ASPECTOS GENÉTICOS DA PARAMEIOSE VIA FUSÃO DE PROTOPLASTOS
EM *METARRHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.) SOROKIN

MARINA ESTHER VEGA

-Bióloga-

Orientador: Prof^a Dr^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

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

PIRACICABA

ESTADO DE SÃO PAULO-BRASIL

NOVEMBRO - 1990

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

Vega, Marina Esther

V426a Aspectos genéticos da paramiose via fusão de
protoplastos em Metarhizium anisopliae (Metsch.)
Sorokin. Piracicaba, 1991.
95p. ilustr.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fungo entomopatogênico 2. Fusão de protoplas
tos 3. Paramiose 4. Protoplasto I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

ASPECTOS GENÉTICOS DA PARAMEIOSE VIA FUSÃO DE PROTOPLASTOS EM

METARHIZIUM ANISOPLIAE (METSCH.) SOROKIN

Marina Esther Vega

Aprovada em: 04/02/91

Comissão Julgadora:

Prof^a Dr^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

ESALQ/USP

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Cláudio Luiz Messias

UNICAMP

Prof^a Dr^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

Orientador

Aos meus pais, irmão,
esposo e filha

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Aline A. Pizzirani-Kleiner pela orientação, apoio e estímulo;

Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, a quem muito admiro, pelas facilidades iniciais concedidas;

À Maria Helena Fungaro e Eduardo Bagalhi, pelas valiosas sugestões, incentivo e auxílio nas horas difíceis;

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos em especial Cláudio Costa, Marisa V. de Queiroz e Ida C. Pimentel, pela convivência e cooperação amiga;

Aos funcionários Antônio J. Rocha Campos, Carlos A. Nolasco, e Sandra R. Campos do Laboratório de Genética de Microrganismos, pela ajuda na execução da parte experimental;

À bibliotecária Eliana Maria Garcia Sabino, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo;

À Marina Y. Murayama e Selma T. Ohashi, pela amizade e alegre convivência;

Aos meus pais Martín e Delia pelo amor, compreensão e apoio constantes;

À Daniel Fernando e Maria Fernanda por tudo que são e significam.

À Sra. Elisa S. Peron, pelo excelente trabalho datilográfico.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O Fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	3
2.1.1. Classificação e descrição	3
2.1.2. Estudos genéticos e obtenção de linhagens melhoradas	5
2.2. Protoplastos	10
2.2.1. Protoplastos de micélio	10
2.2.2. Protoplastos de conídios	20
2.3. Parameiose em Fungos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Linhagens Utilizadas	24
3.1.1. Símbolos e fenótipos dos mutantes	25
3.2. Meios de Cultura e Soluções Utilizadas	26
3.3. Preparo de Filtro e Palitos de Transferência de Colônias	33
3.4. Esterilização e Incubação	34
3.5. Teste de Reversão dos Mutantes	34
3.6. Produção de Protoplastos de Micélio	34

	Página
3.6.1. Contagem de protoplastos	35
3.6.2. Teste de reversão	35
3.6.3. Regeneração dos protoplastos	35
3.7. Fusão de Protoplastos de Micélio	36
3.7.1. Frequência de fusão	37
3.7.2. Análise dos produtos de fusão	37
3.8. Coloração de Núcleos de Protoplastos de Micélio	37
3.9. Coloração de Núcleos de Conídios	39
3.10. Produção de Protoplastos de Conídios	40
3.10.1. Regeneração dos protoplastos de conídios	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Teste de Reversão	42
4.2. Obtenção, Regeneração e Citologia de Protoplastos de Micélio	42
4.3. Fusão de Protoplastos de Micélio	47
4.3.1. Análise genética	47
4.4. Obtenção e Regeneração de Protoplastos de Conídios	63
5. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE TABELAS

Tabela nº		Página
1	Soluções estoque de suplementos adicionados ao meio mínimo	28
2	Número de protoplastos obtidos e porcentagem de regeneração em diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i>	45
3	Porcentagem de protoplastos com diferente número de núcleos nas linhagens E ₆ , E ₉ e R _J	45
4	Cruzamentos inter e intra-linhagens de <i>M. anisopliae</i> e frequência de fusão para cada cruzamento	48
5	Número de colônias desenvolvidas nos meios seletivos utilizados nos diferentes cruzamentos	49
6	Segregantes obtidos por fusão de protoplastos entre linhagens de <i>M. anisopliae</i>	58
7	Segregantes obtidos nos diferentes meios seletivos. Cruzamento E ₆ x E ₉	61
8	Obtenção de protoplastos de conídios da linhagem E ₉ 20 de <i>M. anisopliae</i>	65

LISTA DE FIGURAS

Figura nº	Página
1	Esquema seguido para a análise genética dos cruzamentos realizados via fusão de protoplastos 38
2	Protoplastos da linhagem E ₉ 20 obtidos após 3 horas de digestão com enzimas líticas. Coloração em Giemsa 46
3	Colônias desenvolvidas após tratamento com PEG (polietileno glicol), com 10 dias de crescimento 51
4	Colônias muito esporuladas resultantes de fusão de protoplastos entre as linhagens E ₆ x E ₉ . Cruzamento 8 x 20 52
5	Colônias pouco esporuladas resultantes de fusão de protoplastos entre as linhagens E ₆ x E ₉ . Cruzamento 8 x 20 53
6	Colônia heterocariótica resultante de fusão de protoplastos entre as linhagens E ₆ x E ₉ . Cruzamento 7 x 20 54
7	Colônias instáveis resultantes de fusão de protoplastos entre as linhagens E ₆ x E ₉ . Cruzamento 8 x 20 55
8	Prováveis aneuplóides apresentando crescimento lento e baixa esporulação, resultantes de fusão de protoplastos entre as linhagens E ₆ x E ₉ . Cruzamento 7 x 20..... 56
9	Conídios uninucleados da linhagem E ₉ 20 de <i>M. anisopliae</i> , com 8 dias de crescimento 66

Figura nº		Página
10	Aglomeração de conídios e liberação de protoplas- tos após 6 horas de incubação com enzima lítica. Linhagem E ₉ 20	67
11	Protoplasto emergindo da região apical da parede do esporo. Linhagem E ₉ 20	68

ASPECTOS GENÉTICOS DA PARAMEIOSE VIA FUSÃO DE PROTOPLASTOS
EM *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.) SOROKIN

Autor: Marina Esther Vega

Orientador: Prof^a Dr^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

RESUMO

Com o objetivo de verificar o fenômeno da parameiose em *Metarhizium anisopliae*, mutantes das linhagens E₆, E₉ e R_J, com duas marcas auxotróficas e uma marca morfológica, foram utilizados para a realização de cruzamentos via fusão de protoplastos. Através da análise genética dos produtos de fusão detectou-se a ocorrência de recombinantes auxotróficos, com evidências de recombinação mitótica, não recuperando-se o diplóide. Este fato demonstra a alta instabilidade da fase diplóide e comprova a ocorrência de parameiose nesta espécie. Prováveis aneuplóides foram isolados, os que poderiam ter sido originados pelo desarranjo cromossômico dos diplóides em processo de haploidização.

Por outro lado, descreveu-se o método de produção de protoplastos de conídios. A obtenção dos mesmos, abre a possibilidade de sua utilização em futuros estudos de transformação genética, uma vez que estes protoplastos são mais adequados para essa finalidade.

GENETIC ASPECTS OF PARAMEIOSIS BY PROTOPLAST FUSION
IN *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCH.) SOROKIN

Author: Marina Esther Vega

Adviser: Prof^a Dr^a Aline A. Pizzirani-Kleiner

SUMMARY

Aiming to study parameiosis in *Metarhizium anisopliae*, mutants of the strains E₆, E₉ and R_J, with two auxotrophic marks and a morphological one, were crossed by protoplast fusion. Through the genetical analysis of the fusion products it was detected auxotrophic mutants, evidencing mitotic recombination and the diploid was not recovered. This fact shows the high instability of the diploid phase and confirms the occurrence of parameiosis in this species. Some supposed to be aneuploids were isolated and it might, be possible they were originated by chromosomal disarrangements during haploidization.

A protoplasting method from conidia was described as well. It might be used in future genetic transformation experiments since this kind of protoplasts suit better the process.

1. INTRODUÇÃO

A crescente resistência dos insetos pragas aos defensivos agrícolas e sua persistência no ambiente com consequente poluição ambiental provocada pelos mesmos, assim como os altos custos, tem contribuído para que o controle biológico assuma atualmente grande importância. Larga gama de microorganismos tem sido usada nas tentativas de controle biológico, dentre os quais, o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, destaca-se como um potencial agente de biocontrole, assumindo grande importância econômica principalmente no Brasil, onde vem sendo utilizado em escala comercial no controle de pragas das pastagens e de cana-de-açúcar.

Uma grande variabilidade natural já foi detectada neste fungo, onde caracteres desejáveis para o controle biológico podem ser encontrados em linhagens de diferentes origens e regiões. Esta variabilidade pode ser ampliada pelo uso de agentes mutagênicos e por recombinação, métodos úteis para o desenvolvimento de linhagens superiores para o biocontrole.

Embora cruzamentos entre diferentes linhagens pelo ciclo parassexual clássico e pela técnica de fusão de protoplastos foram descritos, poucas informações ainda existem sobre os detalhes destes processos, bem como sobre o fenômeno da paramiose, recentemente verificado nesta espécie.

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Realizar cruzamentos entre e dentro de linhagens por meio da fusão de protoplastos com a finalidade de ampliar os conhecimentos sobre a paramiose em *Metarhizium anisopliae*.
- Determinar metodologia para a obtenção de protoplastos de conídios e compará-los com protoplastos oriundos de micélio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Fungo *Metarhizium anisopliae*

2.1.1. Classificação e descrição

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um Deuteromiceto pertencente à ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* e foi descrito pela primeira vez por METSCHNIKOFF em 1879. Este pesquisador realizou o primeiro trabalho de controle microbiano aplicando o *M. anisopliae* para controle de larvas do besouro *Anisoplia austriaca*. A partir dessa época, este fungo vem sendo estudado sobre muitas espécies de insetos. Acredita-se que esse patógeno ocorra naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos das diferentes ordens, incluindo pragas importantes (ALVES, 1986).

A espécie *M. anisopliae* apresenta duas variedades: a var. *anisopliae* (também conhecida como *minor*) e a var. *major*, separadas quanto ao tamanho dos conídios. A var. *anisopliae* apresenta-se com conídios de 3,5 a 9,0 μm de comprimento e a var. *major* com conídios de 9,0 a 18 μm de comprimento (TULLOCH, 1976).

A possibilidade de que a var. *major* seja um diplóide natural foi sugerida por TINLINE & NOVIELLO (1971) e observações realizadas por SAMUELS *et alii* (1989) apoiam esta idéia. Segundo estes autores, o aumento na resistência à luz ultravioleta e a dificuldade na obtenção de mutantes auxotróficos, assim como medidas do volume nuclear, proporcionam evidências de que isolados da var. *major* são diplóides naturais estáveis.

Este fungo apresenta geralmente conídios uninucleados (TINLINE, 1971) com pequena proporção de binucleados (LUNA, 1985; BAGALHI, 1987) ou mesmo multinucleados (LUNA, 1985). As hifas são frequentemente uninucleadas em seus segmentos hifais, podendo ocorrer dois ou mais núcleos, ou mesmo segmentos multinucleados em pontas de hifas. A ocorrência de anastomose entre hifas, facilita a obtenção de heterocários (TINLINE & NOVIELLO, 1971).

A temperatura ótima para o desenvolvimento e esporulação do *M. anisopliae* situa-se entre 27°C-28°C, sendo que, à temperaturas inferiores ocorre um retardamento no desenvolvimento, aumento na formação do micélio e redução na formação de conídios (FERRON, 1978). Em temperaturas superiores a 32°C ocorre uma rápida redução na germinação e no desenvolvimento, a qual não se recupera após exposição à 37°C por 96 horas (SANTOS, 1978). É tolerante a uma faixa de pH de 2,0 a 8,5, sendo que 6,9 é a melhor condição para o seu desenvolvimento e esporulação (VEEN, 1968).

Estudos visando a aplicação de *M. anisopliae* como bioinseticida vem sendo desenvolvidos em vários países onde este entomopatôgeno oferece possibilidades no controle de pragas de interesse agrônômico, como *Nilaparvata lugens*, importante praga do arroz (SAMUELS *et alii*, 1989); *Liriomyza* spp. mosca minadora de folhas de plantas cultivadas (BORDAT *et*

alii, 1988); *Brontispa longissima*, praga das palmáceas (LIU *et alii*, 1989); *Perkinsiella saccharicida*, *Aeneolamia varia saccharina*, pragas em cana-de-açúcar (RICO & VICTORIA, 1988; ALLARD *et alii*, 1990) entre outras.

No Brasil, este fungo vem sendo utilizado no controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* e *Mahanarva fimbriolata* (ALVES, 1986), e das pastagens, *Deois flavopicta* e *Zulia entreri* (VEIGA, 1979). Também tem sido verificado sua patogenicidade em outros insetos pragas como *Diatraea saccharalis* (ALVES *et alii*, 1984); *Hypothenemus hampei* (LECUONA *et alii*, 1986); *Ceratitis capitata* (GARCIA *et alii*, 1989); *Solenopsis* spp (STIMAC *et alii*, 1987); *Atta sexdens piriventris* (DIEHL-FLEIG *et alii*, 1988); *Oebalus poecilus* (MARTINS *et alii*, 1987); bem como em insetos de interesse médico como *Rhodnius prolixus* (SILVA & MESSIAS, 1985) e *Panstrongylus prolixus* (MARINHO *et alii*, 1987).

2.1.2. Estudos genéticos e obtenção de linhagens melhoradas

2.1.2.1. Caracterização

Para a produção massal do fungo *M. anisopliae* visando sua aplicação no campo, é necessária a sua caracterização a nível de raças, uma vez que o mesmo apresenta naturalmente uma grande variabilidade (ALVES *et alii*, 1986).

A caracterização de raças deste fungo tem sido realizada utilizando-se características ou qualidades dos isolados, tais como, virulência (SOSA GOMEZ & ALVES, 1983), especificidade, crescimento e esporulação, observações de conídios em microscópio eletrônico (HAMMIL, 1972), padrões eletroforéticos (DE CONTI *et alii*, 1980; SOSA GOMEZ

et alii, 1984) e enzimas extracelulares (ROSATO *et alii*, 1981, SOSA GOMEZ & ALVES, 1983).

A técnica de cromatografia gasosa foi utilizada por MESSIAS *et alii* (1983) como método auxiliar na identificação de linhagens de *M. anisopliae* procedentes de diferentes locais do Brasil. ALVES *et alii* (1986) empregaram a análise fenética para a separação de onze isolados através de 16 caracteres usando-se a análise de taxonomia numérica e a análise de ordenação de componentes principais. RIBA *et alii* (1987) consideraram a patogenicidade ao inseto *Ostrinia nubilalis* e padrões isoenzimáticos para a caracterização de 27 isolados de *M. anisopliae* oriundos de diferentes regiões brasileiras.

2.1.2.2. Mutação

A mutagênese tem sido empregada por vários autores visando a produção de genes marcadores para a análise genética dos cruzamentos. Assim, numerosas linhagens auxotróficas, resistentes a drogas e mutantes para coloração foram obtidas em *M. anisopliae* (MESSIAS, 1979; FRIGO, 1983; SILVEIRA, 1983, SILVEIRA & AZEVEDO, 1984; BAGALHI, 1987; HEALE *et alii*, 1989). Entretanto, este processo pode afetar vários loci simultaneamente ou devido a efeitos pleiotrópicos as linhagens marcadas auxotroficamente, podem apresentar uma perda significativa da patogenicidade em relação aos progenitores do tipo selvagem (GARCIA *et alii*, 1985; MESSIAS *et alii*, 1986; BAGALHI, 1987).

O método de indução de mutação tem sido utilizado em *M. anisopliae* visando a obtenção de linhagens mais eficientes no controle biológico, e vários isolados apresentaram aumento na virulência depois do

tratamento com mutagênicos (AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978; AL-AIDROOS & SEIFERT, 1980). SILVA *et alii* (1989) ensaiaram a virulência a *Triatoma infestans* de mutantes com altos níveis de atividade amilolítica, lipolítica e proteolítica. Isolados selecionados para amilase e lipase mostraram maior virulência do que a linhagem original, porém, isolados selecionados para protease apresentaram virulência igual ou menor. Esta relação entre atividade amilolítica, lipolítica e virulência também foi encontrada por SILVA & MESSIAS (1985). Já, HEALE *et alii* (1989) observaram incremento na patogenicidade a *Nilaparvata lugens* em mutante com alto grau de atividade proteolítica.

2.1.2.3. Recombinação

Através da recombinação é possível combinar características desejáveis em uma única linhagem. Os processos de recombinação conhecidos no fungo *M. anisopliae* são, o ciclo parassexual e a técnica de fusão de protoplastos, através dos quais, observou-se a obtenção de diplóides e posterior obtenção de recombinantes ou recombinantes obtidos diretamente via parameiose (BAGALHI, 1987; AZEVEDO *et alii*, 1990).

O ciclo parassexual se caracteriza por apresentar: anastomose de hifas com núcleos diferentes (heterocariose), fusão de núcleos haplóides, permuta mitótica e haploidização (PONTECORVO, 1956). Sua descrição em *M. anisopliae*, com ocorrência de heterocários, diplóides e recombinantes estáveis, foi feita pela primeira vez por MESSIAS (1979) e MESSIAS & AZEVEDO (1980), sendo confirmado quase simultaneamente por AL-AIDROOS (1980). Desde sua descoberta diversos aspectos genéticos tem sido estudados neste fungo.

BERGERON & MESSING AL-AIDROOS (1982) analisaram a segregação de oito marcas genéticas e localizaram estes genes em cinco possíveis grupos de ligação. MAGOON & MESSING AL-AIDROOS (1986) fizeram o mapeamento de mais duas marcas genéticas nestes cinco grupos de ligação e propuseram a existência de duas vias metabólicas para a biossíntese da pigmentação dos conídios.

Diversos critérios tem sido considerados para diferenciar diplóides, haplóides e recombinantes obtidos pelo ciclo parassexual. Assim temos: tamanho de conídios, relação entre o diâmetro dos núcleos e o tamanho dos conídios, morfologia das colônias, estabilidade das colônias em presença de benlate, diâmetro dos núcleos dos conídios, número de núcleos por conídio e quantificação do DNA dos conídios (MESSIAS & AZEVEDO, 1980; SILVEIRA, 1983; MAGOON & MESSING AL-AIDROOS, 1984; LUNA & AZEVEDO, 1985; BAGALHI, 1987).

Em alguns casos, o cruzamento no ciclo parassexual é impedido devido à incompatibilidade genética entre linhagens desta espécie (SILVEIRA, 1983; FRIGO, 1983; BAGALHI, 1987). Nestas ocasiões, a técnica de fusão de protoplastos tem sido empregada com sucesso.

A protoplastização de *M. anisopliae* foi descrita por SILVEIRA (1983) e SHIMIZU & KURISU (1987). O primeiro autor indica o uso de uma mistura de enzimas constituída por celulase CP e Novozym 234 para a obtenção de protoplastos. Já, SHIMIZU & KURISU (1987) utilizaram zimoliase 20-T e prévio prétratamento do micélio com 2-mercaptoetanol, o que incrementou a produção de protoplastos em cinco vezes. Neste trabalho foram observados três padrões de regeneração: no primeiro tipo ocorre a formação do tubo germinativo a partir do protoplasto; no segundo tipo o protoplasto dá

origem a uma cadeia de células leveduriformes e o tubo germinativo é formado a partir da célula terminal; o terceiro tipo é semelhante ao anterior com exceção de que a cadeia de células leveduriformes não apresenta desenvolvimento hifal.

A metodologia de fusão de protoplastos foi definida por SILVEIRA (1983) e SILVEIRA & AZEVEDO (1987). Estes autores observaram uma alta frequência de fusão dentro e entre linhagens que variou de 0,9 a 44,1 em 10^5 protoplastos.

Uma variação desta técnica, a técnica do "doador morto", permite que cruzamentos sejam realizados sem a necessidade de indução de marcadores genéticos em uma das linhagens parentais (HOPWOOD & WRIGHT, 1981). Segundo FRIGO (1983), esta técnica mostrou-se efetiva na obtenção de diplóides e segregantes entre linhagens distintas de *M. anisopliae*. Por sua vez, HEALE *et alii* (1989) obtiveram baixa frequência de fusão e ressaltam a dificuldade de se obter recombinação genética através desta metodologia.

Recentemente, uma nova técnica de seleção dos produtos de fusão, empregando uma linhagem selvagem e uma linhagem resistente à drogas foi aplicada a *M. anisopliae* (HEALE *et alii*, 1989). Em estudos preliminares estes autores determinaram que o caráter resistência a drogas apresenta herança nuclear, podendo ser utilizado como uma marca para a seleção dos produtos de fusão nuclear entre duas linhagens parentais viáveis.

Embora a recombinação de caracteres simples ou poligênicos seja possível através dos processos mencionados, poucos trabalhos foram feitos no sentido de comparar a patogenicidade dos produtos de cruzamentos

em relação às linhagens parentais. HEALE *et alii* (1989) relataram a obtenção de sucesso no melhoramento de *M. anisopliae* utilizando-se do ciclo parassexual. Estes autores obtiveram recombinantes que apresentaram patogenicidade semelhante a um parental selvagem e alta capacidade de esporulação, semelhante ao outro parental. Segundo BAGALHI (1987) recombinantes prototróficos híbridos obtidos pelo ciclo parassexual têm sua virulência restaurada, podendo ser superiores às linhagens parentais selvagens.

Os trabalhos feitos para explorar a virulência dos diplóides obtidos nesta espécie, apresentam resultados controversos. Assim, GARCIA *et alii* (1985) mostraram que o diplóide foi menos efetivo em provocar a mortalidade de *Ceratitis capitata* do que a linhagem selvagem E₉. Entretanto, VALADARES *et alii* (1985) demonstraram que os diplóides eram muito mais efetivos do que as linhagens parentais em provocar a mortalidade de *Nezara viridula* e de *Spodoptera frugiperda*. Já, RIBA *et alii* (1985) e MESSIAS *et alii* (1986) observaram que os diplóides apresentaram patogenicidade semelhante ao parental selvagem quando testados sobre os insetos *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, *Culex pipiens*, *Ostrinia nubilalis* (RIBA *et alii*, 1985) e *Rhodnius prolixus* (MESSIAS *et alii* 1986).

2.2. Protoplastos

2.2.1. Protoplastos de Micélio

2.2.1.1. Isolamento

Com poucas exceções os protoplastos não estão presentes na natureza e são produzidos artificialmente (PEBERDY, 1979). Normalmente o

isolamento envolve a digestão total ou perfuração localizada da parede celular por enzimas líticas, permitindo que o conteúdo celular envolvido pela membrana celular seja liberado mantendo-se estável em meio hipertônico.

Os primeiros relatos sobre isolamento de protoplastos em fungos filamentosos foram feitos por EMERSON & EMERSON (1958) e BACHMANN & BONNER (1959) em *Neurospora crassa*. Estes autores relataram o sucesso da aplicação do suco digestivo de *Helix pomatia* como complexo lítico, avaliado mais tarde como helicase, glusulase, β -glucoronisade e fosfatase (DAVIS, 1985). Entretanto, a eficiência deste sistema lítico tem sido limitada a algumas espécies tais como: *Aspergillus nidulans* (FERENCZY *et alii*, 1975), *Curvularia inaequalis* e *Trichoderma reesei* (LAURILA *et alii*, 1985).

A maioria dos grupos que trabalham com fungos filamentosos consideram que a produção de complexos enzimáticos a partir de microrganismos é o caminho mais eficaz para a obtenção de protoplastos. Um grande número de microrganismos apresenta atividade micolítica, e dentre estes os mais utilizados tem sido as espécies de *Streptomyces* (GIBSON & PEBERDY, 1972; FAWCETT *et alii*, 1973; BENITEZ *et alii*, 1975; HEESWIJCK, 1984; BILlich *et alii*, 1988), de *Trichoderma* (DAVIS *et alii*, 1977; KEVEL & PEBERDY, 1984; KOMEL *et alii*, 1985; KITAMOTO *et alii*, 1988) e de *Penicillium* (MUSILKOVA *et alii*, 1969; PEREZ *et alii*, 1986; SZAJER *et alii*, 1989).

Em muitos casos a síntese do complexo enzimático pelo organismo lítico requer a presença de substratos indutores no meio de crescimento. Estes meios de cultura na sua grande maioria têm sido supridos com micélio homogeneizado esterilizado do organismo do qual se quer produzir protoplastos (GIBSON & PEBERDY, 1972; ANNE *et alii*, 1974), ou com parede

celular purificada (DAVIS *et alii*, 1977; BEHLING & FICHER, 1980). Tentativas têm sido feitas para produzir meios de crescimento mais definidos para a obtenção de enzimas pelo uso de polissacarídeos idênticos ou semelhantes àqueles encontrados em paredes de fungos. Deste modo, a suplementação com quitina e laminarina (BENITEZ *et alii*, 1975; PEBERDY & GIBSON, 1971) ou celulose (SIETSMA & BOER, 1973) têm-se mostrado efetivas.

Tendo em vista que a produção de misturas líticas é um processo demorado, a utilização de enzimas comerciais pode oferecer vantagens de ordem prática. HAMLYN *et alii* (1981) compararam algumas polissacarases comerciais quanto à sua capacidade de liberar protoplastos em várias espécies de fungos. Segundo estes autores, as enzimas variam quanto à sua capacidade de produzir protoplastos e principalmente duas preparações, a Novozym 234 e celulase CP mostraram-se eficientes como agentes líticos. A eficiência das preparações enzimáticas comerciais foi constatada por vários pesquisadores (SILVEIRA, 1983; PICATAGGIO *et alii*, 1983; LYNCH *et alii*, 1985; HAMLYN *et alii*, 1985; KROPP & FORTIN, 1986; DEED & SEVIOUR, 1989; SANDHU *et alii*, 1989).

Devido à complexidade e diversidade da parede celular das hifas, muitas vezes a combinação das enzimas líticas promove melhores resultados na liberação de protoplastos (PFEIFER & KHACHATOURIANS, 1987; JAKSON & HEALE, 1987; PINGYAN e KAIYING, 1987; HUANG *et alii*, 1990).

As preparações de enzimas autolíticas constituem outra alternativa de fonte enzimática para a produção de protoplastos (ISAAC & GOKHALE, 1982; LYNCH *et alii*, 1985). No entanto, o método de autólise tem sido pouco utilizado.

Além das enzimas vários outros parâmetros tem sido analisados na tentativa de maximizar a produção de protoplastos.

A produção e a estabilidade dos protoplastos podem ser afetados pelo tipo e concentração do estabilizador osmótico utilizado. Estes fatores variam de organismo para organismo, de maneira que não existe um estabilizador universal. De forma geral, os sais inorgânicos são os estabilizadores mais apropriados para fungos filamentosos (DAVIS, 1985).

Vários trabalhos demonstram que a idade da cultura é um fator importante na liberação de protoplastos. PEBERDY *et alii* (1976) estudaram o efeito da idade da cultura na liberação de protoplastos em *A. flavus*, *A. nidulans*, *P. chrysogenum*, *Fusarium culmorum* e *N. crassa*. Verificaram que a produção de protoplastos foi maior quando foram usadas culturas na fase exponencial do crescimento. Resultados semelhantes têm sido encontrados por outros autores (TANAKA *et alii*, 1981; PICATAGGIO *et alii*, 1983; KROPP & FORTIN, 1986; LYNCH *et alii*, 1985; PFEIFER & KHACHATOURIANS, 1987; DEED & SEVIOUR, 1989).

A concentração micelial na digestão lítica também exerce influência na protoplastização. PEBERDY *et alii* (1976) demonstraram que a produção máxima de protoplastos em *A. nidulans* e *A. flavus* foi obtida com 30-40mg mL⁻¹ de micélio. Resultados semelhantes tem sido encontrados por LYNCH *et alii* (1985) em *Fusarium tricinctum* e *F. oxysporum*.

Temperatura e pH são fatores que podem afetar a produção de protoplastos uma vez que estão relacionados com a atividade do sistema lítico e dos estabilizadores osmóticos. PEBERDY *et alii* (1976) estudaram o efeito do pH na liberação de protoplastos de *A. nidulans*, *P. chrysogenum*,

F. culmarum e *N. crassa* e verificaram que o pH ótimo esteve entre 6,0 e 6,5. DAVIS *et alii* (1977) observaram que em células gigantes de *A. niger* a produção de protoplastos melhorou com o aumento da temperatura para 40°C e do pH para 7,0. KROPP & FORTIN (1986) reportaram que a temperatura ideal para a protoplastização do basidiomiceto ectomicorrízico *Laccaria bicolor* foi de 30°C.

Vários trabalhos têm relatado a influência do pré-tratamento na produção de protoplastos. Em geral o pré-tratamento envolve a incubação da célula em um composto tiol apropriado ou um detergente (DAVIS, 1985). Assim, DOOIJEWAAARD *et alii* (1973) estimularam a produção de protoplastos em *Geotrichum candidum* pela adição de dithiothreitol, 2-mercapto-etanol ou cisteamina ao meio de incubação. PFEIFER & KHACHATOURIANS (1987) verificaram que o dithiotreitol foi o composto tiol mais eficaz na produção de protoplastos em *Beauveria bassiana*. FAWCETT *et alii* (1973) encontraram que o pré-tratamento do micélio com dithiothreitol foi necessário para obtenção de protoplastos em *Cephalosporium acremonium*. SIETSMA & BOER (1973) observaram que a pré-incubação do micélio com Triton x 100, desoxicolato de sódio e laurilsulfato de sódio estimularam de forma acentuada a formação de protoplastos em *Pythium* sp.

2.2.1.2. Regeneração de Protoplastos

Um importante aspecto dos protoplastos é seu potencial de regenerar, dando origem a hifas normais quando transferidos para um meio nutritivo com um estabilizador osmótico apropriado. No entanto, a frequência de regeneração varia entre as diferentes espécies de fungos filamentosos e inclusive dentro de uma mesma espécie (PEBERDY, 1979).

PEBERDY & GIBSON (1971) sugerem que a incapacidade de alguns protoplastos regenerarem hifas normais pode ser devida à ausência de núcleos ou ao sítio de origem dos protoplastos na hifa parental. Segundo GIRARD *et alii* (1984) a heterogeneidade na intensidade de regeneração observada em protoplastos de *Saprolegnia monoica* está relacionada com a região de origem dos protoplastos. LYNCH *et alii* (1985) consideram que a alta porcentagem de protoplastos anucleados pode ser a causa da baixa frequência de regeneração observada em *F. tricinctum* e *F. oxysporum*. Por outro lado, existem evidências de que a incubação em diferentes sistemas líticos também influencia a capacidade de regeneração dos protoplastos (ISAAC, 1985).

Existem basicamente 3 tipos de padrão morfológico de regeneração dos protoplastos. Num primeiro tipo o protoplasto dá origem a uma cadeia de células leveduriformes e eventualmente a célula terminal produz a hifa. Num segundo padrão de regeneração, os protoplastos produzem uma parede ou concha dentro do qual o citoplasma migra, assim que a cadeia cresce o citoplasma torna-se dividido em duas partes situadas em extremos opostos da cadeia. A razão para a existência destes dois tipos de regeneração não é conhecida, mas sugere-se que a origem dos protoplastos possa ser um fator. É possível que os protoplastos vacuolados são aqueles que produzem desenvolvimento do tipo concha (PEBERDY & GIBSON, 1971; PEBERDY, 1979). Um terceiro tipo de regeneração foi reportado por GARCIA-ACHA *et alii* (1966) no qual ocorre a formação do tubo germinativo diretamente a partir do protoplasto. Este modo de regeneração parece estar relacionado com o meio de cultura utilizado, observando-se geralmente em meio sólido (PEBERDY & GIBSON, 1971; DEED & SEVIOUR, 1989).

Estes padrões de regeneração de protoplastos têm sido observados em diferentes espécies de fungos filamentosos, tais como: *A. nidulans* (PEBERDY & GIBSON, 1971). *Pythium* sp (SIESTMA & BOER, 1973), *P. chrysogenum* (ANNE *et alii*, 1974), *Pyricularia oryzae* (TANAKA *et alii*, 1981), *Sclerotium glucanicum* (DEED e SEVIOUR, 1989).

2.2.1.3. Fusão

O interesse nas técnicas de fusão de protoplastos em fungos surgiu de trabalhos similares com células animais e protoplastos de plantas. As primeiras tentativas de fusão controlada tiveram um sucesso limitado (BINDING, 1974; FERENCZY *et alii*, 1974). Entretanto, em 1975, um eficiente método de fusão foi descrito (ANNE & PEBERDY, 1975), decorrente da aplicação do polietileno glicol como agente fusogênico, cuja eficiência havia sido descoberta previamente em sistemas de protoplastos de plantas (CONSTABEL & KAO, 1974).

O plano geral desses primeiros experimentos e na maioria deles desde então, baseou-se no processo clássico de formação de heterocáries balanceados (PONTECORVO *et alii*, 1953). Os protoplastos usados em experimentos de fusão são obtidos a partir de linhagens que se complementam nutricionalmente e os produtos de fusão são selecionados em meio mínimo de regeneração (PEBERDY, 1985).

ANNE & PEBERDY (1975) estudaram os parâmetros envolvendo solução fusogênica (PEG), pH e concentração de íons cálcio em protoplastos de *P. chrysogenum*. A concentração de PEG foi estabelecida com um ótimo em 30% (p/v) a um tempo de exposição de 10' a 30°C. Segundo PEBERDY *et alii*

(1976) a concentração ótima de PEG para fusões intraespecíficas em protoplastos de *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *P. frequentans*, *P. ramigena* foi de 25%. ANNE & PEBERDY (1976), através de mutantes auxotróficos obtiveram fusões intraespecíficas em *P. chrysogenum*, *P. patulum*, *P. roquefortii*, *A. nidulans* e *Cephalosporium acremonium* e fusões interespecíficas entre *P. chrysogenum* e *P. notatum*. Heterocários foram confirmados pelo crescimento de colônias em meio mínimo e os diplóides por prototrofia, coloração de esporos, tamanho de esporos e conteúdo de DNA.

Estes estudos, com consequente aprimoramento na metodologia de fusão, permitiram que barreiras de incompatibilidades fossem sobrepujadas e significativos progressos tenham sido obtidos com fusões a níveis intra e interespecíficos e intergenéricos.

Assim, a técnica de fusão de protoplastos permitiu obter heterocários entre linhagens de *A. nidulans* vegetativamente incompatíveis e conduzir uma análise genética dos genes de incompatibilidade (Dales & Croft, 1980, citados por PEBERDY, 1985)¹. Além disso, cruzamentos considerados incompatíveis ou difíceis de serem obtidos através de processos normais tem sido realizados entre linhagens de *A. niger* (AZEVEDO & BONATELLI, 1982, DAS *et alii*, 1989), onde linhagens diplóides com maior produtividade de ácido cítrico foram obtidos (KIRIMURA *et alii*, 1988). Já, USHIJIMA *et alii* (1987) obtiveram por haploidização dos diplóides heterozigóticos, recombinantes haplóides com alta produtividade enzimática em *A. sojae*. OGAWA *et alii* (1988) demonstraram através desta técnica a existência do ciclo parassexual em *A. awamori*.

¹ DALES, R.B.G. & CROFT, J.H. Protoplast fusion and the genetical analysis of vegetative incompatibility in *Aspergillus nidulans*. In: FERENCZY, L. & FARKAS, G.L., ed. Budapest. Akademiai Kiadó, Oxford, Pergamon Press, 1980. p.77-84.

HAMLIN *et alii* (1985) usando a técnica de fusão de protoplastos determinaram o número de grupos de ligação e localização de marcas genéticas em *C. acremonium*, onde a frequência de formação de heterocários via ciclo parassexual é muito baixa.

OGAWA *et alii* (1989) confirmaram a existência do ciclo parassexual em *Trichoderma reesei* e a possibilidade de sua aplicação no melhoramento da produção de enzimas através de fusão de protoplastos. STASZ *et alii* (1988), PE'ER & CHET (1990) reportaram a fusão de protoplastos entre linhagens de *T. harzianum* visando a obtenção de linhagens mais eficientes no controle biológico. A fusão intraespecífica de protoplastos também foi observada em outros fungos como *Verticillium lecani* (JACKSON & HEALE, 1987), *B. bassiana* (PACCOLA-MEIRELLES, 1988), *T. pseudokoningii* (FURLANETO, 1989), *Humicola* sp (NEIROTTI ROUMAS, 1988).

Em basidiomicetos, foi relatada a obtenção de heterocários e subsequente formação de corpos de frutificação em cruzamentos intraespecíficos (*Coprinus cinereus*, KIGUCHI & YANAGI, 1985, YANAGI *et alii*, 1988, (*Pleurotus salmoneo-stamineus*, TOYOMASU & MORI, 1987b), *Pleurotus cornucopiae*, MAGAE *et alii*, 1986) e interespecíficos (*Pleurotus* spp, TOYOMASU & MORI, 1987a).

KEVEI & PEBERDY (1984) realizaram fusões entre várias espécies do grupo *A. nidulans*. As colônias primárias resultantes das fusões foram heterocários interespecíficos, mas em alguns casos o cultivo prolongado destes heterocários em meio seletivo resultou em híbridos interespecíficos como consequência da fusão nuclear somática. VIALTA (1987) obteve fusão entre mutantes auxotróficos de *A. niger* e *A. awamori*. Na segregação

dos híbridos interespecíficos houve uma distribuição ao acaso dos grupos de ligação, semelhante ao esperado para um diplóide intraespecífico, sugerindo alto grau de homologia cromossômica entre as duas espécies.

A técnica de fusão de protoplastos também tem possibilitado a hibridação entre espécies do gênero *Penicillium*. Em sua revisão, ANNE & PEBERDY (1985) relatam trabalhos envolvendo cruzamentos entre espécies estreitamente relacionadas e espécies com menor grau de parentesco, dando ênfase na importância deste tipo de híbrido no estudo da homologia genética entre espécies. Segundo estes autores a viabilidade dos heterocários interespecíficos pode estar correlacionada com a relação taxonômica das espécies envolvidas.

A recombinação genética interespecífica entre fungos produtores de β -lactâmicos do gênero *Cephalosporium* e *Emmericellopsis* através da fusão de protoplastos foi reportada por MINUTH & ESSER (1983). Estes autores também realizaram fusões intergenéricas entre *C. acremonium* e *Paecilomyces carneus* e, *C. acremonium* e *E. glabra*, no primeiro cruzamento foram isolados recombinantes porém, no segundo cruzamento somente foram obtidas colônias heterocarióticas.

Segundo o trabalho de KIRIMURA *et alii* (1989) a hibridação entre *A. niger* e *T. viride* resultou no crescimento de colônias heterocarióticas com morfologia mista entre os dois parentais e colônias prototróficas haplóides com o tipo morfológico de *A. niger*.

A fusão de protoplastos também tem contribuído para a realização de outros estudos. Experimentos de transferência de genes através de plasmídios, baseados nos métodos de fusão de protoplastos previamente

estabelecidos, tem apresentado grandes progressos e, na atualidade, sistemas de transformação tem sido desenvolvidos para vários fungos filamentosos (BERGES & BARREAU, 1989, WOLOSHUK *et alii*, 1989). Por outro lado esta técnica tem proporcionado as bases para o estudo de recombinação, estrutura molecular e evolução do genoma mitocondrial do gênero *Aspergillus* (CROFT, 1981, FERENCZY, 1985) e tem se mostrado útil para o estudo de transmissão de vírus (PINGYAN & KAIYING, 1987).

2.2.2. Protoplastos de conídios

Tal como foi abordado anteriormente, para o isolamento de protoplastos em fungos filamentosos geralmente utiliza-se o micélio. No entanto, por causa de seu sítio de origem, estes protoplastos são heterogêneos quanto à constituição de organelas e função bioquímica (GIBSON & PEBERDY, 1972). Assim, e tendo em vista que as suspensões homogêneas de protoplastos seriam mais apropriadas para estudos de genética e fisiologia, os esporos constituem uma fonte útil de protoplastos uma vez que estes geralmente são uniformes em tamanho e número de núcleos (BOS & SLAKHORST, 1981).

Porém, o sucesso na obtenção de protoplastos de esporos de fungos filamentosos tem sido limitado a algumas espécies e poucos trabalhos tem sido publicados.

O primeiro trabalho neste sentido foi o de EMERSON & EMERSON (1958) que obtiveram protoplastos de macroconídios de um mutante osmótico de *N. crassa* através de tratamentos com hemicelulase. Entretanto, estes protoplastos foram menos uniformes que os originados de hifa. Já, BACHMANN & BONNER (1959) usando o suco digestivo de *Helix pomatia* como

complexo lítico, observaram que em muitos casos os protoplastos não emergem dos conídios permanecendo como estruturas esféricas dentro da parede parcialmente digerida. Este fato também foi observado por GARCIA ACHA *et alii* (1964) que reportaram a dificuldade de se obter verdadeiros protoplastos quando esporos de *Fusarium culmorum* foram tratados com uma preparação enzimática de *Streptomyces* sp.

A liberação de protoplastos depende em grande parte do tipo de enzima usada, e muitas vezes a combinação de enzimas promove melhores resultados. Segundo BOS & SLAKHORST (1981) a enzima *Oerskovia* demonstrou ser essencial para a formação de protoplastos em *A. nidulans*, onde aproximadamente 80% dos conídios foram convertidos em protoplastos. STASZ (1988) reporta que a mistura lítica constituída por driselase, glucoronidase, quitinase e Novozym 234 foi muito mais eficaz na produção de protoplastos de *T. harzianum* que o uso destas enzimas individualmente.

As condições de crescimento também parecem influenciar na produção de protoplastos de conídios. MOORE & PEBERDY (1976) reportaram o sucesso na produção de protoplastos de conídios de *A. flavus* produzidos em meio de cultura líquido, entretanto, os conídios obtidos em meio de cultura sólido foram altamente resistentes à digestão.

Os mesmos pesquisadores observaram que a produção de protoplastos decresce com o aumento da idade dos esporos. Esporos jovens são muito mais suscetíveis a protoplastização do que esporos maduros. Similarmente, TOYAMA *et alii* (1984) obtiveram alta produção de protoplastos quando conídios imaturos de *Trichoderma reesei* foram tratados com uma preparação enzimática de *T. viride*.

A sensibilidade dos esporos às enzimas líticas pode ser aumentada com a adição de uma etapa de pré-incubação. Segundo BOS & SLAKHORST (1981) a produção de protoplastos em *A. niger* e *A. nidulans* foi maior quando os conídios foram pré-incubados na presença de 2-deoxi-D-glucose. Já, PFEIFER & KHACHATOURIANS (1987) observaram que os conídios de *B. bassiana* pré-incubados em dithiothreitol e tratados com uma mistura enzimática de celulase, quitinase, β glucoronidase e lisozima foram totalmente resistentes à lise.

2.3. Parameiose em Fungos

O termo parameiose foi proposto por BONATELLI Jr. *et alii* (1983) para designar o fenômeno de instabilidade dos núcleos diplóides heterozigóticos, os quais apresentam uma alta taxa de recombinação e haploidização nas hifas heterocarióticas, guardando semelhanças com o processo meiótico (BAGALHI, 1987). Este fato foi detectado através do estudo de cruzamentos pelo ciclo parassexual de linhagens auxotróficas de *A. niger*. A ocorrência de diplóides instáveis neste organismo foi previamente relatada por outros autores (CHANG & TERRY, 1973, DAS & ILCZUK, 1978).

Este fenômeno de alta instabilidade do diplóide heterozigótico foi observado também em outros fungos como *Verticillium albo-atrum* (HASTIE, 1964), *V. dahliae* (PUHALLA e MAYFIELD, 1974), *V. lecanii* (JAKSON & HEALE, 1987), *Penicillium patulum* (CALAM *et alii*, 1973), *C. acremonium* (BALL & HAMLYN, 1982 e HAMLYN *et alii*, 1985) e *Beauveria bassiana* (PACCOLA-MEIRELLES, 1988).

Em estudos realizados por McGeary & Hastie (1981)¹ citados por JACKSON & HEALE (1987) com linhagens auxotróficas de *V. albo-atrum*, observou-se que a instabilidade do diplóide foi influenciada pelas marcas auxotróficas utilizadas. Segundo estes autores, um dos núcleos do diplóide apresentaria além da mutação auxotrófica uma mutação cromossômica; a heterogeneidade neste ponto de aberração cromossômica ocasionara a instabilidade.

Em *M. anisopliae*, estudos realizados por BAGALHI (1987) através de cruzamentos intra e inter-linhagens utilizando o ciclo parassexual, indicam a ocorrência de parameiose. Este pesquisador interpretou este fenômeno como sendo um possível mecanismo natural de amplificação da variabilidade genética em fungos imperfeitos. Evidências também foram reportadas por SILVEIRA & AZEVEDO (1987), os quais se baseiam na parameiose para discutir a alta instabilidade dos produtos de fusão intra e inter-linhagens deste fungo.

¹ McGEARY, F.M. & HASTIE, A. Hybridization of *Verticillium albo-atrum* strains from tomato and leucerne. In: INTERNATIONAL VERTICILLUM SYMPOSIUM, 3., Bari, Italy, 1981. Abstracts. 1981. p.42.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens Utilizadas

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* utilizadas no presente trabalho, originadas do estoque do Setor de Genética de Microorganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP, estão abaixo relacionadas:

E₆ - (Espírito Santo)

E₉ - (Espírito Santo)

R_J - (Rio de Janeiro)

E₆ - vio₉ met₉ bio₉

E₆ - ylo₈ pir₈ lys₈

E₉ - met₁ lys₃

E₉ - ylo₁ leu₆ rib₈

E₉ - ylo₁ leu₆ ade₉

R_J - vio₁ lys₃ bio₂

Estas linhagens foram originariamente isoladas de insetos adultos de *Deois flavopicta* (Homoptera, cercopidae).

Os mutantes da linhagem E₆ foram obtidos por W.D. SILVEIRA.

Os mutantes das linhagens E₉ e R_J foram obtidos por E. BAGALHI.

3.1.1. Símbolos e Fenótipos dos mutantes

Símbolo	Fenótipo
Mutantes nutricionais:	Requerem:
ade	adenina
bio	biotina
leu	leucina
lys	lisina
met	metionina
pir	piridoxina
rib	riboflavina
Mutantes morfológicos	
ylo	conídios de coloração amarela
vio	conídios de coloração violeta

3.2. Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

3.2.1. Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO *et alii*, 1953)

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCL	0,5g
MgSO ₄ .7H 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%

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

Adicionou-se ao meio mínimo:

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

pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%

3.2.3. Meio Mínimo Líquido (PONTECORVO *et alii*, 1953)

Meio Mínimo (item 3.2.1.) sem adição de ágar.

3.2.4. Meio Completo Líquido (PONTECORVO *et alii*, 1953)

Meio Completo (item 3.2.2.) sem adição de ágar.

3.2.5. Meio Mínimo Líquido para crescimento de micélio

Ao meio mínimo líquido (item 3.2.3.) foram adicionados requisitos nutricionais para cada marca auxotrófica, 2,0g/l de caseína hidrolisada e 5,0g/l de extrato de levedura.

3.2.6. Meio Mínimo Líquido para pré-tratamento dos conídios

A 50ml de MM líquido (item 3.2.3.) foram adicionados 0,125ml de solução 2-deoxy-D-glucose (item 3.2.18) e os requisitos nutricionais para cada marca auxotrófica.

3.2.7. Meio Completo com estabilizador osmótico

Preparado segundo o item 3.2.2., em dupla concentração. No momento do uso foi diluído com KCl 1,4M (item 3.2.22) na proporção de 1:1.

3.2.8. Meio Mínimo com estabilizador osmótico

Preparado segundo o item 3.2.1., em dupla concentração. No momento do uso foi diluído com KCl 1,4M (item 3.2.22) na proporção de 1:1.

3.2.9. Solução de Vitaminas

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

A solução foi esterilizada em banho maria durante 15 minutos e mantida em frasco escuro no refrigerador a 4°C.

3.2.10. Soluções estoque dos suplementos adicionados ao meio mínimo

O estoque dos suplementos foi preparado de acordo com a Tabela 1. As soluções foram esterilizadas em banho maria durante 15 minutos e conservados em refrigerador.

Tabela 1. Soluções estoque de suplementos adicionados ao meio mínimo

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

3.2.11. Solução salina (0,85%)

NaCl	8,5g
água destilada	1.000,0ml

A solução foi distribuída em frascos (10ml para cada frasco) autoclavada e conservada no refrigerador a 4°C.

3.2.12. Solução de "Tween 80" (0,1%)

"Tween 80"	0,1ml
água destilada	99,9ml

A solução foi distribuída em tubos (2,5ml) autoclavada e conservada no refrigerador a 4°C.

3.2.13. Solução de albumina 50% (TANAKA *et alii*, 1979)

Uma clara de ovo foi colocada em um becker e picotada vagarosamente com tesoura durante 1 hora. Filtrou-se e ao filtrado adicionou-se glicerina (v/u) e cristais de cânfora. A solução foi mantida em refrigerador a 4°C.

3.2.14. Solução de Giemsa

Giemsa em pó	1,0g
Glicerina	66,0ml
Metanol	66,0ml

Misturou-se o Giemsa com glicerina a 60°C. Após resfriamento foi adicionado o metanol. Filtrou-se e a solução corante foi

armazenada em frasco escuro a temperatura ambiente.

3.2.15. Solução de HCl 1N

HCl concentrado	82,50ml
-----------------	---------

Água destilada	1.000,0ml
----------------	-----------

A solução foi conservada em frasco escuro.

3.2.16. Solução Sulfocrômica

Dicromato de potássio	15,00g
-----------------------	--------

Ácido sulfúrico	1,00ml
-----------------	--------

Água destilada	150,00ml
----------------	----------

O dicromato de potássio foi dissolvido em 150ml de água e a esta solução foi adicionado cuidadosamente o ácido sulfúrico.

3.2.17. Solução de Triton x 100 (0,1%)

Triton x 100	0,1ml
--------------	-------

Água destilada	99,9ml
----------------	--------

A solução foi autoclavada e conservada no refrigerador a 4°C.

3.2.18. Solução de 2-deoxy-D-glucose (10mg/ml)

2-deoxy-D-glucose	100mg
-------------------	-------

Água destilada	10ml
----------------	------

Manteve-se a solução em refrigerador a 4°C.

3.2.19. Tampão fosfato pH 5.8 (0,2M)

Solução A

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	31,2g
Água destilada	1.000,0ml

Solução B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	35,6g
Água destilada	1.000,0ml

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

3.2.20. Tampão fosfato pH 5,8 (0,02M)

A solução de tampão fosfato 0,2M (pH = 5,8) foi diluída dez vezes em água destilada estéril.

3.2.21. Tampão fosfato pH 6,9 (0,2M)

Solução A

NaH_2PO_4	24,0g
Água destilada	1.000,0ml

Solução B

Na_2HPO_4	28,4g
Água destilada	1.000,0ml

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

3.2.22. Solução de KCl 1,4M pH 5,8

Adicionou-se a 500ml da solução A (tampão fosfato pH 5,8) 104,38g de KCl. Titulou-se com a solução B (tampão fosfato pH 5,8) até atingir pH 5,8. O volume final foi acertado para 1.000ml com tampão fosfato pH 5,8. A solução foi autoclavada e conservada em refrigerador.

3.2.23. Solução de KCl 0,7M pH 5,8

Um volume de KCl 1,4M foi diluído com igual volume de tampão fosfato pH 5,8. A solução foi autoclavada e conservada em refrigerador.

3.2.24. Solução de enzimas para produção de protoplastos de micélio

(HAMLYN *et alii*, 1981)

Estabilizador osmótico KCl 0,7M	1,0ml
"Celulase CP"	2,5mg
"Novozym 234"	2,5mg

3.2.25. Solução de enzimas para produção de protoplastos de conídios

Estabilizador osmótico KCl 0,7M	1,0ml
"Novozym 234"	5,0mg

3.2.26. Solução de polietilenoglicol (PEG) 30%

Solução A

CaCl ₂	11,0g
Água destilada	1.000,0ml

Solução B

Glicina	3,75g
Água destilada	1.000,0ml

pH ajustado para 8,0 com NaOH 4%

Foram adicionados 10,0ml da solução A em 10,0ml da solução B e o volume foi corrigido para 100,0ml com água destilada. O pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4% e adicionado PEG 6.000 em concentração final de 30%.

3.3. Preparo de filtro, palitos de transferência de colônias

3.3.1. Filtros Büchner para filtração de micélio

Estes foram preparados mantendo-se em seu interior duas folhas de papel de filtro Whatman nº 1. Envolveu-se em papel de alumínio e papel comum e autoclavou-se por 15 minutos a 120°C.

3.3.2. Uso de palitos para transferência de colônias

Palitos roliços adquiridos no comércio foram lavados em água por 6 vezes consecutivas e então esterilizados em forno por três horas.

3.4. Esterilização e Incubação

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 120°C (exceto nos casos assinalados). Os frascos que necessitaram ser utilizados e esterilizados, foram autoclavados a 120°C por 35 minutos. As placas de Petri após autoclavagem e lavagem foram esterilizadas em estufa de secagem, a 150°C , por 2 horas. A temperatura de incubação para crescimento do fungo foi de 28°C em todos os experimentos.

3.5. Testes de Reversão dos Mutantes

Suspensões de conídios de todos os mutantes foram feitas em solução de Tween 80, de tal modo que as mesmas tivessem 10^7 conídios/ml. Estas foram semeadas em MM e em MM com um dos requisitos nutricionais e incubadas a 28°C por 7-8 dias. Após este período verificou-se a presença ou ausência de crescimento de colônias.

3.6. Produção de Protoplastos de Micélio (SILVEIRA, 1983)

Conídios obtidos em MC incubados a 28°C por 7-8 dias, foram suspensos em solução salina e determinadas suas concentrações (conídios/ml) com o auxílio da Câmara de Neubauer e microscópio. Estas foram adicionadas em meio para produção de micélio (item 3.2.5.) mais os requisitos de cada mutante para uma concentração final de 10^6 conídios/ml. O meio assim inoculado foi mantido em agitador rotatório (150rpm) a 28°C por 24 horas. Findo este período, o micélio desenvolvido foi filtrado em filtro Büchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado em KCl 1,4M (tampão fosfato 5,8). Determinou-se a seguir, seu peso úmido. Este micélio foi colocado em presença de KCl 0,7M (tampão fosfato pH 5,8) e complexo de

enzimas líticas na proporção de 50mg de micélio: 1ml de KCl 0,7M: 5mg de enzima (50% de celulase CP e 50% de Novozym 234) (HAMLYN *et alii*, 1981). Agitou-se em agitador recíproco (120rpm) por 2:30 a 3:00 horas. Após este período, verificou-se a presença de protoplastos com o auxílio do microscópio. Uma vez observada a presença de protoplastos, centrifugou-se a suspensão por 30 segundos a 500rpm, retirou-se o sobrenadante e o mesmo foi centrifugado por 10 minutos a 4.000rpm. O sobrenadante foi desprezado, ressuspensão o precipitado em KCl 0,7M, esterilizado e novamente centrifugado (4.000rpm; 15 minutos). Repetiu-se esta operação mais 2 vezes.

3.6.1. Contagem de protoplastos

Os protoplastos obtidos no item 3.6 (precipitado) foram ressuspensos em KCl 0,7M (tampão fosfato pH 5,8) e contados em Câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio ótico.

3.6.2. Teste de reversão

Suspensões de protoplastos obtidos no item 3.6. foram semeadas "pour plate" em MMKCl (45-50°C) sem diluição. As placas foram incubadas a 28°C por 7-8 dias e constatou-se a presença de revertentes pelo crescimento de colônias.

3.6.3. Regeneração dos protoplastos

Os protoplastos obtidos no item 3.6. foram semeados "pour plate" em MC e MCKCl (45-50°C) em diversas diluições. A contagem das colônias desenvolvidas em MC indicou o número de conídios e fragmentos

viáveis de hifas presentes na solução, enquanto que em MCKCl além destes, houve crescimento dos protoplastos. A diferença no número de colônias entre estes dois meios possibilitou o cálculo da frequência de regeneração de protoplastos o qual foi feito pela fórmula

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

onde:

a = nº de colônias crescidas em MCKCl

b = nº de colônias crescidas em MC

c = nº de protoplastos da suspensão

3.7. Fusão de protoplastos de micélio

Os protoplastos obtidos em KCl 0,7M foram misturados em quantidades iguais (nunca menos que 10^6 protoplastos) centrifugados a 4.000rpm por 10 minutos e o precipitado lavado por centrifugação em presença de KCl 0,7M mais 2 vezes. O precipitado assim obtido, foi ressuspenso em PEG (1,0ml) pré-aquecido (30°C) e mantido em banho maria (30°C) por 10 minutos. Após este período, adicionou-se KCl 0,7M (cerca de 10ml) e centrifugou-se por 10 minutos à 4.000rpm. Este procedimento foi repetido duas vezes. O precipitado assim obtido, foi ressuspenso em 1ml de KCl 0,7M e diluições apropriadas foram feitas também em KCl 0,7M. Estas diluições foram semeadas "pour plate" em MCKCl, MMKCl e MMKCl suplementado com os requisitos nutricionais (aminoácidos e vitaminas) em diferentes combinações (diluições conforme o número de protoplastos).

3.7.1. Frequência de fusão

Esta foi determinada como sendo:

Número de colônias desenvolvidas em MMKCl

Número de colônias desenvolvidas em MCKCl

3.7.2. Análise dos produtos de fusão

Das placas de MMKCl com diferentes suplementações, oriundas de fusão de protoplastos (item 3.7.) e contendo pequenas colônias, foram re cortados blocos de ágar (contendo estas colônias) que foram transferidas para placas contendo MM sem estabilizador osmótico suplementado com os requisitos nutricionais em diferentes combinações. Estas foram incubadas a 28°C por 10-15 dias. Das colônias e dos setores obtidos foram feitas suspensões em solução salina 0,85%. Estas soluções após serem diluídas convenientemente foram semeadas em MC de tal modo que se obtivessem colônias isoladas (10 a 15 colônias). Estas placas foram incubadas (28°C) por 7-8 dias. As colônias isoladas que aí se desenvolveram, foram transferidas para placas contendo MC na disposição 5 x 5 + 1 para a confecção de placas mestras, sendo a seguir caracterizadas quanto a sua morfologia e necessidades nutricionais (Figura 1).

3.8. Coloração de Núcleos de Protoplastos de Micélio (BORGES, 1987)

Para a coloração utilizou-se o precipitado obtido após a centrifugação de 30 segundos do sistema lítico (item 3.6.).

Algumas gotas da suspensão de protoplastos foram espalhadas em lâminas limpas. Para limpeza, as lâminas utilizadas foram deixadas por uma noite em solução sulfocrômica e em seguida, lavadas com sabão e passadas várias vezes em água destilada.

Figura 1. Esquema seguido para a análise genética dos cruzamentos realizados via fusão de protoplastos

Após o gotejamento do material, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por um período de 15 minutos. Logo após foi feita a fixação em metanol absoluto por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram deixadas para escorrer por 1 minuto e colocadas para hidrólise em solução de HCl 1N a 56°C por 2 minutos. As lâminas foram, então, lavadas com água corrente e água destilada. A coloração foi feita colocando-se tampão fosfato 0,02M (pH=5,8) sobre as lâminas e gotejando-se o corante Giemsa. Após 2 minutos, o material foi lavado com água corrente, observado ao microscópio ótico e foram contados o número de protoplastos uni, bi, tri, tetra e pentanucleados em 200 protoplastos por linhagem.

3.9. Coloração de Núcleos de Conídios

3.9.1. Limpeza de lâminas e lamínulas

As lâminas e lamínulas foram lavadas e conservadas em álcool 70%. No momento do uso as mesmas foram secas em papel absorvente macio.

3.9.2. Preparo da lâmina

O material a ser corado foi aderido a uma lamínula previamente untada com albumina 50% e seca levemente sob um bico de Bunsen. A seguir foi fixado em metanol absoluto durante 15 minutos. Após a fixação as lamínulas foram colocadas para hidrólise em HCl 1N a 60°C por 8 a 10 minutos. Lavou-se por três vezes consecutivas em água destilada e uma vez em tampão fosfato pH 6,9, sendo a seguir efetuada a coloração do material com 1 ml de solução corante Giemsa e 9 ml de tampão fosfato pH 6,9 durante 1/2 hora. Após a coloração, o material foi lavado rapidamente por 2 vezes em tampão fosfato pH 6,9 e a seguir procedeu-se a montagem

provisória em lâminas, passando parafina nas bordas da lamínula, com o auxílio de um bastão de metal aquecido e papel de filtro, procurando evitar bolhas de ar entre lâmina e lamínula.

3.9.3. Determinação do número de núcleos por conídio

Conídios desenvolvidos em MC por 7-8 dias a 28°C foram preparados como no item 3.6., observados ao microscópio ótico e determinada a porcentagem média de núcleos por conídios. Foram empregados 400 conídios.

3.10. Produção de Protoplastos de Conídios

Conídios crescidos em MC a 28°C por 6 dias foram suspensos em uma solução de Triton x 100 0,1%. Esta suspensão foi agitada vigorosamente, filtrada e novamente agitada. A seguir determinou-se sua concentração com o auxílio da câmara de Neubauer e microscópio, e centrifugou-se durante 15 minutos a 4.000rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em água deionizada e centrifugou-se novamente (15 minutos a 4.000rpm). Os conídios assim coletados foram pré-incubados em 50ml de MM líquido suplementado com os requisitos nutricionais e 2-deoxy-D-glucose (25µg/ml) durante 3 horas em agitador recíproco (150rpm) a 28°C. Após este período, centrifugou-se a suspensão por 15 minutos a 4.000rpm. Esta operação foi repetida mais uma vez e o precipitado obtido foi ressuspense em 3ml de KCl 0,7M (tampão fosfato pH 5,8) contendo 15mg de enzima Novozym 234 (1,0ml de KCl 0,7M: 5mg de enzima). Agitou-se em agitador recíproco (120rpm) por 3 horas a 28°C e após este período, verificou-se a presença de protoplastos com o auxílio de microscópio.

Uma vez observada a presença de protoplasto, centrifugou-se a suspensão por 30 segundos a 500rpm, retirou-se o sobrenadante e o mesmo foi centrifugado por 20 minutos a 4.000rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em KCl 0,7M e novamente centrifugado (20 minutos a 4.000rpm). Finalmente o precipitado foi ressuspenso no estabilizador osmótico e os protoplastos contados em câmara de Neubauer no microscópio ótico.

3.10.1. Regeneração dos protoplastos de conídios

Os protoplastos obtidos pela metodologia descrita no item 3.7, foram semeados "pour plate" em MC e MCKCl (45-50°C) em diversas diluições. O cálculo da frequência de regeneração de protoplastos foi feito como indicado no item 3.6.3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de Reversão

Os mutantes utilizados para a obtenção e fusão de protoplastos foram ensaiados quanto a reversibilidade de suas marcas, semeando-se 10^7 conídios/placa em MM e em MM com um dos requisitos nutricionais. A frequência de reversão espontânea para cada marca foi sempre > 1 .

4.2. Obtenção, Regeneração e Citologia de Protoplastos de Micélio

A metodologia utilizada para a protoplastização e regeneração foi descrita nos itens 3.6 e 3.6.3 respectivamente. Os resultados estão sumarizados na Tabela 2.

Protoplastos das linhagens E_6 , E_9 e R_J foram obtidos com o uso de KCl 0,7M em tampão fosfato 0,2M (pH 5,8) como estabilizador e uma mistura lítica constituída por celulase CP e Novozym 234. Sob estas

condições experimentais foi possível uma boa produção de protoplastos, fato que foi previamente constatado por SILVEIRA (1983). O número de protoplastos liberados está dentro da faixa daqueles reportados para outros fungos e é suficientemente alto para seu uso em futuros experimentos de fusão e transformação.

No que diz respeito as duas preparações enzimáticas utilizadas, estas também mostraram-se eficientes como agentes líticos contra várias outras espécies de fungos filamentosos (HAMLYN *et alii*, 1981; PACCOLA-MEIRELLES, 1988; FURLANETO, 1989).

A porcentagem de regeneração variou de 8% a 19%, frequência alta se comparada com a obtida por SILVEIRA & AZEVEDO (1987), que observaram uma porcentagem de regeneração de 1,2% a 3%. Por outro lado parece estar havendo uma relação do tipo "maior produção-maior taxa de regeneração". Esta relação também foi observada por BAGALHI (1987).

A capacidade de regeneração dos protoplastos é influenciada pela incubação em enzimas líticas (ISAAC, 1985). Segundo QUIGLEY *et alii* (1987), a alta atividade de proteinase da Novozym 234 poderia explicar em parte as baixas frequências de regeneração reportadas em vários trabalhos, porém, outros estudos tem questionado isto (BROWNE *et alii*, 1987). O tempo de exposição das células também pode ser importante, embora não tenha sido analisado neste trabalho. O incremento na frequência de regeneração em curtos períodos de exposição (PICATAGGIO *et alii*, 1983) pode refletir a persistência de fragmentos de parede não detectáveis.

Por meio da análise citológica observou-se a ocorrência de protoplastos anucleados em uma frequência de 15 a 20% do total, assim como protoplastos com diferentes números de núcleos e tamanho (Tabela 3, Figura 2). Esta heterogeneidade pode ser inerente a estrutura e arranjo das hifas pois, estudos de microscopia eletrônica, histoquímicos e bioquímicos demonstraram que as extremidades das hifas são diferentes das regiões mais distais tanto em relação a distribuição de organelas citoplasmáticas quanto a estrutura da parede hifal. (GROVE & BRACKER, 1970; TRINCI & COLLINGE, 1975).

Tabela 2. Número de protoplastos obtidos e porcentagem de regeneração em diferentes linhagens de *M. anisopliae*

Nº protocolar	Linhagens	Nº de protoplastos/ml	Porcentagem de regeneração
7	E ₆ vio ₉ met ₉ bio ₉	1,9 x 10 ⁶	9%
8	E ₆ ylo ₈ pir ₈ lys ₈	1,4 x 10 ⁷	14%
12	E ₉ met ₁ lys ₃	2,2 x 10 ⁷	18%
19	E ₉ ylo ₁ leu ₆ rib ₈	5,1 x 10 ⁶	8%
20	E ₉ ylo ₁ leu ₆ ade ₉	5,4 x 10 ⁶	9%
31	R _J vio ₁ lys ₃ bio ₂	1,3 x 10 ⁷	19%

Tabela 3. Porcentagem de protoplastos com diferente número de núcleos nas linhagens E₆, E₉ e R_J

Linhagens	Nº de núcleos/protoplastos				
	1	2	3	4	5
E ₆ ylo ₈ pir ₈ lys ₈	101 50,5%	64 32%	25 12,5%	9 4,5%	1 0,5%
E ₉ ylo ₁ leu ₆ ade ₉	129 64,5%	54 27%	14 7%	2 1%	1 0,5%
R _J vio ₁ lys ₃ bio ₂	150 75%	39 19,5%	10 5%	1 0,5%	- -

Figura 2. Protoplastos da linhagem E₉ 20 obtidos após 3 horas de digestão com enzimas líticas. Coloração em Giemsa

4.3. Fusão de Protoplastos de Micélio

A metodologia utilizada para obtenção de "produtos de fusão" entre mutantes com duas marcas auxotróficas e uma marca morfológica dentro das linhagens E_6 e E_9 , e entre as linhagens E_6 e E_9 , e E_9 e R_J foi descrita no item 3.7. Os cruzamentos realizados e as frequências de fusão são mostrados na Tabela 4.

Observou-se uma frequência de fusão alta, quando comparada com outros trabalhos na literatura, como SILVEIRA & AZEVEDO (1987) que obtiveram uma frequência de fusão que variou de 0,9 a 44,1 em 10^5 protoplastos. Por outro lado, a frequência de produtos de fusão nos cruzamentos inter-linhagens é menor numa ordem de magnitude, fato que pode refletir reais diferenças de compatibilidade

4.3.1. Análise genética

A metodologia seguida na análise genética dos cruzamentos encontra-se resumida no esquema da Figura 1.

As suspensões de protoplastos obtidos após tratamento com PEG (polietileno glicol), foram semeadas em quatro meios seletivos, com dupla suplementação, de modo a possibilitar o crescimento de recombinantes auxotróficos e impedir o crescimento das linhagens parentais. Nestes meios observou-se uma frequência bem maior de colônias que no MM sem suplementação, fato que ressalta a importância dos mesmos na seleção de recombinantes (Tabela 5). Porém, deve ser salientado que parte deste

crescimento pode ser devido ao sintrofismo isto é, crescimento mutuamente estimulado pela liberação de metabólitos ao meio, uma vez que, durante a obtenção de protoplastos acontecem rupturas de células permitindo a liberação dos mesmos.

Tabela 4. Cruzamentos inter e intra-linhagens de *M. anisopliae* e frequência de fusão para cada cruzamento

Cruzamento (nº protocolar)	Frequência de fusão
12 x 20	$1,00 \times 10^{-2}$
7 x 8	$1,04 \times 10^{-2}$
7 x 19	$1,80 \times 10^{-3}$
8 x 20	$1,70 \times 10^{-3}$
7 x 20	$1,35 \times 10^{-3}$
20 x 31	$1,16 \times 10^{-3}$

Tabela 5. Número de colônias desenvolvidas nos meios seletivos utilizados nos diferentes cruzamentos

		MEIOS SELETIVOS												
Cruzamento (M ₀ pro-tocolar)	MH	MH+												
		met	leu	met	ade	bio	ade	bio	leu	lys	ade	pir	leu	MC
7 x 8	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.000
7 x 19	36	3.500	-	-	-	3.700	-	-	-	-	1.200	20	-	20.000
8 x 20	52	-	-	-	-	-	5.720	3.200	5.680	400	-	-	-	30.600
7 x 20	35	7.600	2.900	500	8.200	-	-	-	-	-	-	-	-	26.000
20 x 31	50	-	-	60	5.633	10.133	5.350	-	-	-	-	-	-	43.000

As pequenas colônias que se desenvolveram (Figura 3) foram transferidas, por recorte de um bloco de ágar, para placas contendo o mesmo meio seletivo sem estabilizador osmótico. Estas colônias foram em sua grande maioria de dois tipos: a) colônias bem esporuladas apresentando a coloração de um dos pais (Figura 4); b) colônias pouco esporuladas e incoloras (Figura 5). Observou-se também, em menor número, colônias de aspecto heteriocariótico (Figura 6) e colônias que setorizaram espontaneamente (Figura 7). Quando conídios destas colônias foram semeados no mesmo meio seletivo em densidade o suficientemente baixa para permitir o surgimento de colônias monospóricas isoladas, três eventos foram constatados:

- a) ausência de crescimento;
- b) colônias com crescimento lento, pouca ou sem conidiação (Figura 8);
- c) colônias prototróficas.

Os dois primeiros eventos dificultaram a análise genética e poderiam ser interpretados da seguinte maneira. Primeiro, os conídios que não se desenvolveram poderiam provir de colônias heteriocarióticas, que ao segregarem as marcas parentais, não conseguiram crescer nos meios seletivos empregados. Segundo, estes conídios poderiam provir de colônias diplóides em processo de haploidização, que quando transferidos aos meios seletivos e devido à perda de cromossomos, não apresentaram crescimento ou crescimento lento com pouca ou sem conidiação. As colônias desenvolvidas poderiam ser aneuplóides, entretanto, para a confirmação da aneuploidia seriam necessários maiores estudos.

Figura 3. Colônias desenvolvidas após tratamento com PEG (polietileno glicol), com 10 dias de crescimento

Figura 4. Colônias muito esporuladas resultantes de fusão de protoplas-
tos entre as linhagens E_6 x E_9 . Cruzamento 8 x 20

Figura 5. Colônias pouco esporuladas resultantes de fusão de protoplas-
tos entre as linhagens E_6 x E_9 . Cruzamento 8 x 20

Figura 6. Colônia heterocariótica resultante de fusão de protoplas-
tos entre as linhagens E_6 x E_9 . Cruzamento 7 x 20

Figura 7. Colônias instáveis resultantes de fusão de protoplastos entre as linhagens E_6 x E_9 . Cruzamento 8 x 20

Figura 8. Prováveis aneuplóides, apresentando crescimento lento e baixa esporulação, resultantes de fusão de protoplastos entre as linhagens E_6 x E_9 . Cruzamento 7 x 20

Os recombinantes prototróficos isolados apresentaram coloração verde e crescimento vigoroso nos meios seletivos utilizados. A ploidia dos mesmos foi determinada através do diâmetro nuclear dos conídios e estabilidade das colônias em presença de benlate, critérios que tem se mostrado eficazes para a distinção entre linhagens haplóides e diplóides (LUNA & AZEVEDO, 1985; MAGOON & MESSING AL-AIDROOS, 1986). Não se detectou a emissão de setores por estas colônias na concentração de benlate utilizada (1µg/ml de meio) nem diferenças no volume nuclear entre os mesmos e as linhagens parentais, quando comparadas a níveis de 5% (teste t). Com base nestes resultados, estas colônias podem ser consideradas recombinantes haplóides prototróficos.

Com a finalidade de superar as dificuldades anteriormente mencionadas, a purificação foi realizada em MC e as colônias obtidas foram caracterizadas com relação à morfologia e auxotrofia. A Tabela 6 sumariza os tipos de colônias recombinantes, bem como suas frequências em relação ao total de colônias analisadas em cada cruzamento.

No cruzamento intra-linhagem $E_6 \times E_6$ (7 x 8), detectou-se somente recombinantes auxotróficos, met, com coloração violeta (72,22%) e verde (27,77%). Resultados semelhantes para o mesmo cruzamento foram obtidos por VALADARES (1989). É interessante notar aqui, que quando cruzamentos dentro desta linhagem foram realizados via ciclo parassexual, além dos recombinantes auxotróficos foram isolados recombinantes prototróficos haplóides (BAGALHI, 1987) e diplóides estáveis e instáveis (VALADARES, 1989).

Tabela 6. Segregantes obtidos por fusão de protoplastos entre linhagens de *M. anisopliae*

Cruzamento	Total de colônias analisadas	Marca seletiva	Marca não seletiva (coloração dos conídios)	Nº Observado	Frequência (%)
7 x 8	72	Recombinantes	met	52	72,22
			met	20	27,77
7 x 19	75	Parental	leu rib	5	6,66
		Recombinantes	met bio leu rib	1	1,33
			met leu rib	5	6,66
			met bio leu	2	2,66
			leu bio	11	14,66
			met leu	6	8
			leu	42	56
			bio	1	1,33
			met	1	1,33
			met	1	1,33
7 x 20	67	Parental	leu ade	28	41,79
		Recombinantes	ade	5	7,46
			leu	2	2,98
			met	32	47,76
8 x 20	71	Parental	pir lys	19	26,76
			leu ade	15	21,13
		Recombinantes	pir lys ade	1	1,41
			pir lys leu	7	9,86
			lys leu ade	4	5,63
			pir leu ade	7	9,86
			lys leu	4	5,63
			leu	9	12,67
			pir	1	1,41
			pir	2	2,81
			lys	1	1,41
			lys	1	1,41
20 x 31	58	Parental	leu ade	29	50
			lys bio	1	1,72
		Recombinantes	leu ade lys bio	6	10,34
			leu ade lys	1	1,72
			leu lys bio	1	1,72
			leu ade bio	1	1,72
			leu lys	3	5,17
			leu	13	22,41
			ade	1	1,72
			lys	2	3,45

* Recombinantes com coloração dos conídios amarelo-escuro

Nos cruzamentos inter-linhagens $E_6 \times E_9$, os segregantes foram do tipo parental e recombinantes auxotróficos. No cruzamento 7 x 19 detectou-se alta frequência de recombinantes auxotróficos (93,33%), distribuídos em 9 classes, recuperando-se somente um tipo parental. As colônias apresentaram em sua grande maioria coloração amarela (97,14%), sendo que, como já observado no cruzamento anterior, os recombinantes met apresentaram coloração verde (1,43%) e violeta (1,43%). No cruzamento 8 x 20 a frequência de recombinantes foi menor (52,11%), confirmando-se a ocorrência de 10 classes de recombinantes auxotróficos de coloração amarela (ylo_1 : 72,97% e ylo_8 : 27,02%) e de ambos parentais. Os resultados observados nestes dois cruzamentos são similares aqueles obtidos pelo ciclo parassexual (VALADARES, 1989). No cruzamento 7 x 20 a frequência de recombinantes foi de 58,21%. Observou-se menor número de classes recombinantes (3) recuperando-se um tipo parental. As colônias recombinantes apresentaram coloração violeta (82,05%) e amarela (17,94%).

No cruzamento inter-linhagens, $E_9 \times R_J$ (20 x 31) também observou-se alta frequência de recombinantes (48,25%) detectando-se 8 classes e ambos parentais. Os recombinantes leu ade lys bio apresentaram uma coloração amarelo escura, diferente do parental E_9 , o que pode refletir alguma interação entre as marcas para cor.

Os resultados do presente estudo, onde somente se isolaram recombinantes prototróficos haplóides e auxotróficos sugerem que a fase diplóide seja altamente instável e transitória. Este fenômeno denominado paramiose por BONATELLI *et alii* (1983), foi descrito em vários fungos como *Cephalosporium acremonium* (BALL & HAMLYN, 1982), *A. niger* (BONATELLI

et alii, 1983), *M. anisopliae* (SILVEIRA & AZEVEDO, 1987 e BAGALHI, 1987), *Verticillium lecanii* (JAKSON & HEALE, 1987), *B. bassiana* (PACCOLA-MEIRELLES, 1988).

Por outro lado, estes resultados indicam que a fusão nuclear é um evento frequente, sendo difícil distinguir entre os segregantes se houve permuta mitótica e haploidização ou só haploidização.

Nem todos os possíveis genótipos foram recuperados, sendo que alguns foram mais frequentes que outros. Este fenômeno, já observado em outros trabalhos (SILVEIRA & AZEVEDO, 1987; BAGALHI, 1987; VALADARES, 1989), não parece ser devido a seleção contra certos alelos mutantes, pois as marcas que não são isoladas em um cruzamento, são facilmente recuperadas em outro.

A ocorrência de tipos recombinantes diferentes do esperado para o meio seletivo utilizado (Tabela 7), foi observada com alta frequência (54,44%). Esta "conduta ilegítima", também reportada por BIRKETT & HAMLYN (1985) e VALADARES (1989) pode ser ocasionada pelo desarranjo cromossômico originando aneuplóides. Este fenômeno estaria associado a instabilidade do diplóide, pois é sabido que os aneuplóides fornecem um elo entre os diplóides parentais e os segregantes haplóides (ROPER, 1985).

Quando empregado MC para a purificação de colônias, recombinantes prototróficos não foram isolados; isto pode ser devido a que, neste meio, puderam ser detectados diversos tipos de recombinantes auxotróficos os que, por serem mais frequentes, teriam mascarado sua ocorrência.

Tabela 7. Segregantes obtidos nos diferentes meios seletivos. Cruzamento E₆ x E₉

Cruzamento	Meio seletivo	Segregantes		Nº Observado
		Marca seletiva	Marca não seletiva (coloração dos conídios)	
E ₆ vio ₉ met ₉ bio ₉	MM + met + leu	ade leu	amarelo	21
		ade	amarelo	5
		leu	amarelo	2
		met	violeta	4
E ₉ ylo ₁ leu ₆ ade ₉	MM + met + ade	met	violeta	20
		ade leu	amarelo	4
		met	violeta	3
		ade leu	amarelo	3
7 x 20	x	met	violeta	5
		ade leu	amarelo	3

A capacidade de produzir recombinantes pode ser considerada como uma expressão de compatibilidade (JACKSON & HEALE, 1987). Assim, a compatibilidade entre as linhagens estudadas pode ser constatada pela frequência de recombinantes obtida, sendo de 48,27% no cruzamento $E_9 \times R_J$ e de 67,88% ($\bar{x}$) nos cruzamentos $E_6 \times E_9$. Estes dados, consistentes aos observados por SILVEIRA (1983), BAGALHI (1987) e VALADARES (1989), poderiam estar relacionados com a origem geográfica das linhagens, detectando-se maior divergência entre as linhagens de regiões geográficas mais distantes.

MESSIAS & AZEVEDO (1980), BERGERON & MESSING AL-AIDROOS (1982), MAGOON & MESSING AL-AIDROOS (1985) sugerem que o número de grupos de ligação em *M. anisopliae* é pequeno, sendo provavelmente 5. Pela análise dos tipos de recombinantes obtidos (Tabela 6), observou-se que nos cruzamentos 7 x 8 e 7 x 20 as marcas vio met apresentam uma tendência a segregarem juntas (84 dos 111 recombinantes analisados, isto é, 75,67%). Já nos cruzamentos 7 x 19, 8 x 20 e 20 x 31, o tipo recombinante mais frequente foi ylo leu (64 dos 135 recombinantes analisados, isto é, 47,40%). Isto indica provável ligação entre as marcas vio met e ylo leu, sendo necessário porém, um estudo mais detalhado sobre grupos de ligação e mapeamento de genes para a obtenção de maiores evidências.

4.4. Obtenção e regeneração de protoplastos de conídios

Conídios da linhagem E₉ 20 (Figura 9), em sua grande maioria uninucleados (99,51%), foram transformados em protoplastos segundo o item 3.10. Os resultados (Tabela 8), embora preliminares, demonstram a possibilidade de se obter protoplastos de conídios de *M. anisopliae*, fato de grande interesse pois, sendo estes fisiologicamente homogêneos, são mais adequados para estudos de fisiologia e genética (BOS, 1985).

As primeiras tentativas mostraram que a utilização de conídios jovens é um pré-requisito essencial, observando-se melhor produção de protoplastos com conídios de 6 dias de crescimento. Este fato também foi constatado por MOORE & PEBERDY (1976) em *A. flavus* e TOYAMA *et alii* (1984) em *T. reesei*.

Após o período de pré-incubação dos conídios em presença de 25µg de 2-deoxy-D-glucose/ml de meio, detectou-se a tendência dos mesmos a agregar-se. Esta peculiaridade, já observada em *A. niger* (BOS & SLAKHORST, 1981) foi provavelmente uma das causas da limitada produção de protoplastos (Figura 10).

Deve ser salientado que, segundo esses mesmos autores, o meio de incubação dos conídios tem um efeito marcante na liberação dos protoplastos. Sugere-se então, que sejam testados outros meios, os quais poderiam apresentar melhores resultados.

Após 8 horas de incubação na enzima lítica Novozym 234, 20% dos conídios foram convertidos em protoplastos. A Figura 11 mostra que estes emergiram através de poros formados na região apical da parede

do conídio, sendo esta possivelmente a última região a ser sintetizada (MOORE & PEBERDY, 1976). A diferença do verificado neste trabalho, conídios elípticos de *G. candidum* foram totalmente resistentes ao tratamento lítico com Novozim 234 (JACOBSEN *et alii*, 1985).

Os protoplastos foram efetivamente estabilizados com KCl 0,7M. A regeneração de 50% (resultado de um experimento) foi muito maior do que a observada em protoplastos de micélio (9%). Esta diferença pode ser devida a que protoplastos de conídios são fisiologicamente homogêneos, enquanto que, os protoplastos de micélio são heterogêneos como resultado das diferentes idades das células das hifas de onde são liberados (PEBERDY & GIBSON, 1971; ANNE *et alii*, 1974), ou ainda que, em conídios, a parede celular não seja totalmente retirada o que auxiliaria no processo de regeneração dos mesmos.

Tabela 8. Obtenção de protoplastos de conídios da linhagem E₉ 20 de *M. anisopliae*

Idade da cultura (dias)	Pré-incubação 2-deoxy-D-glucose 25µg/ml (horas)	Incubação enzima lítica (horas)	nº de protoplastos/ml
6	3	3	-
		4	-
		5	-
		6	muito poucos
		7	$0,5 \times 10^5$
		8	$1,5 \times 10^5$

Figura 9. Conídios uninucleados da linhagem E₉ 20 de *M. anisopliae*, com 8 dias de crescimento

Figura 10. Aglomeração de conídios e liberação de protoplastos após 6 horas de incubação com enzima lítica - Linhagem E₉ 20

Figura 11. Protoplasto emergindo da região apical da parede do esporo
Linhagem E₉ 20

5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que:

- a) A alta instabilidade do diplóide, resultando em recombinantes auxotróficos no heterocário, foi observada nos cruzamentos dentro e entre linhagens, confirmando a ocorrência de parameiose nesta espécie.
- b) Devido a tendências a segregarem juntas, poderia inferir-se que as marcas *vio met* e *ylo leu* estão localizadas num mesmo grupo de ligação, sendo necessário porém, futuros estudos sobre ligação gênica neste organismo para a obtenção de maiores evidências.

c) A obtenção de protoplastos de conídios, embora deva ser aprimorada, constitui o passo inicial para sua utilização em experimentos de fusão de protoplastos e transformação genética, uma vez que estes são mais adequados para tais fins.

d) A capacidade de regeneração dos protoplastos de conídios demonstrou ser bem maior que a dos protoplastos oriundos de micélio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-AIDROSS, K. Demonstration of parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, Ottawa, 22:309-14, 1980.
- AL-AIDROSS, K. & ROBERTS, D.W. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquitoes larvae. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, Ottawa, 20:211-9, 1978.
- AL-AIDROSS, K. & SEIFERT, A.M. Polysacharide and protein degradation, germination, and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 36:29-34, 1980.
- ALLARD, G.B.; CHASE, C.A.; HEALE, J.B.; ISAAC, J.E.; PRIOR, C. Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a mycoinsecticide for control of sugarcane froghopper, *Aeneolamia varia saccharina* (Hemiptera: Cercopidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 55:41-6, 1990.

ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B., coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. cap.6, p.73-126.

ALVES, S.B.; RISCO, S.H.; SILVEIRA NETO, S.; MACHADO NETO, R. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. to *Diatrea saccharalis* (Fabr.). *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*, Hamburg, 97:403-6, 1984.

ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; HADDAD, M.L.; GOMEZ, D.R.S. Separação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., através da análise fenética. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Itabuna, 15:81-92, 1986. Suplemento.

ANNÉ, J. & PEBERDY, J.F. Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. *Archives of Microbiology*, Berlin, 105:201-5, 1975.

ANNÉ, J. & PEBERDY, J.F. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *Journal of General Microbiology*, London, 92:413-7, 1976.

ANNÉ, J. & PEBERDY, J.F. Protoplast fusion and interspecies hybridization in *Penicillium*. In: PEBERDY, J.F. & FERENCY, L., ed. *Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker, 1985. p.259-78.

- ANNÉ, J.; EYSEN, H.; SOMER, P.de. Formation and regeneration of *Penicillium chrysogenum* protoplasts. *Archives of Microbiology*, Berlin, 98:159-66, 1974.
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, Ed. Nacional, EDUSP, 1973. 288p.
- AZEVEDO, J.L.; BAGALHI, E., PACCOLA-MEIRELLES, L. Parameiosis and genetic improvement of entomopathogenic fungi. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GENETICS OF INDUSTRIAL MICROORGANISM, 6., Strasbourg, 1990. *Abstract book*. Strasbourg, s.ed., 1990. p.119.
- BACHMANN, B.J. & BONNER, D.M. Protoplasts from *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 78:550-6, 1959.
- BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1987. 123p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BALL, C. & HAMLYN, P.F. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic *Cephalosporium C*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 5:1-13, 1982.
- BEHLING, R.A. & FISCHER, A.G. Formation of protoplasts from *Gliocadium virens*. *The International Journal of Biochemistry*, Oxford, 11:449-56, 1980.

- BENITEZ, T.; RAMOS, S.; GARCIA ACHA, I. Protoplasts of *Trichoderma viride*: formation and regeneration. *Archives of Microbiology*, Berlin, 103:199-203, 1975.
- BERGÈS, T. & BARREAU, C. Heat Shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from *Podospora anserina*. *Journal of General Microbiology*, London, 135:601-4, 1989.
- BERGERON, D. & MESSING AL-AIDROSS, K. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, Ottawa, 24:643-51, 1982.
- BILLICH, A.; KELLER, V.; KLEINKAUF, H.; ZOCHER, R. Production of protoplasts from *Fusarium scirpi* by lytic enzymes from *Streptomyces tsusimaensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, 28:442-4, 1988.
- BINDING, H. The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. *Molecular and General Genetics*, Berlin, 135:273-6, 1974.
- BIRKETT, J.A. & HAMLYN, P.F. Protoplast fusion and genetic analysis in *Cephalosporium*. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L., ed. *Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker, 1985. p.207-23.

- BONATELLI JR., R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 6:399-405, 1983.
- BORDAT, D.; ROBERT, P.; RENAND, M. Sensibilité de *Liriomyza trifolii* (Burgess) et *L. sativae* Blanchard (Diptera, Agromyzidae) à onze souches de champignons entomopathogènes. *L'Agronomie Tropicale*, Paris, 43(1):68-73, 1988.
- BORGES, M.I. Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA de alto peso molecular de *Aspergillus niger*. Campinas, 1987, 125p. (Mestrado-Universidade Estadual de Campinas).
- BOS, C.J. Protoplasts from fungal spores. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L., ed. *Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker. 1985. p.73-85.
- BOS, C.J. & SLAKHORST, S.M. Isolation of protoplasts from *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 27:400-7, 1981.
- BROWNE, H.M.; DOWSETT, A.B.; GIBSON, R.K.; PEBERDY, J.F. The isolation and regeneration of protoplasts from *Lipomyces starkeyi*: an oleaginous yeast. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, 6:153-63, 1987.

- CALAM, C.T.; DAGLISH, L.B.; GAITSKELL, W.S. Hybridization experiments with *Penicillium patulum* and *Fusarium moniliforme*. In: VANEK, Z.; HOSTAKEL, Z.; CUDIN, J., ed. *Genetics of industrial microorganisms*. Amsterdam, Elsevier, 1973. v.1, p.265-82.
- CHANG, L.T. & TERRY, C.A. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. *Applied Microbiology*, Washington, 25:890-2, 1973.
- CLARKSON, J.M. & HEALE, J.B. Heterokaryon compatibility and genetic recombination within a host plant between hop wilt isolates of *Verticillium albo-atrum*. *Plant Pathology*, London, 34:129-38, 1985.
- CONSTABEL, F. & KAO, K.N. Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 52: 1603-6, 1974.
- CROFT, J.H. Interspecific transfer and recombination of mitochondrial DNA in *Aspergillus*. In: TRAINING COURSE ON FUNGAL PROTOPLAST FUSION AND ITS APPLICATIONS, Szeged, 1981. Szeged, Attila József University/Department of Microbiology, 1981. p.119-21.
- DAS, A. & ILCZUK, Z. Spontaneous segregation of a heterozygous diploid of *Aspergillus niger*. *Folia Microbiology*, Praga, 23:362-5, 1978.
- DAS, A.; GOKHALE, D.V.; PEBERDY, J.F. Protoplast fusion and genetic recombination in intra e inter strain crossing in *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 11:2-5, 1989.

- DAVIS, B. Factors influencing protoplasts isolation. In: PEBERDY, J. F. & FERENCZY, L., ed. *Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker, 1985. p.45-72.
- DAVIS, B.; D'AVILLES PAIXÃO, M.T.; DEANS, S.G.; SMITH, J.E. Protoplasts formation from giant cells of *Aspergillus niger*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 69(2):207-12, 1977.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, A.L.; AZEVEDO, J.L. Eletrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, Basel, 36:293-4, 1980.
- DEED, A. & SEVIOUR, R. Formation and regeneration of protoplasts of *Sclerotium glucanicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, 31:259-64, 1989.
- DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; PACHECO, M.R. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 40(11):1103-5, 1988.
- DOOLJEWAAARD, A.M.P.; SIETSMA, J.H.; WOUTERS, J.T.M. Formation and regeneration of *Geotrichum candidum* protoplasts. *Journal of General Microbiology*, London, 74:205-9, 1973.

EMERSON, S. & EMERSON, M.R. Production, reproduction and reversion of protoplasts-like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Proceedings of National Academy of Science*, Washington, 44: 663-71, 1958.

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

FERENCZY, L. Transfer of cytoplasmic genetic elements by protoplasts fusion. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L., ed. *Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker, 1985. p.307-21.

FERENCZY, L.; KEVEI, F.; SZEGEDI, M. Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experientia*, Basel, 31:50-2, 1975.

FERENCZY, L.; KEVEI, F.; ZSOLT, J. Fusion of fungal protoplasts. *Nature*, London, 248:793-4, 1974.

FERRON, P. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annual Review Entomological Society*, Stanford, 23:409-42, 1978.

- FRIGO, S.M. Variabilidade e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 119p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FURLANETO, M.C. Recombinação genética e produção de celulasas em *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*. Piracicaba, 1989. 152p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GARCIA, A.T.E.; BARACHO, I.R.; SOUZA, H.M.; MESSIAS, C.L. Virulência de linhagens mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae*, em *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera, Tephritidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, 29:267-70, 1985.
- GARCIA, A.T.E.; SOUZA, H.M.L.; MESSIAS, C.L.; PIEDRABUENA, A.E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* nas diferentes fases de desenvolvimento de *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera, Tephritidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, 33(1):17-23, 1989.
- GARCIA ACHA, I.; LOPEZ-BELMONTE, F.; VILLANUEVA, J.R. Regeneration of micelial protoplasts of *Fusarium culmorum*. *Journal of General Microbiology*, London, 45:515-23, 1966.
- GARCIA ACHA, I.; RODRIGUEZ AGUIRRE, M.J.; VILLANUEVA, J.R. "Protoplasts" from conidia of *Fusarium culmorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 10:99-101, 1964.

- GIBSON, R.K. & PEBERDY, J.F. Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 72: 529-38, 1972.
- GIRARD, V.; CAPELLANO, A.; FEVRE, M. β -glucan synthesis and glucan synthase activities during early stages of cell wall regeneration by protoplasts from *Saprolegnia monoica*. *Journal of General Microbiology*, London, 130:2367-74, 1984.
- GOETTEL, M.S.; LEGER, R.J. ST; BHAIIRI, S.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R. C. Transformation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* using the ben A₃ gene from *Aspergillus nidulans*. In: SYMPOSIUM ON NEW DIRECTIONS IN BIOLOGICAL CONTROL, Frisco, 1989. *Journal of Cellular Biochemistry*, New York, 13(pt.A):170, 198.
- GROVE, S.N. & BRACKER, C.E. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and spitzenkörper. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 104:989-1009, 1970.
- HAMLYN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J. M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 3:321-5, 1981.
- HAMMIL, T.M. Electron microscopy of phialoconidiogenesis in *Metarhizium anisopliae*. *Annals of Botany*, London, 59:317-26, 1972.

- HAMLYN, P.F.; BIRKETT, J.A.; PEREZ, G.; PEBERDY, J.F. Protoplast fusion as a tool for genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. *Journal of General Microbiology*, London, 131:2813-23, 1985.
- HASTIE, A.C. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. *Genetical Research*, Cambridge, 5:305-15, 1964.
- HEALE, J.B.; ISAAC, J.E.; CHANDLER, D. Prospects for strain improvement in entomopathogenic fungi. *Pesticide Science*, Essex, 26:79-92, 1989.
- HEESWIJCK, R.V. The formation of protoplasts from *mucor* species. *Carlsberg Research Communication*, Copenhagen, 49:597-609, 1984.
- HOPWOOD, D.A. & WRIGHT, H.M. Protoplast fusion in *streptomyces* fusions involving ultraviolet-irradiated protoplasts. *Journal of General Microbiology*, London, 126:21-7, 1981.
- HUANG, D.; STAPLES, R.C.; BUSHNELL, W.R.; MacLEAN, D.J. Preparation and regeneration of protoplast from axenic mycelia derived from the wheat stem rust fungus. *Phytopathology*, St.Paul, 80:81-4, 1990.
- ISAAC, S. Metabolic properties of protoplasts. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L., ed. *Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker, 1985. p.171-87.
- ISAAC, S. & GOKHALE, A.V. Autolysis: a tool for protoplast production from *Aspergillus nidulans*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 78(3):389-94, 1982.

- JACKSON, C.W. & HEALE, J.B. Parasexual crosses by hyphal anastomosis and protoplast fusion in the entomopathogen *Verticillium lecanii*. *Journal of General Microbiology*, London, 133:3537-47, 1987.
- JACOBSEN, T.; JENSEN, B.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Preparation of protoplasts from mycelium and arthroconidia of *Geotrichum candidum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 31:93-6, 1985.
- KEVEI, F. & PEBERDY, J.F. Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the *Aspergillus nidulans* group. *Journal of General Microbiology*, London, 102:255-62, 1984.
- KIGUCHI, T. & YANAGI, S.O. Intraspecific heterokaryon and fruit body formation in *Coprinus macrorhizus* by protoplast fusion of auxotrophic mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Baltimore, 22:121-7, 1985.
- KIRIMURA, K.; NAKAJIMA, I.; LEE, S.P.; KAWABE, S.; USAMI, S. Citric acid production by the diploid strains of *Aspergillus niger* obtained by protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Baltimore, 27:504-6, 1988.
- KIRIMURA, K.; IMURA, M.; KATO, Y.; LEE, S.P.; USAMI, S. Intergeneric hybridization between *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* by protoplast fusion. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 53:1589-96, 1989.

- KITAMOTO, Y.; MORI, N.; YAMAMOTO, M.; OHIWA, T.; ICHIKAWA, Y. A simple method for protoplast formation and improvement of protoplast regeneration from various fungi using an enzyme from *Trichoderma harzianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Baltimore, 28: 445-50, 1988.
- KOMEL, R.; ROZMAN, D.; PUC, A.; SOCIC, H. Effect of immobilization on the stability of *Claviceps purpurea* protoplasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Baltimore, 23:106-9, 1985.
- KROPP, B.R. & FORTIN, J.A. Formation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 64:1124-6, 1986.
- LAURILA, H.O.; NEVALAINE, N.; MAKINEN, V. Production of protoplasts from the fungi *Curvularia inaequalis* and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Baltimore, 21:210-2, 1985.
- LECUONA, R.E.; FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; BLEICHER, E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1887) (Coleoptera:Scolytidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Itabuna, 15:21-7, 1986. Suplemento.
- LIU, S.D.; LIN, S.C.; SHIAU, J.F. Microbial control of coconut leaf beetle (*Brontispa longissima*) with green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 53(3):307-14, 1989.

- LUNA, E.A. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Rio de Janeiro, 1985. 260p. (Doutorado-Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- LUNA, E.A. & AZEVEDO, J.L. Obtenção de possíveis diplóides entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 37., Belo Horizonte, 1985. Resumos. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 37 (7):721, 1985.
- LYNCH, P.T.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S. Isolation and regeneration of protoplasts from *Fusarium tricinctum* and *Fusarium oxysporum*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 85(1):135-40, 1985.
- MAGAE, Y.; KASHIWAGI, Y.; SENDA, M.; SASAKI, T. Eletrofusão de giant protoplasts of *Pleurotus cornucopiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Baltimore, 24:509-11, 1986.
- MAGOON, J. & MESSING AL-AIDROOS, K. Epistatic relationships and linkage among colour marks of the imperfect entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*, Ottawa, 28:96-100, 1986.
- MAGOON, J. & MESSING AL-AIDROOS, K. Determination of ploidy of sectors formed by mitotic recombination in *Metarhizium anisopliae*. *Transaction of the British Mycology Society*, London, 82:95-8, 1984.

- MARINHO, T.Q.; MacCORD, J.R.; PERES-MARQUES, L.M. Use of some strains of *Metarhizium anisopliae* as biological control of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835), (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 82:190, 1987. (Suplemento)
- MARTINS, J.F.S.; MAGALHÃES, B.P.; LORD, J.C.; FERREIRA, E.; ZIMMERMANN, F.J.P. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. sobre *Oebalus poecilus* (Dallas, 1851) (Heteroptera, Pentatomidae) percevejo do grão do arroz. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Itabuna, 16:81-91, 1987.
- MESSIAS, C.L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979. 73p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transaction of the British Mycology Society*, London, 75:473-7, 1980.
- MESSIAS, C.L.; DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Virulence of a natural isolate, auxotrophic mutants, and a diploid of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 47:231-3, 1986.

- MESSIAS, C.L.; ROBERTS, D.W.; GREFIG, A.T. Pyrolysis-gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae* an aid to strain identification. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 42:393-6, 1983.
- MINUTH, W. & ESSER, K. Intraespecific, interespecific and intergeneric recombination in β -lactan producing fungi via protoplasts fusion. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 18:38-46, 1983.
- MOORE, P.M. & PEBERDY, J.F. Release and regeneration of protoplasts from the conidia of *Aspergillus flavus*. *Transaction of the British Mycology Society*, London, 66:421-5, 1976.
- MUSILKOVA, M.; FENCL, Z.; SEICHERTOVA, O. Release of *Aspergillus niger* protoplasts by *Penicillium purpurogenum* enzymes. *Folia Microbiology*, Praga, 14:47-50, 1969.
- NEIROTTI ROUMAS, E. Produção de celulasas e fusão de protoplastos em *Humicola* sp. Piracicaba, 1988. 168p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- OGAWA, K.; OHARA, H.; TOYAMA, N. Intraspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var. *kawachi* by protoplast fusion. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 52(2):337-42, 1988.
- OGAWA, K.; OHARA, H.; KOIDE, T.; TOYAMA, N. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* by protoplast fusion. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, 67(3):207-9, 1989.

- PACCOLA-MEIRELLES, L.D. Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Blas.) Vuill. Piracicaba, 1988. 193p. (Doutorado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*. California, 33:21-39, 1979.
- PEBERDY, J.F. Fusão de protoplastos em fungos. In: AZEVEDO, J. L. coord. *Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*. Piracicaba, FEALQ. 1985. cap.7, p.61-5.
- PEBERDY, J.F. & GIBSON, R.K. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Journal of General Microbiology*, London, 69:325-30, 1971.
- PEBERDY, J.F.; BUCKLEY, C.E.; DALTREY, D. C.; MOORE, P.M. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, London, 67:23-6, 1976.
- PE'ER, S. & CHET, I. *Trichoderma* protoplast fusion: a tool for improving biocontrol agents. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 36(1):6-9, 1990.
- PEREZ, A.; REYES, E.; NOVAES-LEDIEU, M.; GARCIA MENDOZA, C. Cell wall remnants. *Transaction of the British Mycological Society*, London, 86(4):545-9, 1986.

- PFEIFER, T.A. & KHACHATOURIANS, G.G. The formation of protoplasts from *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Baltimore, 26:248-53, 1987.
- PICATAGGIO, S.K.; SHAMHART, D.H.J.; MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Sphaeroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, 17:121-8, 1983.
- PINGYAN, L. & KAIYING, C. Virus transmission through interspecies protoplast fusion in *Aspergillus*. *Transaction of the British Mycological Society*, London, 89(1):73-81, 1987.
- PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, 10:393-400, 1956.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; FORBES, E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*, London, 8:198-210, 1953.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K.D.; BUFTON, A. W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, 5:141-238, 1953.
- PUHALLA, J.E. & MAYFIELD, J.E. The mechanism of heterokaryotic growth in *Verticillium dahliae*. *Genetics*, Princeton, 76:411-22, 1974.

- QUIGLEY, D.R.; TAFT, C.S.; STARK, T.; SELITRENNIKOFF, C.P. Optimal conditions for the release of protoplasts of *Neurospora* using Novozym 234. *Experimental Mycology*, Duluth. 11:236-40, 1987.
- RIBA, G.; AQUINO, M.L.De; RIBEIRO, S.A. Polymorphisme chez des souches brésiliennes de l'Hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, inféodées à des *Cercopidae*. *Agronomie*, Paris, 7 (10):763-8, 1987.
- RIBA, G.; AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L.; DIAS DA SILVEIRA, W.D.; TUVESON, R. Studies of the inheritance of virulence in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 46:20-5, 1985.
- RICO, S. & VICTORIA, J.L. Evaluación e identificación de microorganismos patógenos de *Perkinsiella saccharicida* (Hom. Delphacidae) en caña de azúcar. *Acta Agronômica*, Palmira, 38(1):31-40, 1988.
- ROPER, A.J. Recombinação em fungos filamentosos. In: AZEVEDO, J.L., coord. *Genética de Microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*. Piracicaba, FEALQ, 1985. cap.4, p.29-33.
- 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(1):25-31, 1989.
- SANDHU, D.K.; BAWA, S.; BAGGA, S.P. Optimization of protoplast production from *Trichoderma harzianum*. *Indian Journal Experimental Biology*, New Delhi, 27(2):180-1, 1989. Apud *Abstracts of Mycology*, Philadelphia, 23(7)AB-38, July, 1989. (Resumo).
- SANTOS, A.L.L. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) . Sorokin. Piracicaba, 1978. 148p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- SHIMIZU, S. & KURISU, K. Production and reversion of protoplasts from *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, Tokyo, 28(3):325-30, 1987. Apud *Abstracts of Mycology*, Philadelphia, 22(5);AB-48, May, 1988. (Resumo).
- SIETSMA, J.H. & BOER, W.R.de. Formation and regeneration of protoplasts from *Pythium* PRL 2142. *Journal of General Microbiology*, London, 74:211-7, 1973.
- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. Virulência de mutantes e revertentes de exoenzimas de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 38:814, 1985.

SILVA, J.C.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; MARCONDES, C.B. Selection of *Metarhizium anisopliae* for extracellular enzyme production and virulence toward *Triatoma infestans*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 12(1):1-7, 1989.

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).

SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 7:1-8, 1984.

SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 9:149-52, 1987.

SOSA-GOMEZ, D.R. & ALVES, S.B. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. I. Estandarización, virulencia e actividad enzimática. *CIRPON. Revista de Investigación*, Tucumán, 1:83-102, 1983.

SOSA-GOMEZ, D.R.; ALVES, S.B.; MACHADO NETO, R. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. III. Inactivación de conídios com luz ultravioleta y zimogramas del sistema de alfa-esterasas. *CIRPON. Revista de Investigación*. Tucumán, 2:47-54, 1984.

- STASZ, T.E.; HARMAN, G.E.; WEEDEN, N.F. Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strains of *Trichoderma harzianum*. *Mycologia*, Lancaster, 80(2):141-50, 1988.
- STIMAC, J.L.; CAMARGO, M.T.V.; ALVES, S.B. Suscetibilidade de *Solenopsis* spp. a diferentes espécies de fungos entomopatogênicos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Itabuna, 16 (2): 377-88, 1987.
- SZAJER, I.; SZJER, C.; JAMROZ, J. Release of protoplasts from *Penicillium paxilli* by *Penicillium purpurogenum* enzymes. *Acta Microbiologica Polonica*, Warsaw, 37(2):159-66, 1988. Apud *Abstracts of Mycology*, Philadelphia, 23(7):AB-80. July, 1989. (Resumo).
- TANAKA, Y.; OGASAWARA, N.; KAMIMIYA, S. Protoplasts of *Pyricularia oryzae* P₂: preparation and regeneration into hyphal form. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 45:1541-52, 1981.
- TANAKA, Y.; MURATA, N.; KATO, H. Behaviour of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain of weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, Tokyo, 45:182-91, 1979.
- TINLINE, R.D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, Lancaster, 63:713-21, 1971.

- TINLINE, R.D. & NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, Lancaster, 63:701-12, 1971.
- TOYAMA, H.; YAMAGUCHI, K.; SHINMYO, A.; OKADA, H. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*, using immaturo conidia. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 47(2):363-8, 1984.
- TOYOMASU, T. & MORI, K. Intra and interspecific protoplast fusion between some *Pleurotus* species. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 51(3):935-7, 1987b.
- TOYOMASU, T. & MORI, K. Fruit body formation of the fusion products obtained on interspecific protoplast fusion between *Pleurotus* species. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 51(7):2037-40, 1987a.
- TRINCI, A.P.J. & COLLINGE, A.J. Hyphal wall growth in *Neurospora crassa* and *Geotrichum candidum*. *The Journal of General Microbiology*, London, 91:355-61, 1975.
- TULLOCH, M. The genus, *Metarhizium*. *Transaction of the British Mycology Society*, London, 66:407-11, 1976.
- USHIJIMA, S.; NAKADAI, T.; UCHIDA, K. Improvement of enzyme productivities through mutation or haploidization of heterozygous diploids obtained by protoplast fusion of *Aspergillus sojae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 51(4):1051-57, 1987.

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).

VALADARES, M.C.C.; NAVES, M.A.; LUNA, E.A.; AZEVEDO, J.L. Efetividade de mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* no controle biológico de insetos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 37., Belo Horizonte, 1985. Resumos. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 37(7):721, 1985.

VEEN, K.H. Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*. Wageningen, 68:1-7, 1968.

VEIGA, A.F.S.L. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. como opção para o controle biológico das cigarrinhas-das-pastagens (Homoptera: *ceropidae*) no Estado de Pernambuco. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, Brasília, (1): 3-4, 1979.

VIALTA, A. Genética e produção de amiloglicosidase em *Aspergillus awamori* e no híbrido interspecífico com *Aspergillus niger*. Campinas, 1987. 184p. (Mestrado-Universidade Estadual de Campinas).

WOLOSHUK, C.P.; SEIP, E.R.; PAYNE, G.A.; ADKINS, C.R. Transformation system for the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 55(1):86-90, 1989.

YANAGI, O.S.; KAWASUMI, T.; TAKEBE, I.; TAKEMARU, T. Genetic analysis of *Coprinus cinereus* strains derived through intraspecific protoplast fusion. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 52(1):281-4, 1988.