarela verdeada	E ₆ <i>ylo7</i>
E ₉	amarela forte	E ₉ <i>ylo1</i>
E ₉	amarela forte	E ₉ <i>ylo2</i>
E ₉	violeta cinza	E ₉ <i>vio3</i>
E ₉	violeta cinza	E ₉ <i>vio4</i>
E ₉	violeta cinza	E ₉ <i>vio5</i>
RJ	violeta cinza	RJ <i>vio1</i>

ria relacionada com os mutantes amarelos e a outra via, com menos passos metabólicos, relacionada com os mutantes violetas.

4.3. Mutantes auxotróficos obtidos

Os resultados da frequência de obtenção dos mutantes auxotróficos, nos diversos tratamentos, para as diferentes linhagens selvagens e mutantes, estão apresentados na Tabela 5.

Os tipos de mutantes auxotróficos obtidos e suas frequências, nos diversos tratamentos, estão sumarizados na Tabela 6.

O método de irradiação com UV e enriquecimento por filtração (tratamento 2) foi o que apresentou melhores resultados. Observou-se uma frequência de 0,8 a 3,2% de mutantes. Comparando-se com o método de irradiação e isolamento total (tratamento 1), onde se obteve uma frequência média de 0,3% de mutantes, o aumento observado é de 2,6 a 10,7 vezes. Esta mesma comparação quando feita com os resultados obtidos por MESSIAS (1979), o qual obteve 0,1% de mutantes no isolamento total, proporciona um aumento de 8 a 32 vezes, o que é praticamente a metade do obtido por SILVEIRA & AZEVEDO (1984), que obtiveram um aumento de

Tabela 5 - Frequência de obtenção de mutantes auxotróficos em *M. anisopliae* nos diferentes tratamentos em diversas linhagens

Tratamento	Linhagens utilizadas	Número de colônias ensaiadas	Número de mutantes obtidos	Frequência de mutantes obtidos	
1	E6	260	0	0,00	
	E9	234	1	0,0043	
	RJ <i>vio1</i>	<u>156</u>	<u>1</u>	<u>0,0064</u>	
		650	2	0,0030	
	E6 <i>vio2</i>	512	5	0,010	
	E6 <i>ylo4</i>	496	4	0,008	
	E6 <i>ylo7</i>	307	7	0,023	
	E9 <i>ylo1</i>	339	6	0,018	
	E9 <i>ylo2</i>	238	5	0,020	
	E9 <i>met1</i>	125	5	0,024	
2	RJ <i>vio1</i>	618	7	0,008	
	E6 <i>vio2 lis6</i>	257	4	0,015	
	E6 <i>vio2 ade5</i>	254	3	0,029	
	E9 <i>ylo1 met1</i>	220	7	0,032	
	E9 <i>ylo1 leu6</i>	247	5	0,020	
	E9 <i>ylo2 lis3</i>	225	3	0,013	
	RJ <i>vio1 lis3</i>	<u>276</u>	<u>5</u>	<u>0,018</u>	
		4114	66	0,016	
	3*	RJ <i>vio1</i>	879	0	0,000
		E6 <i>vio2 ade5 pro1</i>	495	0	0,000
E9 <i>ylo1 leu6 rib8</i>		<u>520</u>	<u>0</u>	<u>0,000</u>	
	1893	0	0,000		
4	RJ <i>vio1</i>	208	0	0,000	
5	RJ	364	4	0,011	

* No tratamento 3 também não se obteve mutante morfológico.

Tabela 6 - Frequência dos tipos de mutantes auxotróficos obtidos nos diversos tratamentos.

Tratamentos	Tipos de mutantes	Número de vezes que ocorre	Frequência
1	met	2	1,00
2	met	15	0,22
	lis	8	0,12
	leu	5	0,07
	arg	4	0,06
	pro	2	0,03
	(cas.)	<u>9</u>	<u>0,13</u>
		43	0,65
	ade	10	0,15
	gua	<u>1</u>	<u>0,01</u>
		11	0,17
	bio	2	0,03
	nic	2	0,03
	rib	1	0,01
	pir	1	0,01
	(vit.)	<u>6</u>	<u>0,09</u>
		12	0,18
		<u>66</u>	<u>1,00</u>
5	(cas.)	3	0,75
	(vit.)	<u>1</u>	<u>1,25</u>
		4	1,00

met - mutante deficiente na biossíntese de metionina; lis - lisina; leu - leucina; arg - arginina; pro - prolina; ade - adenina; gua - guanina; bio - biotina; rib - riboflavina; pir - pirodoxina; (cas.) - mutantes deficiente na biossíntese de aminoácidos, cresce quando suplementado com caseína; (vit.) - vitaminas.

23 a 61 vezes. Do total de mutantes obtidos pelo método de enriquecimento, 65% são para deficiência na síntese de aminoácido, 18% para vitaminas e 17% para ácido nucléicos. Os tipos de mutantes mais frequentes foram para metionina(22%) seguido de adenina (15%) e lisina (12%). A maior frequência de mutantes para aminoácidos em métodos de enriquecimento por filtração tem sido relacionada a um possível crescimento dos mutantes para vitaminas utilizando traços desses elementos, por um processo de sintrofismo com os prototróficos ou pela lise espontânea das células (STRAUSS, 1958; SILVEIRA & AZEVEDO, 1984).

A não obtenção de mutantes a partir de colônias regeneradas de protoplastos pode ser devido ao fato de que a protoplastização não provoca alterações a nível de DNA ou estas estariam ocorrendo, porém inviabilizando o protoplasto, não permitindo a sua regeneração, ou então as alterações ocorrem em uma frequência muito baixa, sendo mascaradas pela ocorrência de protoplastos com mais de um núcleo.

Na Tabela 7 estão sumarizados todos os mutantes obtidos, com ou sem marca morfológica e com dupla deficiência auxotrófica. Algumas marcas não puderam ser caracterizadas quanto ao tipo de requisito nutricional, ou o faram apenas na diferenciação entre solução de vitaminas e caseína (aminoácidos). A obtenção de um bom número de mutantes é essencial nos estudos da parassexualidade

Tabela 7 - Total de mutantes obtidos, com dupla deficiência auxotrófica

Nº protocolar	Linhagens
1	E6 <i>vio2 ade5 pro11</i>
2	E6 <i>vio2 ade5 met17</i>
3	E6 <i>vio2 ade5 met22</i>
4	E6 <i>vio2 ade5 lis27</i>
5	E6 <i>vio2 lis6 bio1</i>
6	E6 <i>vio2 lis6 met5</i>
7	E6 <i>vio9 met9 bio9*</i>
8	E6 <i>ylo8 pir8 lis8*</i>
9	E6 <i>vio2 ade5 (vit 12)**</i>
11	E9 <i>met1 lis1</i>
12	E9 <i>met1 lis3</i>
13	E9 <i>ylo1 met1 pir6</i>
14	E9 <i>ylo1 met1 lis10</i>
15	E9 <i>ylo1 met1 nic12</i>
16	E9 <i>ylo1 met1 arg13</i>
17	E9 <i>ylo1 leu6 pro1</i>
18	E9 <i>ylo1 leu6 met2</i>
19	E9 <i>ylo1 leu6 rib8</i>
20	E9 <i>ylo1 leu6 ade9</i>
21	E9 <i>ylo1 lis3 arg12</i>
22	E9 <i>ylo2 lis3 met13</i>
23	E9 <i>ylo2 lis3 met14</i>
24	E9 <i>ylo1 met1 x2**</i>
25	E9 <i>ylo1 met1 x5**</i>
26	E9 <i>ylo1 met1 x7**</i>
27	E9 <i>ylo1 met1 x2**</i>
28	E9 <i>ylo1 leu6 x3**</i>
29	E9 <i>ylo1 leu6 x5**</i>
31	RJ <i>vio1 lis3 bio2</i>
32	RJ <i>vio1 lis3 met5</i>
33	RJ <i>vio1 lis3 met17</i>
34	RJ <i>vio1 lis3 (vit.8)**</i>
35	RJ <i>vio1 lis3 (cas.15)**</i>
36	RJ <i>leu1 lis2</i>
37	RJ <i>leu1 (vit.3)**</i>
38	RJ <i>vio1 met1 (vit 9)**</i>

* Os mutantes 7 e 8 foram obtidos por Wanderley Dias Silveira, do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP.

** Mutantes com a 2^a marca auxotrófica não caracterizada.

vit. = vitamina

cas. = caseína

permitindo maiores opções de cruzamento entre linhagens com marcas complementares e também para facilitar os estudos de mapeamento de genes e de número de grupos de ligação.

4.4. Obtenção, regeneração e citologia de protoplastos

4.4.1. Obtenção e regeneração

Na Tabela 8 estão os resultados do número de protoplastos obtidos e a frequência de regeneração nas diferentes linhagens, utilizando dois complexos enzimáticos diferentes para a obtenção dos protoplastos e dois estabilizadores osmóticos diferentes para a regeneração dos mesmos.

O complexo enzimático (Z + M + C), quando utilizado na linhagem E6, demonstrou ser inferior ao complexo (S + N), pois observou-se uma menor produção de protoplastos e uma baixa regeneração. Esse mesmo complexo enzimático apresentou bons resultados na linhagem RJ, com boa produção de protoplastos (maior do que o complexo S + N) e uma boa regeneração (porém menor do que a observada no complexo (S + N). O complexo enzimático (S + N) apresentou, de uma maneira geral, bons resultados em todas as linhagens, com destaque de maior produção nas linhagens E9 e RJ.

Tabela 8 - Número de protoplastos obtidos e frequência de regeneração em diferentes linhagens de *M. anisopliae*.

Linhagens	Complexo enzimático	Número de protoplastos/ml	Frequência de Regeneração	
			KCl 0,7M	Sacarose 0,6 M
E6	Z + M + C	$1,6 \cdot 10^6$	0,05	0,05
E6	S + N	$3,1 \cdot 10^6$	0,44	0,40
E6 <i>vio2 ade5 pro11</i>	S + N	$2,6 \cdot 10^6$	0,15	
E6 <i>vio2 ade5 pro11</i>	S + N	$2,2 \cdot 10^6$		
E9 <i>ylo1 leu6 rib8</i>	S + N	$2,5 \cdot 10^7$	0,36	
E9 <i>ylo1 leu6 rib8</i>	S + N	$1,6 \cdot 10^7$		
RJ	Z + M + C	$8,0 \cdot 10^6$	0,10	0,35
RJ	S + N	$6,0 \cdot 10^6$	0,46	
RJ <i>vio1</i>	S + N	$6,0 \cdot 10^6$	0,12	
RJ <i>vio1</i>	S + N	$3,3 \cdot 10^7$	0,27	

Z = Zimoliase (1 mg/ml)

M = Macerozim R - 10 (5 mg/ml)

C = Celulase Onozuka (20 mg/ml)

S = Celulase Sturge (2,5 mg/ml)

N = Novoym (2,5 mg/ml)

A frequência de regeneração dos protoplastos foi bastante variada (de 0,05 a 0,44), com uma média de 0,24 em KCl 0,7M e 0,26 em sacarose 0,6M. Parece estar havendo uma relação do tipo "maior produção - maior taxa de regeneração". O estabilizador osmótico com KCl 0,7M é o mais comumente utilizado; no entanto, a frequência de regeneração obtida por alguns autores não tem sido muito boa (SILVEIRA & AZEVEDO, 1987). A utilização de sacarose 0,6M apresentou bons resultados de regeneração, sendo o seu inconveniente, o fato de deixar o meio muito viscoso, dificultando a distribuição dos protoplastos durante a semeadura.

Diferenças na obtenção e regeneração de protoplastos, entre as linhagens, podem refletir diferenças na constituição da parede celular das mesmas. A busca de novos complexos enzimáticos, bem como de novos estabilizadores osmóticos poderá aprimorar a metodologia de obtenção e regeneração de protoplastos, tornando mais viável a fusão de protoplastos entre linhagens com características genéticas distintas.

4.4.2. Citologia dos protoplastos

A análise citológica dos protoplastos foi realizada na linhagem RJ *vi01*, após 3 horas de digestão com as enzimas (S + N) em KCl 0,7M. Na Tabela 9 estão os resultados da distribuição da frequência de número de núcleos/pro-

toplastos, onde se observa que a maioria dos protoplastos é uninucleada (71,4%), com 23,4% de binucleados a 5% de trinucleados, ocorrendo também protoplastos com até 5 núcleos (0,2%). Observou-se também a ocorrência de protoplastos anucleados em uma frequência da ordem de 10 a 20% do total. A Figura 4 traz os registros fotográficos realizados em fotomicroscópio, onde se observam diferentes aspectos da morfologia dos protoplastos. Na foto 1, os protoplastos, sem fixação e coloração, apresentam uma variação de tamanho; na foto 2, protoplasto sendo liberado e fragmento de hifa (seta); na foto 3, protoplastos anucleados e com diferentes formatos (setas); na foto 4, um protoplasto em divisão nuclear (seta 4.1) e um com núcleo e nucléolo bem visível (seta 4.2); na foto 5, vários protoplastos uninucleados com nucléolos visíveis (seta 5.1), um protoplasto bem maior em divisão nuclear (seta 5.2) e um em formato elipsoidal (provavelmente) com restos de parede (seta 5.3); na foto 6, um protoplasto em divisão nuclear com "corpos cromatídicos" bem visíveis (seta).

A coloração com Giemsa permitiu uma boa visualização dos núcleos (coloração mais intensa) e também dos nucléolos (coloração menos intensa). O pequeno tamanho dos núcleos não permitiu uma identificação segura dos cromossomos, mas, em alguns casos, foram visualizados "corpos cromatídicos" (TANAKA et al., 1974) de núcleos em divisão, os quais podem ser os próprios cromossomos (TANAKA, Comunica

Tabela 9 - Distribuição da frequência de número de núcleos/
protoplastos na linhagem de *M. anisopliae* RJ
viol.

Repetições	Número de núcleos/protoplastos				
	1	2	3	4	5
I	68	27	5	0	0
II	73	21	6	0	0
III	68	23	7	0	1
IV	74	23	3	0	0
V	73	23	4	0	0
TOTAL	357	117	25	0	1
\bar{x}	71,4	23,4	5,0	0	0,2

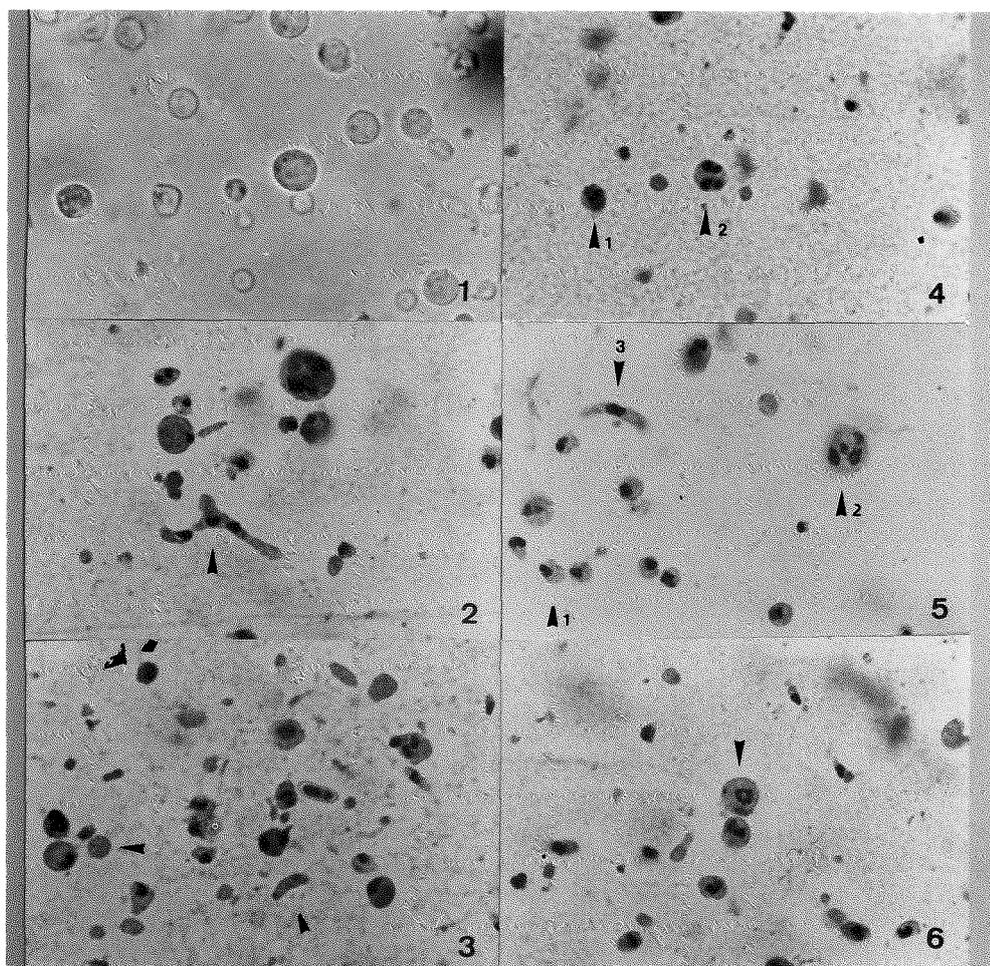


Figura 4 - Protoplastos de *M. anisopliae* linhagem RJ *vi01*, aumento 1000 x, obtidos após 3 horas de digestão com enzimas Sturge + Novozym. Foto 1 - sem coloração; fotos 2 a 6, com fixação e coloração em Giemsa HCl (Merck).

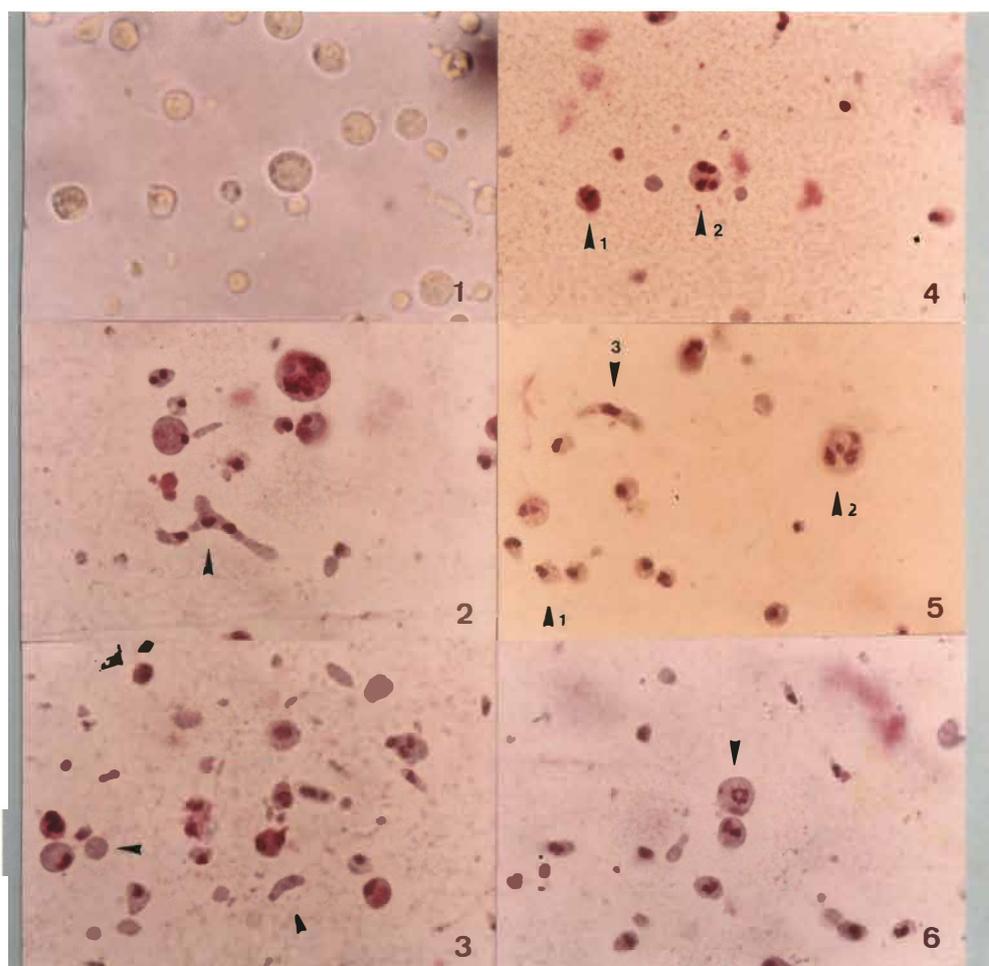


Figura 4 - Protoplastos de *M. anisopliae* linhagem RJ *viol*, aumento 1000 x, obtidos após 3 horas de digestão com enzimas Sturge + Novozym. Foto 1 - sem coloração; fotos 2 a 6, com fixação e coloração em Giemsa HCl (Merck).

ção pessoal). O número destes "corpos cromatídicos" é de quatro ou cinco, o que reforça a hipótese de que o número de grupos de ligação em *M. anisopliae* é pequeno (MESSIAS, 1979), sendo provavelmente cinco (BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS, 1982).

4.5. Teste de reversão

Os mutantes com dupla deficiência auxotrófica das linhagens de E6 e E9, que apresentavam bom crescimento e produção de conídios, foram ensaiados quanto à reversão espontânea de suas marcas, semeando-se nunca menos que 10^6 conídios/placa em MM. Os resultados estão sumarizados na Tabela 10, onde pode ser observado que nenhum mutante apresentou colônias revertentes nesta quantidade de conídios utilizados. A não reversão dos mutantes, nas condições aqui empregadas, permite uma maior segurança na obtenção de diplóides e recombinantes a partir de altas concentrações de conídios (em torno de 10^6) do heterocário.

4.6. Obtenção de heterocários

Na Tabela 11 estão os resultados da obtenção de heterocários nos diversos cruzamentos, onde se avaliou o

Tabela 10 - Frequência de reversão espontânea dos mutantes com dupla deficiência auxotrófica das linhagens de E6 e E9.

Nº protocolar	Linhagens	Frequência de reversão em 10^6 a 10^7 conídios
1	E6 <i>vio2 ade5 pro11</i>	<1
2	E6 <i>vio2 ade5 met17</i>	<1
3	E6 <i>vio2 ade5 met22</i>	<1
4	E6 <i>vio2 ade5 lis27</i>	<1
9	E6 <i>vio2 ade5 pir12</i>	<1
6	E6 <i>vio2 lis6 met5</i>	<1
7	E6 <i>vio9 met9 bio9</i>	<1
8	E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	<1
11	E9 <i>met1 lis1</i>	<1
12	E9 <i>met1 lis3</i>	<1
15	E9 <i>ylo1 met1 bio12</i>	<1
17	E9 <i>ylo1 leu6 pro1</i>	<1
18	E9 <i>ylo1 leu6 met2</i>	<1
19	E9 <i>ylo1 leu6 rib8</i>	<1
20	E9 <i>ylo1 leu6 ade9</i>	<1
22	E9 <i>ylo2 lis3 met13</i>	<1
23	E9 <i>ylo2 lis3 met14</i>	<1

Tabela 11 - Coloração dos conídios e vigor dos heterocários obtidos em diversos cruzamentos entre mutantes de E6, E9 e RJ com marcas auxotróficas complementares.

Linhagens utilizadas (Nº protocólar)	Coloração dos conídios do heterocário	Vigor do heterocário
1 x 7	verde	++++
1 x 8	verde	++++
2 x 8	verde	++++
3 x 8	verde	+++
11 x 17	verde	+++
11 x 19	verde	+++
11 x 20	verde	+++
12 x 17	verde	++++
12 x 19	verde	++++
12 x 20	verde	++++
19 x 22	amarelo	++
20 x 22	amarelo	++
19 x 23	s.f.p.	-
20 x 23	s.f.p.	-
1 x 11	verde	++++
1 x 12	verde	++++
1 x 19	violeta	++
1 x 20	violeta	++
8 x 19	amarelo	++
8 x 20	amarelo	+++
1 x 31	s.f.p.	-
2 x 31	s.f.p.	-
3 x 31	s.f.p.	-

s.f.p. = sem formação de películas ++ = pouco vigor
++++ = bastante vigor + = muito pouco vigor
+++ = médio vigor - = não crescimento

vigor de crescimento das películas e a coloração dos conídios. Na maioria dos cruzamentos houve a complementação gênica com bom vigor das películas e com a restauração da coloração verde selvagem dos conídios. Em dois cruzamentos de E9 x E9 (19 x 22 e 20 x 22), a coloração dos conídios se manteve amarela, o que pode significar que as marcas *ylo1* e *ylo2* da linhagem E9 sejam alelas. Os cruzamentos 19 x 23 e 20 x 23 não formaram películas, provavelmente devido a uma não complementação das marcas auxotróficas. Os cruzamentos entre E6 x E9 apresentaram uma boa complementação com relação às marcas auxotróficas mas não com relação as marcas de coloração, pois a coloração dos conídios do heterocáριο 1 x 19 e 1 x 20 (E6 *vio* x E9 *ylo*) era violeta e de 8 x 19 e 8 x 20 (E6 *ylo* x E9 *ylo*) era amarelo. Embora poucos cruzamentos fossem realizados, a não obtenção de heterocáριο entre E6 x RJ vem confirmar uma incompatibilidade de parede entre estas linhagens, já observada por SILVEIRA (1983), o que dificulta o cruzamento entre as mesmas pela técnica clássica utilizada no ciclo parassexual.

4.7. Detecção da ocorrência de parameiose

4.7.1. Obtenção de possíveis diplóides e recombinantes haplóides

Na Tabela 12 estão sumarizados os cruzamen-

tos, bem como, os meios seletivos com diferentes suplementações, utilizados para a obtenção de possíveis diplóides e recombinantes haplóides. Os meios seletivos suplementados foram preparados de modo a possibilitar o crescimento de recombinantes auxotróficos com diferentes combinações de marcas, sem, no entanto, permitir o crescimento das linhagens parentais auxotróficas.

Os resultados da frequência de obtenção de colônias nos cruzamentos entre linhagens E6 x E6 estão sumariados na Tabela 13. Observou-se uma variação na frequência de $3,5 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-4}$ e também o crescimento confluyente em dois cruzamentos. Não se detectou diferenças entre semeaduras em meios com ou sem suplementação, bem como entre conídios provenientes de heterocário simples ou de pontas de hifas. Colônias obtidas nos diferentes meios seletivos, dos cruzamentos 1 x 8 e 2 x 8, foram purificadas e caracterizadas com relação à morfologia e auxotrofia. Estes resultados estão na Tabela 14. Confirmou-se a ocorrência de recombinantes prototróficos de coloração verde selvagem, amarela e violeta em MM e em MM com suplementação, e também de recombinantes auxotróficos com coloração verde e amarela, bem como um recombinante (*ylo ade*) com a marca morfológica de um parental e a marca auxotrófica do outro parental. Os recombinantes auxotróficos sempre foram obtidos no meio suplementado que possibilitava o seu crescimento, (*ylo pir* em MM + ade + piro e *ylo ade* também em MM + ade + piro), o

Tabela 12 - Cruzamentos realizados e tipos de meios seletivos utilizados na semeadura dos conídios para obtenção de diplóides e recombinantes.

Linhagens utilizadas		Meio seletivo
Número protocolar		
1 x 7	E6 <i>vio2 ade5 pro11</i> x	MM; MM+ade+met; MM+ade+bio;
	E6 <i>vio9 met9 bio9</i>	MM+pro+met; MM+pro+bio; MC
1 x 8	E6 <i>vio2 ade5 pro11</i> x	MM; MM+ade+piro; MM+ade+lis;
	E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	MM+pro+piro; MM+pro+lis; MC
2 x 8	E6 <i>vio2 ade5 met17</i> x	MM; MM+ade+piro; MM+ade+lis;
	E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	MM+met+piro; MM+met+lis; MC
3 x 8	E6 <i>vio1 ade5 met22</i> x	MM; MC
	E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	
11 x 20	E9 <i>met1 lis1</i> x	MM; MM+met; MM+lis; MM+leu;
	E9 <i>ylo1 leu6 ade9</i>	MM+ade; MM+met+leu; MM+met+ade; MM+lis+leu; MM+lis+ade; MC
12 x 20	E9 <i>met1 lis3</i> x	MM; MM+met; MM+lis; MM+leu;
	E9 <i>ylo1 leu6 ade9</i>	MM+ade; MM+met+leu; MM+met+ade; MM+lis+leu; MM+lis+ade; MC
1 x 20	E6 <i>vio2 ade5 pro11</i> x	MM; MM+ade; MM+leu;
	E6 <i>ylo1 leu6 ade9</i>	MM+pro; MM+pro+leu; MC
8 x 19	E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i> x	MM; MM+piro+leu; MM+piro+ribo;
	E9 <i>ylo1 leu6 rib8</i>	MM+lis+leu; MM+lis+ribo; MC
8 x 20	E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i> x	MM; MM+leu; MM+piro+leu; MM+piro+ade;
	E9 <i>ylo1 leu6 ade9</i>	MM+lis+leu; MM+lis+ade; MM+piro+lis; MM+leu+ade; MM+piro+lis+leu+ade; MC

Tabela 13 - Frequência de colônias obtidas a partir de sementeira de conídios provenientes de heterocários simples e de heterocários de pontas de hifas, em Meio Mínimo (MM) e em MM com diferentes suplementos nutricionais - Cruzamentos E6 x E6.

Linhagens utilizadas	Tipo de heterocário	MM confluente*	MM+ade+bio	Meio	Seleção	MM+ade+lis	MM+pro+piro	MM+pro+lis
1 x 7	simples		-					
1 x 7	p.h.1	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-5}$					
1 x 8	simples	$1 \cdot 10^{-4}$						
1 x 8	p.h.1	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$			$2,5 \cdot 10^{-4}$		$2,5 \cdot 10^{-4}$
2 x 8	p.h.1	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$			$5,3 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$MM+met+lis$
3 x 8	simples							

* Foram semeados 10^6 conídios/placas, onde se observou um crescimento confluyente p.h.1 - heterocário proveniente de pontas de hifas de um heterocário simples.

Tabela 14 - Recombinantes obtidos nos diferentes meios seletivos, com confirmação por análise auxonográfica - Cruzamentos E6 x E6.

Cruzamento		Meio seletivo	Recombinantes obtidos		Marca genética
			Tipos		
1 x 8	E6 <i>vio2 ade5 pro11</i>	MM	prototróficos de coloração verde		selvagem
	x	MM+ade+lis	prototróficos de coloração amarela		<i>ylo</i>
E6	<i>ylo8 pir8 lis8</i>	MM+ade+piro	prototróficos de coloração verde		selvagem
			prototróficos de coloração violeta		<i>ylo</i>
2 x 8	E6 <i>vio2 ade5 met17</i>	MM	auxotróficos de coloração amarela		<i>ylo piro</i>
	x	MM+met+piro	auxotróficos de coloração verde		<i>ylo</i>
E6	<i>ylo8 pir8 lis8</i>	MM+met+piro	prototróficos de coloração amarela		<i>ylo</i>
			prototróficos de coloração violeta		<i>vio</i>
E6	<i>ylo8 pir8 lis8</i>	MM+ade+piro	prototróficos de coloração verde		selvagem
			prototróficos de coloração verde/amarela		<i>ylo</i> -selvagem
E6	<i>ylo8 pir8 lis8</i>	MM+ade+piro	auxotróficos de coloração amarela		<i>ylo piro</i>
			auxotróficos de coloração amarela		<i>ylo ade</i>

que demonstra a validade de se utilizar estes tipos de meios seletivos para a obtenção dos mesmos. A ocorrência de recombinantes com marcas genéticas de parentais distintos, bem como recombinantes com marcas auxotróficas e coloração verde selvagem, descarta a possibilidade de reversão das marcas e confirma o processo de fusão nuclear seguido de haploidização.

Na Tabela 15 estão os resultados da frequência de colônias obtidas nos cruzamentos de E9 x E9. Em ambos os cruzamentos observou-se uma frequência maior de colônias (média de $1,1 \cdot 10^{-3}$) nos meios com dupla suplementação, uma frequência intermediária (média de $1,5 \cdot 10^{-5}$) nos meios com uma única suplementação e uma frequência menor (média de $4,0 \cdot 10^{-6}$) em MM sem suplementação. A maior frequência de colônias nos meios com suplementações pode ser devido ao fato de que estes, além dos recombinantes prototróficos, permitem também o crescimento dos recombinantes auxotróficos.

Na Tabela 16 estão os resultados da frequência de obtenção de colônias nos cruzamentos entre as linhagens E6 x E9. Observou-se uma grande variação na frequência entre os diversos cruzamentos, não se detectando diferenças entre os meios com e sem suplementações. No cruzamento 8 x 20, proveniente de pontas de hifas 1, observou-se um crescimento confluyente. Conídios deste mesmo cruzamento,

Tabela 15 - Frequência de colônias obtidas a partir da semeadura de conídios provenientes de heterocários simples, em diferentes meios seletivos - Cruzamento E9 x E9.

Linhas utilizadas	Tipo do heterocário	Meio seletivo								
		MM	MM+met	MM+lis	MM+leu	MM+ade	MM+met+leu	MM+met+ade	MM+lis+leu	MM+lis+ade
11 x 20	simples	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	-	-	-	$2 \cdot 10^{-3}$	-
12 x 30	simples	$4,5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$7,0 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	-	$7,3 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$

Tabela 16 - Frequência de colônias obtidas a partir da sementeira de conídios provenientes de heterocários de pontas de hifas, em Meio Mínimo (MM) com diferentes suplementações nutricionais - Cruzamentos E6 x E9.

Linhagens utilizadas	Tipo de heterocário	Meio s e l e t i v o					
		MM	MM+ade	MM+leu	MM+pro	MM+pro+leu	
1 x 20	p.h.1	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	
8 x 19	p.h.1	MM $3 \cdot 10^{-5}$	MM+pro+leu $2,5 \cdot 10^{-4}$	MM+piro+ribo $2,0 \cdot 10^{-5}$	MM+lis+leu $1,0 \cdot 10^{-4}$	MM+lis+ribo $1,0 \cdot 10^{-4}$	
8 x 20	p.h.1	MM confluente*	MM+piro+leu confluente	MM+piro+ade confluente	MM+lis+leu confluente	MM+lis+ade confluente	
8 x 20	p.h.2	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1}$	

* Foram semeados 10^6 conídios/placas, onde se observou um crescimento confluyente em todas as placas

p.h.1 - heterocário proveniente de pontas de hifas de um heterocário simples

p.h.2 - heterocário proveniente de pontas de hifas de um heterocário p.h.1.

porém proveniente de pontas de hifas 2, foram semeados em concentrações mais diluídas, onde se observou uma alta frequência de obtenção de colônias ($1 \cdot 10^{-1}$). Colônias purificadas dos cruzamentos 1 x 20 e 8 x 20 foram caracterizadas com relação às suas marcas morfológicas e auxotróficas; estes resultados estão na Tabela 17. No cruzamento 1 x 20 detectou-se a ocorrência de recombinantes prototróficos de coloração verde selvagem em MM com suplementação (MM + leu+pro), recombinantes prototróficos de coloração violeta em MM com e sem suplementações e também recombinantes auxotróficos (leu) em MM suplementados contendo leucina (MM + leu e MM + leu + pro). No cruzamento 8 x 20, onde se observou uma alta frequência de colônias, detectou-se a ocorrência de recombinantes prototróficos de coloração verde e coloração amarela, em todos os meios seletivos, inclusive em meio completo, e também recombinantes auxotróficos nos meios que continham a respectiva suplementação (*ylo ade* em MM+lis+adee *ylo leu* em MM + leu e MM + piro + lis + leu + ade). A alta frequência de recombinantes prototróficos verdes e amarelos, bem como de recombinantes auxotróficos, sugere que neste cruzamento, ocorreu uma alta frequência de fusão nuclear seguida de haploidização, pois caso se tratasse da emissão de um único setor recombinante prototrófico no heterocário, apenas este tipo de recombinante seria detectado. Nos cruzamentos 1 x 7 e 3 x 8, onde também se observou crescimento confluyente, mas não se investigou as marcas genéticas das

Tabela 17 - Recombinantes obtidos nos diferentes meios seletivos, com confirmação por análise auxonográfica - Cruzamentos E6 x E9.

Cruzamento	Meio seletivo	Recombinantes obtidos		Marca genética
		Tipos		
E6 <i>vio2 ade5 pro11</i> 1 x 20	MM MM+ade	prototróficos de coloração violeta		<i>vio</i>
		prototróficos de coloração violeta		<i>vio</i>
E6 <i>vio2 ade5 pro11</i> 1 x 20	MM+leu	prototróficos de coloração violeta		<i>vio</i>
		prototróficos de coloração verde		<i>leu</i>
E9 <i>yl01 leu6 ade9</i>	MM+pro	prototróficos de coloração violeta		<i>vio</i>
		auxotróficos de coloração verde		<i>leu</i>
E6 <i>yl08 pyr8 lis8</i> 8 x 20*	MM+leu+pro	prototróficos de coloração verde		selvagem
		prototróficos de coloração verde		selvagem
E6 <i>yl08 pyr8 lis8</i> 8 x 20*	MC, MM e de mais meios	prototróficos de coloração verde		selvagem
		prototróficos de coloração amarela		<i>yl0</i>
E9 <i>yl01 leu6 ade9</i>	MM+leu, MM+piro+lis+ leu+ade	prototróficos de coloração verde		selvagem
		prototróficos de coloração amarela		<i>yl0</i>
E9 <i>yl01 leu6 ade9</i>	MM+lis+ade	auxotróficos de coloração amarela		<i>yl0 leu</i>
		prototróficos de coloração verde		selvagem
E9 <i>yl01 leu6 ade9</i>	MM+lis+ade	prototróficos de coloração verde		<i>yl0</i>
		auxotróficos de coloração amarela		<i>yl0 ade</i>

* Observou-se uma alta frequência de recombinantes (1.10^{-1}) neste cruzamento, sendo possível a obtenção de prototróficos em todos os meios seletivos, inclusive em MC.

colônias obtidas, esta alta frequência de fusão nuclear e haploidização também poderia ter ocorrido.

4.7.2. Análise genética dos recombinantes

A análise genética, utilizando-se de recombinantes obtidos em meios seletivos, para inferências sobre número de grupos de ligação, bem como sobre o mapeamento de genes, é possível; muito embora esta análise seja mais complexa, havendo necessidade de se fazer uma abordagem mais qualitativa do que quantitativa. Pela análise das marcas genéticas dos recombinantes obtidos nos cruzamentos 1 x 8, 2 x 8, 1 x 20 e 2 x 20, com confirmação por análise auxonográfica, e caracterização da marca morfológica observa-se que não há evidências de ligação entre as marcas utilizadas. Considerando o fato de que o número de grupos de ligação em *M. anisopliae* é pequeno, sendo provavelmente 5 (BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS, 1982) e que em todos os cruzamentos realizados se utilizaram parentais com 2 marcas auxotróficas e uma morfológica, num total de 6 marcas por cruzamento, pode-se concluir que a maior parte dos recombinantes obtidos resultou de eventos de permuta mitótica. Maior número de eventos de permuta mitótica, deve ter ocorrido nos recombinantes prototróficos selvagens obtidos em MM como meio seletivo. Deve ser salientado que os recombinantes confirmados por análise auxonográfica foram apenas uma pequena amostra

do total de recombinantes obtidos nos diferentes meios seletivos. Para se proceder um estudo mais detalhado sobre grupos de ligação e mapeamento de genes, é necessário que, para um mesmo cruzamento, um grande número de recombinantes obtidos nos diferentes meios seletivos, seja caracterizado com relação a sua marca morfológica e marcas auxotróficas.

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

4.7.3.1. Crescimento em meio contendo Benlate

Na Tabela 18 estão sumarizados os resultados, com 5 e 10 dias de crescimento, de duas linhagens mutantes e um recombinante, em meio completo (MC) com diferentes concentrações de Benlate, onde se determinou as concentrações inibitórias de crescimento. Observa-se que a partir de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ de meio, o crescimento começa a ser inibido, havendo uma forte inibição em 2 $\mu\text{g/ml}$ e uma inibição praticamente total em 4 $\mu\text{g/ml}$. Na Tabela 19 estão os resultados das características de crescimento das colônias de recombinantes prototróficos ou "possíveis diplóides" em MC e em MC + Benlate (1 $\mu\text{g/ml}$ de meio). Não se observou a emissão de setores por estas colônias, o que fortalece a hipótese dos mesmos serem recombinantes haplóides e não diplóides. O

Tabela 18 - Medidas de crescimento em centímetro (diâmetro maior - diâmetro menor da colônia), das linhagens 1 e 8 e recombinante 1 x 8, em diferentes concentrações de Benlate em Meio Completo (MC).

Concentração de Benlate g/ml de meio	L i n h a g e n s					
	5 dias de crescimento			10 dias de crescimento		
	1	8	1 x 8	1	8	1 x 8
0,0	13-12	20-20	14-13	25-24	39-39	23-23
0,0	13-12	19-19	14-13	25-24	39-38	23-22
0,0	13-12	20-19	13-13	24-24	40-38	23-22
0,1	12-11	19-18	13-13	23-23	38-36	23-22
0,1	12-11	20-20	13-13	25-23	41-40	23-22
0,1	12-11	20-19	13-13	23-23	38-36	24-23
0,2	13-12	19-19	-	26-25	42-40	-
0,2	13-12	20-19	-	24-23	39-38	-
0,2	13-12	21-21	-	25-24	39-38	-
0,4	13-12	20-20	13-13	25-25	37-35	24-24
0,4	13-13	21-20	14-13	26-26	39-39	24-23
0,4	13-13	19-19	13-13	25-24	39-39	23-22
0,6	13-13	20-20	13-13	27-23	36-35	21-20
0,6	13-12	19-19	13-12	23-23	36-36	21-21
0,6	15-13	19-18	13-12	28-24	38-37	23-22
0,8	12-11	18-18	12-12	23-23	38-37	20-20
0,8	11-11	18-18	13-13	24-23	37-36	22-22
0,8	11-11	18-17	12-12	23-23	37-35	20-20
1,0	12-11	17-17	13-13	24-23	35-35	23-23
1,0	12-12	17-16	13-12	24-23	35-35	21-20
1,0	12-11	16-16	12-12	23-23	36-36	23-23
2,0	5- 5	4- 4	6- 5	13-13	10- 9	15-15
2,0	2- 2	2- 2	6- 5	11-11	11-10	16-15
2,0	4- 3	3- 3	5- 5	10-15	11-11	17-16
4,0	0- 0	0- 0	0- 0	0- 0	0- 0	0- 0
4,0	0- 0	0- 0	0- 0	3- 3	4- 4	2- 2
4,0	0- 0	0- 0	0- 0	0- 0	0- 0	3- 3

1 = E6 *vio2 ade5 pro11*

8 = E6 *glo8 pir8 lis8*

1 x 8 = Recombinante prototrófico de coloração amarela obtido no cruzamento 1 x 8.

Tabela 19 - Características de crescimento de alguns recombinantes, em Meio Completo (MC) e em MC + Benlate (1 µg/ml)

Designação prototocar	Recombinante		Cruzamento		Características de crescimento	
	T i p o	onde foi obtido	onde foi obtido	MC	MC + Benlate (1µg/ml)	
61-A	prototrófico de coloração verde	2x8	2x8	estável	sem emissão de setores	
61-B	prototrófico de coloração amarela/verde	2x8	2x8	colônia amarela gera conídios prototróficos verdes	-	
61-B1	prototrófico de coloração verde	2x8(61-B)	2x8(61-B)	estável	sem emissão de setores	
61-B2	prototrófico de coloração amarela	2x8(61-B)	2x8(61-B)	estável	sem emissão de setores	
D1	prototrófico de coloração verde	8x20	8x20	estável	sem emissão de setores	
D2	prototrófico de coloração verde	8x20	8x20	estável	sem emissão de setores	
D3	prototrófico de coloração amarela	8x20	8x20	estável	sem emissão de setores	
D4	prototrófico de coloração amarela	8x20	8x20	estável	sem emissão de setores	

teste de Benlate tem se mostrado muito eficaz na distinção entre linhagens haplóides e diplóides (UPSHALL et al., 1976; BONATELLI Jr. et al., 1983).

4.7.3.2. Determinação da quantidade de DNA e análise citológica dos conídios

Na Tabela 20 estão sumarizados os resultados obtidos de absorvância em função da concentração de DNA, donde foi possível estabelecer uma equação da reta e obtenção da curva padrão (Figura 5). Os dados de absorvância das diversas linhagens e recombinantes, bem como da quantidade de DNA a partir da substituição na equação da reta, estão sumarizados na Tabela 21. As médias das quantidades de DNA das diversas linhagens e recombinantes, obtidas nos dois experimentos - em conjunto com os resultados da frequência de núcleos/conídios (Tabela 22), onde se observa que praticamente 100% dos conídios são uninucleados - apresentam indícios de que não há diferenças com relação ao grau de ploidia entre as mesmas, estando 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).

A ocorrência de diplóides heterozigotos estáveis, com posterior haploidização e surgimento de setores haplóides, não foi detectada, o que difere dos resultados

Tabela 20 - Absorbância observadas em função da concentração de DNA em 595 e 700 nm, para obtenção de equação de regressão.

DNA ($\mu\text{g/ml}$)	1º Experimento			2º Experimento		
	Absorbância			Absorbância		
	595 nm	700 nm	Diferença	595 nm	700 nm	Diferença
5	0,303	0,083	0,220*	0,079	0,018	0,061
10	0,188	0,040	0,148	0,108	0,016	0,092
20	0,280	0,051	0,229	0,170	0,020	0,150
40	0,406	0,063	0,343	0,282	0,017	0,265

Equação de regressão	$y = 0,0910 + 0,0064 \cdot x$	$y = 0,0331 + 0,0058 \cdot x$
Coefficiente de correlação	$r = 0,9957$	$r = 0,9999$

Y = Absorbância; X = quantidade de DNA

* Esta medida não foi considerada no cálculo da reta por se apresentar muito discrepante.

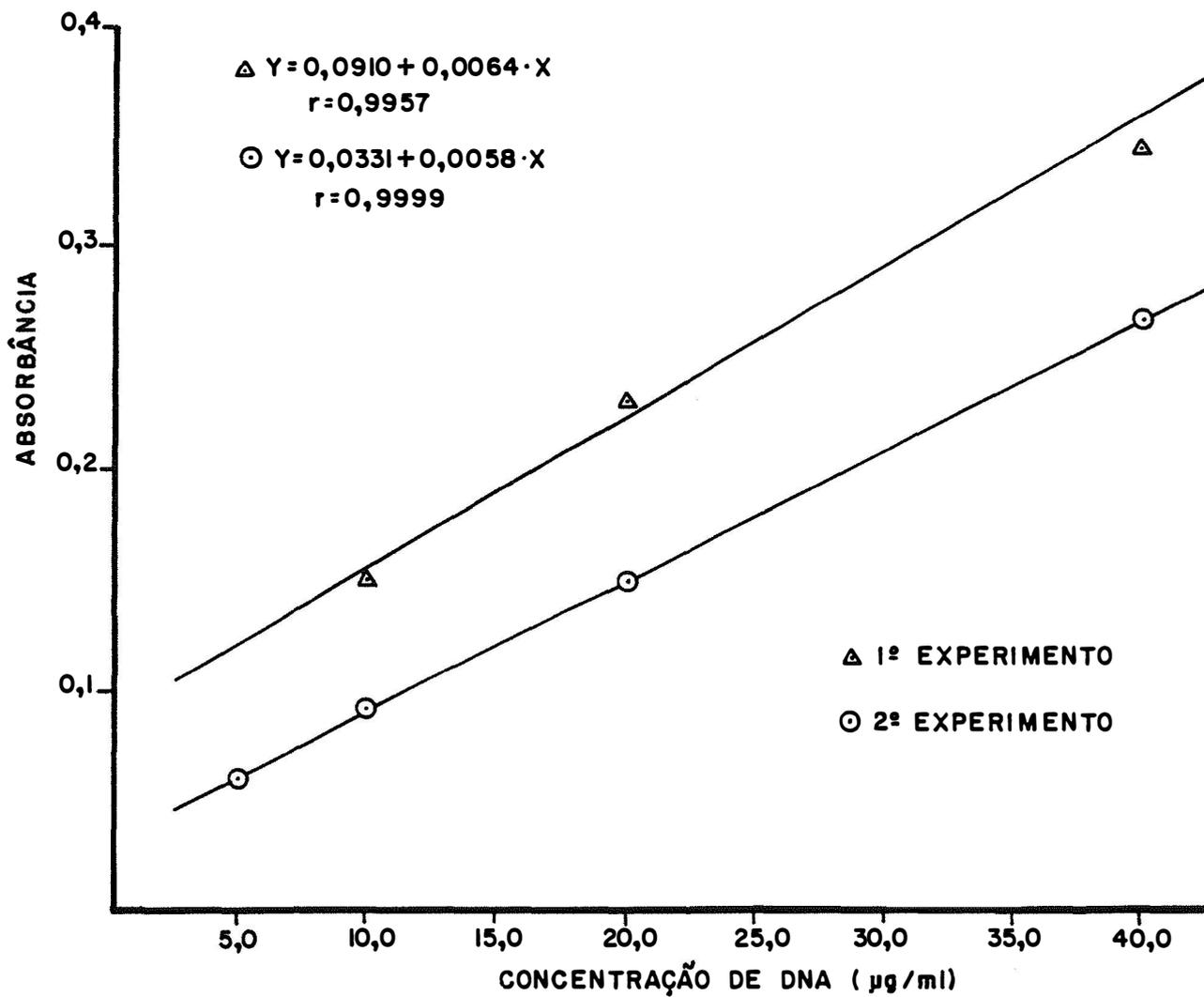


Figura 5 - Curva padrão de Absorbância em função da concentração de DNA.

Tabela 21 - Quantidade de DNA das diferentes linhagens obtidas através da diferença de absorbância nos comprimentos de onda de 595 e 700 nm e substituição na equação da reta.

Linha gem	1º Experimento				2º Experimento			Média da Quantidade de (µg/ml)	
	Absorbância		Quantidade de DNA (µg/ml)	Absorbância		Quantidade de DNA (µg/ml)			
	595 nm	700 nm		595 nm	700 nm				
E6	0,372	0,107	0,265	27,2	0,271	0,034	0,237	35,0	31,1
E9	0,386	0,111	0,275	28,8	0,180	0,022	0,158	21,5	25,1
E6-8	0,452	0,155	0,287	32,2	0,331	0,047	0,284	43,2	37,7
E9-20	0,564	0,172	0,392	46,9	0,203	0,033	0,170	23,5	35,2
D2	0,513	0,134	0,379	44,9	0,197	0,028	0,169	23,4	34,2
D4	0,416	0,138	0,278	29,3	0,215	0,028	0,187	26,5	27,9

D2 = Recombinante prototrófico de coloração verde obtido no cruzamento 8 x 20.

D4 = Recombinante prototrófico de coloração amarela obtido no cruzamento 8 x 20.

Tabela 22 - Porcentagem de conídios uni e binucleados nas diferentes linhagens e recombinantes - Contagem de 400 conídios.

Linhagem	Conídios (%)	
	uninucleados	binucleados
E6	100,0	0,0
E9	100,0	0,0
RJ	100,0	0,0
E6-8	100,0	0,0
E9-20	99,50	0,5
D2	100,0	0,0
D4	99,75	0,25

obtidos por outros autores (MESSIAS, 1979; MESSIAS & AZEVEDO, 1980; AL-AIDROOS, 1980). Esta diferença pode ser devido, em parte, ao método de amostragem utilizado para obtenção de colônias a serem caracterizadas quanto à auxotrofia e grau de ploidia, e também aos meios seletivos aqui empregados, os quais permitiam o crescimento de recombinantes haplóides que, por serem mais frequentes, podem ter mascarado a ocorrência de diplóides estáveis.

4.7.4. Possíveis aspectos evolutivos e significado biológico da parameiose

A parameiose, como descrita inicialmente por BONATELLI JR. et al. (1983) deve estar ocorrendo também em *M. anisopliae*. Duas perspectivas divergentes podem ser consideradas com relação a este fenômeno: uma primeira, a de que a mesma não tem um significado biológico para os organismos que a apresentem, só ocorrendo em condições de manipulação forçada para formação de diplóides os quais haploidizariam rapidamente em função destes apresentarem um crescimento desbalanceado e lento, enquanto os produtos originados da não disjunção apresentam uma maior velocidade de crescimento (HAMLYN et al., 1985); uma segunda, a de que este fenômeno teria sido o resultado de um processo evolutivo, com um significado biológico para os organismos que o apresentem. Dentro desta perspectiva evolutiva, duas possibili

dades teóricas serão especuladas: a da parameiose como um processo que surgiu após alguns grupos de fungos terem perdido a capacidade de reprodução sexuada e a parameiose como um processo de meiose primitiva.

Segundo THOMAS et al. (1983) nos fungos heterotálicos ou dioécios (CASSELTON, 1985), com tipos sexuais diferentes, poderá ocorrer situações em que a reprodução assexual favoreça apenas um "tipo sexual" em detrimento do outro; e se esta força seletiva se mantiver constante, por algum tempo, poderá haver a extinção de um dos "tipos sexuais" e conseqüentemente levar à perda da capacidade de reprodução sexual da classe sobrevivente. Deve ser salientado que esta competição entre os tipos sexuais ou "luta entre os sexos", como proposto por DAWKINS (1979), pode assumir uma situação especial nos fungos, em que reprodução sexuada e assexual podem coexistir em uma mesma espécie, aliada à capacidade de produção de um grande número de propágulos vegetativos em ciclos curtos. Esta poderia ser, portanto, uma possível explicação para a perda da reprodução sexuada nos fungos imperfeitos, os quais passariam a contar com processos parassexuais para a recombinação do seu material genético. A parassexualidade, ainda segundo THOMAS et al. (1983), apesar de desempenhar um importante papel na manutenção da variabilidade genética e na adaptação dos fungos imperfeitos, tem sido negligenciada nos recentes tratados sobre a evolução dos sistemas reprodutivos, como observado nos trabalhos

de WILLIAMS (1975); MAYNARD-SMITH (1978) e BELL (1982).

LEWIS (1985) lança a hipótese de escassez de nutrientes para explicar a manutenção dos estados haplóides em certos grupos de organismos, a despeito das possíveis vantagens do estado diplóide. Os organismos, vivendo num ambiente em que a fonte de nutrientes é escassa, sofreriam uma pressão seletiva para diminuição do tamanho do corpo, sendo que, para os organismos mais simples, isto refletiria em uma diminuição do tamanho celular, favorecendo a haploidia; já para os organismos complexos multicelulares este efeito não seria sentido a nível de tamanho celular, pois estes tenderiam a diminuir o número de células e também podem contar com sistemas mais elaborados para a obtenção de nutrientes, o que explicaria o estado de diploidia e poliploidia neste grupo. Esta hipótese, segundo o autor, é verificada nas algas, onde há grande ocorrência de haploidia. Com relação aos fungos, por apresentarem uma maior diversificação com relação ao tipo e à abundância de nutrientes, uma maior variação no grau de ploidia deveria ser verificado, sendo que maiores dados ecológicos sobre estes organismos são necessários, segundo o autor, para melhor relacionar o grau de ploidia com abundância ou escassez de alimento neste grupo.

Dentro deste contexto, poderia ser dito que nos fungos filamentosos, pelo seu tipo de crescimento em hifi

fas, com possibilidade de heterocariose, o estado haplóide pode ser adaptativamente importante, pois, a diminuição do volume nuclear e celular proporcionaria uma relação superfície/volume bem maior, aumentando a eficiência na absorção de nutrientes. Devido ao comportamento saprofítico da maioria destes organismos e a competitividade entre as diferentes espécies, este fator de eficiência na absorção pode ter sido preponderante do ponto de vista de pressão seletiva. Conserando a possibilidade de perda total da capacidade de reprodução sexuada nos fungos filamentosos imperfeitos, pelo processo de extinção dos tipos sexuais de THOMAS et al. (1983), estes passariam a contar apenas com mecanismos parassexuais de troca de material genético, envolvendo as etapas de heterocariose, fusão nuclear, diploidização e haploidização. Nos grupos submetidos à uma forte pressão seletiva para eficiência na absorção, a fase diplóide pode ir se reduzindo gradualmente até um estágio de alta instabilidade com rápida haploidização e com possibilidades de permutas cromossômicas ou "crossing-over" mitótico, gerando recombinantes haplóides. Desta forma, portanto, estes organismos passariam a contar com um sistema de amplificação de variabilidade genética, simples e eficiente, com alto grau de competitividade na obtenção de nutrientes e exploração do ambiente.

É interessante observar que em *Neurospora crassa*, fungo heterotático com ciclo sexual, não há a ocor-

rência de ciclo parassexual (ROPER, 1985), por sua vez em *A. nidulans*, um fungo homotático com ciclo sexual, há a ocorrência de ciclo parassexual (AZEVEDO, 1972), mas não de parameiose. Já para *A. nidulans* e *M. anisopliae*, os quais não apresentam ciclo sexual, é onde está se observando a ocorrência de parameiose.

A outra possibilidade teórica é a de ser, a parameiose, a manifestação de uma meiose primitiva, em que estruturas especializadas tais como ascos ou basídios ainda não haviam sido originadas. A parameiose, ao contrário da meiose, parece não apresentar o evento de duplicação do núcleo $2n$, o qual forma um núcleo $4n$ que após 2 divisões seguidas origina 4 células com n cromossomos. A possibilidade de ocorrência desta duplicação não pode, no entanto, ser descartada, pois evidências indiretas dessa duplicação já foi detectada no processo parassexual (ROPER & PRITCHARD, 1955), sendo interessante maiores investigações neste sentido. Refletindo provavelmente o seu caráter mais primitivo, a parameiose não deve contar com um controle genético bastante elaborado, nos seus eventos, como o que se observa na meiose.

4.8. Virulência de linhagens selvagens e recombinantes de *M. anisopliae* em larvas de *C. bimaculatas*

As taxas de mortalidade acumuladas, nos 4º, 7º e 12º dias após a aplicação do fungo estão sumarizados na Tabela 23.

No 4º dia, o tratamento que apresentou maior taxa de mortalidade foi o E9 - 10^8 (linhagem E9 na concentração de 10^8 conídios/ml), embora não diferisse estatisticamente dos tratamentos (em ordem decrescente nas taxas de mortalidade): E6 - 10^8 , Composto 2 - 10^8 , E9 - 10^7 e Composto 2 - 10^7 . Os demais tratamentos, com exceção de E6 - 10^7 e D2 - 10^3 não diferiram estatisticamente da testemunha.

No 7º dia, o tratamento que apresentou maior taxa de mortalidade foi o E9 - 10^8 , embora não diferisse estatisticamente dos tratamentos (em ordem decrescente nas taxas de mortalidade): D2 - 10^8 , Composto 2 - 10^8 , E6 - 10^8 , Composto 1 - 10^8 , D4 - 10^8 e Composto 2 - 10^7 . Os tratamentos que apresentaram menores taxas de mortalidade, os quais não diferiram estatisticamente da testemunha, foram os formados pelas linhagens mutantes (E6 *ylo pir lis* e E9 *ylo leu ade*) em todas as concentrações (10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml), e os, Composto 2 - 10^6 , D2 - 10^6 , Composto 1 - 10^6 , D4 - 10^6 e E6 - 10^6 .

No 12º dia, os tratamentos que apresentaram

Tabela 23 - Taxas de mortalidade acumuladas de larvas de *C. bimaculatus* nos 4º, 7º e 12º dias após a aplicação do fungo.

T r a t a m e n t o		P e r í o d o s		
Linagem	Concentração (conídios/ml)	4º dia	7º dia	12º dia
Test.	0	0,011*a	0,063 a	0,095 a
E6	10 ⁶	0,184 abcde	0,510 cdef	0,673 defg
E6	10 ⁷	0,313 bcdef	0,583 defg	0,667 defg
E6	10 ⁸	0,646 fg	0,938 h	0,979 hi
E9	10 ⁶	0,180 abcde	0,360 bcde	0,520 cdef
E9	10 ⁷	0,388 defg	0,612 efg	0,796 efghi
E9	10 ⁸	0,700 g	0,980 h	1,000 i
E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	10 ⁶	0,060 ab	0,060 a	0,200 abc
E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	10 ⁷	0,043 ab	0,174 abc	0,304 abc
E6 <i>ylo1 pir8 lis8</i>	10 ⁸	0,060 ab	0,200 abc	0,240 abc
E9 <i>ylo1 leub ade9</i>	10 ⁶	0,122 abcd	0,184 abc	0,265 abc
E9 <i>ylo1 leub ade9</i>	10 ⁷	0,083 abc	0,083 ab	0,167 ab
E9 <i>ylo1 leub ade9</i>	10 ⁸	0,042 ab	0,104 ab	0,125 a
D2	10 ⁶	0,125 abcd	0,250 abcd	0,479 bcde
D2	10 ⁷	0,143 abcde	0,469 cdef	0,735 efgh
D2	10 ⁸	0,313 bcdef	0,958 h	0,979 hi
D4	10 ⁶	0,060 ab	0,140 ab	0,360 abcd
D4	10 ⁷	0,080 abc	0,620 efg	0,720 efg
D4	10 ⁸	0,157 abcde	0,804 fgh	0,902 ghi
Composto 1	10 ⁶	0,080 abc	0,140 ab	0,460 bcde
Composto 1	10 ⁷	0,080 abc	0,500 cdef	0,820 fghi
Composto 1	10 ⁸	0,200 abcde	0,860 gh	0,980 hi
Composto 2	10 ⁶	0,143 abcde	0,343 abcde	0,429 abcde
Composto 2	10 ⁷	0,360 cdefg	0,740 fgh	0,940 ghi
Composto 2	10 ⁸	0,460 efg	0,940 h	1,000 i

* Taxas seguidas de pelo menos uma letra na coluna não diferem entre si.

maiores taxas de mortalidade foram E9 - 10^8 e Composto 2- 10^8 , os quais mataram todas as larvas, sendo que não diferiram estatisticamente dos tratamentos (em ordem decrescente nas taxas de mortalidade): Composto 1 - 10^8 , E6 - 10^8 , D2 - 10^8 , Composto 2 - 10^7 , D4 - 10^8 , Composto 1 - 10^7 e E9 - 10^7 . Os tratamentos que apresentaram menores taxas de mortalidade, os quais não diferiram estatisticamente da testemunha, foram os formados pelas linhagens mutantes em todas as concentrações e os, Composto 2 - 10^6 e D4 - 10^6 .

Nas Tabelas 24, 25 e 26 estão sumarizados os resultados dos TL_{50} , TL_{90} e Taxas de Potência das diversas linhagens, nas respectivas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml e nas Figuras 6, 7 e 8 estão representadas as curvas de tempo mortalidade para os respectivos tratamentos.

Na concentração de 10^6 conídios/ml, a linhagem que apresentou maior virulência foi a E6, com TL_{50} e TL_{90} de 8,51 e 15,02 respectivamente, e uma Taxa de Potência de 1327 U.P. Dentre os recombinantes, o que demonstrou maior virulência foi o D2, que no entanto, era menor do que os parentais selvagens. As linhagens mutantes apresentaram uma virulência muito baixa, em todas as concentrações, não estando representadas nas Figuras de tempo mortalidade.

Na concentração de 10^7 conídios/ml, a linhagem que apresentou maior virulência foi o Composto 2, com TL_{50} e TL_{90} de 5,39 e 9,35 dias respectivamente, e uma taxa

Tabela 24 - Tempo Letal (TL₅₀), Tempo Letal (TL₉₀) e Taxa de Potência das diversas linhagens, na concentração de 10⁶ conídios/ml, em larvas do último instar de *C. bimaeculatus*.

Linhagem	TL ₅₀	TL ₉₀	Taxa de potência (UP)
E6	8,51	15,02	1.327
E9	11,29	20,91	1.000
E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	22,99	33,93	491
E9 <i>ylo1 leu6 ade9</i>	20,61	38,12	548
D2	11,90	20,37	949
D4	14,70	23,82	768
Composto 1	13,68	22,24	825
Composto 2	13,86	24,48	814

Tabela 25 - Tempo Letal (TL₅₀), Tempo Letal (TL₉₀) e Taxa de Potência das diversas linhagens, na concentração de 10⁷ conídios/ml, em larvas do último instar de *C. bimaeculatus*.

Linhagem	TL ₅₀	TL ₉₀	Taxa de potência (UP)
E6	7,21	16,11	863
E9	6,22	13,29	1.000
E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	15,35	24,78	405
E9 <i>ylo1 leu6 ade9</i>	29,05	50,28	214
D2	8,02	13,38	776
D4	9,23	14,06	674
Composto 1	7,65	11,92	813
Composto 2	5,39	9,35	1.154

Tabela 26 - Tempo Letal (TL₅₀), Tempo Letal (TL₉₀) e Taxa de Potência das diversas linhagens, na concentração de 10⁸ conídios/ml, em larvas do último instar de *C. bimaculatus*.

Linhagem	TL ₅₀	TL ₉₀	Taxa de potência (UP)
E6	4,00	7,07	850
E9	3,40	5,43	1.000
E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	17,99	30,62	189
E9 <i>ylo1 leu6 ade9</i>	26,29	43,74	129
D2	4,35	6,77	781
D4	5,69	9,93	597
Composto 1	4,87	7,44	698
Composto 2	4,47	6,27	761

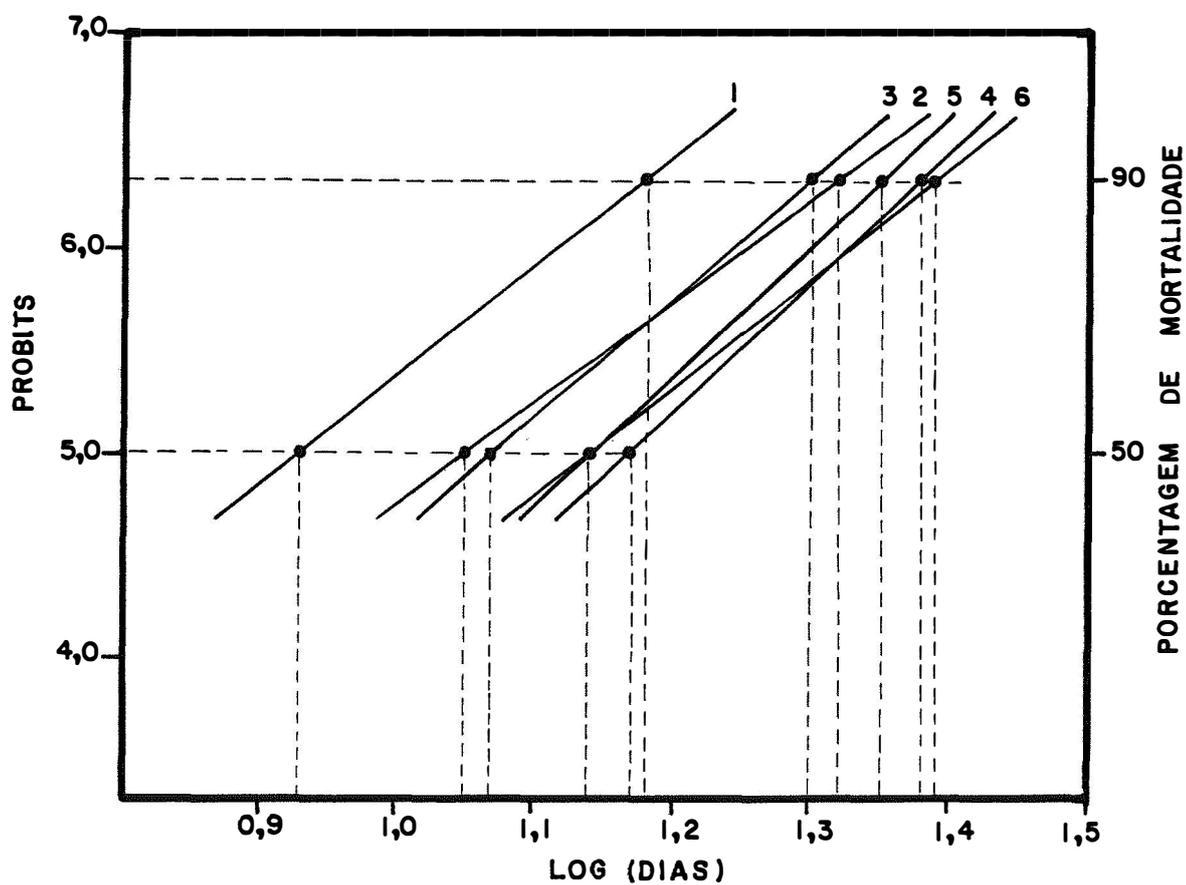


Figura 6 - Curvas de tempo mortalidade para larvas do último instar de *Chalcoedermus bimaculatus*, após exposição, por pulverização (10^6 conídios/ml) das linhagens E6, E9 e seus recombinantes.

- | | |
|--------|----------------|
| 1 - E6 | 4 - D4 |
| 2 - E9 | 5 - Composto 1 |
| 3 - D2 | 6 - Composto 2 |

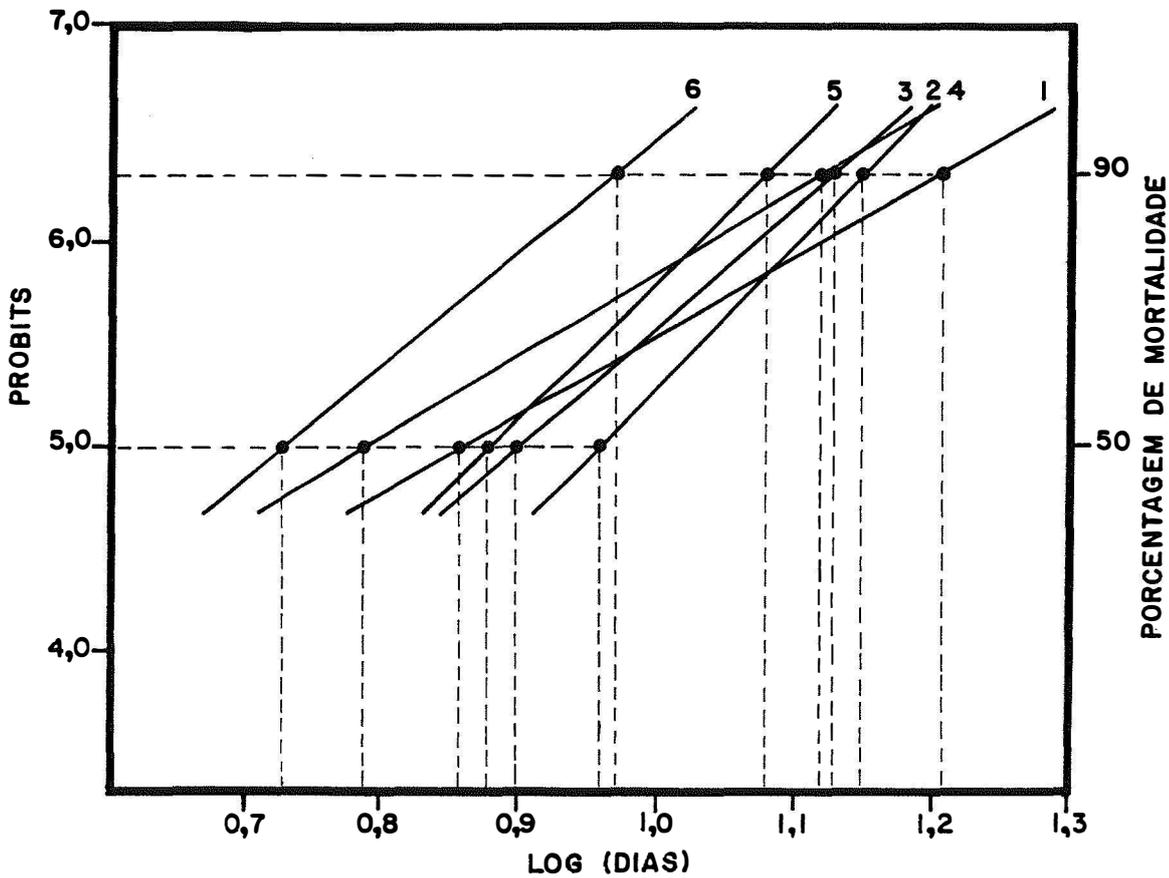


Figura 7 - Curvas de tempo mortalidade para larvas do último instar de *Chalcodermus bimaculatus*, após exposição, por pulverização (10^7 conídios/ml), das linhagens E6, E9 e seus recombinantes.

- | | |
|--------|----------------|
| 1 - E6 | 4 - D4 |
| 2 - E9 | 5 - Composto 1 |
| 3 - D2 | 6 - Composto 2 |

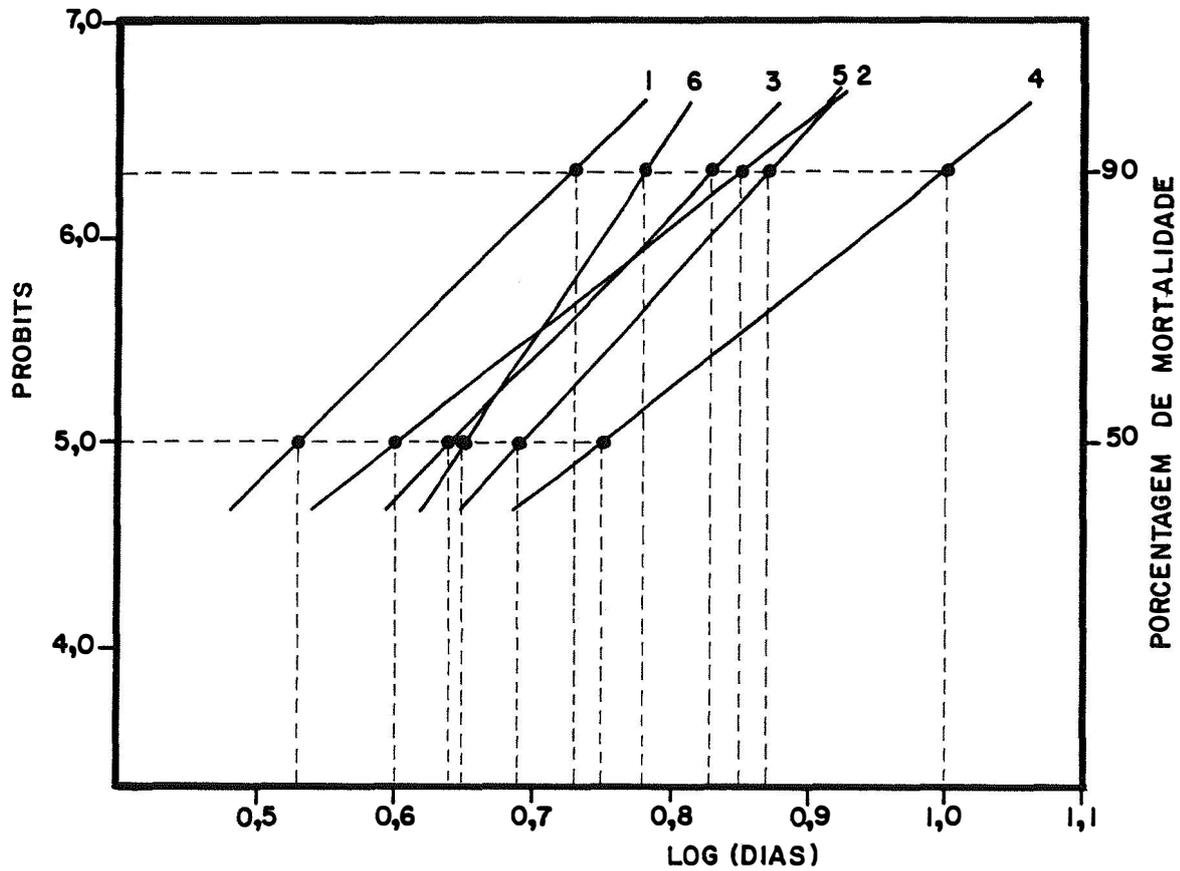


Figura 8 - Curvas de tempo mortalidade para larvar do último instar de *Chalcodermus bimaculatus*, após exposição, por pulverização (10^8 conídios/ml), das linhagens E6, E9 e seus recombinantes.

- | | |
|--------|----------------|
| 1 - E6 | 4 - D4 |
| 2 - E9 | 5 - Composto 1 |
| 3 - D2 | 6 - Composto 2 |

de Potência de 1.154 U.P.

Na concentração de 10^8 conídios/ml, as linhagens mais virulentas foram a E9 e E6, com Taxas de Potência de 1000 e 850 U.P. respectivamente. O Composto 2, apesar de ter apresentado uma taxa de potência menor (761 U.P.), apresentou uma curva de taxa de mortalidade (Figura 8) com maior coeficiente angular, o que significa um aumento na virulência com o tempo.

Em todas as concentrações a linhagem D4 (recombinante prototrófico amarelo) apresentou uma menor virulência que os demais recombinantes o que demonstra um possível efeito pleiotrópico da coloração sobre a patogenicidade.

A obtenção de recombinantes por processos parassexuais deve gerar, em sua maior parte, combinações inferiores aos parentais selvagens, havendo possibilidades de que apenas algumas poucas combinações sejam superiores. Este fato se verificou estar ocorrendo nos recombinantes simples (D2 e D4) e mesmo no Composto 1, os quais apresentaram virulências menores que os parentais selvagens. A maior virulência observada no Composto 2, na concentração de 10^7 conídios/ml, pode ser explicada pela ocorrência de recombinantes superiores contidos neste composto. A menor virulência do Composto 2, com relação aos parentais selvagens, na concentração de 10^6 conídios/ml, pode ser devido ao fato que os conídios com boas combinações estavam em uma frequência

muito baixa; e na concentração de 10^8 conídios/ml, pelo fato de que um aumento da concentração nas linhagens selvagens, leva a um aumento proporcional na virulência pois todos os conídios são homogêneos, enquanto que no composto o aumento na virulência não é proporcional, pois os conídios são heterogêneos, com possibilidades de apenas uma parte dos mesmos apresentar boas combinações genéticas para a patogenicidade.

As linhagens E6 e E0 apesar de diferirem com relação a alguns caracteres, são pouco divergentes geneticamente (DE CONTI et al., 1980; ROSATO et al., 1981; MESSIAS et al., 1983), sendo que ambas foram isoladas de *Deois flavopicta*, no Estado do Espírito Santo. A utilização de linhagens com características mais divergentes, provenientes de diferentes insetos hospedeiros, poderá gerar recombinantes com maior amplitude de variabilidade genética. A utilização de compostos, provenientes de recombinantes obtidos entre linhagens divergentes, aliado a posteriores reisolamentos do fungo do inseto, pode ser uma boa alternativa no melhoramento genético de *M. anisopliae* e outros fungos entomopatogênicos.

Um outro procedimento, para o melhoramento genético, que pode ser utilizado, nestas condições, é o método "sib selection" (AKINS & LAMBOWITZ, 1985). Este método tem se mostrado valioso em experimentos de isolamento de um

determinado gene a partir de uma biblioteca genômica. A partir de um "pool" de plasmídios recombinantes contendo diferentes fragmentos de DNA, etapas sucessivas de transformação são realizadas, reduzindo progressivamente o número de plasmídios recombinantes, até se chegar a um único clone, o qual contém o gene desejado. Analogamente, no caso dos compostos, o que apresentar melhor resultado de patogenicidade pode também ser subdividido e avaliado em etapas sucessivas, até se chegar a um único recombinante de maior virulência.

4.9. Virulência de linhagens selvagens e recombinantes de

M. anisopliae, em adultos de *C. bimaculatus*

A virulência das linhagens selvagens e recombinantes em adultos foi muito pequena. Na Tabela 27 estão os resultados dos TL₅₀ e TL₉₀, na concentração de 10⁸ conídios/ml. A linhagem E6 foi a que apresentou um menor TL₅₀ e TL₉₀, mesmo assim o número de dias é bastante longo. QUINTELA (1986) também observou que a virulência de *B. bassiana* em *C. bimaculatus* era muito pequena em adultos e boa em larvas. O controle desta praga, portanto, utilizando fungos entomopatógenos, deve ser feita com o inseto na fase larval.

Tabela 27 - Tempo letal (TL₅₀), Tempo letal (TL₉₀) das diversas linhagens, na concentração de 10⁸ conídios/ml, em adultos de *C. bimaculatus*.

Linhagem	TL ₅₀	TL ₉₀
E6	19,7	24,8
E9	23,7	35,4
E6 <i>ylo8 pir8 lis8</i>	>100,0	>100,0
E9 <i>ylo1 leu6 ade9</i>	>100,0	>100,0
D2	31,2	50,8
D4	22,3	29,1
Composto 1	26,0	36,7
Composto 2	22,5	33,7

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

- a - O método de irradiação e enriquecimento por filtração permite aumentar a frequência de obtenção de mutantes, comparando-se com o método de isolamento total, com uma tendência em selecionar mutantes deficientes na síntese de aminoácidos.
- b - A obtenção e regeneração de protoplastos não provoca alterações de DNA, que resultem na obtenção de mutantes.
- c - A obtenção de recombinantes haplóides no heterocário, em alta frequência e com evidências de permuta mitótica, indica a ocorrência da parameiose em *M. anisopliae*, podendo ser este fenômeno um mecanismo natural de amplificação da variabilidade genética em fungos filamentosos imperfeitos.

- d - Linhagens com deficiência auxotrófica apresentam uma virulência muito baixa em larvas de *C. bimaculatus*, mas recombinantes prototróficos híbridos têm suas virulências restauradas, podendo ser superiores às linhagens parentais selvagens.
- e - A utilização de composto formados pela mistura de dife-
rentes recombinantes híbridos pode ser um eficiente méto
do na obtenção de linhagens melhoradas para o controle
biológico de insetos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AKINS, R.A. & LAMBOWITZ, A.M. General method for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. Mol. Cell. Biol., 5:2272-8, 1985.

AL-AIDROSS, K. Demonstration of parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Genet. Cytol., 22:309-14, 1980.

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.; RISCO, S.H.; SILVEIRA NETO, S.; MACHADO NETO, R. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. to *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Z. angew. Ent., 97:403-6, 1984.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Comissão de Estudos de Documentação. Referências bibliográficas; N.B.-66. In: _____. Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p.13-30.

WORLD list of scientific periodicals published in the years 1900-1960. 4.ed. London, Butterworths, 1963-1965. 3v. e suplementos.

- ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M.L.; GOMEZ, D.R.S.
Separação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
Sorok., através da análise fenética. Anais Soc ent. Bras.
15(supl.):81-92, 1986.
- AQUINO, M.L.N.; CAVALCANTI, A.L.B.; SENA, R.C.; QUEIROZ, G.
F. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium*
anisopliae. Boletim Técnico da CODECAP, Recife, 4:1-31,
1975.
- AZEVEDO, J.L. O ciclo parassexual em fungos. Rev. Microbiol.,
3:157-68, 1972.
- AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos.
Summa Phytopath., 2:3-15, 1976.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de genética.
ca. São Paulo, EDUSP, 1973. 288p.
- AZEVEDO, J.L. & MESSIAS, C.L. Aspectos genéticos do contro-
le biológico de insetos por fungos. In: AZEVEDO, J.L.,
coord. Genética de microrganismos em biotecnologia e enge-
nharia genética. Piracicaba, FEALQ, 1985. cap.14, p.111-
-4.
- BALL, C. & HAMLIN, P.F. Genetic recombination studies with
Cephalosporium acremonium related to the production of the
industrially important antibiotic *Cephalosporin C*. Rev.

bras. Genet., 5:1-13, 1982.

BELL, G. The masterpiece of nature. Berkeley, University of California, 1982. Apud: THOMAS, D.S.; SURYANARAYANA, K.; MANAVATHU, E.K. A sexual reproduction coupled with heterothalism; possible consequences for fungi. J. theor. Biol., 105:373-8, 1983.

BERGERON, D. & MESSING-AL-AIDROOS, K. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Genet. Cytol., 24:643-51, 1982.

BONATELLI JR., R. Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1981. 91p. (Tese - Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).

BONATELLI JR., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Parassexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. Rev. bras.Genet., 6:399-405, 1983.

BURGES, H.D. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. London, Academic Press, 1981. 949p.

BUXTON, E.W. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. J. gen. Microbiol., 15:133-9, 1956.

- BUXTON, E.W. Parasexual recombination in the banana wilt *Fusarium*. Trans. Br. Mycol. Soc., 45:274-9, 1962.
- CALAM, C.T.; DAGLISH, L.B.; GAITSKELL, W.S. Hibridization experiments with *Penicillium patulum* and *Fusarium moniliforme*. In: VANEK, Z.; HOSTAKEL, Z.; CUDIN, J., eds. Genetics of industrial microorganisms. Amsterdam, Elsevier, 1973. v.1., p.265-82.
- CASSELTON, L.A. Controle genético da reprodução sexual em fungos. In: AZEVEDO, J.L., coord. Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética. Piracicaba, FEALQ, 1985. cap.5, p.35-42.
- CHANG, L.T. & TERRY, C.A. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. Appl. Microbiol., 25:890-2, 1973.
- CORRÊA, G.S. Influência da radiação ultravioleta e solar na viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 84p. (Tese - Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CORRÊA, 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.

- DAS, A. & ILCZUK, Z. Spontaneous segregation of a heterozygous diploid of *Aspergillus niger*. Folia microbiol., 23: 362-5, 1978.
- DAWKINS, R. O gene egoísta. Belo Horizonte, Itatiaia, 1979. 230p.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; DE SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L. Electroforetic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. Experientia, 36:293-4, 1980.
- FANTINI, A.A. Genetics and antibiotic production of *Emericellopsis* species. Genetics, 47:161-77, 1962.
- FERENCZY, L. Microbial protoplast fusion. In: GIOYER, S.W. & HORWOOD, D.A. Genetics as a tool in microbiology. Cambridge, Cambridge University, 1981. p.1-35.
- FINNEY, D.J. Probit analysis. 3th.ed. Cambridge, Cambridge University, 1971, 333p.
- FORBES, E. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 13: 66-80, 1959.
- FRIGO, S.M. Variabilidade e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba,

1983. 119p. (Tese - Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).

FRIGO, S.M. & AZEVEDO, J.L. Meios de cultura e produção de conídios em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Anais Esc. sup. Agric. "Luiz de Queiroz", 43:285-93, 1986.

GARCIA, A.T.E.; BARACHO, I.R.; SOUZA, H.M.L.; MESSIAS, C.L. Virulência de linhagens mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae*, em *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera, Tephritidae). Rev. bras. Ent., 29:267-70, 1985.

GARCIA, A.S.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; PIEDRABUENA, A. E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera, Tephritidae). Rev. bras. Ent., 28:421-4, 1984.

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

GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. Ann. math. Statist., 35: 716-25, 1964.

GUAGLIUMI, P.; MARQUES, J.E.; VILAS BOAS, M.A. Contribuição ao estudo da cultura de *Metarhizium anisopliae* no controle da "cigarrinha-da-folha" *Mahanarva posticata* (Stal) no nor

deste do Brasil. Bolm téc. CODECAP, (3):1-52, 1974.

HADDAD, C.R.B. & MESSIAS, C.L. Influência de espalhantes adesivos e de inseticidas na germinação e desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae*. Bolm Grupo Pesq. Control. biol., (1):6-7, 1979.

HASTIE, A.C. Genetic recombination in the hop-wilt fungus *Verticillium albo-atrum*. J. gen. Microbiol., 27:373-82, 1962.

HASTIE, A.C. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. Genet. Res., 5:305-15, 1964.

HASTIE, A.C. & HEALE, J.B. Genetics of *Verticillium*. Phytopath. mediterr., 22:130-62, 1984.

HAMLIN, P.F.; BIRKETT, J.A.; PEREZ, G.; PEBERDY, J.F. Protoplast fusion as a tool for genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. J. gen. Microbiol., 131:2813-23, 1985.

HAMLIN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELLON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast release from fungi using commercial enzymes. Enzyme microb. Technol., 3:321-5, 1981.

HINO, M.; NAKAYAMA, O.; TSURUMI, Y.; ADACHI, K.; SHIBATA, T.;

- TERANO, H.; KOHSAHA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H. Studies of an immuno-modulator, swainsonine. I. Enhancement of immune response by swainsonine in vitro. J. Antibiotic., Tokyo, 38:926-35, 1985.
- HOPWOOD, D.A. & WRIGHT, H.M. Protoplast fusion in *Streptomyces*; fusions involving ultraviolet-irradiated protoplasts. J. gen. Microbiol., 126:21-7, 1981.
- HUBER, J. Untersuchungen zur physiologie insektentotender pilze. Arch. Mikrobiol., 29:257-76, 1958.
- ITO-KAGAWA, M.; KOYAMA, Y.; KONDO, S. Peptide antibiotic K-582 production in relation to amino acid metabolism in *Metarhizium anisopliae*. J. Antibiot., 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). J. gen. Microbiol., 131:3229-36, 1985.
- KAFER, E. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet., 9:105-45, 1958.
- KENDRIK, W.B. Taxonomy of fungi imperfecti. Toronto, University of Toronto, 1971. 390p.

- 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., a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). Anais Soc. int. Bras., 15(supl.): 21-7, 1986.
- LEWIS JR., W.M. Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploid. Am. Nat., 125:692-701, 1985.
- LHOAS, P. Genetic analysis by means of the parasexyal cycle in *Aspergillus niger*. Gen. Res., 10:45-61, 1967.
- LIHNELL, D. Gronmykos fororsakeo an *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. II. Fisiologiska Undersokningar over gronmykosens swamps. Apud: MESSIAS, C.L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979. 73p. (Tese - Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).
- LORD, J.C. Fungos entomopatogênicos. In: CURSO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE PRAGAS DE CAUPI E FEIJÃO, 3, Goiânia,

1986. Goiânia, EMBRAPA, 1986. 15p.

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

LUNA, E.A. & AZEVEDO, J.L. Obtenção de possíveis diplóides entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Resumos SBPC, 37:721, 1985.

MAGOON, J. & MESSING-AL-AIDROOS, K. Determination of ploidy of sectors formed by mitotic recombination in *Metarhizium anisopliae*. Trans. Br. mycol. Soc., 82:95-8, 1984.

MAGOON, J. & MESSING-AL-AIDROOS, K. Epistatic relationships and linkage among colour markers of the imperfect entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Genet. Cytol., 28:96-100, 1986.

MATOS, A.J.A. Crescimento, germinação, conidiação e resistência a luz ultravioleta de linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Campinas, 1983. 78p. (Tese - Mestrado - Universidade de Campinas).

MAYNARD SMITH, J. The evolution of sex. Cambridge, Cambridge University, 1978. Apud: THOMAS, D.S.; SURYANARAYANA, K.; MANAVATHU, E.K. A sexual reproduction coupled with

heterothalism; possible consequence for fungi. J. theor. Biol., 105:373-8, 1983.

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

MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Parassexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Trans. Br. Mycol. Soc., 75:473-7, 1980.

MESSIAS, C.L.; ROBERTS, D.W.; GREFIG, A.T. Pyrolysis - gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*: an aid to strain identification. J. Invertebrat Path., 42: 393-6, 1983.

MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L.; CONTI, E.; SOUZA, H.M.L. Aspectos biológicos e indução de mutantes em *Metarhizium anisopliae*. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3; CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4, Bahia, 1978. Resumos ... Bahia, Sociedade Entomológica do Brasil, 1978. p.69.

MCCULLY, K.S. & FORBES, E. The use of p-fluorfenil-alanine with "mestra strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. Gen. Res., 6:352-9, 1965.

- NIFFINEGER E SOUZA, D.R. Aspectos genéticos e citológicos da instabilidade mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1979. 244p. (Tese - Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).
- PETCH, T. Notes on entomogenous fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., 16:55-75, 1931.
- PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. A. Rev. Microbiol., 10:393-400, 1956.
- PONTECORVO, G. & ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploid in *Aspergillus nidulans*. J. gen. Microbiol., 6:viii, 1952.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; FORBES, E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. J. gen. Microbiol., 8:198-210, 1953.
- QUINTELA, E.D. Estabilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (Hyphomycetes: Moniliales) no solo e sua patogenicidade ao *Chalcodermus aeneus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), praga do caupi. Piracicaba, 1986. 106p. (Tese - Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).
- RIBA, G.; AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.; SILVEIRA, W.D.; TUVESON, R. Studies of the inheritance of virulence in the

entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebrat. Path., 46:20-5, 1985.

RIBA, G.; BOUVIER-FOUCADE, I.; CAUDAL, A. Isoenzymes polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hypomycetes) entomogenous fungi. Mycopathologia, 96:116-9, 1986.

RIBA, G.; GLANDARD, A.; RAVELO JOANA, A.M.; FERRON, P. Isolement de recombinaisons mitotiques stables de type "intermediaire" chez *Metarhizium anisopliae* (Metschikoff) par hybridation de biotypes sauvages. C. r. Acad. Sci., 29:657-60, 1980.

ROPER, J.A. The parasexual cycle. In: AINSWORTH, G. & SUSSMAN, A.S., ed. The fungi. New York, Academic Press, 1966. vol.2, p.589-617.

ROPER, J.A. Recombinação em fungos filamentosos. In: AZEVEDO, J.L., coord. Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética. Piracicaba, FEALQ, 1985. cap.4, p.29-33.

ROPER, J.A. & PRITCHARD, R.H. Recovery of complementary products of mitotic crossing-over. Nature (London), 175: 639, 1955.

ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. J. Invertebr. Path., 38:1-3, 1981.

- SANTOS, A.L.L. & AZEVEDO, J.L. Resistência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em relação a três fungicidas. Rev. Microbiol., 13:272-8, 1982.
- SERMONTI, G. Genetics of antibiotic producing microorganisms. London, Wily Inter-Science, 1969. 389p.
- SILVA, J.C. Virulência de mutantes exoenzimáticos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e seus revertentes a *Rhodnius prolixus*. Campinas, 1985. 161p. (Tese - Doutorado - Universidade Estadual de Campinas).
- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. J. Invertebrat. Path., 48:368-74, 1986.
- SILVEIRA, W.D. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 153p. (Tese - Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. Rev. bras. Genet., 7:1-8, 1984.
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. Enzyme microb. Technol., 9:149-52, 1987.

- STRAUSS, B.S. Cell death and "Unbalanced Growth" in
Neurospora. J. gen. Microbiol., 18:658-69, 1958.
- TANAKA, Y.; MURATA, N.; KATO, H. Behavior of nuclei and
chromosomes during ascus development in the mating between
either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-
-strain of *Pyricularia*. Ann. phytopath. Soc. Japan, 45:
182-91, 1979.
- THOMAS, D.S.; SURYANARAYANA, K.; MANAVATHU, E.K. Asexual
reproduction coupled with heterothallism; possible
consequences for fungi. J. theor. Biol., 105:373-8, 1983.
- TINLINE, R.D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*.
Mycologia, 63:713-21, 1971.
- TINLINE, R.D. & NOVIELLO, C. Heterocaryosis in the
entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. Mycologia,
63:701-12, 1971.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium anisopliae*. Trans. Br.
Mycol. Soc., 66:407-11, 1976.
- TUVESON, R.W. & COY, D.O. Heterocaryosis and somatic
recombination in *Cephalosporium mycophilum*. Mycologia,
53:244-53, 1961.
- TYPAS, M.A. Heterokaryon incompatibility and interspecific

hybridization between *Verticillium alboatrum* and
Verticillium dahliae following protoplast fusion and
microinjection. J. gen. Microbiol., 129:3043-56, 1983.

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

TYPAS, M.A. & HEALE, J.B. Transfer of a cytoplasmic factor
by micro-injection in *Verticillium*. J. gen. Microbiol.,
111:375-86, 1979.

TYPAS, M.A. & HEALE, J.B. DNA content of germinating spores,
individual hyphal cells and resting structure cells of
Verticillium spp. measured by microdensitometry. J. gen.
Microbiol., 121:231-42, 1980.

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

VALADARES, M.C.C.; NAVES, M.A.; LUNA, E.A.; AZEVEDO, J.L.
Efetividade de mutantes e diplóides de *Metarhizium anisoplia*
e no controle biológico de insetos. Resumos SBPC, 37:721,
1985.

VALE, T.L.; FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L. Varia-

bilidade em linhagens haplóides e diplóides de *Metarhizium anisopliae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 6, Campinas, 1980. Resumos ... Campinas, Sociedade Entomológica do Brasil, 1980. p.346.

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

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

VEIGA, A.F.S.L. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., como opção para o controle biológico das cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) no Estado de Pernambuco. Bolm Grupo Pesq. Control. biol., (1):3-4, 1979.

VILACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorok. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3; CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 4, Bahia, 1978. Resumos...Bahia, 1978. p.70.

WILLIAMS, G.C. Sex and Evolution. Princeton, Princeton University, 1975. Apud: THOMAS, D.S.; SURYANARAYANA, K.;

MANAVATHU, E.K. Asexual reproduction coupled with heterothalism; possible consequence for fungi. J. theor. Biol., 105:373-8, 1983.

ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. J. Invertebrat. Path., 15:63-80, 1970.