

PARASSEXUALIDADE E PRESERVAÇÃO DE Metarhizium
anisopliae (METSCH.) SOROKIN E
Trichoderma pseudokoningii (RIFAI).

EDUARDO BAGAGLI

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

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

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro - 1992

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

B144p Bagagli, Eduardo
Parassexualidade e preservação de *Metarhizium*
anisopliae (METSCH.) Sorokin e *Trichoderma*
pseudokoningii (RIFAI). Piracicaba, 1992.
142p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Fungo para controle biológico - Melhoramento
2. Fungo para controle biológico - Paramiose
3. Fungo para controle biológico - Parassexualida
de I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei
roz, Piracicaba

CDD 589.2


PARASSEXUALIDADE E PRESERVAÇÃO DE
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN E
Trichoderma pseudokoningii (RIFAI)

EDUARDO BAGAGLI

Aprovado em 18-12-1992

Comissão Julgadora

Prof^a Dr^a Aline A. Pizzirani-kleiner ESALQ/USP Piracicaba SP
Prof. Dr. Itamar Soares de Melo EMBRAPA Jaguariuna SP
Prof^a Dr^a Luzia D. Paccola Meirelles UEL Londrina PR
Prof. Dr. Renato Bonatelli Júnior UNICAMP Campinas SP



Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Orientador

Ao meu filho,

Tobias Pagliarini Bagagli,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

- * Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, por toda orientação, amizade e apoio constante.
- * À Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner pelas sugestões apresentadas, amizade e linhagens de *T. pseudokoningii* cedidas.
- * Ao Dr. Claudio Costa pela colaboração, amizade e versão do "Summary".
- * A Dra. Artemísia Villas Boas pela realização do bioensaio para avaliação da virulência de *M. anisopliae* em *D. saccharalis*.
- * Aos funcionários Antonio Corrêa, Benedito Antonio Placidelli e Carlos Roberto Silva pelo preparo de todos os meios de cultura utilizados.

- * À Acadêmica Flaviana Mantovani e à funcionária Telma R. Ferrari pelo auxílio na manutenção e caracterização auxotrófica das linhagens.
- * À Secretária Sônia Maria Faraldo pelos serviços de datilografia e computação.
- * À Secretária Maria de Lourdes D'Abronzio Rosera por toda atenção e amizade.
- * Ao Silvio Garcia Manoel, pela confecção dos slides utilizados na defesa da tese
- * À Andréa Claudia Pagliarini e toda minha família pelo apoio e carinho.
- * Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia, todos seus Professores, Funcionários e Estagiários, pelas facilidades concedidas e boa convivência.
- * À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e em especial ao Departamento de Genética, todos seus Professores, Funcionários e Pós-Graduandos por todo ensinamento e oportunidades fornecidas.

* À FUNDUNESP pelo auxílio-pesquisa concedido (Processo nº 134/90).

* À CAPES-PICD pelo auxílio deslocamento concedido.

S U M Á R I O

	Pag.
SUMÁRIO	vii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xii
RESUMO	xxiii
SUMMARY	xxv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Os fungos <u>M. anisopliae</u> e <u>T. pseudokoningii</u>	04
2.2. Processos Parassexuais de Recombinação em fungos	08
2.2.1. Ciclo parassexual	09

2.2.2. Parameiose	13
2.2.3. Transformação	18
2.3. Preservação e estabilidade genética de fungos	<u>22</u>
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Linhagens utilizadas	27
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas	27
3.2.1. Meio mínimo (MM) (PONTECORVO et al 1953)	27
3.2.2. Meio completo sólido (MC) (AZEVEDO & COSTA, 1973)	30
3.2.2.1. Meio completo mais adenina (MC + ade)	30
3.2.3. Meio mínimo líquido	30
3.2.4. Meio completo líquido	30
3.2.5. Meio mínimo mais 4% de meio comple- to	31
3.2.6. MM e MC mais desoxicolato de sódio (FURLANETO, 1989)	31
3.2.7. Meio de Micosel	31
3.2.8. Solução de vitaminas	32
3.2.9. Suplementos a serem adicionados ao meio mínimo	32

3.2.10. Solução salina (0.85%)	34
3.2.11. Solução de "Tween" 80 (0.1%)	34
3.2.12. Solução estoque de Desoxicolato de Sódio (10%)	34
3.3. Esterilização e incubação	34
3.4. Obtenção de heterocários	35
3.5. Obtenção de heterocários em <u>T. pseudokoningii</u> utilizando papel de filtro como substrato	35
3.6. Obtenção de heterocários em <u>T. pseudokoningii</u> utilizando parentais submetidos à irradiação com luz UV e choque térmico	37
3.7. Obtenção dos recombinantes a partir de heterocários	37
3.7.1. Estimativa da frequência de recombinantes paramelióticos nos heterocários	39
3.8. Obtenção de recombinantes utilizando método de enriquecimento por filtração	39
3.8.1. Estimativa teórica envolvendo os recombinantes com marcas auxotróficas de ambos parentais (R_{aux}^2)	41
3.9. Análise do grau de ploidia	44
3.10. Análises genéticas dos recombinantes	44
3.11. Reisolamento de recombinantes simples e compostos E6/E9 de <u>M. anisopliae</u> a partir de insetos <u>Chalcodermus bimaculatus</u> parasitados	45

3.12.	Bioensaio para avaliação da virulência das linhagens E6, E9 e Compostos híbridos E6/E9 em lagartas de <u>Diatraea saccharalis</u>	45
3.13.	Preservação e avaliação da viabilidade e estabilidade genética	46
4.	RESULTADOS	49
4.1.	Cruzamentos em <u>M. anisopliae</u>	49
4.1.1.	Obtenção de heterocários e seleção de recombinantes em meios seletivos com suplementações	49
4.1.2.	Seleção de recombinantes utilizando método de enriquecimento por filtração	65
4.1.3.	Reisolamento de linhagens selvagens E6, E9 e compostos híbridos E6/E9 de <u>M. anisopliae</u> do inseto <u>Chalcodermus bimaculatus</u> , e virulência em lagartas de <u>Diatraea saccharalis</u>	69
4.1.4.	Análise do grau de ploidia de <u>M. anisopliae</u> pelo crescimento em meio contendo Benlate	71
4.2.	Cruzamentos em <u>I. pseudokoningii</u>	73

4.2.1.	Obtenção de heterocários e seleção de recombinantes utilizando meios seletivos com suplementações	73
4.2.2.	Seleção de recombinantes utilizando método de enriquecimento por filtração	99
4.2.3.	Análise do grau de ploidia de <u>I. pseudokoningii</u> pelo crescimento em meio contendo Benlate	102
4.3.	Análise genética dos recombinantes	104
4.4.	Processos parassexuais de recombinação (PPR) envolvidos em <u>M. anisopliae</u> e <u>I. pseudokoningii</u>	105
4.5.	Preservação e estabilidade genética de <u>M. anisopliae</u> e <u>I. pseudokoningii</u>	109
5.	CONCLUSÕES	117
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

	Pag.
TABELA 1 - Linhagens selvagens, mutantes e recombinantes de <u>M. anisopliae</u> utilizadas	28
TABELA 2 - Linhagens mutantes de <u>I. pseudokoningii</u> utilizadas	29
TABELA 3 - Volume e concentração de diferentes suplementos que foram adicionados ao meio mínimo	33
TABELA 4 - Tratamentos utilizados para obtenção de heterocários entre parentais submetidos à irradiação com luz UV e choque térmico	38
TABELA 5 - Tipos de genótipos possíveis em núcleos segregantes haplóides, considerando parentais com duas marcas auxotróficas (<u>abCD</u> x <u>ABcd</u>) e segregação independente das mesmas, suas respectivas frequências e meios seletivos onde podem ser eliminados por filtração	42

TABELA 6 - Obtenção de películas heterocárias de <u>M. anisopliae</u> em MM + 4% MC	50
TABELA 7 - Características de crescimento de heterocários simples de <u>M. anisopliae</u>	51
TABELA 8 - Características de crescimento de heterocários provenientes de pontas de hifas de <u>M. anisopliae</u>	53
TABELA 9 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 1+8 pH1 de <u>M. anisopliae</u> para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii)	54
TABELA 10 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário secundário (de ponta de hifa) 7 + 20 de <u>M. anisopliae</u> para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii) - 1º Experimento.....	55

TABELA 11 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 7+20 ph1 para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii) - 2º Experimento.....	56
TABELA 12 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocário 1+8 ph1 de <u>M. anisopliae</u> , em diferentes meios seletivos.	57
TABELA 13 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocário original e heterocário secundário (ponta de hifa) 7 + 20 de <u>M. anisopliae</u> em diferentes meios seletivos - 1º Experimento.....	58
TABELA 14 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocário 7+20 ph1 de <u>M. anisopliae</u> , em diferentes meios seletivos - 2º Experimento.....	59

TABELA 15 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocáριο 1+8 phi de <u>M. anisopliae</u> selecionadas em diferentes meios seletivos.	60
TABELA 16 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocáριο 7 + 20 de <u>M. anisopliae</u> - 1 ^o Experimento.	61
TABELA 17 - Marcas genéticas das colônias monospóricas e setores provenientes do heterocáριο 7+20 phi de <u>M. anisopliae</u> selecionadas em diferentes meios seletivos - 2 ^o Experimento.	62
TABELA 18 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocáριο 12+20 de <u>M. anisopliae</u> , caracterizadas utilizando alça multífio.	64
TABELA 19 - Número de conídios inicial (nC_i), final (nC_f) e taxa de enriquecimento (tE) para obtenção de recombinantes com marcas auxotróficas de ambos parentais - Heterocáριο de <u>M. anisopliae</u> 1 + 8 phi.	67

- TABELA 20 - Número de colônias parentais e recombinantes obtidos e esperados após enriquecimento por filtração ($tE = 10^4$)- Heterocário de M. anisopliae 1 + 8 phi. 68
- TABELA 21 - Reisolamento de M. anisopliae de larvas de Chalcodermus bimaculatus infectadas... 70
- TABELA 22 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de Diatraea saccharalis após 10 dias de aplicação das linhagens E6, E9 e compostos híbridos E6/E9 de M. anisopliae. 72
- TABELA 23 - Tamanho da colônia (mm)* de recombinantes prototróficos simples e composto híbrido (E6/E9) de M. anisopliae reisolados de inseto em MC + Benlate (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mcg/ml) após 5 e 9 dias de crescimento. 74/75
- TABELA 24 - Recaracterização das linhagens mutantes de Trichoderma pseudokoningii pela presença (+) ou ausência (-) de crescimento em MM com diferentes suplementações..... 77

TABELA 25 - Obtenção de heterocários normais em <u>I.pseudokoningii</u>	78
TABELA 26 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 1+4 de <u>I.pseudokoningii</u> , para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii).....	79
TABELA 27 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 2+3 de <u>I.pseudokoningii</u> , para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii).....	80
TABELA 28 - Obtenção de heterocários 2+3P em <u>I.pseudokoningii</u> , utilizando papel de filtro embebido com MM + 4% MC como substrato.....	81
TABELA 29 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 2+3P de <u>I.pseudokoningii</u> , para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii).....	82

TABELA 30 - Quantidade relativa de conídios viáveis das linhagens 2 e 3 de <u>I. pseudokoningii</u> , após tratamento de irradiação com luz ultra violeta e choque térmico.....	84
TABELA 31 - Obtenção de heterocários em <u>I. pseudokoningii</u> , utilizando parentais submetidos à irradiação com luz ultra violeta e choque térmico.....	85
TABELA 32 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 2+3E de <u>I. pseudokoningii</u> , para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais.....	86
TABELA 33 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocários 1+4 de <u>I. pseudokoningii</u> , em diferentes meios seletivos.....	87

TABELA 34 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocários 2+3 de <u>I. pseudokoningii</u> , em diferentes meios seletivos.....	88
TABELA 35 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocáριο 2+3.P de <u>I. pseudokoningii</u> , em diferentes meios seletivos.....	89
TABELA 36 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocários 2-3E de <u>I. pseudokoningii</u> , em diferentes meios seletivos.....	90
TABELA 37 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocáριο 1+4 de <u>I. pseudokoningii</u> , selecionadas em diferentes meios seletivos.	92

TABELA 38 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocário 2 + 3 de <u>I. pseudokoningii</u> , selecionadas em diferentes meios seletivos.....	93
TABELA 39 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocário 2+3.P de <u>I. pseudokoningii</u> , selecionadas em diferentes meios seletivos.....	94
TABELA 40 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocário 2+3.E de <u>I. pseudokoningii</u> , selecionadas em diferentes meios seletivo.....	95
TABELA 41 - Número de conídios inicial (nC_i), final (nC_f) e taxa de enriquecimento (tE) para obtenção de recombinantes com marcas auxotróficas de ambos parentais - Heterocário 2 + 3 de <u>I. pseudokoningii</u>	100
TABELA 42 - Número de colônias parentais e recombinantes obtidos após enriquecimento por filtração ($tE = 10^3$) - Heterocário 2 + 3 de <u>I. pseudokoningii</u>	101

TABELA 43 - Tamanho da colônia (mm)* de recombinantes prototrófico e auxotrófico de <u>I. pseudokoningii</u> em MC + Benlate (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mcg/ml) e MC + Desoxicolato de sódio (0,3%) + Benlate (0,5; 1,0 mcg/ml) após 5 e 9 dias de crescimento.	103
TABELA 44 - Análise genética conjunta dos recombinantes estáveis obtidos nos heterocários 2+3 e 2+3E de <u>I. pseudokoningii</u> e possível localização dos genes nos grupos de ligação.....	106
TABELA 45 - Caracterização morfológica e auxotrófica das linhagens mutantes de <u>M. anisopliae</u> após preservação por 45 - 48 meses em água (método de CASTELLANI)...	112
TABELA 46 - Recuperação e caracterização morfológica e auxotrófica de mutantes e recombinantes de <u>I. pseudokoningii</u> após preservação por 4 e 12 meses em água (Método de Castellani).....	114

TABELA 47 - Coleção de linhagens selvagens, mutantes e recombinantes de <u>M. anisopliae</u>	115
TABELA 48 - Coleção de linhagens selvagens e mutantes de <u>I. pseudokoningsii</u>	116
FIGURA 1 - Viabilidade de <u>Metarhizium anisopliae</u> em diferentes métodos de preservação	111

PARASSEXUALIDADE E PRESERVAÇÃO DE Metarhizium
anisopliae (METSCH.) SOROKIN E Trichoderma
pseudokoningii (RIFAI)

Autor: EDUARDO BAGAGLI

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

O presente trabalho teve o objetivo de aprofundar os estudos de genética e melhoramento dos fungos Metarhizium anisopliae e Trichoderma pseudokoningii, e simultaneamente avaliar diversos métodos de preservação das linhagens utilizadas, de modo a possibilitar a continuidade destas pesquisas.

Utilizando linhagens parentais com marcadores morfológicos e auxotróficos complementares, diversos tipos de heterocários (normal, de ponta de hifa, sobre papel de filtro e entre parentais irradiados com luz UV) foram obtidos e investigados com relação à formação de recombinantes. A frequência de recombinantes, avaliada por semeadura em meios seletivos e pelo método de enriquecimento por filtração, variou de $1 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-4}$ para M. anisopliae, e de $4,9 \cdot 10^{-6}$ a

$2,8 \cdot 10^{-5}$ para *I. pseudokoningsii*. Embora a parameiose tenha sido considerada como o principal mecanismo envolvido no surgimento destes recombinantes, discute-se também sobre a possibilidade de ocorrência de um outro processo parassexual de recombinação em fungos, aqui denominado de transformação intra-heterocariótica.

Um recombinante parameiótico híbrido de E6/E9, reisolado de larvas de *Chalcoedermus bimaculatus* infectadas, apresentou boa virulência em lagartas de *Diatraea saccharalis*, evidenciando o potencial deste tipo de metodologia para obtenção de linhagens melhoradas.

O método de preservação em água (CASTELLANI) foi o que possibilitou melhores resultados na manutenção das linhagens quando comparado com outros métodos facilmente acessíveis aos laboratórios (tubo inclinado, tubo inclinado com óleo mineral, solo, sílica gel). Culturas foram recuperadas após 5 anos de preservação, embora com ocorrência de instabilidade genética, como reversão de marcas morfológicas e auxotróficas em certas linhagens.

PARASEXUALITY AND PRESERVATION OF Metarhizium
anisopliae (Metsch) Sorokin and Trichoderma
pseudokoningii (Rifai)

Author: EDUARDO BAGAGLI

Adviser: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

This research was carried out aiming to study the genetics and breeding of the filamentous fungi Metarhizium anisopliae and Trichoderma pseudokoningii and to evaluate their preservation and viability through different methods.

Parental strains carrying contrasting morphological and auxotrophic markers were used to produce heterokaryons from several distinct processes to investigate the presence of recombinants among their conidia. The recombinant frequency was evaluated by plating conidia derived from these heterokaryons in selective media and by filtration enrichment technique. These frequencies varied from 1.10^{-5} to 1.10^{-4} for M. anisopliae and from $4,9.10^{-6}$ to $2,8.10^{-5}$ for T. pseudokoningii. Although parameiosis was considered the leading mechanism to generate

recombinants, it was also discussed the possibility of other parasexual process be involved as intra-heterokaryotic transformation.

A parameiotic hybrid recombinant E6/E9, re-isolated from infected larvae of Chalcodermus bimaculatus, showed good virulence against larvae of Diatraea saccharalis, indicating the potencial of this breeding strategy to produce improved strains for biological control utilization.

The strain preservation method known as CASTELLANI technique showed to be the best one when compared with other methods tested, such as slopes, slopes plus mineral oil, soil and silica gel. Viable cultures were rescued after been 5 years stored in water through the CASTELLANI method. However, genetic instability was detected in some strains including reversion of morphological and auxotrophic markers.

1. INTRODUÇÃO

Dentre o Reino Fungi, Subdivisão Deuteromycotina, existe um elevado número de espécies, principalmente as que produzem esporos assexuais na forma de conídios, que apresentam grande variabilidade genética. Apesar de não se poder descartar totalmente a hipótese da reprodução sexuada estar ocorrendo em situações ainda não detectadas, tem sido admitido que esta alta variabilidade genética se deve a processos parassexuais.

Recentemente, um novo mecanismo parassexual de amplificação da variabilidade genética em fungos imperfeitos, denominado parameiose, vem sendo observado. Este fenômeno parece gerar recombinantes mitóticos em altas frequências, guardando portanto semelhanças com o processo meiótico. Por ser um possível mecanismo natural de recombinação genética a parameiose tem se mostrado promissora tanto para estudos fundamentais como no melhoramento genético de espécies imperfeitas com interesse biotecnológico.

Os fungos Metarhizium anisopliae e Trichoderma pseudokoningii, são importantes agentes utilizados no biocontrole de pragas e doenças de plantas, respectivamente, bem como para produção de exoenzimas, principalmente celulasas. Ambas espécies não apresentam reprodução sexuada, o que dificulta estudos de genética e melhoramento. A parameiose foi constatada também nestes organismos, porém dúvidas ainda existem principalmente com relação à frequência e aos mecanismos envolvidos no surgimento dos recombinantes.

Por outro lado, para que os estudos de genética e melhoramento destas espécies tenham sucesso, é muito importante que se faça uma boa preservação das linhagens selvagens, mutantes e recombinantes, única maneira de possibilitar a continuidade destas pesquisas.

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho teve o objetivo de aprofundar os estudos de parassexualidade em M. anisopliae e T. pseudokoningii, para tanto pretendeu-se:

- Desenvolver novos métodos de obtenção de heterocários e de seleção dos recombinantes que possibilitem uma melhor estimativa da sua frequência de ocorrência;
- Obter maiores informações dos mecanismos envolvidos no surgimento desses recombinantes;

- Realizar análises genéticas para determinar os grupos de ligação e mapeamento dos genes;
- Preservar e avaliar a viabilidade e estabilidade genética de linhagens selvagens, mutantes e recombinantes em vários métodos de preservação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Os fungos M. anisopliae e I. pseudokoningii.

Ambas as espécies pertencem à subdivisão Deuteromycotina, ordem Moniliales, família Moniliaceae, ou seja, são fungos que produzem conídios com abundância a partir de conidióforos que se originam diretamente das hifas hialinas.

M. anisopliae apresenta-se geralmente com conídios uninucleados (TINLINE, 1971), com pequena proporção de binucleados (MESSIAS & AZEVEDO 1980) ou mesmo multinucleados em algumas linhagens (LUNA, 1985). Durante a germinação os núcleos se dividem e um migra para o tubo germinativo enquanto o outro permanece no conídio (VEEN, 1968; ZACHARUK, 1970); em conídios multinucleados, ocorrem mitoses sucessivas a partir de um núcleo, antes de migrarem para os tubos germinativos, sendo que, nestes casos, também pode ocorrer conídios septados com emissão de dois tubos (LUNA, 1985). As hifas são frequentemente uninucleadas em seus segmentos hifais, podendo ocorrer também dois ou mais núcleos, ou mesmos segmentos multinuclea-

dos em pontas de hifas (LUNA, 1985). A ocorrência de anastomoses entre hifas bem como entre conídios parecer ser comum, o que facilita a obtenção de heterocários (TINLINE & NOVIELLO, 1971; MESSIAS, 1979).

A temperatura ótima de crescimento para M. anisopliae está entre 25º a 30º C (VILACORTA, 1978). A espécie é tolerante a uma faixa de pH de 2,0 a 8,5 sendo que 6,9 é a melhor condição para crescimento e esporulação (VEEN, 1968). Com relação à fonte nutritiva é um microrganismo pouco exigente, desenvolvendo-se em diversos meios de cultura, utilizando como fonte de carbono o amido, glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina (HUBER, 1958) e também apresenta um ótimo desenvolvimento em meio mínimo e completo para Aspergillus nidulans (MESSIAS, 1979).

Dentre os diversos agentes entomopatogênicos, o fungo M. anisopliae assume um importante papel (BURGES, 1981). No Brasil, esta espécie vem sendo bastante utilizada no controle biológico de insetos vulgarmente conhecidos como cigarrinhas, (ordem Homoptera, Cercopidae) destacando-se a Mahanarva posticata praga da cana-de-açúcar (GUAGLIUMI et al., 1974; AQUINO et al., 1975) e Depis flavopicata e Zulia entreteriana praga de pastagens (VEIGA, 1979). Também tem sido verificado a sua patogenicidade em outros importantes insetos pragas como a Diatraea saccharalis, broca-de-cana (ALVES et al., 1984) ao Chalcoedermus aneus (= C. bimaculatus), "manhoso" (LORD, 1986;

BAGALHI, 1987), ao Hypothenemus hampei, broca-de-café (LECUONA et al., 1986), a Ceratitidis capitata (GARCIA et al., 1984) e outros (ALVES, 1986), bem como em insetos de interesse médico como o Rhodnius prolixus barbeiros transmissores da doença-de-Chagas (SILVA E MESSIAS, 1986).

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

I. pseudokoninzi é um fungo que apresenta micélio translúcido e esparso, com pouco crescimento aéreo, composto de hifas ramificadas, septadas, parede lisa e sem cor. Os conidióforos são em tufo tornando-se pulverulentos na maturidade. Os primeiros conidióforos formam zonação, os quais tornam-se indistintos posteriormente. Os conídios são produzidos isoladamente e sucessivamente, na extremidade de cada fiálide, apresentando-se subcilíndricos ou ablongos e algumas vezes elipsóides. Quanto a coloração, mudam de branco a branco-esverdeado e verde (RIFAI, 1969). Seus conídios são uninucleados (FURLANETO, 1989), embora binucleados também ocorram principalmente em colônias selecionadas de heterocários (FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER, 1992).

O gênero Trichoderma foi revisado por RIFAI em 1969 e os isolados foram agrupados em 9 espécies, diferenciadas primariamente pelo modo de ramificação do conidióforo e morfologia dos conídios. Esta classificação com base nestas características não tem sido muito satisfatória. Recentemente outros métodos tem sido empregados, como de técnicas sorológicas (BARAK & CHET, 1988) e eletroforese de aloenzimas (STASZ et al., 1988b, 1989b).

Por serem fungos saprofíticos do solo as espécies de Trichoderma utilizam uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio (DANIELSON & DAVEY, 1973). I. pseudokoningii pode degradar a celulose, apresenta um crescimento rápido com uma temperatura ótima em torno de 28°C (BISSET, 1984) e também apresenta ótimo desenvolvimento em meio mínimo e completo utilizado para Aspergillus nidulans (FURLANETO, 1989).

A maioria das espécies de Trichoderma é fotosensível em relação à esporulação, de forma que certos comprimentos de luz são bastante efetivos em induzir a esporulação (MILLER & REID, 1961; GRESSEL & HARTMANN, 1968; BETINA & SPISIAKOVA, 1976). Um importante aspecto da esporulação, embora muito pouco estudado, é a capacidade de produção de clamidósporos, já demonstrado em várias espécies de Trichoderma (LEWIS & PAPAIVIZAS, 1983; 1984), e também relatado em I. pseudokoningii (BISSET, 1984).

A fase perfeita (teleomórfica) de algumas espécies de Trichoderma permite classificá-las como pertencentes ao gênero Hypocrea, família Hypocreaceae (DOY, 1967). I. pseudokoningii pode representar a forma imperfeita (anamórfica) da espécie Hypocrea schweinitzii, (RIFAI, 1969) ou mesmo outra espécie do gênero Hypocrea (BISSET, 1984).

As várias espécies do gênero Trichoderma tem recebido especial atenção nos últimos tempos, pois atuam em processos de hiperparasitismo de patógenos de raízes de plantas, parasitismo de insetos, bem como são bons produtores de exoenzimas (BISSET, 1984; PAPAVIDAS, 1985; CARVALHO, 1989). Isolados de I. pseudokoningii se destacam principalmente pela sua produção de celulasas (BISSET, 1984; BERTOLIN, 1987; FURLANETO, 1989; VICENTE, 1989), mas também pela capacidade de controlar fitopatógenos (MELO & HEALE, 1989).

2.2. Processos Parassexuais de Recombinação em fungos

Além do processo sexual de recombinação, típico de organismos eucariotos superiores, os fungos também apresentam outras formas de amplificação da variabilidade genética, assemelhando-se, em variação e número de processos, aos organismos procarióticos onde a reprodução sexual não é a

forma exclusiva de recombinação. Todos estes mecanismos não sexuais serão aqui denominados de Processos Parassexuais de Recombinação (PPR), onde estão incluídos o ciclo parassexual, a paramiose, e a transformação. Estes processos serão brevemente apresentados a seguir, dando-se mais ênfase, sempre que possível, aos gêneros Metarhizium e Trichoderma.

2.2.1. Ciclo parassexual

O ciclo parassexual, descoberto em 1952 em Aspergillus nidulans por PONTECORVO & ROPER, caracteriza-se por apresentar: anastomose de hifas com núcleos diferentes (heterocariose), fusão de núcleos haplóides e formação de diplóides relativamente estáveis, permutas mitóticas e haploidização, com formação de recombinantes, micóticos (PONTECORVO, 1956).

Seguindo o modelo do ciclo parassexual de A. nidulans, a parassexualidade foi investigada e descrita em mais de 30 espécies fúngicas, segundo AZEVEDO (1987), muitas delas imperfeitas, sem ciclo sexual e importantes na produção de antibióticos, enzimas, no controle biológico e também como causadoras de doenças em plantas. Do ponto de vista aplicado, o ciclo parassexual possibilitou melhoramento genético em fungos biotecnologicamente importantes (SERMONTI, 1969;

BONATELLI JR., 1981) e também ajudou explicar o aparecimento de novas racas fisiológicas em fungos fitopatogênicos (BUXTON, 1956, 1962; AZEVEDO, 1976).

A descrição do ciclo parassexual em M. anisopliae, com ocorrência de heterocário, diplóides e recombinantes estáveis, foi feita pela primeira vez por MESSIAS (1979) e MESSIAS & AZEVEDO (1980), sendo confirmado quase simultaneamente por AL-AIDROOS (1980). Os autores trabalharam com marcas para resistência (AL-AIDROOS, 1980) e marcas para coloração e auxotrofia (AL-AIDROOS, 1980; MESSIAS & AZEVEDO, 1980). Os diplóides obtidos não apresentavam diferenças significativas com relação ao tamanho dos conídios haplóides, porém eram diferentes quanto ao número de núcleos por conídios (os diplóides são sempre uninucleados), quanto ao diâmetro dos núcleos dos conídios (nos diplóides era maior) e também quanto à quantidade de DNA (nos diplóides era praticamente o dobro). Os setores haplóides obtidos por MESSIAS & AZEVEDO (1980) eram em sua maioria do tipo parental, porém, alguns eram recombinantes, o que fez concluírem que o número dos grupos de ligação é pequeno, provavelmente não superior a quatro. Outros trabalhos sobre ciclo parassexual deste fungo realizado por BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982) e MAGOON & MESSING-AL-AIDROOS (1984, 1986) sugerem que o número de grupos de ligação é 5.

A técnica de fusão de protoplastos foi também empregada por vários autores (SILVEIRA, 1983; FRIGO, 1983; SILVEIRA &

AZEVEDO, 1987; COSTA, 1989; VEGA, 1990;) em M. anisopliae no estudo da parassexualidade. Utilizando esta metodologia foi possível obter heterocários, diplóides e/ou recombinantes, em certos casos em altas frequências, mesmo entre linhagens com incompatibilidade de parede onde anastomose de hifas não ocorre naturalmente.

No gênero Trichoderma, várias espécies foram estudadas em relação ao ciclo parassexual, empregando principalmente fusão de protoplastos e, em menor grau, anastomose de hifas para obtenção de heterocários.

Os primeiros trabalhos, realizados em I. viride (WEINMAN-GREENSHPAN & GALUM, 1969; GREENSHPAN & GALUM, 1971 e FARGASOVA et al., 1985), evidenciaram ocorrência de heterocariose porém diplóides e recombinantes não foram detectados. TOYAMA et al (1984) realizaram fusão de protoplastos entre linhagens auxotróficas de I. reesei onde obtiveram segregantes não parentais, porém não esclarecem o tipo de recombinação envolvida. STASZ et al. (1988a) também detectaram, por fusão de protoplastos em I. harzianum, segregantes não parentais e "possíveis diplóides" que em um segundo ciclo de crescimento segregavam parentais auxotróficos e raros prototróficos; a progênie não parental, segundo os autores, estaria se originando por cariogamia e recombinação e/ou por fatores citoplasmáticos ou pela interação núcleo-citoplasma. OGAWA et al. (1987, 1989), por sua vez, afirmam ter detectado o ciclo

parassexual em I. reesei, utilizando-se também da fusão de protoplastos para estabelecimento de heterocários, dos quais, após tratamento com cânfora 0,1%, obtiveram um diplóide com praticamente o dobro (1.9x) da quantidade de DNA em relação aos núcleos haplóides.

Outro grupo de trabalho, liderado principalmente por STASZ, relata importantes aspectos sobre a parassexualidade de Trichoderma. Realizando fusão de protoplastos intra e interlinhagens e espécies (I. hamatum, I. harzianum, I. koningsii e I. viride) com diferentes marcas auxotróficas e padrões isoenzimáticos (STASZ et al. 1989a; STASZ & HARMAN, 1990), observaram que: i) em cruzamentos intralinhagens a taxa de complementação e obtenção de heterocários era alta porém sem ocorrência de diplóides e/ou recombinantes; ii) em cruzamentos interlinhagens e interespecíficos a complementação era baixa com forte incompatibilidade pós-fusão, sendo que nos cruzamentos interlinhagens era comum ocorrer prototróficos de crescimento lento, altamente instáveis que geravam setores não-parentais, diferentes quanto à morfologia, taxa de crescimento, esporulação e padrão isoenzimático mas que, quando analisados monosporicamente, não forneciam indícios da ocorrência de diplóides, aneuplóides ou recombinantes haplóides. Estes autores basearam-se principalmente nos dados de isoenzimas, realizando mais de 5000 análises em pelo menos 1000 progênies segregantes, e concluíram que: i) a parassexualidade não deve ocorrer em Trichoderma, ou ocorre

muito raramente e/ou rapidamente; ii) outros mecanismos devem estar envolvidos no surgimento dos tipos não parentais, sendo que sugerem sobre a possibilidade de um dos núcleos do heterocário se degradar e seu material genético se incorporar ao núcleo remanescente e também sobre o envolvimento de DNA mitocondrial, plasmídios e micovírus nos eventos de pós-fusão. Outra observação, também realizada por este grupo (SIVAN et al., 1990), foi a de que em certos heterocários, obtidos pela transferência de núcleos isolados em protoplastos, um dos núcleos se expressa enquanto o outro permanece quiescente e que esta expressão preferencial muda com o tempo.

Ainda relacionado à parassexualidade de Trichoderma, PE'ER & CHET (1990) utilizando linhagens com marcas auxotróficas e morfológicas de I. harzianum relatam ter obtido, por fusão de protoplastos, colônias prototróficas as quais foram classificadas como sendo do tipo parental ou recombinante, com base nas suas características de crescimento e esporulação. TOYAMA & TOYAMA (1990) fazendo o tratamento com colchicina reportam a obtenção de autopoliplóides em I. reesei, os quais quando crescidos em meios contendo Benomyl emitiam setores que apresentavam variações com relação à conidiação e capacidade em degradar celulose.

2.2.2. Parameiose

A parameiose foi proposta por BONATELLI JR et al. (1983) para explicar um certo tipo de instabilidade dos núcleos diplóides heterozigotos, os quais apresentam recombinação e haploidização nas hifas heterocarióticas, guardando semelhanças com o processo meiótico. Estes autores descreveram o fenômeno através do estudo de cruzamentos pelo ciclo parassexual de linhagens auxotróficas de Aspergillus niger utilizadas na produção de ácido cítrico. Utilizando-se da medida dos diâmetros dos conídios e do comportamento das colônias em meio contendo Benlate, observaram que as colônias obtidas nos heterocários eram dos tipos diplóides heterozigotos para todas as marcas auxotróficas e heterozigotos para apenas algumas marcas e também recombinantes haplóides. Segundo estes autores, a ocorrência de diplóides instáveis e estáveis em A. niger, relatadas por outros autores (LHOAS, 1967; CHANG & TERRY, 1973 e DAS & ILCZUK, 1978), bem como a instabilidade observada em Penicillium patulum (CALAM et al., 1973) e a alta instabilidade dos diplóides de Cephalosporium acremonium (BALL & HAMLIN, 1982) podem ser interpretadas com base na parameiose.

BALL & HAMLIN (1982) e HAMLIN et al. (1985), estando atentos para a ocorrência de recombinantes no heterocário, utilizaram meios seletivos com diferentes suplementações para detectá-los. Ambos trabalhos foram realizados por meio de fusão de protoplastos entre linhagens auxotróficas de

Cephalosporium acremonium, empregando meio mínimo com diferentes suplementações para seleção de produtos de fusão. As colônias regeneradas eram de dois tipos principais: recombinantes haplóides estáveis e aneuplóides ou diplóides heterozigotos instáveis. A maior parte era recombinante haplóide sendo este grau de ploidia sugerido pela análise da estabilidade destas colônias em meios com agentes haploidizantes, com confirmação através da medida de quantidade de DNA. Pela análise genética da frequência destes recombinantes, HAMLYN et al. (1985) obtiveram evidências da existência de 8 grupos de ligação, sendo que detectaram também um alta taxa de permuta mitótica. A frequência de fusão nuclear, estimada por HAMLYN et al (1985), foi de 1.10^{-4} em 10^5 protoplastos viáveis. Os diplóides obtidos, segundo estes autores, deveriam estar apresentando um crescimento não balanceado e lento, de forma que os produtos originados da não disjunção apresentariam uma velocidade de crescimento bem maior, fazendo com que rapidamente tossassem toda a colônia. Os autores (BALL & HAMLYN, 1982 e HAMLYN et al., 1985) relacionam seus resultados obtidos em C. acremonium com a instabilidade dos diplóides das espécies relacionadas de Cephalosporium microphilum e Emericellopsis salmosynnemata descritas por TUVESON & COY (1961) E FANTINI (1962), respectivamente, considerando a possibilidade de ser esta uma característica deste grupo de organismos.

Evidências da ocorrência de parameiosose em *M. anisopliae* podem ser observadas já nos primeiros trabalhos sobre parassexualidade deste fungo (TINLINE & NOVIELLO, 1971; BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS, 1982; SILVEIRA, 1983). Isto se confirmou a medida que o fenômeno foi estudado mais objetivamente, tanto em heterocários obtidos por fusão hifas BAGALHI, 1987; BAGAGLI et al., 1991; VALADARES, 1989) como por fusão de protoplastos (SILVEIRA & AZEVEDO, 1987; COSTA, 1989; VEGA, 1990). De uma maneira geral, recombinantes haplóides e/ou aneuplóides sempre são detectados diretamente dos heterocários em frequências relativamente altas, comparado com a frequência de diplóides do ciclo parassexual de *A. nidulans*, sendo que diplóides, quando ocorrem, são altamente instáveis.

A parameiosose, segundo BAGAGLI et al., (1991), também deve estar ocorrendo em *Verticillium albo atrum* e *V. dahliae* (HASTIE, 1962; 1964; TYPAS, 1983; TYPAS & HEALE, 1977; HASTIE & HEALE, 1984). Recentemente esta foi também detectada em *Beauveria bassiana* (PACCOLA-MEIRELLES & AZEVEDO, 1991).

Em *Trichoderma pseudokoningii* este fenômeno foi estudado por FURLANETO (1989) e FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992), que utilizaram linhagens com marcas auxotróficas e morfológicas e estabeleceram heterocários por anastomoses de hifas e fusão de protoplastos. Recombinantes foram obtidos de setores de colônias prototróficas e em colônias selecionadas

diretamente em meios seletivos com suplementação. O número e tipos de recombinantes auxotróficos detectados foi alto, principalmente por fusão de protoplastos, onde a frequência destes foi 1000 vezes maior do que por anastomose de hifas. Sugerem evidências de ligação entre as marcas leu-arg e leu-met. Um interessante aspecto também relatado por estes autores foi a ocorrência de conídios binucleados em colônias prototróficas, o que pode contribuir para a continuidade do crescimento heterocariótico e confundir a detecção de recombinantes.

A paramiose com sua rápida haploidização dos diplóides no heterocário, permutas cromossômicas mitóticas e geração de recombinantes pode representar um simples e eficiente mecanismo de amplificação da variabilidade genética dos fungos filamentosos imperfeitos (BAGAGLI et al., 1991). Ainda segundo estes autores, isto pode ter ocorrido de forma evolutiva, principalmente no grupo de fungos que sofreu pressão seletiva para se manter no estado haplóide devido a escassez de nutrientes, hipótese de LEWIS (1985), e perda ou diminuição da capacidade de reprodução sexuada devido a extinção ou desbalanceamento de tipos de reação sexual opostos ("mating types") nos fungos heterotálicos, hipótese de THOMAS et al., (1983); corroborando com esta especulação, citam os fatos de que em Neurospora crassa, fungo heterotálico com eficiente ciclo sexual, não se detecta a presença de ciclo parassexual, em A. nidulans, fungo homotálico com ciclo sexual, ocorrer

ciclo parassexual mas sem evidências de parameiose, enquanto que nos fungos hyphomycetos como A. niger, B. bassiana, M. anisopliae e I. pseudokoningii é onde vem sendo detectado este processo de recombinação.

A parameiose, por gerar recombinantes em frequências relativamente altas, demonstrou ser um importante processo na obtenção de novos recombinantes de M. anisopliae com maior potencial para o controle biológico de insetos (BAGALHI & AZEVEDO, 1987), e em I. pseudokoningii para produção de celulases (FURLANETO, 1989; FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER, 1992).

2.2.3. Transformação

A transformação em fungos, descrita inicialmente em leveduras (HINNEN et al., 1978) e posteriormente também em fungos filamentosos (CASE et al., 1979; BALLANCE et al., 1983; TILBURN et al., 1983; FINCHAM, 1989) abriu grandes possibilidades de manipulação genética nestes organismos. Apesar de já ser bastante utilizada e preconizada, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos envolvidos na captação e incorporação do DNA exógeno nestes sistemas de transformação induzidos, os quais se utilizam principalmente de protoplastos ou células osmoticamente sensíveis, agentes fusogênicos (PEG)

e estimuladores de competência (CaCl₂), bombardeamento de partículas e eletroporação. Em M. anisopliae e algumas espécies do gênero Trichoderma este sistema de recombinação já foi também empregado.

Transformantes resistentes ao Benomil foram obtidos em M. anisopliae, utilizando cosmídios (pSV50) e plasmídios (pBENA3) contendo genes de resistência a esta droga, provenientes tanto de N. crassa (BERNIER et al., 1989) como de A. nidulans (GOETTEL et al., 1990). Em ambos os casos, a integração do DNA exógeno ocorreu em vários loci cromossômicos, os transformantes demonstraram ser mitoticamente estáveis mesmo na ausência do anti-fúngico e também mantiveram a capacidade de infectar o inseto Manduca sexta.

Em Trichoderma, transformantes foram obtidos em I. harzianum (GOLDMAN et al., 1990; HERREERA-ESTRELLA et al., 1990) e I. viride (HERRERA-ESTRELLA et al., 1990) utilizando plasmídios (pAN7-1) contendo um gene bacteriano para a resistência à higromicina sob controle de sinais de expressão heterólogo de A. nidulans. HERRERA-ESTRELLA et al. (1990) empregando o sistema de transformação com protoplasto, PEG e CaCl₂, obtiveram transformantes em I. harzianum e I. viride, os quais eram altamente instáveis quando cultivados na ausência do antibiótico; utilizando porém um plasmídio modificado, contendo um fragmento de 2,4 Kb do gene da alfa-amilase de I. harzianum, obteve-se transformantes resistentes

à higromicina com a mesma frequência, os quais foram 100% estáveis, mesmo após várias passagens em meios sem o antibiótico seletivo. Segundo estes autores, a integração do plasmídeo pAN7-1 deve ocorrer em uma única região do genoma, a qual conteria "sequências altamente recombinogênicas" que por um lado proporcionaria um sítio acessível de recombinação não homóloga mas que ocasionaria também uma alta instabilidade genética dos transformantes; quando o fragmento homólogo do gene da alfa-amilase está presente, este deveria proporcionar um impedimento físico de novas recombinações e/ou evitar a integração do plasmídeo nesta região "altamente recombinogênica". Estes mesmos autores também realizaram a co-transformação destes fungos utilizando, além do plasmídeo pAN7-1, o plasmídeo pVT70GAPL, o qual contém o gene marcador de resistência à fleomicina sob controle de expressão de A. nidulans. Observaram uma alta frequência de co-transformação (80%) a este plasmídeo, mesmo em condições seletivas apenas para a higromicina, na ausência de pleomicina. GOLDMAN et al. (1990) por sua vez, utilizando sistema de transformação por eletroporação de células osmoticamente sensíveis, obtiveram transformantes resistentes à higromicina, os quais se apresentaram 100% fenotípica e mitoticamente estáveis. Experimentos de hibridização indicaram que a integração também ocorreu em uma única região do genoma. Segundo os autores, esta alta estabilidade dos transformantes, diferentemente da instabilidade observada na transformação com PEG, poderia ser explicada por uma ativação do sistema de reparo das

células devido ao fato destas terem sido submetidas a uma condição de estresse pelo pulso elétrico de alta-voltagem.

Ainda com relação à transformação, é bastante interessante a possibilidade deste evento ocorrer em condições não induzidas e representar outra via natural de amplificação da variabilidade genética em fungos. Especulações teóricas bem como alguns evidências experimentais já existem sobre isto. STASZ & HARMAN (1990), para explicar a ocorrência de segregantes não-parentais em heterocários de I. harzianum, lançam a hipótese de um dos núcleos degradar-se e parte deste incorporar-se ao núcleo remanescente, o que pode ser considerado como um sistema de transformação intra-heterocariótica. WEIGEL et al. (1988) e KOVACEVIC et al. (1989) realizando estudos comparativos entre os genes da Isopenicilina N sintetase e Deacetoxicefalosporina C sintetase, envolvidos na biossíntese de antibióticos Beta-lactâmicos, de Streptomyces liemanii e dos fungos Aspergillus nidulans, Cephalosporium acremonium e Penicillium chrysogenum, constataram uma alta similaridade na sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína envolvida, que somente poderia ser explicada caso tivesse ocorrido uma transferência horizontal destes genes de bactérias para fungos há cerca de 370 milhões de anos, muito após estes dois grupos terem divergidos evolutivamente há 2 bilhões de anos atrás (COHEN et al., 1990). O mecanismo envolvido nesta transferência horizontal, não sugerido pelos autores, pode ser uma

transformação natural. Este tipo de transferência genética vem sendo detectado em bactérias, tanto no solo como no ambiente aquático (TREVORS et al. 1987).

2.3. Preservação e estabilidade genética de fungos

A necessidade de manutenção de colônias fúngicas vivas, tanto para o ensino, pesquisa e aplicações biotecnológicas fez com que diversos métodos de preservação fossem desenvolvidos ao longo do tempo, tais como: cultivo contínuo ou frequente em tubos inclinados, culturas recobertas com óleo mineral esterilizado, cultivo em solo esterilizado, preservação de fragmentos coloniais em água destilada esterilizada, desidratação e dormência dos esporos em sílica gel, manutenção em freezer (-20 a -80°C), liofilização, e N₂ líquido (BUTTERFIELD et al., 1974; BOSMANS, 1974; SMITH & ONIONS, 1983; MIGUENS, 1985).

Alguns procedimentos foram propostos por pesquisadores individuais enquanto outros acabaram surgindo pelo emprego e desenvolvimento simultâneo entre vários grupos ou a medida que novos equipamentos e instrumentos foram aprimorados.

CASTELLANI (1939, 1967) propôs o método de preservação em água, originalmente previsto para a manutenção de culturas de fungos dermatófitos (de importância médica), os quais são

relativamente difíceis de serem preservados devido a um acentuado pleomorfismo com tendência a perdas de certas características fenotípicas quando cultivados frequentemente. O autor ressalta como vantagens deste método o fato do mesmo prevenir, pelo menos parcialmente, o desenvolvimento de pleomorfismo e senescência em certas espécies, e pela sua facilidade de aplicação principalmente para manutenção de pequenas coleções. FIGUEIREDO & PIMENTEL (1975), avaliando vários métodos de preservação na manutenção de coleção de fungos fitopatogênicos do Instituto Biológico, relatam sobre as vantagens da preservação em água, onde obtiveram culturas viáveis mesmo após 10 anos de estocagem.

PERKINS (1962) descreveu o método de preservação em sílica gel, o qual empregou na manutenção de coleção de linhagens de Neurospora crassa utilizadas para estudos genéticos, envolvendo portanto vários tipos de mutantes. Mais de 700 linhagens foram preservadas por este método e a viabilidade avaliada após 12 a 72 meses de manutenção, com obtenção de 90% de linhagens viáveis. Segundo o autor, a maioria dos casos de inviabilidade referia-se à linhagens mutantes morfológicas e/ou auxotróficas com várias marcas que apresentavam crescimento lento e pouca conidiação. O autor cita casos de linhagens que normalmente não suportam o processo de liofilização mas que podem ser preservadas pelo método de desidratação da sílica gel.

A preservação de culturas fúngicas em temperaturas bastante baixas (-20 a -50°C) em freezer foi provavelmente relatada pela primeira vez por MEYER (1955) na manutenção de fungos dermatófitos. Este autor observou que de um total de 61 isolados mantidos por um período de 2 anos, apenas 3 não se mantiveram viáveis; mudanças pleomórficas discerníveis não foram detectadas nas colônias recuperadas. CARMICHAEL (1962) empregou este método para a preservação de 400 linhagens fúngicas filamentosas e leveduriformes, com avaliação da viabilidade, por um período de até 5 anos de manutenção, onde obteve bons resultados de viabilidade. O autor não faz comentários sobre a estabilidade genética do material.

LITTLE & GORDON (1967) reportam resultados sobre a preservação de uma coleção de 202 culturas fúngicas (patogênicas ao homem e saprófitas) recobertas com óleo mineral esterilizado com avaliações da viabilidade após período de 6 a 12 anos de manutenção. A maioria das espécies puderam ser preservadas nestes períodos, embora mudanças morfológicas, em certos casos irreversíveis, tenham sido detectadas em alguns isolados. Este método de preservação parece não apresentar resultados satisfatórios em certos grupos fúngicos como os da Ordem Mucorales, fato este observado por HESSELTINE et al. (1960).

A liofilização e o uso de N₂ líquido, embora exijam maiores infra-estruturas e equipamentos para sua aplicação, tem sido também empregados na preservação fúngica, com excelentes resultados (HESSELTINE et al., 1960; BOSMANS, 1974; HWANG et al., 1976; DAHMEN et al., 1983; BURGESS et al., 1989). O emprego de agentes crioprotetores e de taxas de resfriamento adequados aos diferentes grupos fúngicos parece ser particularmente importante, possibilitando maiores taxas de viabilidade e estabilidade genética (GOOS et al., 1967; HWANG et al., 1976; BERNY & HENNEBERT, 1991) bem como a preservação de fungos não esporulantes pelo uso apenas de hifas (TAN et al., 1991), ou de toda colônia com a manutenção de suas características macroscópicas. (BUNSE & STEIGLEDER, 1991).

Trabalhos de preservação de M. anisopliae são poucos e normalmente visam a estocagem de conídios na forma de produtos para posterior aplicação no controle biológico; em Icishoderma praticamente são inexistentes.

BELL & HAMALLE (1974) realizaram trabalho de avaliação da viabilidade e patogenicidade de fungos entomopatogênicos preservados em sílica gel a -20^o C por um período de até 3 anos de manutenção. Várias espécies de fungos mantiveram-se viáveis e patogênicos durante este período com exceção das pertencentes ao gênero Entomophthora. De 3 linhagens de M. anisopliae avaliadas, duas sobreviveram por 24 e 33 meses, enquanto a outra por até 36 meses de preservação e com boa

virulência nos insetos Heliiothis zea e Trichoplusia ni.

ABREU et al. (1983) avaliaram a viabilidade e virulência de conídios não formulados de M. anisopliae mantidos à temperatura ambiente, 5°C e -13°C. A viabilidade ficou nula após 120 e 300 dias, respectivamente para os conídios mantidos à temperatura ambiente e à 5°C, enquanto que conídios preservados à -13°C mantiveram sua viabilidade normal mesmo após 360 dias de manutenção. Observou-se uma diminuição da virulência do fungo à largartas de Galleria melonella e cigarrinhas do gênero Deois em função do aumento do período de armazenamento, sendo esta menos acentuada quando os esporos foram preservados a -13°C.

DAOUST & ROBERTS (1983a,b) realizaram estudos similares, porém relacionando temperatura, umidade relativa e meio de cultura na viabilidade e virulência de conídios não formulados de M. anisopliae. Melhores resultados de viabilidade foram observadas em temperaturas moderadas (26 e 19°C) porém com altas umidades relativas (98%) e em baixas temperaturas (4°C) porém com 0% de umidade relativa. Conídios mantidos em condições favoráveis apresentaram boa virulência à larvas de Culex pipiens pipiens e Anopheles stephensi, mesmo após 18 e 12 meses de preservação, respectivamente. Observou-se também que embora o tipo de meio de cultura seja importante na produção de conídios, a viabilidade e virulência foi a mesma nos diversos substratos quando os conídios foram mantidos nas mesmas condições de preservação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas linhagens selvagens, mutantes e recombinantes de *M. anisopliae* (Tabela 1) e mutantes de *I. pseudokoningii* (Tabela 2).

3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas:

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

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl	0,5g
MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,5g
FeSO ₄	0,02g
ZnSO ₄	0,02g
Glicose	10,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	1000,0g
pH ajustado para 6,8 com NaOH	4%

Tabela 1 - Linhagens selvagens, mutantes e recombinantes de
M. anisopliae utilizadas

Designação*		
protocolar	Marcas genéticas	Origem

E6	Selvagem	Isolados de insetos
E9	Selvagem	<u>Depis flavopicta</u>
E6-1	vio2 ade5 pro11	BAGALHI (1987)
E6-2	vio2 ade5 met17	"
E6-3	vio2 ade5 met22	"
E6-5	vio2 lis6 bio1	"
E6-7	vio9 met9 bio9	SILVEIRA (1983)
E6-8	ylo8 pir8 lis8	"
E9-11	met1 lis1	BAGALHI (1987)
E9-12	met1 lis3	"
E9-13	ylo1 met1 pir6	"
E9-17	ylo1 leu6 pro1	"
E9-19	ylo1 leu6 rib8	"
E9-20	ylo1 leu6 ade9	"
E9-23	ylo2 lis3 met14	"
RJ-31	vio2 lis3 bio22	"
RJ-32	vio1 lis3 met15	"
Composto 1-1	Recombinantes	Reisolados de
Composto 2-1	tipo	larvas de
Composto 2-2	prototróficos	<u>Chalcodermus</u>
Composto 2-3	de	<u>bimaculatus</u>
Composto 2-4	E6-8/E9-20	(BAGALHI, 1987)

* Para as linhagens mutantes também será utilizada a forma abreviada citando-se apenas o número (1, 2, ... 32)

Tabela 2 - Linhagens mutantes de L. pseudokoningii.
utilizadas

Designação*

protocolar

Marcas genéticas

Origem

Tp-1	whi4 leu1 arg1	FURLANETO (1989)
Tp-2	whi4 leu1 tio1	"
Tp-3	ylo5 rib1 arg2	"
Tp-4	ylo5 rib1 arg2	"
Tp-5	ylo5 leu2 lis1	"
Tp-6	arg3 rib2	"
Tp-7	nic1 met1	"

* Também será utilizada a forma abreviada citando-se apenas o número da linhagem (1, 2, ...7)

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

Meio mínimo adicionado de:

Extrato de levedura	0,5g
Peptona	2,0g
Caseína hidrolisada	1,5g
Solução de vitaminas	1,0 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.2.1. Meio completo mais adenina (MC + ade)

Meio completo adicionado de:

Adenina.....25,0 ug/ml

3.2.3. Meio mínimo líquido

Foi preparado segundo o item 3.2.1., porém
sem adição de ágar.

3.2.4. Meio completo líquido

Foi preparado segundo o item 3.2.2., porém
sem adição de ágar.

3.2.5. Meio mínimo mais 4% de meio completo

Em tubos de ensaio foram adicionados 2,5ml de meio mínimo líquido mais 4% de meio completo líquido.

3.2.6. MM e MC mais desoxicolato de sódio (FURLANETO, 1989)

Desoxicolato de sódio a 0,3% foi adicionado nos MM e MC para obtenção de colônias de tamanho reduzido de L. pseudokoningsii, quando necessário.

3.2.7. Meio de Micosel

36 g de Mycosel (BBL) foram adicionados a um litro de água, obtendo-se os componentes nas seguintes concentrações:

Peptona.....	10,0 g
Dextrose.....	10,0 g
Ágar.....	15,5 g
Cicloheximide (Actidione).....	0,4 g
Cloranfenicol.....	0,05 g
Água destilada.....	1000,0 ml

PH final 6,9 ± 0,2

3.2.8. Solução de vitaminas

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

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

3.2.9. Suplementos a serem 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). No momento do uso, cada frasco foi novamente aquecido em banho-maria (98°C) por 5 minutos. O volume e concentração utilizados de cada suplemento estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Volume e concentração dos diferentes suplementos que foram adicionados ao meio mínimo

Suplemento	Solução Estoque (10ml de água)	Quantidade adicio- nada por placa(20 ml de meio de cul- tura)	Concentração final no meio de cul- tura
Adenina	50,0mg	0,1 ml	25 ug/ml
Guanina	50,0mg	0,1 ml	25 ug/ml
Arginina	100,0mg	0,1 ml	50 ug/ml
Cisteína	100,0mg	0,1 ml	50 ug/ml
Leucina	100,0mg	0,1 ml	50 ug/ml
Lisina	100,0mg	0,1 ml	50 ug/ml
Metionina	100,0mg	0,1 ml	50 ug/ml
Prolina	100,0mg	0,1 ml	50 ug/ml
Biotina	0,4mg	0,1 ml	0,20 ug/ml
Ácido nicotínico	1,0mg	0,1 ml	0,50 ug/ml
Riboflavina	1,0mg	0,1 ml	0,50 ug/ml
Piridoxina	0,5 mg	0,1 ml	0,25 ug/ml

3.2.10. Solução salina (0,85%)

Foi preparada uma solução de 8,5 g de NaCl em 1000 ml de água destilada. Aliquotas de 9 ml desta solução foram colocadas em frascos e a seguir os mesmos foram autoclavados e conservados em refrigerador a 4°C.

3.2.11. Solução de "Tween" 80 (0,1%)

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

3.2.12. Solução estoque de Desoxicolato de Sódio (10%)

Foi preparada uma solução de 10 g de Desoxicolato de Sódio em 100 ml de água destilada. A esterilização foi realizada em banho-maria à 60°C por uma hora e conservada em refrigerador a 4°C.

3.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 120°C (exceto nos casos assinalados).

Os frascos que necessitaram ser utilizados esterilizados, foram autoclavados a 120°C por 35 minutos. As placas e pipetas, após lavagem, foram esterilizadas em forno a 180°C por 3 horas. A temperatura de incubação das culturas foi de 28°C, exceto em casos especiais à temperatura ambiente.

3.4. Obtenção de heterocários

Conídios das diferentes linhagens com marcas auxotróficas e morfológicas complementares foram colocadas em um mesmo tubo de ensaio contendo 2,5 ml de MM líquido mais 4% de MC. Estes tubos foram incubados por 7 - 10 dias (I. pseudokoningii) e por 10 - 15 dias (M. anisopliae) para obtenção de uma película heterocariótica. Esta película foi transferida para placas com MM para manutenção do heterocário. Pontas de hifas deste heterocário simples foram transferidas para outras placas com MM para obtenção de novos heterocários.

3.5. Obtenção de heterocário em I. pseudokoningii utilizando papel de filtro como substrato

Suspensões de conídios em MM+4%MC líquido das linhagens individuais (Tp2 e Tp3) foram colocadas sobre

fragmentos de papel de filtro esterilizados dobrados em L, em 3 tratamentos distintos:

Tratamento 1 - 1,0 ml da suspensão de conídios de cada linhagem foi colocado de forma sobreposta em fragmentos de papel de filtro com 1,5 cm de largura;

Tratamento 2 - 1,0 ml da suspensão de conídios de cada linhagem foi colocado em extremidades opostas dos fragmentos de papel de filtro com 1,5 cm de largura;

Tratamento 3 - 1,0 ml da suspensão de conídios de cada linhagem foi colocado em extremidades opostas dos fragmentos de papel de filtro com 2,0 cm de largura.

Os fragmentos de papel de filtro com as suspensões de conídios foram mantidos em placas de petri vedadas contendo algodão embebido com água destilada esterilizada para manutenção da umidade. O crescimento de possível heterocário sobre o papel foi observado pelo aparecimento de micélio e conídios de coloração esverdeada. Fragmentos de papel contendo heterocários crescidos foram colocados em tubos contendo Tween 0,1% e agitados vigorosamente para obtenção de suspensões de conídios, os quais foram semeados em MC, MM e MM com diferentes suplementações nutricionais para avaliar a presença de recombinantes

3.6. Obtenção de heterocários em I. pseudokoningii, utilizando parentais submetidos à irradiação com luz UV e choque térmico

Suspensões de conídios de cada linhagem (Tp2 e Tp3) receberam os seguintes tratamentos:

T0 = sem irradiação e sem choque térmico

Ti = irradiação com luz ultra violeta (marca Tohwalite, GT15T8), a uma distância de 15 cm, durante 5 minutos.

TiC = irradiação com luz ultra violeta por 5 minutos e choque térmico (55°C por 10 minutos e 40°C por 3 minutos).

Cada linhagem em cada tratamento foi semeada em MC para estimar a sobrevivência dos conídios.

As linhagens Tp2 e Tp3, submetidas aos tratamentos acima (T0, Ti, TiC), foram combinadas entre si, inoculando conídios em MM + 4% MC para obtenção de possíveis heterocários, totalizando 9 tratamentos finais, representados de A a I (Tabela 4)

3.7. Obtenção dos recombinantes a partir de heterocários

Suspensões de conídios provenientes das colônias heterocarióticas foram semeadas em placas contendo MM (no mínimo 4 placas) e MM mais suplementações (aminoácidos e

Tabela 4 - Tratamentos utilizados para obtenção de heterocá-
rios entre parentais submetidos à irradiação com
luz UV e choque térmico

		Tp3 (T0 Ti TiC)		
Tp2	To	A	B	C
	Ti	D	E	F
	TiC	G	H	I

Tratamento A = Tp2T0+Tp3T0; B = Tp2T0+Tp3Ti; ...;

I = Tp2TiC+Tp3TiC.

vitaminas em diferentes combinações - no mínimo 2 placas para cada combinação). Estas foram incubadas a 28°C por 6 - 7 dias quando então foi avaliada a frequência das colônias nas diferentes combinações de meio. As colônias possíveis recombinantes obtidas foram purificadas por diluição de suspensões de conídios e semeadura em MC de modo a obter colônias monospóricas, as quais foram a seguir caracterizadas quanto à sua morfologia, necessidades nutricionais e grau de ploidia. Todo recombinante obtido foi estocado e sua marca genética confirmada em pelo menos três caracterizações.

3.7.1. Estimativa da frequência de recombinantes parameióticos nos heterocários

Esta foi obtida fazendo-se um produto entre a frequência de obtenção de colônias nos meios suplementados com a frequência de recombinantes observada nas colônias monospóricas

3.8. Obtenção de recombinantes utilizando método de enriquecimento por filtração

Conídios provenientes de heterocários de parentais com duas marcas auxotróficas (ab+cd) foram inoculados em (I) MM+A+B e (II) MM+C+D líquidos com agitação (150 a 180 rpm) a 28°C por 24 e 12 horas, respectivamente para M. anisopliae e I. pseudokoningii, quando foram então filtrados em gaze

esterilizada de forma a eliminar os fragmentos de micélio crescidos. O filtrado contendo conídios não germinados foi novamente incubado nas mesmas condições de tempo e temperatura e submetido a outra filtração em gaze. Após três ciclos de crescimento e filtração, o filtrado contendo conídios ainda não germinados foi centrifugado, lavado e incubado novamente porém invertendo os meios, ou seja, o filtrado de (I) foi agora incubado em MM+C+D e o filtrado de (II) em MM+A+B. Após mais três ciclos de crescimento e filtração, o filtrado contendo conídios não germinados nos dois meios seletivos (elimina conídios de ambos parentais, recombinantes prototróficos e auxotróficos com apenas uma marca auxotrófica) foi ressuspensão em volume conhecido e semeado em MC + ade e MC + Desoxicolato de sódio, respectivamente para M. anisopliae e T. pseudokoningii. As colônias obtidas em MC foram então pré-avaliadas com relação às suas marcas morfológicas e auxotróficas, inoculando simultaneamente em MM+A+B e MM+C+D, sendo que aquelas não crescidas em ambos os meios foram recortadas cuidadosamente do meio seletivo, recuperadas em MC e a seguir caracterizadas auxotroficamente, onde o esperado é obter recombinantes com duas marcas auxotróficas porém provenientes de parentais distintos e recombinantes com três e quatro marcas auxotróficas também provenientes de ambos parentais. Estes recombinantes, aqui denominados Raux², não devem ser eliminados pela filtração e representam 9/16 do total de recombinantes possíveis, sem considerar as marcas

morfológicas (Tabela 5).

3.8.1. Estimativa teórica envolvendo os recombinantes com marcas auxotróficas de ambos parentais (R_{aux}^2)

O número de R_{aux}^2 (nR_{aux}^2) em uma amostra de conídios provenientes de heterocário em que ambos parentais possuem duas marcas auxotróficas depende do número de conídios (nC) da amostra, da frequência geral de recombinantes paramelióticos haplóides (fRh) e da constante ($K=9/16$) obtida pela razão entre R_{aux}^2 e demais tipos recombinantes possíveis (Tabela 5), na forma do produto:

$$nR_{aux}^2 = nC \cdot fRh \cdot K \quad (1)$$

A frequência de R_{aux}^2 (fR_{aux}^2) por sua vez depende da razão entre nR_{aux}^2 e nC :

$$fR_{aux}^2 = nR_{aux}^2 / nC \quad (2)$$

Substituindo nR_{aux}^2 pela equação (1), tem-se:

$$fR_{aux}^2 = nC / nC \cdot fRh \cdot k, \text{ ou}$$

$$fR_{aux}^2 = fRh \cdot k \quad (3)$$

Tabela 5 - Tipos de genótipos possíveis em núcleos segregantes haplóides, considerando parentais com duas marcas auxotróficas (abCD X ABcd) e segregação independente das mesmas, suas respectivas frequências e meios seletivos onde podem ser eliminados por filtração

Genótipos possíveis	Frequência	Eliminação por filtração em	
		MM+A+B	MM+C+D
1- abCD	1/16	+	-
2- ABcd	1/16	-	+
3- ABCD	1/16	+	+
4- aBCD	1/16	+	-
5- AbCD	1/16	+	-
6- ABcD	1/16	-	+
7- ABCd	1/16	-	+
8- aBcD	1/16	-	-
9- aBCd	1/16	-	-
10- AbcD	1/16	-	-
11- AbCd	1/16	-	-
12- abcD	1/16	-	-
13- abCd	1/16	-	-
14- aBcd	1/16	-	-
15- Abcd	1/16	-	-
16- abcd	1/16	-	-

Em um experimento de enriquecimento, o nC da amostra inicial (nC_i) será maior que o nC da amostra final (nC_f) obtida após as filtrações, sendo que uma taxa de eliminação de conídios ou de enriquecimento (tE) pode ser calculada por:

$$tE = nC_i / nC_f \quad (4)$$

Enquanto o $nRaux^2$ da amostra é constante e dependente do nC_i , ou seja:

$$nRaux^2 = nC_i \cdot fRh \cdot K \quad (5),$$

a $fRaux^2$ deverá aumentar a medida que o número total de conídios (nC) diminuir com as filtrações, de forma que a frequência inicial de $Raux^2$ (f_iRaux^2) será diferente da final (f_fRaux^2), sendo que:

$$f_iRaux^2 = nRaux^2 / nC_i \quad (6)$$

$$f_fRaux^2 = nRaux^2 / nC_f \quad (7)$$

Substituindo $nRaux^2$ pela equação (5), tem-se:

$$f_fRaux^2 = (nC_i / nC_f) \cdot fRh \cdot k \quad (8)$$

Substituindo nC_i / nC_f pela equação (4), tem-se:

$$f_fRaux^2 = tE \cdot fRh \cdot k \quad (9)$$

Quanto maior for a taxa de eliminação durante as filtrações, maior será a tE e conseqüentemente maior será a probabilidade de obtenção de $Raux^2$ na suspensão de conídios final.

A frequência geral de recombinantes parameióticos haplóides (fRh) por sua vez pode também ser obtida neste tipo de experimento a partir da equação (9), ou seja:

$$fRh = (f_p Raux^2) / (tE \cdot K) \quad (10)$$

3.9. Análise do grau de ploidia

Foi avaliado através da estabilidade ou emissão de setores em MC contendo Benomil (agente haploidizante).

3.10. Análises genéticas dos recombinantes

Foram realizadas pelas frequências de recombinantes e parentais obtidos nos diferentes meios seletivos com o objetivo de determinar o número de grupos de ligação e mapeamento dos genes marcadores.

3.11. Reisolamento de recombinantes simples e compostos E6/E9 de M. anisopliae a partir de insetos Chalcodermus bimaculatus parasitados.

A partir de larvas e insetos mortos pelo fungo obtidos em bioensaio de virulência (BAGALHI, 1987), procedeu-se o reisolamento do fungo semeando-se esporos fúngicos coletados da superfície do inseto, bem como todo o corpo do inseto após assepsia e lavagem em hipoclorito de Sódio 0,5% por 3 - 5 minutos, em MC e Micosel (contém cloranfenicol e actidione).

3.12. Bioensaio para avaliação da virulência das linhagens E6, E9 e Compostos híbridos E6/E9 em lagartas de Diatraea saccharalis

Foram utilizadas as linhagens E6, E9, Composto2-1, Composto2-2, Composto2-3 e Composto2-4 (Tabela 1), todas recentemente isoladas de larvas de Chalcodermus bimaculatus e cultivadas pela 3ª vez em MC. Lagartas do 3º instar de D. saccharalis foram emergidas por 10 segundos em solução contendo 10^7 conídios/ml e mantidas em placas com dieta apropriada. A porcentagem de mortalidade foi avaliada em 10 repetições com 4 lagartas/repetição, durante um período de até 10 dias. Este experimento foi realizado pela Dra. Artemisia Vilas-Boas junto à Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina - Pernambuco - IAA/PLANALÇUCAR.

3.13. Preservação e avaliação da viabilidade e estabilidade genética.

Linhagens selvagens, mutantes e recombinantes de M. anisopliae e I. pseudokoningii foram cultivados em meio completo (MC) ou MC + ade, até a obtenção de um bom crescimento e esporulação e a seguir preservadas empregando os seguintes procedimentos:

- a) Crescimento contínuo em tubos inclinados, mantidos vedados com magiplastic à 28° C e temperatura ambiente, protegidos de luminosidade. Novos cultivos (repiques) foram realizados após períodos de pelo menos 3 meses, embora tubos com cultura tenham sido assim mantidos e avaliados por períodos de até 12 meses.
- b) Crescimento em tubos inclinados e recobertos com óleo mineral Nujol esterilizados; manutenção à temperatura ambiente. Cultivos para recuperação de novas colônias foram realizados fazendo-se uma drenagem prévia do óleo mineral.
- c) Blocos de cultura em água destilada esterilizada (método de CASTELLANI, 1939). Os blocos de cultura de cerca de 4 mm² foram sempre obtidos de colônias jovens

crescidas em placas de petri. Estes eram colocados em frascos com água e a seguir vedados e mantidos à temperatura ambiente. A recuperação da colônia foi realizada semeando-se estes fragmentos em placas de petri com meio de cultura.

- d) Crescimento e dormência em solo esterilizado. Suspensões de conídios foram semeados em tubos contendo solo argiloso esterilizados por duas autoclavagens. Após cultivo à 28° C estes foram mantidos vedados com algodão à temperatura ambiente. A recuperação de colônias foi realizada semeando-se grânulos de solo sobre placas contendo meio de cultura.
- e) Dormência em sílica-gel (método de PERKINS, 1962). Tubos de 8-100 mm preenchidos até a metade com sílica gel previamente peneirada foram esterilizados e a sílica desidratada em forno de 180° C por 3 horas. Suspensões de conídios preparados com leite mólico desnatado à 5% foram adicionados aos tubos com sílica (1 ml/tubo) mantidos em banho de gelo-água (30 a 60 minutos), vedados com algodão. Após um período de 1 a 2 semanas quando os cristais de sílica apresentaram-se secos e soltos, os tubos foram vedados com magiplastic e mantidos à temperatura ambiente. A recuperação de colônias foi realizada semeando-se cristais de sílica

sobre placas contendo meio de cultura.

Utilizou-se pelo menos 15 tubos ou frascos para cada linhagem de M. anisopliae em cada tratamento. Para T. pseudokoningii, utilizou-se de 2 a 3 tubos ou frascos por linhagem, porém empregando apenas os métodos de preservação por crescimento contínuo e de blocos de cultura em água.

O índice de viabilidade para cada método de preservação foi obtido pela média dos dados de recuperação de colônias das diferentes linhagens selvagens e mutantes.

A análise da estabilidade genética foi realizada através da frequência de reversão das marcas auxotróficas e morfológicas dos mutantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CRUZAMENTOS EM M. anisopliae

4.1.1. Obtenção de heterocários e seleção de recombinantes em meios seletivos com suplementações

Utilizando linhagens parentais com uma ou duas marcas auxotróficas e uma morfológica, pôde-se obter películas heterocarióticas em MM + 4% MC em todas combinações avaliadas (Tabela 6), as quais continuaram a crescer em placas contendo apenas MM (Tabela 7). Embora a complementação gênica para as marcas auxotróficas aparentemente tenha ocorrido em todos estes heterocários originais, o mesmo não se observou com relação às marcas morfológicas onde a coloração mesclou entre ambos os tipos parentais e o verde selvagem ou mesmo apresentou zonação entre o centro e a periferia da colônia (Tabela 7). Este tipo de complementação parcial ou desbalanciamento zonal também foi observado em heterocários

TABELA 6 - Obtenção de películas heterocarióticas de
M. anisopliae em MM + 4% MC

Linhagens	Formação de película
1	-
7	-
8	-
20	-
1 + 8	+
3 + 17	+
7 + 17	+
7 + 20	++
8 + 20	++

(-) Não crescimento (observado nas linhagens isoladamente)

(+) Crescimento pequeno

(++) Crescimento normal

TABELA 7 - Características de crescimento de heterocários simples de M. anisopliae

Heterocário	Coloração e outras observações
1+8	branco amarelado (15 dias) passando a verde amarelado (30 dias), crescimento lento e presença de setores
3+17	Colônias verde-violáceas
7+17	Colônias verde-violáceas
7+20	colônias verde violáceas e colônias amarelas isoladas
8+20	amarelo claro (semelhante parental 20) na periferia e amarelo intenso (semelhante parental 8) no centro do heterocário

secundários provenientes de pontas de hifas dos heterocários originais (Tabela 8), onde, além dos aspectos de não-complementação morfológica, observou-se também apenas o crescimento residual de um dos parentais (17) nas combinações 3+17 e 7+17, o que evidencia uma situação não homogênea com relação à distribuição e interação gênica dos núcleos nas colônias heterocarióticas de M. anisopliae. A proporção entre os tipos parentais também aponta para uma natureza não homogênea dos heterocários, uma vez que esta foi de 3,7(1): 1(8) para o heterocário 1+8 pH1 (Tabela 9) e de 1,6(7): 1,0(20) e 1(7):2(20) respectivamente para o 1º e 2º experimento do heterocário 7+20 pH1 (Tabelas 10 e 11).

A seleção de recombinantes, efetuada em duas etapas, semeando primeiramente suspensões de conídios em MM e MM com suplementações (MMS) com posterior obtenção de colônias monospóricas em MC, foi realizada para os heterocários 1+8 pH1 e 7+20 pH1. A frequência média de obtenção de colônias em MM e MMS variou de $3,1 \cdot 10^{-4}$ a $1 \cdot 10^{-1}$ (Tabelas 12, 13 e 14), sendo que para um mesmo heterocário (7+20) esta foi ligeiramente menor em heterocário original (Tabela 13) quando comparado com heterocário secundário de ponta de hifa (Tabela 13 e 14). A caracterização morfológica e auxotrófica das colônias monospóricas, bem como alguns setores, demonstrou ocorrência de recombinantes principalmente do tipo prototrófico, alguns com prototrofismo parcial, com e sem a marca morfológica (Tabelas 15, 16 e 17), e recombinantes auxotróficos simples (uma só marca),

TABELA 8 - Características de crescimento de heterocários
provenientes de pontas de hifas de M. anisopliae

Heterocáριο	Repetição	Coloração do heterocáριο	Vigor de crescimento	Setores
1+8 ph1	I	branco amarelado	++	ausente
	II	verde amarelado	++	ausente
7+20 ph1	I	amarelo (bordas), violeta (centro)	+++	ausente
	II	amarelo (bordas), violeta (centro)	+++	presente
7+20 ph1a	I	amarelo	+	ausente
	II	amarelo	++	ausente
8+20 ph1	I	amarelo	+	ausente
	II	amarelo	+++	ausente
3+17 ph1	I	-	*	-
7+17 ph1	II	-	*	-

+ a +++ representa crescimento de pobre a vigoroso

ph1a = heterocáριο secundário proveniente de colônia heterocariótica
totalmente amarela

* Crescimento residual apenas do parental 17

- = não avaliado

TABELA 9 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 1+8 ph1 de M. anisopliae para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii).

Diluição da suspensão de conídios	Repetição	Parental		Total
		1	8	
10^{-6}	I	0	0	0
10^{-6}	II	5	1	6
10^{-5}	I	30	10	40
10^{-5}	II	23	7	30

i) Concentração de conídios na suspensão inicial = $3,2 \cdot 10^7$ conídios/ml

ii) Proporção entre parentais = 3,7(1) : 1(8).

TABELA 10 -Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocáριο secundário (de ponta de hifa) 7 + 20 de M. anisopliae para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii) - 1º Experimento.

Diluição da suspensão de conídios	Repetição	Parental		Total
		7	20	
10^{-6}	I	1	0	1
10^{-6}	II	1	0	1
10^{-5}	I	6	4	10
10^{-5}	II	7	4	11

i) Concentração de conídios na suspensão inicial = $1 \cdot 10^7$
conídios/ml

ii) Proporção entre parentais = 1,6(7) : 1,0(20)

TABELA 11 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocáριο 7+20 pH1 de M. anisopliae para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii) - 2º Experimento

Diluição da suspensão de conídios	Repetição	Parental		Total
		7	20	
10^{-6}	I	1	0	1
10^{-6}	II	0	2	2
10^{-5}	I	14	17	31
10^{-5}	II	5	22	27

i) Concentração de conídios na suspensão inicial = $2,2 \cdot 10^7$ conídios/ml

ii) Proporção entre parentais = 1(7) : 2(20).

TABELA 12 - Frequência de obtenção de colônias a partir da
 semeadura de suspensões de conídios do
 heterocário 1+8 ph1 de M. anisopliae, em
 diferentes meios seletivos.

Meio seletivo	Diluição da suspensão de conídios	Frequência (.10 ⁻⁵)
MM	10 ⁻²	2
	10 ⁻³	0
MM+ade+lis	10 ⁻²	93
	10 ⁻³	31
MM+ade+pir	10 ⁻²	62
	10 ⁻³	0
MM+pro+pir	10 ⁻²	60
	10 ⁻³	0
Média		31 ± 36,5

TABELA 13 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocário original e heterocário secundário (ponta de hifa) 7 + 20 de M. anisopliae em diferentes meios seletivos - 1^o Experimento.

Meio Seletivo	Frequência (x 10 ⁻³)	
	Heterocário original	Heterocário secundário
MM	2,5	-
MM + bio + ade	2,0	-
MM + bio + leu	15,0	80,0
MM + met + ade	-	100,0
MM + met + leu	-	100,0
Média	6,5 ± 7,3	9,3 ± 11,5

(-) Não estimado devido a crescimento confluyente, não crescimento de colônias, ou contaminação

TABELA 14 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocáριο 7+20 ph1 de M. anisopliae, em diferentes meios seletivos - 2º Experimento

Meio seletivo	Diluição da suspensão de conídios	Frequência (10 ⁻³)
MM	10 ⁻²	C*
	10 ⁻³	>100
MM+bio+leu	10 ⁻²	C
	10 ⁻³	>100
MM+bio+ade	10 ⁻²	C
	10 ⁻³	>100
MM+met+leu	10 ⁻²	C
	10 ⁻³	>100
MM+met+ade	10 ⁻²	C
	10 ⁻³	>100
Média		>1.10 ⁻¹

* C = crescimento confluyente, impossível determinar a frequência

TABELA 15 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocário 1+8 ph1 de M. anisopliae selecionadas em diferentes meios seletivos.

Meio seletivo	Número de colônias analisadas	Marcas genéticas		
		Parental		Recombinantes*
		1	8	
MM	2	(0)	(0)	ylo prototrófico (1) ylo pir lis/PIR LIS(1)**
MM+ade+pir	4	(0)	(2)	ylo pir lis/PIR LIS(2)
MM+ade+lis	2	(2)	(0)	
MM+pro+pir	4	(0)	(2)	ylo pir lis/PIR LIS(2)
MM+pro+lis	6	(0)	(2)	ylo pir lis/PIR LIS(4)
Total	18	(2)	(6)	(10)

Frequência de recombinantes = $10/18 = 0,55$

* () = Entre parênteses está o número observado

** ylo pir lis/PIR LIS = Prototrofismo parcial, com crescimento lento em MM

TABELA 16- Marcas genéticas das colônias monospóricas recombinantes obtidas do heterocário 7 + 20 de M. anisopliae - 1^o Experimento.

Meio seletivo	Número de colônias analisadas	Recombinantes
MM	6	0
MM + bio + ade	5	0
MM + bio + leu	8	01 prototrófico*
	19	1

Frequência de recombinantes = 1/19

* Apresentou emissão de setor recombinante via ade

TABELA 17- Marcas genéticas das colônias monospóricas e setores provenientes do heterocáριο 7+20 ph1 de M. anisopliae selecionadas em diferentes meios seletivos - 2º Experimento

Meio seletivo	Número de colônias analisadas	Marcas genéticas		
		Parental		Recombinantes*
		7	20	
MM	10	(0)	(5)	verde prototrófico (5)
MM+bio+leu	8	(0)	(1)	verde prototrófico (2) ylo prototrófico (5)
MM+bio+ade	10	(0)	(10)	
MM+met+leu	10	(0)	(4)	ylo prototrófico (3) vio met (3)
MM+met+ade	10	(0)	(10)	
<u>SETORES:</u>				
MC	S1		(1)	
MC	S2			vio ade
MM+met+leu	S3			ylo prototrófico
	S4			vio prototrófico
	S5			vio met
Total	48 colônias	(0)	(31)	(17)
	5 setores	(0)	(1)	(4)

Frequência de recombinantes = $17/48 = 0,35$

* () = Entre parênteses está o número observado

sendo que em um dos setores (vio ade) as marcas morfológicas e auxotróficas eram provenientes de parentais distintos (Tabela 17).

Colônias tipo parentais sempre foram detectadas ao lado dos recombinantes em todos os heterocários, devido provavelmente à continuidade de crescimento heterocariótico ou até mesmo sintrofismo nos meios seletivos com suplementações. Isto gera dificuldades na estimativa da frequência de recombinantes nestes heterocários, com tendências a uma super-estimativa do fenômeno, principalmente se a obtenção de colônias monospóricas e caracterização auxotrófica não for cuidadosamente efetuada. Colônias parentais com dupla auxotrofia podem ser facilmente confundidas como recombinantes com três ou até mesmo quatro marcas auxotróficas, principalmente quando se trabalha com grandes números de colônias e com inoculações em alça tipo multifio (Tabela 18), uma vez que nestas condições a falta de conídios em determinadas inoculações ocorre com uma certa frequência devido provavelmente à baixa esporulação e crescimento lento das colônias, características estas presentes na maioria dos mutantes morfológicos e auxotróficos de M. anisopliae. Este fato pode explicar em partes as diferenças de resultados entre os aqui obtidos e o observado por VALADARES (1989), COSTA (1989) e VEGA (1990), onde a maior frequência foi de recombinantes com três ou quatro marcas auxotróficas. Mesmo tomando estas precauções, a frequência de recombinantes paramielióticos

TABELA 18- Marcas genéticas das colônias monospóricas provenientes do heterocário 12+20 de M. anisopliae, caracterizadas utilizando alça multifio

Colônia original	Meio seletivo	Número de colônias analisadas	Marcas genéticas		
			Parental		Recombinantes *
			12	20	
1	MM	26	(2)	(24)	(0)
2	MM	26	(25)	(1)	(0)
3	MM	26	(17)	(7)	met lis leu ade (2)
4	MM	26	(0)	(26)	(0)
5	MM	26	(16)	(8)	met lis leu ade (2)
6	MM + met	26	(20)	(5)	met lis leu ade (1)

* () Entre parênteses está o número observado

A recharacterização individual destes "recombinantes" demonstrou que todos são narealidade do tipo met lis (parental 12)

aqui obtida (pelo produto entre a frequência de colônias nos meios suplementados com a frequência de recombinantes nas colônias monospóricas), como sendo de $1 \cdot 10^{-5}$ a $1 \cdot 10^{-4}$, pode estar super-estimada devido ao alto número de colônias obtidas nos meios seletivos suplementados onde, além de recombinantes, também devem estar crescendo colônias heterocarióticas e/ou sintróficas. Apesar da taxa de reversão das marcas auxotróficas em amostras de conídios ser relativamente baixa (menor que $1 \cdot 10^{-7}$, BAGALHI, 1987; VEGA, 1990), a possibilidade de ocorrência de colônias prototróficas devido reversão não pode ser totalmente descartada, principalmente pelo fato destas linhagens terem sido obtidas há cerca de 5-6 anos e, em alguns casos, estarem apresentando instabilidade genética com reversão de marcas morfológicas e auxotróficas durante este período de preservação (ver cap. 4.5. Preservação e estabilidade genética).

4.1.2. Seleção de recombinantes utilizando método de enriquecimento por filtração

Adaptado dos métodos de enriquecimento para obtenção de mutantes, procurou-se desenvolver um método de enriquecimento por filtração que possibilitasse uma melhor obtenção e quantificação de recombinantes com marcas auxotróficas de

ambos parentais. Neste tipo de procedimento o esperado é eliminar os conídios tipo parentais, recombinantes prototróficos e auxotróficos com apenas uma marca (7/16 do total), e manter os conídios recombinantes com duas, três ou quatro marcas auxotróficas de ambos parentais (9/16 do total, considerando que ambos parentais tenham duas marcas auxotróficas, Tabela 5).

Realizando esta metodologia no heterocário 1+8 pH1 de M. anisopliae, conseguiu-se uma boa eliminação de conídios, de forma que o número de conídios inicial de cerca de $1 \cdot 10^6$ passou para $1 \cdot 10^2$, proporcionando uma taxa de enriquecimento (tE) de 10^4 (Tabela 19). Considerando a frequência geral de recombinantes haplóides obtida por semeadura em MM e MMS como sendo ao redor de $1 \cdot 10^{-5}$, pode-se deduzir uma frequência esperada para os $Raux^2$ após a filtração no valor de $5,6 \cdot 10^{-2}$ (Tabela 20). No entanto, após ter analisado cerca de 80 colônias detectou-se apenas tipos parentais (Tabela 20). Apesar da possibilidade de estar ocorrendo perdas de partes dos $Raux^2$ durante as filtrações, a não detecção de recombinantes neste tipo de experimento pode sugerir que a frequência de recombinantes haplóides parameióticos na realidade não ocorre em frequências tão elevadas quanto inicialmente se pensou ocorrer, pelo menos para M. anisopliae. Outra possibilidade é a de ocorrer uma seleção a nível de heterocário de forma que nem todas as combinações possíveis possam ser segregadas em conídios, podendo prevalecer os

TABELA 19 - Número de conídios inicial (nC_i), final (nC_f) e taxa de enriquecimento (tE) para obtenção de recombinantes com marcas auxotróficas de ambos parentais - Heterocáριο de M. anisopliag 1+8 ph1

Parâmetro*	Valor estimado
nC_i	1.10^6
nC_f	1.10^2
tE	10^4

* nC_i - obtido pela contagem em câmara de Neubauer

nC_f - obtido por semeadura e contagem das colônias em MC+ade

tE - obtido pela razão entre nC_i / nC_f

TABELA 20 - Número de colônias parentais e recombinantes obtidos e esperados após enriquecimento por filtração ($tE = 10^4$) - Heterocário de M. anisopliag 1 + 8 phi

Repetição	nº de colônias analisadas	Marcas Genéticas			
		Parental		Recombinantes	
		1	8	esperado*	observado
I	41	4	37	2,3	0
II	45	38	7	2,5	0
Total	86	42	44	5,5	0

* A frequência esperada foi obtida pela equação:

$$f_p R_{aux}^2 = tE \cdot f_{Rh} \cdot k, \text{ considerando } f_{Rh} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ e } k = 9/16$$

$$f_p R_{aux}^2 = 5,6 \cdot 10^{-2}$$

recombinantes prototróficos sobre auxotróficos, principalmente pelo fato dos heterocários serem mantidos em MM.

4.1.3. Reisolamento de linhagens selvagens E6, E9 e compostos híbridos E6/E9 de M. anisopliae do inseto Chalcodermus bimaculatus e virulência em lagartas de Diatraea saccharalis.

A partir de larvas e insetos adultos de C. bimaculatus infectados por M. anisopliae, obtidos em bioensaio realizado por BAGALHI (1987) onde observou-se que um composto híbrido (composto 2), formado pela mistura de conídios de 16 colônias recombinantes verdes prototróficas obtidas de E6-8/E9-20) apresentava virulência igual ou superior às linhagens parentais selvagens, procedeu-se o reisolamento do fungo em meio de Micosel, o qual contém cloranfenicol e actidione (inibe o crescimento de fungos saprofíticos mas não o de M. anisopliae). Conídios coletados da superfície externa de larvas infectadas produziram culturas positivas em todas as linhagens avaliadas (Tabela 21). Utilizando, no entanto, o corpo todo de insetos adultos infectados tratados com hipoclorito de sódio obteve-se cultura apenas para a linhagem E6 (Tabela 21). O melhor isolamento a partir de larvas pode estar relacionado ao fato de que estas são mais eficientemente parasitadas pelo fungo em relação aos insetos adultos

TABELA 21 - Reisolamento de M. anisopliae de larvas de Chalcodermus bimaculatus infectadas

Procedimento	Linhagem	Cultura
Semeadura de esporos da	E6	+
superfície externa da	E9	+
larva	Composto 2-1	+
	Composto 2-2	+
	Composto 2-3	+
	Composto 2-4	+
Semeadura do corpo do	E6	+
inseto após assepsia em	E9	-
NaOCl	Composto 2-1	-
	Composto 2-2	-
	Composto 2-3	-
	Composto 2-4	-

(BAGALHI, 1987), o que deve proporcionar maiores quantidades de material fúngico viável.

As linhagens E6, E9 e quatro subpopulações do composto 2 todos reisolados de C. bimaculatus, foram também avaliadas quanto à virulência em lagartas de Diatraea saccharalis. A porcentagem de mortalidade variou entre as subpopulações do composto 2, sendo que para uma destas, foi equivalente à linhagem E9, onde se alcançou um maior índice com 80% de mortalidade (Tabela 22). Este resultado suporta a hipótese da heterogeneidade genética dos compostos bem como da possibilidade de obtenção de linhagens recombinantes com maior potencial para o controle biológico pela aplicação de compostos híbridos seguida de reisolamento fúngico dos insetos mortos (BAGALHI, 1987; BAGALHI & AZEVEDO, 1987).

4.1.4. Análise do grau de ploidia de M. anisopliae pelo crescimento em meio contendo Benomil

Recombinantes prototróficos com e sem marca morfológica bem como o composto 2-1 (reisolado de C. bimaculatus), todos obtidos do cruzamento E6-8/E9-20, foram avaliados com relação à produção de setores coloniais em MC contendo diferentes concentrações de Benomil, agente haploidizante (UPSHALL et al., 1976). O crescimento das colônias tende a ser diminuído a

TABELA 22 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de Diatraea saccharalis após 10 dias de aplicação das linhagens E6, E9 e compostos híbridos E6/E9 de M. anisopliae.

Linhagens*	% de mortalidade
E6	65
E9	80
Composto 2-1	55
Composto 2-2	55
Composto 2-3	75
Composto 2-4	80

*Todas as linhagens haviam sido recentemente isoladas de C. bimaculatus, e cultivadas por três ciclos de crescimento em MC

medida que a concentração da droga aumenta, havendo uma forte inibição com 2 ug/ml e inibição quase que total com 4 ug/ml (Tabela 23). Detectou-se o aparecimento de pequenos setores em duas colônias recombinantes na concentração de 2 ug/ml de Benlate. Estes setores, além de pequenos, eram prototróficos e apresentavam um aspecto degenerado com baixa ou mesmo inexistência de esporulação, o que sugere a ocorrência de eventos recombinacionais do que uma possível diminuição do grau de ploidia para a formação dos mesmos. Apesar das evidências indicarem uma condição de haploidia, não se pode descartar totalmente a hipótese desses recombinantes se apresentarem na forma aneuplóide ou hiperhaplóide relativamente estáveis

4.2. Cruzamentos em I. pseudokoningsii

4.2.1. Obtenção de heterocários e seleção de recombinantes utilizando meios seletivos com suplementações

Antes de iniciar a obtenção de heterocários, realizou-se uma recharacterização das linhagens mutantes de I. pseudokoningsii obtidas por FURLANETO (1989), onde confirmou-se que todas as linhagens apresentam duas marcas

TABELA 23 - Tamanho da colônia (mm)* de recombinantes prototróficos simples e composto híbrido (E6/E9) de *M. anisopliae* reisolados de inseto em MC + Benlate (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ug/ml) após 5 e 9 dias de crescimento

Linhagem	Repetição	Número de dias	MC+Ben				
			0,5	1,0	2,0	4,0	
820.1 ylo proto- trófico	I	5	15,0	9,5	2,0	0,0	
		9	29,5	23,0	6,5	2,0	
	II	5	15,0	9,0	2,0	1,0	
		9	30,0	23,0	8,5	2,5	
	III	5	14,5	9,0	1,0	0,0	
		9	29,0	23,5	4,0	3,0	
	IV	5	14,0	9,5	3,0	1,0	
		9	28,0	23,5	9,0	3,0	
	820.4 verde proto- trófico	I	5	16,5	13,0	3,0	2,0
			9	35,0	29,5	8,0	2,0
		II	5	16,5	11,0	5,0	2,0
			9	34,5	27,5	9,0	2,0
III		5	16,5	14,0	3,5	0,0	
		9	34,0	31,0	9,0	0,0	
IV		5	16,0	11,5	3,0	0,0	
		9	33,0	29,0	14,0	0,0	
820.9 verde proto- trófico		I	5	18,0	12,0	4,0	0,0
			9	34,5	29,5	6,5	0,0
		II	5	17,0	12,0	3,0	2,0
			9	34,0	30,0	11,0	2,0
	III	5	16,5	12,0	2,0	1,0	
		9	33,5	29,5	4,0	2,0	
	IV	5	17,5	13,5	3,0	0,0	
		9	33,5	31,0	8,5	0,0	

Continua

TABELA 23 - Continuação

Linhagem	Repetição	Número de dias	MC+Ben			
			0,5	1,0	2,0	4,0
Composto 2.1 verde proto- trófico	I	5	17,0	10,0	7,0	5,0
		9	34,0	28,5	11,0	7,0
	II	5	16,0	9,0	3,0	1,0
		9	33,0	26,5	3,0	1,0
	III	5	17,0	12,0	7,0	0,0
		9	32,0	29,5	12,0	0,0
	IV	5	16,5	13,0	0,0	0,0
		9	34,0	25,5	2,0	0,0

- Em negrito estão assinaladas as colônias onde houve surgimento de setores, os quais continuaram prototróficos, porém com uma morfologia alterada (coloração violácea ou aspecto degenerado, praticamente sem esporulação)

* Médias obtidas entre os diâmetros maior e menor

auxotróficas (Tabela 24), sendo que Tp1 e Tp2 apresentam também coloração branca, Tp3, Tp4 e Tp5 coloração amarela, enquanto Tp6 e Tp7 coloração verde selvagem.

Combinando conídios de linhagens parentais com marcas morfológicas e auxotróficas complementares e empregando os procedimentos: i) normal com obtenção de película em MM + 2 e 4% MC e passagem para MM, ii) utilização de papel de filtro como substrato e iii) utilização de parentais submetidos à irradiação com luz U.V. e choque térmico, diversos heterocários foram estabelecidos e avaliados com relação à ocorrência de recombinantes.

Heterocários normais 1+4 e 2+3 foram facilmente obtidos tanto em MM+2 como 4% de MC e em placas com MM apresentaram coloração verde selvagem com presença de pontos ou tufo conidiais brancos e amarelos (Tabela 25). A proporção entre parentais nestes heterocários foi de 2(1): 1(4) e 1(2): 1(3), respectivamente para 1+4 e 2+3 (Tabelas 26 e 27). Colônias verdes, muito provavelmente heterocarióticas, foram também obtidas quando suspensões de conídios em MM+4% de MC das linhagens Tp2 e Tp3 foram semeadas de forma sobreposta em fragmentos de papéis de filtro esterilizados (Tabela 28). A proporção entre parentais neste heterocário (denominado 2+3P) foi de 3(2): 1(3) (Tabela 29). Num terceiro procedimento, linhagens parentais Tp2 e Tp3 foram submetidas ou não a tratamentos de irradiação e choque térmico e a seguir combinadas entre si (2+3) para obtenção de heterocários.

TABELA 24 - Recaracterização das linhagens mutantes de *T. pseudokoningii* pela presença (+) ou ausência (-) de crescimento em MM com diferentes suplementações

Meio	linhagens						
	1	2	3	4	5	6	7
MM	-	-	-	-	-	-	-
MM + leu	-	-	-	-	-	-	-
MM + ribo	-	-	-	-	-	-	-
MM + lis	-	-	-	-	-	-	-
MM + arg	-	-	-	-	-	-	-
MM + ade	-	-	-	-	-	-	-
MM + nic	-	-	-	-	-	-	-
MM + met	-	-	-	-	-	-	*R
MM + nic + met	-	-	-	-	-	-	+
MM + leu + lis	-	-	-	-	+	-	-
MM + ribo + ade	-	-	-	+	-	+	-
MM + ribo + arg	-	-	+	-	-	-	-
MM + leu + Tio	-	+	-	-	-	-	-
MM + leu + arg	+	-	-	-	-	-	-

* R = Pequeno crescimento residual

Tp1 = whi4 leu1 arg1

Tp2 = whi4 leu1 tio1

Tp3 = ylo5 rib1 arg2

Tp4 = ylo5 rib1 ade1

Tp5 = ylo5 leu2 lis1

Tp6 = arg3 rib2

Tp7 = nic1 met1

TABELA 25 - Obtenção de heterocários normais em
T. pseudokoningsii

Cruzamento	Obtenção de películas		Coloração do heterocário
	MM+2%MC	MM+4% MC	
1 + 4	+	+	verde com pontos brancos e amarelos
2 + 3	+	+	verde com pontos brancos e amarelos

TABELA 26 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 1+4 de T. pseudokoningsii para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii)

Diluição da suspensão de conídios	Repetição	Parental		Total
		1	4	
10^{-5}	I	24	12	36
10^{-5}	II	29	14	43
10^{-5}	III	22	12	34
		75	38	113

i) Concentração de conídios na suspensão inicial
 = $3,7 \cdot 10^7$ conídios/ml

ii) Proporção entre parentais = 2(1): 1(4)

TABELA 27 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 2+3 de I. pseudokoningii para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii)

Diluição da suspensão de conídios	Repetição	Parental		Total
		2	3	
10^{-5}	I	19	20	39
10^{-5}	II	27	27	54
10^{-5}	III	19	14	33
Total		65	61	127

i) Concentração de conídios na suspensão inicial
= $4,7 \cdot 10^7$ conídios/ml

ii) Proporção entre parentais = 1(2): 1(3)

TABELA 28 -Obtenção de heterocários 2+3P em *I. pseudokoningii*, utilizando papel de filtro embebido com MM + 4% MC como substrato .

Tratamento	Obtenção de heterocário
1	+
2	-
3	-

+ = positivo para formação de heterocário

- = negativo para formação de heterocário

TABELA 29 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 2+3P de I. pseudokoningii para estimar a concentração de conídios (i) e a proporção entre parentais (ii)

Diluição da suspensão de conídios	Repetição	Parental		Total
		2	3	
10^{-5}	I	10	4	14
10^{-5}	II	8	3	11
10^{-4}	I	114	22	136
10^{-4}	II	119	35	154

i) Concentração de conídios na suspensão
inicial = $1,3 \cdot 10^7$ conídios/ml

ii) Proporção entre parentais = 3(2) : 1(3)

Apesar de uma acentuada diminuição da viabilidade dos conídios após a irradiação e choque térmico (Tabela 30), estes quando combinados entre si estabeleceram crescimento de películas em MM + 4% MC em todos os tratamentos, porém, quando semeadas em placas com apenas MM apenas se observou crescimento heterocariótico nos tratamentos A, D e G onde o parental Tp3 não sofreu irradiação nem choque térmico, e no tratamento E onde ambos parentais sofreram apenas irradiação com luz UV (Tabela 31). Estes heterocários apresentaram características semelhantes aos heterocários normais, ou seja, coloração verde com pontos brancos e amarelos; a presença de setores, também avaliado, não foi detectada (Tabela 31). O heterocário proveniente do tratamento E (2+3E) foi avaliado com relação à proporção entre parentais onde se observou ser de 1,4(2): 1(3) (Tabela 32) e também quanto a presença de recombinantes (Tabelas 36 e 40).

A seleção de recombinantes, efetuada em duas etapas como em M. anisopliae, foi realizada para os heterocários 1+4, 2+3, 2+3P e 2+3E. A frequência média de obtenção de colônias em MM e MMS foi bastante constante nos quatro heterocários, com pequena variação de 1,0 a 4,9 $\cdot 10^{-5}$, apresentando-se ligeiramente menor no heterocário 2+3E, no qual ambos parentais receberam irradiação com luz UV (Tabelas 33, 34, 35 e 36). A caracterização morfológica e auxotrófica de colônias monospóricas provenientes das colônias selecionadas evidenciou ocorrência de recombinantes, os quais foram bastante variáveis

TABELA 30 - Quantidade relativa de conídios viáveis das linhagens 2 e 3 de *T. pseudokoningii* após tratamento de irradiação com luz ultra violeta e choque térmico.

Tratamento	Viabilidade dos conídios *
Tp2To	+++
Tp2Ti	+
Tp2TiC	++
Tp3To	+++
Tp3Ti	++
Tp3TiC	+

* Obtida pelo crescimento em MC.

+ a +++ representa viabilidade, de baixa a normal

TABELA 31 - Obtenção de heterocáριο em *T. pseudokoningii*, utilizando parentais submetidos à irradiação com luz ultra violeta e choque térmico.

Tratamento	Crescimento de película em MM + 4% MC	Crescimento e produção de conídios da colônia heterocariótica em MM	Coloração da colônia heterocariótica	Setores
A	+++	+++	verde com pontos brancos e amarelos	ausentes
B	++	-		
C	++	-		
D	+++	++	verde com pontos brancos e amarelos	ausentes
E	++	+	verde com pontos brancos e amarelos	ausentes
F	++	-		
G	+++	+++	verde com pontos brancos e amarelos	ausentes
H	++	-		
I	+	-		

+ a +++ representa crescimento de pobre a vigoroso
- não crescimento

TABELA 32 - Número de colônias obtidas em MC a partir de conídios do heterocário 2+3E de I pseudokoningii, para estimar a concentração de conídios(i) e a proporção entre parentais.

Diluição da suspensão de conídios	Repetição	Parental		Total
		2	3	
10^{-6}	I	4	2	6
10^{-5}	I	26	19	45
10^{-5}	II	16	18	34
10^{-4}	I	-	-	C*
10^{-4}	II	-	-	C

* C = crescimento confluyente

- = não estimado

i) Concentração de conídios na suspensão inicial =
 $4,6 \cdot 10^7$ conídios/ml.

ii) Proporção entre parentais = 1,4(2):1(3)

TABELA 33 -Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocátricos 1+4 de T. pseudokoningii, em diferentes meios seletivos

Diluição da suspensão de conídios	Meio Seletivo	Frequência* (x 10 ⁻⁵)
10 ⁻¹	MM	2,7
10 ⁻²	MM	5,4
10 ⁻²	MM + arg + ribo	0,0
10 ⁻²	MM + arg + arg	12,0
10 ⁻²	MM + leu + ade	5,4
10 ⁻²	MM + leu + ribo	4,0
Média		4,9 ± 4,0

- Com exceção de três colônias brancas pequenas, uma obtida em MM + e duas em MM + arg + ade, todas as demais são de coloração verde

* Médias obtidas em duas placas

TABELA 34 -Frequência de obtenção de colônias a partir da
semeadura de suspensões de conídios do heterocá-
rios 2+3 de I. pseudokoningii, em diferentes meios
seletivos

Diluição da suspensão de conídios	Meio Seletivo	Frequência* (x 10 ⁻⁵)
10 ⁻¹	MM	3,9
10 ⁻²	MM	2,6
10 ⁻²	MM + leu + arg	2,6
10 ⁻²	MM + leu + ribo	1,2
10 ⁻²	MM + tio + arg	4,7
10 ⁻²	MM + tio + ribo	2,6
Média		2,9 ± 1,2

- Com exceção de três colônias brancas pequenas, uma obti-
da em MM + e duas em MM + tio + arg, todas as demais
são de coloração verde

* Médias obtidas em duas placas

TABELA 35 - Frequência de obtenção de colônias a partir da semeadura de suspensões de conídios do heterocário 2+3.P de I. pseudokoningii, em diferentes meios seletivos

Diluição da suspensão de conídios	Meio seletivo	Frequência* (x 10 ⁻⁵)
10 ⁻¹	MM	6,9
10 ⁻²	MM	7,4
10 ⁻¹	MM + leu + arg	5,9
10 ⁻²	MM + leu + arg	7,1
10 ⁻¹	MM + leu + ribo	3,6
10 ⁻²	MM + leu + ribo	0,0
10 ⁻¹	MM + tio + arg	5,6
10 ⁻²	MM + tio + arg	7,0
10 ⁻¹	MM + tio + ribo	3,0
10 ⁻²	MM + tio + ribo	0,0
Média		4,6 ± 2,8

-Com exceção de uma única colônia branca amarela, obtida em MM+leu+arg, todas as demais são de coloração verde

* Médias obtidas em duas placas

TABELA 36 -Frequência de obtenção de colônias a partir da
semeadura de suspensões de conídios do
heterocários 2-3E de I. pseudokoningii, em
diferentes meios seletivos

Diluição da suspensão de conídios	Meio seletivo	Frequência* (x 10 ⁻⁵)
10 ⁻¹	MM	0,0
10 ⁻²	MM	0,0
10 ⁻¹	MM + leu + arg	5,4
10 ⁻²	MM + leu + arg	0,1
10 ⁻¹	MM + leu + rib	0,0
10 ⁻²	MM + leu + rib	0,0
10 ⁻¹	MM + tio + arg	3,2
10 ⁻²	MM + tio + arg	0,0
10 ⁻¹	MM + tio + ribo	2,1
10 ⁻²	MM + tio + ribo	0,0
Média		1,0 ± 1,8

- Com exceção de três colônias amarelas obtidas em MM +
tio + arg e MM + tio + rib, todas as demais são
de coloração verde

* Médias obtidas em duas placas

nos diversos heterocários, principalmente com relação à frequência de ocorrência e tipos obtidos (prototróficos/auxotróficos, estáveis/instáveis). Enquanto no heterocário 1+4 observou-se apenas recombinantes verdes prototróficos estáveis numa frequência de 1/10 das colônias originais e 2/30 do total de colônias monospóricas analisadas (Tabela 37), no heterocário 2+3 observou-se recombinantes auxotróficos (estáveis e instáveis) numa frequência (recombinantes estáveis) de 5/15 e 19/112, respectivamente do total de colônias originais e de monospóricas analisadas (Tabela 38). No heterocário 2+3P detectou-se apenas recombinantes tipo instável (Tabela 39) e em (2+3E), além de recombinantes instáveis, observou-se também recombinantes estáveis para a marca morfológica (whi/ylo leu tio), numa frequência de 5/85 do total de colônias monospóricas analisadas (Tabela 40).

A ocorrência no heterocário 2+3 (Tabela 38) de recombinantes auxotróficos estáveis com marcas auxotróficas de ambos parentais (ylo arg rib leu) ou morfológica e auxotrófica de parentais distintos (whi rib) é uma prova óbvia de troca de material genético entre os dois núcleos parentais do heterocário não deixando dúvidas sobre a ocorrência de processos parassexuais, nesta espécie. A detecção de recombinantes auxotróficos instáveis pode refletir a existência de aneuplóides ou hiperhaplóides ainda em processo de haploidização. No entanto, o fato de segregarem

TABELA 37 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocário 1+4 de *T. pseudokoningii*.

Colônia Original	Meio Seletivo	Número de colônias monospóricas analisadas	Marcas Genéticas*		
			parental 1	parental 4	recombinantes
1	MM	3	(3)	(0)	(0)
2	MM	3	(3)	(0)	(0)
3	MM	3	(3)	(0)	(0)
4	MM	3	(3)	(0)	(0)
5	MM+leu+ade	3	(1)	(0)	verde prototrófico(2)
6	MM+leu+ade	3	(3)	(0)	(0)
7	MM+leu+ribo	3	(3)	(0)	(0)
8	MM+leu+ribo	3	(3)	(0)	(0)
9	MM+arg+ade	3	(3)	(0)	(0)
10	MM+arg+ade	3	(3)	(0)	(0)
Total		30	(28)	(0)	(2)

Frequência de recombinantes = 1/10 (colônias originais) ou 2/30 (total de colônias monospóricas)

* entre parênteses está o número observado

TABELA 38 - Marcas Genéticas das colônias monospóricas do heterocário 2+3 de T. pseudokoningii.

Colônia Original	Meio Seletivo	Número de colônias monospóricas analisadas	Marcas Genéticas (número observado)			
			parental 2	parental 3	recombinante estável	recombinante* instável
1	MM	4	(0)	(0)	arg rib(4)	
2	MM	4	(2)	(2)		
3	MM	8	(3)	(5)		
4	MM	4	(2)	(2)		
5	MM	4	(0)	(2)		whi leu tio arg (2)
6	MM+tio+arg	4	(2)	(1)		ylo arg rib leu (1)
7	MM+tio+arg	9	(0)	(4)	ylo arg rib leu(4)	whi/green leu (1)
8	MM+tio+arg	10	(4)	(5)		whi leu tio rib (1)
9	MM+tio+arg	9	(3)	(4)		whi leu tio rib (2)
10	MM+tio+rib	8	(0)	(4)		whi leu tio arg (4)
11	MM+tio+rib	8	(0)	(2)	whi rib (6)	
12	MM+leu+rib	8	(8)			
13	MM+leu+rib	8	(6)	(1)		ylo/whi arg rib (1)
14	MM+leu+arg	12	(2)	(6)	arg rib (4)	
15	MM+leu+arg	12	(4)	(6)	arg rib (1)	arg rib leu (1)
TOTAL		112	(36)	(44)	(19)	(13)

Frequência de recombinantes estáveis 5/15 (colônias originais) ou 19/112 (total de colônias monospóricas)

* Todos recombinantes instáveis segregaram para um dos tipos parentais, exceto a colônia original 15, em que arg rib leu segregou para o recombinante estável arg rib

TABELA 39 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocáριο 2+3.P de I. pseudokoningii selecionadas em diferentes meios seletivos.

Meio seletivo	Número de colônias analisadas	Marcas genéticas		
		Parental		Recombinantes * instáveis
		2	3	
MM	24	(8)	(14)	whi/ylo leu tio (1) ylo arg rib tio (1)
MM+tio+rib	23	(10)	(9)	whi/ylo leu tio (2) ylo arg (2)
MM+tio+rib	28	(13)	(14)	whi leu tio rib (1)
MM+leu+rib	20	(8)	(10)	whi leu tio rib (1) whi leu (1)
MM+leu+arg	24	(14)	(8)	whi leu tio arg (2)
TOTAL	119	53	55	11

Frequência de recombinantes estáveis = 0

*Todos recombinantes instáveis segregaram para um dos tipos parentais

whi/ylo = colônia branca porém com aspecto (contorno e compactação) do parental 3 amarelo

TABELA 40 - Marcas genéticas das colônias monospóricas do heterocário 2+3.E de I. pseudokoningii selecionadas em diferentes meios seletivo.

Meio seletivo	Número de colônias analisadas	Marcas Genéticas (número observado)			
		Parental	Recombinantes estáveis	Recombinantes instáveis	
		2	3		
MM+tio+arg	26	(20)	(4)		whi leu tio arg (2)
MM+tio+rib	17	(12)	(5)		
MM+tio+rib	42	(32)	(3)	whi/ylo leu tio (5)	whi leu tio arg (2)
TOTAL	85	64	12	5	4

Frequência de recombinantes estáveis = 5/85 (total de colônias monospóricas)

whi/ylo = colônia branca porém com aspecto do parental 3 (contorno e compactação da colônia)

preferencialmente para tipos parentais ao invés de tipos prototróficos ou auxotróficos com apenas uma marca pode sugerir também ocorrência de problemas metodológicos na caracterização auxotrófica, o que tornou necessário a confirmação das marcas por várias recharacterizações. Uma importante observação neste cruzamento 2+3 é a detecção de recombinantes auxotróficos em colônias monospóricas advindas de colônias originais selecionadas em meios que não permitem o crescimento dos mesmos, ou seja, recombinantes arg rib em MM e MM+leu+arg e ylo arg rib leu em MM + tio arg. Isto pode ter ocorrido devido a um crescimento conjunto (na forma heterocariótica ou sintrófica) entre o recombinante e tipos parentais que complementem a sua deficiência auxotrófica, o que também explicaria a larga ocorrência dos tipos parentais ao lado dos recombinantes. Embora *T. pseudokoningii* apresente conídios uninucleados, clamidósporos também podem ocorrer (BISSET, 1984) e conídios binucleados já foram regularmente detectados em colônias prototróficas obtidas em meios seletivos (FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER, 1992), o que pode proporcionar condições para a continuidade do crescimento heterocariótico ou sintrófico. Outra possibilidade é a de que estes recombinantes, durante a primeira fase da seleção quando foram semeados nos meios seletivos, ainda se encontravam num estado de diploidia, portanto, prototróficos, ou de hiperhaploidia de forma a possibilitar complementação das marcas necessárias para o crescimento no respectivo meio seletivo, e quando purificadas em MC produziram colônias

monospóricas recombinantes haplóides auxotróficas, bem como tipos parentais. A constatação de SIVAN et al (1990) de que em certos heterocários de Trichoderma um dos núcleos pode se expressar enquanto o outro permanece quiescente, com mudança ao longo do tempo, também pode contribuir para explicar os resultados aqui obtidos.

O estabelecimento de heterocários em papel de filtro em T. pseudokoningii (Tabela 28) é bastante interessante por se tratar de fungo celulolítico com larga ocorrência em substratos à base de celulose (BISSET, 1984; BERTOLIN, 1987; FURLANETO, 1989; VICENTE, 1989). No entanto, no heterocáριο 2+3P aqui avaliado detectou-se apenas recombinantes instáveis (Tabela 39), o que limita especulação sobre a possibilidade de ocorrência de processos parassexuais em condições naturais nesta espécie, questão esta sempre levantada porém não totalmente resolvida, principalmente em estudos de parassexualidade de fungos fitopatogênicos (AZEVEDO, 1976)

A obtenção de heterocários e seleção de recombinantes utilizando parentais submetidos à irradiação e choque térmico foi efetuada visando obter possíveis informações dos mecanismos envolvidos no surgimento dos recombinantes, principalmente evidências da ocorrência de um processo aqui denominado de transformação intra-heterocariótica em que partes do material genético de um núcleo incorpora-se ao núcleo heterocariótico remanescente, especulação esta já

levantada por STASZ & HARMAN (1990) para Trichoderma. Os dados experimentais aqui obtidos (Tabelas 30, 31, 32, 36 e 40) embora não permitam maiores esclarecimentos, também não discordam desta hipótese. O estabelecimento de heterocários entre conídios irradiados porém previamente germinados talvez possa ser mais útil neste sentido, procedimento este semelhante à técnica de fusão de protoplasto utilizando doador-morto (FERENCZY, 1981; HOPWOOD & WRIGHT, 1981; FRIGO, 1983), que apesar de utilizada para obtenção de recombinantes, é pouco explorada na elucidação dos eventos recombinacionais da parassexualidade dos fungos.

A estimativa da frequência geral de recombinantes estáveis em heterocários normais de T. pseudokoningii, obtida pelo produto entre a frequência de colônias em MM e MMS com a frequência de recombinantes nas colônias monospóricas, variou de $4,9 \cdot 10^{-6}$ para o heterocáριο 1+4 a $9,6 \cdot 10^{-6}$ para o heterocáριο 2+3, o que é maior do que a frequência de obtenção de diplóides no ciclo parassexual (PONTECORVO, 1956; ROPER, 1966; AZEVEDO, 1972, 1987). Apesar das limitações metodológicas deste tipo de cálculo, já salientado atrás em M. anisopliae, a estimativa aqui obtida para T. pseudokoningii deve refletir melhor o que está acontecendo em termos de recombinações por paramiose, uma vez que este fungo apresenta vantagens sobre aquele, podendo mesmo ser considerado como um organismo ideal para este tipo de estudo, principalmente por apresentar crescimento rápido, boa esporulação e marcadores

morfológicos e auxotróficos bem característicos.

4 2.2. Seleção de recombinantes utilizando método de enriquecimento por filtração

A realização desta metodologia no heterocário 2+3 de I. pseudokoningii, proporcionou uma taxa de enriquecimento (tE) de 10^3 (Tabela 41) e possibilitou a obtenção de recombinantes com marcas auxotróficas de ambos parentais ($Raux^2$), todos do tipo whi leu tio rib, numa frequência (f_{Raux^2}) de $1,6 \cdot 10^{-2}$ (Tabela 42). A frequência geral de recombinantes haplóides (fRh) em I. pseudokoningii, deduzida por este método, foi de $2,8 \cdot 10^{-5}$ (Tabela 42), o que é bastante similar ao estimado pelo método de semeadura em meios seletivos.

Este tipo de seleção com enriquecimento por filtração apresenta alguns aspectos bastante positivos nos estudos de paramiose, pois: i) proporciona recombinantes com marcas auxotróficas de ambos parentais só possíveis de serem surgidos por recombinação e não por reversão de marcas; ii) possibilita eliminar as colônias prototróficas ou sintróficas derivadas de conídios binucleados e/ou de clamidósporos; iii) possibilita estimar a frequência de recombinantes com facilidade; iv) pode ser empregado para obtenção de linhagens mestras com marcas

TABELA 41 - Número de conídios inicial (nC_i), final (nC_f) e taxa de enriquecimento (tE) para obtenção de recombinantes com marcas auxotróficas de ambos parentais - Heterocário 2+3 de I. pseudokoningii.

Parâmetro*	Valor estimado
nC_i	$5 \cdot 10^9$
nC_f	$5 \cdot 10^6$
tE	10^3

* nC_i - obtido pela contagem em câmara de Neubauer

nC_f - obtido por semeadura e contagem das colônias em MC+ade

tE - obtido pela razão entre nC_i / nC_f

TABELA 42 - Número de colônias parentais e recombinantes obtidos após enriquecimento por filtração ($tE = 10^3$) - Heterocário 2+3 de I. pseudokoningii.

Repetição	nº de colônias analisadas	Marcas Genéticas		
		Parental		Recombinantes
		2	3	
I	136	108	22	whi leu tio rib (6)
II	225	101	114	0
Total	361	208	136	6

$$f_f Raux^2 = 6/361 = 1,6 \cdot 10^{-2}$$

$$fRh = (f_f Raux^2) / (tE \cdot K), \text{ considerando } K = 9/16$$

$$fRh = 2,8 \cdot 10^{-5}$$

em todos os cromossomos e assim facilitar o mapeamento dos genes envolvidos. Por ser relativamente simples, este método pode ser facilmente empregado para outras espécies fúngicas como um teste de verificação da ocorrência de paramiose, mesmo naquelas onde ocorre formação de diplóides estáveis pelo ciclo parassexual.

4.2.3. Análise do grau de ploidia de I. pseudokoningii pelo crescimento em meio contendo Benomil

Um recombinante verde prototrófico e um auxotrófico com marcas de ambos parentais foram avaliados com relação à produção de setores coloniais em MC contendo diferentes concentrações de Benomil, com e sem Desoxicolato de sódio. I. pseudokoningii demonstrou ser bastante sensível ao Benomil, apresentando inibição completa de crescimento em MC contendo 1,0 ug/ml desta droga, sendo que em MC contendo também Desoxicolato de sódio este efeito foi menos acentuado (Tabela 43). Observou-se uma colônia com crescimento significativamente maior que as demais, o que pode representar possível mutante resistente ao fungicida, uma vez que não apresentou características típicas de setor segregante haplóide e também pelo fato de ter sido verificado num recombinante com três marcas auxotróficas, o qual já deve se encontrar em estado de haploidia. Entretanto, semelhante à

TABELA 43- Tamanho da colônia (mm)* de recombinantes prototrófico e auxotrófico de *T. pseudokoningii* em MC + Benlate (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ug/ml) e MC + Desoxicolato de sódio (0.3%) + Benlate (0,5; 1,0 ug/ml) após 5 e 9 dias de crescimento

Linhagem	Repetição	Número de dias	MC+Ben				MC+DesNa+Ben		
			0,5	1,0	2,0	4,0	0,5	1,0	
Tp (1-4)1 verde proto- trófico	I	5	0,0	0,0	0,0	0,0	6,5	1,0	
		9	3,0	0,0	0,0	0,0	11,5	3,0	
	II	5	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5	0,0	
		9	0,0	0,0	0,0	0,0	13,0	0,0	
	III	5					7,0	2,0	
		9					15,0	3,0	
	IV	5					5,0	0,0	
		9					11,5	0,0	
	Tp (2-3)1 ylo arg rib leu	I	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
			9	3,0	0,0	0,0	0,0	7,0	0,0
		II	5	22,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
			9	75,0	0,0	0,0	0,0	7,5	0,0
III		5					0,0	0,0	
		9					7,5	0,0	
IV		5					0,0	0,0	
		9					9,0	0,0	

Colônia assinalada em negrito representa possível setor ou mutante resistente ao Benlate

* Média entre o maior e menor diâmetro

M. anisopliae, não se pode descartar totalmente a hipótese destes recombinantes estarem se apresentando na forma aneuplóide ou hiperhaplóide relativamente estáveis. Técnicas recentes de obtenção de cariótipos por eletroforese em campo pulsado tem demonstrado que o conjunto cromossômico de uma determinada espécie fúngica não é tão estático quanto inicialmente se pensou, mas sim polimórfico, com ocorrência de variações em tamanho e até mesmo número (MCDONALD & MARTINEZ, 1991; SKINNER et al., 1991), como a presença de cromossomos supra-numerários tipo B (MIAO et al., 1991)

4.3. Análise genética dos recombinantes

A análise genética dos recombinantes obtidos por paramiose para inferências sobre número de cromossomos e mapeamento dos genes, embora possível, apresenta ainda algumas limitações devido principalmente às dificuldades na determinação das frequências dos diversos tipos de recombinantes possíveis. Recombinantes originados em uma fase inicial do crescimento heterocariótico poderão apresentar maiores frequências que os originados mais tardiamente, devido a uma maior multiplicação por clonagem dos primeiros. Esta dificuldade pode ser em parte contornada, fazendo-se uma análise conjunta de todos recombinantes obtidos em uma mesma combinação heterocariótica, nas diversas repetições e métodos

de seleção. Realizando este tipo de análise com os recombinantes estáveis dos heterocários 2+3 e 2+3E de I. pseudokoningii, obtidos em meios seletivos e por enriquecimento por filtração, pode-se propor um conjunto cromossômico com pelo menos cinco grupos de ligação (Tabela 44), que evidentemente necessita ainda de maiores dados para confirmações. Os dados aqui obtidos não apontam para ligação entre leu-arg como sugerem FURLANETO & PIZZIRANI-KLEINER (1992), mas sim entre whi-arg. Com relação à M. anisopliae, este tipo de análise não foi possível ser realizada devido à baixa variação nos tipos recombinantes obtidos, os quais eram principalmente prototróficos e auxotróficos com somente uma marca (Tabelas 15, 16 e 17).

4.4. Processos parassexuais de recombinação (PPR) envolvidos em M. anisopliae e I. pseudokoningii

M. anisopliae e I. pseudokoningii, espécies fúngicas imperfeitas porém não diretamente relacionadas, apresentam um sistema de recombinação parassexual claramente detectável quando se obtém heterocários entre linhagens parentais com marcadores genéticos e condições seletivas apropriadas. As evidências experimentais indicam que o PPR envolvido em ambas espécies difere do ciclo parassexual típico observado em

TABELA 44- Análise genética conjunta dos recombinantes estáveis obtidos nos heterocários 2+3 e 2+3E (ylo arg rib + whi leu tio) de I. pseudokoningii e possível localização dos genes nos grupos de ligação.

Mapeamento dos genes (considerando n>5)			
Recombinantes	Frequência relativa	Parental	
		2	3
arg rib	+++	___arg___	(1) ___whi___
whi rib	++	___ylo___	(2) _____
whi/ylo leu tio	++	_____	(3) ___leu___
ylo arg rib leu	+	_____	(4) ___tio___
whi leu tio rib	+	___rib___	(5) _____

+ a +++ representa frequência de baixa a alta

A nidulans e diversos outros fungos, principalmente com relação à ocorrência e estabilidade de diplóides, bem como à frequência de surgimento de recombinantes. A parameiose, por envolver cariogamia instantaneamente seguida de haploidização por aneuploidias com ocorrência de permutas cromossômicas (BONATELLI JR et al., 1983), parece explicar melhor os dados obtidos, sendo que sua ocorrência já foi investigada e admitida tanto para M. anisopliae (SILVEIRA & AZEVEDO, 1987; BAGALHI, 1987; COSTA, 1989; VALADARES, 1989; VEGA, 1990; BAGALHI et al., 1991) como para T. pseudokoningii (FURLANETO, 1989; FURLANETO et al., 1992)

Outra possibilidade, já mencionada por STASZ & HARMAN (1990) e não discordante com os dados experimentais aqui obtidos, é do surgimento de recombinantes sem formação de diplóides por fusão nuclear, num sistema que pode ser denominado de transformação intra-heterocariótica, onde apenas cromossomos ou fragmentos de DNA de um dos núcleos se funde e sofre recombinação com o outro núcleo do heterocário. Suporta esta hipótese o fato de ser o estado haplóide o grau de ploidia mais estável na maioria dos fungos e também a observação de que eventos de fusão nuclear em certos grupos de fungos parecem ser particularmente evitados, mesmo em situações onde núcleos geneticamente diferentes ocorrem lado a lado, como na fase dicariótica de Ascomicetos e Basidiomicetos (ALEXOPOULOS et al. 1979; FINCHAM et al. 1979). O surgimento de eventos de fusão nuclear no processo evolutivo da reprodução

sexuada, segundo HICKEY & ROSE (1988)¹ citados por HURST (1991), pode ter sido induzido pela presença de elementos genéticos parasitas ("selfish genetic element"), os quais teriam assim maiores chances de transmissão. Interessante observar que dentre os eucariotos, os fungos são organismos que possuem os menores genomas, com muito pouco DNA repetitivo, sendo que em certos grupos (Ascomycetos com fase dicariótica) já foi inclusive demonstrado a ocorrência de mecanismos (recombinação pré-meiótica e mutação de ponto repetida-induzida, RIP) que atuam no sentido de eliminar ou "limpar" o genoma de sequências repetidas e/ou parasitas (FINCHAM, 1989; SELKER, 1990). Esta tendência no sentido da não-fusão nuclear poderia propiciar condições para que outros processos de recombinação independentes de fusão, como a transformação, ocorresse, principalmente nos fungos que apresentam fase heterocariótica mas que não se reproduzem sexualmente, ou o fazem em condições muito restritivas. A transformação intra-heterocariótica, além de possibilitar recombinação, assegura a identidade genética da espécie, uma vez que a formação de heterocários normalmente só ocorre entre indivíduos geneticamente relacionados.

¹HICKEY, D.H. & ROSE, M.R. In: The Evolution of Sex (eds. MICHOD, R.E. & LEVIN, B.R.) 161-175 (Sinauer, Sunderland, Masschusetts, 1988)

Outro tipo de transmissão de material genético intra-heterocariótico, também independente de fusão, foi recentemente observado em Neurospora crassa por KINSEY (1990). Este autor observou neste fungo filamentoso, tipicamente heterotálico com reprodução sexuada porém sem ciclo parassexual, que certos fragmentos de DNA tipo transposons ("LINE-like element") presentes em um dos núcleos podem ser rapidamente transmitidos a um outro núcleo heterocariótico, onde estava inicialmente ausente, por processos de transposição, com possíveis envolvimento de intermediários de RNA e cDNA citoplasmático. Estes fatos portanto, parecem reforçar a hipótese de que nos fungos de uma maneira geral, os sistemas de amplificação da variabilidade genética são mais amplos e flexíveis, não dependendo exclusivamente da reprodução sexuada e ciclo parassexual.

4.5. Preservação e estabilidade genética de M. anisopliae e T. pseudokoningsii

A viabilidade e estabilidade genética de linhagens selvagens e mutantes de M. anisopliae mantidas por vários métodos de preservação comumente acessíveis em nossos laboratórios foram avaliadas no período de 4-5 anos de manutenção. Melhores resultados de viabilidade foram obtidos nos métodos: i) blocos de cultura em água (CASTELLANI) e ii)

tubos inclinados recobertos com óleo mineral, onde a recuperação de colônias foi positiva após 48 meses de preservação; menores viabilidade foram observadas em sílica gel e solo, onde após 5 meses de preservação não mais se obteve colônias viáveis; em tubos inclinados mantidos à temperatura ambiente, pode-se recuperar colônias em até 12 meses, porém com baixa viabilidade (Figura 1). A baixa viabilidade aqui observada em sílica gel provavelmente está relacionada ao tipo de sílica empregada, a qual apresentava cristais com granulações irregulares e com tamanho maior do que o preconizado (malha 6-12) neste tipo de experimento (BELL & HAMALLE, 1974; SMITH & ONIONS, 1983).

Reversões de marcas auxotróficas e morfológicas foram observadas em 28% do total de marcas dos mutantes preservados em água por 48 meses (Tabela 45) o que indica ocorrência de instabilidade genética nestas linhagens. Esta instabilidade genética pode não estar necessariamente relacionada ao método de preservação em sílica, como indica alguns trabalhos (SMITH & ONIONS, 1983), uma vez que foi observada apenas nos mutantes de E9 e RJ mas não em E6. Possíveis ocorrências de transposons, micovírus e rearranjos cromossômicos parassexuais podem estar contribuindo para esta alta taxa de reversão de marcas genéticas. O fato destas marcas terem sido obtidas por mutação induzida com luz UV pode também fazer com que sejam mais susceptíveis de serem modificadas e revertidas.

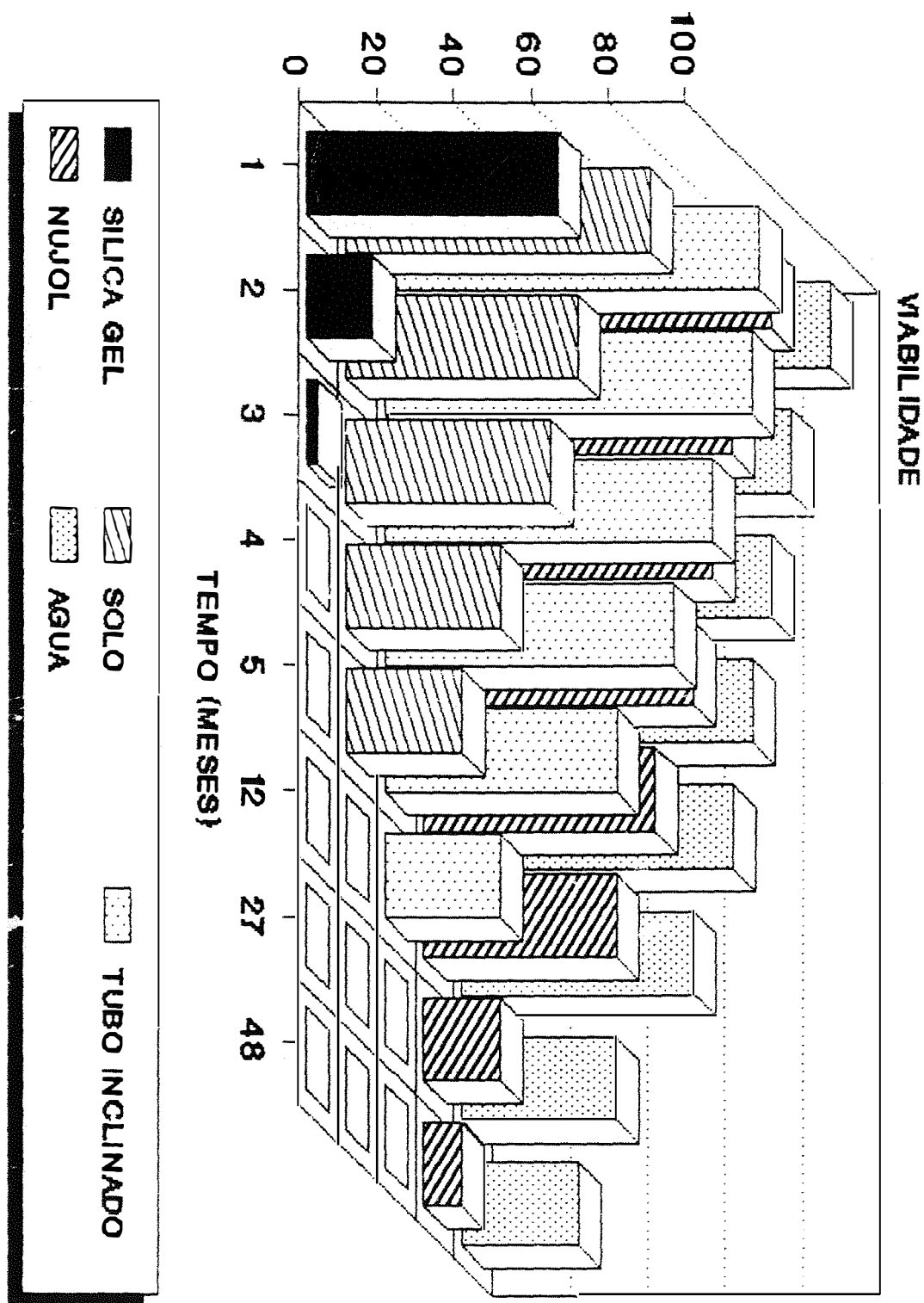


FIGURA 1 - Viabilidade de linhagens de *M. anisopliae* em vários métodos de preservação

TABELA 45 - Caracterização morfológica e auxotrófica das linhagens mutantes de M. anisopliae após preservação por 45 - 48 meses em água (método de CASTELLANI)

Linhagem	Marcas Genéticas		
(nº protocolar)			
E6-1	vio2	ade5	pro11
E6-2	vio2	ade5	met17
E6-3	vio2	ade5	met22
E6-5	vio2	lis6	bio1
E6-7	vio9	met9	bio9
E6-8	ylo8	pir8	lis8
E9-11	(met1)*	(lis1)*	
E9-12	met1	lis3	
E9-13	ylo1	pir6	(met1)*
E9-17	ylo1	leu6	(pro1)*
E9-19	(ylo1)**	leu6	(rib8)*
E9-20	ylo1	(leu6)*	ade9
E9-23	ylo2	lis3	met14
RJ-31	vio1	lis1	(bio22)**
RJ-32	(vio1)**	lis3	met15

* Marcas auxotróficas que foram perdidas

** Marcas morfológicas que apresentaram setores tipo verde selvagem

A viabilidade e estabilidade genética de linhagens mutantes e recombinantes de *T. pseudokoningii* mantidas em água (método CASTELLANI) foram também avaliadas por um período de 12 meses de preservação, onde observou-se uma completa recuperação de colônias, sem ocorrência de perdas de marcas auxotróficas ou morfológicas neste período (Tabela 46).

Utilizando estes métodos simples de preservação, em especial o de CASTELLANI, tem sido possível manter uma coleção de linhagens, principalmente de mutantes e recombinantes de *M. anisopliae* (Tabela 47) e *T. pseudokoningii* (Tabela 48), as quais poderão ser útil na continuidade dos estudos de genética e melhoramento destas espécies.

TABELA 46 - Recuperação e caracterização morfológica e auxotrófica de mutantes e recombinantes de T. pseudokoningii após preservação por 4 e 12 meses em água (Método de Castellani)

Linhagens	Recuperação		Marcas Genéticas

	4 meses	12 meses	
Tp1	+	+	whi4 leu1 arg1
Tp2	+	+	whi4 leu1 bio1
Tp3	+	+	ylo5 rib1 arg2
Tp4	+	+	ylo5 rib1 ade5
Tp5	+	+	ylo5 leu2 lisi
Tp6	+	+	arg1 rib2
Tp7	+	+	nic1 met3
Tp23.1	+	+	ylo5 arg2 rib1 leu1
Tp23.5	+	+	whi4 rib1
Tp23.9	+	+	arg2 rib1

+ = Crescimento

- = Não crescimento

TABELA 47 - Coleção de linhagens selvagens, mutantes e recombinantes de M. anisopliae

1. LINHAGENS SELVAGENS

E6

E9 - Ambas isoladas de insetos adultos de Deois flavopicta, no estado do Espírito Santo.

2. LINHAGENS MUTANTES

Nº protocolar	Marcas genéticas	Obtidas por:
E6-1	vio2 ade5 pro11	Bagalhi (1987)
E6-2	vio2 ade5 met17	"
E6-3	vio2 ade5 met22	"
E6-5	vio2 lis6 bio1	"
E6-7	vio9 met9 bio9	Silveira (1983)
E6-8	ylo8 pir8 lis2	"
E9-11	met1 lis1	Bagalhi (1987)
E9-12	met1 lis3	"
E9-13	ylo1 met1 pir6	"
E9-17	ylo1 leu6 pro1	"
E9-19	ylo1 leu6 rib8	"
E9-20	ylo1 leu6 ade9	"
E9-23	ylo2 lis3 met14	"
RJ-31	vio1 lis3 bio22	"
RJ-32	vio1 lis3 met15	"

3. RECOMBINANTES E6-E9

B20.1	ylo prototrófico	(D4)	Bagalhi (1987)
B20.3	" "	(D6)	"
B20.4	verde prototrófico	(D8)	"
B20.6	ylo prototrófico	(D12)	"
B20.9	" "	(D15)	"
B20.C1	Composto híbrido E6-E9		"

(reisolado de Chalcedermus bimaculatus)

TABELA 48 - Coleção de linhagens selvagens e mutantes de
T. pseudokoningii.

1. LINHAGENS MUTANTES

Nº protocolar	Marcas genéticas	Obtidas por:
Tp-1	whi4 leu1 arg1	Furlaneto (1989)
Tp-2	whi4 leu1 tio1	"
Tp-3	ylo5 rib1 arg2	"
Tp-4	ylo5 rib1 ade5	"
Tp-5	ylo5 leu2 lisi	"
Tp-6	arg1 rib2	"
Tp-7	nic1 met3	"
Tp-8	nic1 met3 ylo6	Bagagli (1992)

2. RECOMBINANTES Tp2 - Tp3

Tp23.1	ylo5 arg2 rib1 leu1	Bagagli (1992)
Tp23.2	ylo5 arg2 rib1 leu1	"
Tp23.3	ylo5 arg2 rib1 leu1	"
Tp23.4	ylo5 arg2 rib1 leu1	"
Tp23.5	whi4 rib1	"
Tp23.6	whi4 rib1	"
Tp23.7	arg2 rib1	"
Tp23.8	arg2 rib1	"
Tp23.9	arg2 rib1	"
Tp23.10	arg2 rib1	"
Tp23.11	arg2 rib1	"
Tp23.12	arg2 rib1	"
Tp23.13	arg2 rib1	"
Tp23.14	arg2 rib1	"
Tp23.15	whi4 leu1 tio1 rib1	"

3. RECOMBINANTES Tp1-Tp4

Tp14.1	prototrófico verde	Bagagli (1992)
Tp14.2	"	"

5 - CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

- a - Recombinantes haplóides e/ou hiperhaplóides podem ser detectados diretamente dos heterocários em M. anisoeliae e T. pseudokoningsii;
- b - A obtenção e estimativa da frequência dos recombinantes pode ser realizada por semeadura em meios seletivos e por enriquecimento por filtração;
- c - A frequência de surgimento destes recombinantes é maior do que a observada no ciclo parassexual típico;
- d - O mecanismo responsável no surgimento dos recombinantes deve ser a parameiose, embora outros processos como a transformação intra-heterocariótica possa também estar ocorrendo;

- e - A aplicação de compostos híbridos seguida de reisolamento fúngico dos insetos infectados pode ser uma boa alternativa no melhoramento genético de M. anisopliae para o controle biológico;
- f - O método de preservação em água (método de CASTELLANI) possibilita a manutenção de linhagens selvagens, mutantes e recombinantes de M. anisopliae e L. pseudokoningii, com viabilidade por vários anos, embora proporcione a ocorrência de instabilidade genética em certas linhagens.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, O.C.; VALARINI, P.J.; BASTOS CRUZ, B.P.; OLIVEIRA, D.A.; GABRIEL, D. Viabilidade e patogenicidade do fungo Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin, em função do período e condições de armazenamento. Arg Inst Biol, São Paulo, 50(1/4):57-63, 1983.
- AL-AIDROSS, K. Demonstration of parasexual cycle in the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. Can J Genet Cytol., 22: 309-14, 1980.
- ALEXOPOULOS, C.J. & MIMS, C.W. Introductory mycology. New York, John Wiley & Sons, 1979. 632p
- ALVES, S.B.; RISCO, S.H.; SILVEIRA NETO, S.; MACHADO NETO, R. Pathogenicity of nine isolates of Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. to Diatraea saccharalis (Fabr) Z. Angew. Ent., 92: 403-6, 1984.

ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M.L.; GOMEZ, D.R.S.
Separação de isolados de Metarhizium anisopliae (Metsch.)
Sorokin, através da análise fenética. Anais Soc. Ent. Bras.,
15 (supl.): 81-92, 1986.

AQUINO, M.L.N.; CAVALCANTI, A.L.B.; SENA, R.C.; QUEIROZ, G.F.
Nova tecnologia de multiplicação do fungo Metarhizium
anisopliae. Boletim Técnico da CODECAP, Recife, 4: 1-31,
1975.

AZEVEDO, J.L. O ciclo parassexual em fungos. Rev. Microbiol.,
3: 157-68, 1972.

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

AZEVEDO, J.L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA,
S.O.P., ed. Genética molecular e de Microrganismos. São
Paulo, Editora Manole Ltda, 1987. p.393-407.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de genética.
São Paulo, EDUSP, 1973. 288P.

BAGALHI, E. Parameiose em Metarhizium anisopliae (Metsch.)
Sorokin. Piracicaba, 1987. 124p. (Tese Mestrado - Escola
Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de
São Paulo).

- BAGALHI, E. & AZEVEDO, J.L. Parameiose e melhoramento genético do Metarhizium anisopliae usado no controle biológico de insetos. Congr. Latino-Americano Biotecnologia, I, Tucuman, Argentina, 1987, Resumos. Tucuman, 1987 p.8.
- BAGAGLI, E.; VALADARES, M.C.C.; AZEVEDO, J.L. Parameiosis in the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. Rev. Bras. Genet., 14: 261-71, 1990.
- BALL, C. & HAMLIN, P.F. Genetic recombination studies with Cephalosporium acremonium related to the production of the industrially important antibiotic Cephalosporin C. Rev. Bras. Genet., 5: 1-13, 1982.
- BALLANCE, J.; BOXTON, F.P.; TURNER, G. Transformation of Aspergillus nidulans by the orotidine-5-phosphate decarboxylase gene of Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-9, 1983.
- BARAK, R. & CHET, I. Serological methods as a tool for characterization of Trichoderma isolated. In: International Trichoderma Gliocladium workshop, 2^o, Salford, 1988. Resumo Salford, University of Salford, 1988 p.3.
- BELL, J.V. & HAMALLE, R.J. Viability and pathogenicity of entomogenous fungi after prolonged storage on silica gel at -20°C. Can. J. Microbiol., 20: 639-42, 1974.

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

BERNIER, L.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K.; CLARKSON, J.M. Transformation of entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae to benomyl resistance. FFMS Microbiol. Letters, 60:261-6, 1989

BERNY, J.F. & HENNEBERT, G.L. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: Effects of protectants and cooling rates. Mycologia, 83(6):805-15, 1991.

BERTOLIN, A.O. Isolamento e biologia de novos fungos celulolíticos. Piracicaba, 1987. 63p. (Tese Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo).

BETINA, V. & SPISIANKOVA, J. Suppression of photo-induced sporulation in Trichoderma viride by inhibitors. Folia Microbiol., 21: 362-70, 1976.

BISSET, J.A. Revision of the genus Trichoderma. Can. J. Bot., 62: 924-31, 1984.

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

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

BOSMANS, J. Ten years lyophilization of pathogenic fungi Mycopath. Mycol. Appl., 53:13-23, 1974.

BUNSE, T. & STEIGLEDER, G.K. The preservation of fungal cultures by lyophilization. Mycoses, 34 (3/4):173-6, 1991.

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

BURGES, L.W.; NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. Stability of morphological characters of Fusarium nygamai. Mycologia, 83: 480-2, 1989.

BUTTERFIELD, W.; JONG, S.C.; ALEXANDER, M.T. Preservation of living fungi pathogenic for man and animals. Can. J. Microbiol., 20:1665-73, 1974.

- BUXTON, E.W. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of Fusarium oxysporum. J. gen. Microbiol., 15: 133-9, 1956.
- BUXTON, E.W. Parasexual recombination in the banana wilt Fusarium. Trans. Br. Mycol. Soc., 45: 274-9, 1962.
- CALAM, C.T.; DAGLISH, L.B.; GAITSKELL, W.S. Hibridization experiments with Penicillium patulum and Fusarium moniliforme. in: VANEK, Z.; HOSTAKEL, Z.; CUDIN, J. eds. Genetic of Industrial Microorganisms Amsterdan, Elsevier, 1973, v.1., p.265-82.
- CARMICHAEL, J.W. Viaility of mould cultures stored at -20°C. Mycologia, 54: 432-6, 1962.
- CARVALHO, C.M.V. Conidiação, obtenção de mutantes, heterocariose e atividade celulolítica na linhagem selvagem Trichoderma sp. Belo Horizonte, 1989, 141p. (Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais).
- CASE, M.E.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S.R.; GILES, N.H. Efficient transformation of Neurospora crassa by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 76: 5259-63, 1979.

- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. J. Trop. Med. & Hyg., 24: 270-6, 1939
- CASTELLANI, A. - Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researchs. J. Trop. Med. & Hyg., 70: 181-4, 1967.
- CHANG, L.T. & TERRY, C.A. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of Aspergillus. Appl. Microbiol., 25: 890-2, 1973.
- COHEN, G.; SHIFFMAN, D.; MEVARECH, M.; AHARONOWITZ, Y. Microbial isopenicillin N synthase genes: structure, function, diversity and evolution. Tibtech., 8: 105-11, 1990.
- COSTA, C.V. Diversidade biológica em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1989. 177p. (Tese - Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).
- DAHMEN, H.; STAUB, T.; SCHWINN, F.J. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. Phytopathology, 73:241-6, 1983

- DANIELSON, R.M. & DAVEY, C.B. Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of Trichoderma in vitro. Soil Biol. Biochem., 5: 517-24, 1973.
- DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of Metarhizium anisopliae conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. J. Invertebr. Pathol., 41: 143-50, 1983a.
- DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of Metarhizium anisopliae conidia: Effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. J. Invertebr. Pathol., 41: 161-70, 1983b.
- DAS, A. & ILCZUK, Z. Spontaneous segregation of a heterozygous diploid of Aspergillus niger Folia Microbiol., 23: 362-5, 1978.
- DOY, Y. Revision of the Hypocreales with cultural observations. III. Three species of the genus Podostromo with Trichoderma or Trichoderma like conidial states. Trans. Mycol. Soc. Jpn., 8: 54-60, 1967.
- FANTINI, A.A. Genetics and antibiotic production of Emericellopsis species. Genetics, 47: 161-77, 1962.

- FARGASOVA, A.; SPICZK, M.; BETINA, V. Morphological and colour mutants of Trichoderma viride: Characterization and complementation. Folia Microbiol., 30: 433-42, 1985.
- FERENCZY, L. Microbial protoplast fusion. In: GIOYER, S.W. & HOPWOOD, D.A. Genetics as a tool in microbiology. Cambridge, Cambridge University, 1981. p.1-35.
- FIGUEIREDO, M.B. & PIMENTEL, C.P.V. Métodos utilizados para conservação de fungos na micoteca da seção de micologia fitopatológica do Instituto Biológico. Summa Phytopath., 1: 299-302, 1975
- FINCHAM, J.R.S. Transformation in fungi. Microbiol. Rev., 53: 1-70, 1989.
- FINCHAM, J.R.S.; DAY, P.R.; RADFORD, A. Fungal genetics. Berkeley and Los Angeles, University of California Press, 1979. 636p.
- FRIGO, S.M. Variabilidade e fusão de protoplastos em Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 119p. (Tese - Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo)

- FURLANETO, M.C. Recombinação genética e produção de celulases em *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*. Piracicaba, 1989. 152p. (Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).
- FURLANETO, M.C. & PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Intraspecific hybridisation of *Trichoderma pseudokoningii* by anastomosis and by protoplast fusion. FEMS Microbiol. letters, **90**: 191-6, 1992.
- GARCIA, A.S.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; PIETRABUENA, A.E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a *Ceratitidis capitata* (Wied.) (Diptera, Tephritidae). Rev. Bras. Ent., **28**: 421-4, 1984.
- GOETTEL, M. S.; ST LEGER, R. J.; BHAIRI, S.; JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. Curr. Genet., **17**: 129-132, 1990.
- GOLDMAN, G.H.; MONTAGU, M.V.; HERRERA-ESTRELLA, A. Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. Curr. Genet., **17**: 169-74, 1990.
- GOOS, R.D.; DAVIS, E.E. & BUTTERFIELD, W. Effect of warming rates on the viability of frozen fungous spores. Mycologia, **59**: 58-66, 1967.

GREENSHPAN, D. & GALUN, E. Complementation in Nonconidiating mutants of Trichoderma. J. Bacteriol., 99: 806-6, 1969.

GREENSHPAN, D. & GALUN, E. Morphogenesis in Trichoderma: autonomous and nonautonomous pigmentation in heterokaryons of color mutants in Trichoderma viride. Am. J. Bot., 58: 287-91, 1971.

GRESSEL, J.B. & HARTMANN, K.M. Morphogenesis in Trichoderma: Action spectrum of photoinduced sporulation. Planta, 79: 271-4, 1968.

GUAGLIUMI, P.; MARQUES, J.E.; VILAS BOAS, M.A. Contribuição ao estudo da cultura de Metarhizium anisopliae no controle da "cigarrinha-da-folha" Mahanarva posticata (Stal nordeste do Brasil) Bolm Tec. CODECAP, (3): 1-52, 1974.

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

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

HASTIE, A.C. & HEALE, J.B. Genetics of Verticillium. Phytopaht. Mediterr., 22: 130-62, 1984.

- HAMLYN, P.F.; BIRKETT, J.A.; PEREZ, G.; PEBERDY, J.F.
Protoplast fusion as a tool for genetic analysis in
Cephalosporium acremonium. J. gen. Microbiol., 131: 2813-23,
1985.
- HERRERA-ESTRELLA, A.; GOLDMAN, G.H.; MONTAGU, M.V. High-
efficiency transformation system for the biocontrol agents,
Trichoderma spp. Mol. microbiol., 4: 839-43, 1990.
- HESELTIME, C.W.; BRADLE, J.; BENJAMIN, C.R. Further
investigations on the preservation of molds. Mycology,
52: 762-74, 1960
- HINNEN, A.; HICKS, J.; FINK, G.R. Transformation of yeast.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75: 1929-33, 1978.
- HINO, M.; NAKAYAMA, O.; TSURUMI, Y.; ADACHI, K.; SHIBATA, T.;
TERANO, H.; KOHSAHA, M.; AOKI, H.; IMANAKA, H. Studies of an
immuno-modulator, swainsonine. I. Enhancement of immune
response by swainsonine in vitro. J. Antibiotic, Tokyo, 38:
926-35, 1985.
- HOPWOOD, D.A. & WRIGHT, H.M. Protoplast fusion in
Streptomyces; fusions involving ultraviolet-irradiated
protoplasts. J. gen. Microbiol., 126: 21-7, 1981.

- HUBER, J. Untersuchungen zur physiologie insektentotender pilze. Arch. M. Krobiol., 29: 257-76, 1958.
- HURST, L. D. Sex, slime and selfish genes. Nature, 354: 23-4, 1991.
- HWANG, S.W.; KWOLEK, W.F.; HAYNES, W.C. Investigation of ultra low temperature for fungal cultures III. Viability and growth rate of mycelial cultures following cryogenic storage. Mycologia, 68:377-87, 1976.
- ITO-KAGAWA, M.; KOYAMA, Y.; KONDO, S. Peptide antibiotic K-582 production in relation to amino acid metabolism in Metarhizium anisopliae. J. Antibiot., Tokyo, 37: 487-93, 1984.
- KINO, T.; INAMURA, N.; NAKAHARA, K.; KIYOTO, S.; GOTO, T.; TERANO, H.; KOHSAKA, M.; AOKI, H. IMANAKA, H. Studies of an immunomodulator, swainsonine. II. Effect of swainsonine on mouse immunodeficient system and experimental murine tumor. J. Antibiot., Tokyo, 38: 936-40, 1985.
- KINSEY, J.A. Tad, a LINE-like transposable element of Neurospora, can transpose between nuclei in heterokaryons. Genetics, 126: 317-23, 1990

- KOVACEVIC, S; WEIGEL, B.J.; TOBIN, M. B.; INGOLIA, T. D.; MILLER, J. R. Cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of Streptomyces clavuligerus gene encoding Deatoxycephalosporin C synthetase. J. Bacteriol., 171: 754-60, 1989.
- LECUONA, R.E.; FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; BLEICHER, E, Patogenicidade de Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok., à broca-do-café, Hypothenemus hampei (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) Anais Soc. Int. Bras., 15(supl.): 21-7, 1986
- LEWIS, JR., W M. Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploid. Am. Nat., 125: 692-701, 1985.
- LEWIS, J.A. & PAPAIVIZAS, D.C. Production of chlamyospores and conidia by Trichoderma spp. in liquid and solid growth media. Soil Biol. Biochem., 15: 351-7, 1983.
- LEWIS, J.A. & PAPAIVIZAS, D.C. Chlamyospore formation by Trichoderma spp. in natural substrates. Can. J. Microbiol., 30: 1-7, 1984.
- LHOAS, P. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in Aspergillus niger. Gen. Res., 10: 45-61, 1967.

- LITTLE, G.N. & GORDON, M.A. Survival of fungus cultures maintained under mineral oil for twelve years. Mycologia, 59:733-6, 1967.
- LORD, J.C. Fungos entomopatogênicos. In: Curso de Controle microbiológico de pragas de caupi e feijão, 3 Goiânia, 1986. Goiânia, EMBRAPA, 1986, 15p.
- LUNA, E.A. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Rio de Janeiro, 1985. 260p. (tese - Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- MAGOON, J. & MESSING-AL-AIDROSS, K. Determination of ploidy of sectors formed by mitotic recombination in *Metarhizium anisopliae*. Trans.Br.Mycol. Soc., 82: 95-8, 1984.
- MAGOON, J. & MESSING-AL-AIDROSS, K. Epistatic relationship and linkage among colour markers of the imperfect entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Genet. Cytol., 28: 96-100, 1986.
- MCDONALD, B.A. & MARTINEZ, J.P. Chromosome length polymorphisms in a *Septoria tritici* population. Curr. Genet., 19: 265-71, 1991.

- MELO, I.S. & HEALE, J.B. Isolamento e regeneração de protoplastos de Trichoderma pseudokoningii, um agente de biocontrole de fitopatógenos. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 12, Araras, 1989. Resumos. Araras, 1989, p.34.
- MESSIAS, C.L. Parassexualidade em Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979. 73p. (Tese - Doutoramento - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the Deuteromycete Metarhizium anisopliae. Trans. Br. Mycol. Soc., 75: 473-7, 1980.
- MEYER, E. The preservation of dermatophytes at sub-freezing temperatures. Mycologia, 4: 664-8, 1955.
- MIAD, V.P.; COVERT, S.F.; VANETTEN, H.D. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. Science, 254: 1773-6, 1991.
- MIGUENS, M.P. Methods of maintaining stock cultures. Mykosen, 28:134-7, 1985.

- MILLER, J.J. & REID, J. Stimulation by light of sporulation in Trichoderma lignorum (Tode) Harz. Can. J. Bot., 39: 259-61, 1961.
- OGAWA, K.; BROWN, J.A.; WOOD, T.M. Intraspecific hybridization of Trichoderma reesei QM 9414 by protoplast fusion using colour mutants. Enzyme Microb. Technol., 9: 229-32, 1987.
- OGAWA, KIHACHIRO, HISTOSHI OHARA, TAKAO KOIDE - Intraspecific hibridização of Trichoderma reesei by protoplast fusion. J. Ferment Bioeng., 67: 207-9, 1989.
- PACCOLLA-MEIRELLES, L. & AZEVEDO, J.L. Parasexuality in Beauveria bassiana. J. Invertebr. Pathol., 57: 172-6, 1991.
- PAPAVIZAS, G.C. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol. Ann Rev Phytopathol., 23: 23-54, 1985.
- PE'ER, S. & CHET, I. Trichoderma protoplast fusion: a tool for improving biocontrol agents. Can. J. Microbiol., 36: 6-9, 1990
- PERKINS, D.D. Preservation of Neurospora stock cultures in anhydrous silica gel. Can. J. Microbiol., 8: 591-4, 1962.

- PONTECORVO, G. - The parasexual cycle in fungi. Ann. Rev. Microbiol., 10: 393-400, 1956.
- PONTECORVO, G. & ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in Aspergillus nidulans. J. gen. Microbiol., 6: vii, 1952.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; FORBES, E. Genetic recombination without sexual reproduction in Aspergillus niger. J. gen. Microbiol., 8: 198-210, 1953.
- RIFAI, M.A. A revision of the genus Trichoderma. Mycol. Papers, 116: 1-56, 1969.
- ROPER, J.A. The parasexual cycle. In: AINSWORTH, G. & SUSSMAN, A.S. , ed. The Fungi. New York, Academic Press, 1966. vol.2, p. 589-617.
- SELKER, E. U. Premeiotic instability of repeated sequences in Neurospora crassa. Ann. Rev. Genet., 24: 579-613, 1990.
- SERMONTI, G. Genetics of antibiotic producing microorganisms. London, Wiley Inter-Science, 1969, 389p.
- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. Virulence of mutants and revertants of Metarhizium anisopliae var. anisopliae towards Rodnius prolixus. J. Invertebr. Pathol., 48: 368-74, 1986.

- SILVEIRA, W.D. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 153p (Tese - Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo)
- SILVEIRA, W.D. AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. Enzyme Microb. Technol., 9: 149-52, 1987.
- SIVAN, A.; HARMAN, G.E.; STASZ, T.E. Transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol., 56: 2404-9, 1990.
- SKINNER, D.Z.; BUDDE, A.D.; LEONG, S.A. Molecular karyotype analysis of fungi. In: BENNETT, J.W. & LASURE, L.L., eds. More gene manipulations in fungi. Orlando Academic Press, Inc., 1991. p.86-103.
- SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. The preservation and maintenance of living fungi. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, 1983, 51p.
- STASZ, T.E.; HARMAN, G.E.; WEEDEN, N.F. Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. Mycologia, 80: 141-50, 1988a.

- STASZ, T.E.; WEEDEN, N.F.; HARMAN, G.E. Methods of isoenzyme electrophoresis for Trichoderma and Giocladium species. Mycologia, 80: 870-4, 1988b.
- STASZ, T.E.; HARMAN, G.; GULLINO, M.L. Limited vegetative compatibility following intra- and interspecific protoplast fusion in Trichoderma. Exp. Mycol., 13: 364-71, 1989a.
- STASZ, T.E.; NIXON, K.; HARMAN, G.; WEEDEN, N.F. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationship in the genus Trichoderma by cladistic analysis of isoenzyme polymorphism. Mycologia, 81: 391-403, 1989b.
- STASZ, T.E. & HARMAN, G.E. Nonparental progeny resulting from protoplast fusion in Trichoderma in the absence of parasexuality. Exp. Mycol., 14: 145-59, 1990.
- TAN, C.S.; STALPERS, J.A.; VAN INGEN, C.W. Freeze-drying of fungal hyphae. Mycologia, 83: 654-7, 1991.
- THOMAS, D.S.; SURYANARAYANA, K.; MANAVATHU, E.K. Asexual reproduction coupled with heterothallism: possible consequences for fungi. J. Theor. Biol., 105: 373-8, 1983.
- TILBURN, J.; SCAZZOCCHIO, C.; TAYLOR, G.G.; ZABICK-ZISSMAN, J.H.; LOCKINGTON, R.A.; DAVIES, R.W. Transformation by integration in Aspergillus nidulans. Gene, 26: 205-21, 1983.

- TINLINE, R.D. Nuclear distribution in Metarhizium anisopliae. Mycologia, 63: 713-21, 1971.
- TINLINE, R.D. & NOVIELLO, C. Heterocaryosis in the entomogenous fungus, Metarhizium anisopliae. Mycologia, 63: 701-12, 1971.
- TOYAMA, H. & TOYAMA, N. Autopolyploid formation of Trichoderma reesei QM9414 by colchicine treatment. J. Ferment. Bioeng., 69: 51-3, 1990.
- TOYAMA, H.; YAMAGUCHI, K.; SHINMYO, A.; OKADA, H. Protoplast fusion of Trichoderma reesei using immature conidia. Applied Environ. Microbiol., 47: 363-8, 1984.
- TREVORS, J.T.; BARKAY, T.; BOURQUIN, A.W. Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review Can. J. Microbiol., 33: 191-8, 1987.
- TUVESON, R.W. & COY, D.O. Heterocaryosis and somatic recombination in Cephalosporium mycophilum. Micologia, 53: 244-53, 1961.
- TYPAS, M. A. Heterokaryon incompatibility and interspecific hybridization between Verticillium albo-atrum and Verticillium dahliae following protoplast fusion and microinjection. J. gen. Microbiol., 129: 3043-56, 1983.

- TYPAS, M.A. & HEALE, J.B. Analysis of ploidy levels in strains of Verticillium using a Coulter Counter. J. gen. Microbiol., 101: 177-80, 1977.
- UPSHALL, A.; GIDDINGS, B.; MORTIMORE, I.D. The use of Benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of Aspergillus nidulans and A. terreus. J. gen. Microbiol., 100: 413-8, 1976.
- VALADARES, M.C.C. Genética e produção de exoenzimas em linhagens de Metarhizium anisopliae var. anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1989, 160p (Tese - Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).
- VEEN, K.H. Recherches sur la maladie, due à Metarhizium anisopliae chez le criquet pèlerin. Meded. LandbHogeschool Wageningen, 68: 1-77, 1968.
- VEGA, M.E. Aspectos genéticos da paramiose via fusão de protoplastos em Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1990, 95p. (Tese - Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).

- VEIGA, A.F.S.L. O fungo entomógeno Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok., como opção para o controle biológico das cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: Cercopidae) no Estado de Pernambuco. Bolm. Grupo Pesq. Control Biol., (1): 3-4, 1979.
- VICENTE, V.S. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos. Piracicaba, 1989. 173p (Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo).
- VILACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de Metarhizium anisopliae Sorok. In: Congresso Latinoamericano de entomologia, 3; Congresso Brasileiro de Entomologia, 4, Bahia, 1978. Resumos Bahia, 1978, p.70.
- WEIGEL, B. J.; BURGETT, S. G.; CHEN, V. J.; SKATRUD, P. L.; FROLIK, C. A.; QUEENER, S. W.; INGOLIA, T. D. Cloning and expression in Escherichia coli of Isopenicillin N synthetase genes from Streptomyces lipmanii and Aspergillus nidulans. J. Bacteriol., 170: 3817-26, 1988.
- WEINMAN-GREENSHPAN, D. & GALUN, E. Complementation in nonconidiating mutants of Trichoderma. J. Bacteriol., 99: 802-6, 1969

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