

DIVERSIDADE BIOLÓGICA EM
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN

CLAUDIO COSTA

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de concentração: Genética Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1989

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

Costa, Cláudio

C837d Diversidade biológica em Metarhizium anisopliae (METSCH
Sorokin. Piracicaba, 1989.
182p.

Tese - ESALQ

Bibliografia.

1. Fungo entomopatogênico - Diversidade biológica 2.
Fungo para controle biológico I. Escola Superior de Agri-
cultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

DIVERSIDADE BIOLÓGICA EM
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN

CLAUDIO COSTA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1989

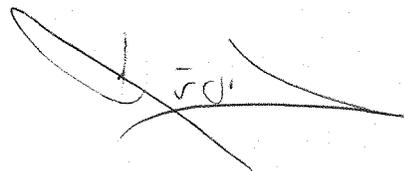
DIVERSIDADE BIOLÓGICA EM
Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin

Claudio Costa

Aprovada em: 20/12/90

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof. Dr. Akihiko Ando	ESALQ/USP
Prof. Dr. Rodolpho de Camargo	ESALQ/USP
Prof. Dr. Romeu Cardoso Guimarães	IBB/UNESP
Prof ^a Dr ^a Silvia Maria Frigo	UEL/Pr



Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Orientador

Dedicatória

Aos meus pais,

NATALINO e VALY

MARIA ELISABETH,

minha esposa, e

FREDERICO AUGUSTO e

PEDRO HENRIQUE,

meus filhos,

ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos que me auxiliaram na elaboração deste trabalho e em especial:

- Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, orientador e amigo;

- À Dr^a Catalina Romero Lopes, Chefe do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, pelo apoio, amizade, incentivo e facilidades concedidas;

- Ao Dr. Cecilio Linder, Diretor do Instituto de Biociências, UNESP - Botucatu, pelas facilidades concedidas;

- À Dr^a Aline A. Pizzirani-Kleiner do Depto. de Genética da ESALQ/USP pelo apoio, amizade e confiança;

- Aos Drs. Spartaco Astolfi Filho, Sueli Felipe e Maristela de Oliveira Azevedo, do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília pelo incentivo e inestimável apoio;

- Aos meus queridos Maristela e José Paulo de Azevedo por me acolherem e proporcionarem um lar em Brasília;

- Ao Dr. Samuel McDowell da Bioplanta S.A., Paulínia, pelo apoio técnico, informações e facilidades concedidas;

- Aos colegas do Departamento de Genética da UNESP-Botucatu, pelo apoio e amizade;

- Aos funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP;

- Aos funcionários do Departamento de Genética do IB/UNESP - Botucatu;

- À Zilda R. de Moraes Bartanha do Departamento de Genética do IB/UNESP-Botucatu, pelo auxílio na execução das eletroforeses de isoenzimas;

- À Maria Inês de Moura Campos Pardini pelo inestimável apoio durante nosso estágio na Bioplanta;

- À querida Mironiudes Scaglia Pacheco de Almeida, pela amizade e apoio, sem o qual seria impossível a análise das exoenzimas;

- Ao Dr. Paulo Roberto Curi da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, pelo inestimável apoio técnico nas análises de taxonomia numérica;

- À Marisa Vieira de Queiroz do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela amizade e apoio;

- Aos colegas Gustavo H. Goldman, Maria Vieira de Queiroz, Luzia D. Paccola Meirelles, Maria Helena P. Fungaro, Maria Cleria Valadares, Marcia Furlanetto, Vania Vicente, Ida Chapaval Pimentel, Marina E. Vega, Maria José Valarini, José Odair Pereira, Janete Magali de Araujo e Olivia M. Nagy Arantes, do Depto. de Genética da ESALQ/USP, pela amizade e agradável convivência;

- Ao Dr. Allan Brown e Dr^a Emily Blakemore pelo apoio técnico;

- Ao Jorge Luiz Diorio pela cuidadosa digitação do texto;

- Ao Sr. Martins do Depto. de Biofísica do IB/UNESP-Botucatu pela confecção dos gráficos;

- A minha esposa Betty e meus filhos Frederico e Pedrinho pela confiança e apoio;

- A CAPES pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	03
2.2. A genética de <i>Metarhizium anisopliae</i>	08
2.3. A paramiose de <i>M. anisopliae</i>	10
2.4. Caracterização das linhagens	12
2.5. O DNA mitocondrial em fungos (mt DNA)	13
2.6. O polimorfismo através de fragmentos de restrição (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Linhagens utilizadas	22
3.1.1. Linhagens de <i>M. anisopliae</i>	22
3.1.2. Linhagens de bactérias	24
3.2. Meios de cultura de soluções utilizadas ...	24
3.2.1. Meio mínimo	24
3.2.2. Meio completo	25
3.2.3. Meio completo líquido	25
3.2.4. Meio mínimo mais 4% de meio completo	25
3.2.5. Meio mínimo mais KCl	26
3.2.6. Meio completo mais KCl	26
3.2.7. Meio completo líquido para cresci- mento de micélio	26

3.2.8. Meio de manipueira	26
3.2.9. Meio completo LB (LURIA-BERTAN) para bactérias	27
3.2.10. Meio completo LB líquido	27
3.2.11. Meio SOB para bactérias	27
3.2.12. Meio SOC para bactérias	28
3.2.13. Meio SOB sólido para bactérias	28
3.2.14. Solução de vitaminas	28
3.2.15. Solução de ácido nucleico de leveduras	29
3.2.16. Solução de Twen (0,1%)	29
3.2.17. Solução salina	29
3.2.18. Solução de KCl 0,7M em tampão fosfato (0,2M) pH 5,8	30
3.2.19. Tampão McILVAINE pH 5,8	30
3.2.20. Solução 0,6M (NH ₄) ₂ SO ₄ .H ₂ O	31
3.2.21. Solução de PEG 6000 a 30%	31
3.2.22. Solução de enzimas para produção de protoplastos	32
3.2.23. Tampões para extração de DNA mitocondrial e DNA total de <i>M. anisopliae</i>	32
3.2.24. Soluções utilizadas para preparo de plasmídios para clonagem molecular.	37
3.2.25. Soluções utilizadas para técnicas de transferência e hibridização do DNA	39
3.2.26. Tampões utilizados nas eletroforeses em gel de agarose	40
3.2.27. Reagentes usados para eletroforese em gel de poliacrilamida	40

3.2.28. Solução corante para proteínas	43
3.2.29. Soluções para citologia	44
3.3. Sobrevivência de <i>M. anisopliae</i> à luz UV ...	46
3.4. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos	46
3.5. Obtenção de heterocários	48
3.5.1. Obtenção de diplóides e recombinantes haplóides a partir de heterocários	49
3.5.2. Análise genética de recombinantes e segregantes	49
3.6. Produção de protoplastos	50
3.6.1. A partir de micélio	50
3.6.2. A partir de tubos germinativos	51
3.6.3. Contagem de protoplastos	52
3.6.4. Verificação da presença de hifas, esferoplastos e conídios na suspensão de protoplastos	52
3.6.5. Frequência de regeneração de protoplastos	53
3.6.6. Fusão de protoplastos	54
3.6.7. Obtenção dos produtos de fusão e análise genética	54
3.6.8. Coloração de protoplastos	55
3.7. Extração de DNA mitocondrial de <i>M. anisopliae</i>	55
3.8. Extração de DNA total de <i>M. anisopliae</i>	56
3.8.1. Método utilizado no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília	56
3.8.2. Método de RAEDER & BRODA (1985)	58

3.9. Extração de plasmídios em grande escala ..	59
3.10. Extração de plasmídios em pequena escala .	61
3.11. Isolamento de DNA plasmídico em <i>E. coli</i> (mini-screen).....	63
3.12. Extração fenol/clorofórmio	64
3.13. Construção de banco genômico de <i>M. anisopliae</i>	65
3.13.1. Corte do plasmídio CV 13 com a en- donuclease Bam HI	65
3.13.2. Desfosforilação do DNA	66
3.13.3. Ligaçãõ do DNA de <i>Metarhizium ani-</i> <i>sopliae</i> com o plasmídio CV 13	67
3.13.4. Eletroeluição do DNA do gel de agarose (MANIATIS et alii, 1982) .	67
3.14. Eletroforese em gel de agarose (minigel) .	68
3.15. Transformação bacteriana pelo método do cloreto de cálcio	69
3.16. Transformação bacteriana pelo método de HANAHAN	70
3.17. Preparo das sondas de DNA	71
3.17.1. Purificação dos plasmídios com o kit-GENE CLEAN®	71
3.17.2. Preparo das sondas com uso de mar- cação não-radioativa do kit CAT- 1093657 produzido pela Boehringer Mannheim (modificado)	73
3.18. Transferência do DNA para membrana de ny- lon (Southern blotting) e hibridização com as sondas	74
3.18.1. Transferência	74
3.18.2. Hibridização	74

3.18.3. Lavagem dos filtros, detecção imunológica e revelação	75
3.19. Agrupamento de linhagens segundo taxonomia numérica	77
3.19.1. Agrupamento segundo padrões isoenzimáticos de esterases	77
3.19.2. Agrupamento segundo padrões eletroforéticos de isoenzimas e DNA mitocondrial tratado com enzimas de restrição	77
3.19.3. Agrupamento segundo a produção de isoenzimas e de produção e regeneração de protoplastos	78
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1. Porcentagem de sobrevivência à luz UV	79
4.2. Obtenção de mutantes	92
4.3. Obtenção e regeneração de protoplastos	96
4.4. Caracterização de <i>M. anisopliae</i> quanto à produção de exoenzimas	105
4.5. Caracterização eletroforética de linhagens de <i>M. anisopliae</i>	113
4.6. Análise do DNA mitocondrial	129
4.7. RFLP	136
4.8. Construção do banco genômico de <i>M. anisopliae</i>	140
4.9. Variabilidade e paramiose	141
4.10. Agrupamento de linhagens segundo taxonomia numérica	155

Página

5. CONCLUSÕES	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

DIVERSIDADE BIOLÓGICA EM
Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin

Autor: CLAUDIO COSTA

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Numa tentativa de se ampliar o conhecimento da variabilidade natural existente em 10 linhagens selvagens do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* estudou-se a resistência à luz ultra-violeta, a obtenção e regeneração de protoplastos segundo duas metodologias diferentes, a produção de exoenzimas, o padrão eletroforético de isoenzimas, o polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), a ocorrência da parameiose e o polimorfismo do DNA mitocondrial. Construiu-se também um banco genômico da linhagem E6.

A análise do DNA mitocondrial mostrou ser uma técnica importante como indicadora de polimorfismo genético e a técnica de RFLP com marcação não-radiativa de sondas, mostra-se propícia para laboratórios que não tenham facilidades de uso de radioisótopos.

A parameiose, caracterizada pela obtenção de recombinantes haplóides no heterocário em alta frequência e com evidências de permuta mitótica está ocorrendo em *Metarhizium anisopliae* e pode ser um mecanismo natural de amplificação da variabilidade genética em fungos filamentosos imperfeitos.

BIOLOGICAL DIVERSITY IN

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin

Author: CLAUDIO COSTA

Adviser: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

The deuteromycete *Metarhizium anisopliae* has been used in Brazil as a bioinsecticide. The present work was carried out aiming at the study of the natural variability occurring in 10 wild isolates concerned to their sensitivity to ultra-violet light, protoplasting and protoplast regeneration, exoenzymes production, isozyme electrophoretic pattern, restriction fragment length polymorphism (RFLP), occurrence of parameiosis and mitochondrial DNA polymorphism. A genomic library for the strain E6 was constructed as well. Mitochondrial DNA restriction pattern analysis has shown to be a useful approach to be explored, it provides an alternative aid for filamentous fungi taxonomy. In addition, RFLP with non-radioactive DNA probe labeling was shown as a potential tool for DNA polymorphism detection and genetic maps

construction, it is very useful for laboratories where no radioisotopes facilities are available.

Parameiosis, identified by the product of haploid recombinants in high frequency directly from heterokaryons, was shown to occur in *Metarhizium anisopliae*. It might be understood as a natural mechanism of genetic variability amplification in imperfect filamentous fungi.

1. INTRODUÇÃO

Antes da intervenção do Homem na natureza, desmatando para abrir picadas e para plantar, o número de insetos dependia de sua capacidade de reprodução em relação às condições naturais. Derrubando matas, o Homem modificou o ambiente provocando um desequilíbrio biológico do qual vem sendo vítima (FRIGO, 1983).

Com o advento da agricultura, muitos insetos se tornaram pragas. Com o aumento da população do planeta, a carência de alimento e a poluição ambiental originada do uso de pesticidas químicos tornaram-se problemas graves.

Há mais de um século o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin é considerado um bom agente controlador de insetos que causam danos à culturas agrícolas de valor econômico. Todavia, a utilização do fungo no controle biológico esbarra numa série de dificuldades devido a sua complexidade de respostas em relação ao meio ambiente.

O *Metarhizium anisopliae* apresenta grande variabilidade podendo ser encontrado no solo ou parasitando insetos. Sendo um fungo deuteromiceto, do ponto de vista genético, o ciclo parassexual representa a única via de estudos de recombinação. Em consequência disto, ainda muito pouco se conhece quanto à genética desse fungo.

A proposta deste trabalho é de ampliar o conhecimento da variabilidade natural em linhagens selvagens de *Metarhizium anisopliae*, estudando-se a resistência à luz ultravioleta, obtenção e regeneração de protoplastos, a produção de exoenzimas, o padrão eletroforético de isoenzimas, o polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), a ocorrência da paramiose, o polimorfismo de DNA mitocondrial e também da construção de um banco genômico que servirá para futuras análises comparativas de linhagens e seleção de genes relevantes ao processo entomopatogênico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O fungo *Metarhizium anisopliae*

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um deutero-miceto 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 (FRIGO, 1983; BAGALHI, 1987).

TULLOCH (1976) revisou a taxonomia do gênero *Metarhizium* e manteve duas espécies: *Metarhizium flavoride* Sams (Rozsypal) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 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 podem ocorrer conídios septados com emissão de dois tubos germinativos (LUNA, 1985). As hifas são freqüentemente 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; BAGALHI, 1987).

Esse fungo apresenta crescimento ótimo em temperaturas entre 25° e 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 a 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 *Metarhizium 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 alii, 1974; AQUINO et alii, 1975), e *Deois flavopicta* e *Zulia entreriana* para as pastagens (VEIGA, 1979; BAGALHI, 1987). Também tem sido verificada a sua patogenicidade em outras importantes pragas como a *Diatraea saccharalis*, broca-da-cana (ALVES et alii, 1984), ao "manhoso" (LORD, 1986), ao *Hypothenemus hampei*, broca-do-café (LECUONA et alii, 1986), a *Ceratitis capitata* (GARCIA et alii, 1984) e outros (ALVES, 1986), bem como em insetos de interesse médico como o *Rhodnius proxilus* e outros vetores da doença de chagas (SILVA & MESSIAS, 1986; BAGALHI, 1987).

Além do interesse no controle de pragas, o fungo *Metarhizium anisopliae* também vem despertando interesse com relação à produção de substâncias farmacológicas como antibióticos e imunomoduladores (ITO-KACAWA et alii, 1984; HINO et alii, 1985; KINO et alii, 1985; BAGALHI, 1987).

Um grande número de linhagens ou isolados, provenientes de diversas fontes e várias regiões do país já foi obtido e foram realizados estudos com relação a uma série de características como crescimento e produção de esporos, produção de exoenzimas, patogenicidade, resistência a agentes físicos e químicos, variabilidade eletroforética, padrões em cromatografia gasosa, onde se observaram grande variabilidade natural na espécie (MESSIAS et alii, 1978; HADDAD & MESSIAS, 1979; DE CONTI et alii, 1980; VALE et alii, 1980; ROSATO et alii, 1981; SANTOS & AZEVEDO, 1982; CORREA, 1983; FRIGO, 1983; MATOS, 1983; MESSIAS et alii, 1983; AZEVEDO & MESSIAS, 1985; LUNA, 1985; SILVA, 1985; FRIGO & AZEVEDO, 1986; BAGALHI, 1987; VALADARES, 1989).

LUNA (1985) em um extensivo estudo de caracterização citológica e morfológica de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *M. anisopliae* detectou variabilidade genética entre essas linhagens. Duas delas (A4 e M5), apresentaram uma grande divergência das demais, sendo sugeridas como 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 variar nas diferentes linhagens.

ALVES et alii (1986), empregaram um sistema de análise genética para 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 grande variabilidade natural entre os isolados e uma forte influência do hospedeiro de origem na determinação dos agrupamentos.

RIBA et alii (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 do 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 de 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 esses autores, poderiam ter sido originados por processos de hibridação entre as linhagens de variedades *major* com linhagens da variedade *anisopliae*, através do ciclo parassexual (BAGALHI, 1987).

2.2. A Genética de *Metarhizium anisopliae*

Antes da década de 70, estudar *M. anisopliae* do ponto de vista genético era inexequível. A impossibilidade, aparentemente, residia no fato de ser um fungo que não apresenta ciclo sexual. Desde que o ciclo parassexual foi assinalado em fungos, para os representantes do grupo dos deuteromicetos como *M. anisopliae*, uma perspectiva de sexualidade surgiu, representando assim a única alternativa de variabilidade por recombinação (AZEVEDO, 1972; 1976; LUNA, 1955; BAGALHI, 1987).

O estudo genético desse fungo, praticamente iniciou-se com TINLINE & NOVIELLO (1971), com a ocorrência de heterocários, obtidos através de mutantes auxotróficos.

Estudos visando informações genéticas sobre esse fungo, intensificaram-se de modo que MESSIAS et alii (1978) conseguiram mutantes em laboratório através do uso de luz UV. OKINO et alii (1978) obtiveram mutantes utilizando irradiações gama. MESSIAS (1979) através da técnica de parassexualidade conseguiu heterocários e diplóides em laboratório. Contudo, o assinalamento do ciclo parassexual na literatura, para esse fungo, só ocorreu em 1979, quando MESSIAS (1979) o descreveu. Os resultados foram relatados quase que simultaneamente com os trabalhos de Al-AIDROOS

(1980) no Canadá e os de MESSIAS & AZEVEDO (1980) no Brasil (LUNA, 1985).

RIBA et alii (1980) também conseguiram recombinantes mitóticos por hibridação de biotipos selvagens. LUGLI & MESSIAS (1982) obtiveram o ciclo parassexual entre linhagens diferentes. BERGERON & AL-AIDROS (1982) mencionaram cinco possíveis grupos de ligação para a espécie.

O emprego de agentes mutagênicos, em *M. anisopliae* como luz ultravioleta, permitiu o isolamento de mutantes morfológicos e auxotróficos (LUGLI & MESSIAS, 1981; LUNA et alii, 1983; ARAÚJO et alii, 1983). Mutantes resistentes a UV também foram conseguidos por (AZEVEDO et alii, 1981; MATOS, 1983). Mutantes com aumento de virulência (AL-AIDROS & ROBERTS, 1978; SILVA et alii, 1983; SILVA & MESSIAS, 1984) e mutantes com produção de enzimas, também foram isolados (AL-AIDROS & SEIFRERT, 1980; ROSATO et alii, 1981; AZEVEDO et alii, 1983; LUGLI & MESSIAS, 1984; LUNA, 1985; BAGALHI, 1987; VALADARES, 1989).

Cruzamentos entre linhagens de *M. anisopliae*, cuja incompatibilidade ocorra a nível de parede, podem ser conseguidos através de técnicas de fusão de protoplastos (SILVEIRA, 1983; SILVEIRA et alii, 1983; SILVEIRA & AZEVEDO, 1984a) e técnica de "doador morto" recentemente introduzidas por FRIGO (1983) e FRIGO & AZEVEDO (1984).

SILVEIRA & AZEVEDO (1982; 1984b), introduziram a técnica de filtração e enriquecimento e conseguiram aumentar o isolamento de mutantes de 6,13% em relação as frequências conseguidas pela técnica de isolamento total, e resultados semelhantes foram também obtidos por BAGALHI (1987).

O isolamento de mutantes morfológicos e auxotróficos é muito importante em *M. anizopliae*, por permitir cruzamentos para obtenção do ciclo parassexual e posterior isolamento de diplóides e haploidização, ampliando as possibilidades de se combinar, num genoma único, genes potencialmente ativos, oriundos de linhagens parentais, com alto poder de infestação e patogenicidade (LUNA, 1985).

2.3. A parameiose em *Metarhizium*

O termo parameiose foi proposto por BONATELI Jr. et alii (1983) para designar um certo tipo de instabilidade dos núcleos diplóides heterozigotos, que apresentariam uma alta taxa de recombinação e haploidização nas hifas heterocarióticas, semelhante ao que ocorreria no processo meiótico. O fenômeno foi descrito analisando-se cruzamentos pelo ciclo parassexual de linhagens auxotróficas de *Aspergillus niger* utilizadas na produção de ácido cítrico.

Analisando-se diâmetros de conídios e o comportamento das colônias em meio contendo Benlate, observaram que as colônias obtidas no heterocáριο eram dos tipos diplóides heterozigotos para todas as marcas auxotróficas e heterozigotos para apenas alguns recombinantes haplóides e algumas marcas auxotróficas. Segundo esses autores, a ocorrência de diplóides instáveis e estáveis em *Aspergillus niger* observada por LHOAS (1967), CHANG & TERRY (1973) e DAS & ILCZUK (1978), bem como a instabilidade observada em *Penicillium patulum* por CALAM et alii (1973) e a alta instabilidade dos diplóides de *Cephalosporium acremonium* observada por BAL & HAMLYN (1982) podem ser interpretadas com base na parameiose.

Evidências da parameiose em outros fungos filamentosos podem ser observados nos trabalhos de HASTIE (1964), TYPAS & HEALE (1977), TYPAS (1983), HASTIE & HEALE (1984) e HAMLYN et alii (1985).

SILVEIRA & AZEVEDO (1987) utilizando-se de fusão de protoplastos intra e interlinhagens com diferentes marcas auxotróficas e morfológicas observaram que os produtos de fusão eram altamente instáveis, emitindo setores recombinantes.

BAGALHI (1987) foi o primeiro autor a interpretar a alta frequência de obtenção de recombinantes haplóides no heterocáριο, com evidências de permuta mitó-

tica, como sendo ocorrência de parameiose em *Metarhizium anisopliae*. Sugere também que este fenômeno possa ser um mecanismo natural de amplificação da variabilidade genética em fungos imperfeitos.

2.4. Caracterização das linhagens

Em geral, a classificação de fungos entomopatogênicos está baseada em critérios morfológicos. Contudo, conhecimentos adicionais da virulência e especificidade, revelaram a necessidade de uma caracterização mais precisa. Algumas informações foram dadas por um estudo mais especializado da conidiogênese (HAMMIL, 1972), observações através da microscopia eletrônica dos esporos (MATANMI & LIBBY, 1975), e, algumas vezes por estudos fisiológicos. Porém, uma caracterização correta das linhagens, requer novas técnicas (FRIGO, 1983). Para tal, estudos comparativos de caracterização de diferentes isolados através de métodos eletroforéticos e imunoeletroforéticos (FARGUES et alii, 1975; De CONTI et alii, 1980), têm-se mostrado muito promissores no desenvolvimento de técnicas para o controle de pragas, uma vez que alguns desses isolados mostram diferentes patogenicidades. A produção de enzimas extracelulares também possibilita uma caracterização, já que uma variação

quanto ao índice enzimático é mostrado entre diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* desenvolvidos em meio sólido e também de acordo com a fonte de nitrogênio utilizada (FRIGO, 1983; VALADARES, 1989).

As técnicas moleculares tornaram-se auxiliares imprescindíveis para ganhos no conhecimento da biologia desse fungo.

Dentre as técnicas moleculares, a análise do DNA mitocondrial e a análise de segmentos de restrição do DNA como indicadores de polimorfismo entre linhagens e a transformação como forma alternativa de recombinação são, possivelmente, as de maior potencialidade.

2.5. O DNA Mitocondrial em fungos (mtDNA)

O DNA de mitocôndrias em fungos vem sendo utilizado de maneira eficiente como bom material para estudo da fisiologia da ação gênica, como indicador do polimorfismo intra e interespecífico e como possível veículo de clonagem de genes em microrganismos eucariotos.

Embora as informações codificadas pelos DNA mitocôndrias de outros metazoários sejam semelhantes as de fungos filamentosos, entre eles há grande variação no tamanho do genoma, refletido pelo conteúdo de pares de bases.

Os menores genomas mitocondriais observados são das leveduras *Torulopsis* (18,9 kb) e *Saccharomyces pombe* (19 kb), que são ligeiramente maiores que o menor genoma animal encontrado que é de 16,5 kb.

Os maiores genomas mitocondriais encontrados são os das plantas superiores (WARD et alii, 1981; LONSDALE, 1985), e dentre os fungos, até o momento, o maior genoma encontrado é o do basidiomiceto *Suillus grisellus* com 121 kb (GROSSMAN & HUDSPETH, 1985). Na Tabela 1 encontram-se os tamanhos de vários genomas mitocondrias de microrganismos eucariotos.

Os DNA mitocondrias de diversos organismos estudados e dentre eles os fungos filamentosos, apresentam-se na forma circular. As exceções estão entre os protozoários ciliados (GODDARD & CUMMINGS, 1975; GOLBACH et alii, 1979; GROSSMAN & HUDSPETH, 1985), o fungo *Physarum polycephalum* (KAWANA et alii, 1982) e a levedura *Hansenula mrakii* (WESLOWSKI & FUKUHARA, 1981).

O grande aumento no tamanho de muitos genomas mitocondrias além do necessário para codificar suas funções conhecidas leva a questionar a função do DNA adicional.

Muitos genomas mitocondrias já foram totalmente ou quase totalmente sequenciados e observaram-se poucas ORF (Open Reading Frames).

Em alguns casos descritos, de 50 a 80% dos

DNA mitocondriais de fungos não apresentam sequências codificadoras. A grande variação no tamanho do genoma mitocondrial de organismos correlacionados leva a crer que muitas sequências não codificadoras sejam eliminadas e que permaneçam somente as sequências necessárias para codificar as principais funções mitocondriais. Pode-se observar que no gênero *Saccharomyces*, a *S. cerevisiae* tem 72-78 kb enquanto *S. oxigrens* tem 23,7 kb (CLARK-WALKER et alii, 1983).

GROSSMAN & HUDSPETH (1985), trabalhando com diversos basidiomicetos, observaram que o mtDNA de *Coprinus cinereus* tem 43 kb enquanto que *C. stercorearius* tem 91 kb.

Pequenas inserções e deleções são comuns nos genomas mitocondriais e dão origem à variação que pode ser analisada através da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) (ECONOMOU et alii, 1987).

ECONOMOU et alii (1987), trabalhando com genomas mitocondriais do basidiomiceto *Coprinus cinereus* observaram que nas linhagens H e J haviam inserções alternativas de pequenos pedaços de DNA de 1,23 kb. Usando o gene da citocromo oxidase 1 (co-1), de *Neurospora crassa* como sonda, mostraram que a inserção "J" estava localizada dentro do gene co-1 de *Coprinus* e que a inserção "H" estava a 2 kb de distância. As inserções mostraram herança ao acaso. A recombinação entre os genomas "J" e "H" foi detectada usando as mutações acu-10, que causa defeitos no citocromo

oxidase, e cap-1 que confere resistência ao cloranfenicol. Recombinantes para esses dois genes mostraram a presença de ambas inserções no DNA. Consideraram que essas mutações se localizam no gene que codifica RNA ribossômico e que embora as inserções tenham tamanho e comportamento similares, não apresentam grandes seqüências em comum de homologia.

O DNA mitocondrial é amplamente utilizado como indicador de polimorfismo em diversas espécies biológicas.

GROOT et alii (1975), analisaram as seqüências de homologias de DNAs nucleares e mitocondriais de quatro diferentes leveduras e observaram que havia em média 10% de homologia para ambos DNA e que eram consideradas como seqüências homólogas de genes ribossômicos. Através de hibridações entre DNA e rRNA observaram que tanto nos genomas nucleares quanto nos mitocondriais, os genes rribossomais foram conservados durante a evolução.

CUMMINGS et alii (1979a,b), estudaram o mtDNA do fungo *Podospora anserina* através de cortes com enzimas de restrição em quatro linhagens - s, A, T e E. Após digestão com EcoRI observaram que as quatro linhagens apresentavam padrões específicos de corte e que as linhagens s e A diferiam entre si em somente um fragmento. De maneira semelhante difeririam entre si por somente dois fragmentos após trata-

mento com a endonuclease HaeIII. Observaram também que as propriedades de mtDNA de culturas senescentes diferiam significativamente dos tipos selvagens ou de mutantes comuns.

EARL et alii (1981), estudaram a alta frequência de transferência das sequências específicas de mtDNA entre membros do gênero *Aspergillus*. Através de mapeamento do genoma com enzimas de restrição e análise em microscopia eletrônica observaram que as diferenças em tamanho se deviam principalmente a inserções de sequências de DNA. Com exceção de algumas espécies, os sítios de restrição específicos foram idênticos para *Aspergillus nidulans* e *A. nidulans* var. *echinulatus*. Através de fusão de protoplastos entre as duas espécies apresentando marcas no mtDNA obtiveram recombinantes para essas marcas. Mostraram também através de padrões de restrição a transferência de 3 sequências de inserção de *A. nidulans*.

COLLINS & LAMBOWITZ (1983), analisaram as variações estruturais e a presença de introns opcionais no DNA de linhagens de *Neurospora* isoladas da natureza e observaram que havia grande diversidade estrutural tanto intra quanto interespecífica. Essas diferenças foram devidas às sequências de inserção próximas das regiões codificadoras de tRNA e rRNA. A análise através do padrão de restrição levou os autores a considerar que tais sequências

sejam introns opcionais no gene que codifica a subunidade 1 da citocromo oxidase.

McARTHUR & CLARK-WALKER (1983), observaram através do padrão de restrição polimorfismo em leveduras do gênero *Dekkera* / *Brettanomyces*. As diferenças no mtDNA também foram devidas as inserções e deleções principalmente em sequências gênicas.

WU et alii (1983), também estudaram o polimorfismo do mtDNA de *Coprinus cinereus* observando através dos padrões de restrição a presença de inserções e deleções no genoma.

AHNE et alii (1984), estudaram o genoma mitocondrial de *Schizosaccharomyces pombe* observando que os mutantes que produziãem linhagens com deficiência respiratória apresentavam deleções nas sequências gênicas que codificam as enzimas envolvidas no processo. Através do padrão de restrição identificaram 22 mutantes por deleção, principalmente localizadas no gene que codifica a subunidade I do citocromo oxidase.

HINTZ et alii (1985), estudaram também heterogeneidade relativa a mtDNA em diferentes espécies de basidiomicetos do gênero *Agaricus*.

BROWN et alii (1984), sequenciaram trechos do DNA mitocondrial de *Aspergillus nidulans* e encontraram uma

determinada sequência que poderá codificar uma segunda forma de subunidade 9 da ATPase.

WEBER et alii (1986), através de padrões de restrições de 2 espécies de fungos do gênero *Coprinus*, compararam seu grau de parentesco evolucionário através de mudanças moleculares ocorridas desde que divergiram de um ancestral comum. Observaram que o mtDNA de *C. stercorarius* apresentava 91,1 Kb e que era em média duas vezes maior que o de *C. cinereus* que tinha 43,3 Kb. O padrão de restrição mostrou que ambos DNAs eram circulares porém não apresentaram homologias muito evidentes. O genoma mitocondrial de *C. stercorarius* apresenta uma região homóloga a uma sonda construída a partir do gene *var1* de levedura enquanto seu DNA nuclear não. Em *C. cinereus* acontece o fenômeno exatamente oposto, isto é, há homologia entre DNA nuclear e sonda e não com o mtDNA.

Os trabalhos de diferentes pesquisadores com diferentes microrganismos eucariotos mostrou que a análise do padrão de restrição de mtDNA é um parâmetro muito adequado para estudos de polimorfismo genético.

2.6. O polimorfismo através de fragmentos de restrição (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)

O desenvolvimento do uso de endonucleases de restrição para mapear seqüências genéticas deu origem à técnica designada como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Tornou-se uma técnica de alto potencial de uso como indicadora de polimorfismo genético utilizada na detecção de alelos mutantes que dão origem às doenças hereditárias em humanos, e como ferramenta básica em estudos de taxonomia, evolução e mesmo como auxiliar em programas de melhoramento genético (BURR et alii, 1983).

A técnica da RFLP utiliza seqüências clonadas de regiões do genoma, que podem ser específicas ou não, como sondas indicadoras de polimorfismo a nível de DNA.

De maneira geral a técnica se utiliza da seguinte seqüência de passos: extração do DNA seguida de digestão por endonucleases de restrição, preparo das sondas e análise dos resultados entre hibridizações das sondas com DNA em teste.

Em microrganismos a RFLP tem sido mais utilizada como indicadora de polimorfismo entre linhagens como mostram os trabalhos de ALAN et alii (1987), BEVERY et alii (1987), CASTLE et alii (1987), MAGEE et alii (1987), MANICON et alii (1987), PAIETTA et alii (1987) e RAEDER & BRODA (1984).

Tabela 1. Diferentes tamanhos de genomas mitocondriais em fungos (adaptado de GROSSMAN & HUDSPETH, 1985).

Taxonomia	Tamanho do genoma mitocondrial	Referências
Mixomicetes		
<i>Physarium polycephalum</i>	69	Kawano et alii (1982)
Oomycetes		
<i>Achlya</i>	49,8-50,7	Hudspeth et alii (1983) Boyd et alii (1984)
<i>Phytophthora infestans</i>	36,2	Klimezak e Prell (1984)
<i>Pythium utlimum</i>	57	Grossman e Hudspeth (1985)
<i>Saprolegnia</i> sp	44,5	Clark-Walker e Gleason (1973)
<i>Saprolegnia ferax</i>	46,5	Grossman e Hudspeth (1985)
Zygomycetes		
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	25,6	Grossman e Hudspeth (1985)
Ascomycetes		
<i>Aspergillus nidulans</i>	31,5	Stepien et alii (1978)
<i>Brettanomyces custersii</i>	108	Clark-Walker et alii (1981)
<i>Cephalosporium acrenomium</i>	27	Minuth et alii (1982)
<i>Claviceps purpurea</i>	45	Tudzynski et alii (1983)
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	115	Garber e Yoder (1985)
<i>Neurospora crassa</i>	60	Bernard et alii (1976)
<i>Podospora anserina</i>	94	Cummings et alii (1979)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	48,3-40,2	Saunders et alii (1984)
Leveduras		
<i>Hansenula mrakii</i>	55	Weslowski e Fukuhara (1981)
<i>Hansenula petersonii</i>	42	Falcone (1984)
<i>Kloeckera africana</i>	27,1	Clark-Walker et alii (1981)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	37	Groot e Van Harten-Loosbroek (1980)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67-78	Sanders et alii (1977)
<i>Saccharomyces exiguus</i>	23,7	Clark-Walker et alii (1983)
<i>Saccharomyces (Yarrowia)</i>	44-48	Kock et alii (1980)
<i>lipolytica</i>		Weslowski et alii (1981)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	19	Del Giudice et alii (1981)
<i>Torulopsis glabata</i>	18,9	Clark-Walker et alii (1981)
Basidiomycetes		
<i>Coprinus cinereus</i>	43	Grossman e Hudspeth (1985)
<i>Coprinus stercorearius</i>	91	Grossman e Hudspeth (1985)
<i>Schizophyllum commune</i>	50,3-52,2	Specht et alii (1983)
<i>Suillus grisellus</i>	121	Grossman e Hudspeth (1985)
<i>Ustilago cynodontis</i>	76,5	Mery-Drugeon et alii (1981)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

3.1.1. Linhagens de *Metarhizium anisopliae*

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* utilizadas neste trabalho pertencem à coleção do Setor de Genética de Microrganismos do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, e estão relacionadas a seguir.

As linhagens mutantes E6-7 e E6-8 foram obtidas por SILVEIRA (1983). As linhagens E6-1, E6-5, E9-12, E9-19, E9-20, E9-23, RJ-31 e RJ-37 foram obtidas por BAGALHI (1987).

As linhagens PL48, PL143, 255, 259, 866 e 959 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Sérgio Batista Alves do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP.

Linhagem	Fenótipo*
A4	prototrófica
A19	prototrófica
A1	prototrófica
E6	prototrófica
E9	prototrófica
M	prototrófica
M5	prototrófica
MT	prototrófica
Major	prototrófica
RJ	prototrófica
PL48	prototrófica
PL143	prototrófica
PL255	prototrófica
PL 866	prototrófica
PL 959	prototrófica
E6-1	E6 vio2 ade5 pro11
E6-5	E6 vio2 lis6 bio1
E6-7	E6 bio9 met9 bio9
E6-8	E6 ylo8 pir8 lis8
E9-12	E9 met1 lis3
E9-19	E9 ylo1 leu6 rib8
E9-20	E9 ylo1 leu6 ade9
E9-23	E9 ylo2 lis3 met14
RJ-31	RJ vio1 lis3 bio2
RJ-37	RJ leu1 (vit3)**

* ade, bio, leu, lis, met, pir, rib designam respectivamente requisitos nutricionais para adenina, biotina, leucina, lisina, metionina, piridoxina e riboflavina.

vio, ylo se referem à coloração dos mutantes violeta e amarela em contraste ao verde que é a coloração dos prototróficos.

** mutante com a 2a. marca auxotrófica que é uma vitamina não caracterizada.

3.1.2. Linhagens de bactérias

As linhagens de *Escherichia coli* HB 101 e *E. coli* 5 K bem como seus plasmídios foram gentilmente cedidos pelo Dr. Spartaco Stolfi Filho do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO et alii, 1953)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,001 g
ZnSO ₄	0,001 g
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
H ₂ O destilada	1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

3.2.2. Meio completo (PONTECORVO et alii, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Ao meio mínimo acrescentaram-se:

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

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

3.2.3. Meio completo líquido (PONTECORVO et alii, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

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

3.2.4. Meio mínimo mais 4% de meio completo

Ao meio mínimo líquido foram acrescentados 4% de meio completo líquido e distribuídos 2,5 ml em tubos de ensaio, os quais foram autoclavados e mantidos em refrigerador.

3.2.5. Meio mínimo mais KCl (MMKCl)

Preparado segundo item 3.2.1, adicionando-se 800 ml de água destilada. Pesou-se 44,73 g de KCl e adicionou-se aos 200 ml restantes. Autoclavaram-se separadamente e foram misturados no momento de uso.

3.2.6. Meio completo mais KCl (MKKCl)

Preparado segundo o item 3.2.2, adicionando-se 800 ml de água destilada. Pesou-se 44,73 g de KCl e adicionou-se aos 200 ml restantes. Autoclavaram-se separadamente e foram misturados no momento de uso.

3.2.7. Meio completo líquido para crescimento de micélio

Preparado segundo o item 3.2.2, aumentando-se a quantidade de glicose para 30 g/l.

3.2.8. Meio de manipueira

Manipueira (efluente de indústria de mandioca)	100 ml
Água destilada	100 ml
Agar comum	4 g

3.2.9. Meio completo LB (LURIA-BERTANI) para bactérias (MANIATIS et alii, 1982)

Triptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g

O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH.

3.2.10. Meio completo LB líquido

Preparado segundo o ítem 3.2.9, não sendo adicionado agar.

3.2.11. Meio SOB para bactérias (HANAHAN, 1986)

Bacto triptona	2%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM

3.2.12. Meio SOC para bactérias (HANAHAN, 1986)

Prepara-se como no item 3.2.11, adicionando-se 20 mM de glucose.

3.2.13. Meio SOB sólido para bactérias

Ao meio preparado como no ítem 3.2.11, adiciona-se 1,5% de agar.

3.2.14. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico	100,0 mg
Ácido p-aminobenzóico	10,0 mg
Aneurina (tiamina)	50,0 mg
Biotina	0,2 mg
Colina	2000,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada esterilizada ...	100,0 mg

A solução foi parcialmente esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada no refrigerador a 4°C em frasco escuro sob clorofórmio.

3.2.15. Solução de ácido nucleico de leveduras

Ácido nucleico de leveduras: 2g em 15 ml
de HCl 1 N

Ácido nucleico de leveduras: 2g em 15 ml
de NaOH 1 N

Ambas as soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, misturadas e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4%. Filtru-se e completou-se o volume para 40 ml sendo a seguir conservada no refrigerador a 4°C sob clorofórmio.

3.2.16. Solução de Tween (0,1%)

Adicionou-se tween 80 à água destilada a uma concentração de 0,1% (v/v). A seguir, distribuindo-se em tubos (2,5 ml por tubo).

3.2.17. Solução Salina

Preparou-se uma solução de cloreto de sódio a 0,89% dissolvendo-se o sal em água destilada. A solução foi colocada em frascos (9 ml por frasco).

**3.2.18. Solução de KCl 0,7 M em tampão fosfato
0,2 M pH 5,8**

Solução A

NaH ₂ PO ₄	62,4 g
Água destilada	1000,0 ml

Solução B

NazHPO ₄	28,39 g
Água destilada	1000,0 ml

Dissolver 89,46 g de KCl em 500 ml da solução B. Adicionar, aos poucos, a solução A à mistura KCl + solução B até que o pH atinja 5,8. Observar o quanto de solução A foi acrescentada. Preparar 2 litros da mistura final adicionando-se quantidades suficientes de soluções A e B na proporção definida.

3.2.19. Tampão McILVAINE pH 5,8

Solução de ácido cítrico 21g em 1000ml
de H₂O destilada

Solução de NazHPO₄.H₂O 32g em 1000ml
de H₂O destilada

Misturou-se 184,25 ml da solução de ácido cítrico e 315,75 ml da solução de NazHPO₄.H₂O.

3.2.20. Solução 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Dissolveu-se 79,2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em pequeno volume do tampão McILVAINE (item 3.2.19). Ajustou-se o pH para 5,8 com a solução de Na_2HPO_4 e completou-se o volume para 1000 ml com o referido tampão.

3.2.21. Solução de PEG 6000 a 30%

Solução A

CaCl ₂	1,1 g
Água destilada	100,0 ml

Solução B

Glicina	3,75 g
Água destilada	100,0 ml
pH ajustado para 8,0 com NaOH 4%	

Adicionou-se 10,0 ml de solução A em 10,0 ml de solução B. Completou-se o volume a 100,0 ml com água destilada adicionando-se PEG 6000 em concentração final de 30%.

3.2.22. Solução de enzimas para produção de protoplastos (HAMLYN et alii, 1981)

Para cada 1,0 ml de estabilizados osmótico foram adicionados 10,0 mg de enzima lítica, sendo 5,0 mg de celulase CP (JOHN & STURGE Ltd., Inglaterra) e 5,0 mg de Novozym 234 (Novo Industri, Dinamarca). O complexo lítico foi esterilizado por centrifugação a 18000 rpm por 30 minutos a 4°C.

3.2.23. Tampões para extração de DNA mitocondrial e DNA total de *Metarhizium anisopliae*

3.2.23.1. Tampão ETS-1

10 mM Tris HCl

5 mM EDTA

0,44 M Sacarose

pH 7,5

3.2.23.2. Tampão MTS

20 mM Tris HCl

0,44 M Sacarose

5 mM MgCl₂

pH 7,5

3.2.23.3. Tampão ETS-2

10 mM Tris HCl
100 mM EDTA
0,44 M Sacarose
pH 8,0

3.2.23.4. Tampão TESDS

0,25 M Tris-HCl
0,1 M EDTA
1% SDS
pH 7,5

3.2.23.5. Tampão TEN

0,25 M Tris-HCl
0,1 M EDTA
1,0 M NaCl
pH 7,5

3.2.23.6. Tampão TNE

10 mM Tris-HCl
10 mM NaCl
0,2 mM EDTA
pH 8,0

3.2.23.7. Tampão SUC

10% sacarose

50 mM Tris-HCl

pH 7,5

3.2.23.8. Tampão TE-1

10 mM Tris-HCl

pH 7,5

3.2.23.9. Solução 5 M de cloreto de sódio

3.2.23.10. Solução 4M de acetato de sódio

3.2.23.11. Tampão espermidina 10x (10 vezes
concentrado)

Espermidina	0,04 m
NazEDTA	0,10 M
Tris-HCl pH 8,5	0,10 M
KCl	0,36 M

pH = 9,5

3.2.23.12. Tampão Triton - Espermidina 1x
(TTE) 200 ml

Tampão espermidina 10x	20,0 ml
Sacarose 2 M	50,0 ml
β -mercaptoetanol 14 M	0,2 ml
Triton x-100 (v/v) 100%	1,0 ml
Água destilada	128,8 ml

Guardar a 4°C até o momento de uso.

3.2.23.13. Tampão de lise (TL)

Tris-HCl pH 8,0	0,04 M
NaCl	0,20 M
Sacrosil ou SDS (v/v)	1,5%
NazEDTA	0,01 M

Guardar a 4°C.

3.2.23.14. Tampão SET

Sacarose	20%
Tris HCl	50mM pH 7,6
EDTA	50mM

3.2.23.15. Tampão React 3 (MANIATIS et alii, 1982)

Tris HCl pH 8,0	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	100 mM

3.2.23.16. Tampão CiP 10x

Tris HCl pH 9,0	0,5 M
MgCl ₂	10 mM
ZnCl ₂	1 mM
Espermidina	10 mM

3.2.23.17. Tampão TNES

Tris-HCl pH 8,0	0,1 M
NaCl	5 M
EDTA	0,1 M
SDS	20%

3.2.23.18. Tampão TAE

Tris-acetato	4mM pH 7,9
EDTA	2mM
Ajustar o pH com ácido acético glacial.	

3.2.24. Soluções utilizadas para preparo de plasmídios para clonagem molecular

3.2.24.1. Solução I

25 mM Tris-HCl pH 8,0

10 mM EDTA

50 mM glicose

3.2.14.1. Solução II

0,2 N NaOH

1% SDS

3.2.24.3. Solução III

3 M acetato de sódio

2 M ácido acético

pH 4,8

3.2.24.4. Tampão TE-2

25 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

pH 8,0

3.2.24. Tampão R

20 mM Tris-HCl

0,1 mM EDTA

pH 7,5

3.2.24.6. Clorofane

Fenol-clorofórmio (iv/iv)

8-hidroxiquinolina 0,5% (p/v)

Tris-HCl 20mM pH 8,0

NaCl 100mM

EDTA 1mM

3.2.24.7. Solução de RNase A:

RNase A 10 mg/ml

Dissolvida em:

Ácetato de sódio 50mM pH 4,8

(ferver em banho-maria por

10 minutos)

3.2.24.8. Tampão de transformação para
o método de HANAHAN (1986) TFB

KCl	100 mM
MnCl ₂	45 mM
CaCl ₂	10 mM
HaCoCl ₃	3 mM
K-MES	10 mM
pH = 6,2	

3.2.25. Soluções utilizadas para as técnicas de
transferência e hibridização do DNA

3.2.25.1. Solução 20xSCC

0,3 M cloreto de sódio

0,3 M citrato de sódio

pH ajustado com NaOH 10N

3.2.25.2. Solução de SDS (dodecil-sulfato de
sódio) a 10% (peso/volume)

3.2.25.3. Solução 4M cloreto de lítio

3.2.25.4. Solução 0,5M EDTA

3.2.26. Tampões utilizados nas eletroforeses em gel de agarose

3.2.26.1. Tampão TEB (10x)

(MANIATIS et alii, 1982)

Tris - Base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA	20 mM
Água destilada	1000 ml
pH 8,4	

3.2.26.2. Tampão de amostra TA (3x)

Em TEB 3x acrescentar:

Ficol tipo 400	20%
Azul de bromofenol ...	0,1%

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

3.2.27.1. Solução estoques de Acrilamida

Acrilamida	75 g
Bis-acrilamida	2 g
H ₂ O destilada.....	250 ml

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

3.2.27.2. Tampão de gel separador pH 8,9

Tris-base	45,75 g
H ₂ O destilada	60,0 ml

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

Completou-se o volume para 100 ml, com H₂O destilada.

A solução foi filtrada e mantida à temperatura ambiente.

3.2.27.3. Tampão do gel empilhador pH 6,8

Tris-base	7,474 ml
H ₂ O destilada	60,00 ml

Ajustou-se o pH para 6,8 com HCl 1N e completou-se o volume para 100 ml, com H₂O destilada.

3.2.27.4. Tampão do tanque - pH 8,9

Tris-base	6,32 g
Glicina	3,99 g
H ₂ O destilada	100,0 ml

Ajustou-se o pH para 8,9 com glicina, completou-se o volume para 1000 ml, com H₂O destilada e manteve-se em refrigerador.

3.2.27.5. Gel separador a 10%

Tampão do gel separador	
(item 3.2.27.2).....	1,5 ml
Acrilamida (item 3.2.27.1)	5,0 ml
Água destilada	8,4 ml
Persulfato de amônia(10%).	0,1113ml
TEMED	0,005 ml

3.2.27.6. Gel empilhador a 4%

Tampão do gel empilhador	
(item 3.2.27.3)	0,75 ml
Acrilamida (item 3.2.27.2)	1,00 ml
Água destilada	5,70 ml
Persulfato de amônio(10%).	0,056ml
TEMED	0,0075ml

3.2.27.7. Tampão da amostra

Glicerol	5,0 ml
Tampão do gel espalhador .	2,5 ml
Azul de bromofemol	2,5 mg

Completou-se o volume para 25 ml, com H₂O destilada e manteve-se estocada a -2°C.

3.2.27.8. Solução corante para esterase
(SHAW & PRASAD, 1970)

3.2.27.8.1. Estoques

A- α -naftil acetado	0,1 g
Acetona	5,0 ml
H ₂ O destilada	5,0 ml
B- α -naftil acetato	
Acetona	5,0 ml
H ₂ O destilada	5,0 ml

3.2.27.8.2. Corante

Fast Blue RR".....	50,0 mg
Tris-HCl 0,5M pH 7,1 ..	5,0 ml
α -naftil acetato	0,75ml
β -naftil acetato	0,75 ml
H ₂ O destilada	43,5 ml

3.2.28. Solução corante para proteínas

3.2.28.1. Fixador PAGE

Metanol	22,5 ml
Ácido actético	5,0 ml
H ₂ O destilada	22,5 ml

3.2.28.2. Corante

Azul de Comassie	
("Brilhant Blue R259").	50,0 mg
Fixador PAGE	50,0 ml

3.2.29. Soluções para citologia

3.2.29. Tampão fosfato 0,125 M, pH 7,0

Solução A:

NaH ₂ PO ₄	g
H ₂ O destilada	1000,00 ml

Solução B:

NaHPO ₄	53,65 g
H ₂ O destilada	1000,00 ml

Misturou-se 45 ml da solução A com 55 ml da solução B, completou-se o volume pra 1000 ml e ajustou-se o pH 7,0 com solução A ou B.

3.2.29.2. Solução de Giemsa

Diluiu-se um parte de giemsa em 66 partes de glicerina, a 60°C. Após resfriamento, misturou-se com 66 partes de metanol e manteve-se à temperatura ambiente.

3.2.29.3. Solução de albumina 50%

Colocou-se a clara de um ovo em becker estéril, com tesoura esterilizada, cortou-se a clara por uma hora. Filtrou-se, usando papel filtro, e adicionou-se igual volume de glicerina. A solução foi mantida em refrigerador.

3.2.29.4. Solução de HCl 1N

HCl	24,75 ml
H ₂ O destilada	300,00 ml

3.2.29.5. Solução de álcool etílico

Preparadas nas concentrações de 90 e 70% mediante diluições apropriadas em água destilada.

3.2.29.6. Solução de fixação

Utilizou-se 3 volumes de álcool etílico (absoluto) para 1 volume de ácido acético glacial. A solução foi preparada no momento do uso.

3.2.29.7. Tampão fosfato 0,02 M, pH 5,8

Diluiu-se solução 3.2.18, na proporção de 1:10 em água destilada.

3.3. Sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* à luz ultravioleta

Suspensões de conídios das linhagens de *Metarhizium anisopliae* em tween 80 foram observadas ao microscópio com auxílio de uma câmara de Neubauer, determinando-se o número de conídios por mililitro. Estas suspensões foram diluídas em solução salina (1:10), colocadas em placas de Petri esterilizadas e irradiadas com luz ultravioleta em diferentes intensidades. Após cada irradiação salina foram feitas diluições apropriadas em solução salina a 0,85% e semeou-se 0,1 ml em placas contendo meio completo. As placas foram incubadas a 28°C durante 5 dias. Após esse período as colônias sobreviventes foram contadas e procedeu-se o cálculo da curva de sobrevivência tomando-se o número de colônias obtidas no tempo zero minutos como 100% de sobrevivência. Estimou-se deste modo, o tempo de irradiação que permitia 5% de sobrevivência para as linhagens.

3.4. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos

Conídios das linhagens de *Metarhizium anisopliae* com 7 dias de desenvolvimento foram transferidas para

tubos de ensaio contendo tween 80. Em seguida, utilizando-se uma câmara de Neubauer foram contados os conídios dessas colônias procurando-se obter uma concentração ao redor de 10^6 conídios por mililitro.

A suspensão de conídios foi diluída (1:10) em solução salina e irradiada com luz ultravioleta por um período capaz de inviabilizar 95% dos conídios.

A suspensão irradiada foi diluída e dessa diluição semeou-se 0,1 ml por placa de Petri contendo meio completo. Após sete dias de incubação os conídios das várias colônias foram transferidos para placas de Petri, inoculadas na distribuição 5 x 5 mais 1, em MM (AZEVEDO, OLIVEIRA e ROCHA CAMPOS, 1976) e incubadas por 48 horas. As colônias que não se desenvolveram nesse meio foram consideradas mutantes. O ágar sobre o qual essas colônias se desenvolveram foi cortado em blocos que as continham e foram transferidos para tubos contendo meio completo inclinado. Assim novos conídios foram conseguidos para ensaio das deficiências nutricionais.

Para o ensaio dessas deficiências, os conídios de possíveis mutantes, foram suspensos em tubo contendo solução de "tween" 80 e semeou-se uma alíquota de 0,2 ml dessa suspensão bem densa em "pour plate", para 20 ml de MM, ainda líquido à temperatura de 45°C. As placas foram incubadas a 28°C. Após 24 h, gotas de solução de caseína

hidrolisada, vitaminas, extrato de levedura e ácidos nucleicos foram cuidadosamente distribuídos em diferentes locais das placas e estas novamente incubadas. Após sete dias, um crescimento ao redor destas soluções indicava a deficiência do mutante e procurou-se a caracterização de cada um deles. Os mutantes morfológicos foram selecionados entre aqueles que produziram colônias de coloração diferente ou com alterações na morfologia.

3.5. 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 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 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.

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

Suspensões de conídios provenientes das colônias heterocárias 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 freqüências 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.

3.5.2. Análise genética de recombinantes e segregantes

Colônias provenientes de heterocário, crescidas em MC e MM mais requisitos combinados dos parentais, foram transferidas para placas mestras, com MC, na disposição de 26 pontos (5 x 5 + 1).

As colônias oriundas de MC foram repicadas a partir de sua placa mestra com auxílio de multialça para MC, MM, MM mais requisitos dos parentais e MM contendo três dos

requisitos dos dois mutantes (parentais), de tal forma a permitir a detecção de marcas recombinantes.

Recombinantes, produtos de parameiose, selecionados em placas contendo combinações dos requisitos dos parentais, foram analisados quanto à marcas recombinantes. Repicaram-se as colônias, a partir de cada tipo de placa mestra, com o auxílio de multialça, para placas contendo MM mais três dos requisitos dos dois parentais, MC e MM como controle.

3.6. Produção de protoplastos

3.6.1. A partir de micélio

(SILVEIRA & AZEVEDO, 1987 modificado)

Conídios crescidos em MC inclinado a 28°C por 7-8 dias foram suspensos em solução 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 (item 4.2.7) para uma concentração final de 10^6 conídios/ml. O meio assim obtido foi mantido em agitador rotatório (150 rpm) a 28°C por 24-36 horas. Findo este período, o micélio desenvolvido foi filtrado em filtro Buchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado com estabi-

lizador osmótico esterilizado. Determinou-se a seguir, seu peso úmido. Este micélio foi colocado em presença do estabilizador osmótico esterilizado e complexo de enzimas líticas, na proporção de 50 mg de micélio para cada ml de complexo lítico. Agitou-se em agitador recíproco (120 rpm) por 1:30, 2:30 e 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, filtrou-se a suspensão em filtro de gaze, sendo o filtrado retirado e centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, o "pellet" ressuspense em estabilizador osmótico esterilizado e centrifugou-se novamente (4000 rpm; 15 minutos). Repetiu-se esta operação mais 2 vezes.

3.6.2. A partir de tubos germinativos

(GAMBINO et alii, 1984, modificado)

Inocularam-se frascos de erlenmeyer de 150 ml contendo 50 ml de MC líquido para uma concentração final de 10^7 conídios/ml e incubados em agitador rotatório (15 rpm) a 28°C de 16 a 20 horas. Os tubos germinativos foram coletados por centrifugação (3000 rpm) e após se determinar seu peso úmido foi colocado em presença do estabilizador osmótico

esterilizado e complexo lítico. Incubou-se a 28°C por 1 hora em agitador rotatório (100 rpm). Os passos seguintes foram os mesmos descritos no item 3.6.1.

3.6.3. Contagem de protoplastos

Os protoplastos obtidos no item 3.6 ("pellet") foram ressuspensos em estabilizador osmótico (volume fixo) e contados em Câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio ótico.

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

Os protoplastos obtidos foram semeados por "pour plate" em MC e MC + estabilizador osmótico. 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 MC + estabilizador osmótico. A semeadura foi feita em diversas diluições.

3.6.5. Freqüência de regeneração de protoplastos

Calculou-se a freqüência de regeneração, baseando-se no número de protoplastos obtidos e na diferença entre o número de colônias crescidas em MC + estabilizador osmótico e MC, segundo a fórmula:

$$\% \text{ de regeneração} = \frac{a - b}{c} \times 100$$

onde:

a = número de colônias crescidas em meio completo com estabilizador osmótico;

b = número de colônias crescidas em meio completo;

c = número de protoplastos da suspensão.

As avaliações de crescimento foram feitas no 2º e 3º dias de incubação a 28°C, e nunca após o 5º dia, quando o crescimento de prototróficos pode propiciar o sintrofismo.

O cálculo de freqüência de colônias recombinantes foi feito baseando-se no número de colônias de cada tipo recombinante em relação ao total de colônias analisadas para cada meio seletivo.

3.6.6. Fusão de protoplastos

Misturaram-se quantidades iguais de protoplastos das linhagens a serem cruzadas, obtidos segundo o item 3.4.5. Centrifugou-se a suspensão a 2.900 rpm por 10 minutos sendo os protoplastos do precipitado ressuspendido em 1 ml de solução de PEG (item 3.2.19), e incubados a 28°C por 10 min. Adicionaram-se 10 ml da solução estabilizadora (item 3.2.18) e centrifugou-se a 2.900 rpm por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado mais uma vez em solução estabilizadora, centrifugou-se, sendo o precipitado finalmente coletado em 5 ml de estabilizador. Procederam-se diluições apropriadas e colocou-se 0,1 ml em placas de cultura recobrimo com fina camada de meio de cultura.

3.6.7. Obtenção dos produtos de fusão e análise genética

O produto de fusão foi semeado em MC, MC + KCl, MM + KCl e meio mínimo com requisitos combinados dos parentais mais KCl. Avaliaram-se as frequências de recombinantes mediante contagem do número de colônias crescidas em cada tipo de meio e procedeu-se à análise genética.

3.6.8. Coloração de protoplastos (BORGES, 1987)

Coletou-se o precipitado, obtido na filtração dos protoplastos e espalhou-se em lâminas previamente lavadas com água e álcool. Deixou-se secar por 15 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a hidrólise em HCl 1N, a 60°C por 6 (seis) minutos. Lavou-se em água corrente para retirada do excesso de micélio aderido à lâmina. Lavou-se uma vez mais em água destilada e procedeu-se à coloração com Giemsa, diluída de 1:5 em tampão fosfato 0,02M, por 2 (dois) minutos. Lavou-se em água corrente e observou-se ao microscópio ótico.

A estimativa do número de núcleos por protoplastos foi obtida mediante contagem de 100 protoplastos devidamente separados quanto à quantidade de núcleos.

3.7. Extração do DNA mitocondrial de *Metarhizium anisopliae*

As linhagens de *M. anisopliae* foram crescidas 36 horas em meio completo líquido (item 3.2.7) a 28°C em agitação. O micélio obtido foi congelado com nitrogênio líquido e moído em liquidificador até pó bem fino. Foi então suspenso em ETS-1 e centrifugado a 4000 rpm por 10 min a

40°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 12000 rpm por 60 min a 4°C. O precipitado foi suspenso em 8 ml de MTS e tratado com DNase por 30 min a 4°C. Parou-se a digestão acrescentando-se ETS-2. O material foi centrifugado a 18000 rpm por 15 min a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 1 ml de SUC e tratado com TESDS a 65°C por 15 min. Após esse tratamento, adicionou-se NaCl 5M e centrifugou-se a 15000 rpm por um minuto. O sobrenadante foi transferido para proveta gelada e seu volume foi aumentado com TEN. Adicionou-se acetado de sódio a 4N e em seguida isopropanol. O material foi deixado em freezer a 20 graus negativos e, em seguida, foi feita a extração por fenol: clorofórmio de acordo com MANIATIS et alii (1982). O DNA recuperado foi purificado por diálise e congelado em alíquotas em TNE.

3.8. Extração de DNA total de *Metarhizium anisopliae*

3.8.1. Método utilizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília

As linhagens de *M. anisopliae* foram crescidas 36 horas em meio completo líquido (item 3.2.7) a 28°C em agitação. Foi coletado de 0,5 a 1g de micélio (peso úmido) em funil de Büchner acoplado a sistema de vácuo. O micélio

obtido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e triturado em almofariz, mantendo sempre a baixa temperatura (-70°C) até a pulverização do micélio. O pó foi transferido para um bequer de 100 ml contendo previamente 20 ml do tampão TTE a 4°C . Foi bem misturado e centrifugado por 20 minutos, 10.000 rpm a 4°C , utilizando tubos do tipo "Corex" de 30 ml ou 15 ml, rotor SS-34 em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento ressuspenso em 5 ml do tampão de lise (TL) e homogeneizado com um bastão de vidro por 10 minutos a 4°C . Foi acrescentado igual volume de clorofane (item 3.2.24.6) e homogeneizado lentamente durante 10 minutos com intervalos no gelo. Foi a seguir centrifugado a 1500-1800 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Quando necessário, a extração com clorofane foi repetida. Acrescentou-se então 30 microlitros de RNase/ml e deixado a temperatura ambiente por 20 minutos. Nova extração com clorofane foi realizada. Foi adicionado então ao tubo contendo a fase aquosa 200 mM de sal, que poderia ser NaCl ou acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol a 70% gelado (-20°C). Usou-se rotor SS-34 em centrífuga refrigerada a 4°C . O sedimento foi ressuspenso em 300-500 microlitros de tampão TR e estocado em alíquotas a -20°C .

3.8.2. Método de RAEDER & BRODA (1985; modificado)

Após crescimento das linhagens por 36 horas em meio completo líquido a 28°C, o micélio foi coletado em filtro de entertela e lavado com água destilada. A última lavagem foi com 0,5M EDTA. O micélio foi então comprimido para eliminação do excesso de umidade e congelado em nitrogênio líquido. Em seguida foi liofilizado por 8 h. Aproximadamente 50 mg do material liofilizado foi transferido para tubos de Eppendorf e suspenso em 500 µl de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8,5; 250 mM NaCl, 25 mM EDTA e 0,5% SDS) preparado na hora do uso. O material foi homogeneizado com uma ponteira de pipeta automática. Em seguida acrescentaram-se 350 µl de fenol destilado e 150 µl de clorofórmio. Deixou-se extraíndo à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida centrifugado em microcentrífuga a 13000 g. A fase líquida foi então transferida para novo tubo de Eppendorf contendo 15µl de RNase (20 mg/ml) e logo em seguida o DNA foi precipitado adicionando-se 0,6 volume de isopropanol (ou 2,5 V de etanol). O DNA foi ligeiramente centrifugado para separar a fase líquida que foi cuidadosamente retirada. O pellet foi lavado com etanol a 70%, deixado secar à temperatura ambiente e ressuspenso em 100 µl de tampão TE esteril (10 mM Tris HCl pH 8,0; 0,5 mM EDTA).

3.9. Extração de plasmídios em grande escala

(MANIATIS et alii, 1982)

As células de *Escherichia coli*, portadoras de plasmídio foram crescidas em 10 ml de meio de cultura LB, contendo antibiótico ampicilina (100 µl/ml), por período aproximado de 18 horas e sob agitação à 37°C.

Posteriormente, 5 ml desta cultura foi adicionado em 200 ml de meio LB, contendo antibiótico, e incubado à 37°C, 180 rpm por 18 horas.

Após este período, a cultura foi centrifugada à 5000 g por 10 minutos, à 4°C.

Lavou-se o sedimento com 10 ml de salina 0,9% e centrifugou-se novamente à 5000 rpm por 10 minutos.

O sedimento foi ressuspendido em 2,5 ml da solução I (item 3.2.24.1) e agitou-se vigorosamente em agitador Vortex. Posteriormente adicionou-se 2,5 ml da solução I acrescida de lisozima na concentração de 4 mg/ml. Incubou-se por 30 minutos no gelo.

Adicionou-se então, 10 ml da solução II (item 3.2.24.2) e o tubo foi invertido, suavemente, por 7 vezes. Incubou-se novamente por 10 minutos à 0°C.

Posteriormente foi adicionado 7,5 ml da solução III (item 3.2.24.3) misturando-se muito bem, porém suavemente e incubou-se por mais 40 minutos à 0°C.

Centrifugou-se o preparado à 12000 rpm por 15 minutos à 4°C.

Foi adicionado, então, ao sobrenadante igual volume de isopropanol e deixou-se a temperatura ambiente por 5 minutos.

O material foi centrifugado à 12000rpm por 20 minutos à 4°C e o sedimento foi secado à vácuo.

Este sedimento foi ressuspendido em 3 ml de tampão TE e acrescentou-se 30 µl de RNase A. Deixou-se à temperatura ambiente por 30 minutos.

A seguir, foram adicionados 1,5 ml de solução PEG 6000 30% e incubou-se no gelo por mais 30 minutos.

O material foi centrifugado à 12000 rpm por 20 minutos à 4°C e o sedimento foi redissolvido em 1,0 ml de tampão TE-2 (item 3.2.24.4). Em seguida adicionou-se 50 µl de acetato de sódio 2M (pH 7,5) e 50 µl de sarcosil 10%. Agitou-se e a mistura foi transferida para dois tubos Eppendorf.

Posteriormente adicionou-se igual volume de clorofane, agitou-se e centrifugou-se à 12000 rpm por 5 minutos.

Ajustou-se a concentração final de acetato de sódio para 300 mM com acetato de sódio 2 M (pH 7,5). Adicionou-se 2,5 vezes de volume de etanol 100% e deixou-se precipitar durante à noite.

O sedimento foi coletado por centrifugação à 12000 rpm por 15 minutos à 4°C e posteriormente este foi lavado com etanol 70% à -20°C, sem ressuspender e centrifugando-se novamente à 12000 rpm por 2 minutos.

O material foi secado à vácuo, ressuspendido em 100 µl de tampão R e estocado em alíquotas à -20°C.

Foi adicionado às amostras de material tampão de amostra TA (3x) e estas foram aplicadas em gel de agarose 0,7%. Foi utilizada uma amperagem inicial de 20 mA a fim de que as amostras penetrassem no gel e posteriormente esta foi aumentada para 40 mA. O gel foi corado com 1,0 µg/ml de brometo de etídeo dissolvido em tampão TEB (1x) por 20 minutos. A análise deste foi feita sob luz ultravioleta utilizando-se transiluminador.

3.10. Extração de plasmídios em pequena escala

(MANIATIS et alii, 1982)

As culturas de *Escherichia coli* foram crescidas em 3 ml de meio LB contendo antibiótico Kanamicina à 10 µg/ml, à 37°C, 180 rpm por aproximadamente 18 horas.

Centrifugou-se 1,5 ml das culturas por 15 segundos à 12000 g em micro centrífuga.

O sedimento foi ressuspensionado em 100 μ l de solução I (item 3.2.24.1) mantido em banho de gelo por 30 minutos.

A seguir, adicionou-se 200 μ l de solução II (item 3.2.24.2), inverteu-se lentamente o tubo para misturar e o preparado foi mantido no gelo por 5 minutos.

Posteriormente adicionou-se 150 μ l de solução III (item 3.2.24.3). O preparado foi novamente mantido no gelo por 40 minutos.

Centrifugou-se à 12000 g por 5 minutos e recuperou-se o sobrenadante. Adicionou-se a este o dobro de volume de etanol 100%, misturou-se lentamente e incubou-se no freezer durante à noite.

A seguir, centrifugou-se a 12000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado rapidamente e o sedimento foi ressuspensionado em 30 μ l de tampão TE-2 (item 3.2.24.4).

Às amostras foi adicionado tampão amostra TA (3x) (item 3.2.24.2) e a seguir estas foram aplicadas em gel de agarose 0,7%.

3.11. Isolamento de DNA plasmídico em *E. coli* ("MINI-SCREEN") (MANIATIS et alii, 1982; VALARINI, 1989)

Células de *E. coli* HB 101 foram crescidas em LB a 37°C até a fase logarítmica. 1,5 ml da cultura foram transferidos para tubo de microcentrífuga (tipo eppendorf), centrifugados por 30 segundos, e o precipitado ressuspendido em 1 ml de tampão SET (item 3.2.23.14). Após total ressuspensão do precipitado, a suspensão foi centrifugada por 1 minuto e o precipitado novamente ressuspensão em 150 µl de tampão SET. 5 µl de solução RNase foram adicionados e, em seguida, 350 µl de mistura lítica e a solução mantida à temperatura ambiente (a solução tornou-se clareada). A seguir, a referida solução foi mantida em banho de gelo durante 10 minutos. 250 µl de acetato de sódio 3M foram, então, adicionados, misturados por inversão lenta do tubo e a solução incubada por 30 minutos em gelo (SDS e DNA cromossômico desnaturado foram precipitados nesta etapa). A solução foi, em seguida, centrifugada por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para novo tubo. Igual volume de isopropanol foi adicionado, as fases misturadas por inversão do tubo e a solução centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram então invertidos, o isopropanol removido e o precipitado lavado, sem ressuspensão, com

etanol 70%. Em seguida foi promovida nova centrifugação por 5 minutos à temperatura ambiente e o etanol removido. O precipitado foi em seguida, seco a vácuo durante 10 minutos e ressuspenso em 20 μ l de água bidestilada. Quando necessário, a solução de DNA foi concentrada e reextraída em fenol/clorofórmio (item 3.12).

3.12. Extração fenol/clorofórmio (MANIATIS et alii, 1982)

Um volume de fenol saturado foi adicionado e misturado à solução de DNA a ser concentrada. A fase aquosa (superior) foi separada da fase orgânica (fenol) através de centrifugação de 4.000 rpm por 3 minutos à 4°C. Após descarte de fenol, 1 volume de clorofórmio foi adicionado à fase aquosa e a suspensão foi centrifugada por 3 minutos a 4°C. A fase aquosa foi, então, transferida para novo tubo, adicionados 2,5 volumes de etanol resfriado e 0,1 volume de solução acetato de sódio 3M e a mistura mantida a -20°C por 60 minutos. A suspensão foi, em seguida, centrifugada a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C, descartado o sobrenadante e o precipitado de DNA lavado com etanol 70% em agitação. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C, descartado o etanol e o precipitado seco à vácuo por 10 minutos. O precipitado de

DNA assim obtido foi, finalmente, redissolvido em tampão ou água destilada até a concentração desejada.

3.13. Construção do banco genômico de *Metarhizium anisopliae*

3.13.1. Corte do plasmídio CV 13 com a endonuclease Bam HI

Utilizando-se de microtubo tipo eppendorf, sem uso anterior, 10 μ l de solução de DNA do plasmídio CV 13 extraído de *E. coli* HB 101 (item 3.9) foram adicionados a 5,0 μ l da enzima de restrição Bam HI, 10 μ l de tampão React 3 (item 3.2.23.15) de reação da Bam HI e 15 μ l de água bidestilada, totalizando um volume de 50 μ l. Os referidos reagentes foram colocados em ordem ascendente, observando-se que o DNA fosse o último colocado. A mistura de reação foi centrifugada por 5 segundos. Durante as operações, os reagentes foram mantidos em gelo. A digestão foi, então, iniciada através de incubação da mistura a 37°C por 2 horas mantendo-se, em seguida em gelo. O progresso da reação foi monitorado através de eletroforese em gel de agarose (item 3.14). A reação foi interrompida adicionando-se igual volume de tampão TR e clorofane (ítems 3.2.24.5 e 3.2.24.6). O material foi centrifugado a 5000 rpm por 2 minutos e feitas mais 2 extrações com clorofane. Foi recuperada a fase aquosa

e o sal ajustado a 0,3M com NaCl. Foram adicionados 2 volumes de etanol gelado a 100% e deixado precipitar durante a noite. No dia seguinte o material foi centrifugado em microcentrífuga por 3 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 30 μ l de tampão TR (item 3.2.24.5).

3.13.2. Desfosforilação do DNA

Após digestão do plasmídeo CV 13 com Bam HI como no item 3.13.1, foi preparado o sistema de desfosforilação contendo 25 μ l de DNA (CV 13/Bam HI), 13 μ l de tampão CiP 10x (item 3.1.23.16) e 2 μ l da enzima fosfatase alcalina de bezerro (CAP). Após rápida centrifugação o sistema foi mantido a 37°C por 15 minutos e 1,5 minutos a 56°C. Após esse tempo, mais 2 μ l de enzima CAP foram adicionados e o sistema foi então mantido novamente 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 56°C. Foram então adicionados 170 μ l do tampão TES (item 3.2.23.17) ao sistema. Foi então incubado a 68°C por 15 minutos e feitas 2 extrações com clorofane (item 3.2.24.6). Foi ajustado o sal para 0,3M com NaCl e o DNA precipitado com 2,5 volume de etanol gelado a 100%. Foi deixado precipitar a -20°C durante a noite e no dia seguinte o precipitado foi coletado por centrifugação e lavado com etanol 70%. Foi deixado secar em câmara de vácuo e ressuspendendo em 25 μ l de tampão R (item 3.2.24.5).

3.13.3. Ligação do DNA de *Metarhizium anisopliae* com o plasmídeo CV 13

Foi preparado um sistema de ligação contendo 3,2 µg de DNA de *M. anisopliae*; 0,5 µg de plasmídeo cortado (CV 13/Bam), 10 µl de tampão T4 ligase, 1 µl da enzima T4 ligase, 5 µl de água bidestilada perfazendo um total de 100 µl. O sistema foi incubado em banho de água gelo a 16°C durante a noite e no dia seguinte foi feita a paralisação do sistema adicionando-se clorofane e o banco foi precipitado com etanol gelado a 100%, recuperado e estocado em tampão TR (item 3.2.24.5).

3.13.4. Eletroeluição do DNA do gel de agarose (MANIATIS et alii, 1982)

Após a eletroforese em gel de agarose da solução de DNA plasmidial e cromossomal, a banda de interesse foi localizada, com auxílio de transiluminador de UV. A agarose correspondente foi cortada com bisturi flambado e transferida para um saco de diálise pré-aquecido em solução EDTA 0,02 M (neutralização de nucleases contaminantes). A seguir adicionou-se tampão TAE para cobrir todo o gel, evitando a presença de bolhas de ar. O saco foi então amarrado nas extremidades, imerso em tampão TAE dentro da

cuba e a eletroeluição processada a 100V durante uma hora. A polaridade foi, em seguida, revertida por 2 minutos para liberação do DNA aderido à parede do de diálise e a solução DNA retirada com pipeta Pasteur. O pedaço do gel foi re-examinado em UV para certificar se todo DNA havia sido eluído. A solução de DNA assim obtida foi extraída e concentrada tal como no item 3.8.2.

3.14. Eletroforese em gel de agarose ("MINIGEL", MANIATIS et alii, 1982)

Agarose a 1% foi dissolvido em tampão TAE sob aquecimento e, em seguida, adicionado 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio. Após solidificação do gel, o pente foi retirado, permitindo a formação de poços de volume variado (10-40 μl). Amostras de DNA plasmídico e/ou cromossômico, bem como do padrão λ (lambda) digerido com Hind III foram, transferidas para os poços do minigel e este imerso em tampão TAE na cuba. A eletroforese foi a seguir, iniciada e prosseguida por 30-40 minutos a 100 volts (10-15 miliamps). Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para um transiluminador de UV, as bandas de DNA visualizadas e fotografadas.

3.15. Transformação bacteriana pelo método do cloreto de cálcio (MANIATIS et alii, 1982 modificado)

10 ml de LB foram inoculados com 0,1 ml de uma cultura de *E. coli* BH 101 e incubados sob intensa agitação a 37°C durante 3-5 horas para obtenção de uma densidade de aproximadamente $5 \cdot 10^8$ células/ml ($DO_{550} = 0,5$). A densidade foi monitorada em espectrofotômetro a 550 nm. A cultura foi, em seguida resfriada em gelo durante 15 minutos, centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C e, o precipitado de células, ressuscitado em 5 ml (metade do volume original) de uma solução esterilizada e resfriada de $CaCl_2$ 50 mM e Tris HCl 10 mM (pH = 8,0). A suspensão de células foi transferida para um banho de gelo por 15 minutos e, então, centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuscitadas em 667 μ l (1/15 do volume original) da referida solução resfriada de $CaCl_2$ e Tris HCl. A seguir, foram adicionados, em novo tubo, 10 μ l da solução de DNA em tampão TE (Tris 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7), 100 μ l de tampão TE e 200 μ l de suspensão de células competentes (passíveis de transformação) em $CaCl_2$ obtidas acima. A mistura foi levemente agitada e mantida em gelo por 2-3 horas. Após a reação de transformação, o tubo foi transferido para banho-maria a 42°C e mantido, assim, por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 ml

de LB, sendo a suspensão de células, incubada a 37°C por 1 hora sem agitação para permitir recuperação das células e início da expressão da resistência aos antibióticos marcadores (ampicilina e tetraciclina). A suspensão foi, então, centrifugada à temperatura ambiente por 4 minutos e as células ressuspendidas em 100 μ l de água bidestilada, inoculadas em meio seletivo em placas contendo 50 μ g/ml de ampicilina e placas contendo 20 μ g de tetraciclina e incubadas a 37°C durante à noite.

3.16. Transformação bacteriana pelo método de HANAHAN (1986)

A linhagem de *Escherichia coli* HB 101 foi crescida em placa contendo o meio SOB sólido (item 3.2.13) e após 16-20h foram retiradas 2 colônias de aproximadamente 3 mm de diâmetro e transferidas para tubo de ensaio contendo 1 ml de meio SOB (item 3.2.11) e dissolvido bem usando-se "vortex". O conteúdo do tubo foi incubado em erlenmeyer de 1 l contendo 20 ml de meio SOB (item 3.2.11) e incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm até densidade de aproximadamente $4-7 \cdot 10^7$ células/ml. Foram coletados 10 ml da cultura em tubo do tipo "Corex" de 30 ml e incubado em gelo por 15 minutos. Foi então centrifugado a 750-1000g (ou 3000 rpm em rotor SS-34) por 15 minutos a 4°C. O "pellet" obtido foi secado

bem e ressuspensão em 7,0 ml de TFB (item 3.2.24.8) e incubado no gelo de 10-15 minutos. Foi novamente centrifugado a 750-1000 g por 15 minutos a 4°C e o "pellet" após seco foi ressuspensão em 1600 μ l de TFB.

Foram adicionados 56 μ l de DnD, agitado suavemente por vários segundos e incubado no gelo por 20 minutos. Foi adicionado outra alíquota de 56 μ l de DnD, agitado suavemente e deixado no gelo por outros 20 minutos. Transferiram-se alíquotas de 210 μ l para tubos de vidro previamente gelados. Foram adicionados 15 μ l de DNA e os tubos incubados em gelo por 40 minutos. Foi então aplicado o choque térmico a 42°C por um minuto e os tubos retornados ao gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 μ l de meio SOC (item 3.2.12) a cada tubo e incubados a 37°C com agitação moderada por 60 minutos. Foram adicionados mais 100 μ l de meio SOC e a suspensão de células foi plaqueada em meio seletivo contendo ampicilina e tetraciclina.

3.17. Preparo das sondas de DNA

3.17.1. Purificação dos plasmídios com o kit

GENE CLEAN®

Foram utilizadas duas sondas neste trabalho. Uma delas possuía um fragmento de DNA ribossômico de

Neurospora crassa no plasmídeo pMF2 e gentilmente cedida pela Dra. Myriam S. Tigano do CENARGEM/Brasília e a sonda EMFA obtida de fragmentos de DNA de genes que codificam para a via metabólica da peroxidase de *Metarhizium anisopliae* E6 e gentilmente cedida pelo Dr. Augusto Schrank do Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ambas sondas foram purificadas usando o kit GENE CLEAN® comercializado pela GENOSIT BIO101, La Jolla, California 92038, USA.

De acordo com o protocolo do fabricante, a cada sonda foram adicionados 250 μ l de iodeto de sódio e misturado bem. Foram adicionados 2 μ l de "glasmilk" (previamente agitado em vortex por 2 minutos), misturando-se bem, agitando-se com força e esperou-se 5 minutos, agitando-se sempre para não depositar no fundo. Centrifugou-se por 15 segundos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μ l de "NewWash". O pellet foi ressuscitado com pipetador. Centrifugou-se por 15 segundos e o sobrenadante foi cuidadosamente retirado. Foram adicionados 9 μ l de água desmineralizada esterilizada e após ressuspensão do pellet, incubou-se a 56°C por 3 minutos. Centrifugou-se por um minuto. Transferiu-se 7,7 μ l do sobrenadante para novo tubo de Eppendorf e com 1,5 μ l restante correu-se um gel para visualização do procedimento.

3.17.2. Preparo das sondas com uso de marcação não-radiativa do kit CAT 1093657 produzido pela Boehringer Mannheim (modificado)

O tubo contendo 7,5 μ l de DNA purificado foi aquecido a 100°C por 10 minutos para desnaturação do DNA. Preparou-se então a mistura de marcação: 1 μ l do conteúdo do frasco 5 do kit (hexanucleotídeo); 1 μ l do frasco 6 que é uma mistura de polinucleotídeos com a uracila marcada e 0,5 μ l da solução contendo o fragmento de Klenow da DNA polimerase I (frasco 7). Adicionou-se ao tubo contendo o plasmídeo purificado e deixou-se a 37°C de 3 a 16 horas. A reação foi interrompida adicionando-se 75 μ l de etanol por tubo e em seguida para cada sonda adicionou-se 24,5 μ l da solução que continha 20 μ l da solução de SSDNA de Salmão (contendo 10 mg/ml), 2,5 μ l de solução 4M de cloreto de lítio e 2,0 μ l da solução de 0,5M EDTA. Deixou-se a -20°C por 30 minutos e centrifugou-se por 10 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e o pellet lavado com etanol 70%. Centrifugou-se por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante e deixando-se secar levemente à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 100 μ l de tampão TE.

3.18. Transferência do DNA para membrana de nylon (Southern blotting) e hibridização com as sondas

3.18.1. Transferência

O DNA total de 20 linhagens de *M. anisopliae* foi cortado com as enzimas EcoRI e Hind III e migrados em gel de agarose a 1% medindo 19x19 cm. O gel foi então cuidadosamente colocado na cuba de transferência (VacuGene, Pharmacia LKB) previamente montada de modo que colorisse totalmente a membrana de nylon (Hybond Amersham) colocada no fundo da cuba e foram vedadas com agarose todos pocinhos de amostra de modo a não interferir na transferência. Sobre o gel foi vertida uma solução de HCl 0,25 N e ligado o vácuo. Após 20 minutos essa solução foi aspirada e sobre o gel foi vertido o tampão de desnaturação contendo 0,5 M NaOH e 1,5 M NaCl. Após 20 minutos a solução foi aspirada e o gel recoberto com o tampão de neutralização que continha 1M de acetado de amônia. Após 1 hora esse tampão foi retirado e a membrana de nylon deixada secar à temperatura ambiente e exposta 1 minuto à luz UV (254 nm) para fixar o DNA.

3.18.2. Hibridização

A membrana de nylon foi cortada ao meio gerando 2 pedaços de 9,5x10 cm e colocados dentro de sacos

plásticos para pré-hibridizar em 10 ml de solução de hibridização que contém 5xSSX, 5% blocking reagent (frasco 11 do kit de marcação Boehringer Mannheim), 0,1% sarkosyl, 0,02% SDS e 50% de formamida desionizada. Esta solução foi previamente aquecida por 1 hora a 50-60°C para completar dissolução de seus componentes. Os sacos plásticos foram vedados e colocados em banho-maria a 68°C por 1 hora.

As sondas foram desnaturadas a 100°C por 10 minutos e imediatamente transferidos para o gelo. Retirada a solução de pré-hibridização do filtro, foram vertidos 10 ml de solução de hibridização à qual foi previamente adicionada a sonda desnaturada. O saco foi novamente selado e incubado de 16 a 20 horas a 42°C com agitação. Seguiram-se as séries de lavagem dos filtros.

3.18.3. Lavagem dos filtros, detecção imunológica e revelação

Na 1^a série de lavagem os filtros foram colocados em cuba coletiva contendo 50 ml/filtro de solução 2xSSC, 0,1% SDS por 5 minutos à temperatura ambiente. Repetida a operação, os dois filtros foram colocados juntos (com a face contendo DNA para fora) dentro de novo saco plástico para a 2^a série de lavagem e verteu-se 75 ml de

solução 0,2xSSC 0,1% SDS, deixando-se a 65°C por 20 minutos. A operação foi repetida.

Para detecção imunológica, foram adicionados aos filtros 50 ml por filtro de tampão I (kit de marcação, 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) mais 0,5% de "blocking reagent" e deixados à temperatura ambiente por 30 min. Após se retirar essa solução, adicionou-se 50 ml de solução contendo tampão 1, "blocking reagent" e 4 µl/filtro da solução de anticorpo (frasco B do kit). Foram colocados os 2 filtros num saco e deixados a temperatura ambiente por 30 minutos.

Após esse tempo, os sacos foram abertos e os filtros colocados em cuba coletiva contendo 100 ml por filtro de tampão I e deixados a 15 minutos à temperatura ambiente. Repetiu-se esta operação. Desprezou-se a solução e adicionaram-se 20 ml por filtro de tampão 3 (100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) na cuba coletiva deixando-se por 2 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo a solução foi desprezada e adicionou-se o AMPPD na proporção de 1320 µl em 120 ml de tampão 3.

O AMPPD - disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-tricyclo-[3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) phenil phosphate - é uma substância luminescente produzida pela TROPIX, Inc., Massachussetts, USA, que se liga às sondas hibridizadas e que emite radiação luminosa.

Retirado o AMPPD o filtro foi colocado em saco plástico, vedado e exposto ao filme KODAK-BRAF-QA-S (para raio-X médico de 20,3 x 25,4 cm) por 4 horas e 30 minutos. O filme foi então revelado (revelador KODAK GBX, 200 ml), lavado, fixado (fixador KODAK GBX, 200 ml), lavado em água corrente e deixado secar.

3.19. Agrupamento de linhagens segundo taxonomia numérica

3.19.1. Agrupamento segundo padrões isoenzimáticos de esterases

Foi efetuada análise de agrupamento (SNEATH & SOKAL, 1973) calculando-se o coeficiente de JACCARD e utilizando-se o algoritmo UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average).

3.19.2. Agrupamento segundo padrões eletroforéticos de isoenzimas e DNA mitocondrial tratado com enzimas de restrição

As 10 linhagens selvagens foram referidas como unidades taxonômicas operacionais (OTU), de acordo com

uma lista de presenças ou ausências de bandas obtidas em análises eletroforéticas, totalizando 23 variáveis. Estas 23 variáveis representam o padrão total de bandas da análise conjunta dos padrões isoenzimáticos e de restrição do DNA mitocondrial. Usaram-se como medidas de semelhança o coeficiente de Jaccard e o Simple Matching e as distâncias genéticas de Balakrisman & Sanghri e de Nei, segundo SNEATH & SOKAL (1973).

3.19.3. Agrupamento segundo a produção de exoenzimas e de produção e regeneração de protoplastos

Outras 23 variáveis representadas pelas medidas de halos de produção de exoenzimas (amilase, lipase, protease, produção de proteases em presença de 0,1 e 0,2 mg/ml de CaCl_2 , produção de exoenzimas após irradiação das linhagens por luz ultravioleta por 2 e 4 minutos), produção e regeneração de protoplastos em 3 estabilizadores osmóticos diferentes e a partir de hifas e tubos germinativos, foram analisadas em conjunto.

As 10 linhagens também foram consideradas OTUs utilizando-se o coeficiente Simple Matching e as distâncias genéticas de Balakrisman & Sanghri e de Nei, segundo SNEATH & SOKAL (1973).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Porcentagem de sobrevivência à luz ultra-violeta

Como primeiro parâmetro para se medir a variabilidade entre as linhagens analisadas, suspensões de conídios das linhagens prototróficas foram irradiadas conforme descrito no item 3.

Os resultados das porcentagens de conídios sobreviventes nos diferentes tempos de irradiação encontram-se na Tabela 2.

Pode-se observar através das Figuras 1 a 10, que dentre as linhagens selvagens há grande variabilidade em relação à resistência de conídios à irradiação com luz UV.

As linhagens E6, E9, M5 mostraram-se mais resistentes enquanto que as linhagens Major, A19, A1 e A4 mostraram-se mais sensíveis.

Tabela 2. Porcentagens de sobrevivência a diferentes tempos de irradiação UV de conídios das linhagens prototróficas de *Meatarhizium anisopliae*.

Linhagens	Porcentagens de sobrevivência						
	Tempo						
	0	1	2	4	6	8	16
A4	100	55,20	1,1	0,30	0,20	0,14	0,01
A19	100	61,0	0,98	0,96	0,95	0,02	0,001
A1	100	30,0	10,53	1,08	1,08	1,0	-
E6	100	95,41	80,02	71,41	69,84	0,98	0,06
E9	100	96,00	52,14	31,01	30,16	0,70	0,10
M	100	55,47	20,18	6,31	6,01	0,68	0,001
M5	100	68,53	53,01	4,10	3,8	0,05	0,002
MT	100	78,54	8,47	2,15	2,13	0,001	0,0
Major	100	35,16	8,0	1,23	1,0	0,01	0,0
RJ	100	46,24	9,0	0,18	0,10	0,08	0,001

FRIGO (1983) obteve dados semelhantes para a linhagem A19 entretanto para as linhagens E6 e E9 há variabilidade nos dados de literatura como vistos em SILVEIRA (1983), MESSIAS (1979) e SANTOS (1978). LEITE (1987), analisando a resistência de diferentes linhagens à luz UV observou que em duas delas, uma isolada na Polônia e outra na Bahia, a sensibilidade foi muito grande, refletindo-se

numa baixa esporulação e na indução de um estado de senilidade irreversível, o que impediu a realização de bioensaios.

A fonte de irradiação tem um grande efeito sobre os resultados pois dependendo da idade da fonte haverá maior ou menor resistência dos conídios à irradiação.

A literatura frequentemente apresenta dados de irradiação com luz ultravioleta (BAGALHI, 1987; LEITE, 1987; LUNA, 1985; FRIGO, 1983; CORREA, 1983; PIZZIRANI, 1977) e esses dados mostram que a luz ultravioleta é um dos mais eficientes e seguros métodos de se obter mutantes em fungos filamentosos.

Outro aspecto a ser observado é que fungos entomopatogênicos sendo sensíveis à radiação ultra-violeta podem ter aí o seu fracasso como biocontroladores. O espectro ultravioleta da luz solar na maior parte das vezes é negligenciado e uma boa linhagem biocontroladora sendo sensível à luz UV quando levada a campo resulta num fracasso.

VALLE (1984) analisou a influência da luz de diversas cores sobre o crescimento e esporulação de *Metarhizium anisopliae* e observou que a luz UV visível estimulam a esporulação e que a luz visível diminui a viabilidade de conídios, sendo que a maior produção destes é devido à interação linhagem x meio de cultura x fonte de luz.

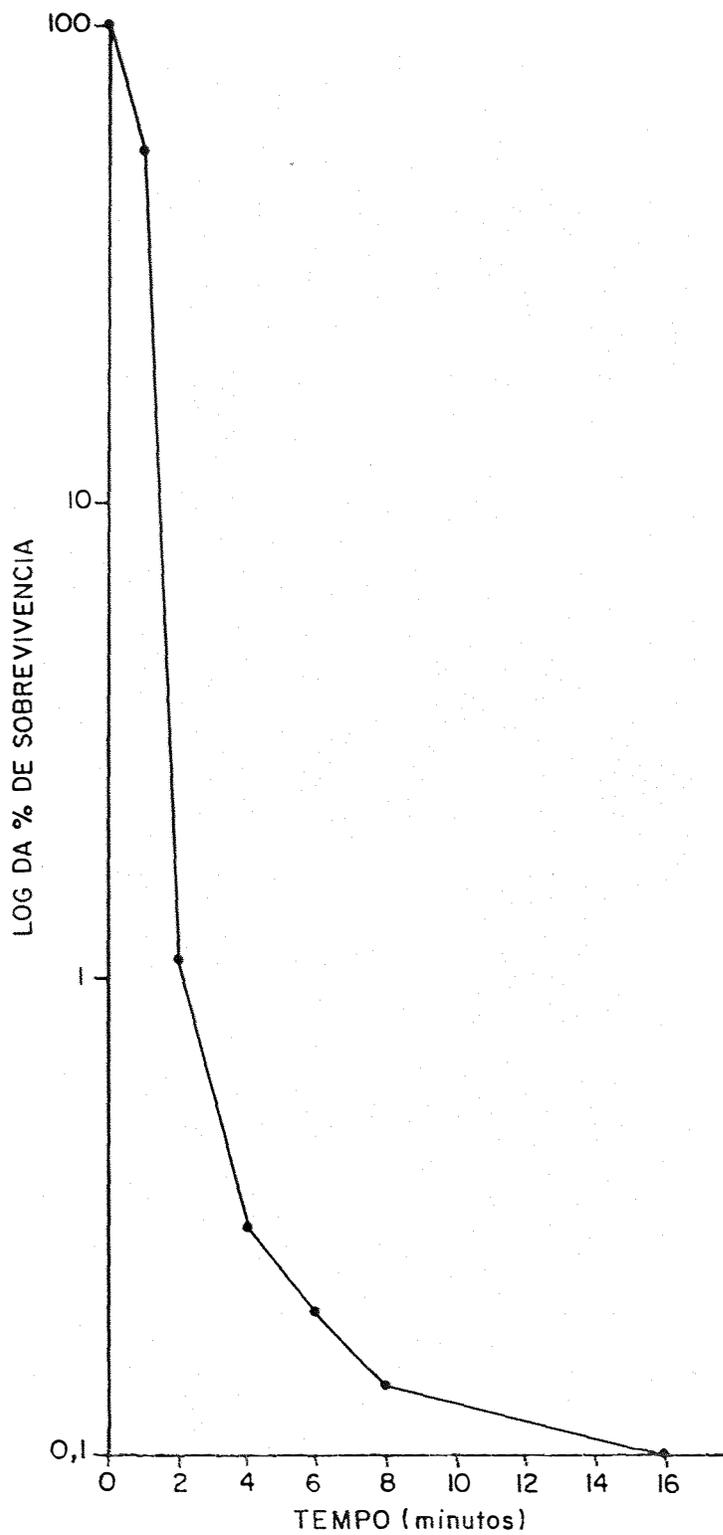


Figura 1. Curva de sobrevivência da linhagem A4 à luz ultravioleta.

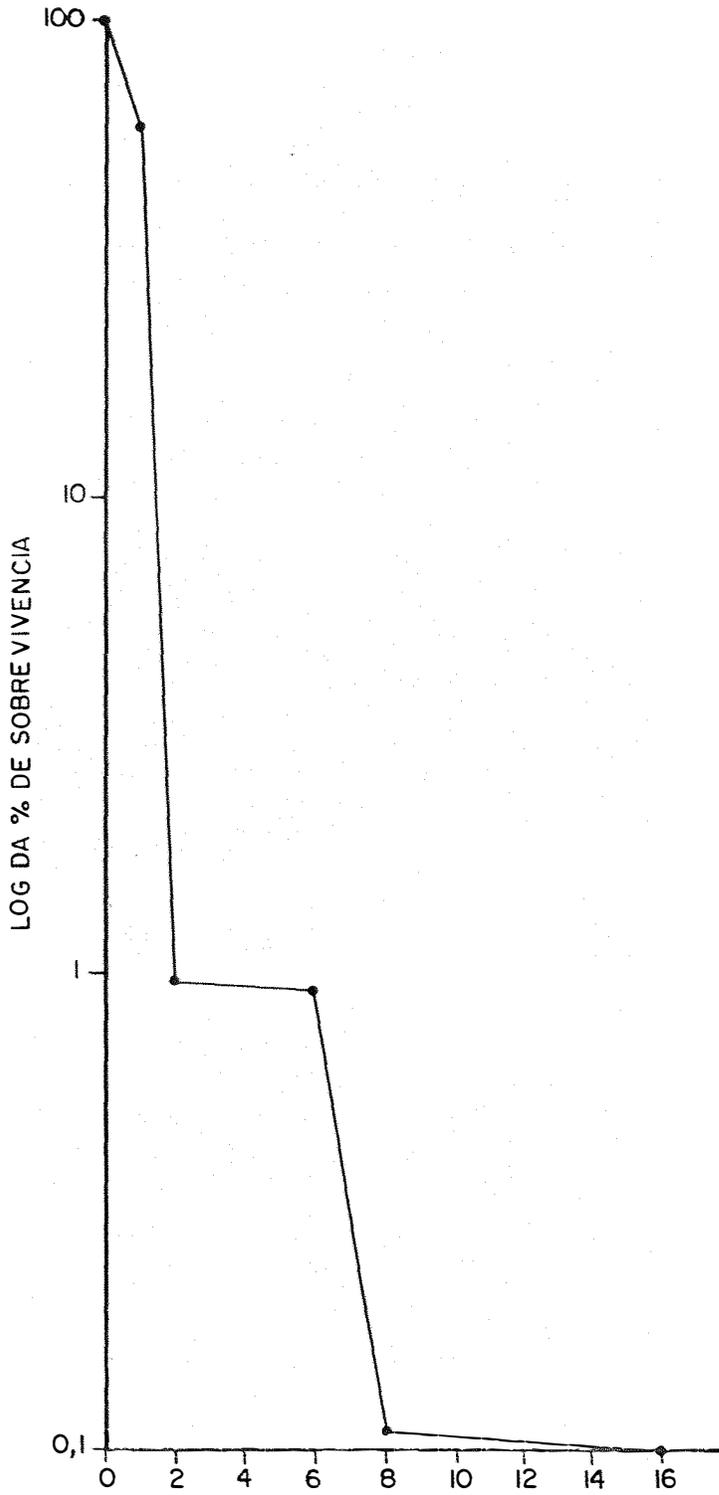


Figura 2. Curva de sobrevivência da linhagem A19 à luz ultravioleta.

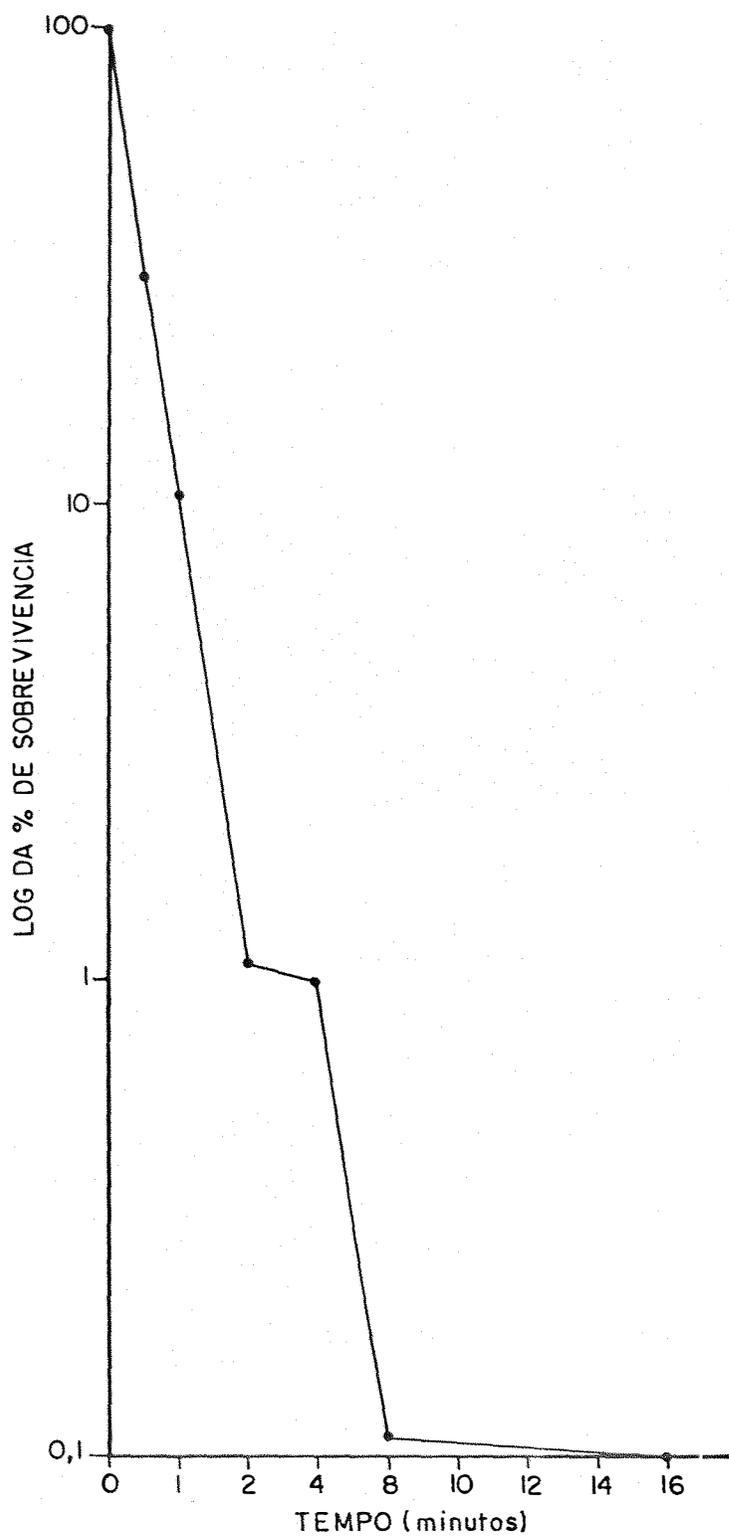


Figura 3. Curva de sobrevivência da linhagem A_e à luz ultravioleta.

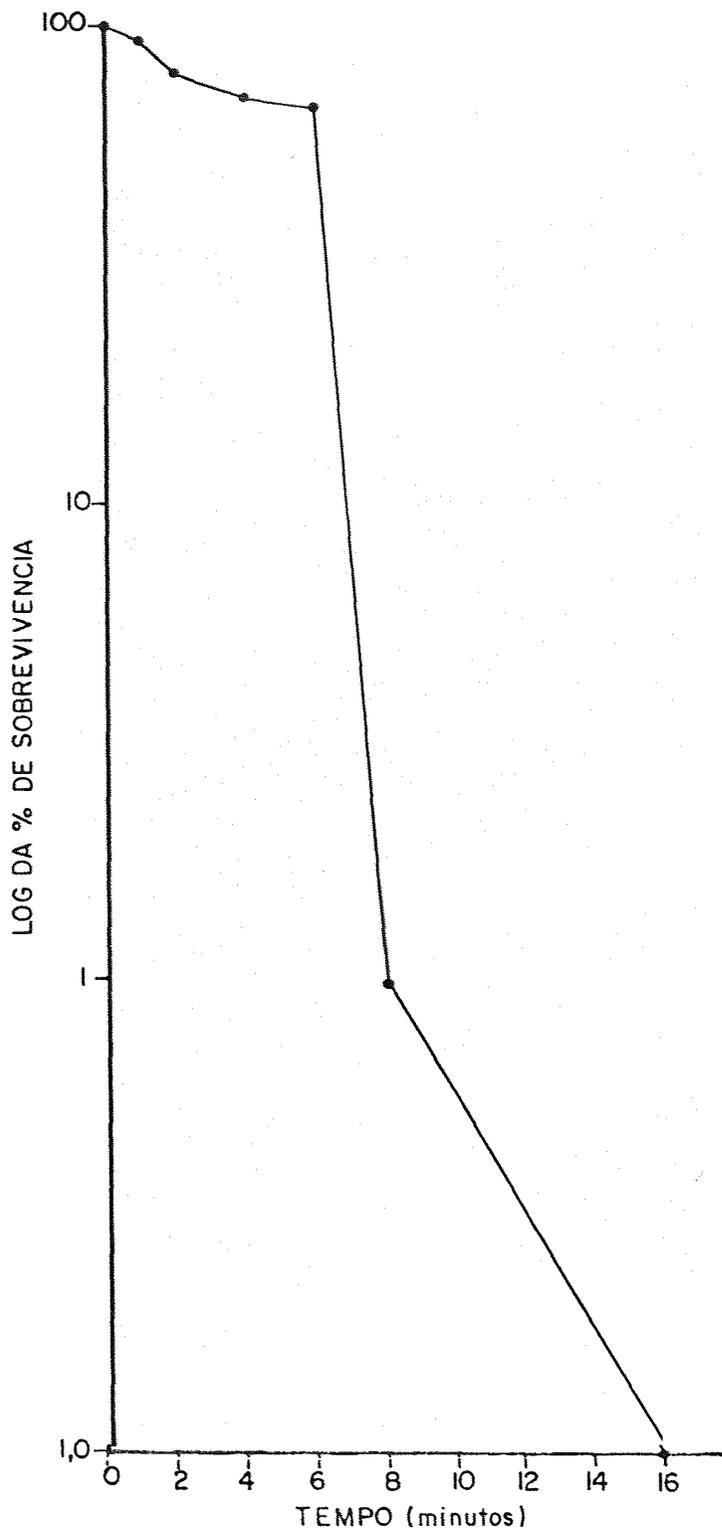


Figura 4. Curva de sobrevivência da linhagem E6 à luz ultravioleta.

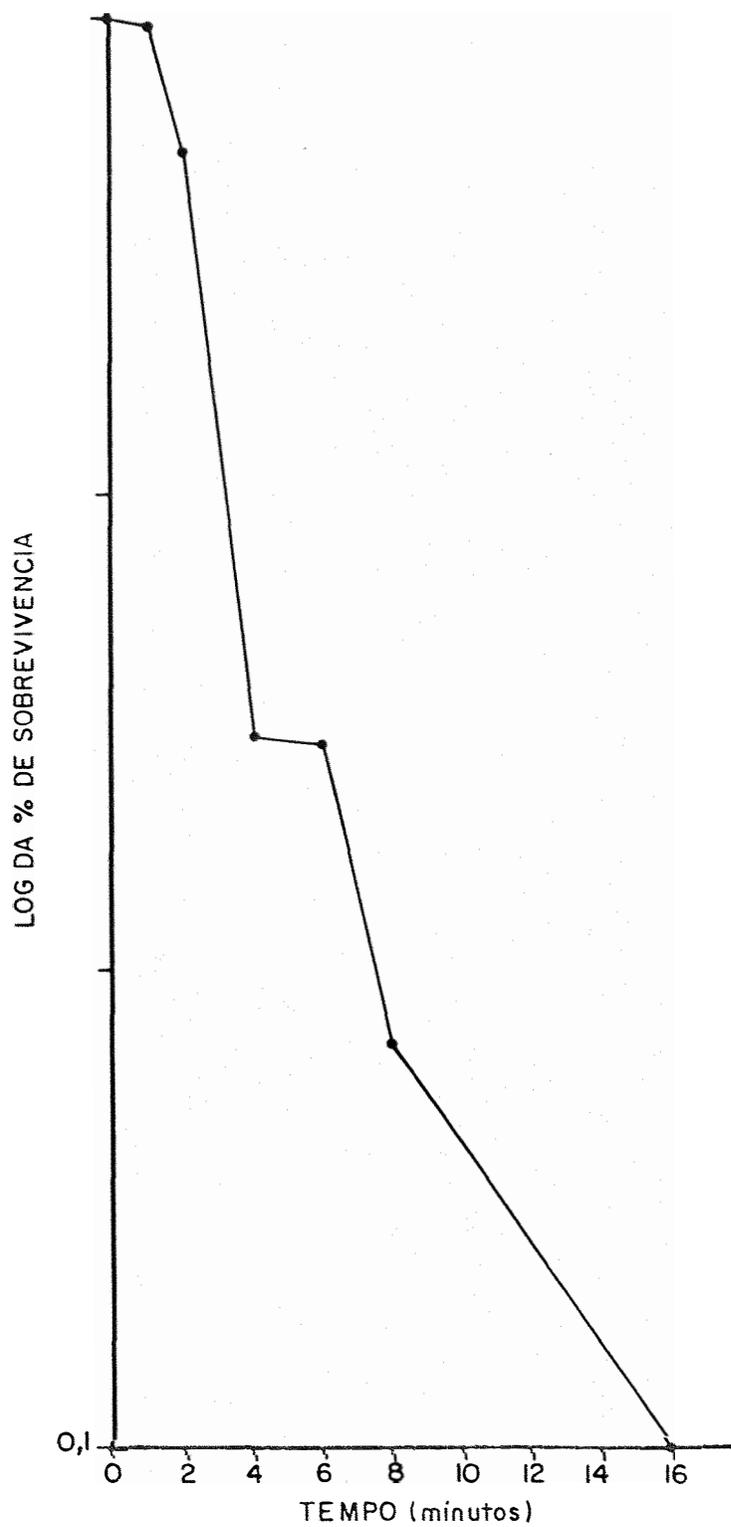


Figura 5. Curva de sobrevivência da linhagem E9 à luz ultravioleta.

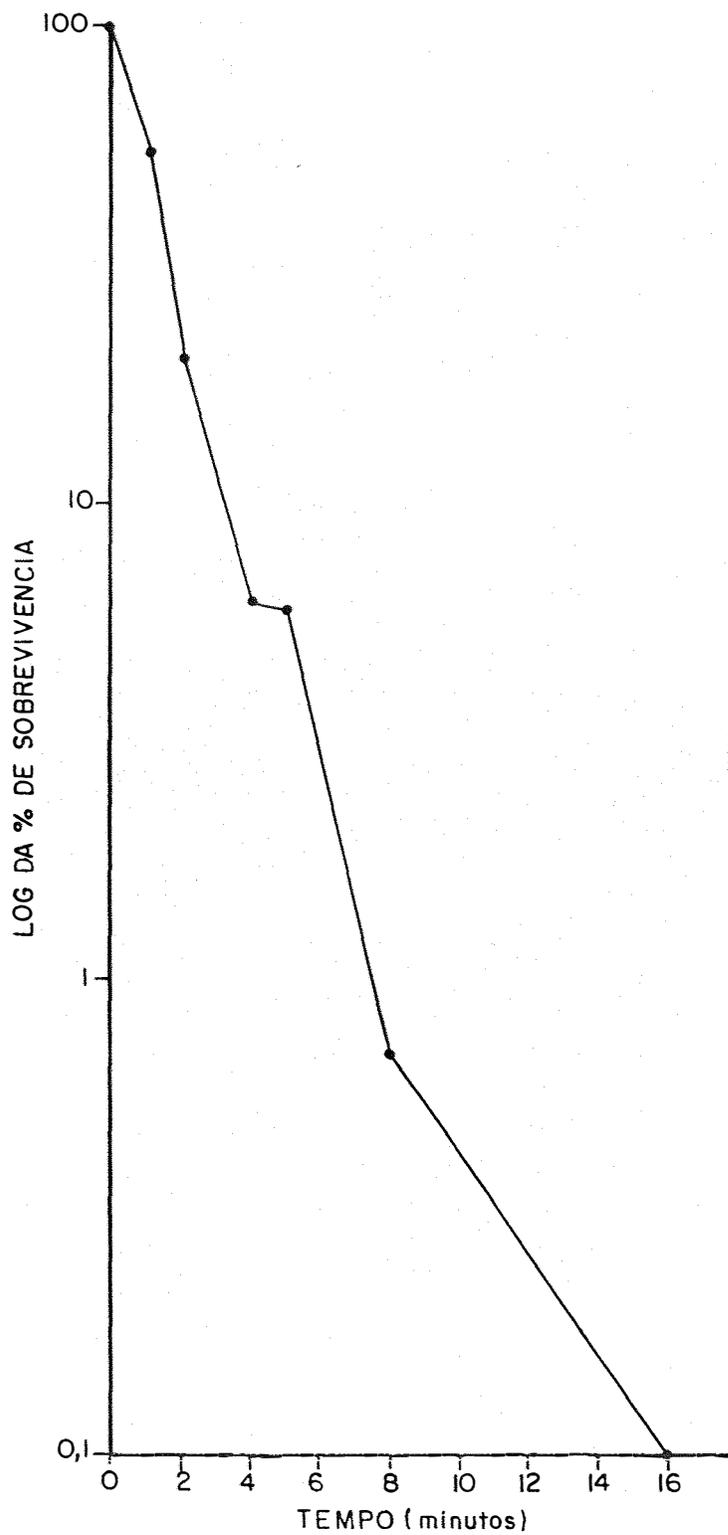


Figura 6. Curva de sobrevivência da linhagem M à luz ultravioleta.

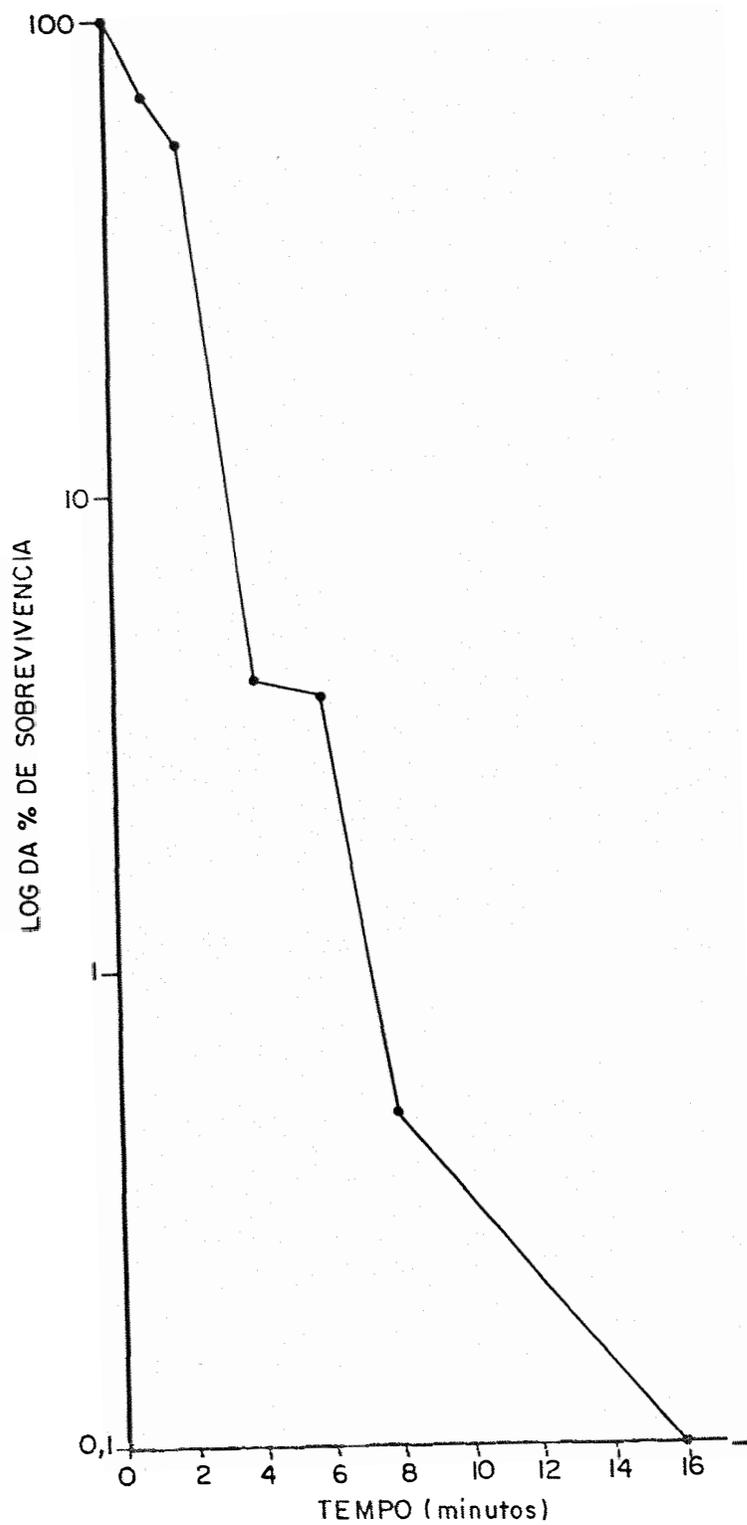


Figura 7. Curva de sobrevivência da linhagem M5 à luz ultravioleta.

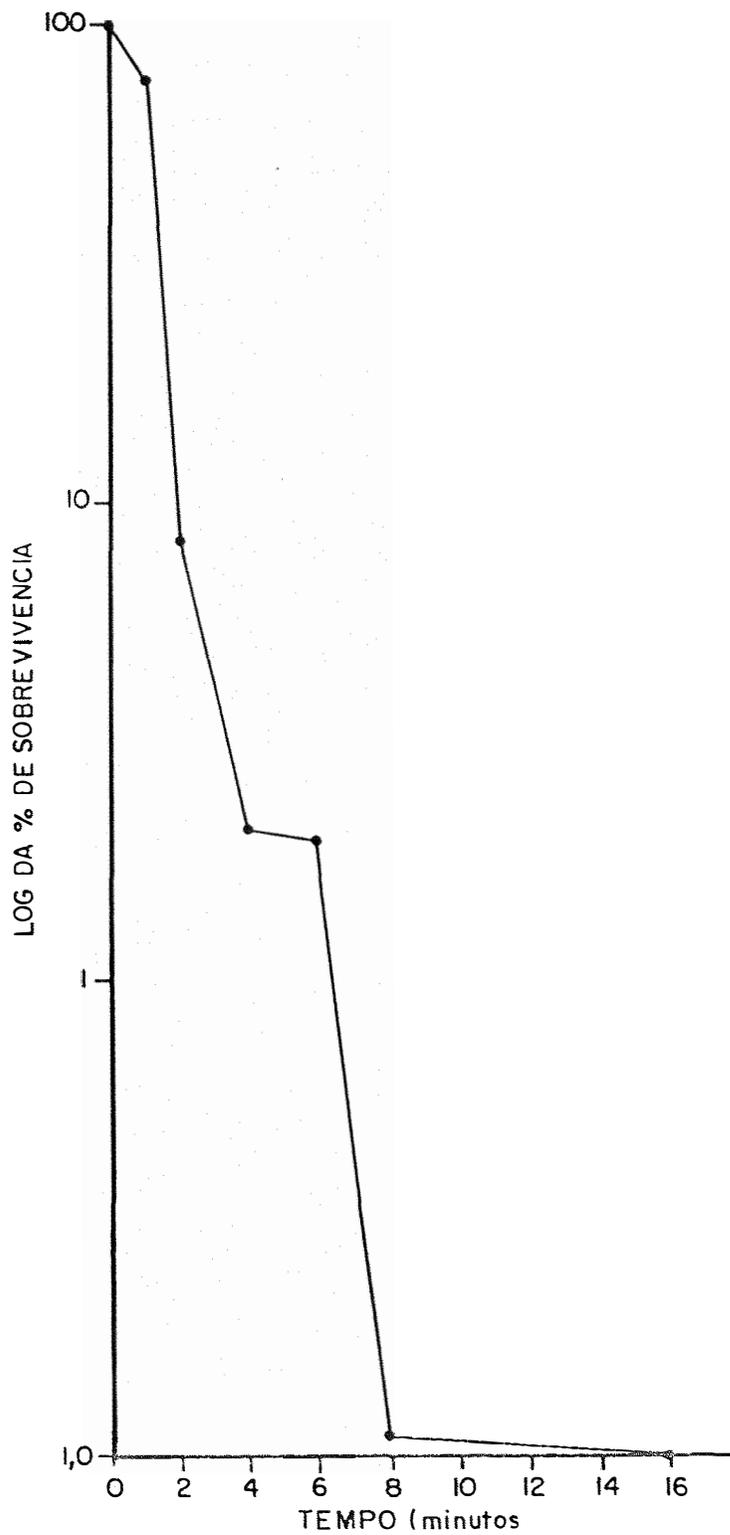


Figura 8. Curva de sobrevivência da linhagem MT à luz ultravioleta.

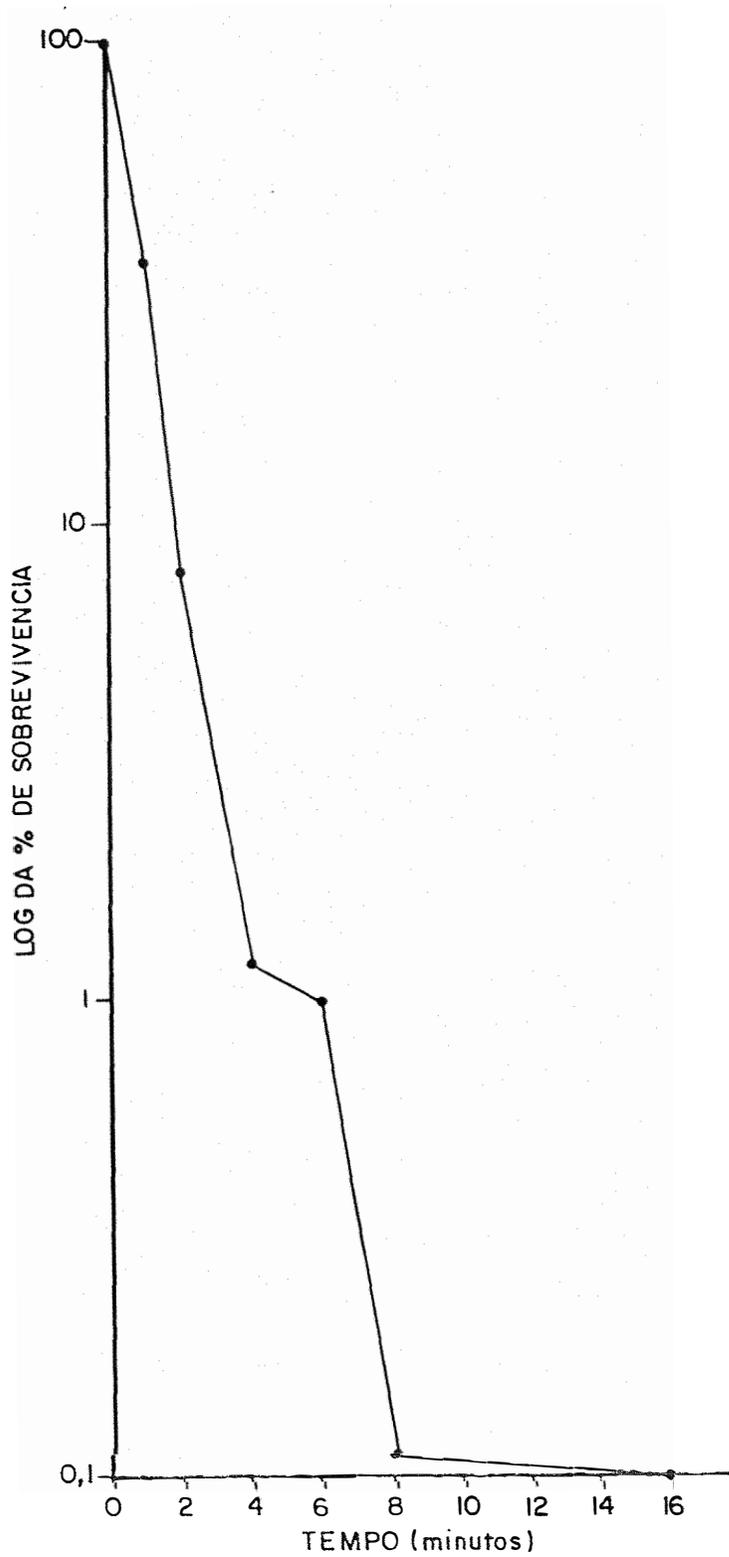


Figura 9. Curva de sobrevivência da linhagem Major à luz ultravioleta.

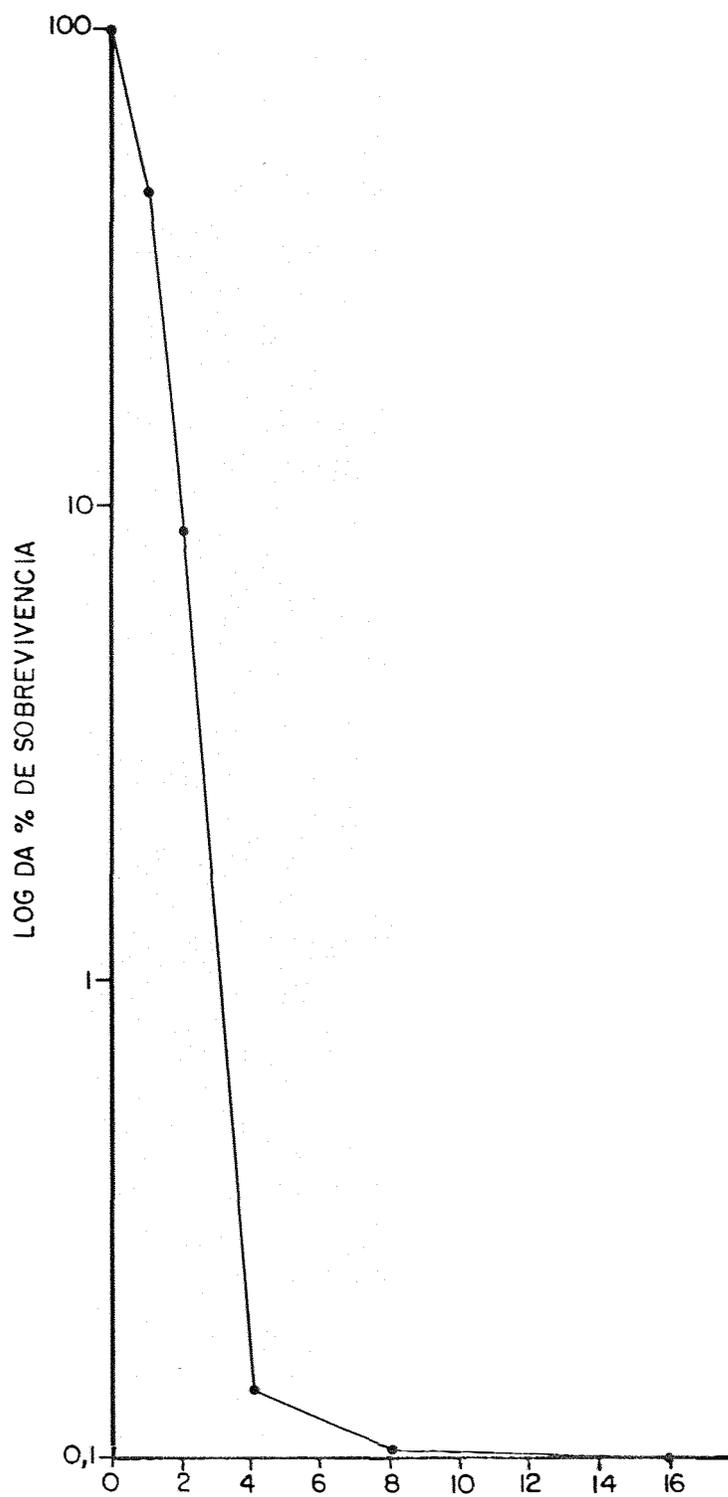


Figura 10. Curva de sobrevivência da linhagem RJ à luz ultravioleta.

4.2. Obtenção de mutantes

Outro parâmetro indicador de variabilidade entre as linhagens, foi analisar o uso da luz UV como fator de obtenção de mutantes.

Baseando-se nas curvas de sobrevivência obtidas para as linhagens prototróficas, conídios dessas linhagens (10^6 conídios/ml) foram submetidos a irradiação com luz UV a nível de 5% de sobrevivência para obtenção de mutantes.

Como pode se observar na Tabela 3 e Figura 11, a luz UV se mostrou eficiente na obtenção de mutantes morfológicos. A esse método, onde irradiamos o material e observamos diretamente o possível surgimento de mutantes damos o nome de isolamento total.

Através do isolamento total as 10 linhagens prototróficas utilizadas foram eficientes em produzir pelo menos um mutante morfológico, sendo que para cada linhagem foram ensaiadas em média 500 colônias.

A linhagem MT foi a que maior número apresentou- 17, sendo que dois deles eram compacto, isto é, apresentavam crescimento radial da colônia reduzido.

À semelhança do que já observado por SILVEIRA (1983), FRIGO (1983) e BAGALHI (1987) duas classes de coloração de conídios podem ser mais encontradas: uma de conídios amarelados e outra de conídios acinzentados, que

SILVEIRA (1983) e BAGALHI (1987) também chamaram de conídios violeta e que há maior uniformidade de coloração entre os mutantes de conídios acinzentados do que entre os conídios amarelados, que podem variar do amarelo claro, a um amarelo esverdeado.

Tabela 3. Mutantes morfológicos obtidos por irradiação das linhagens com luz UV.

Linhagem	Número	Fenótipo
A4	1	verde claro *
A19	-	-
A1	2	amarelados
E6	2	amarelados
E9	3	compactos, esverdeados
M	1	amarelado
M5	1	amarelo
MT	17	2 acinzentados, compactos 15 amarelos
Major	1	verde claro *
RJ	-	-

* Este mutante reverteu à coloração original após a 1a. repicagem.

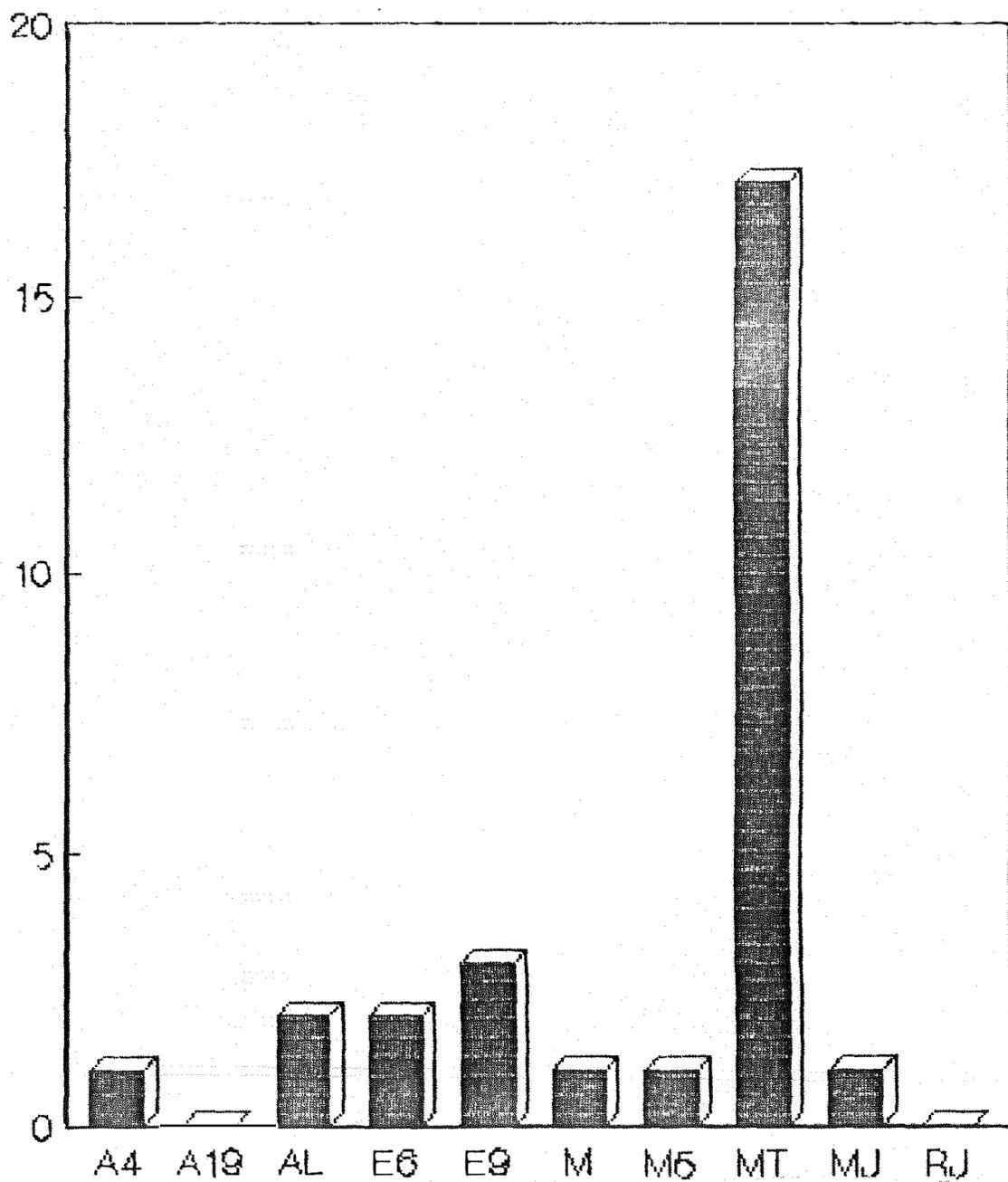


Figura 11. Número de mutantes morfológicos obtidos pelo tratamento de 10 linhagens selvagens de *M. anisopliae* com luz UV.

Observou-se também que a idade da colônia influenciou na variação da coloração. Colônias amarelas quando novas apresentavam um tom bem claro de coloração. À medida que envelheciam iam se escurecendo, chegando próximo de um verde-claro sujo. Colônias bastante velhas, com mais de vinte dias de crescimento, chegavam a apresentar coloração próxima de um cinza forte.

A composição do meio de cultura e valor de pH também foram fatores que alteraram a coloração das colônias, sendo que tanto as prototróficas quanto mutantes sempre voltavam ao que se estipulou ser coloração normal, quando a composição e pH do meio de cultura voltavam aos padrões do meio completo (MC) de Pontecorvo et alii (item 3.2.2).

Os 17 mutantes morfológicos obtidos da linhagem MT foram ensaiados para se tentar induzir uma marca auxotrófica porém em 250 colônias ensaiadas não se obteve nenhum mutante auxotrófico.

A característica comum a todos os mutantes obtidos foi apresentarem um crescimento bastante lento em relação às linhagens prototróficas e os 2 mutantes compactos obtidos atingiram 2 cm de diâmetro de colônia após 18 dias de crescimento. Estes mutantes, de conídios acinzentados, serão objeto de análises futuras, na tentativa de se conhecer a origem de seu aspecto tão diferenciado.

4.3. Obtenção e regeneração de protoplastos

A obtenção de regeneração de protoplastos são outros fatores de medida de variabilidade entre as linhagens prototróficas de *Metarhizium anisopliae*.

Nas Tabelas 4 e 5 estão os resultados encontrados para protoplastos obtidos a partir de micélio e a partir de tubos germinativos.

Observa-se que há grande variabilidade tanto na produção quanto na regeneração de protoplastos nos diferentes estabilizadores ensaiados que há variabilidade entre linhagens, como se pode observar nas Figuras 12, 13, 14 e 15.

DAVIS (1985) observa que vários tipos de estabilizadores osmóticos têm sido usados para isolamento de protoplastos de fungos filamentosos, incluindo sais inorgânicos e açúcares.

Dependendo do organismo tanto o tipo quanto a concentração do estabilizador osmótico a influência a produção e estabilidade de protoplastos.

Sais inorgânicos têm apresentado os melhores resultados tanto na produção quanto estabilidade de protoplastos de fungos filamentosos .

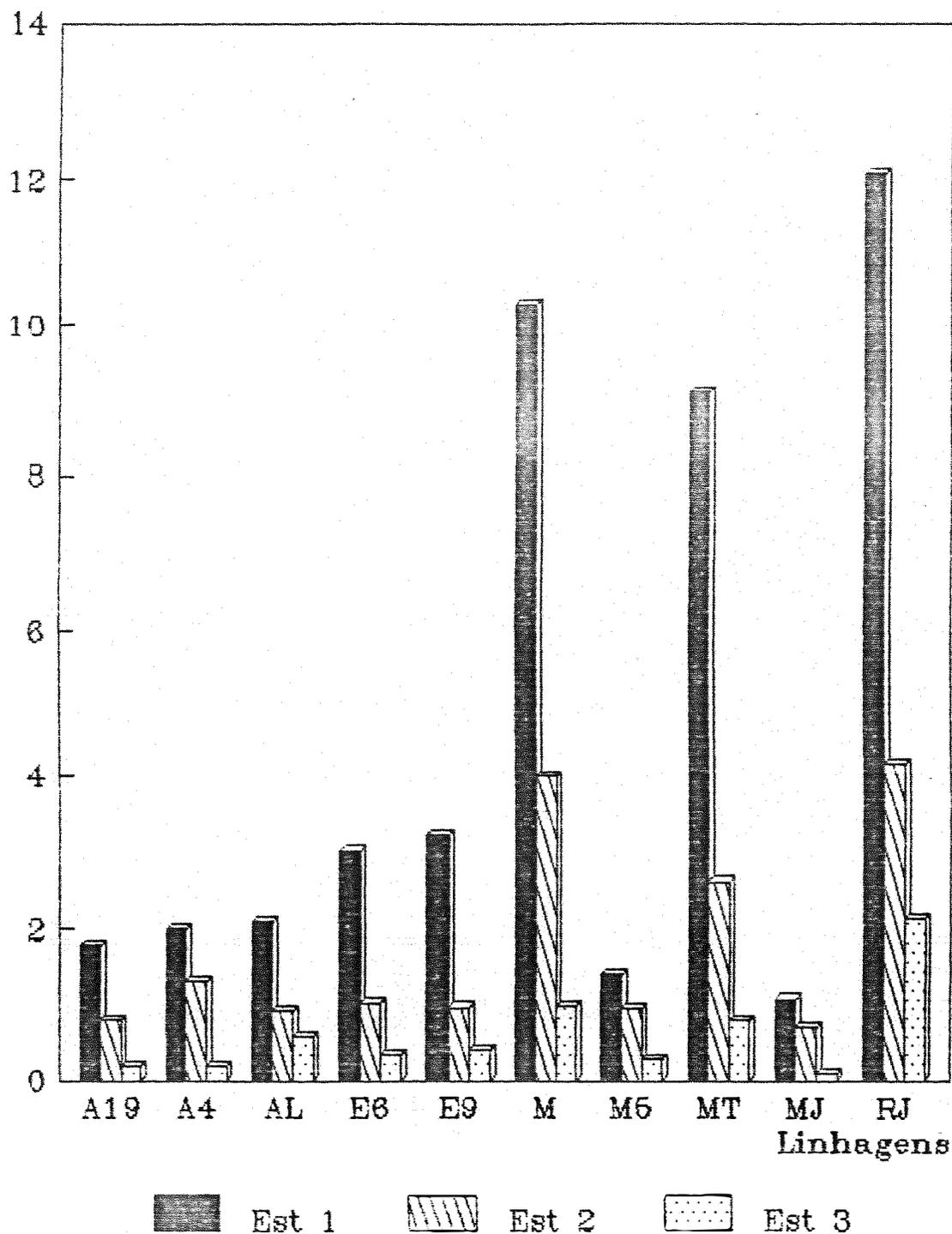
Tabela 4. Número de protoplastos obtidos a partir de micélio nos diferentes estabilizadores e respectivas porcentagens de regeneração em MC mais o estabilizador em análise.

Linhagem	Nº de protoplastos (10^6 /ml)			% de regeneração em MC +		
	Est.1	Est.2	Est.3	Est.1	Est.2	Est.3
A19	2,1	1,0	0,8	2,0	1,4	0,1
A4	3,2	1,1	0,6	2,1	1,8	0,3
A1	3,82	0,9	0,5	1,8	0,6	0,1
E6	4,01	1,0	0,5	0,9	2,0	0,14
E9	14,0	2,0	0,6	2,1	2,5	0,12
M	15,0	1,1	0,3	0,82	0,3	0,10
M5	3,3	0,4	0,1	1,6	0,18	0,10
MT	11,0	5,0	0,6	15,0	3,0	0,8
Major	2,0	0,4	0,01	1,1	0,4	0,001
RJ	21,0	10,0	1,0	12,0	2,7	0,28

Est 1 = 0,7 M KCl

Est 2 = 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Est 3 = 1,2 M Sorbitol



Est 1: 0,7 M KCl

Est 2: 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Est 3: 1,2 M Sorbitol

Figura 12. Número de protoplastos obtidos a partir de micélio em 3 estabilizadores osmóticos diferentes.

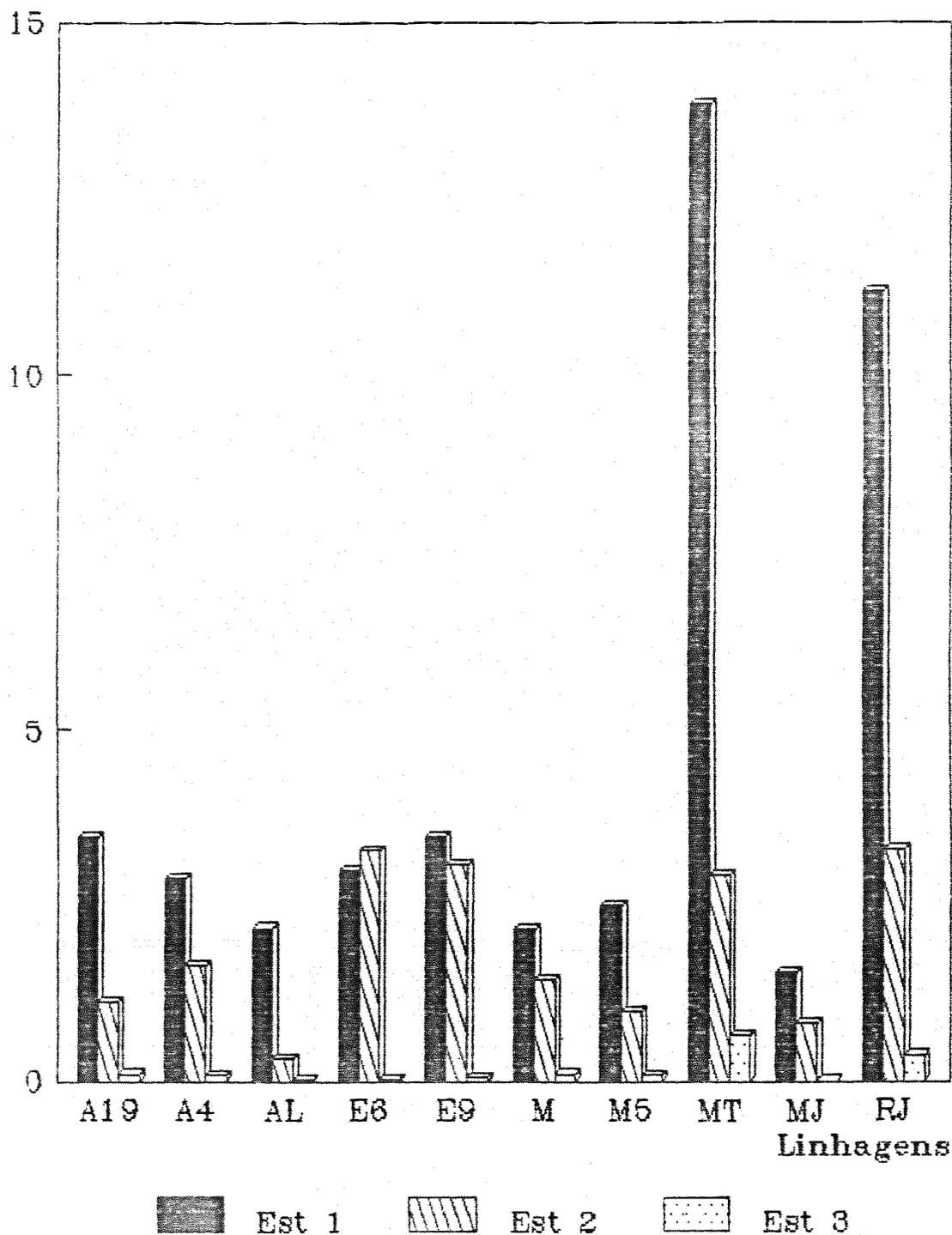


Figura 13. Regeneração de protoplastos obtidos de micélio em estabilizadores osmóticos diferentes.

Tabela 5. Número de protoplastos obtidos de tubos germinativos em diferentes estabilizadores e respectivas porcentagens de regeneração em MC + o estabilizador.

Linhagem	Nº de protoplastos (10^6 /ml)			% de regeneração em MC +		
	Est.1	Est.2	Est.3	Est.1	Est.2	Est.3
A19	1,8	0,82	0,2	3,4	1,1	0,1
A4	2,0	1,34	0,21	2,8	1,6	0,09
A1	2,1	0,94	0,61	2,1	0,32	0,01
E6	3,0	1,04	0,36	2,9	3,2	0,011
E9	3,2	0,98	0,42	3,4	3,0	0,04
M	10,3	4,0	1,0	2,08	1,4	0,1
M5	1,42	0,96	0,3	2,4	0,97	0,092
MT	9,1	2,6	0,82	13,84	2,83	0,64
Major	1,1	0,73	0,12	1,5	0,8	0,001
RJ	12,1	4,15	2,13	11,25	3,21	0,36

Est.1 = 0,7 M KCl

Est.2 = 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Est.3 = 1,2 M Sorbitol

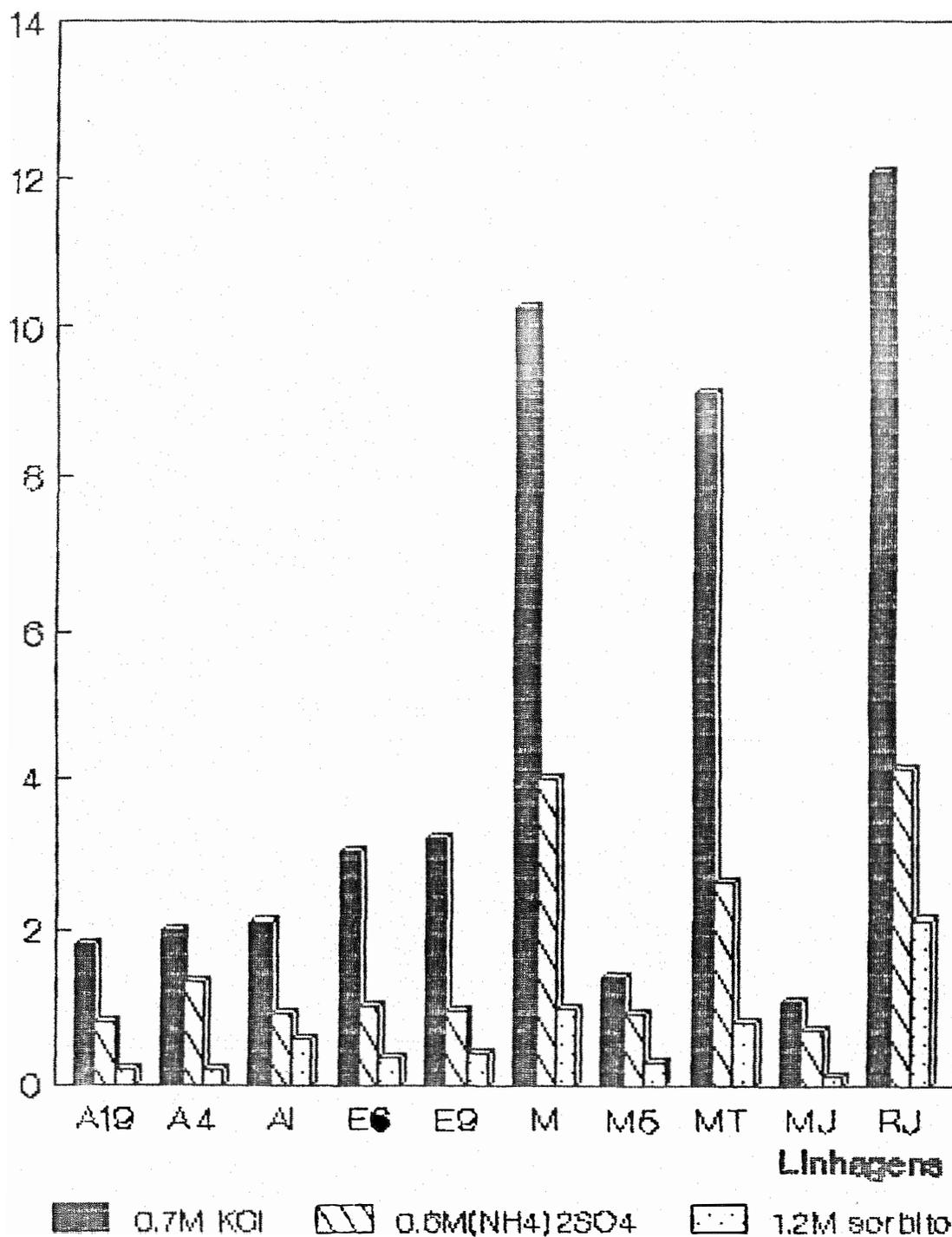


Figura 14. Número de protoplastos obtidos a partir de tubos germinativos em 3 estabilizadores diferentes.

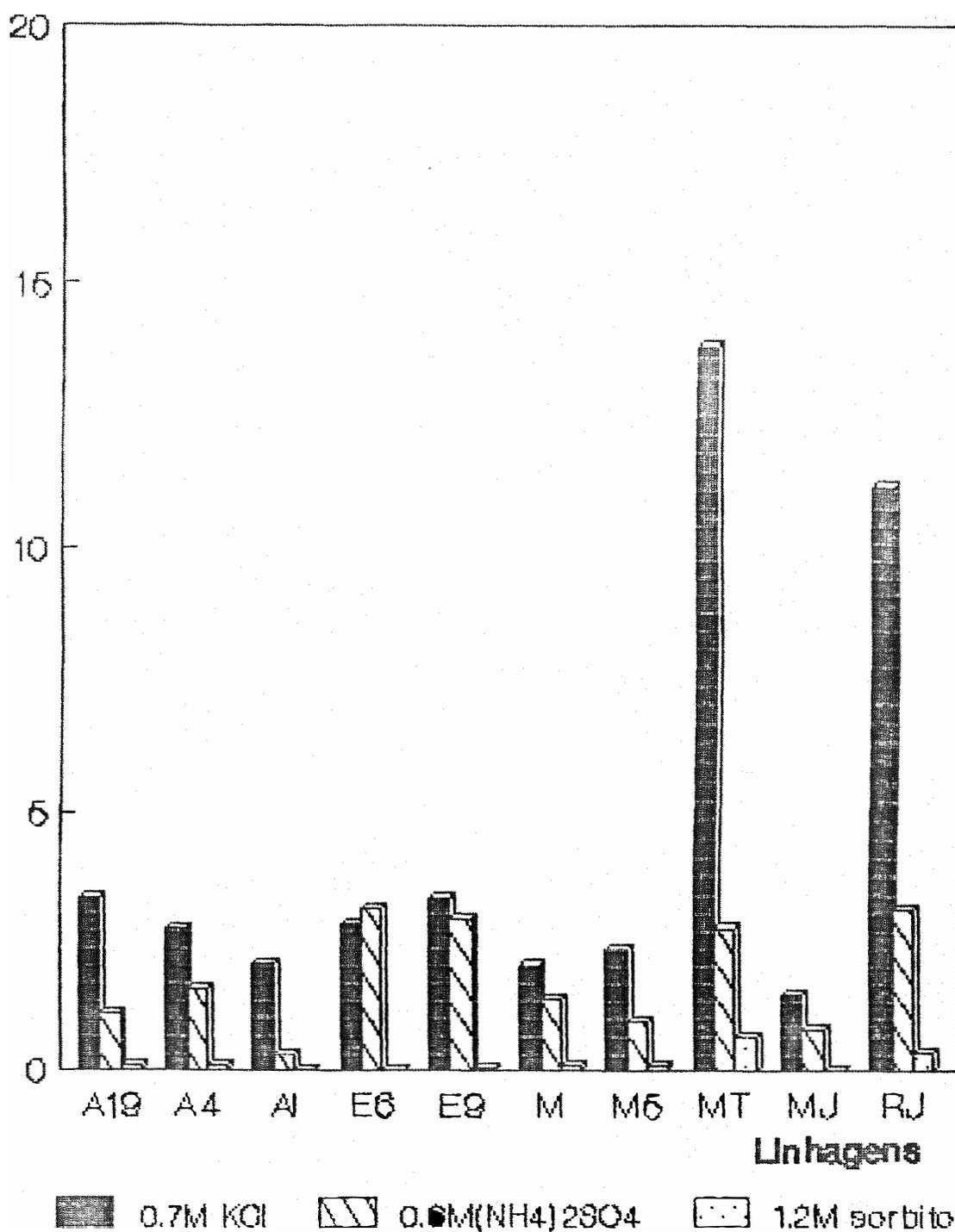


Figura 15. Porcentagem de regeneração de protoplastos obtidos de tubos germinativos em MC mais 3 diferentes estabilizadores osmóticos.

Os resultados apresentados tanto de produção quanto regeneração de protoplastos das 10 linhagens prototróficas em estudo confirmam que sais inorgânicos são mais adequados para fungos filamentosos. Principalmente para *Metarhizium* estes dados já vem confirmar o que foi encontrado por SILVEIRA (1983), FRIGO (1983), BAGALHI (1987) e VALADARES (1989) embora BAGALHI tenha tido bons resultados utilizando-se 0,6 M sacarose com estabilizador osmótico.

PEBERDY (1979, 1980) observa que os aspectos relacionados à reconstituição da parede e regeneração de protoplastos são os mais intensamente estudados, entretanto a razão porque a regeneração varia tanto ainda é desconhecida.

Analisando-se os dados das Tabelas 4 e 5 e Figuras 12 a 15 observa-se que a linhagem Major apresentou a menor produção e regeneração utilizando-se 1,2 M sorbitol como estabilizador osmótico. Em nenhum dos tratamentos houve regeneração nula.

Pode-se observar também que para *Metarhizium anisopliae* não há grandes diferenças em se obter protoplastos a partir de micélio ou de tubos germinativos.

Observa-se que algumas linhagens apresentaram altas taxas de produção e regeneração tais como as linhagens M e RJ nos estabilizadores ensaiados e modos de produção.

Tanto SILVEIRA (1983) quanto BAGALHI (1987)

obtiveram taxas de regeneração menores. Sugere-se que as altas taxas obtidas neste trabalho estejam relacionadas à maior recuperação de protoplastos, onde foi usada filtração e não centrifugação para recuperá-los após o tratamento lítico e também à sensível melhoria na qualidade da enzima Novozym utilizada nestes experimentos. Para os primeiros lotes de Novozym utilizados obtinha-se a maior produção de protoplastos após 180 minutos de tratamento. Com a nova Novozym este tempo às vezes se reduz para 60 minutos para linhagens como a RJ, MT, M, E9 e A1.

Para *Metarhizium* ainda há muito que se estudar quanto ao uso de estabilizadores osmóticos, modos de produção e regeneração de protoplastos, principalmente visando futuros trabalhos de transformação, onde uma boa produção e regeneração de protoplastos são etapas fundamentais.

Quanto à citologia dos protoplastos, a técnica de BORGES (1987) se mostrou muito eficiente para a coloração de núcleos e visualização das estruturas de um protoplasto.

Todas as linhagens ensaiadas em ambos processos apresentaram em média de 50 a 65% de protoplastos uninucleados e somente 3% delas apresentaram protoplastos polinucleados isto é de 5 ou mais que 5 núcleos. O tamanho deles também variou entretanto não se conseguiu estabelecer

uma relação entre tamanhos de protoplastos. A linhagem MT, usando digestão de hifas, chegou a produzir protoplastos de tamanho maior e polinucleados. PEBERDY (1979) sugere que variações no tamanho de protoplastos sejam puramente osmóticas.

4.4. Caracterização de *Metarhizium anisopliae* quanto à produção de exoenzimas

A variabilidade quanto à produção de amilase, protease e lipase foi estudada como parâmetro de diferenciação entre as linhagens prototróficas A4, A19, A1, E6, E9, M, M5, MT, Major e RJ.

A produção das exoenzimas foi expressa na forma de índice enzimático.

Índice enzimático, neste trabalho, foi considerado como sendo a relação entre o diâmetro da colônia + halo e o diâmetro da colônia.

$$\text{Índice enzimático} = \frac{\text{diâmetro (colônia + halo)}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

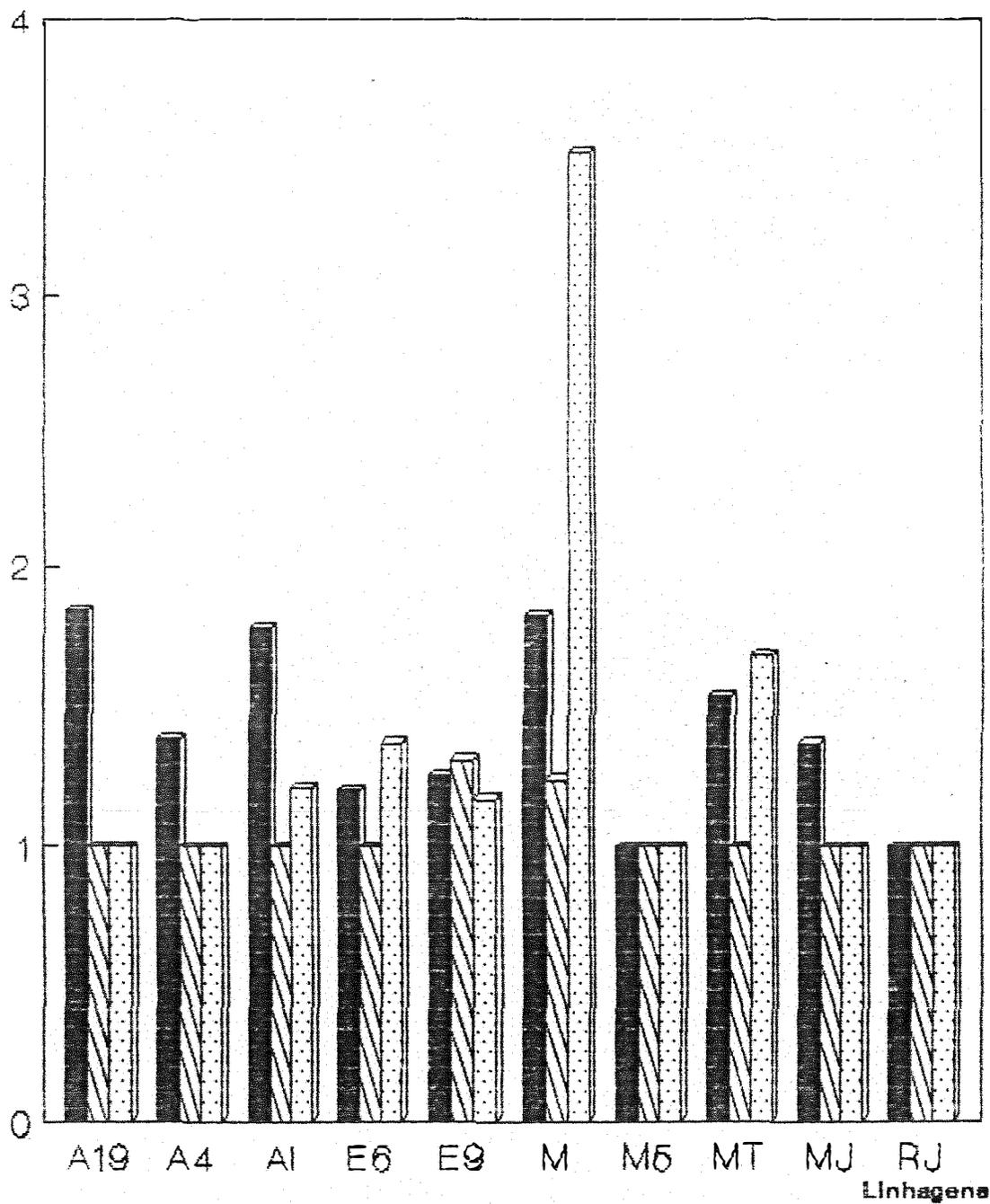
A Tabela 6 resume as atividades de produção de amilase, lipase e protease, das linhagens em estudo, expressas em índice enzimático, como pode se observar na Figura 16.

Para amilase observa-se que há variabilidade entre as linhagens sendo a linhagem A19 a que mais produziu, o que também pode ser observado pelas análises estatísticas.

Tabela 6. Atividades de produção de amilase, lipase e protease de 10 linhagens selvagens de *M. anisopliae* expressas em índice enzimático.

Linhagem	amilase	lipase	protease
A19	1,84	1,0	1,0
A4	1,39	1,0	1,0
A1	1,78	1,0	1,0
E6	1,21	1,0	1,38
E9	1,26	1,32	1,18
M	1,82	1,25	3,5
M5	1,0	1,0	1,0
MT	1,54	1,0	1,68
MJ	1,38	1,0	1,0
RJ	1,0	1,0	1,0

À semelhança do que foi observado por SCAGLIA-PACHECO DE ALMEIDA (1988) não se detectou atividade amilolítica para a linhagem M5, sendo as linhagens A19, A1 e M as mais destacadas.



Amilase Lipase Protease

Figura 16. Atividades de produção de amilase, lipase e protease por 10 linhagens selvagens de *M. anisopliae* expressas em índices enzimáticos.

VALADARES (1989) analisou a produção de amilase nas linhagens E6, E6-7, E6-8, E9, E9019 e E9-20, crescidas em meio para atividade amilolítica, contendo ou não glicose. Não observou variabilidade entre elas a não ser para o mutante E6-7 onde houve pequena variação para atividade e observou também que o meio sem glicose revelou maiores médias de índice enzimático.

LEITE (1987) comparando a atividade amilolítica de diferentes linhagens entre si observou variabilidade. Entretanto, quando comparou a atividade em diferentes concentrações de substrato não obteve linearidade de resposta.

ROSATO et alii analisando onze linhagens de *Metarhizium* observaram variabilidade, havendo linhagens que apresentaram índices enzimáticos iguais a 1,0, o mesmo que SILVA (1985) obteve com mutantes não produtores de amilase.

SOSA-GOMEZ (1983) também observou variabilidade na produção de amilase em diferentes isolados de *M. anisopliae*.

Considerando as observações de VALADARES (1989) de que meios de cultura contendo somente amido deveriam expressar melhor o verdadeiro potencial amilolítico das linhagens, tentou-se o uso do meio de manipueira (efluente de indústria de mandioca) que apresenta alta porcentagem de amido. Não houve crescimento em nenhuma das 10 linhagens

ensaiadas. Tal resultado pode estar relacionado à presença de fontes alternativas de carbono, de acordo com ROBERT & MESSING-AL-AIDROOS (1985) que observaram que o sistema de produção de amilase é do tipo repressivo e indutivo.

A atividade lipolítica só foi detectada nas linhagens E9 e M. VALADARES (1989), LEITE (1987) e SOSA-GOMEZ (1983) trabalhando com outras linhagens também observaram índices de atividade lipolítica iguais a 1,0 (um), indicando que essas linhagens não apresentaram atividade lipolítica, pelo menos extracelularmente.

SCAGLIA-PACHECO DE ALMEIDA (1988) observou que mesmo em mutantes produtores de lipase isolados da linhagem M houve variabilidade de produção havendo inclusive colônias com índice de atividade lipolítica igual a 1,0 (um).

A atividade proteolítica foi detectada nas linhagens E6, E9, M e MT, sendo maior atividade detectada na linhagem M, à semelhança de SCAGLIA-PACHECO DE ALMEIDA (1988).

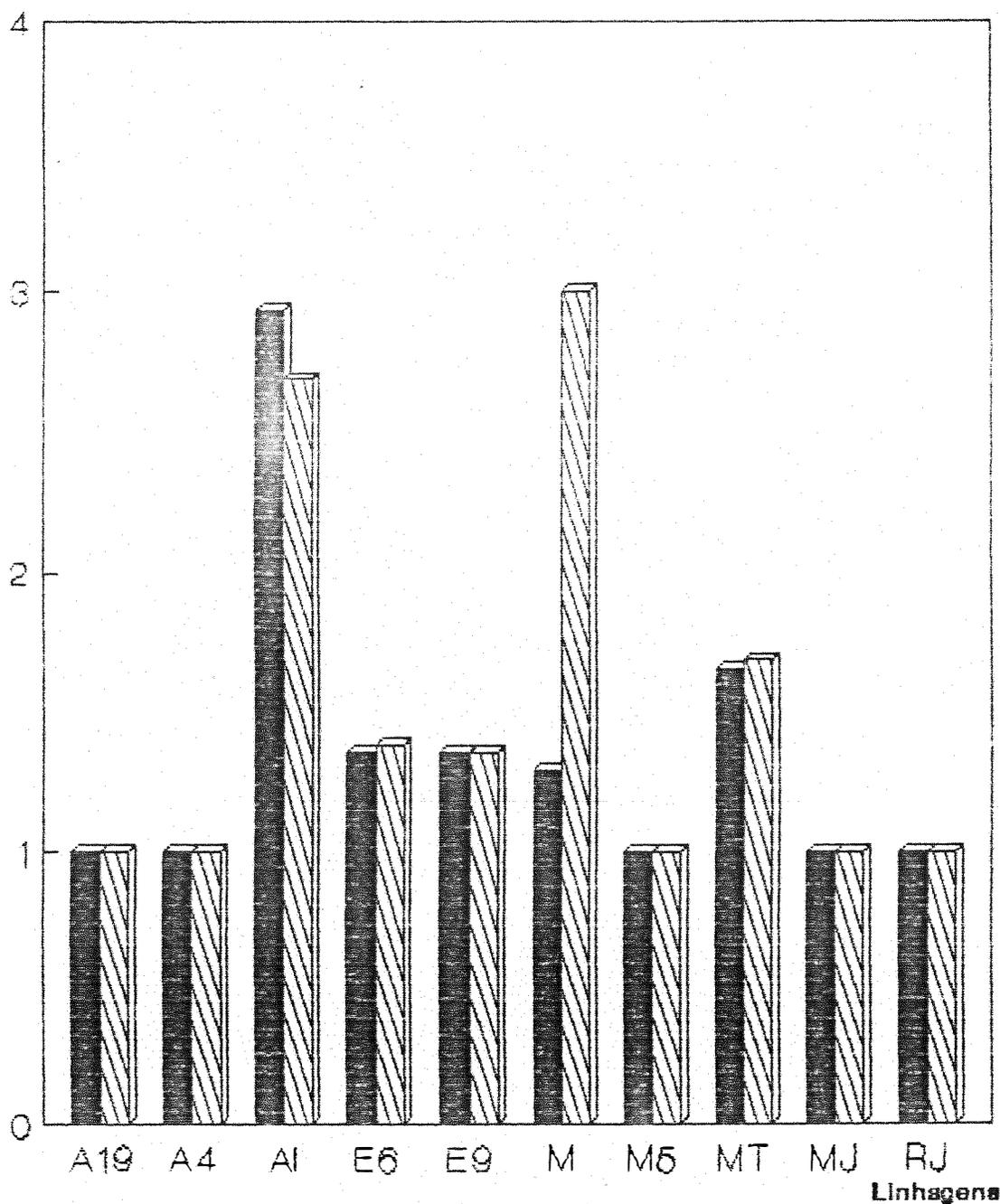
VALADARES (1989) obteve crescimento de colônias em meio contendo gelatina (que é usado para se detectar atividade proteolítica) sem no entanto verificar os halos de exportação da enzima, ao contrário do que verificou em meio contendo leite, onde os halos foram visualizados.

GABRIEL (1968) observou atividade proteolítica em meios contendo gelatina ou leite em pó, sugerindo que este fato por si só não é indicação de que fungos entomopatogênicos sejam capazes de utilizarem diferentes tipos de proteínas, sendo que os substratos podem atuar como indutores ou inibidores das proteases.

A variabilidade quanto à atividade proteolítica também foi detectada nas diferentes linhagens de *Metarhizium* utilizadas por LEITE (1987), SILVA (1986), SOSA-GOMEZ (1983) e ROSATO et alii (1981).

Na tentativa de se obter diferentes respostas dentre as linhagens ensaiadas, utilizaram-se meios de cultura contendo duas diferentes concentrações de cloreto de cálcio e em contraste com SCAGLIA-PACHECO DE ALMEIDA (1988) a linhagem M respondeu bem à concentração de 0,2 mg/ml de cloreto de cálcio em meio de atividade proteolítica. A referida autora não observou influencia das diferentes concentrações de CaCl_2 nos resultados obtidos. Não houve diferença de respostas nas linhagens A19, A4, E9, M5, Major e RJ à semelhança de SCAGLIA-PACHECO DE ALMEIDA (1988), como mostram a Tabela 7 e Figura 18.

Diante da variabilidade observada quanto à produção de exoenzimas, irradiaram-se conídios das 10 linhagens em estudo com luz ultra-violeta por 2 a 4 minutos e avaliaram-se os índices enzimáticos.



0,1 mg/l CaCl₂
 0,2 mg/l CaCl₂

Figura 17. Atividades de protease de 10 linhagens selvagens de *M. anisopliae* crescidas em duas concentrações de CaCl₂ e expressas em índices enzimáticos.

Tabela 7. Índices enzimáticos da produção de protease de *M. anisopliae* crescidos em diferentes concentrações de CaCl₂ (mg/ml).

Linhagem	0,1 mg/ml CaCl ₂	0,2 mg/ml CaCl ₂
A19	1,0	1,0
A4	1,0	1,0
A1	2,93	2,70
E6	1,34	1,37
E9	1,34	1,34
M	1,28	3,0
M5	1,0	1,0
MT	1,64	1,67
MJ	1,0	1,0
RJ	1,0	1,0

Como se observa na Tabela 8, não houve diferenças estatísticas entre os índices enzimáticos de cada atividade analisada nos diferentes tratamentos efetuados. Isto quer dizer que a irradiação não afetou, pelo menos quanto a essa maneira de análise, os índices enzimáticos. As linhagens que produziam e exportavam exoenzimas continuaram como antes e a irradiação por si só não foi agente indutor de variabilidade detectável quanto a esses índices enzimáticos.

Tabela 8. Índices enzimáticos de 10 linhagens de *M. anisopliae* irradiadas por 2 e 4 minutos com luz ultravioleta.

Linhagem	Amilase		Lipase		Protease	
	t2	t4	t2	t4	t2	t4
A19	1,74	1,68	1,0	1,0	1,0	1,0
A4	1,48	1,31	1,0	1,0	1,0	1,0
A1	1,76	1,80	1,0	1,0	1,0	1,0
E6	1,20	1,23	1,0	1,0	1,38	1,20
E9	1,20	1,27	1,37	1,32	1,0	1,0
M	1,85	1,81	1,21	1,29	1,80	3,65
M5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
MT	1,39	1,41	1,0	1,0	1,52	1,50
MJ	1,29	1,39	1,0	1,0	1,0	1,0
RJ	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

4.5. Caracterização eletroforética de linhagens de *Metarhizium anisopliae*

4.5.1. Análise dos padrões de esterases

Padrões de esterase têm sido usados para caracterizar linhagens de *M. anisopliae*.

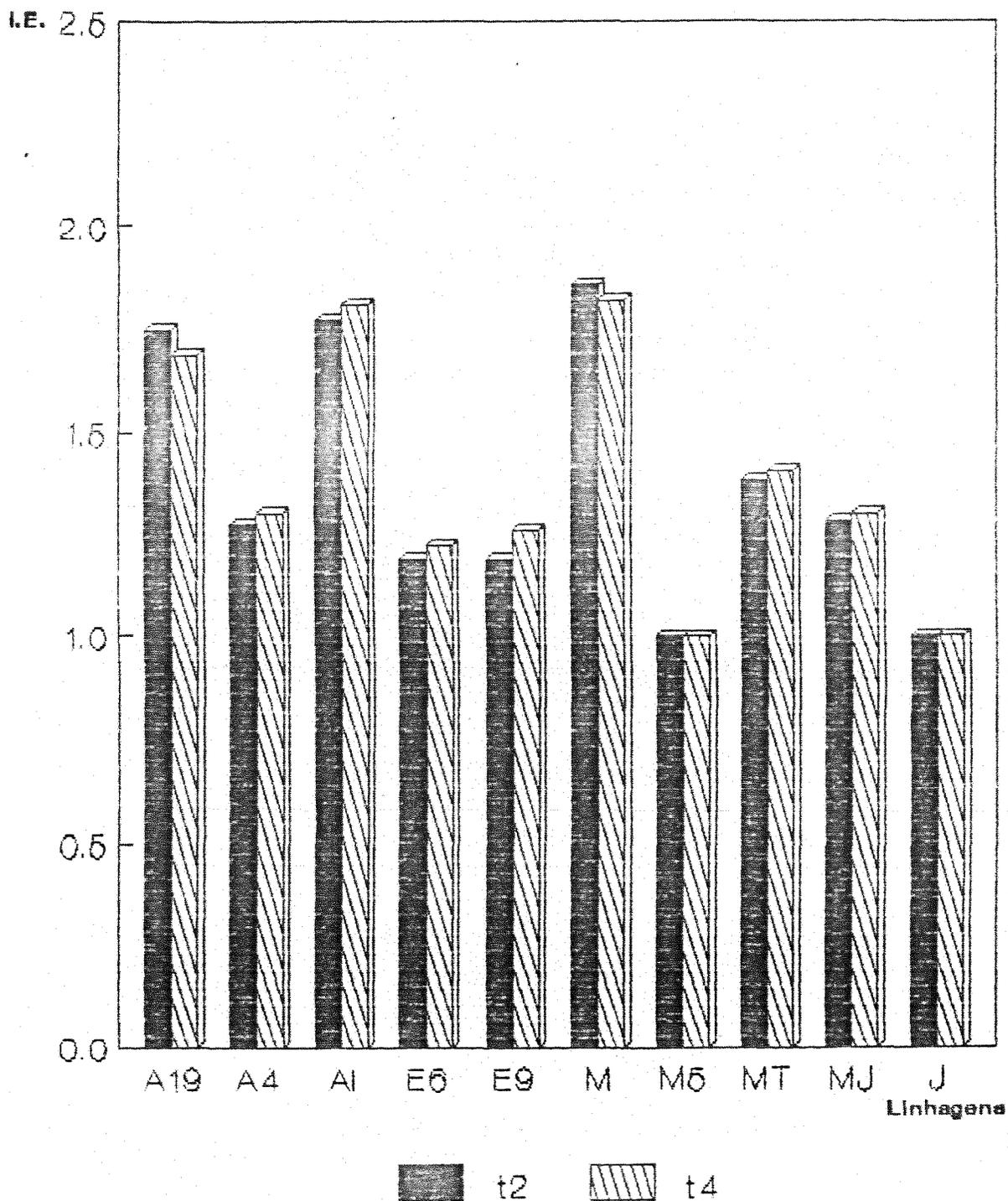


Figura 18. Atividade de produção de amilase, expressas em índice enzimático, por 10 linhagens de *M. anisopliae* expostas 2 min e 4 min à radiação UV.

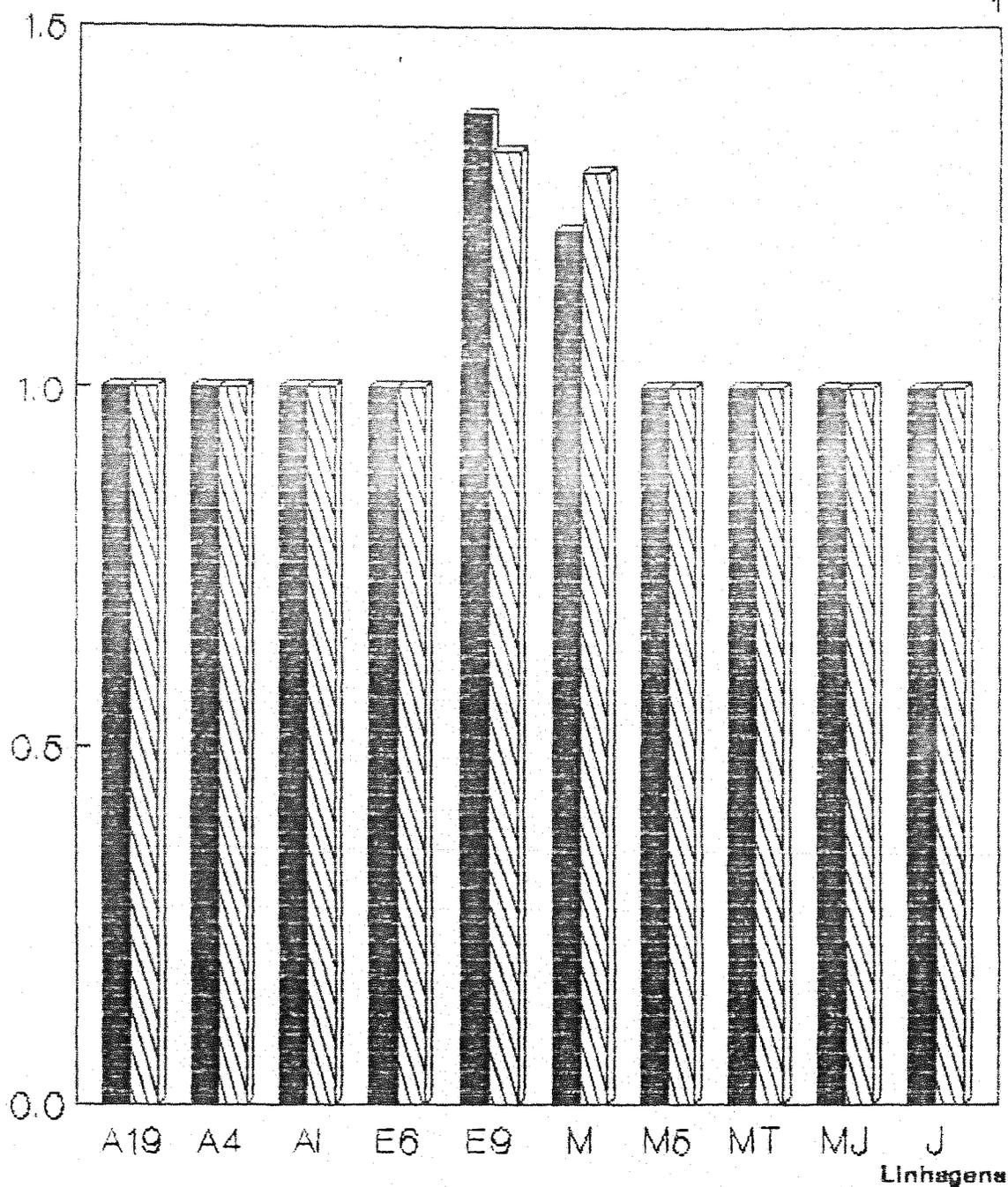


Figura 19. Atividade de produção de lipase, expressa em índices enzimáticos, de 10 linhagens de *M. anisopliae* expostas 1 min e 4 min à luz UV.

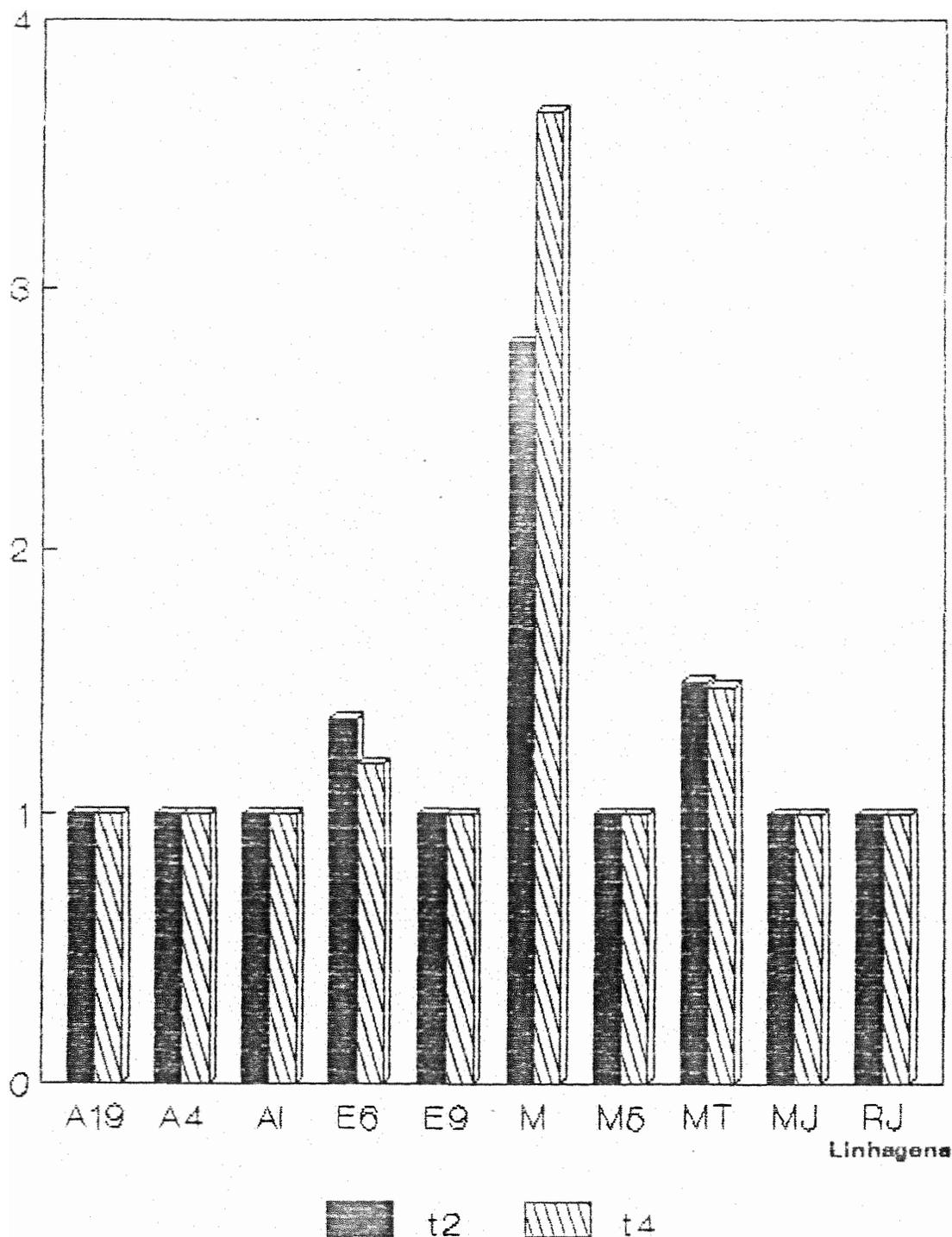


Figura 20. Atividades de produção de protease, expressas em índices enzimáticos, por 10 linhagens de *M. anisopliae* expostas 2 min e 4 min à luz UV.

As linhagens A19, A4, A1, E6, E9, M, M5, MT, Major e RJ foram analisadas quanto ao padrão de esterases, tanto a α -esterase quanto a β -esterase.

A Figura 19 é o zimograma que esquematicamente ilustra os padrões de esterases para as 10 linhagens ensaiadas.

Os padrões eletroforéticos de enzimas solúveis e outras proteínas em fungos representam a manifestação direta da constituição genética da célula e podem ser utilizados para fins taxonômicos.

A partir do padrão de bandas nesse zimograma foi efetuada análise de agrupamentos (SNEATH & SOKAL, 1973), calculando-se o coeficiente de Jaccard e utilizando-se o algoritmo UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) como se vê nas Tabelas 9 e 10.

O dendrograma (Figura 20), que mostra graficamente as semelhanças e divergências entre as linhagens ensaiadas foi construído usando-se o programa NTSYS-pc 1.40 (ROHLF, 1988).

Pela análise do dendrograma observamos que segundo os padrões de esterases obtidos as linhagens mais próximas entre si são M e M5, A4 e RJ e E6 e E9 e as mais distantes entre si são A19 e Major.

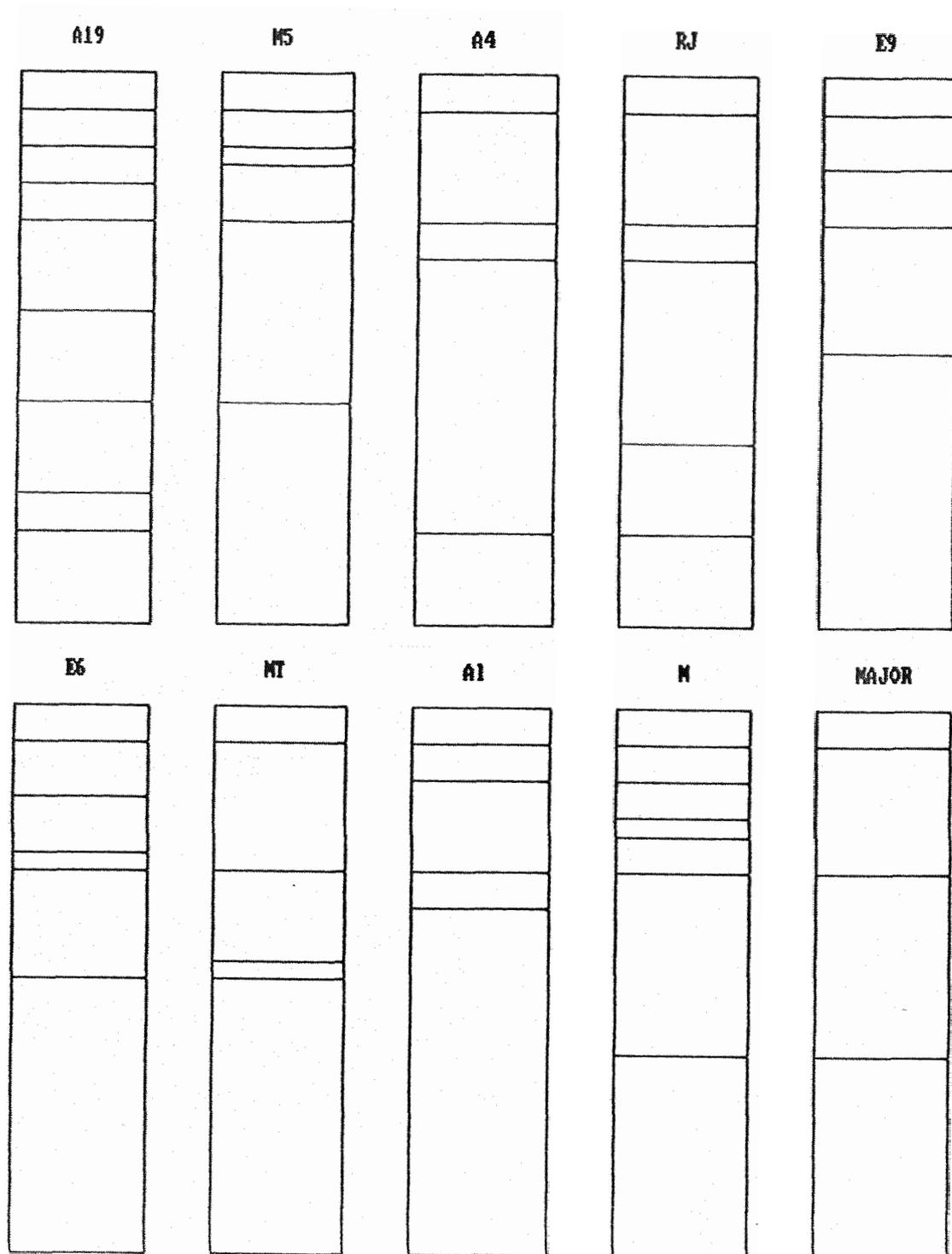


Figura 21. Representação esquemática do zimograma de esterases de micélio de 10 linhagens selvagens de *M. anisopliae*.

Tabela 9. Matriz 10x10. Coeficientes de Jaccard obtidos através da análise de zimogramas para es-
terases em 10 linhagens de *Metabizium anisopliae*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,000									
2	0,444	1,000								
3	0,333	0,286	1,000							
4	0,300	0,250	0,800	1,000						
5	0,200	0,500	0,333	0,286	1,000					
6	0,181	0,429	0,286	0,250	0,800	1,000				
7	0,333	0,286	0,333	0,286	0,600	0,500	1,000			
8	0,333	0,500	0,600	0,500	0,333	0,286	0,333	1,000		
9	0,556	0,833	0,250	0,222	0,429	0,375	0,250	0,429	1,000	
10	0,333	0,286	0,333	0,500	0,333	0,286	0,600	0,333	0,250	1,000

Tabela 10. Matriz 10x10. Método UPGMA e coeficientes de Jaccard.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,000									
2	0,500	1,000								
3	0,322	0,322	1,000							
4	0,322	0,322	0,800	1,000						
5	0,322	0,322	0,324	0,324	1,000					
6	0,322	0,322	0,324	0,324	0,800	1,000				
7	0,322	0,322	0,324	0,324	0,430	0,430	1,000			
8	0,322	0,322	0,550	0,550	0,324	0,324	0,324	1,000		
9	0,500	0,833	0,322	0,322	0,322	0,322	0,322	0,322	1,000	
10	0,322	0,322	0,324	0,324	0,430	0,430	0,600	0,324	0,322	1,000

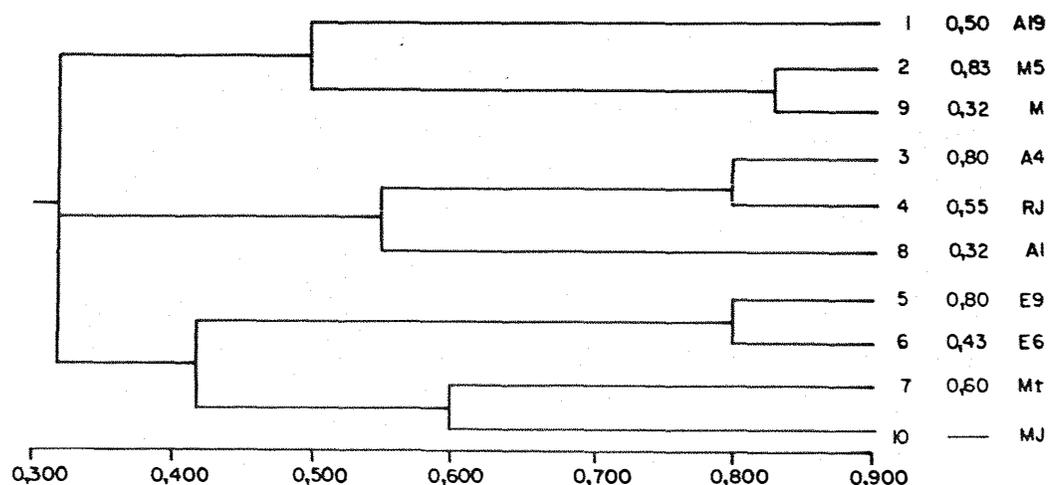


Figura 22. Dendrograma (fenograma) UPGMA ilustrativo das interrelações entre 10 linhagens selvagens de *M. anisopliae* utilizando-se como medida de semelhança o coeficiente de Jaccard com base no padrão enzimático.

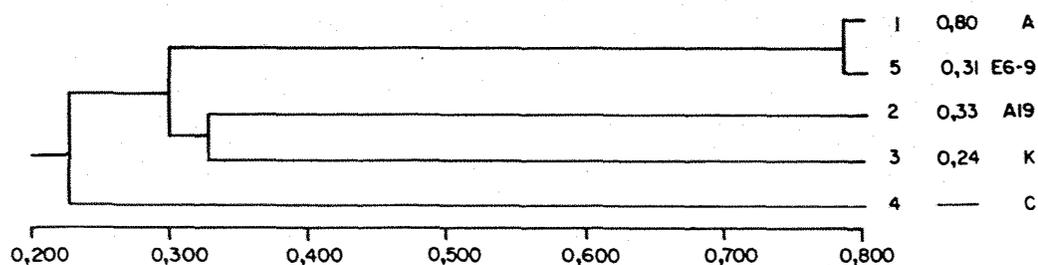


Figura 23. Dendrograma (fenograma) UPMGS ilustrativo das interrelações entre linhagens selvagens de *M. anisopliae* utilizando-se como medida de semelhança o coeficiente de Jaccard com base no padrão isoenzimático de esterase, a partir de DE CONTI et alii (1980).

LUNA (1985) através de caracterizações citológicas observou que as linhagens A4 e M5 eram as mais dessemelhantes do conjunto analisado, sugerindo inclusive novas espécies para A4 e Major. Entretanto, quanto ao padrão de esterases A4 é próxima de RJ e próxima de MS.

Como visto no item 2.1 TULLOCH (1976) considera a linhagem Major como variedade a parte dentro da espécie *Metarhizium anisopliae* e LUNA (1985) devido à particularidades da linhagem MJ chega a lhe sugerir nova espécie. Observa-se analisando a Figura 22 que realmente a linhagem Major é a mais dessemelhante do conjunto e no transcorrer deste trabalho observou-se que esta linhagem tem crescimento mais lento que as demais, conídios maiores e de coloração verde bem escura.

MESSIAS et alii (1983) analisaram 7 linhagens de *M. anisopliae*, isoladas no Brasil, Estados Unidos e Samoa, sendo 6 do tipo *minor* e uma *major* através de cromatografia a gás (GC) e pirolise-cromatografia a gás (PGC). Dentre as linhagens *minor* estavam a E6, E9 e A4. Sob estes parâmetros observou que as linhagens E6 e E9 são idênticas entre si e a A4 foi a que mais diferiu de todas do grupo *minor*, apresentando a *major* um comportamento diferenciado.

SILVEIRA (1983) e VALADARES (1989) também observaram variabilidade quanto aos padrões de esterases mostrados pelas linhagens E6, E9, RJ e mutantes obtidos

dessas linhagens. Sugerem inclusive que a presença ou ausência de determinadas bandas esteja ligada à plodia das células.

DE CONTI et alii (1980) analisaram o padrão de esterases de 11 linhagens selvagens de *M. anisopliae* e dentre elas estavam as linhagens E6, E9 e A19. Identificaram 5 conjuntos de padrões quanto à presença e motilidade de bandas.

A partir dos dados de DE CONTI et alii e utilizando-se do mesmo esquema de análise (coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA) obtiveram-se as Tabelas 11 e 12 e o dendrograma mostrado na Figura 23.

À semelhança do que se encontrou neste trabalho, a Figura 21 mostra que, quanto ao padrão de bandas para esterases obtido por DE CONTI et alii (1980), as linhagens E6 e E9 são idênticas entre si e distintas da linhagem A19.

ALVES (1982) e SOSA-GOMEZ (1983) também obtiveram alta variabilidade entre linhagens analisando o padrão de esterases.

ALVES (1982) analisou 7 isolados de *M. anisopliae* e entre eles a linhagem E9 e SOSA-GOMEZ (1983) analisou 11 isolados à semelhança do que se faz com os dados de DE CONTI et alii (1980) obtiveram-se os dados das Tabelas 13, 14, 15 e 16 e Figuras 24 e 25.

Tabela 11. Matriz 5x5. Coeficiente de Jaccard a partir da análise de zimogramas de esterases obtidos por DE CONTI et alii (1980).

	1	2	3	4	5
1	1,000				
2	0,333	1,000			
3	0,333	0,222	1,000		
4	0,286	0,286	0,125	1,000	
5	0,800	0,286	0,286	0,250	1,000

Tabela 12. Matriz 5x5. Método UPGMA e coeficientes de Jaccard à partir de DE CONTI et alii (1980).

	1	2	3	4	5
1	1,000				
2	0,310	1,000			
3	0,310	0,333	1,000		
4	0,237	0,237	0,237	1,000	
5	0,800	0,310	0,310	0,237	1,000

Tabela 13. Matriz 7x7. Coeficiente de Jaccard a partir da análise de zimogramas de esterases obtidos por ALVES (1982).

	1	2	3	4	5	6	7
1	1,000						
2	1,000	1,000					
3	0,250	0,250	1,000				
4	0,200	0,200	0,667	1,000			
5	0,250	0,250	0,143	0,111	1,000		
6	0,111	0,111	0,333	0,429	0,333	1,000	
7	0,000	0,000	0,143	0,250	0,143	0,333	1,000

Tabela 14. Matriz 7x7. Método UPGMA e coeficientes de Jaccard a partir de ALVES (1982).

	1	2	3	4	5	6	7
1	1,000						
2	1,000	1,000					
3	0,154	0,154	1,000				
4	0,154	0,154	0,667	1,000			
5	0,250	0,154	0,154	0,154	1,000		
6	0,154	0,154	0,381	0,381	0,154	1,000	
7	0,154	0,154	0,242	0,242	0,154	0,242	1,000

Tabela 15. Matriz 11x11. Coeficiente de Jaccard a partir da análise de cimoogramas de esterases obtidos por SOSA-GOMEZ (1983).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1,000										
2	0,111	1,000									
3	0,222	0,500	1,000								
4	0,200	0,125	0,250	1,000							
5	0,222	0,286	0,667	0,429	1,000						
6	0,222	0,000	0,111	0,111	0,111	1,000					
7	0,000	0,286	0,111	0,000	0,000	0,111	1,000				
8	0,222	0,286	0,429	0,111	0,429	0,250	0,111	1,000			
9	0,222	0,500	0,429	0,111	0,429	0,111	0,250	0,667			
10	0,273	0,333	0,444	0,300	0,444	0,182	0,083	0,444	0,444	1,000	
11	0,444	0,222	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,333	0,500	1,000

Tabela 16. Matriz 11x11. Método UPGMA e coeficientes de Jaccard a partir de SOSA-GOMEZ (1983).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1,000										
2	0,284	1,000									
3	0,284	0,393	1,000								
4	0,203	0,203	0,203	1,000							
5	0,284	0,393	0,667	0,203	1,000						
6	0,144	0,144	0,144	0,144	0,144	1,000					
7	0,115	0,115	0,115	0,115	0,115	0,115	1,000				
8	0,284	0,393	0,429	0,203	0,429	0,144	0,115	1,000			
9	0,284	0,393	0,429	0,203	0,429	0,144	0,115	0,667	1,000		
10	0,359	0,284	0,284	0,203	0,284	0,144	0,115	0,284	0,284	1,000	
11	0,359	0,284	0,284	0,203	0,284	0,144	0,115	0,284	0,284	0,500	1,000

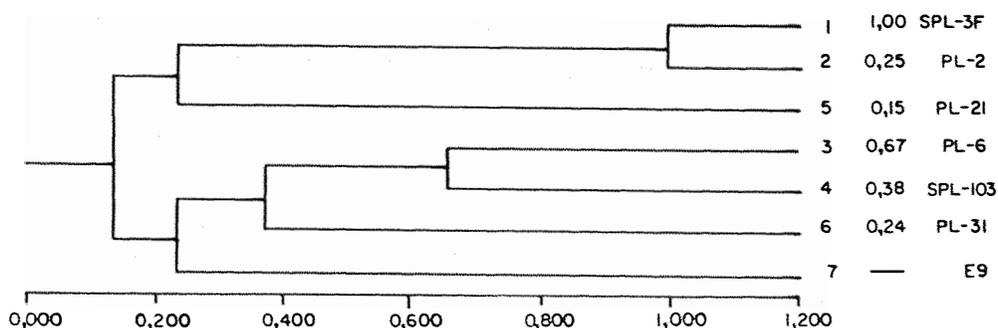


Figura 24. Dendrograma (fenograma) UPGMA ilustrativo das interrelações entre linhagens selvagens de *M. anisopliae* utilizando-se como medida de semelhança o coeficiente de Jaccard com base no padrão isoenzimático de esterases, a partir de ALVES (1982).

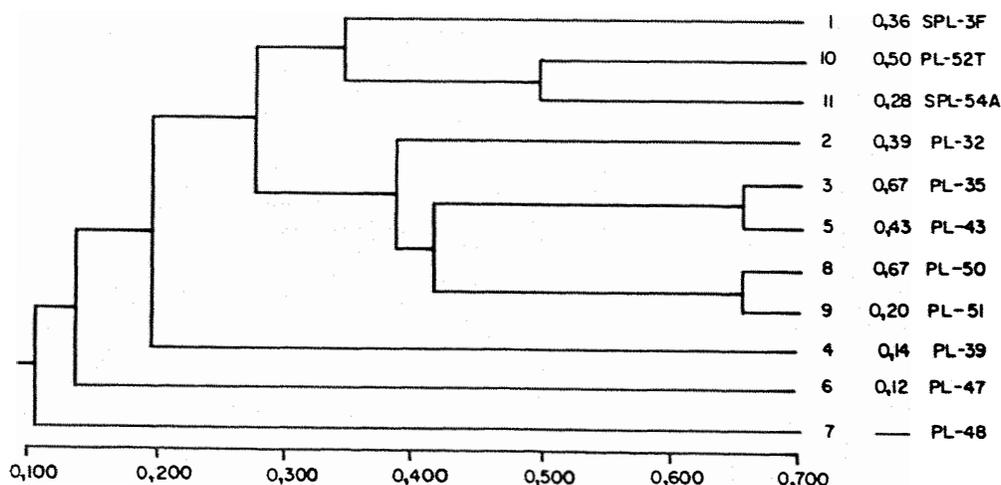


Figura 25. Dendrograma (fenograma) UPMGA ilustrativo das interrelações entre linhagens selvagens de *M. anisopliae* utilizadas como medida de semelhança o coeficiente de Jaccard com base no padrão isoenzimático de esterases, a partir de SOSA-GOMEZ (1983).

Embora utilizando uma terminologia diferente da utilizada neste trabalho, os resultados desses autores nos permite visualizar a variabilidade existente entre diferentes isolados de *M. anisopliae*.

A Figura 24 obtida a partir dos dados de ALVES (1982) mostra que 2 linhagens, a SPL-3F e PL-2 são idênticas entre si e que todos os isolados analisados divergem da linhagem E9.

A Figura 25 obtida a partir dos dados de SOSA-GOMEZ (1983) mostra que há grande variabilidade entre as linhagens analisadas e que, embora não se possam comparar diretamente os resultados deste trabalho com os mostrados nas Figuras 22 e 23 fica evidente que linhagens de *Metarhizium anisopliae* divergem geneticamente entre si quanto ao padrão de esterases obtido e que esse parâmetro pode ser utilizado como indicador de variabilidade.

4.6. Análise do DNA mitocondrial (mtDNA)

A análise do DNA mitocondrial foi também escolhida como parâmetro para se detectar a variabilidade entre as dez linhagens selvagens escolhidas: A4, A19, A1, E6, E9, M, M5, MT, MJ (Major) e RJ.

O mtDNA obtido segundo o item 3.7 foi submetido à digestão total com as endonucleases de restrição EcoRI e Hind III resultando numa série de fragmentos que foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (item 3.14).

As comparações de frações (F) de bandas comuns entre as linhagens foram feitas através da fórmula:

$$F = 2c_{xy} / (u_x + u_y + 2c_{xy})$$

onde c_{xy} representa o número de bandas comuns às linhagens X e Y e u_u representa o número de bandas únicas (KOZŁOWSKI et alii, 1982).

A Figura 26 mostra esquematicamente o padrão de bandas do mtDNA das 10 linhagens em análise tratados com a endonuclease Eco RI e a Figura 25 mostra o padrão obtido com Hind III.

A Tabela 17 mostra os valores de F obtidos da comparação entre bandas produzidas por Eco RI e a Tabela 18 mostra os valores de F para Hind III.

Como pode se observar pelas Figuras 26 e 27 há uma forte evidência de origem comum das 10 linhagens analisadas, embora algumas diferenças possam ser notadas.

Tabela 24. Valores de F (fração de bandas comuns entre linhagens testadas) para 10 linhagens selvagens de *Metarhizium anisopliae* tratadas com Eco RI.

Linhagens comparadas	F
A4-(A19, A1, E6, E9, M, MT, RJ)	0,86
A4-M5	0,75
A4-Major	0,86

Tabela 25. Valores de F (fração de bandas comuns entre linhagens testadas) para 10 linhagens selvagens de *Metarhizium anisopliae* tratadas com Hind III.

Linhagens comparadas	F
A4-(A1, E6, E9, M, MT)	0,83
A4-(A19, M5)	0,83
A4-Major	0,77
A4-RJ	0,92

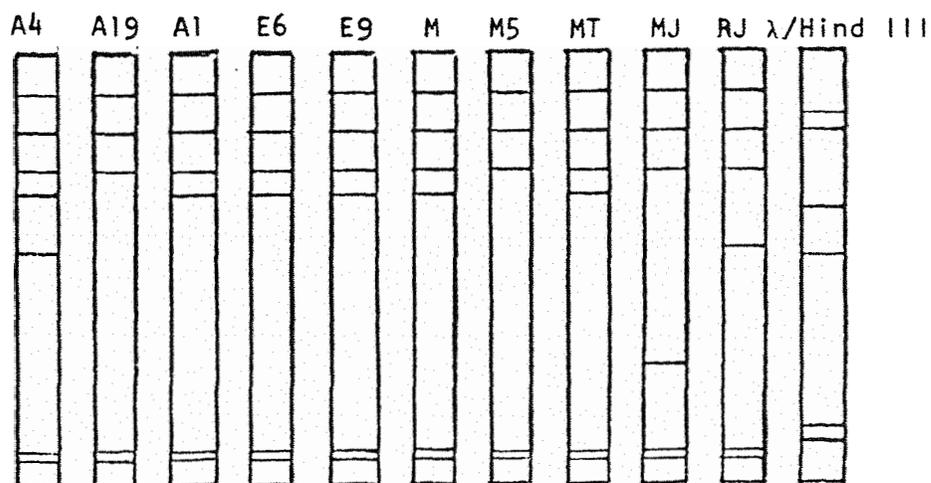


Figura 26. Representação esquemática dos padrões de bandas obtidos pelo tratamento do DNA mitocondrial de 10 linhagens selvagens de *M. anisopliae* com a endonuclease Eco RI. A coluna da extrema direita é DNA de fago λ cortado com Hind III e usado como referencial.

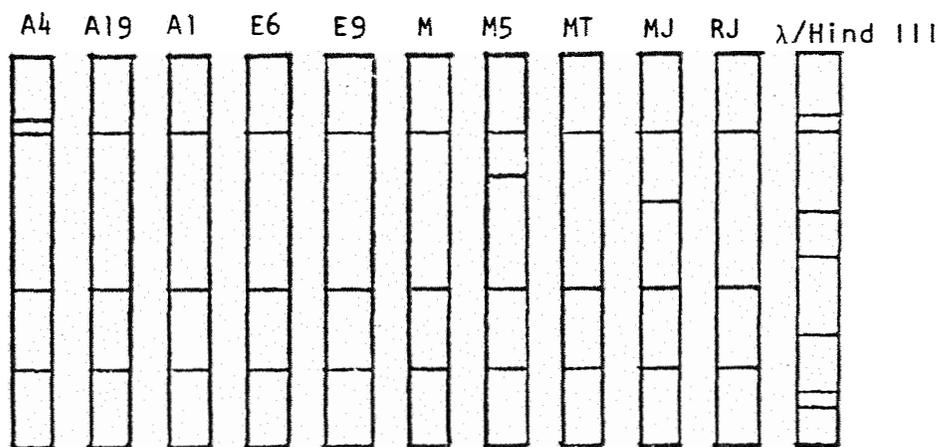


Figura 27. Representação esquemática dos padrões de bandas obtidos pelo tratamento do DNA mitocondrial de 10 linhagens selvagens de *M. anisopliae* com a endonuclease Hind III. A coluna da extrema direita é DNA de fago λ cortado com Hind III e usado como referencial.

A digestão do mtDNA com Eco RI deu origem aos seguintes conjuntos de padrões de bandas:

conjunto 1: linhagem A4

conjunto 2: linhagem M5

conjunto 3: linhagem Major (MJ)

conjunto 4: linhagens A19, A1, E6, E9, M, MT
e RJ

Pela Tabela 24 observa-se que embora os resultados de F obtidos pela comparação do conjunto 1 com 3 e 1 com 4 sejam iguais (0,86), o padrão de bandas é diferentes.

A digestão do mtDNA com Hind III (Tabela 25) deu origem aos seguintes conjuntos de padrões de bandas:

conjunto 1: linhagens A1, E6, E9, M e MT

conjunto 2: linhagens A19 e M5

conjunto 3: linhagem A4

conjunto 4: linhagem Major (MJ)

conjunto 5: linhagem RJ

A digestão com Eco RI deu o menor F (0,75) e a digestão com Hind III deu o maior F (0,92).

Os padrões de digestão obtidos tanto com Eco RI e Hind III nos permitem observar que a estrutura primária do mtDNA de *Metarhizium* é altamente conservada e que os

resultados de F só nos permitem observar o grau de bandas em comum, quando os padrões são comparados entre si.

O que fica claro, entretanto, é que embora sendo fenotipicamente bem distintas, as linhagens de *Metarhizium anisopliae* têm uma origem comum e somente estas comparações não são suficientes para separá-las em unidades taxonômicas mais diferenciadas.

LUNA (1985) observou através de análise citológica grande diferença entre as linhagens A4, M5 e Major, sugerindo inclusive novas unidades taxonômicas para elas.

A análise do DNA mitocondrial também mostra variabilidade, embora em grau muito menor.

HINTZ et alii (1985) observaram heterogeneidade entre padrões de restrição em mtDNA de *Agaricus bitorquis* e homogeneidade em *Agaricus brunnescens* e ECONOMOU et alii (1987) observaram que a heterogeneidade obtida nos padrões de restrição em 2 linhagens de *Coprinus cinereus* era devida a inserções alternativas de pequenos pedaços de DNA de 1,23 Kb e que a detecção desses fragmentos foi feita através de hibridizações com sonda obtida de *Neurospora crassa*. A presença de inserções também foram observadas nos trabalhos de WEBER et alii (1986), AHNE et alii (1984), WU et alii (1983), COLLINS & LAMBOWITZ (1983) e EARL et alii (1981).

KOLOWSKI et alii (1982) observaram que para o mtDNA seria interessante também calcular as seqüências de divergência, isto é, o grau de substituição de pares de bases nos diferentes mtDNA analisados. Entretanto, em nossas condições, é uma técnica ainda difícil de se aplicar. Os autores acima citados observaram também que a análise de seqüências de divergências deve ser aplicada com reservas em mtDNA de fungos. Primeiro, parece que a taxa de substituição de pares de bases não é igual para todas partes do genoma mitocondrial. Segundo, que algumas das mudanças no padrão de restrição podem ser devidas à inserções (ECONOMOU et alii, 1987) e terceiro, que estamos apresentando aqui os padrões de restrição e não mapas de restrição.

KOZLOWSKI et alii (1982) observaram também que para mamíferos a taxa de evolução do mtDNA é dez vezes mais rápida que para o DNA nuclear e que em fungos não se conhece a taxa de evolução do genoma mitocondrial. Entretanto, se considerarmos que a taxa de evolução dos genomas mitocondriais de linhagens do gênero *Metarhizium* seja constante, então os valores das seqüências de divergência serão proporcionais ao tempo de evolução quando as linhagens forem comparadas separadamente.

Alguns comentários sobre o grau de credibilidade dos resultados obtidos devem ser feitos. Os pesos moleculares dos fragmentos de DNA são geralmente calculados com

erro de precisão em torno de 5%, mas é importante observar que a molécula do mtDNA é circular e que a identificação de duas bandas como idênticas pode ser feita não somente com a comparação de seus pesos moleculares mas também por suas posições relativas em comparação com outras bandas e informações adicionais podem ser obtidas através de dados de hibridização ou de comparação com padrões de restrição obtidos através de diferentes misturas de endonucleases. Também é difícil estimar o erro de cálculo da fração F. Quando F se aproxima de 1,0 ocorre o máximo de precisão entretanto, quanto mais F se afasta de 1,0 maior é a possibilidade de interpretações errôneas.

Este trabalho deixa em aberto o uso da técnica da RFLP, como poderá ser observado no item subsequente, para detecção de padrões de restrição através de hibridizações com sondas específicas com DNA mitocondrial.

4.7. RFLP

Para realização da análise do polimorfismo dos segmentos de restrição (RFLP) foram escolhidas as 20 linhagens de *Metarhizium anisopliae* que se seguem: A4, A19, A1, E6, E9, M, M5, MT, Major, RJ, E9-19, E9-20, E9-23, E6-8, RJ-37, PL 48, PL 143, PL 255, PL 866 e PL 959.

O DNA total dessas linhagens extraído segundo o item 3.8.2 e submetido à digestão foram monitoradas através de eletroforese em gel de agarose segundo o item 3.14.

Esses DNA totalmente digeridos foram transferidos para 2 membranas de nylon segundo o item 3.18 de tal modo que para uma das membranas foram transferidos os DNA das 20 linhagens tratadas com Eco RI e para a outra foram transferidos os 20 DNA tratados com Hind III.

A membrana contendo os 20 DNA clivados com Eco RI foi hibridizada com a sonda pMF2 e a membrana dos DNA clivados com Hind III foi hibridizada com a sonda EMFA.

A ordem de aplicação das amostras nos geis de agarose para transferência obedeceu a seguinte ordem: na canaleta da extrema direita foi aplicado um marcador que contém seqüências de nucleotídeos que se hibridizam com as sondas, a seguir foram aplicadas as amostras de *Metarhizium* (PL 143, PL 48, PL 255, E6, E9, RJ, A1, A4, M, M5, MT, PL 866, A19, PL 959, E9-19, E9-20, E9-23, RJ-37 e E6-8) e na canaleta da extrema direita aplicou-se o marcador λ /Hind III, que é bacteriófago λ tratado com a endonuclease Hind III.

Não houve hibridização entre a sonda EMFA obtida a partir da linhagem E6 e os DNA tratados com Eco RI. É um resultado sem explicação plausível, pois a sonda era

homóloga, isto é, obtida à partir de DNA semelhante ao das amostras. Só ocorreu hibridização com os controles.

Já a sonda pMF2 hibridizou com as amostras de DNA tratadas com Hind III porém não indicou polimorfismo.

Observando-se cuidadosamente a radiografia em negatoscópio é possível visualizar bandas bastante fracas na parte inferior da canaleta referentes às linhagens A19 e A1.

Estes resultados levam a questionar qual o número mínimo de sondas necessárias para se detectar polimorfismo e quantas enzimas de restrição devem ser usadas.

HULBERT et alii (1988) usaram 55 sondas de DNA genômico e de cDNA (DNA complementar) para detectar 61 loci de RFLP em 3 isolados heterotáticos de *Bremia lactucae* usando as seguintes endonucleases de restrição: Bam III, Eco RI, Eco RV, Hind III e Map I. A enzima Map I não foi eficiente em revelar polimorfismo em alface, o que já tinha sido verificado em milho e tomate, apesar de muito eficiente para se estudar genes humanos (LANDRY et alii, 1987).

BURR et alii (1983) observaram que em milho o polimorfismo foi detectado usando-se de 16 a 18 sondas.

Em *Eucalyptus* MOURA CAMPOS-PARDINI (Comunicação pessoal) utilizou 60 sondas para detectar polimorfismo intra e interespecífico entre 10 espécies analisadas.

Os dados da literatura mostram que o procedimento mais comum entre os autores é tratar o DNA total do organismo em análise com um "pool" de enzimas de restrição (de 3 a 5) para garantir hibridização, entretanto fica-se sem saber a origem do fragmento de restrição que porventura tenha se hibridizado.

Nossos resultados, ainda que bastante restritos, deixam claro que a técnica de marcação de sondas "a frio" é altamente promissora e a melhor opção para laboratórios que não possuam facilidade de uso de radioisótopos.

Em nosso trabalho a marcação das sondas foi feita pela incorporação de deoxiuridina trifosfatada marcada com digoxigenina que é um hapteno de esteroide.

A revelação entretanto foi realizada segundo sugestão de McDOWELL (Comunicação pessoal) com uso da substância luminescente AMPPD.

Esta técnica é análoga à da revelação com uso de radioisótopos e da mesma maneira permite a reutilização dos filtros após remoção das sondas.

Em outras palavras, quando se utilizam sondas marcadas radioativamente, após hibridização os filtros são lavados, as sondas removidas e após as séries de lavagens os filtros estão aptos a serem reutilizados.

MANIATIS et alii (1982) observam que filtros

assim tratados podem ser reutilizados indefinidamente, e esta é a grande vantagem apregoada para o uso da marcação isotópica.

A técnica da marcação com digoxigenina e AMPPD entretanto oferece as mesmas vantagens da técnica de radioisótopos além de requerer menos cuidados no uso e oferecer a mesma eficiência de resolução.

Segundo McDOWELL (Comunicação pessoal) os filtros adequadamente manipulados podem ser reutilizados inúmeras vezes e as autorradiografias apresentam a mesma resolução que a obtida por marcação radioativa.

A somatória dessas técnicas deixa evidente que o uso da RFLP para *Metarhizium anisopliae* apresenta potencial incomensurável, principalmente para a construção de um futuro mapa genético.

4.8. Construção do banco genômico de

Metarhizium anisopliae

Um banco genômico é construído pela fragmentação do DNA cromossômico e pela preservação destes fragmentos no vetor de clonagem. Juntos, o conjunto de insetos nesta coleção de moléculas deve representar toda a informação genética do organismo.

Escolheu-se a linhagem E6 de *Metarhizium anisopliae* e segundo a metodologia descrita no item 3.13 construiu-se o banco genômico, utilizando-se o plasmídio CV13, que é derivado do pBR322, como vetor de clonagem.

As linhagens de *Escherichia coli* HB101 e 5K foram transformadas segundo o item 3.15 e segundo o método de HANAHAN (1986), como descrito no item 3.16.

O método de HANAHAN foi mais eficiente pois obtinham-se transformantes na ordem de 1×10^5 transformantes por 1 μ g de DNA.

O banco assim conseguido servirá para futuras análises comparativas de linhagens e seleção de genes relevantes ao processo entomopatogênico.

4.9. Variabilidade e paramiose

4.9.1. Obtenção de heterocários

A paramiose originalmente descrita por BONATELLI Jr. et alii (1983) foi verificada por BAGALHI (1987) em *Metarhizium anisopliae* e caracteriza-se pela recuperação de recombinantes diretamente a partir de heterocários.

Previamente à obtenção de heterocários, as linhagens mutantes com dupla deficiência auxotrófica foram

ensaiadas quanto à reversão espontânea de suas marcas, semeando-se sempre 10^7 conídios por placa de MM. Os resultados encontram-se na Tabela 26.

Tabela 26. Frequência de reversão espontânea dos mutantes com dupla deficiência auxotrófica das linhagens de *M. anisopliae* utilizadas.

Linhagem	Fenótipo	Frequência de reversão de 10^7 conídios
E6-1	E6 vio2 ade5 pro11	< 1
E6-5	E6 vio2 lis6 bio1	< 1
E6-7	E6 bio9 met9 bio9	< 1
E6-8	E6 ylo8 per8 lis8	< 1
E9-12	E9 met 1 lis 3	< 1
E9-19	E9 ylo1 leu6 rib8	< 1
E9-20	E9 ylo1 leu6 ade9	< 1
RJ-31	RJ vio1 lis3 bio2	< 1
RJ-32	RJ leu1	< 1

Os heterocários obtidos entre as linhagens E6-1 + E6-5, E6-1 + E9-12 e E9-12 + E9-19 foram obtidos segundo a metodologia descrita no item 3.5 e os demais

heterocários (E6-1 + E6-7, E6-1 + E6-8, E6-1 + E9-19, E6-5 + E9-19, E6-5 + E9-20, E9-19 + RJ 31 e E9-19 + RJ 32) foram obtidos por fusão de protoplastos, segundo o item 3.6.6.

A Tabela 27 mostra a freqüência de fusão para cada cruzamento.

Tabela 27. Freqüência de fusão de protoplastos entre linhagens de *Metarhizium anisopliae* com marcar auxotróficas complementares.

Cruzamento	Freqüência de fusão
E6-1 + E6-7	$1,0 \times 10^{-2}$
E6-1 + E6-8	$1,02 \times 10^{-2}$
E6-1 + E9-19	$1,2 \times 10^{-3}$
E6-5 + E9-19	$1,0 \times 10^{-3}$
E6-5 + E9-20	$1,3 \times 10^{-3}$
E9-19 + RJ 31	$1,3 \times 10^{-3}$
E9-19 + RJ 32	$1,2 \times 10^{-3}$

4.9.2. Obtenção de recombinantes e análise genética

A obtenção de recombinantes prototróficos e outros tipos de recombinantes foi realizada através da semeadura de conídios em meios seletivos. A Tabela 28 mostra os resultados obtidos.

Colônias originadas de heterocários, crescidas nos meios seletivos foram analisadas geneticamente quanto às marcas auxotróficas e os resultados estão resumidos na Tabela 29.

Analisando-se os resultados observam-se que todos os cruzamentos realizados, envolvendo marcas auxotróficas e morfológicas, deram origem a recombinantes prototróficos, recombinantes auxotróficos e recombinantes apresentando as marcas parentais e que esses eventos muito provavelmente resultaram de permuta mitótica.

BAGALHI (1987) e VALADARES (1989) também obtiveram recombinantes mitóticos e observaram esses autores que os meios seletivos com dupla suplementação foram os que mais favoreceram o surgimento de recombinantes.

Resultados semelhantes foram observados por FURLANETO (1989) em *Trichoderma pseudokoningii* e PACCOLA-MEIRELLES (1988) em *Beauveria bassiana*.

Tabela 28. Frequência de colônias obtidas a partir de heterocários em meios seletivos.

Heterocário	Meios seletivos	Frequência de colônias ($\times 10^{-5}$)
E6-1 + E6-5	MM	4,0
	MM + ade + lis	4,8
	MM + ade + bio	6,0
	MM + pro + lis	4,6
	MM + pro + bio	4,5
E6-1 + E9-12	MM	3,1
	MM + ade + met	2,8
	MM + ade + lis	2,8
	MM + pro + met	2,0
	MM + pro + lis	1,9
E9-12 + E9-19	MM	3,8
	MM + met + leu	4,0
	MM + met + rib	3,8
	MM + lis + leu	3,8
	MM + lis + rib	3,6
E6-1 + E6-7	MM	5,9
	MM + ade + met	5,2
	MM + ade + bio	7,1
	MM + pro + met	5,5
	MM + pro + bio	4,8

Cont.

Tabela 28. Continuação.

Heterocário	Meios seletivos	Frequência de colônias ($\times 10^{-5}$)
E6-1 + E6-8	MM	4,8
	MM + ade + pir	3,8
	MM + ade + lis	4,6
	MM + pro + pir	3,9
	MM + pro + lis	4,3
E6-1 + E9-19	MM	3,2
	MM + ade + leu	3,0
	MM + ade + rib	2,8
	MM + pro + leu	2,2
	MM + pro + rib	2,0
E6-5 + E9-19	MM	3,5
	MM + lis + leu	2,8
	MM + lis + rib	2,5
	MM + bio + leu	2,8
	MM + bio + rib	2,9
E6-5 + E9-20	MM	3,6
	MM + lis + leu	2,8
	MM + lis + ade	3,8
	MM + bio + leu	2,9
	MM + bio + ade	3,8

Cont.

Tabela 28. Continuação.

Heterocários	Meios seletivos	Frequência de colônias ($\times 10^{-5}$)
E9-19 + RJ 31	MM	3,5
	MM + leu + lis	4,0
	MM + leu + bio	3,5
	MM + rib + lis	3,2
	MM + rib + bio	3,0
E9-19 + RJ 32	MM	3,0
	MM + leu + lis	3,5
	MM + leu + met	3,5
	MM + rib + lis	2,8
	MM + rib + met	3,5

Os resultados da Tabela 29 reforçam as observações de BAGALHI (1987) e VALADARES (1989) indicando a ocorrência da paramiose. VEGA (Comunicação pessoal) também encontrou resultados semelhantes trabalhando com mutantes das linhagens E6 e E9 de *M. anisopliae*.

Tabela 29. Freqüência de colônias recombinantes, obtidas a partir de heterocários, entre linhagens de *M. anisopliae*.

Heterocário	Nº de colônias analisadas	Marcas genéticas	Nº observado	Frequência (%)
E6-1 + E6-5	94	ade	20	21,28
		pro	2	2,13
		lis	10	10,64
		bio	2	2,13
		ade lis	1	1,06
		ade bio	3	3,19
		pro lis	1	1,06
		pro bio	2	2,13
		ade pro	15	15,96
		lis bio	18	19,15
		ade pro lis	1	1,06
		ade lis bio	1	1,06
		prototróficas	18	19,15
E6-1 + E6-7	98	ade	18	18,37
		pro	3	3,06
		met	2	2,04
		bio	2	2,04
		ade pro	21	21,43
		met bio	25	25,51
		ade met	2	2,04
		ade bio	1	1,02
		pro met	3	3,06
		pro bio	1	1,02
		ade pro met	2	2,04
		pro met bio	2	2,04
		ade pro met bio	1	1,02
prototróficas	15	15,31		

Cont.

Tabela 29. Continuação.

Heterocário	Nº de colônias observadas	Marcas genéticas	Nº observado	Frequência (%)
E6-1 + E9-12	80	ade	18	22,50
		pro	2	2,50
		met	3	3,75
		ade pro	11	13,75
		met lis	9	11,25
		ade met	1	1,25
		ade lis	1	1,25
		pro met	2	2,50
		pro lis	2	2,50
		ade met lis	2	2,50
		pro met lis	1	1,25
		prototróficas	28	35,00
E6-1 + E6-8	106	ade	23	21,70
		pro	2	1,89
		pir	2	1,89
		lis	2	1,89
		ade pro	23	21,70
		pir lis	19	17,92
		ade pir	2	1,89
		ade lis	2	1,89
		pro lis	2	1,89
		ade pro pir	2	1,89
		pro pir lis	2	1,89
		ade pro pir lis	1	0,94
prototróficas	24	22,64		

Cont.

Tabela 29. Continuação.

Heterocário	Nº de colônias analisadas	Marcas genéticas	Nº observado	Frequência (%)
E6-1 + E9-19	91	ade	22	24,18
		pro	4	4,40
		leu	3	3,30
		rib	2	2,20
		ade pro	19	20,90
		leu rib	11	12,10
		ade leu	1	1,10
		ade rib	1	1,10
		pro leu	2	2,20
		pro rib	1	1,10
		ade pro leu	1	1,10
		ade pro rib	2	2,20
		pro leu rib	1	1,10
		ade pro leu rib	1	1,10
		prototróficas	20	22,00
E6-5 + E9-19	83	lis	13	15,67
		bio	3	3,60
		leu	3	3,60
		rib	4	4,82
		lis bio	14	16,87
		leu rib	17	20,50
		lis leu	2	2,41
		lis rib	1	1,21
		bio leu	1	1,21
		bio rib	1	1,21
		lis bio leu	2	2,41
		lis bio rib	1	1,21
		lis leu rib	1	1,21
		bio leu rib	1	1,21
		prototróficas	19	22,90

Cont.

Tabela 29. Continuação.

Heterocário	Nº de colônias analisadas	Marcas genéticas	Nº observado	Frequência (%)	
E6-5 + E9-20	85	lis	12	14,12	
		bio	4	4,71	
		leu	3	3,53	
		ade	5	5,88	
		lis bio	18	21,18	
		leu ade	13	15,29	
		lis leu	2	2,35	
		bio ade	2	2,35	
		lis bio leu	1	1,18	
		lis leu ade	1	1,18	
		lis leu bio ade	1	1,18	
		prototróficas			
		E9-12 + E9-19	111	met	8
lis	3			2,70	
leu	5			4,50	
rib	1			0,90	
met lis	26			23,42	
leu rib	25			22,52	
met leu	2			2,80	
met rib	2			1,80	
lis leu	1			0,90	
met lis rib	1			0,90	
met leu rib	2			1,80	
met lis leu rib	1			0,90	
prototróficas	33			29,73	

Cont.

Tabela 29. Continuação.

Heterocário	Nº de colônias analisadas	Marcas genéticas	Nº observado	Frequência (%)
E9-19 + RJ 31	69	leu	5	7,25
		lis	3	4,35
		bio	1	1,45
		leu rib	17	24,64
		lis bio	9	13,04
		leu lis	2	2,90
		leu bio	2	2,90
		leu rib lis	1	1,45
		prototróficas	29	42,03
E9-19 + RJ 32	52	leu	1	1,93
		rib	1	1,93
		lis	1	1,93
		met	1	1,93
		leu rib	15	28,85
		lis met	10	19,23
		leu lis	1	1,93
		leu met	1	1,93
		leu rib lis	1	1,93
		rib lis met	1	1,93
		leu rib lis met	1	1,93
		prototróficas	18	34,62

4.9.3. A parameiose como mecanismo promotor de variabilidade

O fenômeno da parameiose, como inicialmente descrita por BONATELLI Jr. et alii (1983), apresenta muitas evidências de que esteja ocorrendo em *M. anisopliae*.

BAGALHI (1987) observa que a parameiose pode ser analisada sob duas óticas divergentes. A primeira é de que não tenha um significado biológico real e que seja somente produto de uma condição forçada de formação de diplóides. Estes haploidizariam rapidamente em função do crescimento desbalanceado e lento enquanto os produtos originados da não disjunção apresentariam maior velocidade de crescimento. A segunda é de que seja resultado de um processo evolutivo. De acordo com este ponto de vista a parameiose também pode ser entendida como meiose primitiva ou que este processo tenha surgido em alguns grupos de fungos que perderam a capacidade de reprodução sexual.

THOMAS et alii (1983), CASSELTON (1985) e BAGALHI (1987) observam que em fungos heterotálicos com tipos sexuais diferentes poderiam ocorrer situações que favorecem um tipo sexual em detrimento do outro e que se essa força seletiva se mantivesse constante por algum tempo levaria à extinção um dos tipos sexuais. Observa também

BAGALHI (1987) que a "luta entre sexos" como proposto por DAWKINS (1979) pode assumir uma situação especial em fungos onde as reproduções sexuadas e assexuadas possam coexistir numa mesma espécie, produzindo propágulos em ciclos curtos e isto poderia ser uma possível explicação para a perda da reprodução sexuada em fungos imperfeitos, os quais passariam a contar com processos parassexuais de recombinação.

A parassexualidade é um processo importante na manutenção da variabilidade genética e na adaptação de fungos imperfeitos embora tenha sido negligenciada em estudos recentes de evolução dos sistemas reprodutivos (BAGALHI, 1987).

A parassexualidade é um poderoso instrumento de variabilidade em fungos fitopatogênicos e fungos de interesse industrial (PONTECORVO, 1956; AZEVEDO, 1987).

ROPER (1952) foi quem primeiro descreveu uma metodologia para obtenção de heterocários diplóides em *Aspergillus nidulans* e PONTECORVO et alii (1953) descreveram o ciclo parassexual em *Aspergillus niger*.

O ciclo parassexual envolve etapas de heterocariose, fusão nuclear, diploidização e haploidização (AZEVEDO, 1987).

A fase diplóide quando altamente instável e com possibilidades de permutas mitóticas geraria recombi-

nantes haplóides, o que caracteriza a parameiose (BONATELLI Jr. et alii, 1983).

A fase diplóide instável poderia surgir de uma pressão seletiva para menor eficiência em absorção de nutrientes, segundo a hipótese de LEWIS (1985) que especula que a escassez de nutrientes favoreceria a manutenção de condições haplóides em determinados grupos de organismos em detrimento das possíveis vantagens da condição diplóide.

A outra possibilidade sugerida por BAGALHI (1987) observa que a parameiose seria a manifestação de uma meiose primitiva e que ao contrário da meiose não apresentaria pareamento de todos cromossomos homólogos. Entretanto a possibilidade de ocorrência desse pareamento não deve ser descartada pois ROPER & PRITCHARD (1955) detectaram evidências de que a permuta mitótica é recíproca e ocorre no estágio de 4 fios.

Embora provavelmente a parameiose, dado o seu caráter mais primitivo, não deva contar com um controle genético elaborado não deixa de ser um mecanismo gerador de variabilidade em fungos deuteromicetos como o *Metarhizium anisopliae*.

4.10. Agrupamento de linhagens segundo taxonomia numérica

As Figuras 28 a 34 mostram os fenogramas resultantes das análises em conjunto de 23 variáveis obtidas através de padrões eletroforéticos das 10 linhagens selvagens de *M. anisopliae* (isoenzimas e DNA mitocondrial) e de 23 variáveis obtidas através de quantificações de produções de exoenzimas e produção e regeneração de protoplastos em três diferentes estabilizadores osmóticos e a partir de hifas e tubos germinativos.

Esses fenogramas mostram a intensa variabilidade existente entre as linhagens, permitindo agrupá-las de maneiras diferentes segundo os parâmetros adotados.

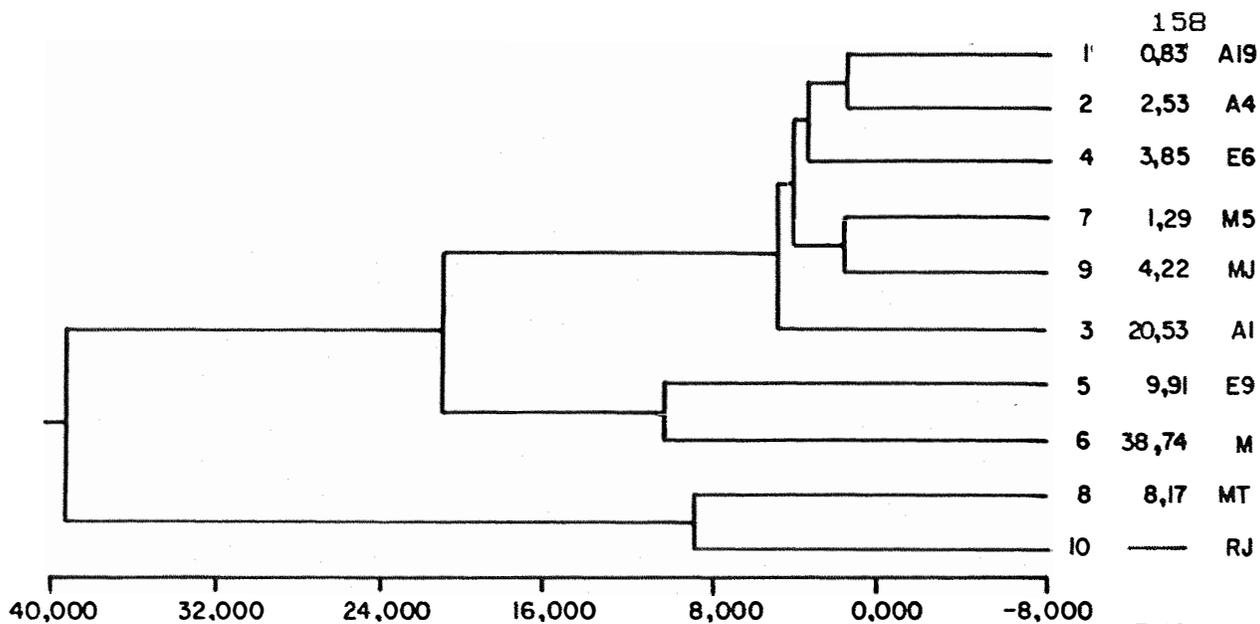


Figura 30. Fenograma resultante dos agrupamentos por UPGMA, baseado na distância de Balakrisman e Sanghri (BS) para dados de exoenzimas e protoplastos (produção e regeneração).

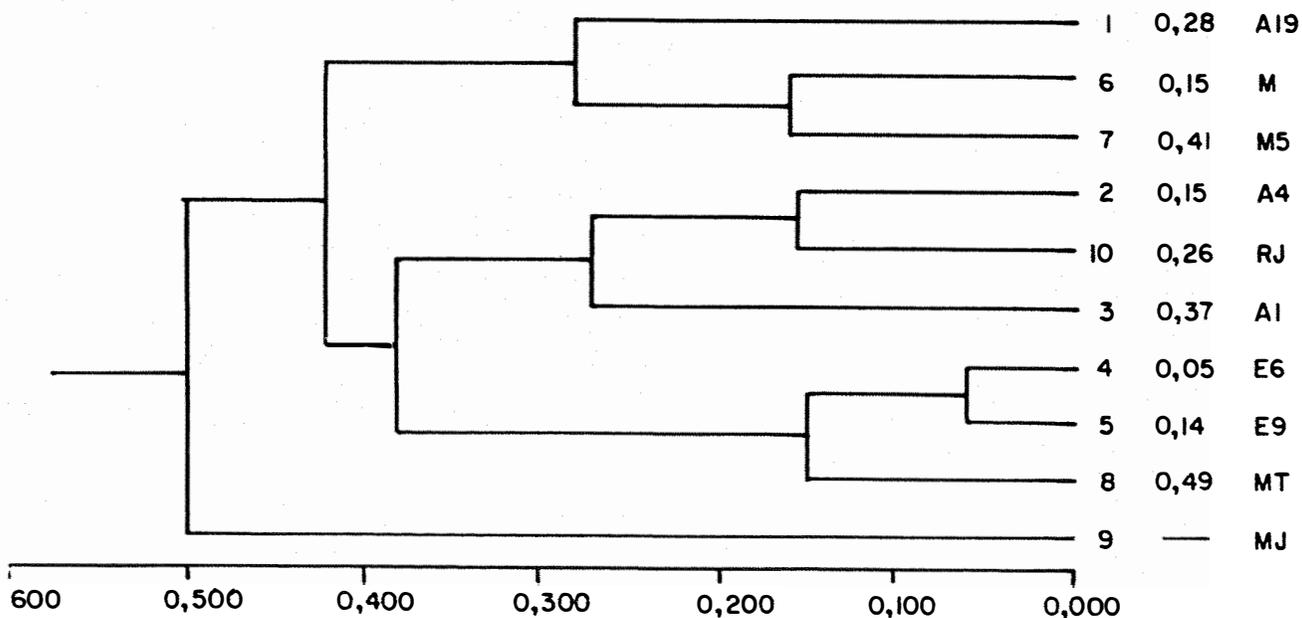


Figura 31. Fenograma resultante dos agrupamentos por UPGMA, baseado na distância de Nei para dados de isoenzimas e DNA mitocondrial.

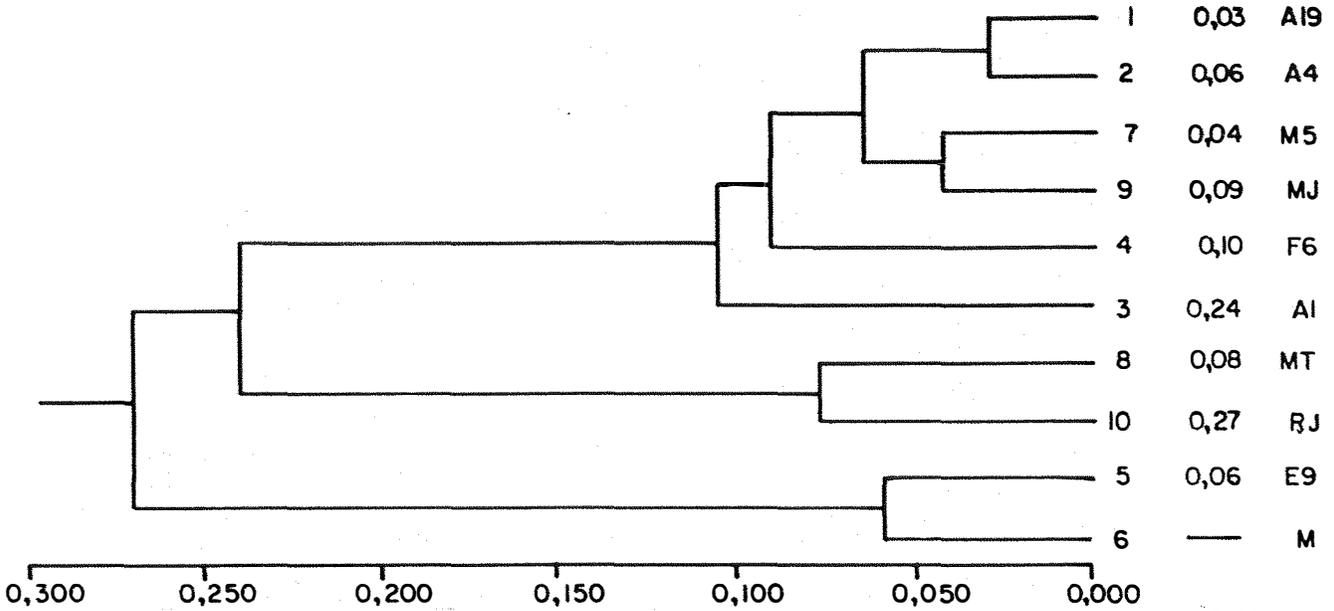


Figura 32. Fenograma resultante dos agrupamentos por UPGMA, baseado na distância de Nei para dados de exoenzimas e protoplastos (produção e regeneração).

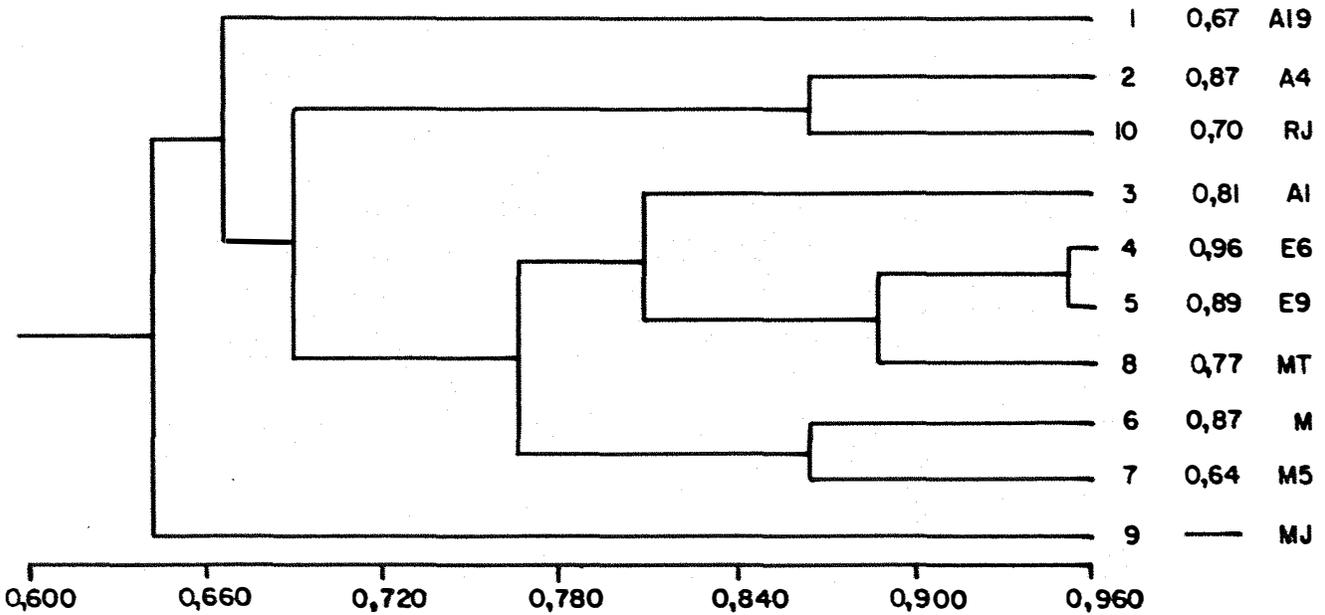


Figura 33. Fenograma resultante dos agrupamentos por UPGMA, usando-se o coeficiente Simple-Matching para dados de isoenzimas e DNA mitocondrial.

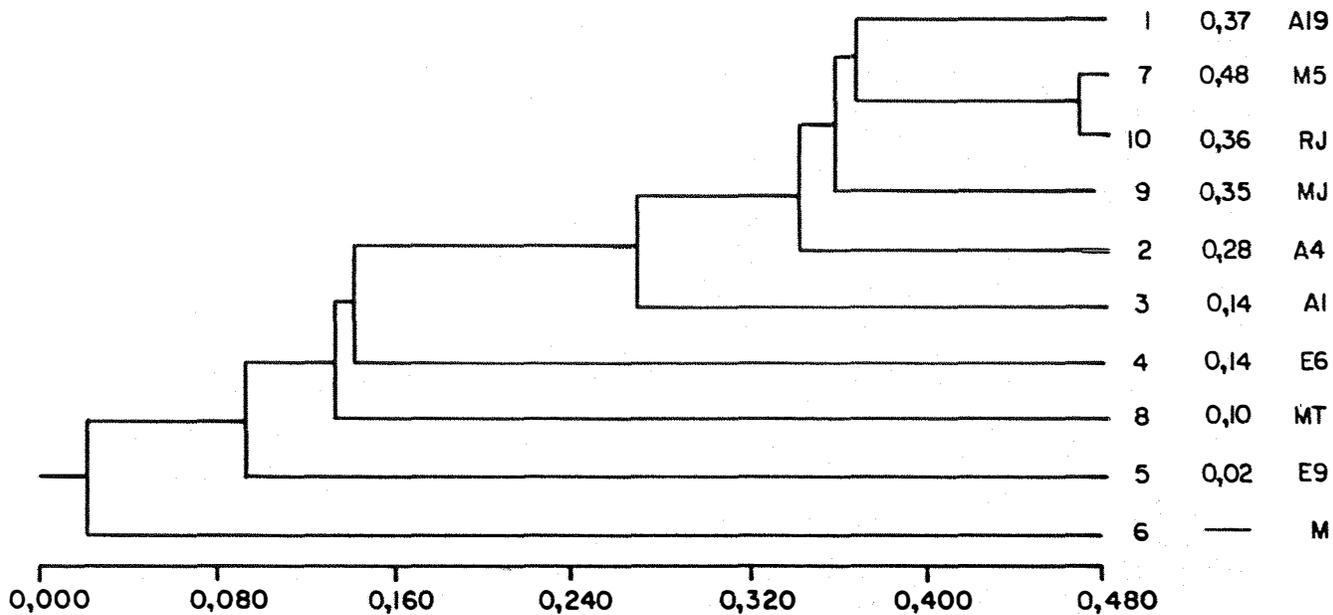


Figura 34. Fenograma resultante dos agrupamentos por UPGMA, usando-se o coeficiente Simple-Matching para dados de exoenzimas e protoplastos (produção e regeneração).

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- há variabilidade genética natural entre as linhagens selvagens de *Metarhizium anisopliae* que pode ser detectada pelas diferenças de sensibilidade à luz ultravioleta, obtenção e regeneração de protoplastos, produção de exoenzimas, padrão eletroforético para isoenzimas, análise do DNA mitocondrial e análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP);

- a análise do DNA mitocondrial é uma técnica indicadora de polimorfismo e auxiliar na taxonomia de fungos filamentosos;

- a análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) com marcação não radiativa de sondas é uma técnica de grande potencial como indicadora de variabilidade genética e muito propícia para laboratórios que não tenham

facilidades de uso de radioisótopos, embora em nosso caso o número e tipo de sondas utilizados não tenham sido suficientes para indicar polimorfismo;

- há fortes evidências de que a parameiose, caracterizada pela obtenção de recombinantes haplóides no heterocário em alta frequência e com evidências de permuta mitótica esteja ocorrendo em *Metarhizium anisopliae* e pode ser um mecanismo natural de amplificação da variabilidade genética em fungos filamentosos imperfeitos;

- construiu-se também um banco genômico em plasmídeo (CV13) a partir da linhagem E6, que servirá para futuras análises comparativas de linhagens e seleção de genes relevantes ao processo entomopatogênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHNE, F.; MERLOS-LANGE, A.M.; LANG, B.F.; WOLF, K. The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* 5. Characterization of mitochondrial deletion mutants. *Current Genetics*, Berlin, 8: 517-24, 1984.
- AL-AIDROOS, K. Demonstration of parasexual cycle in the tomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, 22: 309-14, 1980.
- AL-AIDROOS, K. & ROBERTS, D.W. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence toward mosquito larvae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, 20: 211-19, 1978.
- AL-AIDROOS, K. & SEIFERT, A.M. Polysaccharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 36: 29-34, 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.). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, Hamburg, 97: 403-6, 1984.
- ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M.L.; GOMEZ, D.R.S. Separação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin através da análise genética. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 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.
- ARAUJO, H.M.M.; LUNA, E.A.; AZEVEDO, J.L. Seleção de mutantes morfológicos em três linhagens de *Metarhizium anisopliae*. *Anais da 10a. Reunião Anual de Genética de Microorganismos*, Caxias do Sul, 1983.
- AZEVEDO, J.L. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 4: 157-168, 1972.
- AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 2: 3-15, 1976.
- AZEVEDO, J.L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S.O.P., coord. *Genética molecular e de microrganismos*. São Paulo, Manole, 1987. p.393-407.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de Genética, São Paulo, EDUSP, 1973. 288p.

- AZEVEDO, J.L.; OLIVEIRA, A.; ROCHA CAMPOS, A.J. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 2: 237-41, 1976.
- AZEVEDO, J.L. & MESSIAS, C.L. Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos. In: AZEVEDO, J.L. coord. *Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética*. Piracicaba, FEALQ, 1985. cap. 14, p.11-4.
- AZEVEDO, J.L.; CHACEL, N.M.; TIMO, P. Resistência à luz ultravioleta e mutantes de *Metarhizium anisopliae*. *Anais da 8a. Reunião Anual de Genética de Microrganismos*, Belo Horizonte, p.1, 1981.
- AZEVEDO, J.L.; TIMO, P.; CLARO, O.C. Eletroforese em mutantes morfológicos de *Metarhizium anisopliae*. *Anais da 10a. Reunião Anual de Genética de Microrganismos*, Caxias do Sul, 1983.
- BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1987. 123p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BALL, C. & HAMLIN, P.G. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic cephalosporin C. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 5: 1-13, 1982.

- BONATELLI Jr., AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.U. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 6: 399-405, 1983.
- BERGERON, D. & AL-AIDROOS, K.M. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomogenous fungus. *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, 24: 643-51, 1982.
- BROWN, A.; RAY, J.A.; WARING, R.B.; SCAZZOCHIO, C.; DAVIES, R.W. A mitochondrial reading frame which may code for a second form of ATPase subunit 9 in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, Berlin, 8: 489-92, 1984.
- BIRGES, H.D. **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London, Academic Press, 1981, 949p.
- BURR, B.; EVOLA, S.W.; BURR, F.A.; BECKMANN, J.S. The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In: SETHOW, J.K. & HOLLAENDER, A. (eds.). *Genetic engineering principles and methods*, New York, Plenum Press, 1983, vol. 5, p.45-59.
- CASSSELTON, 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.
- CALAM, C.T.; DAGLISH, L.B.; GAITSKELL, W.S. Hybridization 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.

- CHANG, L.T. & TERRY, C.A. Interage complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. *Applied Microbiology*, Washington, 25: 890-2, 1973.
- CLARK-WALKER, G.D.; McARTHUR, C.R.; SRIPRAKASH, K.S. Order and orientation of genic sequences in circular mitochondrial DNA from *Saccharomyces exiguus*: implications for evolution of yeasts mt DNAs. *Journal of Molecular Evolution*, New York, 19: 333-41, 1983.
- COLLINS, R.A. & LAMBOWITZ, A.M. Structural variations and optional introns in the mitochondrial DNAs of *Neurospora* strains isolated from nature. *Plasmid*, San Diego, 9: 53-70, 1983.
- CORREA, G.S. Influência da radiação ultravioleta e solar na viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 84p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- COSTA, C. & AZEVEDO, J.L. DNA mitocondrial em *Metarhizium anisopliae*. *Anais da 16a. Reunião Anual de Genética e Microorganismos*, Recife, p.28, 1989.
- CUMMINGS, D.J.; BELCOUR, L.; GRANDCHAMP, C. Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. I. Isolation and characterization. *Molecular and General Genetics*, New York, 71: 229-38, 1979.

- CUMMINGS, D.J.; BELCOUR, L.; GRANDCHAMP, C. Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures. *Molecular and General Genetics*, New York, 171: 239-50, 1979.
- DAS, A. & ILCZUK, Z. Spontaneous segregation of a heterozygous diploid of *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, Praha, 23: 362-5, 1978.
- DAVIS, B. Factors influencing protoplast isolation. In: PEBERDY, J.F. & FURENCZY, L., ed. *Fungal protoplasts - application in biochemistry and genetics*, New York, Marcel Dekker, Inc., 1985. p.45-71.
- DAWKINS, R. *O gene egoista*. Belo Horizonte, Itatiaia, 1979. 230p.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterase and phosphatases in eleven wild type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, Basel, 36: 329-4, 1980.
- EARL, A.J.; TURNER, G.; CROFT, J.H.; DALES, R.B.G.; LAZARUS, C.M.; LÜNSDORF, H.; KÜNTZEL, H. High frequency transfer of species specific mitochondrial DNA sequences between members of the Aspergillaceae. *Current Genetics*, Berlin, 3: 221-8, 1981.
- ECONOMOU, A.; LEES, V.; PUKKILA, P.J.; ZOLAN, M.E., CASSELLTON, L.A. Biased inheritance of optional insertions following mitochondrial genome recombination in the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus*. *Current Genetics*, Berlin, 11: 513-19, 1987.

- FARGUES, J.; DURIZ, T.; ANDRIEU, J.; POPEYE, E.; ROBERT, P. Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (DELACK) in champignon hyphomycete entomopathogène. *Comptes Rendues Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences, Paris, Ser. D*, 281: 1781-84, 1975.
- FRIGO, S.M. Variabilidade e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 119p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FRIGO, S.M. & AZEVEDO, J.L. A técnica do doador morto na fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae*. *Anais da 36a. Reunião Anual da SBPC, São Paulo*, p.856, 1984.
- FRIGO, S.M. & AZEVEDO, J.L. Meios de cultura e produção de conídios em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, 43: 285-93, 1986.
- FURLANETO, M.C. Recombinação genética e produção de celulas em *Trichoderma pseudokoningii* var. Rifai. Piracicaba, 1989. 152p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GAMBINO, J.; LAWRENCE, G.B.; MORRIS, M.R. Effect of mitotic and tubulin mutations on microtubule architecture in actively growing protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology*, New York, 99: 830-8, 1984.

- GARCIA, A.S.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; PIEDRABUENA, A.E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Ceratitidis capitata* (Wied.) (Diptera, Pephritidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, 28: 421-4, 1984.
- GODDARD, J.M. & CUMMINGS, D.J. Structure and replication of mitochondrial DNA from *Paramecium aurelia*. *Journal of Molecular Biology*, London, 97: 593-609, 1975.
- GOLDBACK, R.W.; BOLLEN-DE BOER, J.E.; VAN BRUGGEN, E.F.J., BORST, P. Replication of the linear mitochondrial DNA of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 562: 400-17, 1979.
- GROOT, G.S.P.; FLAVELL, R.A.; SANDERS, J.P.M. Sequence homology of nuclear and mitochondrial DNAs of different yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 378: 186-94, 1975.
- GROSSMAN, L.I. & HUDSPETH, M.E.S. Fungal mitochondrial genomes. In: BENNETT, J.W. & LASURE, L., ed. *Gene manipulation in fungi*, New York, Academic Press, 1985, p.65-103.
- GUAGLIUMI, P.; MARQUES, J.E., VILLAS BOAS, M.A. Contribuição ao estudo da cultura de *Metarhizium anisopliae* no controle da "cigarrinha-da-folha" *Mahanarva posticata* (Stal) no nordeste do Brasil. *Boletim Técnico da 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*. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, (1): 6-7, 1979.
- HANAHAN, D. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: GLOVER, D.M., ed. *DNA cloning*, vol. I, a practical approach, Oxford, IRL Press, 1986. 190p.
- HAMLIN, P.F.; BRADSHAW, R.K., MELLON, F.M., SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M., PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, Stoneham, 3: 321-3, 1981.
- HAMLIN, P.F.; BIRKETT, J.A.; PEREZ, G., PEBERDY, J.F. Protoplast fusion as a tool for genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. *Journal of General Microbiology*, London, 131: 2813-23, 1985.
- HASTIE, A.C. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. *Genetical Research*, Cambridge, 5: 305-15, 1964.
- HASTIE, A.C. & HEALE, J.B. Genetics of *Verticillium*. *Phytopathologia Mediterranea*, Barcelona, 22: 130-62, 1984.
- HINO, M.; NAKAYAMA, O.; TSURUMI, Y.; ADACHI, K.; SHIBATA, T.; TERANO, H.; HOHSAHA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H. Studies of an immuno-modulator, swainsonine. I. Enhancement of immune response by swainsonine in vitro. *Journal of Antibiotics*, Tokyo, 38: 926-35, 1985.

- HINTZ, W.E., MOHAN, M.; ANDERSON, J.B.; HORGAN, P.A. The mitochondrial DNAs of *Agaricus* heterogeneity in *A. bisporus* and homogeneity in *A. brunnescens*. *Current Genetics*, Berlin, 9: 127-32, 1985.
- HUBER, J. Untersuchungen zur physiologie insektentotender pilze. *Archives für Mikrobiologie*, Berlin, 29: 257-76, 1958.
- HULBERT, S.H.; ILOTT, T.W.; LEGG, E.J.; LINCOLN, S.E.; LANDER, E.S.; MICHELMORE, R.W. Genetic analysis of the fungus *Bremia lactucae* using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics*, Chapel Hill, 120: 947-58, 1988.
- ITO-KAGAWA, M.; KOYAMA, Y.; KONDO, S. Peptide antibiotic K-582 production in relation to amino acid metabolism in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Antibiotics*, Tokyo, 37: 487-93.
- KAWANO, S.; SUZUKI, T.; KUROIWA, T. Structural homogeneity of mitochondrial DNA in the mitochondrial nucleoid of *Physarum polycephalum*. *Biochemica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 696: 290-8, 1982.
- KINO, T.; INAMURA, N.; NAKAHARA, K.; KIYOTO, S.; GOTO, T.; TARANO, H.; KOHSAKA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H. Studies of an immunomodulator, Swainsonine. II. Effect of Swainsonine on mouse immunodeficient system and experimental murine tumour. *Journal of Antibiotics*, Tokyo, 38: 936-40, 1985.

- LANDRY, S.B.; KESSELI, R.V.; FERRARA, B.; MICHELMORE, R.W. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics*, Chapel Hill, 116: 331-7, 1987.
- LECUONA, R.E.; FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; BLEICHER, E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, à broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 15(Supl.): 217, 1986.
- LEWIS Jr., W.M. Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploid. *American Naturalist*, Chicago, 125: 692-702, 1985.
- LIHNELL, D. Gronmykos fororsakeo an *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. II. Fisiologia Undersokningar over gronmykosens swamps. Apud: MESSIAS, C.L. *Parassexualidade em Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979, 73p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- LONSDALE, D.M. A review of the structure and organization of the mitochondrial genome of higher plants. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, 3: 201-6, 1985.
- LORD, J.C. Fungos entomopatogênicos. In: Curso de Controle Microbiológico de Pragas de Caupi e Feijão, 3, Goiânia, 1986. Goiânia, EMBRAPA, 1986. 15p.

- LUGLI, J. & MESSIAS, C.L. Obtenção de mutantes de *Metarhizium anisopliae*. Anais da 8a. Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Belo Horizonte, p.14, 1981.
- LUGLI, J. & MESSIAS, C.L. Parassexualidade em diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, 3: 15-6, 1982.
- LUGLI, J. & MESSIAS, C.L. Produção de dextruxina A por linhagens selvagens e mutantes de *Metarhizium anisopliae*. Anais da 11a. Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Londrina, p.21, 1984.
- LUNA, E.A. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens mutantes e diploides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Rio de Janeiro, 1985. 250p. (Doutoramento - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- LUNA, E.A.; ARAUJO, M.H.M.; AZEVEDO, J.L. Análise citológica e indução de mutantes auxotróficos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Anais da 35.a Reunião Anual da SBPC, Belém, p.647, 1983.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982. 545p.
- MATANMI, B.A. & LIBBY, J.L. Scanning electron microscopy of *Entomophthora virulenta* and *Conidiobolus coronatus*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 26: 165-70, 1975.

- MATOS, A.J.A. Crescimento, germinação, conidiação e resistência a luz ultra-violeta de linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Campinas, 1983. 78p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- McARTHUR, C.R. & CLARK-WALKER, G.D. Mitochondrial DNA size diversity in the *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *Current Genetics*, Berlin, 7: 29-35, 1983.
- MESSIAS, C.L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979. 73p. Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.
- MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Parassexualidade in the deuteromicete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 75: 473-77, 1980.
- 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.
- MESSIAS, C.L.; ROBERTS, D.W.; GREFFID, A.T. Pyrolysis gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*: an aid to strain identification. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 42: 393-6, 1983.
- OKINO, L.A.; SILVA, J.C.; SANTOS, A.L.L.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. *O Solo*, Piracicaba, 70: 32-6, 1978.

- PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Variabilidade e recombinação genética no deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Piracicaba, 1988. 193p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. Manual de técnicas eletroforéticas em microorganismos. Piracicaba, FEALQ, 1988, 54p.
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts; isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, 33: 21-39, 1979.
- PEBERDY, J.F. Protoplasts fusion - a tool for genetic manipulations and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme Microbiology and Technology*, Stoneham, 2: 23-9, 1980.
- PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, 10: 393-400, 1956.
- PONTECORTVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.D.; BUFTO, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, 5: 141-238, 1953.
- RIBA, G.; BOUVIER-FOUCADE, I.; CAUDAL, A. Isoenzymes polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hypomyces) entomogenous fungi. *Mycopathologia*, Dordrecht, 96: 126-9, 1986.

- RIBA, G.; GLANDARD, A.; RAVELO, J.A.M.; FERRON, O. Isolement de recombinés mitotiques stables de type "intermediaire" chez *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) par hybridization de biotypes sauvages. *Comptes Rendues de la Academie de Sciences, Paris*, 29: 657-60, 1980.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc - Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.40. New York, Exeter Publishing Ltd., 1988. 144p.
- ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia, Basel*, 8: 14-5, 1952.
- 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*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 38: 1-3, 1981.
- SANTOS, A.L.L. & AZEVEDO, J.L. Resistência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em relação a três fungicidas. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 13: 272-8, 1982.
- SCAGLIA-PACHECO DE ALMEIDA, M. Caracterização de exoenzimas produzidas por linhagens selvagens do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1988. 40p. (Relatório apresentado ao CNPq - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- SILVA, J.C. Virulência de mutantes exoenzimáticos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e seus revertentes a *Rhodnius prolixus*. Campinas, 1985. 161p. (Doutorado - Universidade Estadual de Campinas).
- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. Virulência de alguns mutantes de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus* e obtenção de revertentes. Anais da 10a. Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Londrina, p.10, 1984.
- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. Virulência of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* towards *Rhodnius prolixus*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 48: 368-74, 1986.
- SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L.; PEDRABUENA, A.E. Virulência de alguns mutantes de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*. Anais da 35.a Reunião Anual da SBPC, Belém, p.703, 1983.
- SILVEIRA, W.D. Obtenção de fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 153p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Obtenção de mutantes pela técnica de enriquecimento em *Metarhizium anisopliae*. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, 3: 14, 1982.

- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 7: 1-8, 1984.
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme Microbiology Technology*, Stoneham, 9: 149-152, 1987.
- SILVEIRA, W.D.; ANDRADE, L.R.M.; AZEVEDO, J.L. Produção e viabilidade de protoplastos em *Metarhizium anisopliae*. *Anais da 10a. Reunião Anual de Genética de Microrganismos*, Caxias do Sul, p.17, 1983.
- SNEATH, P.H. & SOKAL, R.R. Numerical taxonomy, San Francisco, Freeman, 1973. 573p.
- THOMAS, D.S.; SURYANARAYANA, K.; MANAVATHU, E.K. Asexual reproduction coupled with heterothalism; possible consequences for fungi. *Journal of Theoretical Biology*, London, 105: 373-8, 1983.
- TINLINE, R.D. & NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, New York, 63: 701-12, 1971.
- TINLINE, R.D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, New York, 63: 713-21, 1971.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 66: 407-11, 1976.

- TYPAS, M.A. Heterokaryon incompatibility and interespecific hybridization between *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae* following protoplast fusion and microinjection. *Journal of General Microbiology*, London, 129: 3043-56, 1983.
- TYPAS, M.A. & HEALE, J.B. DNA content of germinating spores, individual hyphal cells and resting structure cells of *Verticillium* spp. measured by microdensitometry. *Journal of General Microbiology*, London, 121: 231-42, 1980.
- VALADARES, M.C.C. Genética e produção de ezoenzimas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1989. 160p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- VALARINI, M.J. Métodos de biologia molecular e esferoplastização aplicados à *Rhizobiaceae*. Piracicaba, 1989. 137p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- VALLE, T.L.; FRIGO, .; AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L. Variabilidade em linhagens haploides e diploides de *Metarhizium anisopliae*. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 6, Campinas, 1980. **Resumos...** Campinas, Sociedade Entomológica do Brasil, 1980. p.346.
- VEEN, K.H. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 9: 276-8, 1967.

- VEEN, K.H. Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. Mededelingen van de Landbouwhoogeschool Wageningen, Wageningen, 68: 1-77, 1968.
- VEIGA, A.F.S.L. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, como opção para o controle biológico das cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) no estado de Pernambuco. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico (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.
- WARD, B.L.; ANDERSON, R.S.; BENDICH, A.J. The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). Cell, Cambridge, 25: 793-803, 1981.
- WEBER, C.A.; HUDSPETH, M.; MOORE, G.P.; GROSSMAN, L.I. Analysis of the mitochondrial and nuclear genomes of two basidiomycetes, *Coprinus cinereus* and *Coprinus stercorearius*. Current Genetics, Berlin, 10: 525-25, 1986.
- WESLOWSKI, M. & FUKUHARA, H. Linear mitochondrial deoxyribonucleic acid from the yeast *Hansenula mrakii*. Molecular and Cellular Biology, Washington, 1: 387-93, 1981.
- WU, M.M.J.; CASSIDY, J.R.; PUKKILA, P.J. Polymorphisms in DNA of *Coprinus cinereus*. Current Genetics, Berlin, 7: 385-92, 1983.

ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). I. Dormant and Germinating conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 15: 63-80, 1970.

ZACHARUK, R.Y. Electron-microscope studies of the histopathology of fungal infections by *Metarhizium anisopliae*. *Publications of the Entomological Society of America*, Washington, 9: 112-9, 1973.