OBTENÇÃO E FUSÃO DE PROTOPLASTOS EM *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA

Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

- Orientador -

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro 1982

Aos meus pais, irmãos
e à minha noiva e
família,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho e, em especial:

. Ao mestre e amigo Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, que, como modelo de pessoa, orientação, estímulo e dedicação possibilitou-me a realização deste trabalho.

. À Profª Drª Aline Aparecida P. Kleiner, pela orientação inicial e amizade.

. Ao prof. Dr. Felizardo Penalva da Silva, pela amizade, estímulo, apoio e conhecimentos transmitidos.

. Ao Prof. Dr. Manoel Vitor Franco Lemos, pela primeira chance de contato com a Genética de Microrganismos.

. Ao Prof. Spartaco Astolfi Filho, pelo estímulo e apoio.

. Ao amigo Nuno M. Chacel, pela realização de parte do trabalho fotográfico, pela concessão da linhagem Manaus e companheirismo constante.

. Ao Prof. Mário Pederneiras, pela revisão dos originais.

. Ao Departamento de Genética, na pessoa de seu Diretor, Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades iniciais concedidas.

. Ao Laboratório de Genética e Evolução da Universidade de Brasília, na pessoa do Chefe de Departamento do Instituto de Biologia Animal, pelo apoio material e humano sem os quais este trabalho não seria possível.

. Ao amigo Paulo Eduardo Moretti, pela convivência.

. Aos técnicos dos Laboratórios de Genética da ESALQ/USP e Genética e Evolução da UnB.

. Aos amigos do Laboratório de Genética e Evolução da UnB, Elza Luna, Maria de Fátima Alves, Elaine Santos, Leide Rovênia, Petrônio Timo, Walter Cézar, Gláucia, Pedro, Ornil, Rose e Pituka, pela amizade e auxílio.

. À Adriana, pela amizade, amor, compreensão e estímulo.

. Aos meus pais Djalma e Irene, pela confiança e tranqüilidade que demonstraram ao longo deste "caminho".

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O fungo *Metarhizium anisopliae*	4
2.1.1. Classificação e Descrição	4
2.2. Isolamento e Caracterização de Mutantes	7
2.3. O Ciclo Parassexual	16
2.4. Protoplastos	23
2.4.1. Isolamento	23
2.4.2. Fusão	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Linhagens utilizadas	41
3.2. Meios de Cultura e soluções utilizadas	41
3.2.1. Meio mínimo (MM)	41
3.2.2. Meio completo (MC)	42
3.2.3. Meio mínimo líquido	42
3.2.4. Meio completo líquido	43
3.2.5. Meio mínimo mais 2% de Meio completo e meio mínimo mais 4% de Meio completo.....	43
3.2.6. Meio completo 2 vezes concentrado	43
3.2.7. Meio mínimo 2 vezes concentrado	43

Página

3.2.8.Meio mínimo líquido para enriquecimento.. 44
3.2.9.Meio para crescimento de micélio 44
3.2.10.MMKCl para reversão e obtenção de produtos de fusão 44
3.2.11.MCKCl para obtenção de crescimento de células totais 44
3.2.12.Solução de vitaminas 45
3.2.13.Solução de ácido nucleico de leveduras . 45
3.2.14.Suplementos adicionados ao meio mínimo.. 46
3.2.15.Solução Salina 47
3.2.16.Solução de Tween 47
3.2.17.Solução de Caseína Hidrolisada 47
3.2.18.Solução de Albumina 5% 47
3.2.19.Solução de Cloroneb 48
3.2.20.Tampão fosfato pH 5,8 48
3.2.21.Tampão fostato pH 6,9 49
3.2.22.Tampão Lítio-Borato pH 8,3 49
3.2.23.Tampão Tris-Citrato pH 8,3 49
3.2.24.α-Naftilacetato 50
3.2.25.β-Naftilacetato 50
3.2.26.Solução para revelação de esterases 50
3.2.27.Solução de perssulfato de amônia (AP) .. 50
3.2.28.Solução de Álcool Etílico 50
3.2.29.Solução de Giemsa 51
3.2.30.Solução de Fixação 51

Página

3.2.31.Solução de KCL 1,4 M pH 5,8 51

3.2.32.Solução de KCL 0,7 M pH 5,8 52

3.2.33.Solução de PEG 52

3.2.34.Solução de enzimas para produção de protoplastos 53

3.2.35.Solução de Difenilamina 53

3.2.36.Solução de ácido perclórico 53

3.2.37.Solução 5 mM NaOH 53

3.2.38.Solução estoque de DNA 54

3.2.39.Gel de acrilamida 54

3.2.40.Sistema de filtro para técnica de enriquecimento 54

3.2.41.Filtros Buchner para micélio 54

3.2.42.Uso de palitos para transferência de colônias 55

3.2.43.Esterilização e incubação 55

3.3. Sobrevivência à luz ultra-violeta 55

3.3.1. Determinação do tempo de enriquecimento por filtração para obtenção de mutantes auxotróficos 56

3.3.2. Obtenção de mutantes morfológicos 57

3.3.3. Obtenção de mutantes auxotróficos 58

3.3.4. Teste de Reversão 59

3.3.5. Determinação do tempo para produção de protoplastos 59

3.3.5.1. Produção de Protoplastos 60

Página

3.3.6. Contagem de protoplastos 61
3.3.7. Fusão de protoplastos 61
3.3.8. Verificação da presença de hifas, esferoplastos e conídios na suspensão de protoplastos 62
3.3.9. Teste de reversão em protoplastos 62
3.3.10. Obtenção de heterocários 63
3.3.10.1. Fusão de Protoplastos 63
3.3.10.2. Frequencia de fusão de protoplastos 63
3.3.10.3. Análise de setores oriundos de colônias obtidas em fusão de protoplastos 63
3.3.10.4. Obtenção de heterocário pela metodologia clássica 64
3.3.10.5. Obtenção de diplóides 65
3.3.10.6. Haploidização de diplóides 65
3.4. Coloração de conídios 65
3.4.1. Medida do tamanho dos conídios 66
3.4.2. Determinação do número de núcleos por conídio 66
3.5. Determinação dos padrões de esterases 67
3.5.1. Preparação das amostras 67
3.5.2. Placa de gel de acrilamida 67
3.5.3. Aplicação das amostras e corrida de eletroforese 68

Página

3.5.4. Revelação das esterases e plastificação do gel. 69

3.6. Extração e dosagem de DNA 69

4. RESULTADOS 71

4.1. Sobrevivência à Luz ultra-violeta 71

4.2. Determinação do tempo de enriquecimento por filtração e obtenção de mutantes auxotróficos 76

4.3. Teste de reversão 82

4.4. Produção de protoplastos 83

4.5. Obtenção de heterocários 86

4.5.1. Metodologia clássica 86

4.5.1.2. Obtenção de diplóides e segregação 87

4.5.1.3. Análise da variabilidade genética das linhagens selvagens, mutantes e setores 92

4.5.1.4. Tamanho dos conídios e conteúdo de DNA por conídio das linhagens selvagens, mutantes e setores.. 92

4.5.2. Fusão de Protoplastos 96

5. DISCUSSÃO 105

5.1. Indução de mutação com luz UV e obtenção de mutantes auxotróficos 105

5.2. Ciclo parassexual 107

Página

5.2.1. Análise clássica 87

5.2.2. Produção e fusão de protoplastos 110

5.2.3. Análise genética dos cruzamentos realizados 113

6. CONCLUSÃO 115

7. LITERATURA CITADA 118

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela

1 Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à luz ultra-violeta do isolado selvagem E_6 72

2 Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes à luz ultra-violeta do isolado selvagem RJ-3 73

3 Porcentagem relativa no número de colônias mutantes e selvagens dos isolados E_6 e RJ-3 para os diferentes tempos de agitação após filtração ... 78

4 Mutantes obtidos com a técnica de enriquecimento por filtração 78

5 Mutantes obtidos nos isolados E_G e RJ-3 através de irradiação com luz ultravioleta..... 81

6. Freqüencia de reversão espontânea dos mutantes utilizados 82

7. Número de protoplastos produzidos em diferentes tempos de tratamento com o complexo lítico 83

8. Cruzamentos realizados para obtenção de heterocariose em *M.anisopliae* 88

9. Diâmetro de conídios, número de núcleos por conídio e conteúdo de DNA por conídio das linhagens selvagens e cruzamentos a partir dos mutantes obtidos a partir das primeiras..... 95

Página

10. Freqüência de reversão dos protoplastos utilizados para fusão, cruzamentos realizados e freqüencia de fusão para cada cruzamento. 99

11. Segregantes obtidos nas diferentes fusões de protoplastos em *M. anisopliae* 104

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curva de sobrevivência do isolado E_6 de *M.anisopliae* com luz ultra violeta ($\mu w/cm^2 . 10^{-2}/seg$)	74
2	Curva de sobrevivência do isolado RJ-3 de *M.anisopliae* com luz ultra-violeta ($\mu w/cm^2 . 10^{-2}/seg.$)	75
3	Esquema seguido para enriquecimento e obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos	73
4	Porcentagem relativa entre colônias auxotróficas e prototróficas por tempo de cultivo em MM do isolado E_6	79
5	Porcentagem relativa entre colônias auxotróficas e prototróficas do tempo de cultivo em MM do isolado RJ-3	80
6	Produção de protoplastos dos isolados E_6 e RJ-3 em diferentes tempos de tratamento frente ao complexo lítico	84
7	Protoplastos produzidos a partir de micélio de *M.anisopliae* tratado com complexo lítico, podendo-se observar a presença de esferoplastos e hifas (Aumento de 400X).....	85
8	Colônias heterocarióticas obtidas nos cruzamentos (Metodologia clássica)dentro do isolado E_6 de *M. anisopliae*	89

Página

9 Películas heterocarióticas resultantes do cruzamento (metodologia clássica) entre mutantes dos isolados E_6 e RJ-3 de *M.anisopliae*..... 90

10 Película heterocariótica apresentando "setores vigorosos" já em MM (cruzamentos: E_6 x E_6, E_6 x RJ-3)..... 91

11 Eletroforese em Gel de poliacriamida. Padrões de esterases (α e β) das linhagens envolvidas no experimento..... 93

12 Esquema obtido a partir dos padrões de esterase da figura 11..... 94

13 Esquema da metodologia utilizada para fusão de protoplastos em *M. anisopliae*..... 98

14 a.b. Desenvolvimento de colônias heterocarióticas em MM provenientes da fusão de protoplastos entre isolados de *M.anisopliae* (cruzamentos:E_6 x E_6, E_6 x RJ-3)..... 100

15-16 Desenvolvimento de colônias oriundas de fusão de protoplastos em MC entre isolados de *M. anisopliae* (cruzamentos: E_6 x E_6 , E_6 x RJ-3)..... 101

17 Placa mestra utilizada para repique em meios de cultura diferenciais, mostrando colônias obtidas de setores em MC (Disposição 5 x 5 + 1)..... 102

18 Colônias de *M.anisopliae* provenientes de fusão de protoplastos e apresentando desenvolvimento de coloração verde entre as mesmas (Fusão E_6 x E_6)..... 103

OBTENÇÃO E FUSÃO DE PROTOPLASTOS EM *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA
- Autor -

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO
Orientador -

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar a possibilidade de obtenção do ciclo parassexual no fungo *Metarhizium anisopliae*, dentro e entre duas linhagens designadas E_6 e RJ-3 que se diferenciam em várias características genéticas seja através de metodologia clássica ou através da fusão de protoplastos. Para isso, obtiveram-se mutantes morfológicos e auxotróficos induzidos por luz ultravioleta. Desenvolveu-se também uma técnica de enriquecimento por filtração para obtenção de mutantes auxotróficos, conseguindo-se um máximo de 6,13% de mutantes após crescimento em meio líquido por períodos intercalados de 20-24 horas e subseqüente filtração em cinco camadas de gaze esterilizada. O au

mento de mutantes obtidos em relação ao processo de isolamento total foi de 613 X prevalecendo a obtenção de mutantes auxotróficos para aminoácidos e ácido nucléico sobre os deficientes para vitaminas. Produção de heterocário foi obtida entre mutantes auxotróficos complementares da linhagem E_6, porém, não se logrou chegar ao estado diplóide. Com relação a heterocários entre mutantes auxotróficos das linhagens E_6 e RJ-3, com raras exceções, estes não foram obtidos. Os heterocários que se desenvolveram entre estas linhagens produziram setores que, através da medida da quantidade de DNA por conídio e padrão eletroforético de esterases, mostraram-se ser diplóides e hiper-haplóides. A produção média de protoplastos em cada linhagem foi de $0,9 \times 10^7$/ml para a linhagem E_6 e $1,33 \times 10^7$/ml para a linhagem RJ-3 após 2 horas e meia a 3 horas de tratamento frente ao complexo lítico. A técnica de fusão de protoplastos entre os mutantes auxotróficos e morfológicos envolvidos, ocorre com uma alta freqüência ($0,83 \cdot 10^{-5}$-$44,1 \cdot 10^{-5}$) e demonstrou que o estado heterocariótico é obtido, tanto nos cruzamentos dentro de linhagens como entre linhagens, ocorrendo recombinação e segregação, sem a obtenção do estado diplóide. Desse modo, a técnica de fusão de protoplastos constitui uma maneira viável para a obtenção de recombinação e variabilidade entre linhagens de *M. anisopliae* que sejam incapazes de apresentarem recombinação via metodologia clássica de ciclo parassexual, bem como abre a possibilidade de futuros estudos genéticos na referida espécie.

OBTAINMENT AND FUSION OF PROTOPLASTS IN *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA
- Author -

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO
- Adviser -

SUMMARY

The present work was carried out aiming the study of parasexuality in the fungus *Metarhizium anisopliae* using two differents strains designated E_6 and RJ-3 which have several distinct genetic characteristics. This was done by the classical processes and protoplast fusion. For this morphological and auxotrophic mutants were obtained after ultra-violet induction. Also a technique of enrichment by filtration was developed for auxotrophic mutants derivation. A maximum total of 6.13% mutants after growth by intercaleted periods of 20--24 hours in liquid medium and filtration. An increase of 613 X in relation of the total isolation method was obtained in this way most in relation to mutants which required amino-acids. Heterokaryon were produced between complementing aux-

otrophic and morphological mutants from strain E_6 but diploids were not produced. In relation to heterokaryon and auxotrophic mutants from E_6 x RJ_3, with rare exceptions heterokaryon were not produced. However, the rare heterokaryon produced sectors which were diploids and hyperhaploids after being tested by their DNA content and eletrophoresis. Protoplast production was 0.9×10^7/ml for strain E_6 and 1.33×10^7/ml for strain RJ-3 after 2.1/2 to 3 hours treatment by a lytic complex. The fusion protoplast technique has shown that heterokaryon were obtained in all crosses, with the occurrence of recombination and segregation without the diploid state. The protoplast fusion technique is in this way appropriated for the derivation of recombinants and to increase variability among strains of *M. anisopliae*.

1. INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, assume grande importância econômica no Brasil, pois é utilizado no controle de pragas das pastagens e cana-de-açúcar. Estas pragas (cigarrinhas), insetos da ordem Homoptera, família Cercopidae, atacam as culturas acima descritas e constituem-se em um dos sérios problemas para a Agricultura e especialmente para a pecuária em diversas regiões do país.

O estudo do ponto de vista genético neste fungo, portanto, reveste-se de importância primordial, pois é através dele que vai ser possível o melhoramento genético do mesmo incluindo, por exemplo, a combinação em uma única linhagem de características consideradas favoráveis no controle biológico, tais como produção de exoenzimas, patogenicidade, grau de infectividade, produção de conídios, velocidade de

crescimento, resistência a altas temperaturas e radiações. Além disso, o uso de linhagens melhoradas vai permitir a redução do uso de inseticidas, que entre tantas desvantagens propiciam o aparecimento de insetos resistentes, são dispendiosos quando aplicados em larga escala, destroem o equilíbrio ecológico, e são, em geral, altamente tóxicos.

O *M. anisopliae* contudo, sendo um Deuteromiceto, é desprovido de ciclo sexual e assim a recombinação genética é obtida apenas pelo ciclo parassexual recentemente determinado por MESSIAS e AZEVEDO em 1980. Este ciclo é dependente de processos como a fusão de hifas para obtenção de heterocário, a fusão de núcleos levando em geral a um estado diplóide e obtenção de recombinação via permuta mitótica e não disjunção. É importante então um estudo mais aprofundado desse ciclo, por exemplo, em outras linhagens além daquela onde o mesmo foi descrito. A determinação do ciclo parassexual dentro e entre outras linhagens de *M. anisopliae* ainda não estudadas geneticamente, permitirá que programas de melhoramento genético sejam feitos objetivando-se reunir em uma única linhagem características desejáveis existentes em inúmeras outras. Permitirá também verificar a possibilidade de cruzamento entre diferentes linhagens pelo processo parassexual clássico e pela técnica moderna que envolve fusão de protoplastos.

O presente trabalho terá então como objetivo o estudo de duas linhagens de *M. anisopliae* ainda não pesquisadas com relação aos diversos aspectos de sua

parassexualidade. Para isso, técnicas de enriquecimento para obtenção de mutantes auxotróficos nas mesmas serão pesquisadas, bem como serão tentados cruzamentos entre e dentro dessas linhagens pelo processo clássico e pela fusão de protoplastos.

2. REVISAO DE LITERATURA

2.1. O FUNGO *Metarhizium anisopliae*

2.1.1. CLASSIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um Deuteromiceto pertencente à ordem Moniliales, família *Moniliaceae* e foi descrito pela primeira vez em 1879 (METSCHNIKOFF, apud PETCH, 1931 e KENDRICK, 1971) quando encontrado na praga do milho *Anisopliae austriaca*, e classificado como *Entomophtora anisopliae*. Este mesmo autor (METSCHNIKOFF), reclassificou-o como *Isaria destructor* em 1880 e finalmente, foi classificado como *Metarhizium anisopliae* em 1883 por SOROKIN.

Foi descrito por BARON (1968) como tendo uma estrutura de formação de conídios agregada a hifas entrelaçadas e contendo uma massa compacta de conidióforos simples ou ramifica

cados, provenientes de células denominadas fiálides, às quais originam fialósporos não septados, cilíndricos e hialinos. Do mesmo modo, BARNETT (1960) verificou que as fiálides são simples, em pares ou espiraladas e MARCHIONATO (1942), verificou diferença na coloração de hifas produzidas internamente e externamente em insetos parasitados, sendo as internas arroxeadas e as externas hialinas.

Quanto à morfologia e tamanho dos conídios MARCHIONATO (1942), verificou que estes são cilíndricos, medindo 8 - 9µm x 2,5 - 3,0µm. Por sua vez BARNETT (1960), constatou que os conídios possuem morfologia variada de ovóide a cilíndricos, unicelulares, hialinos ou levemente pigmentados, dando ao conjunto um aspecto verde-oliva em massas compactas. Do mesmo modo, foi verificada a existência de duas formas em *Metarhizium anisopliae* (JOHNSTON, 1915); uma com conídios de 3,0 a 11,9 u de comprimento, denominada de variedade *Major* e outra com comprimento variando de 2-3,0 a 3,5 u e denominada variedade *Minor* . Esta variabilidade foi confirmada por FRIEDERICHS (1930; *apud* TULLOCH, 1976) que verificou a existência de uma forma longa de conídios variando de 6,0 a 8,0 u e por KAMAT *et al.* (1952; *apud* TULLOCH, 1976) sendo que neste último a varibilidade foi dependente do meio de cultura, sugerindo que a mesma (5 - 7,6 e 2,5 - 3,5 u) em nutriente ágar ; 8-14 e 3-4,5 u em meio de arroz) seria de natureza fisiológica. TINLINE (1971), procurando correlacionar tamanho de conídios com número de núcleos e quantidade de DNA por conídio nes

tas duas variedades (*Major e Minor*), verificou que o aumento no tamanho dos conídios não levava a um aumento no número de núcleos por conídio, embora houvesse variação na quantidade de DNA, com uma quantidade máxima na variedade *Major*.

Na mesma linha de estudos, FARGUES *et al.* (1975) através de estudos com imunoeletroforese, não detectaram diferenças imunológicas importantes entre as linhagens de conídios grandes (*Major*) e a de conídios pequenos (*Minor*).

Por sua vez, BALFOR-BROWE (1960) tratando larvas de *Eritrea sp* com conídios provenientes de linhagens que apresentavam esta variabilidade (*Major e Minor*), verificou que as mesmas eram afetadas e mortas pelas linhagens com conídios menores.

Quanto ao número de núcleos por conídios, normalmente o fungo apresenta-se com conídios uninucleados, provenientes de um conidióforo também uninucleado, sendo que os conídios maduros são provenientes da divisão durante a germinação, quando um núcleo filho migra para o tubo de germinação enquanto o outro permanece no conidióforo (TINLINE, 1971). Do mesmo modo, VEEN (1967) e ZACHARUK (1970a) estudando estes conídios através de microscopia eletrônica, haviam demonstrado que os mesmos eram uninucleados. ZACHARUK (1970 b), confirmou estes estudos constando a existência de conídios uninucleados sendo que, a presença de conídios binucleados seria resultante da germinação e migração de núcleos para o tubo de germinação. Por outro lado, MESSIAS *et al.* (1978) constataram através de coloração por Giemsa, a presença de conídios binucleados numa porcentagem de 5%.

Quanto à necessidade de requisitos nutricionais e condições de temperatura e pH para crescimento, o fungo *M. anisopliae* apresenta bom desenvolvimento nos mais variados meios de cultura (MARCHIONATTO, 1942; ADAMEK, 1965; EVLAKHOVA ,1966; HIDALGO-SALVATIERRA e BERRIOS, 1972; MARQUES e VILAS-BOAS,1973; AQUINO, 1974; VILLACORTA, 1978; MESSIAS, 1980), apresenta uma temperatura de crescimento ótima localizada entre 25ºC e 30ºC e pode desenvolver-se em grande faixa de pH (2,0 a 8,5) com um ótimo em torno de 6,9 (LIHNELL, 1944; ADAMEK,1965).

Devido ao grande número de isolados obtidos deste fungo, estudos comparativos para a caracterização através de métodos eletroforéticos (FARGUES, 1975; DE CONTI *et al.*,1980) e produção de enzimas extracelulares (ROSATO *et al.*,1981) têm sido realizados.

2.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES

Praticamente todos os estudos em genética de fungos sao baseados no estudo de mutações em loci específicos dos cromossomos, pois sem mutações os loci nunca poderiam ser identificados nem suas funções estudadas. A maioria das investigações genéticas são possíveis devido à ocorrência e preservação de mutantes em laboratório que dificilmente sobreviveriam em condições naturais. O desenvolvimento de métodos e-

ficientes de isolamento e caracterização de mutantes é então de grande importância.

O método mais direto, porém menos eficiente, para isolar mutantes auxotróficos em fungos, consiste em tratar uma população de esporos com um mutagênico qualquer e ensaiar individualmente sua capacidade de crescimento em meio mínimo com posterior passagem para meio completo. Deste modo, mutantes morfológicos, podem ser visualizados diretamente e mutantes auxotróficos, podem ser detectados pela ausência de crescimento em meio mínimo. Este método porém envolve manipulação de grande quantidade de células prototróficas e é limitado a fungos que crescem formando colônias de bordos definidos.

Se o fungo usado não possui crescimento colonial limitado, tanto mutantes para esta característica podem ser utilizados (linhagens que formam colônias compactas em qualquer meio), como também podem ser usados meios especiais que induzam a morfologia colonial em linhagens normais.

TATUM *et al* . (1950), trabalhando com *Neurospora* utilizaram os dois métodos acima mencionados, usando em alguns experimentos o duplo mutante *pe^m col-1* que possui crescimento colonial em qualquer meio de cultura e em outros o duplo mutante *pe^m inos* que cresce formando microcolônias em meios com concentrações limitantes de inositol. Os mesmos autores (*TATUM et al., 1949*) utilizaram um meio no qual o açúcar sacarose foi parcialmente substituido por um açúcar não

utilizável (sorbose) que reduz o crescimetno colonial.

MACKINTOSH e PRITCHARD (1963), introduziram o uso de desoxicolato de sódio a 0,08% no meio de cultura para acentuar a formação de microcolônias em *Aspergillus nidulans*.

LINDEGREN e LINDEGREN (1950), tentando usar conídios uninucleados, trabalharam com mutante microcolonial "*fluffy*" de *Neurospora crassa* que produz somente conídios uninucleados, após a superfície do meio ter sido umidecida com água esterelizada.

TATUM et al.(1950), para a mesma *Neurospora crassa*, preferiram usar outro mutante (pe^m) que tem a virturde de formar grande número de microconídios nos meios de cultura ordinariamente utilizados.

BEADLE E TATUM (1945), já haviam tentado resolver o problema de outra maneira, ou seja, irradiando macroconídios e usando-os para fertilizar protoperitécios de tipos de reação sexual oposta sendo que os ascosporos formados eram isolados em tubos de meio completo e germinados com choque térmico, esperando desse modo que os ascosporos mutantes constituissem metade dos existentes nos peritécios.

ROBERTS (1959), tentando diminuir o número de repicagens em *Aspergillus nidulons* necessárias para ensaiar a auxonografia (PONTECORVO, 1949) de muitas colônias que este método requer, desenvolveu um repicador multifio que consiste de vários pinos de aço ajustados em uma superfície sólida.

MACKINTOSH E PRITCHARD (1963), utilizando o mesmo fungo (*Aspergillus nidulans*) e um repicador de veludo, foram capazes de replicar acima de 600 colônias de uma única vez simplesmente diminuindo o tamanho das colônias (meio de cultura com desoxicolato de sódio 0,08%).

MALING (1960), usou superfícies ou de veludo ou de papel de filtro para replicar colônias de *Neurospora* carregando duas marcas morfológicas (*crisp e ragged*) e que conferiam característica de microcolônias à mesma.

PONTECORVO (1949), estabeleceu metodologia para identificar façilmente um mutante auxotrófico (após o mesmo não ter crescido em meio mínimo). Esta consite em inocular-se suspensão de conídios do mutante auxotrófico em meio mínimo fundido, esperando-se esfriar e introduzindo pequenos cristais de várias substâncias em posições bem definidas na superfície do ágar. Após incubação, substâncias promotoras de crescimento propiciam o aparecimento de zonas de crescimento ao redor das mesmas.

Uma segunda metodologia que visa diminuir o número de células que passam por um selecionamento é a denominada de "Rescue" e que permite visualizar as colônias auxotróficas entre as prototróficas. Deste modo, REAUME e TATUM (1949) inocularam (após diluições convenientes) uma suspensão de células haplóides irradiadas de *Saccharomyces cerevisiae* em meio mínimo e incubaram por vários dias para permitir crescimento das células prototróficas. A posição em que estas células cresceram foi marcada e uma segunda

camada de meio completo fundido (à temperatura que não matasse os esporos, 45 - 50°C) foi adicionada sobre a primeira. As colônias que se desenvolveram após este procedimento foram isoladas e as mesmas após auxonografia, mostraram ser auxotróficas.

LEIN *et al.* (1948), usaram uma metodologia alternativa para a descrita acima (REAUME e TATUM, 1949) utilizando *Neurospora*; com o uso de microscópio foram transferidos para meio enriquecido os esporos que não cresciam ou que tinham crescimento retardado em meio mínimo. A mesma metodologia foi utilizada por BOONE et al. (1956) para *Venturia inaequalis*. A grande maioria dos esporos assim obtidos mostraram ser auxotróficos.

Em anos recentes, procedimento de isolamento total e métodos nos quais mutantes são obtidos por visualização direta, têm sido substituidos por métodos que resultem na eliminação seletiva dos sobreviventes prototóficos e permitem a sobrevivência de mutantes auxotróficos.

Assim, metodologia para enriquecimento por filtração, na qual uma suspensão de conídios selvagens tratados com agente mutagênico é suspensa em meio mínimo líquido e o prototrófico em crescimento é eliminado por filtrações sucessivas, através de alguma espécie de filtro esterilizado, faz com que o auxotrófico passe através do mesmo. Isto tem sido descrito para *Ophiostoma* (FRIES, 1947) *Neurospora* (WOODWARD et al., 1945; CATCHESIDE, 1954).

STRAUSS (1958), utilizando o método de enriquecimento por filtração com *Neurospora*, verificou que as células capazes de crescer em pequenas quantidades de vitaminas (liberadas pelos esporos quebrados, mortos ou prototróficos em crescimento) ou aqueles que requerem piridoxina ou inositol (morrem rapidamente em meio mínimo) não são obtidos no total de mutantes auxotróficos analisados. Obteve por outro lado, um grande número de mutantes requerendo arginina.

TAKAHASHI (1959), utilizou esta metodologia em uma linhagem floculante de *Saccharomyces cerevisiae* na qual células em brotamento tendem a permanecer juntas. O autor removeu conjuntos multicelulares de uma suspensão inicial por filtração em lã de fibra de vidro, irradiou as células resultantes, suspendeu-as em meio mínimo e após incubação, removeu a maioria dos protrotróficos sobreviventes com uma série de filtrações posteriores.

A técnica de enriquecimento por filtração tem sido também utilizada para obtenção de mutantes auxotróficos que venham a ser usados em posteriores estudos genéticos como em *Coprinus lagopus* (DAY e ANDERSON, 1961) e *Schizophyllum commune* (ANDERSON e DEPPE, 1977).

FRIES (1947), trabalhando com *Ophiostoma* mostrou que duplos mutantes para deficiência nutricionais, algumas vezes sobrevivem mais tempo em meio mínimo do que os mutantes únicos que lhe deram origem.

PONTECORVO *et al.* (1953), utilizaram estas observações (FRIES, 1947) e estabeleceram metodologia efetiva para obter mutantes auxotróficos em *A. nidulans*. Conídios de um mutante auxotrófico para biotina foram irradiados com luz ultra-violeta para que resultasse uma porcentagem de 5% de sobrevivência, semeados em meio mínimo (ágar) e cobertos com uma segunda camada do mesmo meio. Após um período de incubação que levasse à morte 99% dos mutantes com requerimento para biotina, uma camada de meio completo foi adicionada. Acima de 60% das colônias que cresceram após este procedimento, demonstrou-se serem auxotróficas. Este método foi denominado de enriquecimento por "Starvation".

LESTER e GROSS (1959), aplicando o mesmo princípio em *Neurospora*, isolaram duplos mutantes auxotróficos a partir de um mutante único requerendo inositol. Verificaram que o mutante auxotrófico único para inositol requeria de 2 - 4 dias a 34ºC para morrer. O mesmo método com inositol foi usado com *Saccharomyces cerevisiae* para obtenção de mutantes auxotróficos (CULBERTSON e HENRY, 1975).

ROMAN (1955), verificou que em *Saccharomyces cerevisiae*, mutantes para adenina acumulavam pigmento vermelho e que uma segunda mutação na mesma via biossintética da adenina em um passo anterior à formação de pigmento vermelho, levava ao acúmulo de pigmento branco ou rosa. Esta segunda mutação confere à levedura uma vantagem seletiva de tal modo que retarda o seu cres

cimento em meio de cultura quando comparada a primeira.

BACH E LACROUTE (1959), usando o princípio de bloquear a formação de um intermediário tóxico isolaram mutantes autróficos para Pirimidinas em leveduras.

MOAT *et al.* (1959), usando os mesmos princípios de DAVIS (1948) para obtenção de auxotróficos em *E. coli* com auxílio de penicilina, mostraram que em *Saccharomyces* com o auxílio de vários antibióticos entre os quais *anfotericina B*, *endomicina e nistatina* em meio mínimo líquido seguido de centrifugação e posterior semeadura em meio livre de antibióticos, a proporção de auxotróficos entre as células sobreviventes era 5 vezes maior do que na população original livre do agente de seleção. Verificou que uma alta proporção das células sobreviventes eram deficientes respiratórios citoplasmáticos. Este problema foi eliminado com o uso de uma forma mais solúvel de *anfotericina B* (*Fungozone*) (MOAT *et al.*, 1966).

A efetividade da *nistatina* através da mesma metodologia tem sido confirmada para *Saccharomyces* (*SNOW,1966*), *Penicillium chrysogenum* (*Mac DONALD,1968*) e *Rhodotorula mucilaginosa* (*COOK, 1974*). *YANO et al.*(*1981*) por sua vez, utilizaram o efeito sinergístico da combinação da *Nistatina e Periolnitrina* para enriquecimento de mutantes defectivos na utilização de hidrocarbonetos em *Candida tropicalis* e *Candida maltose*.

BAL *et al*, (1975), mostraram que o antibiótico N-glicosil polifungina mata conídios em germinação mas não coni-

dios não germinados de *Aspergillus nidulans* . Os autores usaram esta morte diferencial para a seleção de segregantes haplóides de prototróficos heterozigotos.

YOUNG *et al.* (1976), usando *Saccharomyces cerevisiae* e o antibiótico *neotropsina*, verificaram que este último tem a capacidade de selecionar auxotróficos, sendo que a razão para a seleção dos mesmos não é conhecida, mas suspeita-se que afete a síntese da membrana celular.

MAGNET (1965, 1965a) verificou que o análogo da glicose, 2 deoxiglicose, seleciona contra células em divisão em *Schizosaccharomyces pombe* e usou este composto para seleção de mutantes auxotróficos nesta levedura.

BIELY *et al.*(1971) usando o mesmo composto (2 deoxiglicose) em *Saccharomyces cerevisiae*, mostraram que o mesmo era incorporado nas paredes celulares das células tipo selvagem, causando aumento na sensibilidade devido a diminuições abruptas na pressão osmótica.

Um método que tem sido aplicado com muito sucesso em *Aspergillus flavus* (DONKERSLOOT e MATELES, 1968) *Saccharomyces cerevisiae* (LITTLEWOOD e DAVIS , 1973) e *Neurospora crassa* (RUSSEL e COHEN, 1976), depende da incorporação pelas células selvagens em meio mínimo ou a altas temperaturas de percursores de ácidos ribonucleicos ou proteínas marcados com tritium (^3H). Durante subsequente estocagem a baixa temperatura as células selva

gens tendem a ser mortas pela radiotividade que elas incorporam enquanto os mutantes auxotróficos e temperatura-sensíveis, que não são ativos em síntese macro-molecular durante o período de exposição ao precurssor marcado, tendem a sobreviver. O método parece ser efetivo no enriquecimento para mutantes auxotróficos e temperatura-sensíveis. MARTINDALE e PEARLMAN (1979), estabeleceram metodologia alternativa em *Tetrahymena termophila* para obtenção de mutantes defectivos em divisão celular e temperatura sensíveis tratando-se culturas com 5-bromodeoxiuridina (BUdR) e luz ultra-violeta. Deste modo, ocorre morte preferencial de células pela U.V. que tenham incorporado BUdR.

Em *M.anisopliae* mutantes morfológicos e auxotróficos tem sido obtidos para estudos de heterocariose (TINLINE *et al*, , 1971) parassexualidade e estudos genéticos (AL-AIDROSS,.. 1980, MESSIAS e AZEVEDO, 1980) porém sem o uso de métodos de enriquecimento.

2.3. O CICLO PARASSEXUAL

Apesar dos fungos apresentarem uma série de vantagens em estudos genéticos- crescimento rápido, facilidade de obtenção de um grande número de indivíduos (esporos) em espaço reduzido, crescimento em meios de cultura tanto definidos como complexos, facilidade de manuseio e obtenção de mutantes com o uso de agentes mutagênicos - até praticamente o primeiro terço deste século limitavam-se àqueles que apresentavam ciclo sexual (FICOMICETOS, ASCOMICETOS e BASIDIOMICETOS) envolvendo união de células haplóides e

posterior meiose com recombinação em seus grupos de ligação. Desta maneira, os fungos imperfeitos (DEUTEROMICETOS) por não apresentarem um mecanismo conhecido de recombinação genética na natureza, não se prestavam para estudos genéticos. Esta impossibilidade, porém, foi removida com os estudos de ROPER (1952) em *Aspergillus nidulans*, no qual o autor descreveu técnica usando mutantes mofológicos e nutricionais complementares, obtendo deste modo diplóides estáveis após fusão de hifas. A seguir, PONTECORVO E ROPER (1952) verificaram através deste mesmo fungo que os diplóides poderiam permanecer neste estado permanentemente ou produzir "diplóides homozigotos" para um ou vários marcadores; diplóides estes que teriam sido originados por algum tipo de "permuta" mitótica ou somática. A partir destes estudos, diversos trabalhos com *A. nidulans* foram publicados, tentando-se a localização de genes nos devidos grupos de ligação (PONTECORVO e ROPER, 1952; PONTECORVO et al., 1953 e PONTECORVO E KÄFER, 1958).

Uma vez este processo ter sido constatado, FORBES (1959) estabeleceu técnica baseada em segregação mitótica para localizar novos mutantes em grupos de ligação de *A. nidulans* e outros fungos, sendo a mesma fundamentada na observação de que linhagens diplóides sofrem haploidizações raras porém regulares sem apresentarem permuta. Desse modo, os membros individuais de cada par de grupos de ligação segregam como unidades inteiras e independentes, fazendo com que marcadores localizados em diferentes grupos de ligação mostrem livre

recombinação, enquanto que marcadores no mesmo grupo não recombinam. Assim, FORBES (1959), construiu linhagens mestras tendo marcadores em cada grupo de ligação. KAFER (1958), usando o mesmo princípio localizou cerca de 40 genes nos 8 grupos de ligação que *A.nidulans* possui, sendo que estes genes foram confirmados com o uso de análise meiótica.

Deste modo, para que se estabeleça a ocorrência de um ciclo parassexual, é necessária a fusão de hifas com marcas auxotróficas diferentes e complementares com conseqüente estabelecimento de um heterocário (núcleos diferentes em um citoplasma comum) em meio mínimo, fusão de núcleos, recombinação via permuta ou não dos grupos de ligação (PONTECORVO e KÄFER, 1958) e haploidização via não disjunção (KÄFER,1960, 1961; Mc CULLY e FORBES, 1965; BAL et al., 1975). A heterocariose, além de ser originada por fusão de hifas, também pode ocorrer por mutação (ISHITANI E SAKAGUCHI, 1956 e TINLINE, 1961) enquanto que a freqüencia de diplóides formados pode ser aumentada por agentes químicos ou físicos (PONTECORVO et al, 1953; DAY e JONES, 1969 e IKEDA et al., 1957).

Uma maneira de se reconhecer conídios diplóides apos heterocariose é através de medidas do volume desses conídios quando comparados com a linhagem haplóide. Também o conteúdo de DNA por núcleo pode ser utilizado. Algumas vezes o diplóide pode apresentar o volume igual ao dobro da haplóide (*A. nidulans*; ROPER, 1952) em outras não (*Ustilago maydis*; HOLLIDAY, 1961 - *Cochliobolus sativus*; TINLINE, 1962). O conteúdo de

DNA por núcleo é um método seguro para indicar a formação de diplóides (HEAGY e ROPER, 1952).

A descoberta do ciclo parassexual permitiu que houvesse melhoramento de fungos que possuem valor industrial pois a maioria desses é desprovida de ciclo sexual. Assim, a descoberta do ciclo parassexual em *Penicilium chrysogenun* aumentou a esperança de melhorar a produção de penicilina (PONTECORVO e SERMONTI, 1954) por exemplo. Nas primeiras tentativas (SERMONTI , 1959), a única linhagem que teve título de produção melhorada foi um diplóide. Mac DONALD *et al.*(1964, 1965) e Mac DONALD (1968) , encontraram duas dificuldades principais em seus trabalhos com *Penicillium*: a possível seleção contra segregantes de título alto e "segregação de genomas parentais", nos quais os haplóides do tipo parental eram preferencialmente recuperados. Esta última dificuldade foi provavelmente devido ao uso de haplóides parentais que diferiam um do outro no arranjamento cromossômico; por exemplo, uma translocação recíproca em um dos parentais poderia prevenir a recombinação e haploidização entre grupos de ligação. Isto foi resolvido contornando-se os problemas que são encontrados na haploidização e foi possível construir mapas de ligação que deram uma base para um programa de cruzamento mais racional usando-se mutantes com poucas marcas auxotróficas e o uso de p-fluorfenilalanina (pFA) como agente haploidizante (BALL, 1971). Dentro desta mesma espécie, SERMONTI (1956) já havia localizado por parassexualidade 2 locos que afetavam a produção de penicilina atra

vés do uso de heterocários balanceados e diplóides heterozigotos, obtendo-se também recombinantes através do uso de marcas auxotróficas complementares (SERMONTI e SPADA-SERMONTI, 1956).

Em fungos fitopatogênicos o ciclo parassexual foi descrito em *Penicillium expansum* (GARBER e BEHARA, 1965), embora BARRON (1962) não tivesse conseguido o ciclo neste mesmo fungo. Do mesmo modo, BUXTON (1956, 1962) conseguiu estabelecer o ciclo parassexual em *Fusarium oxysporum* com a obtenção de vários recombinantes entre as marcas parentais, inclusive marcas recombinantes para patogenicidade; BOONE *et al.* (1956) estabeleceu o ciclo parassexual em *Venturia inaequalis*; DUTTA e GARBER (1960) em *Colletotrichum lagenarium*; STROMNAES *et al.* (1964) em *Penicillium italicum*, e *Penicillium digitatum*; HOLLIDAY (1961) em *Ustilago maydiz*; KATZ e SUSSMAN (1972), MOSSES *et al.* (1975) e LOOMIS (1979) em *Dictyostelium discoideum*; HASTIE (1962, 1964) em *Verticillium albo-atrum*; BAUCH (1952) e DAY e JONES (1968) em *Ustilago violacea*. Este processo nos referidos fungos pode explicar o aparecimento de novas raças fisiológicas e permitir o estudo genético dos mesmos com a localização e quantificação dos genes envolvidos na patogenicidade.

Do mesmo modo, em outros fungos de importância econômica o ciclo parassexual também tem sido determinado (*Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae*, ISHITANI E SAKAGUCHI - 1956; ISHITANI *et al.*- 1956; A.oryzae, IKEDA *et al.* - 1957); havendo neste último caso um melhoramento na produtividade de protease em linhagens diplóides e

tetraplóides quando comparadas com as haplóides. Em *A.niger*, *DAS(1980)* procurou através de ciclo parassexual, obter melhoramento na produtividade de ácido cítrico porém o diplóide obtido e seus segregantes não diferiram significantemente dos haplóides parentais. De maneira semelhante, MESSIAS (1977) procurando correlacionar a parassexualidade em *A. flavus* com a produção de aflotoxina, estabeleceu que este caráter é complexo e possivelmente dependente de muitos genes.

Este processo de análise genética, mostrou ser um bom instrumento de localização de genes com consequente determinação do número de grupos de ligação em *Aspergillus nidulans* (PONTECORVO *et al.*, 1953; KÄFER, 1958; FORBES, 1959; Mc CULLY e FORBES, 1965); *Aspergillus niger* (PONTECORVO *et al.*, 1953; LHOAS, 1967) ; *Aspergillus flavus* (PAPA, 1973,1976); *Aspergillus fumigatus* (LEVADOUX *et al.*, 1981); *Aspergillus parasiticus* (VINNET e GOYNES,1980); *Aspergillus sp* (PEREIRA, 1978); *Dictyostelium discoideum* (WRIGHT *et al.*, 1977); *Aspergillus tamarii*, *A. ochraceus*, *A.wentii* (*ISHITANI e SAKAGUCHI, 1956*); *Cochliobolus sativus* (TINLINE, 1962) e *A.nidulans* (MENEZES e AZEVEDO, 1978) sendo que neste último, foi estudado a localização e tipos de genes (Mutação ou repressão) responsáveis pelo aparecimento de variantes deteriorados que revertem para o tipo morfológico parental.

Ressalte-se que no fungo entomapatogênico *Metarhizium anisopliae* a determinação do ciclo parassexual foi recentemente estabelecida (MESSIAS E AZEVEDO, 1980 e Al-AIDROOS, 1980). Os autores trabalharam com marcas para resistência (AL-AIDROOS) e marcas

para coloração e auxotrofia(MESSIAS,AZEVEDO,1980; AL-AIDROOS,.. 1980); sendo que os heterocários obtidos pelos primeiros autores foram verdes como o parental tipo selvagem. Diplóides foram obtidos, porém, com relação ao tamanho dos conídios, estes não apresentaram diferença significativa dos haplóides, havendo contudo,diferença no número de núcleos por conídio (os diplóides não se apresentaram binucleados), diâmetro dos núcleos dos conídios (o diâmetro nuclear dos diplóides foi maior) e a quantidade de DNA dos diplóides foi praticamente o dobro. Através do uso de Cloroneb (100 ug/ml) MESSIAS E AZEVEDO obtiveram, a partir dos diplóides, setores em meio completo que analisados mostraram-se ser em sua maioria do tipo parental, porém,alguns mostraram-se recombinantes. Por meio desses resultados, concluiram que este microrganismo possui poucos grupos de ligação com um número não superior a 4; o Cloroneb poderia estar atuando selecionando certas combinações gênicas que não apareceriam nos haplóides segregantes ou então, por efeito de luz ultra-violeta, translocações teriam ocorrido prevenido o aparecimento de certos tipos de recombinantes. Deste modo, abrem-se perspectivas de uso para esta metodologia em análise genética e melhoramento para aplicação industrial deste microrganismo.

2.4. PROTOPLASTOS

2.4.1. ISOLAMENTO

A técnica de obtenção e fusão de protoplastos, desde os primeiros relatos (EDDY e WILLIAMSON, 1957, 1959; BACHMANN e BONNER, 1959), tem adicionado uma nova dimensão ao estudo dos fenômenos parassexuais nos organismos que, ou não possuam o ciclo sexual bem estabelecido, ou que apresentem barreira impedindo a troca gênica, recombinação e consequente variabilidade genética entre e dentre linhagens. Essa técnica tem sido usada como uma "ferramenta" para a manipulação genética e cruzamento entre organismos de interesse industrial (PEBERDY, 1980) ou organismos que sejam utilizados em pesquisa básica (PEBERDY, 1979).

O isolamento de protoplastos de células microbianas, envolve a digestão total ou perfuração localizada da parede celular por enzimas, permitindo que o conteúdo celular envolvido pela membrana celular, seja liberado e mantenha-se estável em meio hipertônico.

Normalmente, a liberação de protoplastos envolve o uso de enzimas líticas que liberam os referidos protoplastos de uma maneira muito rápida. Isolamento de protoplastos de leveduras, geralmente envolve o uso de enzimas comerciais, sendo que EDDY e WILLIAMSON (1957, 1959) foram os primeiros a introduzir o uso de suco digestivo de *Helix pomatia* como complexo lítico para obter

protoplastos em *Saccharomyces cerevisiae*. Do mesmo modo, esta enzima tem sido usada extensivamente por outros pesquisadores em diferentes leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (DEUTCH e PARRY, 1974), *Schizosaccharomyces pombe* (SHAHIN, 1971, 1972; FOURY e GOFFEAU, 1973), *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (PARTRIDGE e DREWE, 1974). Por outro lado, numerosas outras enzimas têm-se mostrado úteis na obtenção de protoplastos. Assim, Zimoliase, uma enzima derivada de *Arthrobactus luteus*, tem sido usada para isolamento de protoplastos em *Candida albicans*, *C.guilliermondii*, *C.intermedia* e *C.tropicalis* (YAMAMURA *et al.*, 1975). Outros microorganismos que produzem enzimas para obtenção de protoplastos como *Spicaria violacea* em *Gliocadium virens* (BEHLING e FISCHER, 1980); *Trichoderma viride* em *Schizophyllum commune* (de VRIES e WESSELS, 1972, 1973 a e 1973 b); *Streptomyces satsumaensis* em *Geotricum candidum* (DOOIJEWAARD *et al.*, 1973); *Micromonospora* em *Candida utilis*, *Oospora suaveolens* e *Geotrichum lactis* (GASLON *et al.*, 1964); *Myxobacter* em *Mucor racemosus* (GENTHNER e BORGIA, 1978); *Streptomyces ra* em *A. nidulans* (GIBSON e PEBERDY, 1972), *Trichoderma harzanium* em *A.fumigatus* (HEARN *et al.*, 1980); *Streptomyces sp* em *S.fragilis*, *Candida utilis*, *S. rossei*, *S. cerevisiae*, *Kloeckera opiculata* e *Torula utilis* MENDOZA e VILLANNUEVA, 1962); em *A. nidulans* (PEBERDY e GIBSON 1971), em *Mortierella vinacea* (PEBERDY, 1971), em *Fusarium calmorum* (LABORDA *et al.*, 1974 LOPES BELMONTE *et al.*, 1966), em *Pythium* (SIESTMA *et al.*, 1967); *Trichoderma viride* em *S.cerevisiae*, *C. albicons*, *C.neoformans* e *H. anomala* (MIEGEVILLE *et al.*, 1979); *Penicilium purpurugenum* em *A.niger* (MUSILKOVA *et al*, 1969); *Bacillus circulans* em *Pyricularia oryzae* (TANAKA *et al.*, 1981), têm sido utilizados.

Com poucas exceções (HAMLYN *et al.*, 1981; STEPHEN e NASIM (1981), preparações comerciais de enzimas líticas não tem sido efetivas para liberação de protoplastos em fungos filamentosos.

As preparações de enzimas líticas a partir de suco digestivo têm sido efetivas na liberação de protoplastos de *Neurospora crassa* (EMERSON e EMERSON, 1958; BACHMANN e BONNER,1959); *Penicillum chrysogenum* e *Cephalosporium acremonium* (FAWCETT *et al.*, 1973); *Geotricum candidum* (FERENCZY *et al.*, 1974); *A.niger* (MUSILKOVÁ e FENCL, 1968); *Penicillium purpurugenum* (MUSILKOVÁ *et al.*, 1969). Porém a maioria dos grupos que trabalham com fungos miceliais, acham que a produção de complexos enzimáticos a partir de microorganismos, em seu próprio laboratório, é o caminho mais efetivo na obtenção de protoplastos. A lista destes microrganismos que mostram atividade micolítica é muito grande e continua a crescer (descritos anteriormente).

Em muitos casos, a síntese do complexo enzimático pelo organismo lítico requer a presença de substratos indutores no meio de crescimento. Estes meios de cultura, na sua grande maioria, têm sido supridos com micélio homogeinizado esterilizado do organismo da qual se quer produzir protoplastos (MUSILKOVA *et al.*,1969; SIETSMA *et al.*, 1967), ou com parede celular purificada (BEHLING e FISCHER, 1980; de VRIES e WESSELS, 1972). Tentativas têm sido feitas para produzir meios de crescimentos mais definidos para obtenção de enzimas, pelo uso de polissacarídeos idênticos ou semelhantes àqueles encontrados em paredes de fungos. Deste modo, suplemen

tação do meio com quitina e laminarina (HOUSSET *et al.*, 1975; PEBERDY e GIBSON, 1971) ou celulase (SIETSMA e BOER, 1973) tem-se mostrado efetiva.

Os componentes da mistura de enzimas líticas envolvidas na liberação de protoplastos são conhecidos em apenas alguns casos. Os estudos mais extensivos foram feitos com enzimas de *Trichoderma harzanium* com respeito ao isolamento de protoplastos em *Schizophyllum commune* (de VRIES e WESSELS, 1973). Deste modo, três componentes principais, S-glucanase (α-1,3 - glucanase), R-glucanase (β -1,3 -, β -1,6-glucanase) e quitinase, foram isolados por filtração em coluna de gel e verificou-se que todos os três componentes foram necessários para a liberação de protoplastos em *S.commune*. Por outro lado, um complexo lítico útil no isolamento de protoplastos de *Pythium* foi obtido de *Streptomyces satsumaensis* e mostrado conter dois importantes componentes, uma celulase e uma exo-laminarase (SIETSMA *et al.*, 1968).

Enriquecimento de complexos líticos com polissacarídeos específicos pode aumentar a produção de protoplastos ou a velocidade de liberação dos mesmos. Assim, HOUSSET *et al.*, (1975) adicionaram α-1,3- glucanase e β - 1,3 glucanase a enzimas de suco digestivo e aumentaram ambos os parâmetros no isolamento de protoplastos de *Schizosaccharomyces pombe*. MORRIS (1978), verificou que a adição de glusulase ao complexo lítico proveniente de *Trichoderma harzianum* aumentou a velocidade de liberação de protoplastos em *A. nidulans* e ANNÉ *et al.* (1976), obtiveram produção máxima de protoplastos em *Penicillium chrysogenum* quando enzimas produzidas por

Trichoderma foram misturadas com uma preparação proveniente de *Streptomyces gramineofasciens* e uma celulase comercial.

Complexos enzimáticos constituidos por diferentes polissacarases (celulase, gumase, maltase, hemicelulase e quitinase) purificadas têm sido utilizados para obtenção de protoplastos em *Neurospora crassa* (EMERSON e EMERSON, 1958). Do mesmo modo, tanto preparações de enzimas líticas obtidas a partir de suco digestivo de caramujo (suco digestivo bruto, helicase lipolítica e citohelicase a diferentes concentrações) DIATEWA *et al.*, 1981), quanto polissacarases de origem comercial provenientes de outros microrganismos para uso em diferentes tipos de fungos (*A. nidulans*, *A. niger*, *A.rugulosus*, *A.ochraceus*, *S.cerevisiae*, *A.chrysogenum* e *P.chrysogenum*: HAMLYN et al., 1981, tem sido comparadas.

Protoplastos isolados de culturas de levedura ou fungo filamentoso, por definição, deve ser heterogêneo com respeito à sua fisiologia e bioquímica. A nível de população, o estado fisiológico da cultura é o principal fator que determina a produção de protoplastos. Por outro lado, a idade fisiológica da cultura influencia esta mesma produção. Assim, PEBERDY *et al.* (1976) estudaram os diversos fatores (pH, estabilizadores osmóticos, idade do micélio) que afetam a liberação de protoplastos em *A.flavus*, *A.nidulans*, *P.chrysogenum*, *Fusarium culmorum* e *Neurospora crassa*. Verificaram que para *A.flavus* a produção de protoplastos foi maior quando foram usadas culturas em fase exponencial de crescimento, o mesmo ocorrendo para os outros fungos

estudados. ANNÉ e PEBERDY (1975), verificaram o mesmo fenômeno em *P.chrysogenum*. ZOCHER e KLEINKAUF (1980), obtiveram boa produção de protoplasto em *Claviceps purpura* ao utilizarem micélio em fase estacionária de crescimento (fase em que ocorre síntese de ergotamina). Por outro lado, MENDOZA e VILLANUENA (1962) produziram protoplastos em grande quantidade em *S.frafilis e S. rossei*, usando micélio de culturas novas frente à ação da enzima lítica desde que fizessem um pré-inóculo de 24 horas. Do mesmo modo, MUSILKOVÁ e FENCL (1968, 1969) obtiveram a mais alta - produção de protoplastos em *A. niger* com o uso de hifas jovens. Resultados semelhantes têm sido encontrados por de VRIES e WESSELS(1972)em *Schizophllum commune* e por TANAKA *et al.*(1981)com *Pyricularia oryzae*.

Deste modo, outros trabalhos com a idade da cultura afetando a liberação de protoplastos têm sido realizados em *Saccharomyces cerevisiae*, DEUTCH e PARRY (1974) verificaram que células em fase exponencial de crescimento são sensíveis à produção de protoplastos, enquanto que as de fase estacionária não o são. O mesmo foi observado por SHAHIM (1972). KOVÁC *et al.* (1968),porém,obtiveram protoplastos de *S.cerevisiae* em fase estacionária de crescimento para estudo de fosforilação oxidativa de suas mitocôndrias. DEUTCH E PARRY (1974), observando que células tratatas com cloranfenicol ou 5 - fluoruracil durante este período (fase exponencial) não desenvolvem resistência à ação enzimática, sugerindo que, as mudanças envolvidas neste fenômeno são dependentes de RNA e síntese proteíca. Do mesmo modo, EDDY e WILLIAM

SON (1957), trabalhando com *Sacharomyces carlsbergensis* obtiveram protoplastos de células com 2 idades de cultivo (18 h. a temperatura ambiente e 5 h a 25º C), sendo que nestas condições a produção foi máxima; SHAHIN (1971) usando a enzima Helicase, produziu protoplastos em células de *Schizosaccharomyces pombe* em fase estacionária de crescimento; STEPHEN e NASIM (1981), testaram várias espécies de levedura (*S.cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Trichosporon pullulans* e *Schwanniomyces alluvius*) com a enzima Mutanse (NOVO), sendo que o tempo ótimo de exposição variou com a idade da cultura e a espécie de levedura utilizada; BROWN (1971), tratou células de *Torulopsis glabrata, Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes fases de seu ciclo de crescimento com a enzima Helicase e verificou que a susceptibilidade de *T.glabrata* desapareceu completamente dentro de 2 horas durante a transição da fase exponencial de crescimento para a fase estacionária, enquanto que em *C. albicans* e *S.cerevisiae* a susceptibilidade diminuiu gradualmente durante a fase estacionária.

Poucos trabalhos que relacionam o efeito do meio de cultura na liberação de protoplastos têm sido publicados. MUSILKOVÁ e FENCL (1968), mostraram os efeitos da cultura na liberação de protoplastos de *A. niger* em um meio definido e em meio complexo. A aeração dos meios de cultura resultou na produção de mais protoplastos do que nos meios sem aeração. Concluiram que o meio residual de cultivo deve ser retirado da sus

pensão de micélio pela lavagem com solução de alta pressão osmo tica. OKANISHI *et al.* (1974), verificaram em *S. griseus* e *S. venezuelae* que o número de protoplastos formados é maior e a velocidade de reversão e estabilização melhores em meio contendo $MgCl_2$. Por sua vez, FOURY E GOUFFEAU (1973), estabeleceram que em *Schizosaccharomyces pombe* a produção de protoplastos é aumentada quando as células são pré-incubadas na presença de 2-deoxi-D-glucose. No entanto, longos períodos de incubação nesta substância fazem com que os protoplastos percam sua capacidade respiratória.

Uma outra maneira de aumentar a velocidade de produção de protoplastos consiste em fazer pré-tratamento das células com certas substâncias como, principalmente, compostos de Tiol. Assim DOOIJEWAARD *et al.*.(1973) estimularam a produção de protoplastos em *Geotricum candidum* pela adição de Dithiothreitol, 2-Mercaptoetanol ou cisteamina ao meio de incubação ; FAWCETT *et al.* (1973), verificaram que pré-tratamento do micélio com Dithiothreitol era necessário em *Cephalosporium acremonium* para produção de protoplastos enquanto que para *Penicillium chrysogenum* o mesmo não foi necessário; FINKELMAN *et al.* (1980), através do uso de 2-Mercaptoetanol em *Aureobasideum pullulans* com incubação anaeróbica, lograram a produção de protoplastos frente a uma mistura de enzimas líticas e ALIMDZHANOVA E BEZBORODOV (1980), demonstraram que tratamento das células de *Cospora lactis* com solução de TRIS (Hidroximetil)

Aminometano é essencial para a lise da parede celular com enzima digestiva e conseqüente liberação de protoplastos. Outra maneira de promover a liberação de protoplastos, quando são usados estabilizadores orgânicos, consiste em fazer-se um pré tratamento do micélio com um detergente (Desoxicolato,laurilsulfato ou Triton X 100). SIETSMA e BOER (1973), compararam a açao destes detergentes na produção de protoplastos em *Pythium sp* e verificaram que o Triton X 100 é o mais eficaz.

Esporos também constituem-se em uma fonte útil de protoplastos, especialmente em espécies onde eles são estruturas uninucleadas. Destes protoplastos, espera-se que sejam mais homogêneos em sua composição de organelas e portanto em seu desenvolvimento; o que foi observado por GENTHNER e BORGIA (1978) em *Mucor racemosus* e BOS e SLAKHORST (1981) em *A. nidulans* e *A.niger*.Por outro lado, aspecto diferente foi observado por EMERSON e EMERSON (1958) em *Neurospora crassa*, onde os protoplastos produzidos diretamente a partir de conídios pareceram ser menos uniformes do que os originados da hifa, especialmente, a baixas concentrações de açúcares e enzimas.

2.4.2. FUSÃO

O ímpeto para usar técnicas de fusão de protoplastos em fungos surgiu de trabalhos similares com células animais e protoplastos de plantas. Fusão espontânea foi primeiramente descrita, como um evento raro, em protoplastos de *Fusarium culmorum* (LOPEZ-BELMONTE *et al.*, 1966), sendo a enzima lítica proveniente de *Streptomyces ra*, testando vários estabilizadores, entre os quais os melhores foram: NH_4Cl, manitol, NaCl ou ramnose, o estímulo para a fusão sendo desconhecido. A primeira tentativa de fusão controlada foi feita com *Geotrichum candidum* (FERENCZY *et al.*, 1974), baseada em práticas genéticas padrões, com a seleção de heterocários sendo feita por complementação nutricional em meio mínimo. A freqüência de fusão foi baixa, estabelecendo-se o estado heterocariótico mas não o diplóide. A seguir, BINDING (1974) aumentou a freqüência de fusão em protoplastos de *Phycomyces blakesleeanus* através do uso de mutantes auxotróficos complementares e como agentes de fusão, água de mar e $Ca(NO_3)_2$ tamponado, sendo que, neste último a freqüência de fusão foi duas vezes maior do que a obtida em água do mar e 37 vezes maior do que a obtida por FERENCZY *et al.* (1974). FERENCZY *et al.* (1975), aplicando os mesmos princípios conseguiram aumentar a freqüência de fusão em A. *nidulans* obtendo heterocários irregulares e colônias apresentando-se diferentes dos mutantes parentais.

As observações de CONSTABEL e KAO (1974) em protoplastos obtidos em plantas e subseqüente aumento na freqüên

cia de fusão através do uso de polietileno glicol (PEG), levaram a estudos envolvendo este composto.

ANNÉ e PEBERDY (1975), verificaram em protoplastos de *Penicillium chrysogenum* os parâmetros envolvendo solução fusogênica (PEG), pH e concentração de íons cálcio. A concentração de PEG foi estabelecida como um ótimo em 30% (p/v) a um tempo de exposição de 10 minutos a 30°C. Já PEBERDY *et al.* (1975), com fusões intraespecíficas em protoplastos de *A. flavus*, *A. niger*, *P. frequentans* e *P. ramigena*, *A. nidulans* foi de 25%, sendo a freqüência de fusão baixa para *A. niger*, enquanto que as de *A. flavus* e *Penicillium* foram maiores e semelhantes à de *A. nidulans*. Estas freqüências de fusão foram cerca de 1000 vezes maiores do que as previamente achadas. A partir destes estudos, ANNÉ e PEBERDY (1976) estabeleceram uma metodologia de fusão de protoplastos que pode ser aplicada com sucesso a várias espécies de fungos. Assim, estes autores através de mutantes auxotróficos complementares estabeleceram fusões intraespecíficas em *Penicillium chrysogenum*, *P. patulum*, *P. roquefortii*, *A. nidulans* e *Cephalosporium acremonium*, realizando também fusões interespecíficas entre *P. chrysogenum* e *P. notatum*, sendo que as freqüências de fusão foram sempre aproximadamente as mesmas. Heterocários foram confirmados pelo crescimento de colônias em meio mínimo, alguns diplóides foram formados e confirmados por prototrofia, coloração de esporos, tamanho de esporos e conteúdo de DNA.

Estes estudos com conseqüente aprimoramento na tecnologia de fusão, deram um grande avanço aos vários campos da Genética, fazendo com que significativos progressos tenham sido obtidos com fusões a níveis intra e interespecíficos e intergenéricos. Desse modo, fusões envolvendo células com mesmo tipo de reação sexual tem sido realizados em *S. cerevisiae*, SVOBODA (1978), obteve com mutantes auxotróficos complementares e PEG, freqüências de fusão de 1 a 3%. Análises citológicas e genéticas preliminares sugeriram a formação de um sincário e integração de marcas genéticas parentais, embora o mesmo autor (1976) não houvesse conseguido fusão de protoplastos entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes tipos de reação sexual, sendo que a conjugação ocorreu somente quando os protoplastos já tinham concluído a regeneração de uma nova parede celular. van SOLINGEN e van der PLAAT (1977), por sua vez, fusionaram linhagens do mesmo tipo de reação sexual com auxílio de β-mercaptoetanol, ao mesmo tempo que estudaram se fusão por PEG poderia ser aplicada em leveduras. Da mesma maneira, CHRISTENSEN (1979) fusionou protoplastos de *S. cerevisiae* de mesmo tipo de reaçao sexual e a segregação dos alelos para esta característica com marcas auxotróficas associadas, na proporção 4:4, mostrou que não poderia ter ocorrido mutação. A análise genética dos marcadores demonstrou ter havido recombinação. Experimento semelhante foi realizado por YAMAMOTO e FUKUI (1977).

Em *Schizosaccharomyces pombe*, fusões de proto-

plastos entre linhagens de mesma " reação sexual" também foram obtidas com formação de progênie diplóide (SIPICZKI e FERENCZY, 1977) e localização de genes em grupos de ligação (THURIAUX, 1980). De maneira semelhante, em *Candida albicans*, fusões de protoplastos foram realizadas em presença de PEG (JEFFREY *et al.*, 1981) estabelecendo-se o estado diplóide, sendo confirmado pelo volume celular, ocorrendo perdas cromossômicas que originaram aneuplóides a vários níveis. Também foi verificado por SARACHEK *et al.* (1981) que as perdas de cromossomos e indução de permuta por irradiação podem afetar a recombinação para as marcas parentais nos híbridos. Da mesma forma, em *Candida tropicalis*, têm sido obtidas fusões de protoplastos com estabelecimento de heterocário que podem levar ao estado diplóide (VALLIN e FERENCZY, 1978) ou não (FOURNIER *et al.*, 1977), sendo que neste último caso foi obtido apenas um diplóide e a partir deste foram observados recombinantes para os vários marcadores genéticos envolvidos.

Nos fungos filamentosos e bactérias filamentosas, fusão de protoplastos tem sido usada com sucesso para produzir heterocários com conseqüente diploidia e recombinantes intraespecíficos em diversos gêneros (*Streptomyces fradie*, *S. griseofulvus*; BALTZ, 1978 - *S. coelicolor*; HOPWOOD e WHRIGT, 1979 - *Streptomyces* sp.; HOPWOOD *et al.*, 1977, 1978 - *S. coelicolor*, *S. parvulus*, *S. lividans*, *S. griseus*, *S. acrimycini*; COHEN, 1977 - *S. fradie*; BALTZ, 1978 - *Trichoderma viride*; BOJNANSKÁ *et al.*, 1980 - *Geotrichum candidum*; FERENCZY *et al.*,

1974 - *Mucor racemosus*, GENTHNER e BORGIA, 1978 - *P. chrysogenum*; ANNÉ e PEBERDY, 1975 - *Fusarium cumorum*; LOPEZ - BELMONTE *et al.*, 1966 - *A. nidulans*; FERENCZY *et al.*, 1975 e *Phycomyces blakesleeanus*; BINDING, 1974). Porém, BALL e HAMLYN (1982) não obtiveram evidências nítidas de formação de diplóides e heterozigotos foram raramente detectados em fusões de linhagens estreitamente relacionadas e divergentes de *Cephalosporium acremonium*. Recombinantes, presumivelmente haplóides, foram recuperados através de repique da mistura de fusão de protoplastos para uma série de meios seletivos de regeneração.

De grande significância é o uso de técnicas de fusão na produção de híbridos interespecíficos e intergenéricos. Assim, FERENCZY *et al.* (1976) lograram a fusão e complementação nutricional entre *A. nidulans* e *A. fumigatus* a uma baixa freqüência, sugerindo que esta complementação foi devido a aneuploidias. KEVEI e PEBERDY (1977, 1979), ao realizarem fusões entre *A. nidulans* e *A. rugulosus* obtiveram heterocários de crescimento lento em meio mínimo que deram origem a setores diplóides vigorosos. Estes ao serem agora estudados com marcadores em todos os grupos de ligação da linhagem de *A. nidulans* mostraram distribuição ao acaso destes grupos de ligação nos setores após haploidização sugerindo um alto grau de homologia entre as espécies. PEBERDY *et al.* (1977), isolaram em meio mínimo heterocários interespecíficos após fusão entre *P. chrysogenum* e *P. cyaneo-fulvum* e semelhantemente aos trabalhos de KEVEI e PEBERDY (1977, 1979) obtiveram diplóides e re

combinantes para as marcas parentais, GODFREY *et al.* (1978), cruzaram mutantes auxotróficos de *S. fradie* e *S. birkinien.si.s* e verificaram um aumento de 200 a 1000 vezes na recombinação obtida quando comparada com o cruzamento por técnicas convencionais.

Usando linhagens com menor grau de parentesco (*P. roquefortii* e *P. chrysogenum*), ANNÉ *et al.* (1976) obtiveram colônias "híbridas" após fusão que prontamente segregaram a primeira linhagem parental; contudo a prototrofia dessas colônias e sua capacidade de produzir penicilina indicou a presença, ao menos em parte, do genoma de *P. chrysogenum*.

Fusão de protoplastos entre gêneros diferentes de leveduras (*S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*) foi obtida com sucesso por CARRAU *et al.* (1982), usando como meio de recuperação de heterocários, meios providos de fontes de carbono adequadas para os prováveis produtos de fusão.

A fusão de protoplastos é também utilizada para transferência de determinantes genéticos citoplasmáticos como os presentes em mitocôndrias. Desse modo, FERENCZY e MARÁZ (1977) transferiram mitocôndrias entre linhagens de mesmo tipo de reação sexual de *S.cerevisiae*, FUKUDA e KIMURA (1980), YAMASHITA *et al.* (1981) fizeram transferência intergenérica de mitocôndrias de *Hansenula wingei* para protoplastos de *S. cerevisiae* usando a metodologia de miniprotoplastos e MARÁZ e SUBIK (1981) fusionaram protoplastos de linhagens auxotróficas de *S. cerevisae* de "reações sexuais" iguais e opostas, carregando

diferentes marcadores mitocondriais. Neste último caso, a expressão dos genes mitocondriais não foi prejudicada nem pelos genes nucleares ("mating-type") nem pelo método de transferência de genomas, tornando-se deste modo, possível o estudo genético por fusão de protoplastos. Recentemente TSUBOI (1981), trabalhando em *S. cerevisiae* com linhagens diplóides que eram deficientes respiratórios ou eram homozigotas para o locus tipo de reação sexual (a/a ou α/α) e portanto, incapazes de esporular, foram cruzados por fusão de protoplastos e induzidos a esporular sem reversão a células normais. Para isto, linhagens diplóides deficientes respiratórias foram cruzadas com linhagens haplóides respiratória competentes, com marcadores mitocondriais para resistência, e linhagens haplóides homozigotas para locus de tipos de reação sexual foram cruzadas com linhagens haplóides de tipos de reação sexual opostos. Este procedimento levou à formação de esporos, e a análise dos genótipos dos esporos revelou que quando os produtos de fusão foram cultivados sob condições para esporulação não ocorre cariogamia, núcleos diplóides sofrem meiose e ambos os núcleos, diplóide e haplóide, são capazes de desenvolver esporos.

Outros estudos têm sido realizados com os protoplastos ou com produtos de fusão destes. Assim, HINNEN *et al.* (1978), transformaram protoplastos de *S. cerevisae* leu 2^- com plasmídeo bacteriano Col E1 carregando o gene de levedura leu 2^+, ocorrendo inserção deste em várias regiões do genoma, incluindo a região leu 2^-; BEGGS (1978), de maneira similar ,

transformou protoplastos de *S. cerevisae* com um plasmídeo quimérico entre Col E1 e o plasmídeo 2 μm juntamente com o gene leu 2^+. GURINA *et al.* (1979), estudaram a composição protéica de protoplastos de *Candida utilis* e MANN e MECKE (1980), isolaram e caracterizaram membranas nucleares e núcleo de *S. cerevisiae* através de sua composição química e padrão eletroforético de proteína total. DARLING *et al.* (1969) em *S. cerevisiae*; HAVELKOVÁ (1966) em *C. utilis*, *S. carlsbergensis*, *S. cerevisiae* *S. lactis* e *Schizosaccharomyces pombe*; MIEGEVILLE *et al.* (1979) em *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans* e *H. anomala* e NUNO CHACEL (1982 - comunicação pessoal) em *M. anisopliae* realizaram estudos com microscopia eletrônica do processo de formação de protoplastos e dos próprios protoplastos. GUMPERT (1980), realizou estudos com microscopia eletrônica da fusão de protoplastos em *Streptomyces hygroscopicus*. MORRIS (1978), utilizou protoplastos de *A. nidulans* para obtenção de DNA de alto peso molecular. BIRNBOIN (1971), obteve ácido ribonucléico e polirribossomos a partir de protoplastos de *Schizosaccharomyces pombe*. ROBINSON *et al.* (1981), verificaram a homologia de DNA entre *S. jumonjinensis* e *S. lipmanii* através da fusão de protoplastos dos mesmos e análise em gel de agarose.

Uma nova metodologia que tem sido aplicada com sucesso na fusão de protoplastos e que foi verificada em *S. cerevisiae* (WEBER *et al.*, 1981) é o estímulo da referida fusão por um campo elétrico de alto pulso, fazendo com que a fre-

qüência de fusão seja aumentada em cerca de 200 vezes quando comparada com experimentos sem tratamento com o campo elétrico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS UTILIZADAS

As linhagens utilizadas de *Metarhizium anisopliae* foram provenientes de diferentes Estados brasileiros e originariamente isoladas de insetos adultos de *Deois* (Homoptera, Cercopidae). Assim, foram usados as seguintes linhagens: E_6 (Espírito Santo); RJ-3 (Rio de Janeiro) e M (Manaus).

3.2. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.2.1. MEIO MÍNIMO (MM) (PONTECORVO e col., 1953)

$NaNO_3$.....	6,0 g
KH_2PO_4.....	1,5 g
KCl.....	0,5 g

$MgSO_4 . 7 H_2O$..... 0,5 g

$FeSO_4$..... 0,02 g

$ZnSO_4$..... 0,02 g

Glicose..... 10,0 g

Agar..... 15,0 g

Água destilada.....1000,0 g

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%

3.2.2. MEIO COMPLETO SÓLIDO (MC) (AZEVEDO e COSTA, 1973)

Adicionou-se ao meio mínimo:

Extrato de levedura..... 0,5 g

Peptona..... 2,0 g

Caseína hidrolisada..... 1,5 g

Solução de vitaminas..... 1,0 ml

Solução de ácidos nucléicos..... 1,0 ml

pH ajustado para 6,8 com HaOH 4%

3.2.3. MEIO MÍNIMO LÍQUIDO (PONTECORVO e col., 1953)

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

3.2.4. MEIO COMPLETO LÍQUIDO (PONTECORVO e col., 1953)

Preparado segundo os itens 3.2.1. e 3.2.2., não sendo adicionado o ágar.

3.2.5. MEIO MÍNIMO MAIS 2% DE MEIO COMPLETO E MEIO MÍNIMO MAIS 4% DE MEIO COMPLETO

Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo líquido e meio mínimo mais 4% de meio completo líquido, respectivamente. Estes tubos foram autoclavados e conservados em refrigerador.

3.2.6. MEIO COMPLETO 2X CONCENTRADO

Preparado segundo os itens 3.2.1. e 3.2.2., onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada, com exceção da água.

3.2.7. MEIO MÍNIMO 2X CONCENTRADO

Preparado segundo o item 3.2.1., onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada, com exceção da água.

3.2.8. MEIO MÍNIMO LÍQUIDO PARA CRESCIMENTO DE MICÉLIO

Ao meio mínimo preparado segundo o item 3.2.1., foram adicionados o(s) requisito(s) para cada marca auxotrófica.

3.2.9. MEIO PARA CRESCIMENTO DE MICÉLIO

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

3.2.10. MMKCℓ PARA REVERSÃO E OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE FUSÃO

Preparado segundo o item 3.2.7., onde o mesmo foi diluído no momento de uso com KCl 1,4M em tampão fosfato pH 5,8, na proporção 1:1.

3.2.11. MCKCℓ PARA OBTENÇÃO DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS TOTAIS (PROTOPLASTOS, MICÉLIO E CONÍDIOS NÃO DIGERIDOS)

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

3.2.12. SOLUÇÃO DE VITAMINAS

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

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

3.2.13. SOLUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO DE LEVEDURAS

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

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

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

3.2.14. SUPLEMENTOS ADICIONADOS AO MEIO MÍNIMO

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

	Solução Estoque (20ml de água)	Quantidade adicionada por placa (20 ml de meio de cultura)	Concentração final no meio de cultura
Adenina	500,0 mg	0,1 ml	25,00 µg/ml
Lisina	1,0 g	0,1 ml	50,00 µg/ml
Cisteína	1,0 g	0,1 ml	50,00 µg/ml
Metionina	1,0 g	0,1 ml	50,00 µg/ml
Piridoxina	5,0 mg	0,1 ml	0,25 µg/ml
Biotina	4,0 mg	0,1 ml	0,20 µg/ml
Ácido nicotínico	10,0 mg	0,1 ml	0,50 µg/ml

3.2.15. SOLUÇÃO SALINA (0,85%)

Preparou-se uma solução de 8,5 g de NaCl em 1000 ml de água destilada. Foram colocados 10 ml em frascos e a seguir os mesmos foram autoclavados e conservados à temperatura ambiente.

3.2.16. SOLUÇÃO DE TWEEN 80 (0,1%)

Foram adicionados 0,1 ml de Tween 80 em 100,0 ml de água destilada com homogeneização e 2,5 ml da solução foram colocados em tubos de ensaio, que foram a seguir autoclavados e mantidos à temperatura ambiente.

3.2.17. SOLUÇÃO DE CASEÍNA HIDROLISADA

Preparou-se a solução, dissolvendo-se 100 mg de caseína hidrolisada em 10 ml de H_2O destilada esterilizada. Esta foi aquecida em banho-maria (98°C) por 15 minutos e a seguir conservada em refrigerador a 4°C.

3.2.18. SOLUÇÃO DE ALBUMINA 5%

Preparou-se uma solução com 5,0 ml de clara de ovo em 100 ml de água destilada. Filtrou-se e conservou-se em congelador.

3.2.19. SOLUÇÃO DE CLORONEB (1,4-dicloro-dimetoxil benzeno) (Du Pont, 65% P.A.)

Preparou-se a solução dissolvendo-se 100 mg de Cloroneb em 10 ml de água destilada esterilizada (concentração final de 6.500 µg/ml P.A.). Conservou-se em refrigeração a 4°C.

3.2.20. TAMPÃO FOSFATO pH 5,8

. Solução A

NaH_2PO_4.....	24,0 g
Água destilada.....	1000,0 ml

. Solução B

$Na_2HPO_4 . 12 H_2O$.....	71,6 g
Água destilada.....	1000,0 ml

Adicionaram-se 920,0 ml de solução A em 80,0 ml de solução B. As soluções A e B foram conservadas no refrigerador e o tampão fosfato foi preparado no momento de uso.

3.2.21. TAMPÃO FOSFATO pH 6,9

. Solução A

NaH_2PO_4..... 27,8 g

Água destilada..... 1000,0 ml

. Solução B

Na_2HPO_4..... 53,65 g

Água destilada..... 1000,0 ml

Adicionaram-se 45,0 ml da solução A em 55,0 ml da solução B e completou-se o volume para 200,0 ml com água destilada. As soluções A e B foram conservadas em refrigerador e o tampão foi preparado no momento de uso.

3.2.22. TAMPÃO LÍTIO-BORATO pH 8,3

Hidróxido de lítio (anidro)..... 1,2 g

Ácido bórico..... 11,8 9 g

Água destilada.....1000,0 ml

3.2.23. TAMPÃO TRIS-CITRATO pH 8,3

Trizma Base..... 6,3 g

Ajustar o pH com ácido cítrico..... (±1,6 g)

Água destilada.....1000,0 ml

3.2.24. α-NAFTILACETATO

α-naftilacetato.....	0,2 g
Acetona.....	10,0 ml
Água destilada.....	10,0 ml

3.2.25. β-NAFTILACETATO

β-naftilacetato.....	0,2 g
Acetona.....	20,0 ml

3.2.26. SOLUÇÃO PARA REVELAÇÃO DE ESTERASES

Fast Blue R.....	100,0 mg
α-naftilacetato.....	3,0 ml
β-naftilacetato.....	3,0 ml
Tampão fosfato pH 6,9.....	100,0 ml

3.2.27. SOLUÇÃO DE PERSULFATO DE AMÔNIA (AP)

Solução aquosa a 10% de AP.

3.2.28. SOLUÇÕES DE ÁLCOOL ETÍLICO

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

3.2.29. SOLUÇÃO DE GIEMSA

Diluiu-se uma parte de Giemsa em 66 partes de glicerina a 60ºC e após o resfriamento, misturou-se com 66 partes de metanol. Esta solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.2.30. SOLUÇÃO DE FIXAÇÃO

No momento de uso, foi preparada uma solução na proporção de 6 álcool etílico absoluto: 1 ácido acético gla-cial: 1 ácido lático.

3.2.31. SOLUÇÃO DE KCℓ 1,4M pH 5,8

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

3.2.32. SOLUÇÃO DE KCℓ 0,7M pH 5,8

Para preparo desta solução, um volume de KCl 1,4M foi diluído em igual volume de tampão fosfato pH 5,8. Autoclavou-se e armazenou-se em refrigerador.

3.2.33. SOLUÇÃO DE PEG 30%

. **Solução A**

$CaCl_2$..... 11,0 g

Água destilada..... 1000,0 ml

. **Solução B**

Glicina..... 3,75 g

Água destilada..... 1000,0 ml

pH ajustado para 8,0 com NaOH 4 %.

Foram adicionados 10,0 ml da solução A em 10,0 ml da solução B e o volume corrigido para 100,0 ml com água destilada. O pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4 % e adicionado PEG 6000 em concentração final de 30%.

3.2.34. SOLUÇÃO DE ENZIMAS PARA PRODUÇÃO DE PROTOPLASTOS (HAMLIN *et al.*, 1981)

Para cada 1,0 ml de KCl 0,7M em tampão fosfato pH 5,8 foram adicionados 5,0 mg de enzima lítica, sendo 2,5 mg de "celulase CP" e 2,5 mg de "NOVO".

3.2.35. SOLUÇÃO DE DIFENILAMINA

Colocou-se 10,0 g de difenilamina pura em 100,0 ml de ácido acético glacial e adicionou-se 2,7 ml de ácido sulfúrico concentrado. Conservou-se no escuro e, no momento de uso, aqueceu-se a 100°C por 15 minutos.

3.2.36. SOLUÇÕES DE ÁCIDO PERCLÓRICO

0,5M ..... 50,18 g ..... 1000 ml (H_2O)

1N ..... 100,36 g ..... 1000 ml (H_2O)

3.2.37. SOLUÇÃO 5mM NaOH

Procedeu-se à confecção de uma solução estoque 1N e desta, fez-se a solução 5mM.

3.2.38. SOLUÇÃO ESTOQUE DE DNA PARA CURVA PADRÃO

Preparou-se a solução dissolvendo-se 80 mg de DNA purificado em 10 ml de solução 5mM de NaOH. As diluições para preparação de curva padrão foram realizadas com ácido perclórico 1N.

3.2.39. GEL DE ACRILAMIDA

Cyanogum a 5% em uma mistura de tampões Tris-Citrato pH 8,3 e Lítio-Borato pH 8,3 (na proporção 9:1).

3.2.40. SISTEMA DE FILTRO PARA TÉCNICA DE ENRIQUECIMENTO

No interior de filtros plásticos foram fixadas 6 camadas de gaze (mantidas esticadas) com o auxílio de fita crepe. Este conjunto foi envolto em papel de alumínio e autoclavado por 15 minutos a 120ºC.

3.2.41. FILTROS BÜCHNER PARA FILTRAÇÃO DE MICÉLIO

Estes foram preparados, mantendo-se em seu interior duas folhas de papel de filtro Whatman nº 1. Foram envolvidas em papel de alumínio e papel comum e autoclavados por 15 minutos a 120ºC.

3.2.42. USO DE PALITOS PARA TRANSFERÊNCIA DE COLÔNIAS

Palitos roliços adquiridos no comércio foram autoclavados em água por 6 vezes consecutivas (sendo lavado e a água trocada a cada vez) e então esterilizados em forno por 3 horas. Depois de usados, eram novamente autoclavados, secos e esterilizados para posterior uso.

3.2.43. ESTERILIZAÇÃO E INCUBAÇÃO

Os meios de culturas e as soluções foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 120°C (exceto nos casos assinalados). Os frascos que necessitaram ser utilizados e esterilizados, foram autoclavados a 120°C por 35 minutos (filtros, frascos de produção de protoplastos, etc.). A temperatura de incubação foi de 28°C, exceto quando foi necessário deixar o material à temperatura ambiente.

3.3. SOBREVIVÊNCIA À LUZ ULTRAVIOLETA

Suspensões de conídios das linhagens selvagens E_6 e RJ em tween 80 foram observados ao microscópio com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, determinando-se assim o número de conídios por mililitro. Estas suspensões foram diluídas em solução salina (1:10), colocadas em placas de Petri esteri

lizadas, irradiadas com luz ultravioleta a diferentes intensidades ($\mu W/cm^2/s$). Após cada irradiação, diluições apropriadas foram feitas em solução salina 0,85% e 0,1 ml foi semeado em placa contendo MC. As placas foram incubadas a 28°C em ausência de luz. Findo este período, as colônias sobreviventes foram contadas e procedeu-se o cálculo da curva de sobrevivência, tomando-se o número de colônias obtidas no tempo 0 minutos como 100% de sobrevivência. Estimou-se deste modo, o tempo de irradiação que permitia 5% de sobrevivência para as diferentes linhagens.

3.3.1. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ENRIQUECIMENTO POR FILTRAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS

Suspensões de conídios em tween 80 (0,1%) das linhagens selvagens (E_6 e RJ) e mutantes para uma marca auxotrófica e uma marca para coloração (E_6A^-Y e RJA^-Y), foram produzidas com conídios crescidos em MC inclinado por 7-8 dias (28°C).

Para cada linhagem, quantidades de cerca de 10^7 conídios por ml foram misturados (E_6 e E_6A^-Y; RJ e RJA^-Y) e adicionadas em erlenmeyers contendo 50 ml de meio mínimo líquido, para os tempos 0 - 5 - 10 - 15 - 20 e 25 horas. Estes erlenmeyers foram incubados com agitação rotatória (150 rpm) a 28°C. Após cada período de incubação, o conteúdo do frasco foi passado através de filtro contendo 6 camadas de gaze e centri

fugado (10 minutos a 3000 rpm). Diluições apropriadas foram feitas em solução salina 0,85% e semeadas em placas contendo MC. As placas foram incubadas por 7-8 dias (28ºC). Após este período, as colônias foram contadas (sendo possível diferenciar mutantes de selvagens, pois os primeiros são amarelos) e estabeleceu-se a porcentagem de cada linhagem em relação ao número total de colônias para cada tempo.

3.3.2. OBTENÇÃO DE MUTANTES MORFOLÓGICOS

Suspensões de conídios das linhagens selvagens (E_6 e RJ), contendo 10^7 conídios/ml (contados com o auxílio da Câmara de Neubauer), foram diluídas em solução salina 0,85% (1:10) e irradiadas na intensidade de luz ultravioleta que propiciasse 95% de morte.

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

3.3.3. OBTENÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS

Suspensões de conídios das linhagens mutantes morfológicos em tween 80 0,1% foram obtidas com conídios crescidos em MC inclinado por 7-8 dias. A concentração destas suspensões foram determinadas como descrito no item 3.3., sendo irradiadas do mesmo modo. Após irradiação, a suspensão total foi transferida para frasco contendo 50 ml de MM líquido que foi agitado por um período de 20-25 horas. Após este período, o MM foi filtrado através de gaze (item 3.2.41.) para um outro frasco erlenmeyer esterilizado e vazio e novamente agitado a 28ºC no período acima citado. Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo que após a última filtragem o MM foi centrifugado (3000 rpm 10 minutos), o "Pellet" ressuspenso em cerca de 3,0 ml de solução salina esterilizada e semeado em MC. As placas foram incubadas (28ºC) por um período de 7-8 dias. Todas as colônias que se desenvolveram nestas placas, foram transferidas para placas contendo MM, com auxílio de palitos de madeira esterilizados na disposição de 5 x 5 + 1 (AZEVEDO *et al.*, 1976). Colônias que não se desenvolveram neste meio foram consideradas como sendo mutantes auxotróficos. O local do ágar em que as mesmas foram inoculadas, foi cortado e transferido para tubo contendo MC. Estes foram agora incubados a 28ºC por 7 - 8 dias, conseguindo-se deste modo, conídios para ensaios de deficiências nutritivas.

Placas contendo MM sólido mais cada uma das soluções (caseína hidrolisada, ácidos nucléicos, vitaminas e ex

trato de leveduras) foram feitas e deixadas secar em estufa a 28ºC por 24 horas. Após este período, conídios provenientes dos mutantes auxotróficos foram colocados de maneira eqüidistante nas referidas placas e as mesmas foram incubadas por 2-3 dias (28ºC). Assim, o crescimento dos mutantes em uma das placas, e não em MM, indicava a deficiência de cada um, o que levou à obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos simples. Para a obtenção de mutantes morfológicos e com dupla auxotrofia o mesmo procedimento foi realizado, adicionando-se o requisito para a primeira marca ao MM líquido (usado para filtragem) e ao MM sólido adicionado de aminoácidos, vitaminas, ácidos nucléicos e extrato de leveduras.

3.3.4. TESTE DE REVERSÃO

Para o referido teste, suspensões de conídios de todos os mutantes obtidos, foram feitas em solução de tween 80, de tal modo que as mesmas tivessem 10^7 conídios/ml. Estas foram semeadas em MM e incubadas a 28ºC por 7-8 dias. Após este período verificou-se a presença ou ausência de crescimento de colônias.

3.3.5. DETERMINAÇÃO DO TEMPO PARA PRODUÇÃO DE PROTOPLASTOS

Quantidades constantes de micélio obtido por

24 horas de agitação em meio produzido segundo o item 3.2.9., foram resuspendidas em quantidades constantes de estabilizador osmótico (KCl 0,7M) e complexo enzimático (HAMLYN *et al.*, 1981) por períodos variáveis de tempo (0 - 30 - 60 - 90 - 120 - 150 - 180 minutos). Após cada um destes períodos, a suspen - são de micélio foi lavada com KCl 0,7M por centrifugação (500 rpm - 30 segundos). O sobrenadante foi novamente lavado por centrifugação (4000 rpm - 10 minutos), ressuspendido em quantidades constantes de KCl 0,7M e o número de protoplastos determinados por contagem em câmara de Neubauer.

3.3.5.1. **Produção** de protoplastos

Conídios crescidos em MC inclinado a 28ºC por 7-8 dias, foram suspensos em solução salina e determinadas suas concentrações (conídios/ml) com o auxílio de Câmara de Neubauer e microscópio. Estas foram adicionadas em meio para produção de micélio (item 3.2.9.) mais os requisitos de cada mutante para uma concentração final de 10^6 conídios/ml. O meio assim obtido, foi mantido em agitador rotatório (150 rpm) a 28ºC por 24 horas. Findo este período, o micélio desenvolvido foi filtrado em filtro Büchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado em KCl 1,4M (tampão fosfato pH 5,8). Determinou-se a seguir, seu peso úmido. Este micélio foi colocado em presença de KCl 0,7M (tampão fosfato pH 5,8) e complexo de enzimas líticas na proporção de 50 mg de micélio: 1,0 ml de KCl 0,7 M : 5 mg de enzima (50% de celulase CP e 50% de NOVO) (HAMLYN *et*

al., 1982). Agitou-se em agitador recíproco (120 rpm) por 2:30 a 3:00 horas. Após este período, verificou-se a presença de protoplastos com o auxílio de microscópio (uma gota da suspensão que havia sido agitada sobre lâmina e lamínula). Uma vez observada a presença de protoplastos, centrifugou-se a suspensão por 30 segundos a 500 rpm, retirou-se o sobrenadante e o mesmo foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, ressuspenso o "pellet" em KCl 0,7M esterilizado e novamente centrifugado (4000 rpm; 15 minutos). Repetiu-se esta operação mais 2 vezes.

3.3.6. CONTAGEM DE PROTOPLASTOS

Os protoplastos obtidos no item 3.3.5.1. ("pellet") foram ressuspensos em KCl 0,7 M (tampão fosfato pH 5,8) (volume fixo) e contados em Câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico.

3.3.7. FUSÃO DE PROTOPLASTOS (PEBERDY, 1979)

Os protoplastos obtidos em KCl 0,7M foram misturados em quantidades iguais (nunca menos que 10^6 protoplastos/ml) centrifugados a 4000 rpm - 10 minutos e o pellet lavado por centrifugação em presença de KCl 0,7M mais 2 vezes. O pellet assim obtido, foi ressuspenso em PEG (1,0 ml) pré-a-

quecido (30°C) e mantido em banho-maria (30°C) por 10 minutos. Após este período, adicionou-se KCl 0,7M (cerca de 25 ml) e centrifugou-se por 10 minutos 4000 rpm. Este procedimento foi repetido duas vezes. O pellet assim obtido, foi ressuspenso em 1 ml de KCl 0,7M e diluições apropriadas (1:10) foram feitas também em KCl 0,7M. Estas diluições foram semeadas "pour plate" (1,0 ml) em MMKCl (-1; -2) e MCKCl (diluições conforme o número de protoplastos).

3.3.8. VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE HIFAS, ESFEROPLASTOS E CONÍDIOS NA SUSPENSÃO DE PROTOPLASTOS

Os protoplastos das linhagens mutantes obtidos no item 3.3.5.1. foram semeados por "pour plate" em MC e MCKCl (45 - 50°C). O crescimento de colônias neste meio de cultura (MC), indica o número de hifas e conídios que existem na solução de protoplastos quando comparado com a suspensão semeada em placas com MCKCl. A semeadura foi feita com diversas diluições.

3.3.9. TESTE DE REVERSÃO EM PROTOPLASTOS

Suspensões de protoplastos obtidos no item 3.3.5.1. foram semeados por "pour plate" em MMKCl (45 - 50°C) sem diluição. As placas foram incubadas a 28°C por 7-8 dias e constatou-se a presença de revertentes pelo crescimento de co

lônias.

3.3.10. OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIOS

3.3.10.1. Fusão de protoplastos (PEBERDY, 1979)

Das placas de MMKCl, oriundas de fusão de protoplastos (item 3.3.7.) e contendo pequenas colônias, foram recortados blocos de ágar (contendo estas colônias) que foram transferidas para placas contendo MM e MC. Incubou-se estas placas a 28ºC por 15-20 dias.

3.3.10.2. Freqüência de fusão de protoplastos

Esta foi determinada como sendo:

$$\frac{\text{colônias desenvolvendo em MMKCl}}{\text{colônias desenvolvendo em MCKCl}}$$

3.3.10.3. Análise de setores oriundos de colônias obtidas em fusão de protoplastos

Dos setores obtidos nas placas contendo MC, foram feitas suspensões em solução salina 0,85%. Estas soluções, após serem diluídas convenientemente, foram semeadas em MC de tal modo que se obtivessem colônias isoladas (10 a 15 colônias

por placa). Estas placas foram incubadas (28°C) por 7-8 dias. As colônias isoladas que aí se desenvolveram, foram transferidas para placas contendo MC na disposição de 5 x 5 + 1 para confecção de placas mestras. Destas placas, as colônias foram transferidas com o auxílio de um replicador multifio (AZEVEDO *et al.*, 1976) para placas contendo MM mais uma combinação dos requisitos nutricionais exigidos pelos mutantes participantes da fusão. Estas placas foram incubadas por 48 horas (28°C), período após a qual fez-se a leitura dos mesmos.

3.3.10.4. Obtenção de heterocário pela metodologia clássica (ROPER, 1952)

Conídios das diferentes linhagens (com complementação para marcas auxotróficas e morfológicas) foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de MM líquido suplementado com 2% e 4% de MC líquido (permite uma germinação inicial dos conídios). Estes tubos foram incubados por 10 dias (28°C) e a película formada na superfície do meio foi transferida para placas contendo MM sólido. Após incubação (28°C - 10 dias) uma extremidade desta película foi novamente transferida para placas contendo MM sólido e novamente incubadas a 28°C por mais 10 dias, para evitar-se crescimento devido a resquícios de MC vindos dos tubos.

3.3.10.5. Obtenção de diplóides

Tanto os conídios de colônias heterocariótic as em MM, provenientes de fusão de protoplastos, quanto os de película (metodologia clássica), foram usados para obtenção de suspensões em Tween 80,0,1%(cerca de 10^7 conídios/ml). Estas soluções foram semeadas em MM sem diluição e com diferentes diluições (10^{-5} e 10^{-6}) e incubadas (28°C) por 6-7 dias. As colônias que se desenvolveram nestas placas foram transferidas novamente para MM (prováveis diplóides) e MC (para testar estabilidade). Incubou-se por 7-8 dias (28°C).

3.3.10.6. Haploidização dos diplóides

Todos os prováveis diplóides, foram inoculados em MC mais quantidades de Cloroneb (AZEVEDO *et al.*, 1977) para dar concentrações finais de 75, 100 e 150 µg/ml.

3.4. COLORAÇÃO DE CONÍDIOS

Conídios com 7-8 dias de crescimento em MM a 28°C, foram coletados, colocados sobre lamínula em presença de albumina 5% e homogeneizados com o auxílio de outra lamínula. Após um período de secagem, os conídios foram fixados por 15 minutos em solução de álcool absoluto: ácido acético glacial: ácido lático . Este procedimento foi seguido de hidratação com

soluções de álcool (95 - 70 - 50%) e água destilada por cinco minutos em cada fase. A seguir, o material sofreu hidrólise ácida em presença de HCl 1N durante 20 minutos a 62°C em banho-maria e foi lavado com água destilada duas vezes. Logo após, o material foi corado com 10 ml de tampão fosfato pH 6,9 mais 16 gotas de solução de Giemsa, lavado com tampão fosfato e observado ao microscópio óptico (as lamínulas foram tornadas permanentes pela passagem em acetona e xilol um minuto em cada fase e colocadas sobre lâmina na presença de Bálsamo do Canadá). O tamanho dos conídios foi determinado com o auxílio de uma escala graduada em microscópio óptico.

3.4.1. MEDIDA DO TAMANHO DOS CONÍDIOS

Com o material preparado como no item 3.4., determinou-se a medida de conídios, usando-se para isto, uma ocular micrométrica adaptável ao microscópio óptico. As medidas tomadas foram diâmetros maior e menor dos conídios.

3.4.2. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE NÚCLEOS POR CONÍDIO

Conídios desenvolvidos em MM e MC por 7-8 dias a 28°C foram preparados como no item 3.4. , observados ao microscópio óptico e determinada a porcentagem média de núcleos por conídio. Foram empregados 400 conídios.

3.5. DETERMINAÇÃO DOS PADRÕES DE ESTERASES EM *M. anisopliae* POR ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA

O método usado foi o de SCANDALIOS (1969) modificado.

3.5.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O material a ser ensaiado (*M. anisopliae*) foi crescido em tubos de ensaio contendo MC líquido (3,0 ml) por 5 a 7 dias. A película de micélio formada na superfície do meio foi triturada em outro frasco com o auxílio de um bastão de vidro em presença de 0,5 ml do tampão do gel (9 partes de Tris-Citrato pH 8,3 para 1 parte de Lítio-Borato pH 8,3). Este material foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi diluído (1:10) com o mesmo tampão e aplicado no gel de eletroforese.

3.5.2. PLACA DE GEL DE ACRILAMIDA

Foram dissolvidos 5 g de Cyanogum em 90 ml de tampão Tris-Citrato pH 8,3 e 10 ml de tampão Lítio-Borato pH 8,3. Após a completa dissolução do Cyanogum, foram adicionados 0,1 ml de TEMED (Tetramethyl-ethylenodiamine) e 0,8 ml de solução AP (persulfato de amônio). Imediatamente, a mistura foi vertida em uma placa de vidro de 15 cm x 16 cm x 0,3 cm .

Uma outra placa de vidro foi posta por cima do gel, tendo-se o cuidado de não deixar bolhas de ar.

Deixou-se polimerizar em temperatura ambiente por 20 minutos e depois colocou-se em geladeira (4ºC) por, no mínimo, mais 20 minutos.

Uma vez polimerizado o gel, a placa de vidro de cima foi retirada e canaletas no gel foram feitas, com o auxílio de um pente de metal com 12-14 dentes.

3.5.3. APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS E CORRIDA DA ELETROFORESE

Cada amostra foi embebida num pequeno retângulo de papel de filtro Whatman nº 3, o qual, depois de ser retirado o excesso com o auxílio de um papel poroso, foi colocado em um dos canais feitos no gel.

Após a aplicação das amostras a placa foi posta em uma cuba de eletroforese horizontal. O tampão do eletrodo foi o Lítio-Borato pH 8,3 e a corrida foi feita do pólo negativo para o positivo com uma amperagem de 25 mA - 30 mA / /170V - 200V, em geladeira, por um tempo de 4 a 5 horas.

3.5.4. REVELAÇÃO DAS ESTERASES E PLASTIFICAÇÃO DO GEL

Após a corrida, o gel foi colocado em uma cuba de plástico em presença de 100 ml da solução para revelação (item 3.2.26.) a 37°C por 40 minutos).

Este procedimento sendo realizado, seguiu-se a retirada da solução corante, lavagem do gel em água destilada e fixação em álcool etílico 50%, por no mínimo, 10 minutos a 4°C.

Para plastificar o gel, retirou-se o álcool , lavou-se em água corrente e a plastificação foi feita em papel celofane com auxílio de um bastidor de bordado.

3.6. EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE DNA

Uma grande quantidade de conídios foi obtida a partir de uma suspensão bem concentrada em tween 80 0,1% por lavagens sucessivas com água destilada em centrifugação (10 minutos - 4000 rpm). Estes conídios foram ressuspendidos em 10 ml de tween 80 0,1% e divididos em 3 frações a saber: 1,0 ml para contagem de esporos, 2,0 ml para determinação de peso seco e 7,0 ml para extração de DNA. Esta última fração foi centrifugada (10 minutos - 4000 rpm) e o precipitado foi ressuspendido em acetona fria. Centrifugou-se novamente e o precipitado ressuspendido em 7,0 ml de éter sulfúrico P.A.. Repetiu-se este procedimento mais uma vez(centrifugação e ressuspensão do "Pellet") e o pricipi

tado foi deixado à temperatura ambiente até não haver mais odor de éter. Conservou-se em gelo aproximadamente 20 minutos e o precipitado foi ressuspendido em 4,0 ml de ácido perclórico 0,5M frio mais 0,1 ml de tween 80 0,1% e deixado a 0°C por 20 minutos. Após este tratamento, foi incubado em banho-maria (70°C - 50 minutos) centrifugado (4000 rpm - 10 minutos) e coletado o sobrenadante. A seguir, ao precipitado restante, adicionou-se mais 3,0 ml de ácido perclórico 0,5M e novamente centrifugou-se , guardando este segundo sobrenadante juntamente com o primeiro. Este procedimento foi repetido mais uma vez e o conjunto de sobrenadantes foi conservado em refrigerador para dosagem de DNA.

Para a dosagem de DNA, a cada 2,0 ml da solução de concentração desconhecida, adicionou-se 4,0 ml de solução de difenilamina. Como "blank" utilizou-se 2,0 ml da solução que se extraiu o DNA do fungo e 4 ml de ácido acético glacial mais 0,1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Realizou - se a leitura em 550 nm. Antes da leitura, as soluções foram aquecidas a 100°C por 15 minutos.

4. RESULTADOS

4.1. SOBREVIVÊNCIA À LUZ ULTRAVIOLETA (U.V.)

Suspensões de conídios das linhagens selvagens E_6 e RJ-3 foram irradiadas com diferentes intensidades de luz ultravioleta ($\mu W/cm^2 . 10^{-2}/s$) conforme descrito no item 3.3.. Para as duas linhagens, estimou-se a intensidade de irradiação necessária para obtenção de 5% de sobrevivência (BARACHO *et al.*, 1977). Nas Tabelas 1 e 2 estão os resultados obtidos para as duas linhagens selvagens (E_6, RJ-3). A partir destes dados, determinaram-se as curvas de sobrevivência das referidas linhagens (Figuras 1 e 2). As intensidades necessárias para conseguir-se 95% de morte a partir de uma suspensão de conídios em E_6 e RJ-3 foram de 97,72 $\mu W/cm^2 . 10^{-2}/s$ e 77,27 $\mu W/cm^2 . 10^{-2}/s$, respectivamente.

TABELA 1 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes a luz ultravioleta (média de duas repetições) do isolado selvagem E_6.

Intensidade de irradiação ($\mu W/cm^2 . 10^{-2}/s$)	Número de sobreviventes ($x\ 10^7$)	($x\ 10^7$)	($\bar{M}$)	Porcentagem de sobreviventes
0	0,613	4,501	$2,55x10^7$	$1,00x10^2$
18	0,788	1,131	$0,95x10^7$	$7,70x10^1$
36	0,204	0,561	$0,38x10^7$	$2,30x10^1$
72	0,100	0,213	$0,15x10^7$	$0,95x10^1$
108	0,016	0,042	$0,03x10^7$	$0,18x10^1$
216	0,0001	0,002	$0,90x10^4$	$5,90x10^{-2}$
432	0,0002	0,000	$0,10x10^4$	$4,60x10^{-2}$

TABELA 2 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes a luz ultravioleta do isolado selvagem RJ-3.

Intensidade de irradiação ($\mu W/cm^2.10^{-2}/s$)	Número de sobreviventes ($x10^7$)	($x10^7$)	($\bar{M}$)	Porcentagem de sobreviventes
0	4,920	0,930	$2,93x10^7$	$1,00x10^2$
18	3,990	0,810	$2,40x10^7$	$8,20x10^1$
36	2,380	0,730	$1,56x10^7$	$6,38x10^1$
72	0,309	0,050	$0,18x10^6$	$5,82x10^0$
108	0,029	0,005	$0,15x10^6$	$4,44x10^{-1}$
216	0,001	0,0005	$0,62x10^4$	$1,40x10^{-2}$
432	0,0004	0,000	$0,95x10^2$	$2,00x10^{-4}$

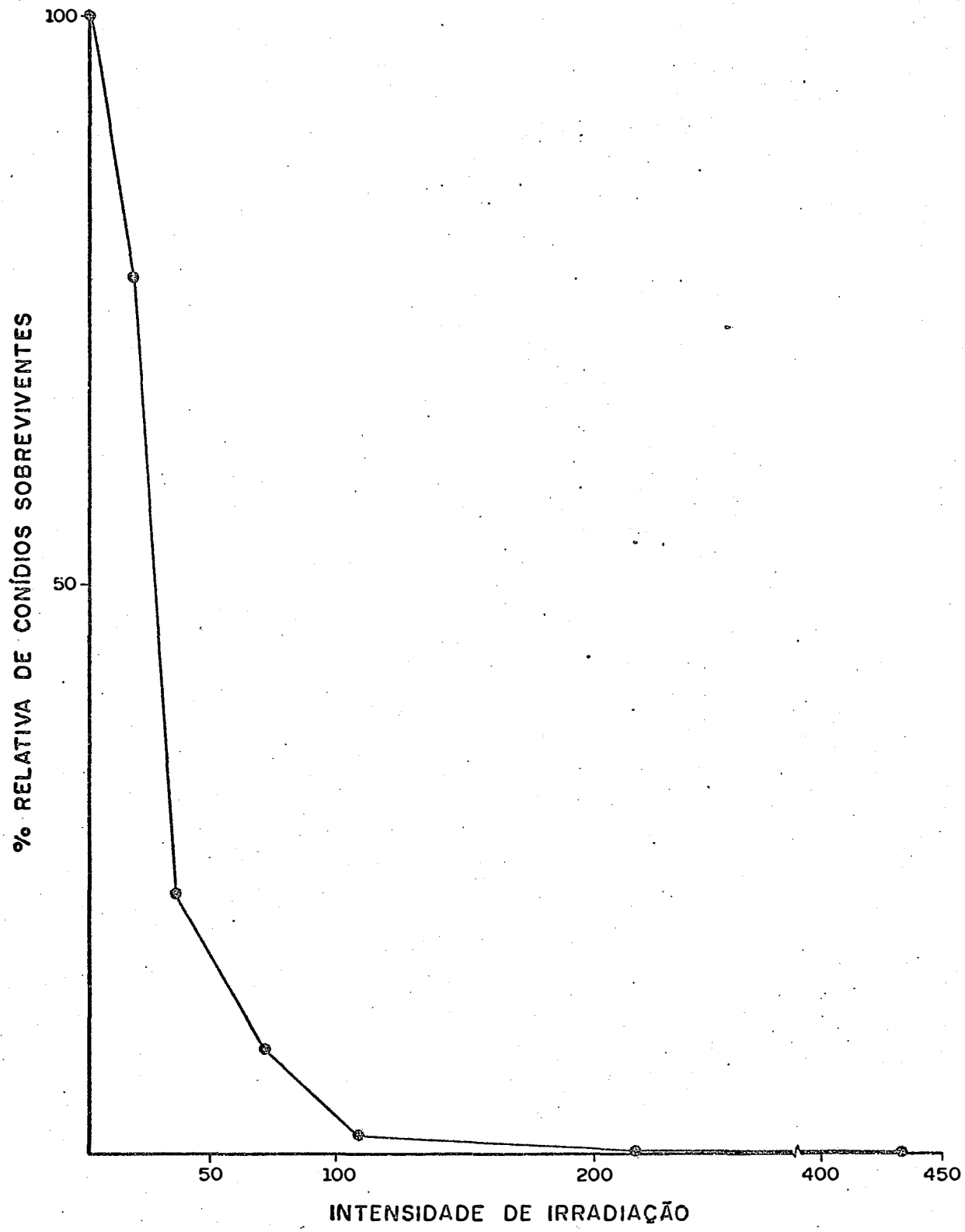


Figura 1 - Curva de sobrevivência do isolado E_6 de *M. anisopliae*, com luz ultravioleta ($\mu W/cm^2 \cdot 10^2/s$).

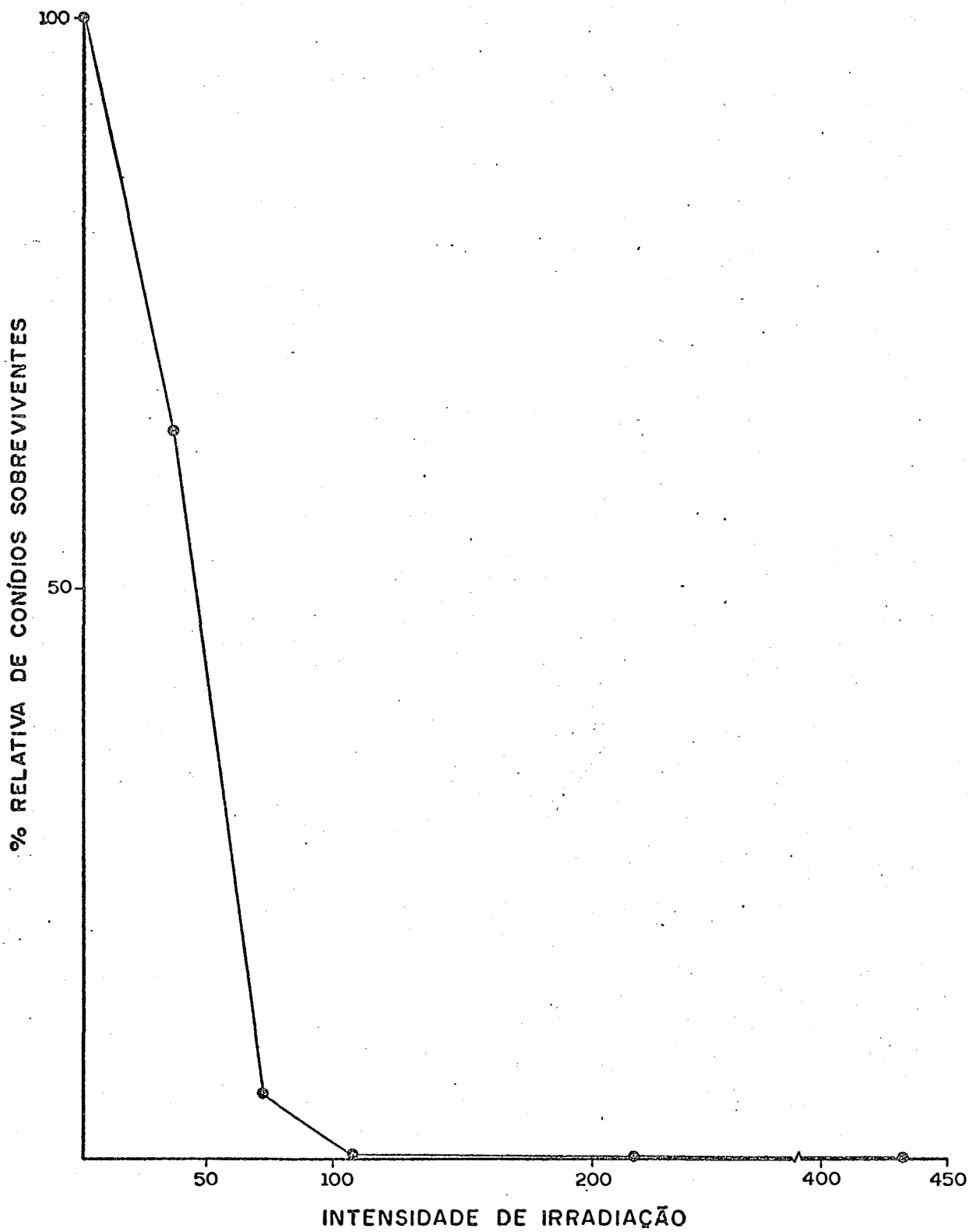


Figura 2 - Curva de sobrevivência do isolado RJ-3 de *M. anisopliae*, com luz ultravioleta ($\mu W/cm^2 \cdot 10^2/s$).

4.2. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ENRIQUECIMENTO POR FILTRAÇÃO E OBTENÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS

Suspensões de conídios preparados conforme item 3.3., foram utilizadas para determinação do tempo necessário na obtenção de número máximo de colônias auxotróficas a partir das linhagens selvagens e auxotróficas obtidas por irradiação com luz ultravioleta (E_6 : 92,72 $\mu W/cm^2 \cdot 10^{-2}/s$ RJ_3 77,27 $\mu W/cm^2 \cdot 10^{-2}/s$). A Figura 3 mostra o esquema para este enriquecimento e posteriores passos utilizados para caracterização. A Tabela 3 mostra a porcentagem relativa no número de colônias mutantes e selvagens dos isolados E_6 e RJ-3 para os diferentes tempos de agitação e as Figuras 4 e 5 mostram as curvas obtidas com o uso destes procedimentos. A Tabela 4 mostra os mutantes obtidos, bem como o número de mutantes para cada marca auxotrófica e a Tabela 5 mostra os mutantes com as marcas auxotróficas duplas, bem como a simbologia usada para caracterizá-los. Deste modo, estabeleceu-se o tempo entre 20 e 24 horas como o ideal para crescimento em meio líquido com agitação e obtenção de colônias auxotróficas. A porcentagem de mutantes auxotróficos obtidos através desta metodologia variou de 2,34% a 6,13%.

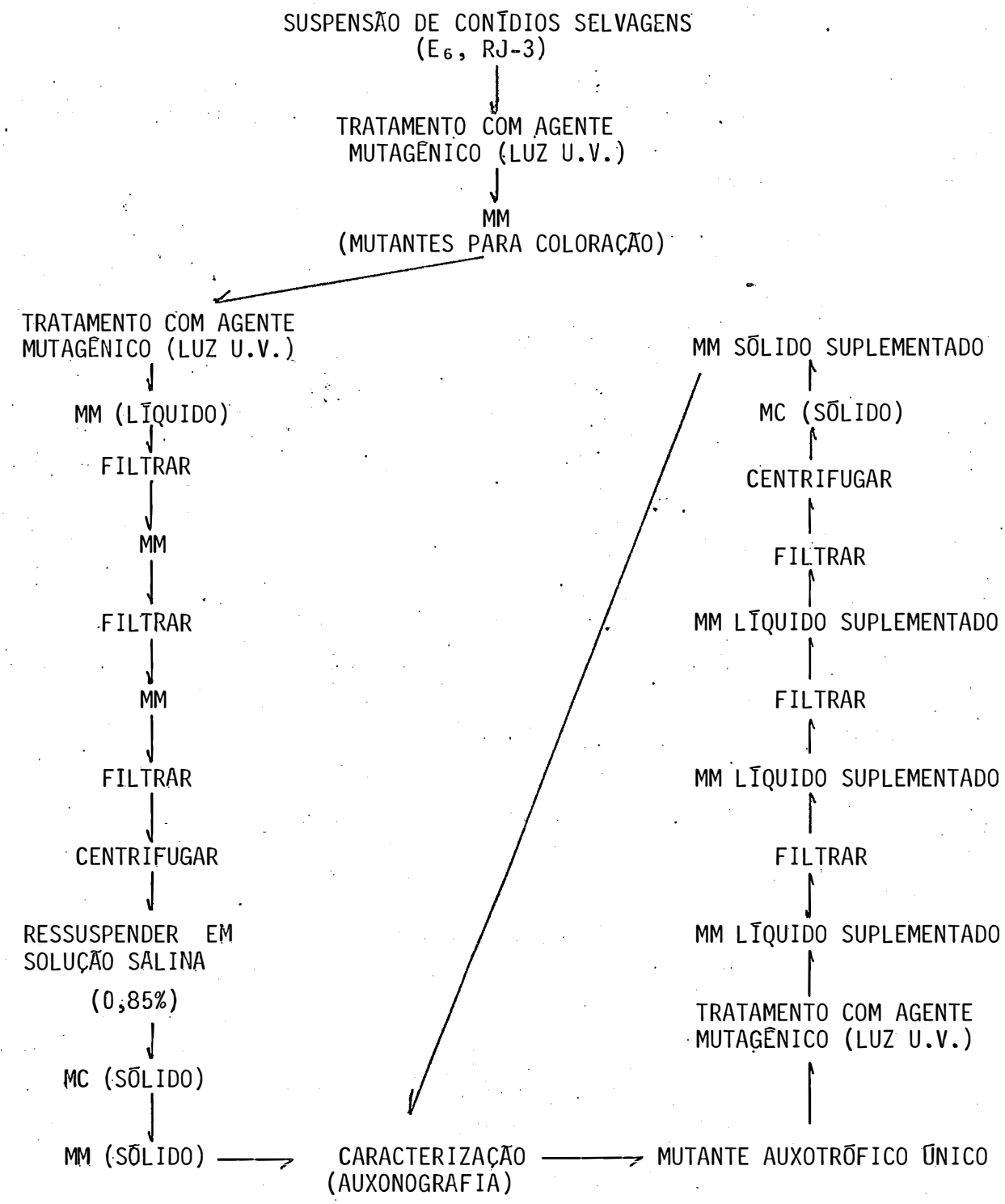


Figura 3 - Esquema seguido para enriquecimento e obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos.

Tabela 3 - Porcentagem relativa no número de colônias mutantes e selvagens dos isolados E_6 e RJ-3 para os diferentes tempos de agitação após filtração (média de duas repetições).

Tempo (h)	E_6		RJ-3	
	Selvagem	Mutante	Selvagem	Mutante
0	92,97	7,02	62,8	37,2
5	82,26	17,73	57,95	42,05
10	81,53	18,46	58,3	41,7
15	47,0	53,0	73,3	27,7
20	12,78	87,21	6,19	93,8
25	6,14	93,85	3,94	96,05

Tabela 4 - Número de cada tipo de mutantes obtidos com a técnica de enriquecimento por filtração.

Deficiência	Isolado	
	E_6	RJ
Adenina	02	02
Lisina	13	02
Metionina	01	02
Cisteína	01	01
Valina	-	01
Piridoxina	01	01*
Biotina	01	01*
Ácido nicotínico	01	-
	Σ 20	10

* Colônias que apresentam crescimento colonial.

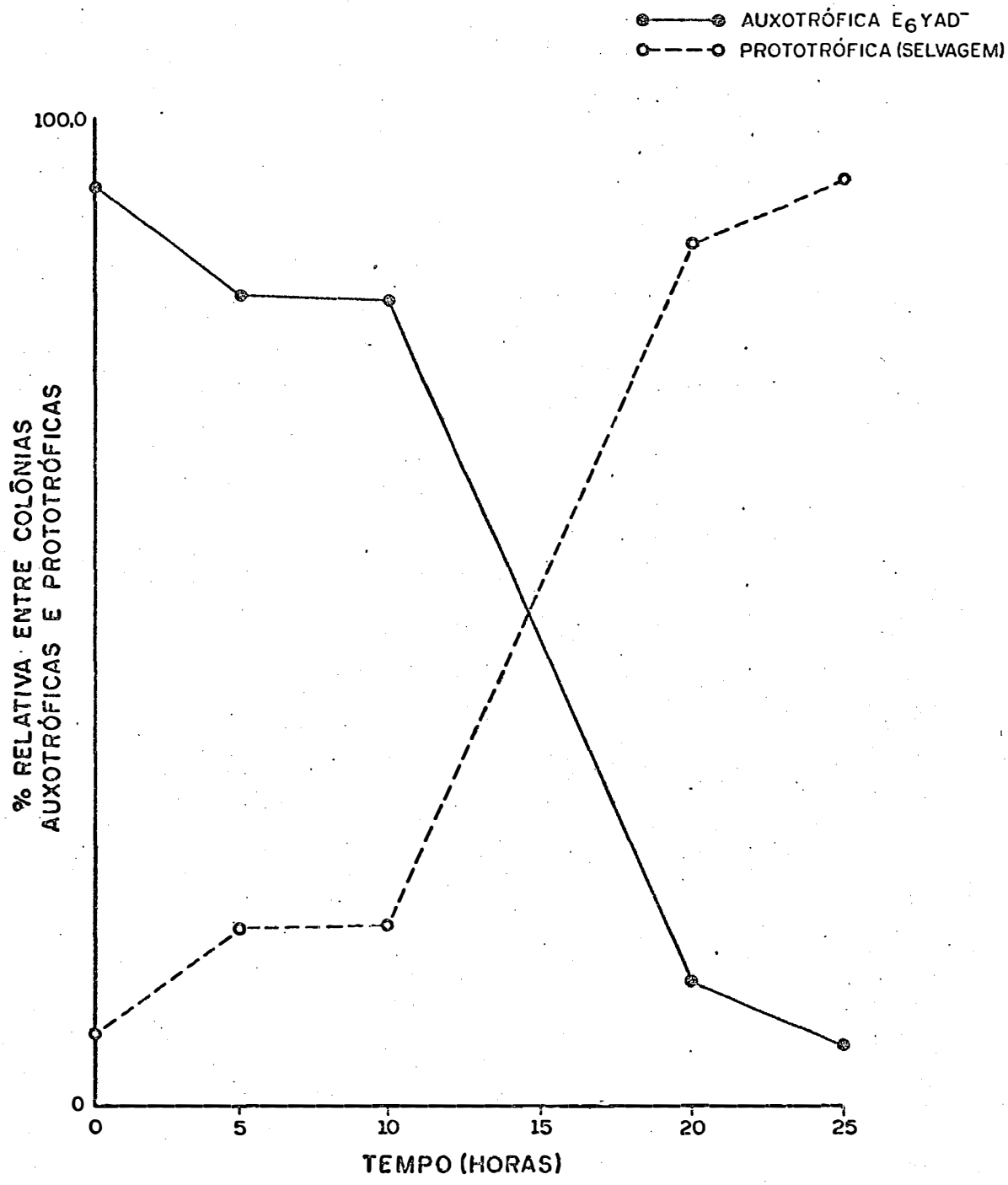


Figura 4 - Porcentagem relativa entre colônias auxotróficas e prototróficas por tempo de cultivo em MM do isolado E_6.

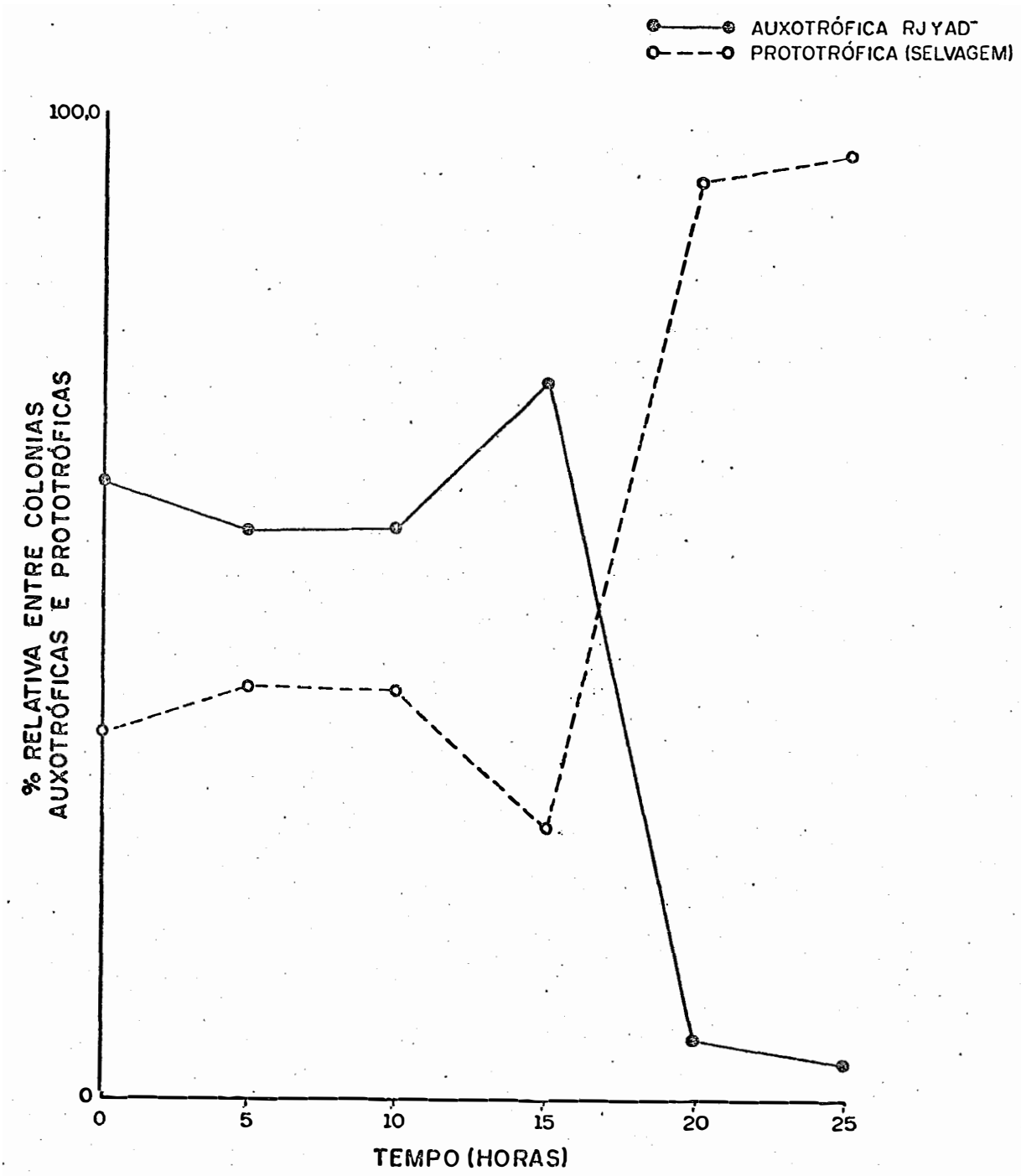


Figura 5 - Porcentagem relativa entre colônias auxotróficas e prototróficas por tempo de cultivo em MM do isolado RJ-3.

Tabela 5 - Mutantes obtidos nos isolados E_6 e RJ-3 através de irradiação com luz U.V.

Isolado selvagem irradiado	Morfologia (conídio)	Mutante auxotrófico	Símbologia da linhagem
E_6	Y (amarelo) (YLO)	Piridoxina (PIR) Adenina (ADE)	YP^-A^-
		Piridoxina (PIR) Lisina (LYS)	YP^-L^-
		Adenina (ADE) Lisina (LYS)	YA^-L^-
		Adenina (ADE) Cisteína (CYS)	YA^-C^-
	V (violeta) (VIN)	Metionina (MET) Biotina (BIO)	VM^-B^-
RJ-3	Y (amarelo) (YLO)	Adenina (ADE) Metionina (MET)	YA^-M^-
		Adenina (ADE) Cisteína (CYS)	YA^-C^-
		Adenina (ADE) Lisina (LYS)	YA^-L
	V (violeta)	Lisina (LYS) Ácido nicotínico (NIC)	VL^-N^-
		Lisina (LYS) Cisteína (CYS)	VL^-C^-
		Lisina (LYS) Metionina (MET)	VL^-M^-

4.3. TESTE DE REVERSÃO

Os mutantes utilizados tanto para obtenção de heterocário como para fusão de protoplastos, foram ensaiados quanto à reversibilidade das suas marcas auxotróficas e morfológicas, para servirem como controles dos testes realizados. A Tabela 6 mostra a freqüência de reversão espontânea para cada mutante.

Tabela 6 - Freqüência de reversão espontânea dos mutantes utilizados na referida dissertação.

Isolado	Mutantes	Freqüência de reversão em 10^7 conídios
E_6	YP^-A^-	<1
	YP^-L^-	<1
	YA^-L^-	<1
	YA^-C^-	<1
	VM^-B^-	<1
RJ-3	YA^-M^-	<1
	YA^-C^-	<1
	YA^-L^-	<1
	VL^-N^-	<1
	VL^-C^-	<1
	VL^-M^-	<1
Manaus*	YA^-M^-	<1

* Obtido e gentilmente cedido por Nuno Chacel, do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília.

4.4. PRODUÇÃO DE PROTOPLASTOS

Protoplastos, tando do isolado E_6 quanto do isolado RJ-3, foram produzidos segundo o item 3.3.5..

Determinando-se assim um tempo ideal (20 a 24 horas), no qual ocorre uma produção máxima de protoplastos homogêneos. A Tabela 7 demonstra o numero de protoplastos obtidos nos diferentes isolados; a Figura 6 compara a produção dos mesmos e a Figura 7 mostra estes protoplastos.

Tabela 7 - Número de protoplastos produzidos em diferentes tempos de tratamento com o complexo lítico ($x10^6$).

Tempo (minutos)	Isolado E_6			$\bar{M}$	Isolado RJ-3			$\bar{M}$
30	0,15	0,25	0,40	0,26	3,86	1,25	1,30	2,14
60	0,30	0,65	1,50	0,82	3,65	12,00	7,84	7,83
90	0,90	1,95	2,40	1,75	17,25	6,60	15,30	13,05
120	1,50	2,55	2,60	2,22	19,40	8,10	16,40	14,63
150	3,00	3,10	2,25	2,78	23,00	7,80	21,20	17,33
180	2,70	3,45	2,05	2,73	20,40	12,20	27,90	20,17

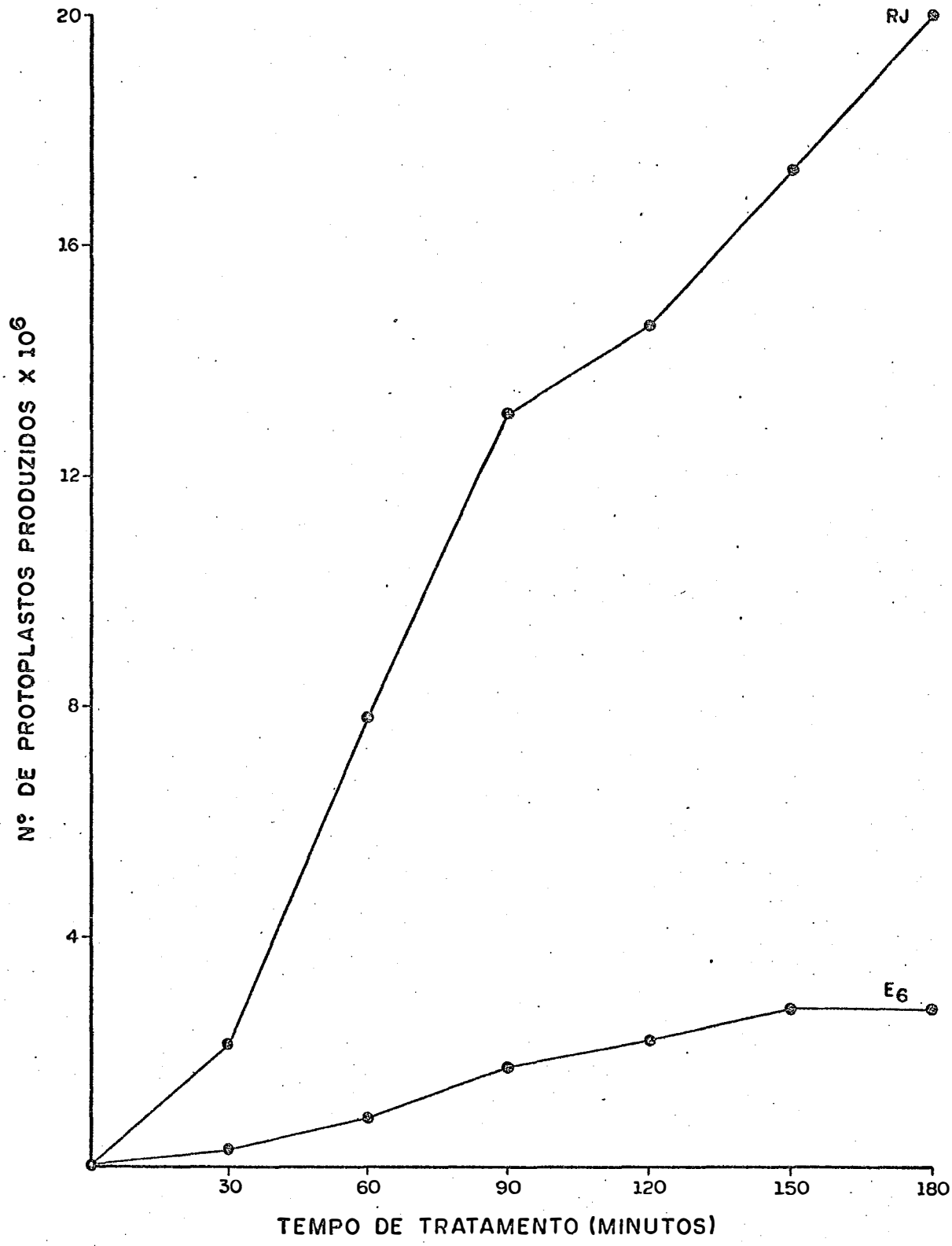


Figura 6 - Produção de protoplastos dos isolados E_6 e RJ-3 em diferentes tempos de tratamento frente ao complexo lítico.

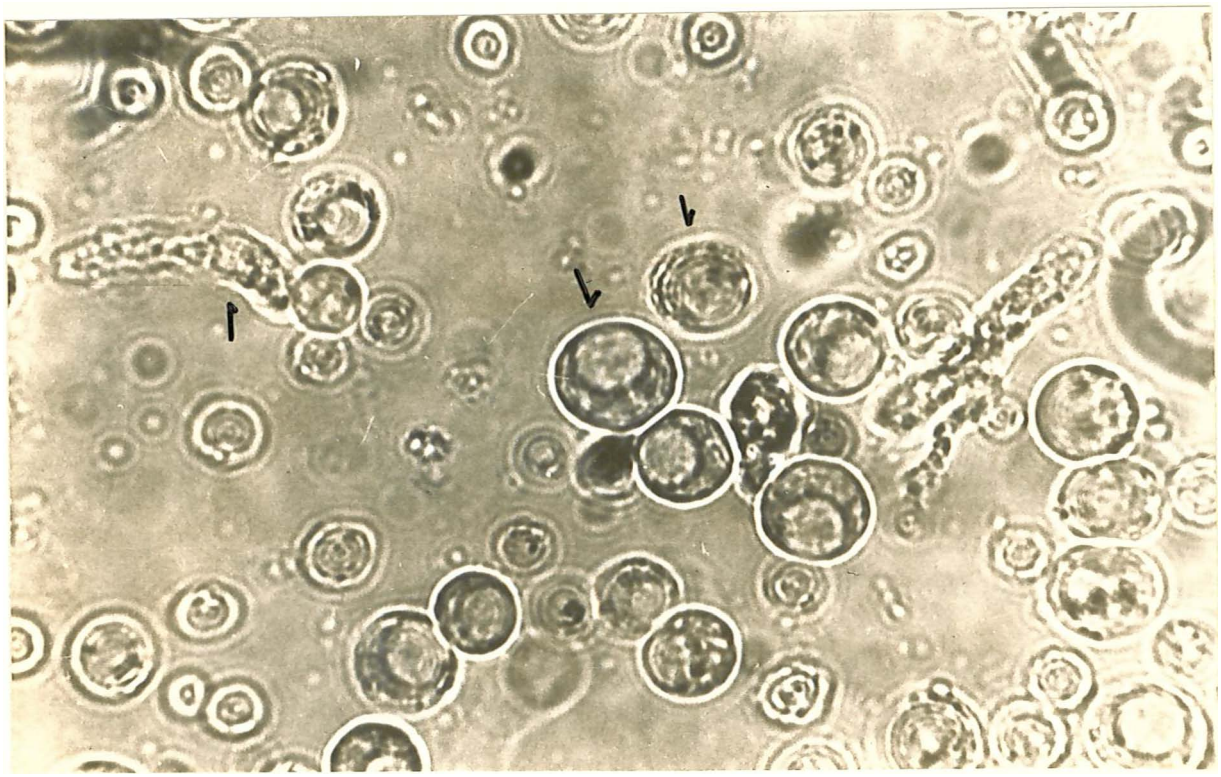


Figura 7 - Protoplastos produzidos a partir de micélio de *M. anisopliae* tratado com complexo lítico, podendo-se observar a presença de esferoplastos e hifas. (Aumento de 400X).

4.5. OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIOS

4.5.1. METODOLOGIA CLÁSSICA (ROPER, 1952)

Metodologia para obtenção de heterocários entre mutantes auxotróficos e morfológicos complementares E_6 e mutantes do isolado RJ-3, bem como dentro dos mutantes do isolado E_6 e RJ-3 foi realizada segundo o item 3.4.10.4., os quais constam da Tabela 8.

As películas obtidas entre os mutantes do mesmo isolado (E_6) em MM + 4% MC, quando transferidos para placas contendo somente MM, cresceram vigorosas com as mesmas apresentando coloração mista dos dois parentais ou não, isto é, não apresentaram a coloração verde do parental selvagem (Fig. 8). Quando, pedaços de ágar foram retirados das bordas destas colônias e novamente transferidos para MM, estes apresentaram-se de forma idêntica às colônias heterocarióticas anteriores e não formando setores.

As películas obtidas, por sua vez, entre mutantes dos isolados E_6 e RJ-3, na sua grande maioria, quando transferidas para MM não conseguiram se desenvolver em colônias heterocarióticas (Fig. 9), com exceção dos cruzamentos E_6YA^-P + + $RJVL^-N^-$, $E_6YA^-P^-$ + $RJVL^-C^-$, $E_6VM^-B^-$ + $RJVL^-C^-$ que já nestas placas (MM), produziram (por uma única vez) setores vigorosos e com características diferentes das linhagens envolvidas nos cruzamentos (Fig. 10). Do mesmo modo, os cruzamentos dentro

do isolado RJ-3, na grande maioria das vezes, não produziram películas de heterocário, sendo porém, colônias com as mesmas características (E_6 + RJ-3) obtidas por uma única vez nos cruzamentos $RJYA^-M^-$ + $RJVL^-N^-$ e $RJYA^-M^-$ + $RJVL^-C^-$.

4.5.1.2. Obtenção de diplóides e segregação

Das suspensões de conídios (10^7 conídios/ml), obtidas a partir das colônias heterocarióticas provenientes dos cruzamentos dentro do isolado E_6 e plaqueadas em MM (10^6 conídios/ml), somente o cruzamento $E_6VM^-B^-$ + $E_6YA^-C^-$ (por uma única vez) originou conídios capazes de crescer neste meio. Estes conídios eram amarelos e uma vez tratados com Cloroneb em MC (item 3.2.19) não produziram setores.

Dos setores vigorosos obtidos nos demais cruzamentos, conídios foram semeados tanto em MM como MC. Neste último meio as colônias apresentaram-se com crescimento estável enquanto que, no MM cresciam, mas com a produção de pequenos setores. Estes pequenos setores quando novamente transferidos para o mesmo meio (MM), comportaram-se da mesma maneira. Conídios das colônias estáveis em MC quando crescidos em MC com Cloroneb, produziram setores que apresentaram o mesmo comportamento.

Tabela 8 - Cruzamentos realizados para obtenção de heterocariose (PONTE-CORVO e ROPER, 1952) em *M. anisopliae*.

Isolados	Cruzamento
$E_6 + E_6$	$VM^-B^- + YA^-P^-$
	$VM^-B^- + YA^-C^-$
	$VM^-B^- + YP^-L^-$
	$VM^-B^- + YA^-L^-$
E_6 + RJ-3	$VM^-B^- + YA^-L^-$
	$VM^-B^- + VL^-N^-$
	$VM^-B^- + VL^-C^-$
	$YA^-P^- + VL^-N^-$
	$YA^-P^- + VL^-C^-$
	$YA^-P^- + VL^-M^-$
	$YA^-Ç^- + VL^-N^-$
	$YA^-Ç^- + VL^-M^-$
	$YP^-L^- + YA^-C^-$
	$YP^-L^- + YA^-M^-$
RJ-3 + RJ-3	$YA^-C^- + VL^-M^-$
	$YA^-M^- + VL^-N^-$
	$YA^-M^- + VL^-C^-$

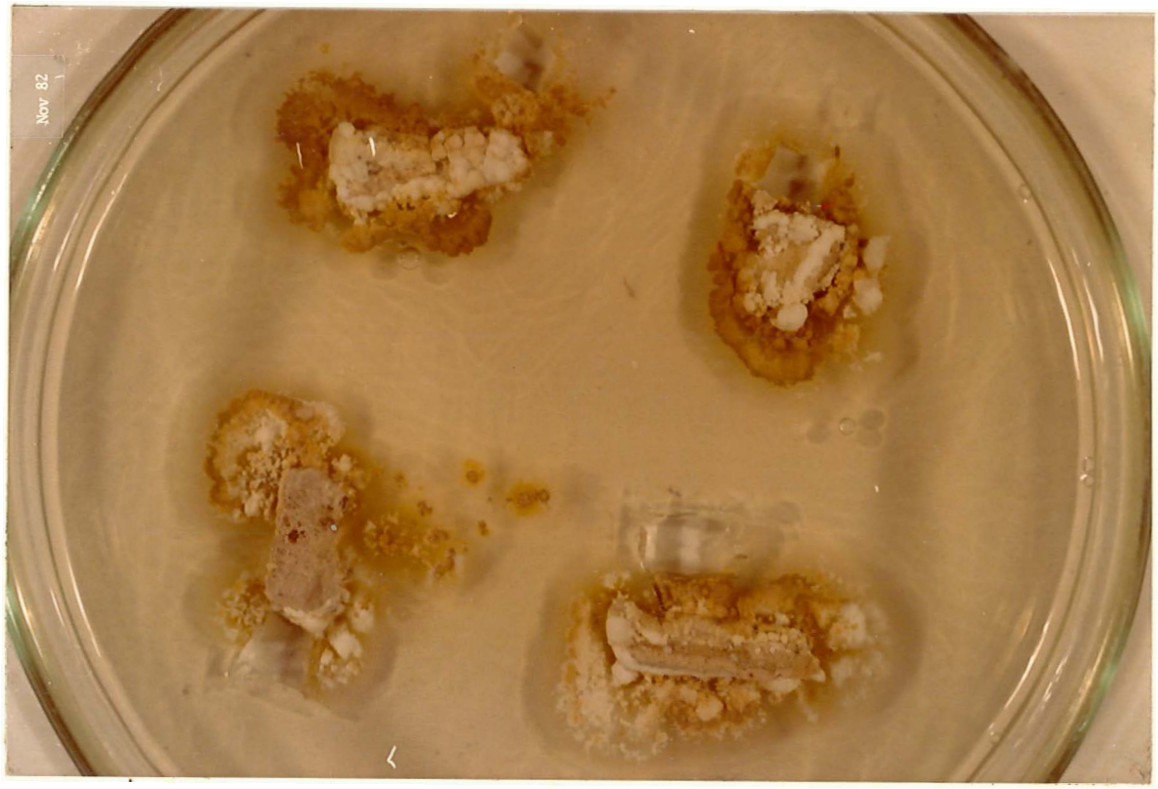


Figura 8 - Colonias heterocariõticas obtidas nos cruzamentos (metodologia clássica) dentro do isolado E_6 de *M. anisopliae*.

Figura 9 - Película heterocariótica resultante do cruzamento entre mutantes dos isolados E_6 e RJ-3 e dentro do isolado RJ-3.

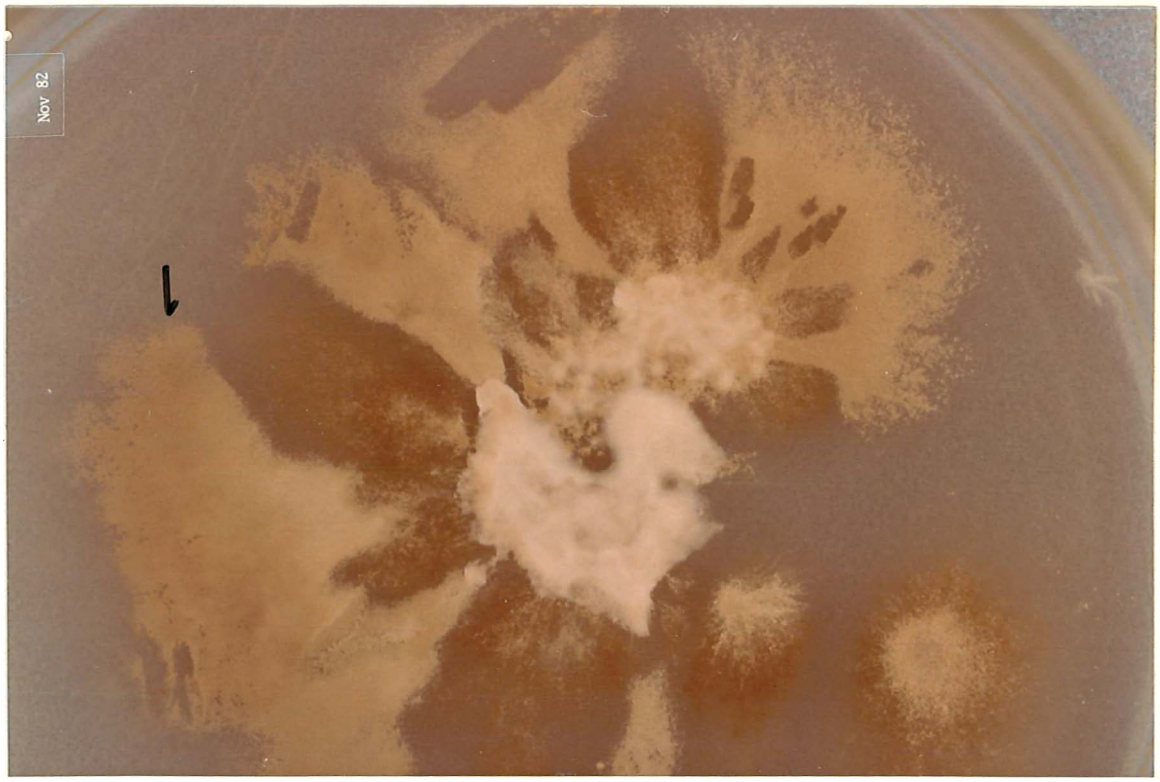


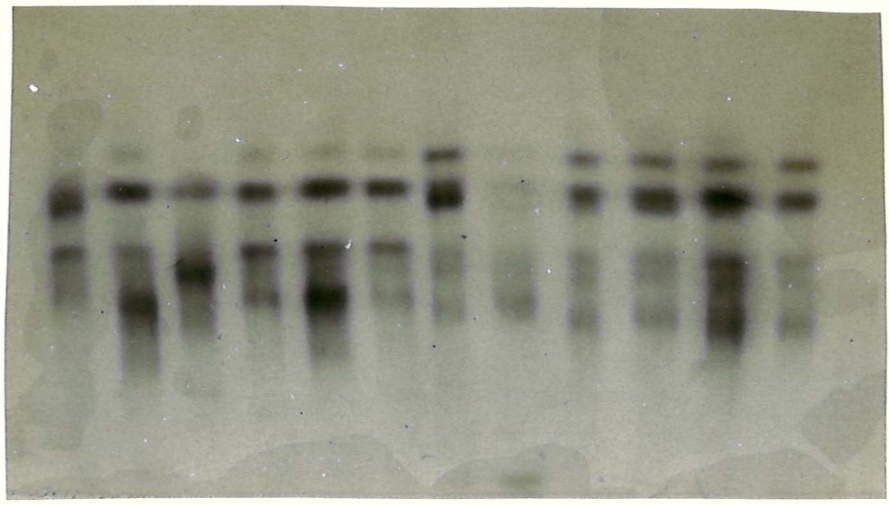
Figura 10 - Película heterocariótica apresentando "setores vigorosos" já em MM. (Cruzamentos E_6 x E_6 e E_6 x RJ_3).

4.5.1.3. Análise da variabilidade genética das linhagens selvagens, mutantes e setores de *M. anisopliae*

Esta análise foi feita através de eletroforese de esterases em gel de poliacrilamida como descrito no item 3.5. As Figuras 11 e 12 mostram a variabilidade apresentada entre as linhagens utilizadas.

4.5.1.4. Tamanho dos conídios e conteúdo de DNA por conídio das linhagens selvagens, mutantes e setores de *M. anisopliae*

O tamanho dos conídios foi determinado segundo o item 3.4. e conteúdo de DNA por conídio segundo o item 3.6. A Tabela 9 mostra os resultados obtidos nos dois métodos.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

PADRÕES	LINHAGEM
1	RJ-3
2	$RJYA^-M^-$
3	$RJVL^-C^-$
4	E_6
5	$E_6 VM^-B^-$
6	$E_6 YA^-P^-$
7	setor proveniente $E_6 YA^-P^-$ + $RJVL^-N^-$
8	setor proveniente $E_6 VM^-B^-$ + $RJVL^-C^-$
9	setor vigoroso proveniente $E_6 YA^-P^-$+$RJVL^-N^-$
10	setor vigoroso proveniente $E_6 YA^-P^-$+$RJVL^-C^-$
11	setor vigoroso proveniente $E_6 VM^-B^-$+$RJVL^-C^-$
12	setor vigoroso proveniente $RJYA^-M^-$+$RJVL^-C^-$

Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida. Padrões de esterases das linhagens envolvidas no experimento.

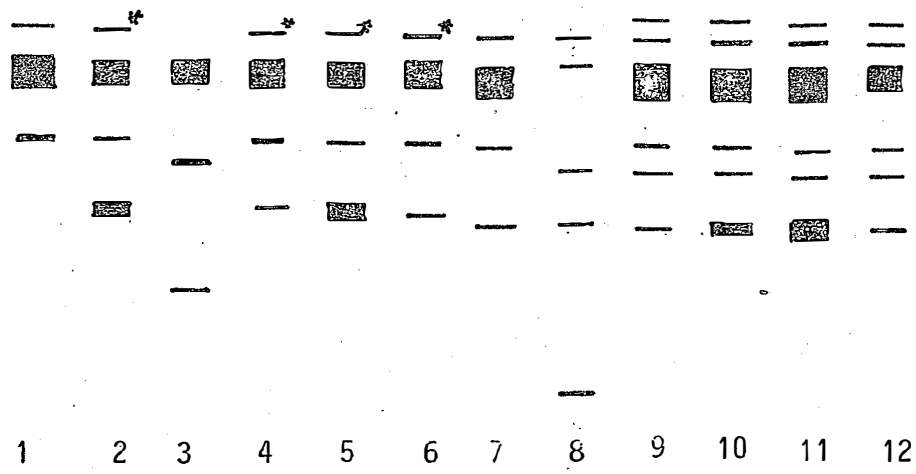


Figura 12 - Esquema obtido a partir dos padrões de esterases da Fig. 11.

PADRÕES	LINHAGEM
1	RJ-3
2	$RJYA^-M^-$
3	$RJVL^-C^-$
4	E_6
5	$E_6VM^-B^-$
6	$E_6YA^-P^-$
7	setor proveniente $E_6YA^-P^-$ + $RJVL^-N^-$
8	setor proveniente $E_6VM^-B^-$ + $RJVL^-C^-$
9	setor vigoroso proveniente $E_6YA^-P^-$ + $RJVL^-N^-$
10	setor vigoroso proveniente $E_6YA^-P^-$ + $RJVL^-C^-$
11	setor vigoroso proveniente $E_6VM^-B^-$ + $RJVL^-C^-$
12	setor vigoroso proveniente $RJYA^-M^-$ + $RJVL^-C^-$

* Bandas correspondentes a α-esterases.

Tabela 9 - Diâmetro de conídios, número de núcleos por conídio e conteúdo de DNA por conídio das linhagens selvagens e cruzamentos a partir dos mutantes obtidos a partir das primeiras.

Linhagem	Tamanho dos conídios em um[1]		% de conídios binucleados[2]	Conteúdo de DNA (em g) por conídio
	Comprimento maior	Comprimento menor		
E_6	17,4	7,0	2	$0,55.10^{-13}$
RJ	19,36	7,36	4,75	$0,50.10^{-13}$
$E_6YA^-P^- // RJVL^-C^-$	19,82	9,11	0	$1,00.10^{-13}$
$E_6VM^-B^- // RJVL^-C^-$	19,24	8,7	0	$1,10.10^{-13}$
$RJYA^-M^- // RJVL^-C^-$	19,36	7,88	0	$2,90.10^{-13}$
$E_6YA^-P^- // RJVL^-N^-$	19,43	9,03	0	$3,76.10^{-13}$
$E_6VM^-B^- // RJVL^-C^-$	19,80	9,18	0	$5,50.10^{-13}$

[1] Média de 25 medidas.

[2] % em 400 conídios contados para cada linhagem.

4.5.2. FUSÃO DE PROTOPLASTOS

A metodologia utilizada para obtenção de "produtos de fusão" entre mutantes auxotróficos e morfológicos complementares, dentro do isolado E_6 e entre os isolados E_6 e RJ-3, foi realizada segundo o item 3.3.7., a qual encontra-se resumida no esquema da Figura 13. Os cruzamentos realizados, as freqüências de reversão dos protoplastos de cada linhagem utilizada e as freqüências (média) de fusão de cada cruzamento são mostrados na Tabela 10.

As suspensões de protoplastos obtidas após tratamento com PEG (polietileno glicol), item 3.3.7., foram semeadas em MMKCl e incubadas por um período de 8 dias. As "pequenas" colônias que se desenvolveram neste meio, como "prováveis" produtos de fusão, foram transferidas para placas com MM ou MC por recorte de um bloco de ágar.

No meio mínimo, estas "pequenas" colônias, após um período de incubação, desenvolveram-se ou não em colônias heterocarióticas (Fig. 14a) apresentando coloração mista entre as linhagens parentais mutantes ou com coloração de somente um dos pais (Fig. 14b). Suspensões de conídios (10^6 conídios/ml) em tween 80, 0,1%, dessas colônias heterocarióticas, quando transferidas novamente para MM, não apresentaram o desenvolvimento de colônias prototróficas.

No meio completo, estas "pequenas" colônias, após um período de incubação, apresentaram setores com caracte

rísticas de um ou de ambos os pais do cruzamento (Figuras 15 e 16). Destes setores, suspensões de conídios foram feitas em tween 80 0,1%, que após diluições apropriadas, foram semeadas em MC para obtenção de colônias isoladas. Após este procedimento ser realizado, procedeu-se à auxonografia dos setores, pela técnica de placa mestra e conseqüente semeadura em meios diferenciais (Fig. 17). O resultado obtido para cada cruzamento, encontra-se relacionado na Tabela 11.

Na auxonografia, obtiveram-se colônias que apresentaram coloração verde e cresciam em MM (Fig. 17). Quando suspensões de conídios destas colônias foram novamente semeadas em MM e MC, obtiveram-se colônias que apresentaram as características de ambos os pais separadamente, e que não cresceram em MM evidenciando-se deste modo sua natureza heterocariótica.

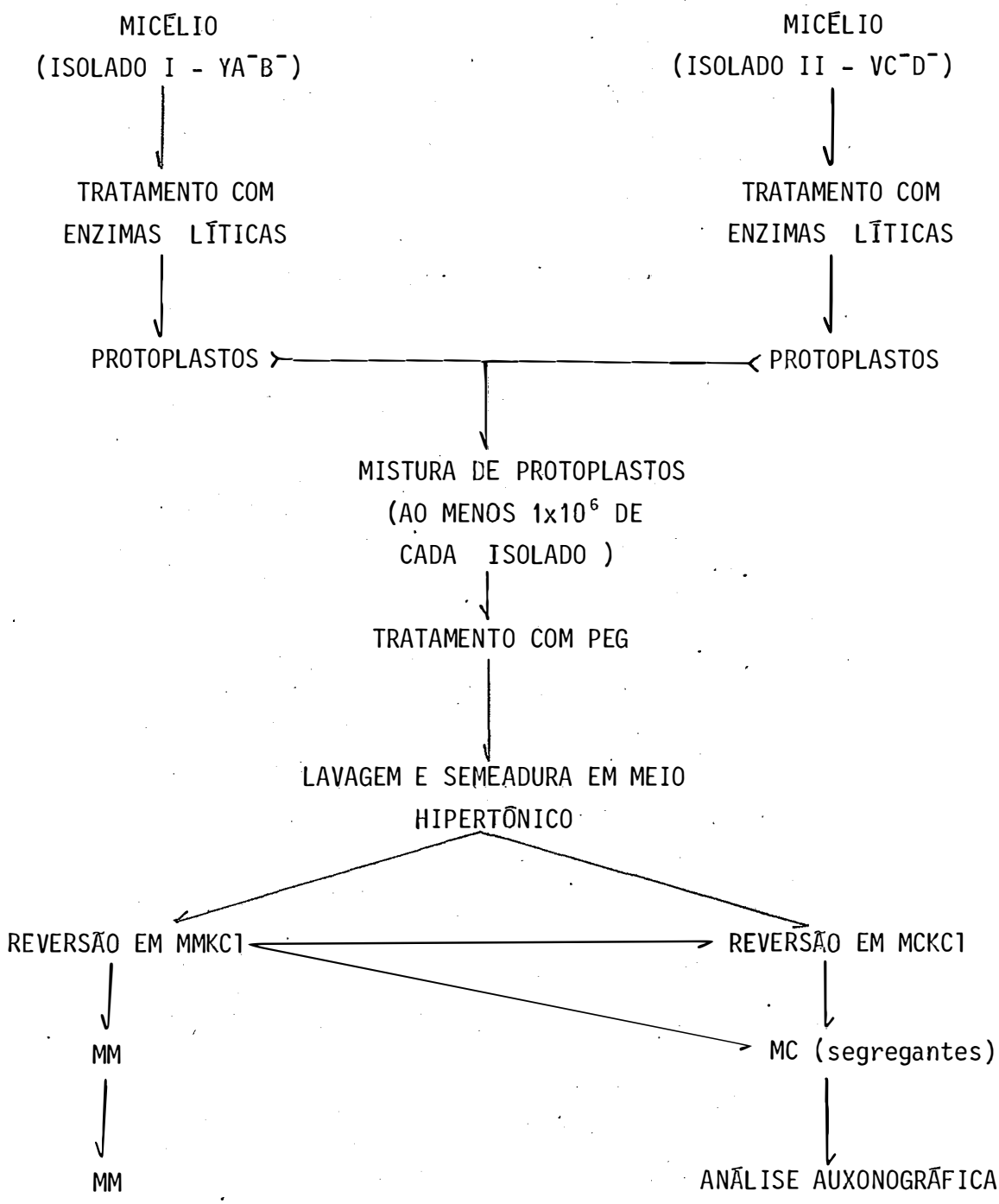
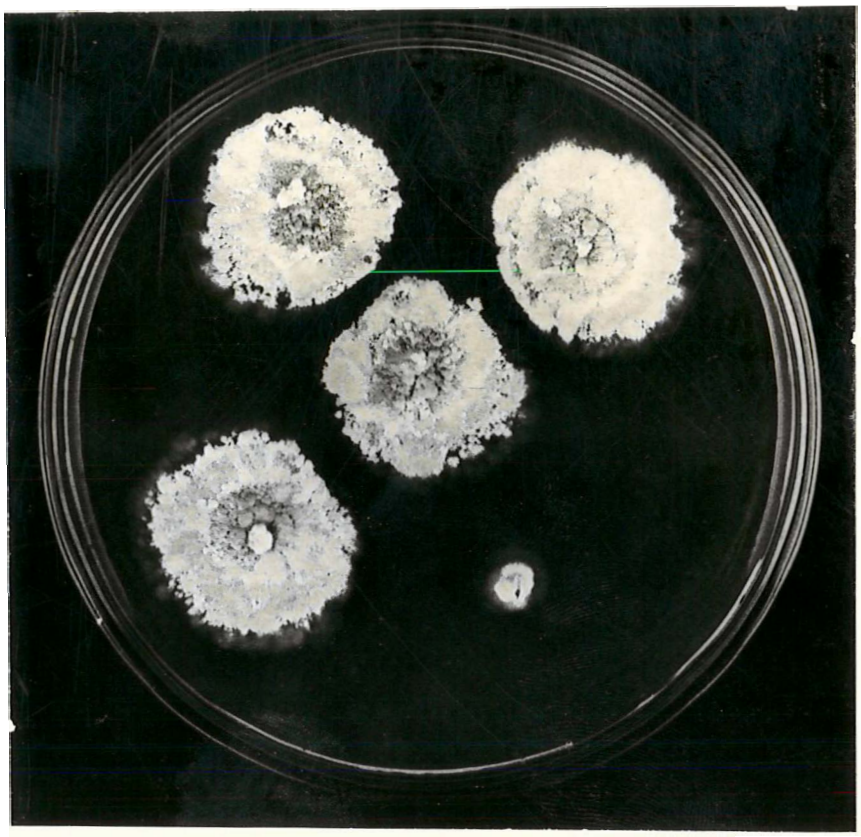
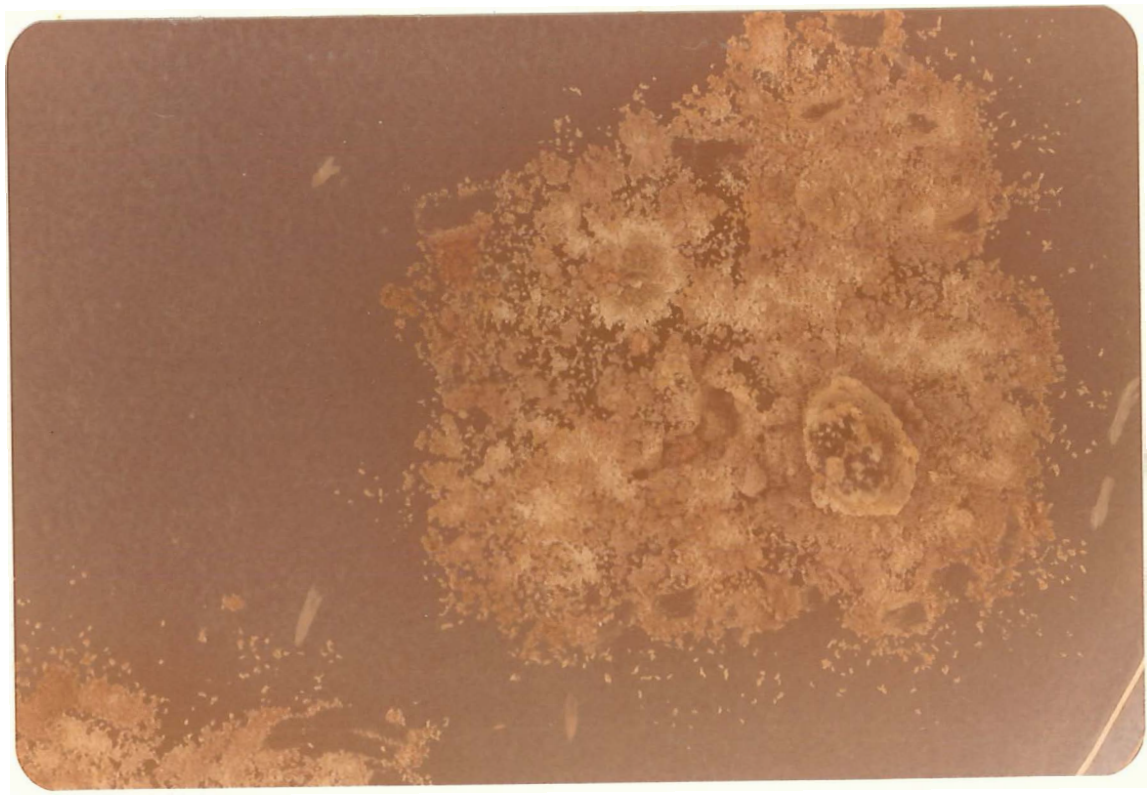


Figura 13 - Esquema da metodologia utilizada para fusão de protoplastos em *M. anisopliae*.

Tabela 10 - Freqüências de reversão dos protoplastos utilizados para fusão, cruzamentos realizados e freqüência de fusão para cada cruzamento.

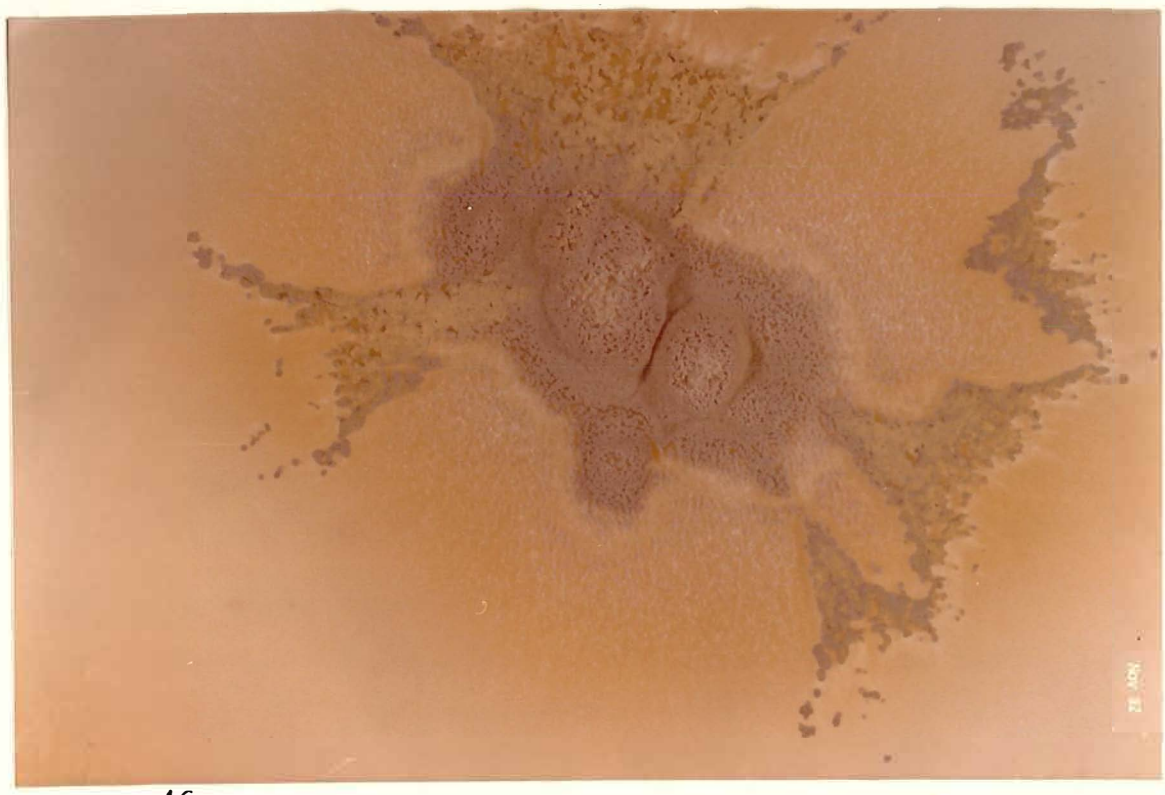
Linhagens	Frequência de reversão (10^7 protoplastos)	Cruzamento	Freqüência de fusão
$E_6VM^-B^-$	<1	$E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-L^-$	$20,2 \cdot 10^{-5}$
$E_6YA^-L^-$	<1	$E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-C^-$	$0,83 \cdot 10^{-5}$
$E_6YA^-C^-$	<1	$E_6VM^-B^-$ x $E_6YP^-L^-$	$44,1 \cdot 10^{-5}$
$E_6YP^-L^-$	<1	$E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-P^-$	$2,6 \cdot 10^{-5}$
$E_6YA^-P^-$	<1	$E_6VM^-B^-$ x $RJYA^-L^-$	$34,16 \cdot 10^{-5}$
$RJVL^-N^-$	<1	$E_6YA^-C^-$ x $RJVL^-N^-$	$0,88 \cdot 10^{-5}$
$RJYA^-L^-$	<1	$E_6YP^-L^-$ x MYM^-A^-	$33,63 \cdot 10^{-5}$
MYA^-M^-	<1		





Figuras 14a,b - Desenvolvimento de colônias heterocariõticas em MM provenientes da fusão de protoplastos entre isolados de *M. anisopliae* (cruzamentos: E_6 x E_6 , E_6 x RJ-3).

15.



16.

Figuras 15 e 16 - Desenvolvimento de colônias oriundas de fusão de protoplastos em MC entre isolados de *M. anisopliae*. (cruzamentos: E_6 x E_6 , E_6 x RJ-3).

Figura 17 - Placa mestra utilizada para repique em meios de cultura diferenciais, mostrando colônias obtidas de setores em MC.(Disposição 5 x 5 + 1).

Figura 18 - Colônias de *M. anisopliae* provenientes de fusão de protoplastos e mostrando o desenvolvimento de coloração verde entre as mesmas (Fusão : E_6 x E_6).

Tabela 11 - Segregantes obtidos nas diferentes fusões de protoplastos em *M. anisopliae*.

Cruzamento	Número de setores analisados	Recombinantes (Nº)	
$E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-L^-$	61	Y A^-	(1)
		L^-	(1)
		$A^-L^-B^-$	(1)
		V M^-	(2)
		A^-	(1)
		B^-	(1)
		$A^-L^-B^-$	(1)
$E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-C^-$	51	Y $A^-C^-B^-$	(1)
		V/Y M^-	(14)
		M^-B^-	(7)
		VERDE M^-B^-	(1)
$E_6VM^-B^-$ x $E_6YP^-L^-$	45	Y P^-	(4)
		M^-	(2)
		B^-	(2)
		L^-	(5)
		B^-L^-	(5)
		$B^-L^-P^-$	(13)
		$M^-L^-P^-$	(1)
		V M^-	(1)
		B^-	(1)
		H* M^-	(1)
		B^-	(5)
$E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-P^-$	20	Y A^-	(1)
		$A^-P^-B^-$	(1)
		$A^-P^-M^-$	(3)
		V B^-	(2)
		V/Y M^-	(1)
$E_6YA^-C^-$ x $RJVLN^-$	28	Y $A^-C^-L^-$	(1)
		V L^-	(1)
		N^-	(1)
$E_6YP^-L^-$ x MYA^-M^-	30	Y P^-	(1)
		$P^-L^-A^-$	(2)

* Coloração heterocariótica.

5. DISCUSSÃO

5.1. INDUÇÃO DE MUTAÇÃO COM LUZ UV E OBTENÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS

O estabelecimento de curvas de sobrevivência para as duas linhagens (E_6 e RJ-3) frente à luz ultravioleta, mostrou haver diferenças das mesmas quanto à sensibilidade para o comprimento de onda utilizado (2573 Å) sendo que, a linhagem RJ-3 é mais sensível que a linhagem E_6 (Figuras 1 e 2, Tabelas 1 e 2). Do mesmo modo, esta mesma característica foi observada em outras linhagens (VALE *et al.*, 1980) e tanto naqueles casos como no presente, parece existir uma alta variabilidade. Assim, o caráter que é importante para o controle biológico (resistência à luz solar) pode vir a ser melhorado não apenas por mutação para resistência, como também por recombinação através do ciclo parassexual recentemente determinado (MESSIAS e AZEVEDO, 1980).

Estas curvas de sobrevivência com luz ultravioleta, ao contrário do que normalmente se faz (SANTOS, 1978; MESSIAS e AZEVEDO, 1980) com o fungo *M. anisopliae*, foi determinada com o auxílio de um espectrômetro para luz ultravioleta (Ultra Violet Products, Inc., CA., USA), fazendo com que para cada ponto de irradiação a medida fosse tomada em $\mu W/cm^2/s$. Este procedimento, faz com que para a mesma linhagem ou mesmo para linhagens semelhantes não haja necessidade de ser construída uma nova curva de sobrevivência sempre que se for trabalhar com uma lâmpada ultravioleta nova, desde que se tenha uma curva padronizada. O presente trabalho além de abrir essas perspectivas, ao mesmo tempo possibilita também estudos para obtenção de mutantes com resistência aumentada para a luz ultravioleta (AZEVEDO *et al.*, 1981); tais mutantes são de grande valia em controle biológico por sua maior resistência a radiações que chegam ao solo durante ou após a aplicação dos conídios no campo.

O estabelecimento de técnica de enriquecimento que consiste em suspender conídios do tipo selvagem, tratados com agente mutagênico, em MM líquido, remover os prototróficos por filtração repetida em gaze esterilizada e posterior semeadura dos conídios restantes em MC (FRIES, 1947); permitiu que houvesse um aumento no número de mutantes auxotróficos obtidos de 0,01% (MESSIAS, 1980) para 2,34% a 6,13% ou seja, um aumento máximo de 613 vezes. Assim, grande número desses mutantes foram obtidos (Tabela 4), havendo predominância de mutantes deficientes na síntese de aminoácidos e ácidos nucléicos sobre os deficientes na

síntese de vitaminas. Este fato, indica que este último grupo de mutantes é contra-selecionado pela filtração devido à facilidade com que cresce em quantidades mínimas de vitaminas liberadas, ou pelos prototróficos em crescimento, ou resultantes da lise de células mortas durante o período de crescimento (STRAUSS, 1958). Esta metodologia, permite que, duplos auxotróficos sejam obtidos com facilidade, o que torna estudos de análise genética mais seguros devido ao número de marcas envolvidas com conseqüente diminuição da freqüência de reversão.

5.2. CICLO PARASSEXUAL

5.2.1. ANÁLISE CLÁSSICA

Os heterocários produzidos através da metodologia clássica entre todos os mutantes auxotróficos da linhagem E_6 mostraram complementação com conseqüente formação de películas, demonstrando que as marcas utilizadas são recessivas. Por sua vez, na maioria das vezes, não houve formação de películas heterocarióticas entre os mutantes auxotróficos das linhagens E_6 e RJ-3. No primeiro caso, as películas de heterocário apresentaram conídios com coloração predominantemente igual a um dos parentais, de ambos ou com uma coloração intermediária entre estas. Como a maioria dos conídios de *M. anisopliae* é uninucleada (VEEN, 1967;

TINLINE, 1971; MESSIAS *et al.*, 1978), MESSIAS e AZEVEDO (1980), estudando a formação de heterocários com coloração verde após o cruzamento de mutantes morfológicos (violetas e amarelos) na linhagem E_9, concluíram ser este caráter não autônomo. Porém, a partir dos dados acima expostos, pode-se considerar que, ao menos nestas linhagens (E_6 e RJ-3), o caráter para coloração se expressa de maneira autônoma como em *Aspergillus flavus* (PAPA, 1973) e *Aspergillus parasiticus* (PAPA, 1978). Nestas linhagens, isto pode ser devido a produtos gênicos não difusíveis que se expressam somente por ocasião da maturação dos conídios e de maneira dependente do genótipo presente nos mesmos. Por outro lado, colônias oriundas de fusão de protoplastos (setores advindos de MC), mostraram neste caso ser este caráter do tipo não autônomo (Fig.18). Desse modo, o processo de extração da parede celular com conseqüente regeneração poderia indicar que o fenômeno tem sua regulação e expressão gênica dependente da integridade da parede.

A grande dificuldade de obtenção de películas de heterocário entre as linhagens E_6 e RJ-3, pode ser explicada por um alto grau de divergência entre as mesmas, divergência esta, que pode ser refletida no padrão eletroforético de esterases (Figuras 11 e 12), diferença no número de protoplastos frente a um mesmo complexo lítico (Fig. 6), tamanho de conídio (Tab. 9) e crescimento em meios diferenciais (LUNA e AZEVEDO, comunicação pessoal). Por outro lado, a formação de raras películas heterocarióticas com produção de setores vigorosos já na placa de

MM e que continuam a produzir novos setores tanto em MM como em MC com Cloroneb, indica que fusão de hifas pode ocorrer em freqüências muito baixas, levando à formação de diplóides e hiperhaplóides instáveis em MM, porém, estáveis em MC. Este alto grau de poliploidia é constatado através de medidas do conteúdo de DNA por conídio (Tab.9), padrão de bandas de isozimas (Figs.11 e 12) e poderá vir a ser confirmado nos estudos envolvendo diminuição na freqüência de obtenção de mutantes nestas linhagens, quando comparadas com as linhagens parentais. Por outro lado, o padrão eletroforético de isozimas, demonstrou esta variabilidade genética através do aparecimento de novas combinações gênicas nos setores analisados e presença de loci responsáveis por padrões com diferentes posições de migração. Esses resultados indicam a provável diploidia ou hiperhaploidia das colônias obtidas, tornando-se esta, uma metodologia de valor comprovado para estudos onde hereditariedade precisa ser demonstrada. Entretanto, mais estudos são necessários para identificar os componentes genômicos envolvidos na formação desses híbridos (ANNÉ e PEBERDY, 1981) . Por outro lado, o presente trabalho confirmou os achados de MESSIAS e AZEVEDO (1980), verificando-se a inexistência de conídios binucleados entre as linhagens obtidas (diplóides e hiperhaplóides) e presença de baixa freqüência de conídios binucleados entre os haplóides parentais (E_6: 2%; RJ-3: 4,75 %) (Tab. 9).

5.2.2. PRODUÇÃO E FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Produção de protoplastos tem sido obtida com o uso de estabilizadores osmóticos que variam para cada tipo de microrganismo (*A. chrysogenum*: NaCl 0,7M; *P. chrysogenum*: NaCl 0,7M; *Aspergillus* sp.: KCl 0,6M; *V. volvacea*: $MgSO_4$ 0,6M; *S. cerevisiae*: Sorbitol 1,2M); estes estabilizadores, juntamente com um grande número de enzimas líticas (celulases, quitina - ses, β-D-glucanase, helicase, enzima lítica L_1, novozima, β-D-glucuronidase) utilizadas isoladamente ou em diferentes combinações permitem produção máxima de protoplastos no menor tempo possível (HAMLYN *et al.*, 1981). Deste modo, protoplastos das linhagens E_6 e RJ-3 foram obtidos com o uso de KCl 0,7M em tampão fosfato 0,2M (pH 5,8) como estabilizador (AZEVEDO, comunicação pessoal) e um complexo de enzimas líticas constituído das enzimas Novozima e Celulase CP (HAMLYN *et al.*, 1981). Após a determinação do tempo ideal para produção de protoplastos (Fig. 6), evidenciou-se grande diferença no número de protoplastos produzidos entre as duas linhagens, com grande predomínio de RJ-3 sobre E_6. Esta diferença provavelmente deve ser devida às diferentes constituições das paredes celulares das duas linhagens, o que é passível de confirmação através de estudos correspondentes das mesmas. De qualquer forma, assim como essas linhagens são distintas em várias características, algumas delas já citadas anteriormente, também os dados de produção de protoplastos confirmam as grandes diferenças existentes entre

as mesmas.

Os protoplastos acima obtidos foram usados para fusões, as quais ocorreram com um alto índice e com freqüência variável nos diferentes cruzamentos (Tab. 10). Esta variação provavelmente foi devida às pequenas diferenças nas condições de trabalho em cada experimento realizado. Deste modo, observou-se que no MMKCl, protoplastos advindos da mistura de fusão originaram colônias muito pequenas e que, ao serem transferidas para MM e MC, desenvolveram-se ou não em colônias heterocarióticas com coloração de um ou de ambos os pais no primeiro caso (MM, Figs. 14a e 14b) e em colônias instáveis com produção de setores no segundo caso (MC, Figs. 15 e 16). Das colônias heterocarióticas formadas em MM, suspensões de conídios foram feitas (10^7 conídios/ml) e novamente semeadas em MM, porém, não originaram colônias (diplóides) que pudessem crescer no referido meio. Por outro lado, ao realizar-se a análise genética em meios diferenciais dos setores oriundos de MC, observou-se que estes podiam ser do tipo parental ou recombinantes (Tab. 11). Estes dados podem levar às seguintes hipóteses:

. as pequenas colônias que cresceram em MMKCl, poderiam ter se originado devido à lise de protoplastos na solução de fusão com conseqüente liberação de nutrientes em quantidades suficientes para um pequeno crescimento.

. ocorre fusão de protoplastos entre as duas linhagens, porém, como cada protoplasto pode ter desde zero até vários núcleos, há possibilidade de se formar um heterocário com razão nuclear não balanceada (mais núcleos de um tipo do que outro) levando ou não ao crescimento da colônia.

. ocorre fusão entre protoplastos com conseqüente fusão nuclear e recombinação, porém, este estado não é estável, fazendo com que ocorra segregação cromossômica e nuclear já a nível de hifa.

A primeira hipótese é improvável, uma vez que as colônias que se originaram em MMKCl podem continuar a crescer em MM. Assim, ocorrendo fusão nuclear, recombinação ou não de cromossomos e segregação cromossômica e nuclear, uma diferença na razão de núcleos poderia levar a um pequeno crescimento em MMKCl. Resultados semelhantes foram observados em *Cephalosporium acremonium* (BALL e HAMLYN, 1982), onde os autores após fusão de protoplastos não obtiveram evidências para a formação de diplóides estáveis; porém, recombinantes presumivelmente haplóides, foram recuperados em uma variedade de meios seletivos de regeneração. A mesma observação foi feita em *Aspergillus niger* por BONATELLI e AZEVEDO (comunicação pessoal) ao obterem recombinantes sem a formação de diplóides. Este fenômeno que parece ter freqüência generalizada, foi designado de parameiose por BONATELLI et al. (1983).

5.2.3. ANÁLISE GENÉTICA DOS CRUZAMENTOS REALIZADOS

Dos dados obtidos (Tab. 11) foi possível evidenciar-se a ocorrência de transferência gênica através da presença de recombinantes com mais marcadores genéticos que os existentes nas duas linhagens parentais (cruzamentos: $E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-L^-$; $E_6VM^-B^-$ x $E_6YP^-L^-$). Este fato é de grande importância pois, em programas de melhoramento genético, transferência pode ser feita com marcadores de reconhecido valor em controle biológico.

O número e tipo de recombinantes obtidos nos cruzamentos entre os mutantes da linhagem E_6, indica que recombinação mitótica ocorre com freqüência relativamente alta ($E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-C^-$, $E_6VM^-B^-$ x $E_6YP^-L^-$); sendo difícil distinguir entre os segregantes se houve haploidização, só permuta mitótica ou permuta mitótica mais haploidização. Por outro lado, no cruzamento $E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-L^-$ a grande maioria dos setores analisados mostraram ser do tipo parental indicando que *M. anisopliae* deve ter um pequeno número de grupos de ligação o que aliás já havia sido mencionado por MESSIAS e AZEVEDO(1980). Este fato, deve ser melhor analisado em estudos futuros com cruzamentos deste mutante ($E_6YA^-L^-$) com outros que venham a ser obtidos pois, como o mesmo foi selecionado após irradiação com luz ultravioleta é possível que algum tipo de alteração estrutural existente no mesmo (translocação ou inversão) exerça uma contra-seleção para os recombinantes, resultando assim nu-

ma maior proporção de marcas parentais. Dos cruzamentos $E_6VM^-B^-$ x $E_6YP^-L^-$ e $E_6VM^-B^-$ x $E_6YA^-P^-$ é possível inferir - se que provavelmente as marcas $\underline{L}^-$ e $\underline{P}^-$ estão ligadas (14 do total de recombinantes apresentam estas marcas) e que as marcas $\underline{Y}$ e $\underline{P}^-$ também estão ligadas (18 no primeiro cruzamento e 4 no segundo, respectivamente). Nos cruzamentos envolvendo as linhagens RJ-3, e M com E_6, como era de se esperar, ocorreram poucos recombinantes indicando que a recombinação de cromossomos e permuta mitótica é dificultada provavelmente por diferentes rearranjos cromossômicos existentes nas linhagens RJ-3 e M que aumentam a inviabilidade. Este fato pode ser constatado através do fato que, no cruzamento $E_6YA^-C^-$ x $RJVL^-N^-$, dos 28 setores analisados apenas 3 são recombinantes; no cruzamento $E_6YP^-L^-$ x MYA^-M^- dos 30 setores analisados apenas 3 são recombinantes, dando um total de cerca de 12%, enquanto que nos cruzamentos envolvendo os mutantes da linhagem E_6, de 177 setores analisados, 86 são recombinantes (cerca de 48%) ou quatro vezes maior do que os outros cruzamentos.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho podem ser formuladas as seguintes conclusões:

1. A padronização da curva de sobrevivência à luz ultravioleta com o auxílio de um espectrômetro, pode auxiliar em futuros estudos para obtenção de mutantes resistentes a este comprimento de onda.

2. A técnica de enriquecimento para obtenção de mutantes auxotróficos por filtração, permitiu um aumento máximo de 61,3 vezes no número de mutantes deficientes na síntese de aminoácidos; por outro lado, observa-se apenas raros mutantes deficientes para a síntese de vitaminas.

3. Obtiveram-se películas heterocarióticas, sem a formação de diplóides, entre mutantes morfológicos e nutricionais den-

tro da mesma linhagem. Com raras exceções, estas películas não foram formadas entre mutantes morfológicos e nutricionais de linhagens distintas.

4. As raras películas heterocarióticas entre diferentes linhagens produziram setores vigorosos ao serem transportadas para MM, e que mostraram ser instáveis em MM e estáveis em MC, após posteriores passagens para estes meios. Estes foram confirmados como diplóides ou hiperhaplóides quando analisados através de eletroforese para padrões de isozimas e medidas do conteúdo de DNA por conídio.

5. Confirmou-se a inexistência de conídios binucleados nestes diplóides e hiperhaplóides e existência de conídios binucleados (em baixa freqüência) nos haplóides parentais.

6. Eletroforese para padrões de isozimas, constitui-se um bom método para determinação de variabilidade entre linhagens haplóides e diplóides.

7. A obtenção de protoplastos em grande numero nas linhagens usadas, através de complexo lítico, torna esta metodologia viável para experimentos com fusão de protoplastos.

8. A fusão de protoplastos, dentro e entre linhagens, ocorre com uma alta freqüência, o que permite aplicá-la para melhoramento genético desta espécie para posterior uso em controle biológico.

9. Através da fusão de protoplastos, ocorre fusão nuclear, com segregação e recombinação mitótica, o que torna esta metodologia uma eficiente alternativa do ciclo parassexual para estudos genéticos e melhoramento.

7. LITERATURA CITADA

AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, 22: 309-314.

AQUINO, M.L.N., 1974. O fungo entomógeno *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, Recife, 72: 1-26.

ALIMDZHANOVA, I.S. e A.M. BEZBORODOV, 1980. Lipase activity of *Oospora lactis* protoplasts. **Microbiology**, 49: 298-302.

ANDERSON, M.R. e C.S. DEPPE, 1977. Selection for conditional lethals: a general negative selection for *Schizophyllum commune*. **Genetical Research**, 29: 93-96.

ANNÉ, J.; H. EYSSEN; P. DE SOMER, 1976. Somatic hybridisation of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. **Nature**, 262: 719-721.

ANNÉ, J. e J.F. PEBERDY, 1975. Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glicol solutions. **Archives of Microbiology**, 105: 201-205.

ANNÉ, J. e J.F. PEBERDY, 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. **Journal of General Microbiology**, 92: 413-417.

ANNÉ, J. e J.F. PEBERDY, 1982. Protoplast fusion and inter-species hybridization in *Penicillium*. In fungal protoplasts. Their uses in Phisiology, Biochemistry and Genetics, ed. J.F. PEBERDY and L. FERENCZY, in press, New York.

AZEVEDO, J.L. e S.O.P. da COSTA, 1973. Exercícios práticos de Genética, ed. USP. 288p.

AZEVEDO, J.L.; N.M. CHACEL; P. TIMO, 1981. Resistência à luz ultravioleta e mutantes de *Metarhizium anisopliae*. Resumos da VIII Reunião de Genética de Microrganismos. p.1.

AZEVEDO, J.L.; A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. **Summa Phytopathologica**, 237-241.

AZEVEDO,J.L.; E.P.SANT'ANA e R.BONATELLI Jr., 1977.Resistance and mitotic instability to Chloroneb and 1,4-oxathin in *Aspergillus nidulans*. Mutation Research, 47:163-172.

BACH,M.L. e F.LACROUT, 1972. Direct selective techniques for the isolation of pyrimidine auxotrophs in yeast. Molecular and General Genetics, 115:126-130.

BACHMANN,B.J. e D.M.BONNER,1959. Protoplasts from *Neurospora crassa*. Journal of Bacteriology, 78:550-556.

BAL,J.; E. BARTNIK, B.GORYLUK; N.J.PIENIAZEK, 1975. An easy way of obtaining *Aspergillus nidulans* haploids in the parasexual cycle using N-glycosyl polifungin. Genetical Research, 25: 249-252.

BALL,C., 1971. Haploidization analysis in *Penicillium chrysogenum* Journal of General Microbiology, 66:63-69.

BALL,C. e P.F. HAMLYN, 1982. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic cephalosporin C. Revista Brasileira de Genética, V(1):1-13.

BALFOUR-BROWNE,F.L., 1960. The green muscardine diseases of insects, with special reference to an epidemic in a swarm os Locustos in Eritrea. Proceedings of Royal Entomological Society of London, Ser.A., 35:65-74.

BALTZ,R.H., 1978. Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. Journal of General Microbiology, 107:93-102.

BARACHO,I.R. e R.T.ROSIN, 1977. Tabelo por la kalkulado de MO_{95}, en fungoj. Sciencia Revue de Internacia Sciencia Asocio Esperontista Beograda, Jugoslavio, 28:223-226.

BARNETT,H.L., 1960. Illustrated genera of imperfecti fungi. Minneapolis Burgess Publishing Company, 225p.

BONATELLI Jr., R.; J.L.AZEVEDO e J.V. VALENTE, 1983.Parasexuality in citric Acid-production strain of *Aspergillus niger*.Revista Brasileira de Genética, (in press).

BARON,G., 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. Baltimore, The Willians & Wilkins Company, 686p.

BARRON,G.L., 1962. The parasexual cycle and linkage relationships in the storage rot fungus *Penicillium expansum*.Canadian Journal of Botany, 40:1603-1613.

BAUCH,R., 1952. Kopulationsbedingungen und sekundäre geschlechtsmerkmale bei *Ustilago violacea*. Biol.Zbl, 42: 9-38.

BEADLE,G.W. e E.L. TATUM, 1945. *Neurospora II*. Methods of producing and detective mutations concerned with nutritional requeriments. American Journal of Botany, 32:678-686.

BEGGS,J.D., 1978. Transformation of yeast by a replicanting hybrid plasmid. Nature, 275:104-109.

BEHLING,R.A. e A.G. FISHER, 1980. Formation of protoplasts from *Gliocadium virens*. The International Journal of Biochemistry, 11:449-456.

BIELY,P.; Z.KRÁTKY; J.KOVARIK; S.BAUER, 1971. Effect of α-deoxyglucose on cell wall formation in *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to cell growth inhibition. Journal of Bacteriology, 107:121-129.

BINDING, H., 1974. The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. Molecular and General Genetics, 135:273-276.

BIRNBOIN,H.C., 1971. New method for extraction of ribonucleic acid and polyribossomes from *Schizosaccharomyces pombe*. Journal of Bacteriology, 107:659-663.

BOJNANSKÁ,A.; M.SIPICZKI; L.FERENCZY, 1980. Characterization of conidiation mutants in *Trichoderma viride* by hyfal anastomosis and protoplast fusion.Acta Microbiologica,27:305-308.

BOONE, D.M.; J.F.STAUFFER; M.A.STAHMANN; G.W. KEITT, 1956. *Venturia inaequalis* (Cke.)Wint. VII. Induction of mutants for studies on genetics nutrition and pathogenicity. American Journal of Botany, 43:198-204.

BOS,C.J. e S.M. SLAKHORST, 1981. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. Canadian Journal of Microbiology, 27:408-416.

BROWN,J.P., 1971. Susceptibility of the cell walls of some yeasts to lysis by enzymes of *Helix pomatia*. Canadian Journal of Microbiology, 17:205-208.

BUXTON, E.W., 1956. Heterocaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Journal of General Microbiology, 15:133-139.

BUXTON, E.W., 1962. Parasexual recombination in the banana-milt *Fusarium*. Transactions of the British Mycological Society, 45:274-279.

CARRAU, J.L.; J.L. AZEVEDO; P. SUDBERY; D. CAMPBELL, 1982. Methods for recovering fusion products among oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Revista Brasileira de Genética, V(1):221-226.

CATCHESIDE,D.G.,1954. Isolation of nutritional mutants of *Neurospora crassa* by filtration enrichment. Journal of General Microbiology, 11:34-36.

CHRISTENSEN,B.E.,1979. Somatic hybridization in *Saccharomyces cerevisiae*. Analysis of products of protoplasts fusion. Carlsberg Research Communication, 44:225-227.

CONTI,E.; C.L.MESSIAS; H.M. MYRINA e J.L.AZEVEDO, 1981. Electrophoretic variation in esterases and phosphotasis in eleven wild-type strains of *Metarhyzium anisopliae*. Experientia, 36:293-294.

CONSTABEL,F. e K.N.KAO,1974. Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethyleneglicol.Canadian Journal of Botany, 52:1603-1606.

COOK,K.A.,1974. Regulation of aromatic metabolism in fungi : Selection of mutants of yeast *Rhodotorula mucilaginosa* with nystatin. Journal of General Microbiology, 85:29-36.

CULBERTSON,M.R. e S.A.HENRY,1975. Inositol-requiring mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 80:23-40.

DARLING,S.; J.THEILADE; A.BIRCH-ANDERSEN,1969. Kinetic and morphological observations on *Saccharomyces cerevisiae* during spheroplast formation. Journal of Bacteriology, 98: 797-810.

DAS,A., 1980. Parasexual hybridization and citric acid production by *Aspergillus niger*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 9:117-122.

DAVIS, B.D., 1948. Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. Journal of American Chemistry Society, 70: 4267.

DAY, A.W. e J.K. JONES, 1968. The production and characteristics of diploids in *Ustilago violacea*. Genetics Research Cambridge, 11: 63-81.

DAY, A.W. e J.K. JONES, 1969. Sexual and parasexual analysis in *Ustilago violacea*. Genetical Research, 11: 63-81.

DAY, P.R. e G.E. ANDERSON, 1961. Two linkage groups in *Coprinus lagopus*. Genetical Research, Camb., 2: 414-423.

DEUTCH, C.E. e J.M. PARRY, 1974. Sphaeroplasts formation in yeast during the transition from exponential phase to stationary phase. Journal of General Microbiology, 80: 259-268.

DE VRIES, O.M.H. e J.G.H. WESSELS, 1972. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a litic enzime preparation from *Trichoderma viride*. Journal of General Microbiology, 73: 13-22.

DE VRIES, O.M.H. e J.G.H. WESSELS, 1973a. Effectiveness of a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride* In Releasing spheroplasts from fungi, particulary Basidiomycetes. Antonie van Leewenhoex, 39: 397-400.

DE VRIES, O.M.H. e J.G.H. WESSELS, 1973b. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified α-1,3-glucanase e chitinase derived from *Trichoderma viride*. Journal of General Microbiology, 76: 319-330.

DIATEWA, M.; I. VIARD; A.J.C. STAHL, 1981. Yeast protoplasts gained with various preparations of *Helix pomatia* digestive juice. Biochimie, 63: 67-69.

DONKERSLOOT, J.A. e R.I. MATELES, 1968. Enrichment of auxotrophic mutants of *Aspergillus flavus* by tritium suicide. Journal of Bacteriology, 96: 1551 -1555.

DOOIJEWAARD, A.M.P.; J.H. SIESTMA; J.T.M. WOUTERS, 1973. Formation and regeneration of *Geotrichum candidum* protoplasts. Journal of General Microbiology, 74: 205-209.

DUELL, E.A.; S. INOUE; M.F. UTTER, 1964. Isolation and properties of intact mitochondria from spheroplasts of yeast. Journal of Bacteriology, 88: 1762-1773.

DUTTA, S.K. e E.D. GARBER, 1960. Genetics of phytopathogenic fungi. III - An attempt to demonstrate the parasexual cycle in *Colletotrichum lagenarium*. Botanical Gazette, 122: 118-121.

EDDY, A.A. e D.H. WILLIAMSON, 1957. A method of isolating protoplasts from yeast. Nature, 179: 1252-1253.

EDDY, A.A. e D.H. WILLIAMSON, 1959. Formation of aberrant cell walls and of spores by the growing yeast protoplast. Nature, 183: 1101-1104.

EMERSON, S. e M.R. EMERSON, 1958. Production, reproduction and reversion of protoplasts - like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. Proceedings of National Academy of Science , USA, 44: 668-671.

EVLAKHOVA, A., 1966. Mass culture of entomopathogenic fungi. Zashchita Rasteni;Mask., 11: 43.

EVELEIGH, D.E.; J.H. SIETSMA; R.H. HASKINS, 1968. The involvement of cellulase and laminarase in the formation of *Pythium* protoplasts. Journal of General Microbiology, 52: 89-97.

FARGUES, J.; T. DURIEZ; J. ANDRIEU; R. POPEYE; P. ROBERT, 1975. Étude immunologique compareé de souches de *Metarhizium anisopliae* (Delack.) sien champicnon hyphomicéte entomopathogéne. Camptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, Ser. D., 281: 1781--1784.

FAWCETT, P.A.; P.B. LODER, M.J. DUNCAN; T.J. BEESLEY; E.P. ABRAHAM, 1973. Formation and properties of protoplasts from antibiotic-producing strains of *Cephalosporium acremonium*. Journal of General Microbiology, 79: 293-309.

FERENCZY, L. e A. MARÁZ, 1977. Transfer of mitocondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 268: 524-525.

FERENCZY, L.; F. KEVEI; J. ZSOLT, 1974. Fusion of fungal protoplasts. Nature, 793-794.

FERENCZY, L.; F. KEVEI; M. SZEGEDI, 1975. High-frequency fusion of fungal protoplasts. Experientia, 31: 1028-1030.

FERENCZY.; F. KEVEI; M. SZEGEDI, 1975. Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. Experientia, 31: 50-52.

FERENCZY, L.; F. KEVEI; M. SZEGDI; A. FRANKŐ; I. ROJIK, 1976. Factors affecting high-frequency fungal protoplasts fusion. Experientia, 32: 1156-1158.

FERENCZY, L.; M. SZEGEDI; F.KEVEI, 1977. Interspecific protoplasts fusion and complementation in *Aspergilli*. Experientia, 33. 184-186

FINKELMAN, M.A.J.; J.E. ZAJIC; A. VARDANIS, 1980. New method of producing protoplasts of *Aureobasidium pullulans*. Applied and Environmental Microbiology, 39: 923-925.

FORBES, E., 1959. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. Heredity, 13: 67-80.

FOURNIER, P.; A. PROVOST; C. BOURGUIGNON; H. HESLOT, 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. Archiver für Mikrobiologie, 115: 143-149.

FOURY, F. e A. GOFFEAU, 1973. Combination of 2-deoxyglucose and snail-gut enzyme treatments for preparing sphaeroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. Journal of General Microbiology, 75: 227-229.

FRIES, N., 1947. Experiments with different methods of isolating physiological mutations of filamentous fungi. Nature, 159: 199.

FUKUDA, H. e A. KIMURA, 1980. Transfer of mitochondria into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* by mini-protoplasts fusion. FEBS Letters, 113: 58-60.

GARBER, G.W. e L. BEHARA, 1965. Genetic of phytopathogenic fungi. XIV - The parasexual cycle in *Penicillium expansum*. Genetics, 52: 487-492.

GASLON, S.; A.G. OCHOA; J.R. VILLANUEVA, 1964. Production of yeast and mold protoplasts by treatment with the strepzyme of *Micronospora as*. Canadian Journal of Microbiology, 11: 573-580.

GENTHNER,F.J. e P.T. BORGIA, 1978. Spheroplasts fusion and heterokaryon formation in *Mucor racemosus*. Journal of Bacteriology, 134: 349-352.

GIBSON, R.K. e J.F. PEBERDY, 1972. Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 72: 529-538.

GODFREY, O.; L. FORD; M.L.B. HUBER, 1978. Interspecies matings of *Streptomyces fradie* with *Streptomyces bikiniensis* mediated by conventional and protoplast fusion techniques. Canadian Journal of Microbiology, 24: 994-997.

GUMPERT, J., 1980. Electron microscopic analysis of protoplast fusion in *Streptomyces hygroscopicus* and consideration on structural alterations in fusing membranes. Archives of Microbiology, 126: 263-270.

GURINA, L.V.; S.B. PETRIKEVICK; A.V. SHUL'GA; S.S. RYLKIN 1979. Stuty of fractional composition of protein from protoplasts of *Candida utilis* during growth and development. Microbiology, 48: 195-197.

HAMLYN, P.F.; R.E. BRADSHAW; F.M. MELLON; C.M. SANTIAGO; J.M. WILSON; J.F. PEBERDY, 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using comercial enzymes. Enzyme and Microbial Technology, 3: 321-325.

HASTIE, A.C., 1962. Genetic recombination in the hop-wilt fungus *Verticillium albo-atrum*. Journal of General Microbiology, 27: 373-382.

HASTIE, A.C., 1964. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. Genetical Research, 5: 305-315.

HAVELKOVÁ, M., 1966. A comparative study of submicroscopic structures of protoplasts of various yeast species. Folia Microbiologica, II, 453-458.

HEAGY, F.C. e J.A. ROPER, 1952. Deoxyribosenucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. Nature, 170: 713.

HEARN, V.M.; E.V. WILSON; D.W.R. MACKENZIE, 1980. The preparation of protoplasts from *Aspergillus fumigatus* mycelium. Sabouraudia, 18: 75-77.

HIDALGO-SALVATIERRA, O. e B. BERRIOS, 1972. Studies on the shootborer *Hypsiphyla grandella* Zeller (Lep., Pyralidae). XII. Determination of the LD_{50} of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin spores on fifth instar larvae. Turrialba, 22: 435-438.

HINNEN, A.; J.B. HICKS; G.R. FINK, 1978. Transformation of yeast. Proceedings of National Academie of Science, USA, 75: 1929-1933.

HOLLIDAY, R., 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis* Genetical Research, 2: 231-249.

HOPWOOD, D.A. e H.M. WRIGHT, 1978. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. Molecular and General Genetics, 162: 307-317.

HOPWOOD, D.A. e H.M. WRIGHT, 1979. Factors affecting recombinant frequency in protoplast fusion of *Streptomyces coelicolor*. Journal of General Microbiology, 111: 137-143.

HOPWOOD, D.A.; H.M. WRIGHT; M.J. BIBB, 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. Nature, 268: 171-177.

HOUSSET, P.; M. NAGY; J. SCHWENCKE, 1975. Protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe*: an improved method for their preparation and the study of their guanine uptake. Journal of General Microbiology, 90: 260-264.

IKEDA, Y.; R. NAKAMURA; K. UCHIDA; G. ISHITANI, 1957. Two attempts upon improving and industrial strain of *Aspergillus oryzae* trough somatic recombination and polyploidization. Journal of General and Applied Microbiology, 3: 93-101.

ISHITANI, C. e K.I. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and recombination in koji-molds (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*). V. Heterocaryosis. Journal of General and Applied Microbiology, 2: 345-400.

ISHITANI, C.; Y. IKEDA; K.I. SAKAGUCHI, 1956. Heditary variation and genetic recombination in koji-molds (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*). VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. Journal of General and Applied Microbiology, 2: 401-430.

JEFFREY, K.; M.J. HUBARD; M.G. SHEPHERD; P.A. SULLIVAN, 1981. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. Journal of Bacteriology, 146: 833-840.

JOHNSTON, J.R., 1915. The entomogenous fungi of Porto Rico. Puerto Rico Board of Commissioners of Agriculture Bulletin, **10**: 1-33.

KÄFER, E., 1958. An 8-chromossome map of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 9: 105-145.

KÄFER, E., 1960. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. Nature, 186: 619-620.

KÄFER, E., 1961. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. Genetics, 46: 1581-1604.

KAMAT, M.M.; M.K. PATEL; G.W. DHANDE, 1952. Occurrence of the green muscardine fugnus on Pyrilla species in Bombay. Current Science, 21: 317. Apud: TULLOCH, M., 1976. The genus *Metarhizium*. Transactions British Mycologycal Society, 66: 407-411.

KATZ, E.R. e M. SUSSMAN, 1972. Parasexual recombination in *Dictyostelium discoideum* and estable haploids segregants. Proceedings of National Academy of Science , USA, 69: 495--498.

KENDRIK, W.B., 1971. Taxonomy of fungi imperfecti. University of Toronto Press. 390p.

KEVEI, F. e J.F. PEBERDY, 1977. Interspecies hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplast. Journal of General Microbiology, 102: 255-262.

KEVEI, F. e J.F. PEBERDY, 1979. Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. Molecular and General Genetics, 170: 213-218.

KOVÁC, L.; H. BEDNAROVÁ; M. GREKSÁK, 1968. I. Isolation and properties of phosphorylating mitochondria from stationary phase cells. **Biochimestry Biophysical**, Acta, 153: 32-42.

LABORDA, F.; I.G. ACHA; J.R. VILLANUEVA, 1974. Studies on a strepzyme capable of obtaining protoplasts from *Fusarium culmorum* conidia. Transactions of British Mycological Society, 62: 509-518.

LEIN, J.; H.K. MITCHELL; M.B. MITCHELL, 1948. A method for the selection of biochemical mutants of *Neurospora*. Proceedings of National Academy of Science , 34: 435-442.

LESTER, H.E. e S.R. GROSS, 1959. Efficient method for selection of auxotrophic mutants of *Neurospora*. Science, 129: 572.

LEVADOUX, W.L.; K.F. GREGORY; A. TAYLOR, 1981. Sequential cold-sensitive mutations in *Aspergillus fumigatus*. II. Analysis by the parasexual cycle. Canadian Journal of Microbiology, 27: 295-303.

LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. Genetical Research, 10: 45--61.

LIHNELL, D., 1944. Gronmykos Fororsakeo an *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. II. Fisiologiska Undersokningar over Gronmykosens Svamp. Stat. Vaxtskyodsanst. Stockholm meddel, 43: 59-90.

LINGEDEGREN, C.G. e G. LINDEGREN, 1950. X-ray and ultra--violet induced mutations in *Neurospora*: I.X-ray Mutations; II. Ultra-violet Mutations. J.Hered., 32:405-435.

LITTLEWOOD, B.S. e J.E. DAVIS, 1973. Enrichment for temperature-sensitive and auxotrophic mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by trytium suicide. Mutation Research, 17: 315-322.

LOOMIS, W.F., 1979. Temperature-sensitive mutants of *Dictyostelium discoideum*. Journal of Bacteriology, 99: 65-69.

LOPEZ-BELMONTE, F.; I.G. ACHA; J.R. VILLANUEVA, 1966. Observations on the protoplasts of *Fusarium culmorum* and on their fusion. Journal of General Microbiology, 45: 127-134.

MacDONALD, K.D., 1968. The selection of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* with nystatin. Genetical Research, 11: 327-330.

MacDONALD, K.D., 1968a. The persistence of parental genome segregation in *Penicillium chrysogenum* after nitrogen mustard treatment. Mutation Research, 5: 302-305.

MacDONALD, K.D.; J.M. HUTICHINSON; W.A. GILLET, 1964. Properties of heterozygous diploids between strains of *Penicillium chrysogenum* selected for high penicillin yield. Antonie van Leewenhoek, 33: 209-224.

MacDONALD, K.D.; J.M. HUTICHINSON; W.A. GILLET, 1965. Heterozygous diploids of *Penicillium chrysogenum* and their segregation patterns. Genetics, 36: 378-397.

MACKINTOSH, M.E. e R.H. PRITCHARD, 1963. The production and replicating of micro-colonies of *Aspergillus nidulans*. Genetical Research, 4: 320-322.

MALING, B., 1960. Replica Plating and rapid ascus collection of *Neurospora*. Journal of General Microbiology, 23: 257-260.

MANN, K. e D. MECKE, 1980. Isolation and characterization of nuclei and nuclear membrane from *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. FEBS Letters, 122: 95-99.

MĀRAZ, A. e J. SUBIK, 1981. Transmission and recombination of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae* after protoplast fusion. Molecular and General Genetics, 181: 131-133.

MARCHIONATO, J.B., 1972. Nota sobre la "muscardina verde" [*Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor.]. Revista de História Natural, 1942-1943: 12-14.

MARQUES, E.J. e A.M. VILASBOAS, 1973. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata* Stal) no Nordeste do Brasil. Anais da 1ª Reunião Anual da Sociedade Entomológica do Brasil, Viçosa, MG. p.70.

MARTINDALE, D.W. e R.E. PEARMAN, 1979. An enrichment for temperature-sensitive mutants in *Tetrahymena termophila*. Genetics, 92: 1079-1092.

McCULLY, K.S. e E. FORBES, 1965. The use of p-fluorfenil-alanine with "mestra strains" of *Aspergillus nidulans* for assingning genes to linkage groups. Genetical Research, 6: 352-359.

MEGNET, R., 1965. Screening of auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces pombe* with 2-Deoxyglucose. Mutation Research, 2: 328-331

MEGENET, R., 1965a. Effect of 2-Deoxyglucose on *Schizosaccharomyces pombe*. Journal of Bacteriology, 90: 1032-1035

MENDOZA, C.G. e J.R. VILLANUENA, 1962. Production of yeast protoplasts by an enzyme preparation of *Streptomyces* sp. Nature, 195: 1326-1327.

MENEZES, E.M. e AZEVEDO, J.L., 1978. Reversion in variants from a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. Molecular and General Genetics, 164: 255-258.

MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus* Link. Piracicaba, ESALQ/USP. 75p. [Tese de Mestrado]

MESSIAS, C.L. e J.L. AZEVEDO, 1980. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhyzium anisopliae*. Transactions of British Mycologycal Society, 75: 473-477.

MESSIAS, C.L.; J.L. AZEVEDO; E. de CONTI; H.M.L. de SOUZA, 1978. Aspectos biológicos e indução de mutantes em *Metarrhizium anisopliae*. Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia. p.69.

MIEGEVILLE, M.; M. BASTIDE; J.M. BASTIDE; C. VERMEIL, 1979. Scanning electron microscope study on the formation of protoplasts in different types of yeast. Cellular and Molecular Biology, 25: 17-23.

MOAT, A.G.; I.J. BARNES; E.H. McCURLEY, 1966. Factors affecting the survival of auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed populations. Journal of Bacteriology, 92: 297-301.

MOAT, A.G.; N. PETER Jr.; A.M. SRB, 1959. Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics. Journal of Bacteriology, 7: 673-677.

MORRIS, N.R., 1978. Preparation of large molecular weight from the fungus *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 106: 387-389.

MOSSES, D.; K.L. WILLIANS; P.C. NEWELL, 1975. The use of mitotic crossing-over for genetic analysis in *Dictyostelium discoideum*: mapping of linkage group II. Journal of General Microbiology, 90: 247-259.

MUSÍLKOVÁ, M. e Z. FENCL, 1968. Some factors affecting the formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. Folia Microbiologica, 13: 235-239.

MUSÍLKOVÁ, M.; Z. FENCL; O. SEICHERTOVÁ, 1969. Release of *Aspergillus niger* protoplasts by *Penicillim purpurogenum* enzymes. Folia Microbiologica, 14: 47-50.

OCHI, K. e E. KATZ, 1980. Genetic analysis of the Actinomycin - producing determinants (plasmid) in *Streptomyces parvulus* using the protoplast fusion technique. Canadian Journal of Microbiology, 26: 1460-1464.

OKANISHI, M.; K. SUZUKI; H. UMEZAWA, 1974. Formation and reversion of Streptomycete protoplasts: Cultural conditions and morphological study. Journal of General Microbiology, 80: 394-400.

PAPA, K.E., 1973. The parasexual cycle in *Aspegillus flavus*. Mycologia, 68: 1201-1205.

PAPA, K.E., 1978. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. Mycologia, 70: 766-773.

PAPA, K.E., 1976. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. Mycologia, 67: 159-165.

PARTRIDGE, B.M. e J.A. DREWE, 1974. *Candida* protoplasts and their ultrastructure. Sabouradia, 12: 166-178.

PEBERDY, J.F., 1971. Protoplasts from *Mortirella vinacea*. Transactions of the British Mycological Society, 56: 67-72.

PEBERDY, J.F., 1979. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. Annual Review of Microbiology, 33: 21-39.

PEBERDY, J.F., 1979. Protoplasts - applications in microbial genetics. A Handbook of Experimental Methods. Published by Department of Botany, University of Nottingham, England, 60p.

PEBERDY, J.F., 1980. Protoplast fusion - a total for genetic manipulation and bredings in industrial microorganisms. Enzyme Microbiology and Technology, 2: 23-29.

PEBERDY, J.F.; C.E. BUCKLEY; D.C. DALTREY; P.M. MOORE, 1976. Factor affecting protoplasts release in some filamentous fungi. Transactions of British Mycological Society, 67: 23-26.

PEBERDY, J.F.; H. EYSSEN; J. ANNÉ, 1977. Interspecific hybridization between *Penicillim chrysogenum* and *Penicillium cyaneo-fulvum* following protoplast fusion. Molecular and General Genetics, 157: 281-284.

PEBERDY, J.F. e R.K. GIBSON, 1971. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. Journal of General Microbiology, 69: 325-330.

PEREIRA, J.O., 1978. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, ESALQ/USP. 108p. [Tese de Mestrado]

PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. Transactions British Mycological Society, 16: 55-75.

PONTECORVO, G., 1949. Auxonographic techniques in biochemical genetics. Journal of General Microbiology, 3: 122-126.

PONTECORVO, G. e E. KAFER, 1958. Genetic analysis by means of mitotic recombination. Advances in Genetics, 9: 71--104.

PONTECORVO, G. e G. SERMONTI, 1954. Parasexual recombination in *Penicillium chrysogenum*. Journal of General Microbiology, II: 94-104.

PONTECORVO, G. e J.A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 6: viii.

PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; E. FORBES, 1953. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. Journal of General Microbiology, 8: 198-210.

PONTECORVO, G.; J.A. ROPER, L.M. HEMMONS; K.D.McDONALD e W.J. BUFTON, 1953. The Genetic of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5: 141-238.

REAUME, S.E. e E.L. TATUM, 1949. Spontaneous and nitrogen mustard induced nutritional deficiencies in *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Biochemistry, 22: 331-338.

ROBERTS,C.F.,1959. A replica plating techniques for the isolation of nutritionally exacting mutants of a filamentous fungus (*Aspergillus nidulans*). Journal of General Microbiology, 20:540-548.

ROBINSON,M.; E.LEWIS; E.NAPIER, 1981. Occurrence of reiterated DNA sequences in strains of *Streptomyces* produced by an interspecific protoplast fusion. Molecular and General Genetics, 182:336-340.

ROMAN,H., 1955. A system selective for mutations affecting the synthesis of adenine in yeast. C.R. Lab. Carlsberg, Ser.

ROPER,J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. Experientia, 8:14-15.

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

RUSSEL,P.J. e M.P. COHEN, 1976. Enrichment for auxotrophic and heat-sensitive mutants of *Neurospora crassa* by trytium suicide. Mutation Research, 34:359-366.

SANTOS,A.L.L., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, Germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae*(Metsch) Sorokin.Tese apresentada à ESAL-USP para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola, 148 p.

SARACHEK,A.; D.D.RHOADS; R.H.SCHWARZHOFF, 1981. Hybridization of *Candida albicans* trough fusion of protoplasts. Archives of Microbiology, 129:1-7.

SCANDALIOS,J.G., 1969. Genetic control of multiple molecular from of enzymes in plants. A. review, Biochemical Genetics, 3:37-79.

SERMONTI,G., 1956. Complementary gen which effect penicillin yields. Journal of General Microbiology, 15:599-608.

SERMONTI,G., 1959. Genetics of penicillin production. Annals of the New York Academy of Science, 81:950-966.

SHAHIN,M.M., 1971. Preparation of protoplasts from stationary phase cells of *Schizosaccharomyces pombe*. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 13:714-719.

SIETSMA,J.H. e J.T.M.WOUTERS, 1971. Cell wall composition and protoplasts formation of *Geotrichum candidum*. Archives fur Mikrobiologie, 79:263-273.

SIETSMA,J.H.; D.E.EVELEIGH; R.H. HASKINS; J.F.T. SPENCER,1967. "Protoplast" from *Pythium* sp. PRL 2142, Canadian Journal of Botany, 13:1701-1704.

SIETSMA, J.H. e W.R. de BOER, 1973. Formation and regeneration of protoplasts from *Pythium* PRL 2142. Journal of General Microbiology, 74: 211-217.

SIPICZKI, M. e C. FERENCZY, 1977. Protoplasts fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. Molecular and General Genetics, 151: 77-81.

SNOW, S.R., 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "nystatin". Nature, 211: 206-207.

SOROKIN, N., 1883. Les parasites des plantes de l'homme et des animaus. Rastielinye parazyth celovekai-zivotnyh. Band, 11: 268-290. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on Entomogenous fungi. Transactions British Mycological Society, 16: 55-75.

SPENCER, J.F.T.; P. LAUD; D.M. SPENCER, 1980. The use of mitochondrial mutants in the isolation of hybrids involving industrial yeast strains. 2. Use in isolation of hybrids obtained by protoplast fusion. Molecular and General Genetics, 178: 651-654.

STAHL, V., 1978. Zygote formation and recombination between like mating-types in the yeast *Saccharomyces lipolytica* by protoplast fusion. Molecular and General Genetics, 160: 111-113.

STEPHEN, E.R. e A. NASIM, 1981. Production of protoplasts in different yeasts by mutanase. Canadian Journal of Microbiology, 27: 550-553.

STRAUSS, B.S., 1958. Cell death and "unbalanced growth" in *Neurospora*. Journal of General Microbiology, 18: 658--669.

STROMNAES, Ø.; E.D. GARBER; L. BEHARA, 1964. Genetics of phytopathogenic fungi. IX. Heterocariosys and the parasexual cycle in *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. Canadian Journal of Botany, 42: 423-427.

SUAREZ, J.A. e K.F. CHATER, 1980. Polyethylene glycol - Assisted transfection of *Streptomyces* protoplasts. Journal of Bacteriology, 142: 8-14.

SVOBODA, A., 1976. Conjugation of yeast protoplasts. Folia Microbiologica, 21: 193-194.

SVOBODA, A., 1976. Mating reaction in yeast protoplasts. Archives of Microbiology, 110: 313-318.

SVOBODA, A., 1978. Fusion of yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. Journal of General Microbiology, 109: 169-175.

TAKAHASHI, T., 1959. Filtration methods for selection of auxotrophic mutants of flocculent type yeast. Report Kihara Institute Biological Research, 10: 57-59.

TANAKA, H.; N. OGASAWARA; S. KAMIMIYA, 1981. Protoplasts of *Pyricularia oryzae* P_2: preparation and regeneration into hyphal form. Agricultural and Biological Chemistry, 45: 1541.

TATUM, E.L.; R.W. BARRATT; N. FRIES; D.M. BONNER, 1950. Biochemical mutant strains of *Neurospora* produced by physical and chemical treatment. American Journal of Botany, 37: 38-46.

TATUM, E.L.; R.W. BARRATT; V.M. CUTTER, 1949. Chemical induction of colonial paramorphs in *Neurospora* and *Syncephelastrum*. Science, 109: 509-511.

THURIAUX, P., 1980. Genetical analysis of a sterile mutant by protoplast fusion in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The Journal of General Microbiology, 116: 525-528.

TINLINE, R.D., 1961. *Cochliobolus sativus*. IV - Drug resistence color and nutritional exacting mutants. Canadian Journal of Botany, 39: 1695-1704.

TINLINE, R.D., 1962. *Cochliobolus sativus*. V. Heterocaryosis and parasexuality. Canadian Journal of Botany, 40: 425--437.

TINLINE, R.D., 1971. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. Mycologia, 63: 713-721.

TINLINE, R.D. e C. NOVIELLO, 1971. Heterocaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. Mycologia, 63: 701-712.

TSUBOI, M., 1981. Sporulation of products of protoplasts fusion without regeneration in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and General Genetics, 182: 1-6.

TULOCH, M., 1976. The genus *Metarhyzium anisopliae*. Transactions British Mycological Society, 66: 407-411.

VALE, T.L.; S.M. FRIGO; J.L. AZEVEDO; C.L. MESSIAS, 1980. Variabilidade em linhagens haplóides e diplóides de *Metarhizium anisopliae*. Resumos do VII Congresso Brasileiro de Entomologia, Campinas, p.347.

VALLIN, C. e L. FERENCZY, 1978. Diploid formation of *Candida tropicalis* via protoplast fusion. Acta Microbiologica, 25: 209-212.

van SOLINGEN, P. e J.B. van der PLAAT, 1977. Fusion of yeats spheroplasts. Journal of Bacteriology, 130: 946-947.

VEEN, K.H., 1967. A technique for monospore cultures and the determination of nucleous numbers in *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 9: 276-278.

VILACORTA, A., 1978. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolamentos de *Metarhizium anisopliae* Sorok. Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia, p.70.

VINNET, C.N. e W.R. GOYNES Jr., 1980. Aspects of parasexual analysis in *Aspergillus parasiticus*. Canadian Journal of Microbiology, 26: 706-713.

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

ZACHARUK, R.Y., 1970b. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae Elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and apressoria. Journal of Invertebrate Pathology, 15: 81-91.

WEBER, H.; W. FORSTER; H. BERG; H.E. JACOB, 1981. Parasexual hybridization of yeasts by electric field stimulated fusion of protoplasts. Current Genetics, 4: 165.

WOODWARD, D.O.; J.R. DEZEEUW; A.M. SRB, 1946. The separation and isolation of particular biochemical mutants of *Neurospora* by differential germination of conidia followed by filtration and selective plating. Proceedings of National Academy of Science , 40: 192-200.

WRIGHT, D.M.; K.L. WILLIAM; P.C. NEWELL, 1977. Ethidium bromide resistance: A selective marker located on linkage group IV of *Dyctyostelium discoideum*. **Journal of General Microbiology**, 102: 423-426.

YAMAMOTO, M. e S. FUKUI, 1977. Fusion of yeast protoplasts. **Agricultural and Biological Chemistry**, 41: 29-30.

YAMAMURA, M.; Y. THERANISHI; A. TANAKA; S. FUKUI, 1955. Preparation of protoplasts of hydrocarbon - utilizing yeast cells and their respiratory activities. **Agricultural and Biological Chemistry**, 39: 13-20.

YAMASHITA, K.; H. FUKUDA; K. MARATA; A. KIMURA, 1981. Transfer of mitochondria of *Hansenula wingei* into protoplast of *Saccharomyces cerevisiae* by mini-protoplast fusion. **FEBS Letters**, 132: 305-307.

YANO, K.; M. KAWAMURA; M. TAKAGI, 1981. Enrichment of n-alkane assimilation-deficient mutants of *Candida* yeast by synergistic effect of nystatin and pyrrolnitrin . **Agricultural and Biological Chemistry**, 45: 1017 - 1020.

YOUNG, J.D., J.D. GORMAN, J.A. GORMAN e R.M. ROCK, 1976. Indirect selection for auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* using the antibiotic netropsin. **Mutation Rearch**, 35: 423 - 428.