VARIABILIDADE E ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS
DA PRODUÇÃO DE PROTEASES EM
Metarhizium anisopliae VAR. *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

GILBERTO ÚBIDA LEITE BRAGA
(Biólogo)

Orientador: Prof. Dr. ROLAND VENCovsky

Dissertação apresentada à Es-
cola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Univer-
sidade de São Paulo, para ob-
tenção do título de Mestre em
Agronomia - Área de concentra-
ção: Genética e Melhoramento
de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1992

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

B813v Braga, Gilberto Ubida Leite
Variabilidade e estimativas de parâmetros
genéticos da produção de proteases em *Metarhizium*
anisopliae Var. *anisopliae* (METSCH.) Sorokin. Pi-
racicaba, 1992.
84p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fungo entomopatogênico - Melhoramento 2. Fungo
entomopatogênico - Parâmetro genético 3. Protease -
Produção I. Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz. Piracicaba

CDD 589.2

VARIABILIDADE E ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS
DA PRODUÇÃO DE PROTEASES EM *Metarhizium anisopliae*
var. *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

Gilberto Ubida Leite Braga

Aprovado em: 13.07.92

Comissão Julgadora:

. Prof. Dr. Roland Vencovsky	ESALQ/USP
. Prof. ^a Dr. ^a Aline A. Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
. Prof. Dr. CLáudio Luiz Messias	UNICAMP

Prof. Dr. Roland Vencovsky

Orientador

Aos meus pais

CÉLIA e GILBERTO

*e aos meus avós pela formação moral, espiritual
e cultural que têm me dado durante a vida*

DEDICO.

*À minha querida ANA RACHEL,
pela dedicação e companheirismo*

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho e, em especial, às seguintes pessoas e instituições:

- Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky, pela valiosa orientação durante o desenvolvimento deste trabalho;

- Ao Prof. Dr. Cláudio Luiz Messias, Professor do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela orientação e incentivo constantes durante toda minha vida acadêmica e pelas condições materiais oferecidas para a realização de todas as atividades práticas deste trabalho;

- Aos amigos Ricardo e Juverlandi pela ajuda constante;

- Ao CNPq - Programa de Colaboração Internacional "Blue Ribbon" - Processo nº 910.279.99-0 - UNICAMP;

- À FINEP pelo apoio financeiro dado através do PADCT - processo nº 4286.0448-01 - UNICAMP;

- À CAPES pela bolsa de mestrado concedida;

- À COPERSUCAR, pela cessão dos insetos e dietas utilizadas nos reisolamentos das linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. A produção de enzimas	04
2.1.1. Proteases	05
2.1.2. Lipases e esterases	12
2.1.3. Quitinases	15
2.1.4. Estudo da variabilidade e de corre- lações entre as produções de enzi- mas	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Materiais	22
3.1.1. Linhagens utilizadas	22
3.1.2. Meios de cultura e soluções utili- zados	23
3.1.3. Reagentes e soluções utilizados na determinação da atividade proteolí- tica e elastolítica	25
3.2. Métodos	26
3.2.1. Ensaio biológicos para o reisola- mento das linhagens	26
3.2.2. Reisolamento das linhagens em inse- tos mortos durante os ensaios bio- lógicos	27

	Página
3.2.3. Determinação da viabilidade	28
3.2.4. Determinação da atividade proteolítica contra caseína	28
3.2.5. Determinação da atividade elastolítica	29
3.2.6. Determinação da massa seca produzida	31
3.2.7. Análise estatístico-genética	31
3.2.7.1. Delineamento experimental.	31
3.2.7.2. Análise da variância	32
3.2.7.3. Análise da covariância ...	36
3.2.7.4. Estimativa de parâmetros adicionais	38
3.2.7.5. Estimativa do ganho e da eficiência esperados nas seleções indiretas	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Curvas de degradação de caseína e elastina em função do tempo de incubação	41
4.2. Viabilidade apresentada pelos conídios das linhagens ensaiadas	48
4.3. Médias e dispersões dos caracteres avaliados	49
4.4. Análise da variância	50
4.5. Estimativas das correlações e resultados e eficiência das seleções indiretas	54
5. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
APÊNDICE	66

VARIABILIDADE E ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS
DA PRODUÇÃO DE PROTEASES EM
Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin

Autor: Gilberto Úbida Leite Braga
Orientador: Prof. Dr. Roland Vencovsky

RESUMO

No presente trabalho foram quantificadas as atividades proteolíticas contra caseína e elastina de 16 linhagens de *Metarhizium anisopliae*, crescidas em meio de cultura líquido, tendo a caseína como única fonte de carbono e nitrogênio. Os objetivos foram estimar parâmetros genéticos como a variância genética, a herdabilidade e o ganho esperado na seleção, bem como as correlações entre os caracteres avaliados e a possibilidade de se utilizar a seleção indireta, em programas de melhoramento genético para a espécie.

Os resultados mostraram que existe uma grande variabilidade genotípica em todos os caracteres estudados entre as 16 linhagens, permitindo sua exploração no melhoramento. Os altos coeficientes de herdabilidade permitem que sejam esperados progressos substanciais na seleção fenotípica, seguida de reprodução por via clonal. Os altos coeficientes de correlação observados entre a atividade elastolítica determinada a 280 e 450 nm, mostraram que a elastina

pode ser usada em substituição à elastina "Congo-Red", como substrato para determinação da atividade elastolítica. Os coeficientes de correlação, bem como as estimativas de ganho na seleção indireta, mostraram que podem ser obtidos altos progressos na atividade elastolítica, através da seleção de linhagens com altas atividades proteolíticas contra caseína.

VARIABILITY AND GENETIC PARAMETER ESTIMATES OF THE
PRODUCTION OF PROTEASES IN *Metarhizium anisopliae*
var. *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

Author: Gilberto Ubida Leite Braga

Adviser: Prof. Dr. Roland Vencovsky

SUMMARY

Proteolytic activities of 16 strains of *Metarhizium anisopliae* were measured against casein and elastin. Strains were grown in liquid culture medium, having casein as the only carbon and nitrogen source. The aims were to estimate genetic parameters, such as the genetic variance, the coefficient of heritability and expected gain from selection, as well as correlations between the evaluated characters. The possibility of practicing indirect selection in genetic breeding programs for the species was investigated.

Results showed a large genotypic variability for all of the studied characters among the 16 strains, permitting its exploration in breeding. The high heritability coefficients indicate that substantial progresses can be expected through phenotypic selection followed by clonal reproduction. The observed high correlation coefficients between elastolytic activity determined at 280 and 450 nm showed that elastin can be used in substitution to Congo-Red

elastin as substrate for determination of the elastolytic activity. Correlation coefficients, as well as the estimated gains in indirect selection, showed that high progresses in the elastolytic activity can be obtained through selection of strains with high proteolytic activities against casein.

1. INTRODUÇÃO

O deuteromiceto *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin é reconhecidamente um agente natural controlador de insetos, sendo capaz de infectar e causar morte em, virtualmente, todas as ordens dos mesmos. Por diversos anos, têm sido estudadas quais as possíveis características apresentadas pelo microrganismo entomopatogênico capazes de lhe conferir maior ou menor virulência. Sabe-se que a virulência apresentada pelo fungo é dada graças a uma combinação específica de um grande número de propriedades fisiológicas, dentre as quais está a produção de um conjunto de exoenzimas, com destaque às proteases com ação elastolítica, numa seqüência temporal que, juntamente com o esforço mecânico provocado pelo desenvolvimento da hifa, permite ao fungo atravessar a cutícula do inseto hospedeiro, num dos passos iniciais da infecção.

A relação precisa entre as produções de enzima e a virulência, bem como a importância relativa de cada uma dessas etapas no processo infectivo, ainda não foram de todo estabelecidas, o que pode ser facilmente observado

frente as freqüentes contradições a esse respeito, encontradas na literatura.

Segundo SAMUELS et alii (1989), a identificação das características envolvidas ou responsáveis por conferir patogenicidade em linhagens utilizadas em programas de controle biológico é um pré-requisito essencial para qualquer programa de melhoramento. Como já foi anteriormente mencionado, o grande número de fatores envolvidos, bem como o desconhecimento da importância que cada um possa ter na composição da característica nitidamente quantitativa, a virulência, talvez justifique o pequeno número de trabalhos de melhoramento genético para a espécie que têm sido desenvolvidos.

Um dos primeiros passos a ser dado num programa de melhoramento, sem dúvida, é determinar a variabilidade natural para características de interesse existentes na espécie, que, posteriormente, poderão ser agrupadas em um número restrito de linhagens, através do uso do ciclo parassexual, descrito na espécie por MESSIAS & AZEVEDO (1980), visto que, o microrganismo não possui reprodução sexual conhecida, ou através do processo de fusão de protoplastos, obtido em *M. anisopliae*, primeiramente por SILVEIRA (1983).

Procurando contribuir para futuros programas que visem ao melhoramento genético da característica virulência, o presente trabalho se propõe a fazer um estudo

ao nível populacional das atividades proteolítica e elastolítica apresentadas pelo fungo, com a estimativa de parâmetros como a variância genética, a herdabilidade e o ganho esperado por seleção. Serão também estimadas as correlações existentes entre a produção de proteases e a produção de elastase; a produção de protease e a produção de massa micelial, em meio onde a caseína é a única fonte de carbono e nitrogênio; e a atividade elastolítica determinada por duas técnicas alternativas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A produção de enzimas

A produção de enzimas por fungos filamentosos foi estudada, inicialmente, através do uso de meios gelificados, contendo substratos específicos (GABRIEL, 1968). HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) descreveram a metodologia da utilização de meios gelificados para detecção de exoenzimas como amilases, lipases, proteases, pectinases, ureases, quitinases, RNases e DNases, destacando a facilidade da técnica como maneira rápida de se realizarem triagens, com intuito de se identificarem variantes genéticos para produção enzimática. Este tipo de metodologia, com pequenas modificações, vem sendo ainda utilizado por diversos pesquisadores como SAMUELS et alii (1989) e VALADARES (1989), muito embora, atualmente, seja dada preferência ao uso de técnicas capazes de avaliar, quantitativamente, a atividade de enzimas liberadas pelo fungo em meio de cultura líquido, por apresentarem uma série de vantagens. Entre

estas estão a maior facilidade no isolamento e purificação das enzimas secretadas e facilidade no acompanhamento da produção de uma dada enzima, ao longo do tempo, pela retirada de pequenas alíquotas do meio de cultura (St. LEGER et alii, 1986a).

M. anisopliae produz uma variedade de enzimas extra celulares correspondentes à maioria dos componentes da cutícula de insetos, tais como endoproteases, aminopeptidases, carboxipeptidases, lipases, esterases, quitinases e N-acetilgliccoaminidases, ocorrendo considerável variação no nível de produção de enzimas dentro da espécie, variação esta que pode ser explicada por taxas diferentes de crescimento entre linhagens, bem como por variação na seqüência temporal das produções enzimáticas (St. LEGER, 1986a).

Nos tópicos seguintes desta revisão, serão abordadas com detalhes enzimas proteolíticas, bem como outras enzimas, comumente citadas na literatura, produzidas por *M. anisopliae*, que possuam envolvimento com a entomopatogenicidade apresentada pela espécie.

2.1.1. Proteases

O principal papel das enzimas proteolíticas na natureza é nutricional, servindo para hidrolizar grandes cadeias polipeptídicas em pequenas moléculas que a célula

pode absorver, sendo sabido que também estão envolvidas em outros processos biológicos, como formação e germinação de esporos. Estas enzimas são geralmente sintetizadas junto à membrana celular, numa forma precursora e depois liberadas na forma final ativa por proteólise. A extensão peptídica que é removida nesse processo, parece ser de natureza hidrofóbica, o que facilita a passagem da enzima, através da membrana (SOGART, 1983).

São vários os procedimentos analíticos usados para o ensaio de proteases, refletindo a grande diversidade de natureza nesse grupo de enzimas.

A prática mais utilizada tem sido a utilização das proteínas caseína ou hemoglobina como substratos para se medir a formação de produtos como a tirosina e o triptofano, espectrofotometricamente a 280 nm, ou colorimetricamente, usando a metodologia de FOLIN & CIOCALTEU (1927) (ANSON, 1938; KUNITZ, 1947; MARRINK & GRUBER, 1966; SÖDERHALL & UNESTAM, 1975; PERSSON et alii, 1984). As desvantagens desse procedimento devem-se às dificuldades encontradas na precipitação ou filtração do substrato não digerido, na variação da qualidade dos substratos, na limitação de solubilidade desses substratos perto do seu ponto isoelétrico e na dificuldade de se obter taxas iniciais de reação (SOGART, 1983).

O uso de substratos cromogênicos possibilitou a automatização de ensaios com proteases, sendo diversos os

trabalhos recentes que se utilizam dessa metodologia, do uso de substratos sintéticos ou peptídeos purificados de composição conhecida para estudos de especificidade e cinética (PERSSON et alii, 1984; St. LEGER et alii, 1986b).

Quanto à elastase, especificamente, embora sua determinação possa ser feita por diversos métodos (BANGA et alii, 1959), atualmente tem sido dada preferência à utilização de elastina "Congo-Red", Azoelastina ou Orceina-Elastina, como substratos nos ensaios com elastases, sendo a atividade enzimática calculada através da determinação colorimétrica dos corantes liberados na solução (NAUGHTON & SANGER, 1961; SHOTTON, 1970).

Segundo PERSSON et alii (1984), o uso de substratos como caseína ou "azocoll" é de valor limitado para a investigação da atividade proteolítica em fungos entomopatogênicos, sendo, segundo o autor, preferível o uso de substratos cromogênicos para investigação da atividade proteolítica em fungos patógenos de insetos.

Quanto à regulação na síntese e secreção de proteases, COHEN (1973), trabalhando com *Aspergillus nidulans*, verificou que a síntese e secreção de proteases extracelulares neutras e alcalinas foram reprimidas na presença de fontes de carbono, nitrogênio e enxofre de baixo peso molecular, sendo que as proteases são formadas e liberadas quando o meio for deficiente para qualquer um desses elementos. Foi constatado também que a adição de

proteína ao meio de cultura não estimulou nem a produção de proteases extracelulares, nem o acúmulo de proteases no micélio; ao invés disso, ocorreu uma pequena taxa de redução na produção, como seria de se esperar, se os produtos da hidrólise da proteína fossem direcionados para a repressão da síntese de protease. DRUCKER (1972) detectou o aparecimento de enzimas proteolíticas no meio de cultura, quando *Neurospora crassa* se desenvolvia, tendo como principal fonte de carbono BSA (Bovinoseralbumina); segundo o autor, uma baixa concentração de sacarose (0,1%) no meio foi necessária para o fungo iniciar o desenvolvimento, visto que os conídios não germinavam em meio cuja única fonte de carbono era a BSA; entretanto, altas concentrações de sacarose (0,5 a 2,0%) reprimiam a síntese de proteases.

KUČERA (1980) isolou e estudou as características bioquímicas de duas proteases produzidas por *M. anisopliae* com ação tóxica sobre larvas de *Galleria mellonella*. Essas enzimas foram denominadas pelo autor de P₁ e P₂. St. LEGER et alii (1987) separaram de filtrados de culturas de 5 dias, crescidas em meio básico de sais, contendo 1% de caseína (p/v), três proteases semelhantes à tripsina, uma quimoelastase (Pr₁) (P.I. 10.3, Mr 25000) e uma tripsina (Pr₂) (P.I. 4.42, Mr 28500), que foram purificadas e estudadas. Estudos de inibição mostraram que ambas possuem resíduos de serina e histidina no sítio ativo. Pr₁ mostrou-se mais ativa que Pr₂ ou que enzimas de mamíferos

contra cutícula de gafanhoto, mostrando também atividade contra elastina e uma ampla especificidade primária contra aminoácidos com grupos hidrofóbicos laterais em ésteres sintéticos. Pr2 hidrolizou rapidamente caseína e substratos sintéticos, contendo arginina ou lisina, possuindo pequena ou nenhuma atividade contra cutícula, elastina ou substratos sintéticos para quimiotripsina e elastase. Sítios de inibição específicos confirmaram a similaridade existente entre Pr2 e tripsina. Os dados bioquímicos mostraram que não há correspondência entre as proteases Pr1 e Pr2 e as P1 e P2, citadas anteriormente.

St. LEGER et alii (1988a), estudando a regulação e a produção de enzimas proteolíticas por *M. anisopliae*, verificaram que os níveis de enzimas são aumentados, quando o meio mínimo é suplementado com cutícula de inseto ou outro nutriente insolúvel, como celulose, por exemplo, que foram insuficientes para produzir uma repressão catabólica. A produção de Pr1 e Pr2 foi inibida, quando metabólitos mais prontamente utilizáveis (sacarose a 1%, alanina a 1%, N-acetilglicosamina a 1%, NH_4Cl a 0,2%) foram adicionados ao meio contendo cutícula ou celulose, mostrando que a repressão anula o efeito de indução dos substratos poliméricos. O trabalho mostrou que a síntese de protease pelo fungo ocorre rapidamente (menos que 2 horas), durante a desrepressão de carbono e nitrogênio, no meio de cultura. Ainda, segundo os autores, a síntese rápida de proteases in

vivo só ocorre em tecidos do hospedeiro, onde a concentração de metabólitos, prontamente utilizáveis, é baixa. Este é o caso de cutícula de insetos com componentes altamente insolúveis, até serem solubilizados por enzimas degradadoras de cutículas. Entretanto, a repressão pode ocorrer sempre que os produtos da degradação da cutícula excederem os requisitos nutricionais do fungo. Estudos de inibição conduzidos pelo grupo sugerem que a regulação de proteases não depende inicialmente da síntese de DNA. Entretanto, a inibição pela D-actinomicina e 8-azoguanina implica que a síntese "de novo" do RNA está envolvida na produção de proteases, com o passo operativo na regulação sendo ao nível de transcrição.

St. LEGER et alii (1986c) mostraram que as enzimas degradadoras de cutícula produzidas por *M. anisopliae* têm uma considerável afinidade pela mesma. A ligação da protease com a cutícula resultou numa inativação da atividade enzimática, superior a 70%. Entretanto, toda a atividade enzimática inicial foi recuperada com a adição de tampão fosfato 0,2M, sugerindo que a enzima, ao invés de inativada, estava ionicamente ligada à cutícula. O estudo indicou claramente que a adsorção foi um pré-requisito para a degradação cuticular pela Pr1. A adsorção e, conseqüentemente, a degradação da cutícula foram inibidas pelo bloqueio das cargas negativas dos grupos carboxil existentes sobre a cutícula, com um detergente catiônico. A adsorção, segundo os autores, pode ser um dos mecanismos responsáveis pela

degradação localizada, podendo isso ser benéfico para o fungo, por prevenir a desidratação prematura do hospedeiro.

Estudos conduzidos por St. LEGER et alii (1989) mostraram que a protease Pr1 é a proteína mais produzida, quando *M. anisopliae* produz estruturas infectivas sobre uma superfície artificial, ou *in situ*, durante a penetração, através da cutícula do hospedeiro, sendo, segundo os autores, a habilidade em produzir Pr1, provavelmente, um fator significante na determinação do grau de virulência da linhagem.

St. LEGER et alii (1986b), estudando a ação de enzimas purificadas de filtrados de culturas de *M. anisopliae*, verificaram suas ações isoladamente e em combinações sobre a cutícula de inseto. Este trabalho mostrou que a protease, atuando sozinha, hidrolizou de 25 a 30% (p/p) das proteínas da cutícula, liberando peptídeos, contendo todos os 15 aminoácidos encontrados na mesma. A protease, quando ensaiada conjuntamente com quitinase, provocou um acréscimo de 1,5 vez na liberação de N-acetil- β -glicosamina, sendo que o acréscimo foi de 3,5 vezes, quando o tratamento da cutícula com protease foi anterior ao tratamento com a quitinase. Isso era de se esperar, visto que a quitina, presente na cutícula de insetos, está envolta por uma matriz protéica.

Em trabalho recente, St. LEGER et alii (1991) estudaram a cinética da digestão de cutículas de inseto pela

quimoelastase Pr1, constatando que variações na ligação enzima-substrato determinam a eficiência proteolítica da enzima para diferentes cutículas.

2.1.2. Lipases e esterases

Um grande número de microrganismos é capaz de usar óleos e gorduras como fonte de carbono para se desenvolver. As enzimas responsáveis pelo fracionamento de óleos e gorduras, antes da metabolização dessas substâncias por microrganismos, são as lipases extracelulares (glicerol éster hidrolase, Ec 3.1.1.3), que catalizam a hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos livres, glicerídeos parciais e glicerol. Os substratos naturais para lipases são triglicerídeos com longas cadeias de ácidos graxos. Estes triglicerídeos são insolúveis em água e as lipases são caracterizadas pela habilidade em catalizar rapidamente a hidrólise de ésteres, retidos na interface entre o substrato insolúvel e a fase aquosa, na qual a enzima é solúvel. Isso dificulta os ensaios de atividade e cinética com a enzima, pois torna-se difícil estabelecer qual a concentração efetiva do substrato insolúvel, pois, a princípio, só as moléculas externas das gotículas de óleo são utilizadas pela enzima. Sendo assim, a área superficial do substrato por unidade de volume deve ser utilizada no cálculo da concentração (SOGART, 1983). Ainda, segundo o autor, estudos de regulação têm mostrado que a produção de lipase em culturas submersas

é geralmente suprimida pela presença de monossacarídeos, dissacarídeos e glicerol, no meio de crescimento, sendo que a adição de lipídeos ao meio tem provocado um aumento na produção de lipase por inúmeros microrganismos; entretanto, é necessária a presença de pequenas quantidades de glicose no meio para permitir o início do crescimento micelial. Diversos têm sido os substratos utilizados nos ensaios de lipases, porém os métodos preferíveis usam emulsões de triglicerídeos insolúveis. Os substratos triglicerídicos usados em ensaios com lipases devem ser líquidos, à temperatura de ensaio, pois a hidrólise de triglicerídeos sólidos é muito lenta. O melhor substrato é, provavelmente, a trioleína, mas, devido ao alto preço, não é comumente utilizada. Um substrato conveniente pelo preço e composição é o azeite de oliva que contém 70% de resíduos de oleato. Emulsões estáveis de trioleína ou azeite de oliva podem ser preparadas por agitação mecânica ou ultrassônica vigorosa com adição de um estabilizador como goma arábica, álcool polivinílico ou carboximetilcelulose. O acompanhamento da reação lipolítica é, normalmente, feito pela quantificação dos ácidos graxos liberados e a interrupção, comumente, feita pela adição de um solvente (álcool ou acetona). Os ácidos graxos liberados são titulados, usando-se azul de timol como indicador ou com o monitoramento de um pHgâmetro, até um ponto final pré determinado. O "tributirín" (1,2,3-tributiriglicerol) também vem sendo utilizado

como substrato, por possuir algumas vantagens sobre o azeite de oliva e a trioleína. Este, todavia, não é um bom substrato para algumas lipases microbianas e sua hidrólise pode ser catalizada por esterases que não mostram atividade lipolítica verdadeira. Esses mesmos inconvenientes desaconselham o uso de ésteres solúveis (SOGART, 1983). MOSKOWITZ et alii (1977) mostraram que a lipase de *Mucor miehei* hidrolizou Tween-20, um éster solúvel, mais rapidamente que qualquer outro lipídeo natural estudado pelo grupo. Isto, segundo DEPLOEY et alii (1981), justificaria o uso dessa substância como substrato para verificação da atividade lipolítica que poderia, segundo os autores, não ser detectada, se um lipídeo natural fosse utilizado para esse fim. Além disso, um substrato solúvel em água evitaria possíveis interações entre a lipase e o emulsificador, que poderiam afetar a atividade da enzima.

St. LEGER et alii (1986a) estudaram a produção de lipase por *M. anisopliae*, usando dois substratos, óleo de oliva e "tributirin", sendo que os resultados lançaram dúvidas quanto à eficiência do segundo em ser um bom agente na verificação da atividade enzimática do fungo. O mesmo trabalho mostrou que as esterases, juntamente com as proteases, são as primeiras enzimas a terem suas atividades detectadas (menos que 24 horas); entretanto, atividade lipolítica não foi detectada no meio de cultura, antes de 5 dias.

Sendo a camada lipídica da epicutícula a primeira barreira a ser atravessada durante a infecção fúngica, e sendo esta camada majoritariamente composta por alcanos, torna-se interessante determinar se os mesmos podem ser utilizados como fonte de carbono por *M. anisopliae*. Este estudo foi feito por St. LEGER et alii (1988b). Nele se constatou a capacidade do fungo se desenvolver em meio de cultura, tendo alcanos como única fonte de carbono, estando, portanto, apto a se desenvolver, utilizando somente a camada lipídica da epicutícula como fonte de nutrientes, nos estágios iniciais da infecção.

2.1.3. Quitinases

A hidrólise enzimática completa da quitina em N-acetil-D-glicosamina é realizada por um sistema quitinolítico composto por duas hidrolases que agem sequencialmente. A quitinase: (poli- β -1,4-(2-acetamido-2-deoxi)-D-glicosídeoglicanohidrolase: EN 3.2.1.14) hidrolisa os polímeros de N-acetil-D-glicosamina, incluindo tetrâmetros e, em menor extensão, trímeros. A quitobiase (quitobiose acetadideoxiglicohidrolase: EN 3.2.1.29) hidrolisa quitobiose (o dímero da N-acetil-D-glicosamina) e quitotriose (JEUNIAUX, 1966).

Os métodos utilizados para o ensaio de quitinases podem ser divididos em turbidimétricos, ensaios baseados na determinação de produtos finais e ensaios radioquímicos (STIRLING, 1978). Os métodos viscosimétricos

baseiam-se na quantificação do decréscimo na viscosidade de soluções contendo quitosana, glicol-quitina ou carboximetil quitina, devido à ação de quitinases (TRACEY, 1955; JEUNIAUX, 1966). Os métodos turbidimétricos consistem na medida da variação da turbidez, numa suspensão de quitina coloidal, durante a quitinólise (JEUNIAUX, 1966). As metodologias que se baseiam na medida dos produtos finais têm, como princípio, a determinação da acetilglicosamina liberada, detectada pela técnica descrita por REISSING et alii (1955). Como essa técnica não detecta quitobiase, os ensaios para a determinação da atividade quitinolítica devem ser feitos quando existe quitobiase na mistura da reação em concentrações apropriadas (JEUNIAUX, 1966). Os ensaios radioquímicos envolvem a determinação da radiação contida em oligossacarídeos solubilizados de quitina coloidal marcada com C₁₄ (PEDRAZA-REYES, 1989).

Algumas dificuldades são encontradas na realização de ensaios com quitinases; segundo STIRLING (1978), o fato de a quitina ser insolúvel em soluções aquosas, torna difícil a preparação da mesma em uma forma quimicamente pura, existindo, como consequência, uma variação na estrutura e no estado físico dos substratos, usados em ensaios de quitinases.

As quitinases são amplamente distribuídas na natureza e têm sido detectadas em bactérias, fungos, plantas e animais (STIRLING et alii, 1978).

Diversos são os trabalhos que relatam a presença de quitinases em fungos (TRACEY, 1955; BALASUBRAMANIAN & MANOCHA, 1986). GABRIEL (1968), estudando a produção de enzimas quitinolíticas, determinou uma baixa atividade em *M. anisopliae*. Nesse trabalho, foi utilizada a metodologia de determinação do halo de degradação, produzido por culturas crescidas sobre meio contendo quitina coloidal. St. LEGER et alii (1986a), estudando a produção de enzimas por *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium lecanii* em meio de cultura líquido, contendo cutícula de inseto, verificaram que a produção de quitinases ocorre em níveis baixos até o 3º dia, aumentando rapidamente após isso. Ainda, segundo os autores, existe uma tendência de isolados com alta produção de quitinase também possuírem uma alta produção de β -N-acetilglicosaminidase. Isso, entretanto, não foi comprovado estatisticamente no trabalho. St. LEGER et alii (1986c), pesquisando os mecanismos interativos entre as enzimas de fungos entomopatogênicos e a cutícula de insetos, verificaram a existência de uma ligação iônica, não específica, reversível, entre a enzima N-acetilglicosaminidase e a cutícula, enquanto que a quitinase ligou-se de maneira irreversível à mesma, formando um complexo específico enzima-substrato.

Quanto à regulação gênica da síntese da enzima, STIRLING et alii (1978) relataram do estudo com estreptomicetos, que a atividade do sistema quitinolítico

pode ser induzida pelo crescimento em meio, contendo quitina como única fonte de carbono. SMITH et alii (1983) verificaram que, quando meios de cultura contendo quitina são autoclavados, há o aparecimento de N-acetilglicosamina e de D-glicosamina, que funcionaram como indutores da síntese de quitinase em *B. bassiana*. Os mesmos autores verificaram que a macromolécula insolúvel não funciona como um indutor para a síntese da enzima.

EL-SAYED et alii (1989), estudando a possível associação entre a atividade quitinolítica e a virulência no fungo *Nomura releiyi*, encontraram altos níveis, tanto de exo como de endo-quitinase, em isolados virulentos, sendo que estes níveis de produção não foram encontrados em um isolado não-virulento. Segundo os autores, a maior diferença na atividade quitinolítica entre os isolados ocorreu durante a germinação, quando a atividade da exo-quitinase foi de 10 a 17 vezes maior e a de endo-quitinase de 15 a 18 vezes maior, nos isolados virulentos.

2.1.4. Estudo da variabilidade e das correlações entre as produções de enzimas

Diversos são os trabalhos que se utilizam dos meios descritos por HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) para o estudo da variabilidade na produção de enzimas por *M. anisopliae*. ROSATO et alii (1981) estudaram a produção de

amilase, lipase, quitinase e protease em 11 isolados. Os autores definiram um índice para cálculo da atividade enzimática dado pela relação diâmetro da colônia/diâmetro do halo de degradação. Foi calculado também a correlação entre a origem geográfica das linhagens e a produção enzimática. Entretanto, o número reduzido de linhagens ensaiadas dificultou a interpretação dos resultados. SOSA-GOMES & ALVES (1983) determinaram as atividades amilolítica, lipolítica e proteolítica em 11 isolados, encontrando diferenças significativas para as três características. Os autores verificaram também a existência de uma correlação positiva entre a atividade amilolítica e a proteolítica ($r = 0,65$) e correlações negativas entre a atividade amilolítica e lipolítica ($r = -0,62$) e entre as atividades proteolítica e lipolítica ($r = -0,85$). Nesse mesmo trabalho, não foi determinada uma correlação estatisticamente significativa entre a virulência e a atividade enzimática. LEITE (1987) determinou a variabilidade entre 15 linhagens quanto às atividades amilolítica, proteolítica, lipolítica e quitinolítica, encontrando diferenças significativas para todas elas. O autor confirmou a existência de uma correlação negativa entre a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas e de uma positiva entre proteolíticas e quitinolíticas. Nesse mesmo trabalho, não foi verificada correlação entre atividades de enzimas e virulência. Segundo o autor, o índice de atividade enzimática proposto por ROSATO et alii (1981) e, comumente utili-

zado, não foi um meio seguro para a análise do potencial das linhagens estudadas no trabalho, tendo os autores utilizado a diferença entre os diâmetros como índice de atividade. SAMUELS et alii (1989) estudaram a variabilidade na produção de enzimas extracelulares em 24 isolados selvagens de *Metarhizium*. Os autores verificaram que a menor variação entre os isolados foi para a atividade quitinolítica.

St. LEGER et alii (1986a) determinaram a atividade de diversas enzimas encontradas no filtrado, quando *M. anisopliae* se desenvolvia em meio de cultura líquido. Uma das classes de enzimas ensaiadas foi a de proteases. Sete linhagens tiveram suas atividades determinadas, sendo que a menor atividade proteolítica verificada correspondeu a aproximadamente 50% da maior, evidenciando a variação nos níveis de atividade entre as linhagens.

As divergências quanto à correlação de enzimas ou grupo de enzimas particulares, bem como os trabalhos que não mostram a existência de correlação entre a produção de enzimas e a virulência, poderiam ser justificados por inúmeros motivos: as atividades *in vitro* não estariam sendo determinadas no momento em que são realmente necessárias *in situ*, durante o processo infectivo, bem como o fato de os meios utilizados para essas determinações não repetirem as condições exatas que o fungo encontra no inseto. Não estariam sendo feitos ensaios para enzimas específicas realmente necessárias à virulência; prova disso são os estudos condu-

zidos por St. LEGER et alii (1987, 1988c e 1989) que individualizam a importância da Pr1 dentre o grupo de proteases produzidas pelo fungo. Um outro motivo seria o possível requerimento dessas enzimas em um nível basal baixo, não tendo influência sobre a virulência produções superiores a essa.

Nenhum dos trabalhos consultados chegou a desdobrar a variância fenotípica, não tendo sido, portanto, calculados parâmetros como a variância genética, a herdabilidade ou o ganho por seleção para as enzimas avaliadas nesse experimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Linhagens utilizadas

No presente trabalho, foram utilizadas linhagens de *M. anisopliae*, abaixo relacionadas, selecionadas ao acaso, dentre as que apresentavam boa produção de esporos. As linhagens foram obtidas junto ao banco de germoplasma do laboratório de fungos entomopatogênicos do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP.

Linhagem	Local onde foi isolada
58	Bahia
E9	Espírito Santo
E6	Espírito Santo
157p*	
02	Pará
22	Espírito Santo
P	NC
29	Alagoas
73	França

Linhagem	Local onde foi isolada
20	Bahia
63	Alagoas
CLII	Alagoas
70	França
38	Alagoas
35	Alagoas
SMC	Alagoas

* A linhagem 157p é um diplóide obtido, via ciclo parassexual, através da utilização de dois mutantes originários da linhagem E₉ (MESSIAS & AZEVEDO, 1980).
NC - Origem desconhecida.

3.1.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

a - Meio Mínimo Líquido

(PONTECORVO et alii, 1953)

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

Completou-se o volume para 1000,0 ml com água destilada.

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 0,2 N, antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

b - Meio Mínimo Sólido

Meio Mínimo Líquido, acrescido de 15,0 g de Agar por litro.

c - Meio Mínimo Sólido com Antibiótico

Meio Mínimo Sólido, acrescido de 0,5 mg de estreptomicina por ml de meio. O antibiótico foi adicionado ao meio fundido, antes do uso.

d - Meio para Atividade Proteolítica

Meio Mínimo Líquido, sem glicose, sem NaNO_3 , acrescido de 0,5% (p/v) de caseína (seg. HAMMARSTEN, livre de vitaminas). O meio foi autoclavado como no item 3.1.2.a.

e - Solução Salina 0,85% (p/v)

NaCl 8,5 g

Completou-se o volume para 1000,0 ml com água destilada.

A solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos e conservada a 4°C .

f - Solução de Tween-80 0,1% (v/v)

Tween-80 0,1 ml

Água destilada 99,9 ml

A solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos e conservada a 4°C .

g - Solução de NaOH 2N

Dissolveram-se 80 g em 800 ml de água destilada, completando-se posteriormente o volume para 1000 ml.

**3.1.3. Reagentes e soluções utilizadas na
determinação da atividade proteolítica e
elastolítica**

a - Tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0)

O tampão foi obtido pela mistura de 50 ml de solução Tris(hidroximetil)aminometano 0,2 M (24,2 g em 1000 ml de água destilada) com 26,8 ml de uma solução de HCl 0,2M, completando-se o volume com água destilada para 200 ml.

b - Solução de Caseína 1% (p/v) em tampão

Tris-HCl 0,05M (pH 8,0)

A solução foi obtida dissolvendo-se 1 g de caseína (seg. HAMMARSTEN, livre de vitaminas) em 95 ml do tampão e adicionando-se o tampão até o volume final de 100 ml ser atingido. Tanto o tampão como a solução foram autoclavados a 120°C, por 20 minutos.

c - Suspensão de Elastina-"Congo-Red" (1mg/ml)

A suspensão foi preparada, no momento do uso, pela adição de Elastina "Congo-Red" (Sigma nº de cat. E0502) ao tampão, na concentração acima indicada.

A suspensão foi agitada vigorosamente, imediatamente antes do uso.

**d - Solução de Ácido Tricloroacético
a 10% (p/v)**

A solução foi preparada adicionando-se 100g de Ácido Tricloroacético em 800 ml de água destilada. Após a dissolução, o volume foi completado para 1000 ml.

3.2. Métodos

3.2.1. Ensaios biológicos para o reisolamento das linhagens

Todas as linhagens, antes de terem suas atividades enzimáticas determinadas, foram reisoladas de insetos mortos em laboratório.

Os ensaios foram conduzidos da seguinte maneira: trinta lagartas de *Diatraea saccharalis*, de aproximadamente 1 cm de comprimento, foram colocadas sobre uma placa de Petri, contendo a linhagem esporulada sobre Meio Mínimo Sólido (esta placa foi obtida pela inoculação e incubação a 28°C por 10 dias), e deixadas caminharem sobre a mesma por 10 minutos. Após isso, as lagartas foram transferidas para recipientes plásticos individuais

(Ø 6,0 x 1,5 cm) e mantidas a 28°C com umidade relativa superior a 80%. Os insetos foram alimentados até a morte ou até a fase de pulpa com dieta apropriada, fornecida pelo Centro de Tecnologia da COPERSUCAR.

Diariamente, realizou-se a retirada dos insetos mortos para que deles fossem feitos os reisolamentos.

3.2.2. Reisolamento das linhagens em insetos mortos durante os ensaios biológicos

As lagartas mortas foram desinfectadas superficialmente pela imersão, por 3 minutos, em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (p/v) e lavadas em três passagens por água destilada esterilizada. Após isso, o excesso de umidade superficial foi retirado com papel de filtro esterilizado e as mesmas foram colocadas em placas de Petri com Meio Mínimo Sólido com Antibiótico e incubadas a 28°C, por 7 dias. Decorrido esse período, os esporos coletados nas placas foram repicados em tubos com Meio Mínimo até o momento do uso. Todas as linhagens foram repicadas simultaneamente, tendo portanto, no momento do uso, sofrido o mesmo número de repicagens.

3.2.3. Determinação da viabilidade

Para a condução dos experimentos de determinação das atividades enzimáticas, a viabilidade dos conídios de cada linhagem ensaiada foi obtida pela inoculação de alíquotas de suspensão, contendo 10^7 conídios por ml, em placas de Petri, contendo meio para a determinação da atividade proteolítica, acrescido de 15 g de Agar por litro de meio. Após 14 horas de incubação, observou-se a porcentagem de conídios germinados e não germinados em uma amostra, ao acaso, de 500 conídios.

3.2.4. Determinação da atividade proteolítica contra caseína

A atividade proteolítica foi determinada segundo a metodologia utilizada por SÖDERHAL & UNESTAM (1975), com modificações.

Erlenmeyers de 50 ml, contendo 18 ml de meio para atividade proteolítica, foram inoculados com 2 ml de uma suspensão, contendo 10^7 conídios por ml e incubados à temperatura de 28°C a 150 rpm, por 72 horas (os conídios foram obtidos de colônias com 12 dias de incubação a 28°C crescidas em tubos de ensaio contendo Meio Mínimo Sólido). Decorrido esse período, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel de filtro (Inlab, tipo 10), previamente tarado, a fim de se reter a massa micelial produzida. O filtrado

foi recolhido e mantido congelado a -60°C , até o momento do uso.

Para determinação da atividade enzimática, o filtrado foi descongelado à temperatura ambiente. A seguir, colocou-se 1 ml de filtrado em 1 tubo de ensaio que foi mantido em banho a 30°C , por 5 minutos, ao fim dos quais, adicionou-se ao tubo 1 ml de uma solução de caseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,0) à mesma temperatura. A mistura foi incubada a 30°C , sem agitação, por 15 minutos (tempo esse determinado a partir de uma curva de degradação da caseína, em função do tempo de incubação, realizada previamente com a linhagem E9, Figuras 1 e 2). A reação foi terminada pela adição de 5 ml de ácido tricloroacético 10% (p/v) e as amostras foram deixadas em repouso por 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de centrifugação a 3000 g, por 15 minutos, e posterior filtração em papel de filtro nº 10, a absorbância do sobrenadante foi determinada a 280 nm, a fim de se determinar a quantidade de tirosina e triptofano, solubilizados pelas enzimas protelíticas (KUNITZ, 1947).

Controles, nos quais o ácido tricloroacético foi adicionado ao filtrado, antes de sua incubação com o substrato, foram feitos em paralelo para todos os tratamentos. Como branco foi utilizado, em substituição ao filtrado, 1 ml de tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,0) na mistura, tratada da mesma maneira.

A atividade enzimática foi calculada de maneira semelhante à realizada por PERSSON et alii (1984), e é dada pela variação ocorrida na absorbância do sobrenadante lida a 280 nm x 10, durante o período de incubação.

3.2.5. Determinação da atividade elastolítica

A atividade elastolítica do filtrado foi determinada segundo a metodologia utilizada por St. LEGER et alii (1986b), com modificações. Preparou-se uma mistura de reação contendo 4 ml de uma suspensão de Elastina na Congo-Red 1 mg/ml em tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,0) e 0,5 ml de filtrado (obtido da mesma maneira que o utilizado na determinação da atividade proteolítica contra caseína). A mistura foi agitada, vigorosamente, por 10 segundos e incubada sem agitação, a 30°C, por 15 minutos (tempo esse determinado a partir de uma curva de degradação do substrato, em função do tempo de incubação, realizada previamente com a linhagem 58, Figuras 3 e 4). A seguir, realizou-se a centrifugação da mistura de reação a 5000 g, por 10 minutos e a posterior filtragem em papel de filtro nº 10. A absorbância do filtrado foi determinada a 280 e 450 nm.

Como controle utilizou-se 0,5 ml de filtrado, fervido por 12 minutos e, como branco, 0,5 ml de tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,0), na mistura de reação, em substituição ao filtrato, tratados da mesma maneira.

As atividades elastolíticas são dadas pelas variações na absorbância dos sobrenadantes nos dois comprimentos de onda $\times 100$, durante o período de incubação.

3.2.6. Determinação da massa seca produzida

A massa micelial seca produzida pelas linhagens foi determinada pela colocação do micélio retido no item 3.2.4., em estufa a 70°C por 72 horas, com a posterior pesagem da mesma em balança analítica. A pesagem foi efetuada imediatamente após a retirada do material da estufa, dada a grande higroscopicidade apresentada pelo micélio desidratado.

3.2.7. Análise estatístico-genética

3.2.7.1. Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o de grupos de experimentos inteiramente casualizados com uma testemunha comum.

As linhagens ensaiadas foram divididas em cinco grupos, sendo que cada grupo foi composto por um número variável de linhagens, mais a linhagem 58, utilizada como testemunha comum.

O grupo 1 foi composto pelos tratamentos: 58, E₂, E₃, 157p
 O grupo 2 foi composto pelos tratamentos: 58, 02, 22, P
 O grupo 3 foi composto pelos tratamentos: 58, 29, 73, 20
 O grupo 4 foi composto pelos tratamentos: 58, 63, CLII, 70, 38
 O grupo 5 foi composto pelos tratamentos: 58, 35, SMC.

3.2.7.2. A análise da variância

A análise da variância foi feita para cada variável, dentro de cada grupo, segundo o esquema de experimentos inteiramente casualizados, como no modelo apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema da análise de variância utilizada para cada um dos grupos.

F.V.	G.L.	SQ	QM
Tratamentos	$t_s - 1$	SQ_T	QM_T
Erro	$t_s (r - 1)$	SQ_E	QM_E
Total	$t_s r - 1$	SQ_{TOT}	
Linhagens	$l_s - 1$	SQ_G	QM_G
Linhagens vs. Testemunha	1	SQ_C	QM_C

sendo:

s = número do grupo;

r = número de repetições;

l_s = número de linhagens no grupo s ;

t_s = número de tratamentos ensaiados no grupo s ,

logo: $t_s = l_s + 1$;

QM_G = quadrado médio das linhagens;

QM_E = quadrado médio do erro experimental;

QM_T = quadrado médio dos tratamentos.

O modelo estatístico usado na análise foi o seguinte:

$$X_{ir} = m + g_i + e_{ir}$$

sendo:

X_{ir} = valor observado na parcela que recebeu o tratamento i
na repetição r ;

$i = 1, 2, \dots, n$;

$r = 1, 2, 3$;

$n = 4$ nos grupos 1, 2 e 3;

$n = 3$ no grupo 5;

$n = 5$ no grupo 4;

m = média geral paramétrica;

g_i = efeito aleatório do genótipo i dentro do grupo;

e_{ir} = erro experimental associado ao valor fenotípico da observação ir , dentro do grupo.

O esquema da análise da variância combinada dos grupos de experimentos é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Esquema da análise da variância combinada dos grupos.

F.V.	G.L.	SQ	QM
Linhagens/Grupos	$\sum_{s=1}^5 (l_s - 1) = 11$	$\sum SQ_G$	$\bar{QM}_G$
Linhagens vs. Test./Grupos	$5 - 1 = 4$	$\sum SQ_C$	$\bar{QM}_C$
Erro/Grupos	$\sum_{s=1}^5 t_s (r - 1) = 40$	$\sum SQ_E$	$\bar{QM}_E$
Total/Grupos	$r \sum_{s=1}^5 t_s - s = 55$	$\sum Q_{TOT}$	-

sendo:

$\bar{QM}_G$ = quadrado médio de linhagens;

$\bar{QM}_C$ = quadrado médio de linhagens vs. testemunha;

$\bar{QM}_E$ = quadrado médio do erro experimental.

Obs.: No grupo 5, a testemunha foi considerada como sendo uma das linhagens ensaiadas, a fim de que pudesse contribuir para a variabilidade total. Sendo assim, para a obtenção da análise de variância combinada, o grupo 5 apresentou-se com 2 graus de liberdade para o contraste Linhagens/Grupos e sem o contraste Linhagens vs. Testemunha/Grupos.

O delineamento utilizado, com a presença de um tratamento comum a todos os grupos, permitiu que as médias dos tratamentos fossem ajustadas, eliminando-se o efeito de possíveis variações ambientais entre os grupos. O

ajuste de médias foi realizado conforme proposto por PIMENTEL GOMES (1987) e é descrito abaixo:

Médias

tratamento i no grupo s:

$$\bar{X}_{is}$$

testemunha no grupo s:

$$\bar{X}_{Ts}$$

geral da testemunha:

$$\bar{X}_T$$

Fator de ajuste relativo ao grupo s

$$\hat{a}_s = \bar{X}_{Ts} - \bar{X}_T$$

Portanto: média ajustada do tratamento i no grupo s

$$\bar{X}_{is(Aj.)} = \bar{X}_{is} - \hat{a}_s$$

Os componentes da variância foram estimados dentro de grupos do seguinte modo:

a) estimador do componente da variância, devida ao efeito das linhagens:

$$\hat{V}_G = (\bar{Q}M_G - \bar{Q}M_E)/r$$

b) estimador do componente da variância, devida ao erro experimental:

$$\hat{V}_E = \bar{Q}M_E$$

c) estimador da variância fenotípica entre as médias das linhagens:

$$\hat{V}_F = \bar{GM}_G / r$$

3.2.7.3. Análise da covariância

A fim de se obter as componentes das covariâncias, procedeu-se à análise da variância da soma das variáveis; tomando-se por exemplo $z = x + y$, temos, genericamente, que:

$$V_z = V_x + V_y = 2COV_{xy}. \text{ Assim,}$$

$$COV_{xy} = (1/2) \cdot (V_z - V_x - V_y)$$

Obedecendo ao mesmo esquema da análise da variância já exposta para as variáveis, isoladamente (Tabela 2), temos para a variável z as estimativas:

$$\hat{V}_{G(Z)} \text{ e } \hat{V}_{E(Z)}$$

de modo que:

$$\hat{COV}_{G(X,Y)} = (1/2) \cdot [\hat{V}_{G(Z)} - \hat{V}_{G(X)} - \hat{V}_{G(Y)}]$$

e

$$\hat{COV}_{E(X,Y)} = (1/2) \cdot [\hat{V}_{E(Z)} - \hat{V}_{E(X)} - \hat{V}_{E(Y)}]$$

Assim sendo, foram obtidos os estimadores das correlações, conforme segue:

a) estimador do coeficiente de correlação genotípica.

$$\hat{r}_G = \hat{COV}_{G(X,Y)} / \sqrt{\hat{V}_{G(X)} \cdot \hat{V}_{G(Y)}}$$

sendo:

$\hat{COV}_{G(X,Y)}$ = estimador da covariância genotípica
entre os caracteres X e Y;

$\hat{V}_{G(X)}$ e $\hat{V}_{G(Y)}$ = estimadores das variâncias genotípicas
dos caracteres X e Y, respectivamente.

b) estimador do coeficiente de correlação ambiental

$$\hat{r}_E = \hat{COV}_{E(X,Y)} / \sqrt{\hat{V}_{E(X)} \cdot \hat{V}_{E(Y)}}$$

sendo:

$\hat{COV}_{E(X,Y)}$ = estimador da covariância ambiental
entre os caracteres X e Y;

$\hat{V}_{E(X)}$ e $\hat{V}_{E(Y)}$ = estimadores das variâncias
ambientais dos caracteres X e Y,
respectivamente.

c) estimativa do coeficiente de correlação fenotípica:

$$\hat{r}_F = (\hat{COV}_{G(X,Y)} + \hat{COV}_{E(X,Y)}) / \sqrt{(\hat{V}_{G(X)} + \hat{V}_{E(X)}) \cdot (\hat{V}_{G(Y)} + \hat{V}_{E(Y)})}$$

3.2.7.4. Estimativa de parâmetros adicionais

Para cada variável estudada, estimaram-se os parâmetros abaixo relacionados, da seguinte maneira:

a) Coeficientes de herdabilidade

a1 Ao nível individual ($\hat{h}^2$)

$$\hat{h}^2 = \hat{V}_G / (\hat{V}_G + \hat{V}_E)$$

a2 Ao nível de médias das linhagens ($\hat{h}_m^2$)

$$\hat{h}_m^2 = \hat{V}_G / (\hat{V}_G + \hat{V}_E / 3) = \hat{V}_G / \hat{V}_F$$

b) Progresso esperado na seleção

$$\hat{G}_S = K \cdot (\hat{V}_G / \sqrt{\hat{V}_F})$$

sendo:

$\hat{G}_S$ = estimador do progresso esperado na seleção;

K = 0.85 intensidade de seleção utilizada para amostras pequenas, com uma intensidade de seleção de 1/3 (FISHER & YATES, 1949).

c) Progresso esperado na seleção, dado em porcentagem, em relação à média do caráter.

$$\hat{G}_S\% = (\hat{G}_S / \bar{Y}_0) \cdot 100$$

sendo:

$\hat{G}_S\%$ = estimador do ganho percentual em relação à média do caráter esperado na seleção;

$\bar{Y}_0$ = média inicial do caráter nas linhagens ensaiadas.

3.2.7.5. Estimativa do ganho e da eficiência esperados nas seleções indiretas

Em muitos casos, existindo correlação entre caracteres, é possível se realizar a seleção para o caráter de interesse, indiretamente, através de um outro. No presente estudo, seria vantajoso, em termos experimentais, que a seleção de linhagens com altas atividades elastolíticas, pudesse ser feita através de suas atividades proteolíticas contra caseína. Isso se deve ao fato de o segundo caráter ser determinado por uma metodologia mais fácil e barata, tendo sido também determinada por outras técnicas em diversas linhagens de *M. anisopliae*. Sendo assim, foram estimadas as eficiências que teriam as seleções indiretas, bem como os ganhos esperados se as mesmas fossem aplicadas nos caracteres avaliados.

a) Estimativa do ganho esperado para a atividade elastolítica a 450 nm, selecionando-se através da atividade elastolítica a 280 nm ($\hat{G}_{S2}$).

$$\hat{G}_{S2} = (\bar{Y}_{S2} - \bar{Y}_0) \cdot \hat{h}_m^2$$

sendo:

$\bar{Y}_{S2}$ = média da atividade elastolítica a 450 nm das 6 linhagens com as melhores médias de atividade elastolítica a 280 nm;

$\bar{Y}_0$ = média geral da atividade elastolítica avaliada a 450 nm;

$\hat{h}_m^2$ = estimativa do coeficiente de herdabilidade, ao nível de médias, da atividade elastolítica avaliada a 450 nm.

- b) Estimativa do ganho esperado na seleção, para a atividade elastolítica a 450 nm, selecionando-se através da atividade proteolítica contra caseína ($\hat{G}_{S3}$).

$$\hat{G}_{S3} = (\bar{Y}_{S3} - \bar{Y}_0) \cdot h_m^2$$

sendo:

$\bar{Y}_{S3}$ = média da atividade elastolítica a 450 nm das 6 linhagens com as melhores médias de atividade proteolítica contra caseína;

h_m^2 = estimativa do coeficiente de herdabilidade, ao nível de médias, da atividade elastolítica a 450 nm.

- c) A eficiência das duas seleções indiretas foi calculada da maneira descrita a seguir:

para o caso a:

$$Ef_2 = (\bar{Y}_{S2} - \bar{Y}_0) / (\bar{Y}_{S1} - \bar{Y}_0)$$

sendo:

Ef_2 = eficiência da seleção indireta no caso a;

$\bar{Y}_{S1}$ = média das 6 linhagens com as maiores atividades elastolíticas, avaliadas a 450 nm;

para o caso b:

$$Ef_3 = (\bar{Y}_{S3} - \bar{Y}_0) / (\bar{Y}_{S1} - \bar{Y}_0)$$

sendo:

Ef_3 = eficiência da seleção indireta no caso b;

$\bar{Y}_{S3}$ = média da atividade elastolítica a 450 nm das 6 linhagens com as melhores médias de atividade proteolítica contra caseína.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Curvas de degradação de caseína e elastina em função do tempo de incubação

A Figura 1 mostra a curva de degradação da caseína, representada pelo incremento na absorbância a 280 nm, em função do tempo de incubação, obtida com o filtrado da linhagem E ϕ . Essa curva serviu para se determinar o período de 15 minutos de incubação, como o tempo a ser utilizado para todas as linhagens na determinação de suas atividades proteolíticas contra caseína. Após esse período de incubação, de acordo com a Figura 2, o filtrado da linhagem E ϕ degradou apenas 21,6% do substrato, considerando-se que, após 240 minutos, a degradação foi de 100%.

A escolha desse período, tomando-se por base a curva obtida com a linhagem E ϕ , mostrou-se adequada, visto que a mesma, em comparação com as outras linhagens ensaiadas, mostrou uma baixa atividade proteolítica, como pode ser visto na Tabela 3. A escolha de um tempo de incubação maior poderia comprometer a discriminação entre linhagens com alta atividade proteolítica, pois as mesmas já teriam degradado todo o substrato existente.

ABSORBÂNCIA A 280nm x 10

Rep.	TEMPO DE INCUBAÇÃO (em minutos)							
	T ₀	15'	30'	45'	60'	120'	180'	240'
R ₁	0,000	2,072	3,925	4,894	5,831	7,806	8,536	9,184
R ₂	0,000	1,893	3,768	4,827	5,623	7,532	8,688	9,014
R ₃	0,000	1,959	4,156	4,370	6,088	7,952	8,878	9,022
$\bar{m}$	0,000	1,975	3,950	4,697	5,847	7,763	8,702	9,073
d.p.	0,000	0,090	0,195	0,285	0,233	0,213	0,171	0,096

Obs.: Os valores médios foram usados na construção do gráfico abaixo (Fig. 1).

Figura 1. Curva de degradação da caseína. Variação na absorbância a 280 nm em função do tempo de incubação (linhagem E_g).

% DO SUBSTRATO DEGRADADO

	TEMPO DE INCUBAÇÃO (em minutos)							
	T ₀	15'	30'	45'	60'	120'	180'	240'
$\bar{m}$	0	21,6	42,5	54,2	63,0	83,6	93,7	100,0

Dados da tabela referentes à figura 1, transformados em porcentagem; 9,073 corresponde a 100% de degradação.

Figura 2. Evolução na degradação da caseína, dada em %, em função do tempo de incubação (linhagem Egl).

Tabela 3. Médias ajustadas, de três repetições, referentes aos 4 caracteres estudados, em 16 linhagens de *M. anisopliae*.

Linhagem	Produção de massa seca (mg)	At. Elastolítica ¹		Atividade proteolítica ²
		280 nm	450 nm	
P	66,4	1,02	0,92	1,828
63	65,7	15,22	5,58	3,669
E ₆	65,6	18,80	6,46	4,403
157p	63,5	25,10	8,64	4,377
35	62,2	16,01	5,76	3,608
58	60,8	21,32	7,38	4,601
70	60,8	17,72	6,68	4,480
E ₉	59,6	0,42	0,36	1,511
22	57,2	2,37	1,68	2,137
SMC	56,5	9,75	3,31	3,505
20	55,2	20,35	6,91	3,646
38	55,1	12,13	5,48	3,330
CLII	54,2	27,13	10,16	6,439
02	54,1	16,25	6,14	6,060
73	52,3	3,89	1,20	2,952
29	49,3	19,81	7,65	3,346
Média geral	58,6	14,20	5,27	3,743

¹ Atividade dada pela variação ocorrida na absorbância, durante o período de incubação x 100.

² Atividade dada pela variação ocorrida na absorbância, durante o período de incubação x 10.

As Figuras 3 e 4 mostram as curvas de degradação da elastina "Congo-Red", representadas pelo incremento na absorbância, a 280 nm (solubilização da tirosina) e a 450 nm (liberação do "Congo-Red"), em função do tempo de incubação. Essas curvas foram construídas com o filtrado obtido da linhagem 58, como descrito na metodologia e serviram para a determinação do tempo de incubação de 15 minutos, utilizado para os ensaios da atividade elastolítica com todas as linhagens ensaiadas.

Como foi visto posteriormente com os resultados gerais (Tabela 3), esse período poderia ter sido maior, pois mesmo a linhagem 58, sendo comparativamente uma boa produtora de elastase, após 15 minutos, nas condições do ensaio, degradou menos que 50% do substrato.

A vantagem que teria sido obtida, caso um período maior de incubação tivesse sido utilizado, seria uma maior precisão na discriminação de linhagens com baixas produções de elastase. Entretanto, este fato não comprometeu a avaliação da atividade elastolítica das linhagens.

ABSORBÂNCIA A 280 nm x 100

Rep.	TEMPO DE INCUBAÇÃO (em minutos)						
	T ₀	5'	10'	15'	30'	60'	120'
R ₁	0,00	14,29	21,45	19,82	37,33	54,88	63,01
R ₂	0,00	16,05	24,53	22,68	36,41	32,21	65,48
R ₃	0,00	14,36	21,26	24,11	36,11	47,63	48,87
$\bar{m}$	0,00	14,90	22,41	22,20	36,62	48,24	59,12
d.p.	0,00	1,00	1,83	2,18	0,63	6,36	8,96

Obs.: Os valores médios foram usados na construção do gráfico abaixo (Fig. 3).

Figura 3. Degradação da elastina. Variação na absorbância a 280nm, em função do tempo de incubação (linhagem 58).

ABSORBÂNCIA A 450 nm x 100

Rep.	TEMPO DE INCUBAÇÃO (em minutos)						
	T ₀	5'	10'	15'	30'	60'	120'
R ₁	0,00	4,67	6,59	6,30	11,75	16,78	19,23
R ₂	0,00	5,72	8,68	7,70	11,77	12,91	20,10
R ₃	0,00	4,90	7,13	7,86	11,71	15,25	15,20
$\bar{m}$	0,00	5,10	7,47	7,29	11,74	14,98	18,18
d.p.	0,00	0,55	1,08	0,86	0,03	1,95	2,61

Obs.: Os valores médios foram usados na construção do gráfico abaixo (Fig. 4)

Figura 4. Degradação da elastina. Variação na absorbância a 450nm em função do tempo de incubação (linhagem 58).

4.2. Viabilidade apresentada pelos conídios das linhagens ensaiadas

A Tabela 4 mostra a viabilidade apresentada pelas linhagens ensaiadas. Como pôde ser observado, todas as linhagens apresentaram alta viabilidade, tendo sido bastante reduzida a variação encontrada. Vale ser ressaltado que o fungo não apresentou problemas para germinar e iniciar seu desenvolvimento, em meio contendo somente caseína como fonte de carbono e nitrogênio, não tendo sido necessárias fontes adicionais menos complexas de nenhuma natureza para seu desenvolvimento inicial.

Tabela 4. Viabilidade das linhagens ensaiadas dada em % de conídios, após 14h de incubação.

Linhagens	Viabilidade (%)
38	97,8
58*	98,4
29	96,0
35	99,0
E ₉	99,0
P	99,0
E ₆	99,0
CLII	97,4
02	98,2
63	99,0
70	98,2
22	99,0
SMC	98,0
20	98,2
157p	98,4

* A viabilidade apresentada corresponde à média das observadas nos 5 grupos.

4.3. Médias e dispersões dos caracteres avaliados

No presente trabalho, foram medidos 4 caracteres, a saber:

Atividade proteolítica contra caseína; atividade elastolítica, mensurada a 280 e a 450 nm e produção de massa seca, cujas médias são mostradas na Tabela 3. A fim de facilitar a observação da ampla variação encontrada em todos os caracteres, foi elaborada a Tabela 5. Nela pode-se observar que, na atividade elastolítica determinada a 280 nm e a 450 nm, os limites superiores foram respectivamente 64,6 e 28,2 vezes maiores do que os limites inferiores. Na atividade proteolítica contra caseína, a maior atividade foi 4,3 vezes superior à menor. A característica que apresentou a menor amplitude de variação foi a produção de massa seca, onde o maior valor foi 1,3 vezes superior ao menor.

A alta variabilidade verificada pôde ser atribuída à grande heterogeneidade genética existente entre as linhagens ensaiadas, já que as mesmas não sofreram previamente nenhum processo de seleção para as características estudadas.

Tabela 5. Valores médios e amplitude dos caracteres avaliados.

Caracteres avaliados	Média	Amplitude
Massa seca (mg)	58,6	49,3 a 66,4
Atividade proteolítica ¹ contra caseína	3,346	1,511 a 6,439
Atividade elastolítica ² avaliada a 280 nm	14,20	0,42 a 27,13
Atividade elastolítica ² avaliada a 450 nm	5,27	0,36 a 10,16

¹ Unidade dada pela variação na absorbância x 10.

² Unidades dadas pelas variações nas absorbâncias x 100.

4.4. Análise da Variância

Os resultados da análise da variância a que foram submetidos os caracteres, com os valores dos quadrados médios, coeficientes de variação e significâncias relativas ao teste F, são apresentados na Tabela 6. Como pôde ser observado, existem diferenças significativas entre as linhagens em todos os caracteres analisados. Em vista disso, foram feitos estudos mais aprofundados e seus resultados serão posteriormente apresentados.

Tabela 6. Valores e significâncias dos testes F dos quadrados médios (QM) obtidos nas análises da variância dos quatro caracteres, avaliados em linhagens de *M. anisopliae*.

F.V.	G.L.	At. Elastolítica ¹		Atividade proteolítica ²	Massa seca (mg)
		280nm	450nm		
Linhagens/s	11	228,8030**	27,3995**	6,395644**	60,85**
Linhagens vs. Test./ Grupos	4	177,8170**	16,0905**	2,491941	46,46**
Resíduo	40	1,9490	0,2415	0,049825	6,40
Coeficiente de Variação (%)		8,8	8,6	5,7	4,3

* Significativo a 5%

** Significativo a 1%

¹ Variação na absorbância x 100

² Variação na absorbância x 10.

O experimento apresentou coeficientes de variação baixos para todos os caracteres, segundo os intervalos definidos por PIMENTEL GOMES (1984), demonstrando uma boa precisão, o que é esperado para experimentos de laboratório bem conduzidos. Um aspecto que deve ser mencionado foi o fato de as determinações elastolíticas terem apresentado coeficientes de variação maiores. Isso, provavelmente, não teria sido verificado se o tempo de incubação com o substrato tivesse sido superior, o que facilitaria a determinação dos produtos de degradação da elastina "Congo-Red", em especial nas linhagens com produção reduzida de elastase.

A Tabela 7 mostra os valores das estimativas das variâncias fenotípicas e seus componentes. Na Tabela 8 podem ser vistas as estimativas dos coeficientes de herdabilidade a nível individual ($\hat{h}^2$) e a nível de médias entre linhagens ($\hat{h}_m^2$).

Tabela 7. Estimativas das variâncias fenotípicas entre médias ($\hat{V}_F$), variâncias genotípicas ($\hat{V}_G$) e variâncias associadas ao erro experimental ($\hat{V}_E/r$), ao nível de médias entre linhagens das características individuais.

Caracteres	$\hat{V}_F$	$\hat{V}_G$	$\hat{V}_E/r$
Massa seca	20,28	18,15	2,13
Ativ.proteolítica contra caseína	2,131881	2,115273	0,016608
Ativ.elastolítica avaliada a 280nm	76,2677	75,6180	0,6497
Ativ. elastolítica avaliada a 450nm	9,1332	9,0527	0,0805

Como pôde ser observado, as estimativas das variâncias genotípicas se apresentaram como as principais componentes das estimativas das variâncias fenotípicas, o que fez com que as estimativas dos coeficientes de herdabilidade fossem altas para todos os caracteres, em especial

para as atividades enzimáticas. VENCOVSKY (1973) ressalta que o coeficiente de herdabilidade não é uma propriedade de um certo caráter em si, mas a propriedade de um caráter numa dada população. Os altos valores dos coeficientes de herdabilidade foram consequência da utilização de uma população com uma heterogeneidade genética bastante grande, em condições ambientais altamente uniformes. FALCONER (1987) cita o papel preditivo, expressando a confiança do valor fenotípico como guia para o valor genético, como sendo a mais importante função da herdabilidade, no estudo genético do caráter métrico. As estimativas dos coeficientes ($\hat{h}_m^2$) indicam que a população poderia ser facilmente melhorada para os caracteres estudados, com a obtenção de grandes progressos, através da simples seleção fenotípica.

A Tabela 8 mostra as estimativas dos progressos esperados na seleção ($\hat{G}_s$), bem como seus valores dados em porcentagem, em relação às médias dos caracteres individuais avaliados ($\hat{G}_s\%$). Os valores dos $\hat{G}_s\%$ mostraram que a população melhorada para atividade proteolítica contra caseína seria 31,3% superior à população original. Quanto à atividade elastolítica, estas superioridades seriam de 46,4% e 44,4%, respectivamente, considerando-se a avaliação realizada a 280 ou 450 nm.

Tabela 8. Estimativas do progresso esperado na seleção e dos coeficientes de herdabilidade para os caracteres avaliados.

Caracteres	$\hat{G}_S$	$\hat{G}_S\%$	$\hat{h}^2$	$\hat{h}_m^2$
Ativ. proteolítica contra caseína	1,23	31,3	0,977	0,992
Ativ. elastolítica avaliada a 280nm	7,36	46,4	0,975	0,995
Ativ. elastolítica avaliada a 450nm	2,55	44,4	0,974	0,991

4.5. Estimativas das correlações e resultados e eficiência das seleções indiretas

Os resultados das estimativas dos coeficientes de correlação são mostrados na Tabela 9. Feita a análise dos resultados, verificou-se a existência de correlações de alta magnitude entre as atividades elastolíticas, avaliadas a 280 e 450 nm, nos três níveis: fenotípico, genotípico e ambiental. Esse resultado não causou surpresa, visto que a característica avaliada era a mesma (produção de elastase). Entretanto, foi importante, pois mostrou que a utilização da elastina como substrato, em substituição à elastina "Congo-Red", é possível, nas condições em que foram realiza-

dos os experimentos. Isso quer dizer que, apesar de a elastina apresentar apenas 1,4% de tirosina e não possuir triptofano em sua constituição (MANDL, 1962), os resíduos de tirosina liberados podem ser quantificados, permitindo uma discriminação entre linhagens produtoras de elastase tão boa quanto à conseguida com a avaliação da solubilização do "Congo-Red".

Tabela 9. Estimativas dos coeficientes de correlação fenotípicos (1), genotípicos (2) e ambientais (3) entre os caracteres avaliados.

Caracteres	Atividade proteolítica contra caseína	Atividade elastolítica ava- liada a 280 nm
Produção de massa seca	(1) - 0,276 (2) - 0,311 (3) - 0,083	
Ativ. elastolítica avaliada a 450nm	(1) 0,475 (2) 0,472 (3) 0,603	0,991 0,995 0,827

Os resultados mostraram que as seis linhagens com as maiores atividades elastolíticas, avaliadas a 450 nm (CLII, 157p, 29, 58, 20 e 70), em ordem decrescente, apresentaram uma média ($\bar{Y}_{S_1}$) de 7,90, praticamente igual à média

da atividade elastolítica a 450 nm das seis linhagens com as maiores atividades elastolíticas, avaliadas a 280 nm ($\bar{Y}_{S_2}$). Isso faz com que a seleção indireta para a atividade elastolítica a 450 nm, feita através da avaliação a 280 nm, tenha uma eficiência de $0,996 \cong 1,00$, ou seja, exatamente igual à seleção direta.

Quanto à associação entre a atividade proteolítica contra a caseína e a atividade elastolítica avaliada a 450 nm, as estimativas dos coeficientes de correlação fenotípica (0,475), genotípica (0,472) e ambiental (0,603) mostraram que as características estão correlacionadas positivamente nos três níveis. A compreensão da magnitude desta correlação foi auxiliada pelos resultados do progresso esperado na seleção para o caráter atividade elastolítica a 450 nm, selecionando-se, indiretamente, as linhagens por suas atividades proteolíticas contra caseína. A média ($\bar{Y}_{S_3}$) da atividade elastolítica a 450 nm das seis linhagens com as maiores médias de atividade proteolítica contra caseína (CLII, 02, 58, 70, E6 e 157p) foi 7,58; isso fez com que o ganho esperado na seleção indireta fosse de 2,29 contra 2,58, esperado na seleção direta. A eficiência esperada na seleção indireta (Ef_g), neste caso, foi de 0,89, um valor bastante alto, o que faz com que a mesma possa ser aplicada com bons resultados. A utilização da seleção direta ou indireta ficaria, portanto, condicionada à conveniência de se avaliar um ou outro caráter.

Os caracteres produção de massa seca, em meio contendo caseína como única fonte de carbono e nitrogênio, e atividade proteolítica contra caseína mostraram coeficientes de correlações fenotípica e genotípica negativos de $-0,276$ e $-0,311$, respectivamente. Uma possível explicação para esse resultado pode ter sido o fato de a quantidade reduzida de caseína no meio de cultura ter limitado o desenvolvimento micelial das linhagens, devendo-se as diferenças na produção de massa seca a variações de eficiência na utilização dos produtos da degradação da caseína, e não a variações na produção de proteases entre as linhagens. Entretanto, isso não passa de suposição, necessitando de estudos complementares para sua confirmação.

5. CONCLUSÕES

Dentro das condições nas quais foram realizados os experimentos, os resultados apresentados e discutidos permitiram que as seguintes conclusões fossem tiradas:

- Existe uma grande variabilidade genotípica em todos os caracteres estudados, permitindo sua exploração em programas de melhoramento.

- Os altos coeficientes de herdabilidade permitem que grandes progressos sejam esperados na seleção fenotípica clonal.

- Os altos coeficientes de correlação, observados entre a atividade elastolítica determinada a 280 e 450 nm, mostram que a elastina pode ser utilizada em substituição à elastina "Congo-Red", como substrato para determinação da atividade elastolítica.

- Os coeficientes de correlação, bem como as estimativas de ganho na seleção indireta, mostram que se podem obter altos progressos na atividade elastolítica, através da seleção de linhagens com altas atividades proteolíticas contra caseína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, Baltimore, 22: 79-89, 1938.

BALASUBRAMANIAN, R. & MANOCHA, M.S. Proteinase, chitinase and chitosanase activities in germinating spores of *Piptocephalis virginiana*. *Mycologia*, New York, 78(2): 157-63, 1986.

BANGA, I.; BALÓ, J.; HORVATH, M. Nephelometric determination of elastase activity and method for elastolytic measurements. *Biochemistry*, Washington, 71: 544-51, 1959.

COHEN, B.L. Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 79: 321-329, 1973.

DEPLOEY, J.J.; FORTMAN, B.; PERVA, L. Daily measurements *Mucor miehei* lipase activity. *Mycologia*, New York, 73: 953-8, 1981.

- DRUCKER, H. Regulation of exocellular proteases in *Neurospora crassa*: Induction and repression of enzyme synthesis. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 110: 1041-9, 1972.
- EL-SAYED, G.N.; COUDRON, T.A.; IGNOOFFO, C.M.; RIBA, G. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus, *Nomurea rileyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 54: 394-403, 1989.
- FALCONER, D.S. *Introdução à genética quantitativa*. Trad. de Martinho de Almeida e Silva e José Carlos Silva. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1987. 279p. ilustr.
- FISHER, R.A. & YATES, F.A. *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. 2nd. ed., London, Oliver and Boyd, 1949. p.59.
- FOLIN, O. & CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, vol. LXXIII, nº 2, p.627-50, 1927.
- GABRIEL, B.P. Enzymatic activities of some entomophthorous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 11: 70-81, 1968.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, New York, 67: 597-607, 1975.
- JEUNIAUX, C. Chitinases. *Methods in Enzymology*. New York, vol. VIII, 644-50, 1966.

- KUČERA, M. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria melonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 35: 304-10, 1980.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *Journal of General Physiology*, Baltimore, 30: 291-310, 1947.
- LEITE, B. Variabilidade natural de linhagens de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, quanto à resistência ao ultravioleta, atividade enzimática e virulência ao vetor da doença de Chagas *Panstrongylus megistus*. Campinas, 1987. 136p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- MANDL, I. Pancreatic Elastase. *Methods in Enzymology*. New York, vol. V: 665-73, 1962.
- MARRINK, J. & GRUBER, M. Use of casein in assays for proteolytic activity in tissue extracts: a warning. *Biochimica et Biophysica Acta*. Amsterdam, 118: 438-9, 1966.
- MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions British Mycology Society*. London, 75: 473-7, 1980.
- MOSKOWITZ, G.J.; CASSAIGNE, R.; WEST, I.R.; SHEN, T.; FELDMAN, L.I. Hydrolysis of animal fat and vegetable oil with *Mucor miehei* esterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 25: 1146-50, 1977.
- NAUGHTON, M.A. & SANGER, P. Purification and specificity of pancreatic elastase. *The Biochemical Journal*, London, 78: 156-73, 1961.

- PEDRAZA-REYES, M. & LOPEZ-ROMERO, E. Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*. *Journal of General Microbiology*, London, 125: 211-8, 1989,
- PERSSON, M.; HALL, L.; SÖDERHALL, K. Comparison of peptidase activities in some fungi pathogenic to arthropods. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 44: 342-8, 1984.
- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. 12.^a ed., Piracicaba, Livraria Nobel, 1987. 467p.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.F.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics*, New York, 5: 141-8, 1953.
- REISSIG, J.L.; STROMINGER, J.L.; LELOIR, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetilamino sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 217: 959-66, 1955.
- ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 38: 1-3, 1981.
- SAMUELS, K.D.Z.; HEALE, J.B.; LLEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 53: 25-31, 1989.
- SHOTTON, D.M. Elastase. *Methods in Enzymology*. New York, vol. XIX: 113-39, 1970.

- SILVEIRA, W.D. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 153p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SMITH, R.J. & GRULA, E.A. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 42: 319-26, 1983.
- SÖDERHALL, K. & UNESTAM, T. Properties of extracellular enzymes from *Aphanomyces astaci* and their relevance in the penetration process of crayfish cuticle. *Physiology plantarum*, London, 35: 140-6, 1975.
- SOGART, W.N. *Microbial enzymes and biochemistry*, London, Applied Science Publishers, 1983.
- SOSA-GOMES, D.R. & ALVES, S.B. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.; 1. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. CIRPON - Revista de Investigación, Tucumán, 1: 83-102, 1983.
- STIRLING, J.L.; COOK, G.A.; POPE, A.M.S. Chitin and its degradation in fungal walls and hyphal growth. *Symposium of the British Mycological Society held in Queen Elizabeth College*, London, April 1978.
- St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-degrading of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 48: 85-95, 1986a.

- St. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 47: 166-77, 1986b.
- St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between Pathogen enzymes and Insect cuticles. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 47: 295-302, 1986c.
- St. LEGER, R.L.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, San Diego, 253: 221-32, 1987.
- St. LEGER, R.J.; DURRANDS, R.M.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology*, Berlin, 50: 413-6, 1988a.
- St. LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 52: 356-9, 1988b.
- St. LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 52: 285-93, 1988c.

- St. LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, San Diego, 13: 253-62, 1989.
- St. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Kinetics of the digestion of insect cuticles by a protease (Pr1) from *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 57: 146-7, 1991.
- TRACEY, M.V. Chitinase in some basidiomycetes. *The Biochemical Journal*. London, 61: 579-86, 1955.
- VALADARES, M.C.C. Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1989. 160p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- VENCOVSKY, R. Princípios de genética quantitativa. Piracicaba, ESALQ/Departamento de Genética, 1973. 97p. (Publicação didática, 16).

APÊNDICE

.....

Apêndice 1. Valores referentes a todas as parcelas no experimento de determinação da atividade proteolítica contra caseína.

Linhas	$A_{280nm}(C)$	$A_{280nm}(A)$	A_{280nm}
Grupo 1			
58			
R1	0,0446	0,5787	0,5341
R2	0,0568	0,5534	0,4966
R3	0,0658	0,5547	0,4889
E ₀			
R1	0,0350	0,2422	0,2070
R2	0,0420	0,2313	0,1893
R3	0,0378	0,2337	0,1959
E ₆			
R1	0,0535	0,5482	0,4836
R2	0,0334	0,5248	0,4914
R3	0,0461	0,5312	0,4851
157p			
R1	0,0681	0,5585	0,4896
R2	0,0772	0,5465	0,4928
R3	0,0573	0,5561	0,4699

Apêndice 1. Continuação.

Linhagens	$A_{280nm}(C)$	$A_{280nm}(A)$	Δ_{280nm}
Grupo 2			
58			
R1	0,0935	0,5139	0,4204
R2	0,1080	0,4870	0,3790
R3	0,0735	0,5119	0,4384
02			
R1	0,1308	0,6721	0,5413
R2	0,0905	0,6310	0,5405
R3	0,0860	0,6795	0,5935
22			
R1	0,1316	0,2723	0,1407
R2	0,1329	0,2770	0,1441
R3	0,0976	0,3112	0,2136
P			
R1	0,1131	0,2435	0,1304
R2	0,1134	0,2760	0,1626
R3	0,1357	0,2485	0,1128
Grupo 3			
58			
R1	0,0827	0,5711	0,4884
R2	0,0716	0,6077	0,5361
R3	0,0861	0,5866	0,5005

Apêndice 1. Continuação.

Linhagens	A _{280nm} (C)	A _{280nm} (A)	Δ _{280nm}
Grupo 3			
29			
R ₁	0,0902	0,4783	0,3881
R ₂	0,1194	0,4807	0,3613
R ₃	0,0906	0,4896	0,3990
73			
R ₁	0,0312	0,3497	0,3185
R ₂	0,0313	0,3670	0,3357
R ₃	0,0368	0,4127	0,3759
20			
R ₁	0,1165	0,5287	0,4122
R ₂	0,1129	0,5408	0,4279
R ₃	0,1160	0,5141	0,3981
Grupo 4			
58			
R ₁	0,0641	0,4946	0,4301
R ₂	0,0553	0,4932	0,4379
R ₃	0,0555	0,5329	0,4774
63			
R ₁	0,0545	0,4019	0,3474
R ₂	0,0533	0,4103	0,3570
R ₃	0,0641	0,4253	0,3612
CLII			
R ₁	0,0313	0,6680	0,6367
R ₂	0,0545	0,6616	0,6071
R ₃	0,0319	0,6847	0,6528

Apêndice 1. Continuação.

Linhagens	$A_{280nm}(C)$	$A_{280nm}(A)$	Δ_{280nm}
Grupo 4			
38			
R ₁	0,0869	0,4018	0,3149
R ₂	0,1023	0,4360	0,3337
R ₃	0,1030	0,4184	0,3154
Grupo 5			
58			
R ₁	0,0958	0,5229	0,4271
R ₂	0,0898	0,5242	0,4344
R ₃	0,0826	0,4954	0,4128
35			
R ₁	0,0916	0,4325	0,3405
R ₂	0,0965	0,4288	0,3323
R ₃	0,0847	0,3878	0,3031
SMC			
R ₁	0,0831	0,4321	0,3490
R ₂	0,1078	0,4089	0,3011
R ₃	0,0937	0,3889	0,2952

Sendo:

 $A_{280nm}(C)$ = Absorbância a 280nm do controle; $A_{280nm}(A)$ = Absorbância a 280 nm da mistura de reação, após o período de incubação; Δ_{280nm} = Variação ocorrida na absorbância a 280 nm, durante o período de incubação.R₁, R₂, R₃ = Repetições 1, 2 e 3.

Apêndice 2. Valores referentes a todas as parcelas no experimento de determinação da atividade elastolítica a 450nm.

Linhagens	$A_{450nm}(C)$	$A_{450nm}(A)$	Δ_{450nm}
Grupo 1			
58			
R ₁	0,0075	0,0906	0,0831
R ₂	0,0090	0,0952	0,0862
R ₃	0,0079	0,0892	0,0811
E ₉			
R ₁	0,0098	0,0242	0,0144
R ₂	0,0093	0,0215	0,0122
R ₃	0,0103	0,0234	0,0131
E ₆			
R ₁	0,0090	0,0826	0,0736
R ₂	0,0084	0,0791	0,0707
R ₃	0,0085	0,0870	0,0785
157p			
R ₁	0,0068	0,1013	0,0945
R ₂	0,0073	0,1067	0,0994
R ₃	0,0066	0,1007	0,0941
Grupo 2			
58			
R ₁	0,0090	0,0836	0,0746
R ₂	0,0079	0,0853	0,0774
R ₃	0,0091	0,0828	0,0737

Apêndice 2. Continuação.

Linhagens	$A_{450nm}(C)$	$A_{450nm}(A)$	Δ_{450nm}
Grupo 2			
22			
R1	0,0107	0,0292	0,0185
R2	0,0120	0,0323	0,0203
R3	0,0121	0,0280	0,0159
02			
R1	0,0102	0,0770	0,0668
R2	0,0098	0,0686	0,0588
R3	0,0097	0,0726	0,0629
P			
R1	0,0047	0,0145	0,0090
R2	0,0044	0,0176	0,0132
R3	0,0045	0,0140	0,0095
Grupo 3			
58			
R1	0,0090	0,0794	0,0704
R2	0,0104	0,0898	0,0794
R3	0,0125	0,0896	0,0771
29			
R1	0,0133	0,0914	0,0781
R2	0,0138	0,0926	0,0788
R3	0,0149	0,0930	0,0781

Apêndice 2. Continuação.

Linhagens	$A_{450nm}(C)$	$A_{450nm}(A)$	Δ_{450nm}
Grupo 3			
73			
R ₁	0,0056	0,0225	0,0169
R ₂	0,0060	0,0173	0,0113
R ₃	0,0054	0,0187	0,0133
20			
R ₁	0,0107	0,0759	0,0652
R ₂	0,0110	0,0890	0,0780
R ₃	0,0113	0,0807	0,0694
Grupo 4			
58			
R ₁	0,0101	0,0659	0,0630
R ₂	0,0101	0,0761	0,0770
R ₃	0,0115	0,0756	0,0786
63			
R ₁	0,0074	0,0618	0,0540
R ₂	0,0065	0,0636	0,0571
R ₃	0,0074	0,0608	0,0534
CLII			
R ₁	0,0056	0,1063	0,1007
R ₂	0,0056	0,0951	0,0895
R ₃	0,0056	0,1171	0,1115

Apêndice 2. Continuação.

Linhagens	$A_{450nm}(C)$	$A_{450nm}(A)$	Δ_{450nm}
Grupo 4			
38			
R ₁	0,0101	0,0622	0,0521
R ₂	0,0102	0,0695	0,0593
R ₃	0,0103	0,0604	0,0501
Grupo 5			
58			
R ₁	0,0105	0,0684	0,0558
R ₂	0,0106	0,0742	0,0660
R ₃	0,0101	0,0600	0,0641
35			
R ₁	0,0095	0,0507	0,0412
R ₂	0,0097	0,0610	0,0513
R ₃	0,0102	0,0550	0,0448
SMC			
R ₁	0,0079	0,0360	0,0281
R ₂	0,0079	0,0297	0,0218
R ₃	0,0093	0,0231	0,0138

Sendo:

 $A_{450nm}(C)$ = Absorbância a 450nm do controle; $A_{450nm}(A)$ = Absorbância a 450 nm da mistura de reação, após o período de incubação; Δ_{450nm} = Variação ocorrida na absorbância a 450 nm, durante o período de incubação;R₁, R₂, R₃ = Repetições 1, 2 e 3.

Apêndice 3. Valores observados em todas as parcelas no experimento determinação da atividade elastolítica a 280 nm.

Linhagens	A _{280nm(C)}	A _{280nm(A)}	A _{280nm}
Grupo 1			
58			
R ₁	0,1016	0,3557	0,2541
R ₂	0,1375	0,3647	0,2272
R ₃	0,1082	0,3417	0,2335
E ₉			
R ₁	0,0995	0,1258	0,0263
R ₂	0,0856	0,1154	0,0298
R ₃	0,0844	0,1164	0,0318
E ₆			
R ₁	0,0902	0,3070	0,2168
R ₂	0,0857	0,2836	0,1979
R ₃	0,0894	0,3141	0,2247
157p			
R ₁	0,0982	0,3683	0,2701
R ₂	0,1026	0,3862	0,2836
R ₃	0,0934	0,3680	0,2746
Grupo 2			
58			
R ₁	0,1378	0,3523	0,2145
R ₂	0,1244	0,3609	0,2365
R ₃	0,1371	0,3560	0,2189

Apêndice 3. Continuação.

Linhagens	$A_{280nm}(C)$	$A_{280nm}(A)$	Δ_{280nm}
Grupo 2			
22			
R ₁	0,1695	0,2037	0,0342
R ₂	0,1743	0,2164	0,0421
R ₃	0,1754	0,2004	0,0250
02			
R ₁	0,1408	0,3195	0,1787
R ₂	0,1338	0,3006	0,1668
R ₃	0,1343	0,3065	0,1722
P			
R ₁	0,1250	0,1413	0,0163
R ₂	0,1288	0,1538	0,0250
R ₃	0,1246	0,1441	0,0195
Grupo 3			
58			
R ₁	0,1087	0,3181	0,2094
R ₂	0,1183	0,3434	0,2219
R ₃	0,1520	0,3463	0,1943
29			
R ₁	0,1633	0,3617	0,1984
R ₂	0,1702	0,3611	0,1909
R ₃	0,1694	0,3605	0,1911

Apêndice 3. Continuação.

Linhagens	$A_{280nm}(C)$	$A_{280nm}(A)$	Δ_{280nm}
Grupo 3			
73			
R ₁	0,0763	0,1146	0,0384
R ₂	0,0832	0,1082	0,0250
R ₃	0,0762	0,1156	0,0394
20			
R ₁	0,1351	0,3191	0,1840
R ₂	0,1289	0,3532	0,2243
R ₃	0,1430	0,3317	0,1887
Grupo 4			
58			
R ₁	0,1426	0,3088	0,1982
R ₂	0,1435	0,3281	0,2268
R ₃	0,1561	0,3263	0,2411
63			
R ₁	0,1130	0,2640	0,1510
R ₂	0,0971	0,2662	0,1691
R ₃	0,0960	0,2589	0,1629
CLII			
R ₁	0,0880	0,3701	0,2821
R ₂	0,0874	0,3416	0,2542
R ₃	0,0937	0,3981	0,3044

Apêndice 3. Continuação.

Linhagens	$A_{280nm}(C)$	$A_{280nm}(A)$	Δ_{280nm}
Grupo 4			
38			
R ₁	0,1559	0,2729	0,1170
R ₂	0,1477	0,2981	0,1504
R ₃	0,1505	0,2734	0,1229
70			
R ₁	0,1127	0,3026	0,1899
R ₂	0,1024	0,2988	0,1964
R ₃	0,1182	0,2899	0,1717
Grupo 5			
58			
R ₁	0,1436	0,2920	0,1662
R ₂	0,1360	0,3041	0,1846
R ₃	0,1323	0,2591	0,1698
35			
R ₁	0,1364	0,2497	0,1133
R ₂	0,1363	0,2801	0,1438
R ₃	0,1499	0,2547	0,1048

Apêndice 3. Continuação.

Linhagens	$A_{280nm}(C)$	$A_{280nm}(A)$	Δ_{280nm}
Grupo 5			
SMC			
R ₁	0,1335	0,2078	0,0743
R ₂	0,1365	0,1930	0,0565
R ₃	0,1349	0,1832	0,0433

Sendo:

$A_{280nm}(C)$ = Absorbância a 280nm do controle;

$A_{280nm}(A)$ = Absorbância a 280 nm da mistura de reação, após o período de incubação;

Δ_{280nm} = Variação na absorbância a 280 nm, durante o período de incubação;

R₁, R₂, R₃ = Repetições 1, 2 e 3.

Apêndice 4. Valores referentes a todas as parcelas no experimento de determinação da massa seca produzida.

Linhagens	Massa seca em mg		
	R ₁	R ₂	R ₃
Grupo 1			
58	66,0	64,4	67,4
E _p	65,5	64,3	64,6
E _s	74,8	69,3	68,1
157p	69,9	69,0	67,0
Grupo 2			
58	57,6	69,4	61,8
02	57,1	58,3	53,1
22	63,0	55,0	60,0
P	68,5	68,4	68,4
Grupo 3			
58	57,6	57,4	57,7
29	46,5	47,5	44,6
73	49,0	49,2	49,1
20	53,2	51,7	51,1
Grupo 4			
58	54,1	57,8	58,4
63	59,1	62,0	64,2
CLII	55,4	48,7	46,4
38	53,9	48,6	50,8
70	55,8	57,1	57,4
Grupo 5			
58	59,9	60,3	61,7
35	62,5	62,2	61,6
SMC	57,0	58,2	53,9

Apêndice 5. Análise reunida da variância para o caráter atividade proteolítica contra caseína.

	GL	SQ	QM
Linhagens/Grupo 1	2	16,582135	
Linhagens/Grupo 2	2	33,392207	
Linhagens/Grupo 3	2	0,726273	
Linhagens/Grupo 4	3	17,451405	
Tratamentos/Grupo 5	2	2,200067	
Linhagens/Grupo	11	70,352087	6,395644
Linhagens vs. Test./Grupo 1	1	3,085878	
Linhagens vs. Test./Grupo 2	1	3,119335	
Linhagens vs. Test./Grupo 3	1	3,726830	
Linhagens vs. Test./Grupo 4	1	0,035721	
Linhagens vs. Test./Grupo	4	9,967764	2,491941
Erro/Grupo 1	8	0,167525	
Erro/Grupo 2	8	0,836122	
Erro/Grupo 3	8	0,416246	
Erro/Grupo 4	10	0,296340	
Erro/Grupo 5	6	0,276781	
Erro/Grupo	40	1,993014	0,049825

Apêndice 6. Análise reunida da variância para o caráter atividade elastolítica determinada a 450nm.

	GL	SQ	$\overline{QM}$
Linhagens/Grupo 1	2	110,4773	
Linhagens/Grupo 2	2	47,7974	
Linhagens/Grupo 3	2	74,6880	
Linhagens/Grupo 4	3	43,1966	
Tratamentos/Grupo 5	2	25,2352	
Linhagens/Grupo	11	301,3945	27,3995
Linhagens vs. Test./Grupo 1	1	11,1890	
Linhagens vs. Test./Grupo 2	1	44,9347	
Linhagens vs. Test./Grupo 3	1	7,8116	
Linhagens vs. Test./Grupo 4	1	0,4267	
Linhagens vs. Test./Grupo	4	64,3620	16,0905
Erro/Grupo 1	8	0,6416	
Erro/Grupo 2	8	0,5976	
Erro/Grupo 3	8	1,4531	
Erro/Grupo 4	10	4,8285	
Erro/Grupo 5	6	2,1398	
Erro/Grupo	40	9,6606	0,2415

Apêndice 7. Análise reunida da variância para o caráter
atividade elastolítica determinada a 280 nm.

	GL	SQ	$\overline{QM}$
Linhagens/Grupo 1	2	986,6973	
Linhagens/Grupo 2	2	426,4298	
Linhagens/Grupo 3	2	525,1233	
Linhagens/Grupo 4	3	377,5586	
Tratamentos/Grupo 5	2	201,0236	
Linhagens/Grupo	11	2516,8326	228,8030
Linhagens vs. Test./Grupo 1	1	96,3015	
Linhagens vs. Test./Grupo 2	1	491,2872	
Linhagens vs. Test./Grupo 3	1	98,8699	
Linhagens vs. Test./Grupo 4	1	25,6629	
Linhagens vs. Test./Grupo	4	712,1515	177,0304
Erro/Grupo 1	8	8,8517	
Erro/Grupo 2	8	5,2726	
Erro/Grupo 3	8	15,1902	
Erro/Grupo 4	10	33,5215	
Erro/Grupo 5	6	15,1250	
Erro/Grupo	40	77,9610	1,9490

Apêndice 8. Análise reunida da variância para o caráter
massa seca.

	GL	SQ	$\overline{QM}$
Linhagens/Grupo 1	2	54,31	
Linhagens/Grupo 2	2	250,49	
Linhagens/Grupo 3	2	51,63	
Linhagens/Grupo 4	3	259,69	
Tratamentos/Grupo 5	2	53,23	
Linhagens/Grupo	11		60,85
Linhagens vs. Test./Grupo 1	1	10,13	
Linhagens vs. Test./Grupo 2	1	5,52	
Linhagens vs. Test./Grupo 3	1	162,14	
Linhagens vs. Test./Grupo 4	1	8,07	
Linhagens vs. Test./Grupo	4		46,40
Erro/Grupo 1	8	35,22	
Erro/Grupo 2	8	119,18	
Erro/Grupo 3	8	7,41	
Erro/Grupo 4	10	82,34	
Erro/Grupo 5	6	12,05	
Erro/Grupo	40		6,40