PARASSEXUALIDADE EM *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN

CLAUDIO LUIZ MESSIAS
engenheiro agrônomo

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese Apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
doutor em Genética e Melhoramento
de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1979

*Às minhas irmãs,
Evangelina e Ana Rita
DEDICO*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e em especial:

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, amizade e estímulos constantes.

Ao Prof. Renato Bonetelli Júnior e Profa. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner, amigos e colegas, pelo auxílio na revisão do texto, e sugestões apresentadas.

Aos colegas Prof. Dr. Ivanhoê Rodrigues Baracho e Profa. Ioko Bomura Rosato, pelas sugestões apresentadas.

Aos estagiários voluntários do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, Maria José Tavares de Mello e Marilsa Souza de Assis, e ao Técnico de Laboratório Juverlandi Lugli, pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico CNPq, através do Programa Integrado de Parasitologia Agrícola e Programa Integrado de Genética, pelo auxílio ao laboratório.

Ao Prof. Dr. Walter A. Hadler, como Diretor do Instituto de Biologia pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

.iv.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, através do Programa Nacional de Controle às Cigarritas das Pastagens, pelo auxílio para obtenção das linhagens.

Ao Pesquisador José Aires Ventura, pela colaboração no envio das linhagens.

CURRICULUM VITAE

CLAUDIO LUIZ MESSIAS, natural de Bonfim Paulista, no estado de São Paulo, filho de Elvessio Messias e Odette R. Sargento Messias, obteve o título de engenheiro agrônomo pela Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária de Jaboticabal "Prof. Antonio Ruete", Universidade Júlio de Mesquita Filho, é Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas pela Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP.

Atualmente, é professor assistente da disciplina de Genética, junto ao Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas onde desenvolve pesquisa na área de Genética de Microrganismos com ênfase a fungos entomopatogênicos.

ÍNDICE

página

1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	5
3.2. Ciclo parassexual e sua importância	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Linhagem utilizada	18
4.2. Meios de cultura e soluções utilizadas	19
4.2.1. Meio mínimo (<i>PONTECORVO e col. 1953</i>) (MM)	19
4.2.2. Meio completo (<i>PONTECORVO e col. 1953</i>) (MC)	19
4.2.3. Meio mínimo mais 1% de meio completo	20
4.2.4. Solução salina	20
4.2.5. Solução de tween 80	20
4.2.6. Solução de 1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenze- no (Cloroneb)	20
4.2.7. Solução de vitaminas	21
4.2.8. Solução de caseína hidrolisada	21
4.2.9. Hidrolisado de ácido nucléico de levedura	21
4.2.10. Extrato de leveduras	22
4.2.11. Suplementos adicionados ao meio mínimo ..	22
4.2.12. Solução de albumina (<i>ROBINOW e CATEN,</i> <i>1969</i>)	22

4.2.13. Soluções de álcool etílico	23
4.2.14. Solução de ácido acético glacial	23
4.2.15. Fixador HCl	23
4.2.16. Tampão fosfato	23
4.2.17. Solução de Giemsa	23
4.3. Métodos de estudo de aspectos citológicos da <u>li</u> nhagem utilizada	24
4.3.1. Aspectos citológicos	24
4.3.1.1. Observação do número de núcleos da linhagem selvagem	24
4.3.1.2. Verificação do diâmetro do nú- cleo e tamanho do conídio na <u>li</u> nhagem selvagem	25
4.3.1.3. Observação do número de nú- cleos, tamanho de núcleos e co- nídios em mutantes e diplóides.	25
4.4. Sobrevivência à luz ultra-violeta	26
4.5. Obtenção dos mutantes auxotróficos, morfológi- cos e teste de reversão	26
4.5.1. Obtenção de mutantes auxotróficos e mor- fológicos	26
4.5.2. Teste de reversão	28
4.6. Técnicas de análise genética	28
4.6.1. Obtenção de heterocário	29
4.6.2. Obtenção de diplóides	29

4.6.3. Haploidização dos diplóides	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Aspectos citológicos em <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i>	31
5.2. Sobrevivência à luz ultra-violeta (UV)	32
5.3. Obtenção de mutantes	35
5.4. Teste de reversão	38
5.5. Análise genética	39
5.5.1. Obtenção do heterocário	39
5.5.2. Obtenção de diplóides	40
5.5.3. Haploidização dos diplóides.....	41
5.5.4. Diâmetro nuclear e tamanho de conídio da linhagem selvagem, mutantes, e diplóides de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i>	44
6. DISCUSSÃO	45
6.1. Aspectos citológicos	45
6.2. Obtenção de mutantes e sua estabilidade	47
6.2.1. Sobrevivência a luz ultra-violeta	47
6.2.2. Mutantes	48
6.3. Ciclo parassexual	50
6.3.1. Obtenção do heterocário	50
6.3.2. Obtenção do diplóide	52
6.3.3. Segregantes dos diplóides	54

7. CONCLUSÕES	58
8. SUMMARY	60
9. LITERATURA CITADA	62

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>página</u>
1 - Porcentagem de conídios de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i> , sobreviventes a luz UV (Média de 3 experimentos	35
2 - Simbologia dos mutantes de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i> obtidos por irradiação da luz ultra-violeta 2.537 Å	38
3 - Frequência de reversão espontânea de diferentes mutantes de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i> utilizados no presente trabalho	39
4 - Crescimento de conídios que se desenvolveram tanto em MM e MC, oriundos de colônias que cresceram em MM, prototróficas e de coloração selvagem após transferência do heterocário	40
5 - Frequência média da obtenção de diplóides em <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i> em 10^6 conídios	41
6 - Diplóides heterozigotos obtidos entre diferentes mutantes de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i>	41
7 - Segregantes de diferentes heterozigotos diplóides de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i>	42
8 - Diâmetro do núcleo, tamanho do conídio da linhagem selvagem, mutantes e diplóides heterozigotos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i>	44

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>página</u>
1 - Mostra uma hifa característica com a ocorrência de um núcleo ou dois núcleos por septo, pode ser visualizado também um prolongamento fino que se constituirá em um conidióforo. (10X; 16X)	33
2 - Ocorrência de hifas das quais os septos dão origem a prolongamentos, conidióforos que são anormais, dos quais já é notado a formação de conídio. (10X; 16X)	33
3 - Observa-se uma fusão característica de conídios que está ocorrendo lateralmente e pelas partes polares. Estes conídios partem de um único conidióforo. Nos conídios observa-se um núcleo. De um dos conídios, o mais terminal, nota-se a formação de hifa pela germinação. (10X; 16X)	34
4 - Observa-se conídios típicos de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i> contendo um e dois núcleos. Na frequência de 95% de uninucleados para 5% de conídios binucleados. (10X; 63X)	34
5 - Curva de sobrevivência da linhagem selvagem de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i> irradiada com luz-ultra violeta. 2537 Å.	36
6 - Passos seguidos para obtenção dos mutantes morfológicos e auxotróficos de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>minor</i> (UV = ultra-violeta. Os outros símbolos se encontram na Tabela 2)	37
7 - Mostrando a formação de setores típicos em diplóides de <i>M. anisopliae</i> var. <i>minor</i> . A indução dos setores foi feita utilizando-se 1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno (Cloroneb)	43

1. RESUMO

No presente estudo procurou-se caracterizar-se o ciclo parassexual do fungo *Metarhizium anisopliaea* var. *minor*, isolado de insetos adultos de *Deois* sp. (Hom. Cerc.).

Utilizando-se como mutagênico a luz ultra-violeta obteve-se mutantes morfológicos e auxotróficos para a biossíntese de aminoácidos e vitaminas. Estes mutantes foram utilizados para a formação de heterocários balanceados que se constituíram no ponto de partida para a produção de diplóides. Diplóides assim obtidos foram haploidizados através de 1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno (Cloroneb) adicionado ao meio seletivo; obteve-se assim a formação de setores haplóides que após análise demonstraram segregarem marcas tipos parentais e recombinantes, para requisitos nutricionais e morfologia.

Técnicas citológicas permitiram a observação do fenômeno de fusão entre conídios e fusão de hifas de diferen-

tes segmentos na linhagem haplóide. Pelas técnicas foi estudada também a variação no tamanho dos confídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides. Pelo tamanho do confídio não foi possível distinção entre linhagens haplóides e diplóides. No entanto, núcleos de confídios diplóides são maiores do que os de confídios haplóides.

2. INTRODUÇÃO

Os fungos imperfeitos são assim denominados por não possuírem ou não terem ainda caracterizado o seu ciclo sexual. Desta maneira a possibilidade de variação genética está associada a outros fenômenos tais como mutação e heterocariose. No entanto, uma alternativa do sexo em fungos denominada ciclo parassexual foi descoberta por *PONTECORVO e ROPER, (1952)* em *Aspergillus nidulans*; desde então vários autores tem reportado a ocorrência deste ciclo em outros fungos.

O ciclo parassexual está basicamente caracterizado por fenômenos tais como: heterocariose, formação de um diplóide, permuta mitótica e haploidização. O processo desde sua descoberta tem permitido o estudo de vários aspectos da Genética desde o mapeamento de genes através da permuta mitótica e haploidização até estudos sobre regulação gênica (*PONTECORVO, 1963*) e instabilidade genética nuclear (*BALL e AZEVEDO, 1976*), além de permitir o melhoramento de microrganismos indus

triais por técnicas de recombinação genética.

Metarhizium anisopliae é um microrganismo desprovido de ciclo sexual e de reconhecido valor no controle biológico de insetos. Embora heterocariose já tenha sido descrita nesse fungo (TINLINE e NOVIELLO, 1971) não foi ainda caracterizado o ciclo parassexual no mesmo. O presente trabalho teve então, como objetivo a obtenção de mutantes em *M. anisopliae*, o estudo de alguns aspectos citológicos na linhagem e, em seguida, a verificação da ocorrência do ciclo parassexual nesse fungo. A existência desse ciclo possibilitará a obtenção de recombinantes com qualidades desejáveis para o controle biológico de insetos, a exploração do vigor híbrido e, o armazenamento da variabilidade em diplóides, bem como outros estudos de ordem genética.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. O fungo *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

O fungo entomopatôgeno *M. anisopliae* foi isolado de um besouro *Anisopliae austriaca*, por Metschnikoff em 1879, o qual demonstrou ser este microrganismo efetivo como causador de doenças a insetos e assim abriu a oportunidade para utilização de fungos como agentes controladores de insetos (BURGES e HUSSEY, 1971).

Vários autores tem citado o *M. anisopliae* como um dos fungos entomopatôgenos de grande potencialidade no controle biológico de insetos como é o caso da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata*, citada por GUAGLIUMI e col. (1972). Este microrganismo vem sendo também utilizado em pastagens para o controle de cigarrinha dos gêneros, *Deois*, *Zulia* e *Aneolamia*, (Hsm. Cerc.).

A espécie *Metarhizium anisopliae*, pertence a

ordem Moniliales, família *Moniliaceae*, classe dos Deuteromycetos, apresentando conídios desde cilíndricos até ovalados e suas colônias podem ser de coloração verde, sépia ou branco amarelada.

Os conídios apresentam uma variação no tamanho sendo a espécie em relação a esta característica dividida em duas variedades, a *minor* e a *major*, sendo também a primeira conhecida como variedade *anisopliae*. A variedade *minor* (*M. anisopliae* var. *anisopliae*) apresenta-se com conídios de 3,5 a 9,0 µm de comprimento, (usualmente 5,0 a 8,0 µm) e a segunda variedade *major* (*M. anisopliae* var. *major*) tem conídios com 9,0 a 18,0 µm de comprimento, mais usualmente de 10,0 a 14,0 µm (TULLOCH, 1976). Alguns autores acreditam que a variedade *major* possa ser um diplóide (TINLINE e col. 1971).

O fungo apresenta-se com conídios uninucleados, (TINLINE, 1971), sendo os conidióforos igualmente uninucleados no início de seu desenvolvimento. Todos os núcleos produzidos de um conidióforo provêm de um mesmo progenitor. Os conídios maduros são tipicamente uninucleados. Durante a germinação os núcleos se dividem e um migra para o tubo germinativo, enquanto o outro permanece no conídio. As hifas são frequentemente uninucleadas mas, algumas células contêm dois ou mais núcleos. Anastomoses e possivelmente migrações nucleares ocorrem e são comuns tanto em conídios e hifas, supondo-se que este processo seja responsável pelo mecanismo de variação (TIN

LINE, 1971).

O número de núcleos por conídio também foi verificado por VEEN (1967) e ZACHARUK (1970) observando-se também um núcleo por conídio. No entanto, alguns conídios tem mais que um núcleo, o que leva alguns autores a sugerirem que os conídios com 2 núcleos estejam em um processo de germinação (TINLINE e col. 1971). Por outro lado, anastomose também pode levar a constituição de conídios com dois núcleos.

TINLINE e col. (1971) trabalhando com um isolado de *M. anisopliae*, o 8-P-1, derivado de uma larva de elaterídeo, o *Hypolithus bicolor* (Each) obtiveram mutantes auxotróficos e também mutantes resistentes a drogas e concluíram que a heterocariose pode ocorrer nesse fungo.

M. anisopliae apresenta uma temperatura ótima para crescimento entre 25° a 30°C. Os pontos de crescimento mínimo estão abaixo de 7°C e acima de 35°C (LATCH, 1965). Quanto ao pH se desenvolve desde 2,0 até 8,5 sendo o ótimo em torno de 6,9 (LIHNELL, 1944). Com relação a fonte nutritiva é um microrganismo pouco exigente desenvolvendo-se em meios de cultura bastante diferenciados, utilizando como fonte de carbono amido, glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina (HUBER, 1958; LIHNELL, 1944). Apresenta ótimo desenvolvimento em meio mínimo e meio completo para *Aspergillus nidulans*, (MESSIAS, não publicado).

Estudos visando a caracterização de diferentes isolados deste fungo tem sido conduzidos, por métodos eletroforéticos pela produção de esterase e fosfatase. *DE CONTI, MESSIAS, SOUZA e AZEVEDO (não publicado)* verificaram a ocorrência de cinco padrões eletroforéticos para esterase em onze isolados de diferentes regiões brasileiras e com relação à fosfatase apresentaram um único padrão eletroforético.

3.2. O ciclo Parassexual e sua Importância

Com as descobertas de *BEADLE e TATUM (1941)* em *Neurospora crassa*, a Genética de Microrganismos tomou uma nova dimensão particularmente no que se refere à Genética de Fungos Filamentosos. Os fungos apresentam várias vantagens em relação aos demais organismos para estudos genéticos. Entre elas estão, o ciclo vital bastante rápido, suas culturas podem ser feitas em pequeno espaço contendo um grande número de indivíduos, apresentam facilidade na obtenção de mutantes por serem em sua grande maioria haplóides e, finalmente, possuem capacidade de desenvolvimento em meios de composição definida ou semi definida. A rápida e simples obtenção de mutantes traz, como trouxe em *Neurospora crassa*, uma grande facilidade de se ter um aumento da variabilidade, o que é de importância pois a genética está baseada em torno da variabilidade encontrada nos organismos. Esta variabilidade pode ser obtida por mutações e/ou recombinação. Uma funciona como uma fonte criadora de variação entre os organismos e, a outra, recombina este mate-

rial e distribuindo-o nas populações através de cruzamentos via sexual dando a estas novas reorganizações. Realmente até a década de 40 ter-se-ia como única maneira de distribuição e reorganização deste material a via sexual. Mas atentando-se para alguns aspectos como a transformação em bactérias, (AVERY e col., 1944) onde DNA pode ser incorporado em células receptoras dando gerações recombinantes ou, ainda, o processo da transdução (ZINDER e LEDERBERG, 1952), verifica-se que há possibilidade de recombinação do material genético por processos alternativos, via parassexual, em procariotos. Embora essas alternativas do sexo tenham sido descobertas em procariotos, foram os fungos que permitiram a elucidação de algumas teorias básicas em genética como a de "um gene-uma enzima", atualmente "um cistron-uma cadeia polipeptídica". O trabalho citado anteriormente realizado por BEADLE e TATUM na realidade foi o início do processo evolucionário dentro da genética de microrganismos bem como da Genética Molecular e Fisiológica. Nesta época não havia então a possibilidade de recombinação a não ser pela via sexual. A via sexual em fungos é uma característica observada em *FICOMICETOS*, *ASCOMICETOS* e *BASIDIOMICETOS*, enquanto, que os *DEUTEROMICETOS*, também conhecidos por fungos Imperfeitos, são assim denominados pelo fato de não possuírem ou não terem ainda descrito o seu ciclo sexual. Desta forma percebe-se a grande dificuldade para surgimento de variabilidade em Deuteromicetos que ficam restringidos a variação via mutação.

No ano de 1952, *PONTECORVO* e *ROPER* ofereceram à ciência um novo processo de recombinação em fungos, ou seja, o ciclo parassexual, descrito pela primeira vez no fungo *Aspergillus nidulans*. Foi *ROPER* (1952) que através de mutantes morfológicos e nutricionais obteve combinação desses marcadores em uma linhagem diplóide de *A. nidulans*. Surge então a valorização de algumas palavras como anastomose de hifas e heterocário que são partes importantes na constituição do ciclo parassexual pois são indispensáveis na obtenção do diplóide somático. Os diplóides somáticos podem surgir por várias maneiras; a) falhas durante o processo meiótico, que não é o caso em estudo ; b) falha em processo mitótico; c) pela fusão de núcleos haplóides, processo também chamado de cariogamia, provavelmente todos estes mecanismos podem ocorrer na natureza mas, é somente o último que é tomado rotineiramente para a produção de heterozigotos diplóides de genótipo conhecido.

O último processo, fusão de núcleos haplóides, é obtido então pelo método descrito por *ROPER* (1952) e, tem como etapas iniciais, a anastomose de hifas e a formação do heterocário; à partir da formação deste heterocário conídios são coletados e semeados em meio de composição definida ou meio mínimo; este meio não permitirá o desenvolvimento de tipos paternais, mas algumas colônias de coloração verde (cor da linhagem selvagem) se desenvolveram e, estas não apresentavam as deficiências nutricionais encontradas nos tipos paternos. Assim obteve-se colônias diplóides originadas pela fusão de nú-

cleos haplóides quando ainda no estágio heterocariótico. Desta maneira *ROPER (1952)* apresentou um meio de seleção para o isolamento de diplóides heterozigotos que juntamente com os trabalhos desenvolvidos com *PONTECORVO e col. (1953)* elucidou o ciclo parassexual e a recombinação mitótica que auxiliam grandemente o mapeamento cromossômico do *A. nidulans*.

Do ponto de vista genético pode se obter diplóides somáticos usando-se a poliploidia, agentes químicos conhecidos como a colchicina ou a cânfora (*BARRON, 1962; ISHITANI e col., 1956; PONTECORVO e col., 1953 e ROPER, 1966*). Porém os diplóides assim formados são homozigotos e isto dificulta a confirmação de que eles sejam realmente diplóides.

A confirmação de diplóides somáticos é feita baseada na identificação do fenótipo tipo selvagem, quando existem marcas morfológicas nos haplóides parentais; no entanto, só esse critério não representa muito uma vez que pode se estar diante de uma reversão ou então pode-se ter a partir do heterocário um aneuplóide; assim, outros critérios se somam para a confirmação do diplóide somático tais como: a) Conteúdo de DNA, b) contagem do número de cromossomos, c) segregação de marcas parentais, d) volume nuclear, e) volume celular, f) morfologia de colônias e desenvolvimento, g) sensibilidade a luz ultra-violeta, h) mutabilidade e, i) número de núcleos por conídios do diplóide quando comparado com o haplóide. *PAPA (1976) e MESSIAS (1977)* em *Aspergillus flavus*, fungo filamento

so que apresenta um dois ou mais núcleos por conídio, usaram por exemplo, esta última característica para confirmação do diplóide somático.

Sendo os processos anastomoses de hifas a heterocariose, precursores do diplóide, alguns autores como CATEN e JINKS (1966), TINLINE e McNEILL (1969) e DAVIS (1966) trataram de suas particularidades em revisões sobre o assunto. O heterocário contém dois núcleos diferentes, em um mesmo citoplasma e, isso além de ocorrer por anastomose de hifas, pode ocorrer também por mutações (ISHITANI e SAKAGUCHI, 1956 e TINLINE, 1961). A partir do heterocário obtém-se a fusão de núcleos que darão então origem ao diplóide heterozigoto (ROPER, 1952). A frequência com que os diplóides ocorrem está entre 10^6 a 10^7 conídios para um diplóide somático em *A. nidulans*. Este número, no entanto pode ser aumentado pelo uso de agentes físicos (DAY e JONES, 1969; IKEDA e col., 1957), como a luz ultravioleta e agentes químicos. ISHITANI e col. (1956) verificaram em *Aspergillus sojae*, fungo com conídios multinucleados, que a luz ultravioleta aumenta a frequência de conídios diplóides de 10^{-7} para 10^{-2} com doses que permitem apenas 1% de sobrevivência.

Os diplóides podem exibir variação no volume nuclear, bem como, no número de núcleos por conídios. Assim os diplóides podem apresentar um tamanho maior tanto para o conídio como para o núcleo como em *A. nidulans*, mas, também pode

não apresentar diferenças no tamanho como em *A. sojae* e *A. oryzae* (IKEDA e col., 1957), *Ustilago maydis* (HOLLIDAY, 1961), *Cochliobolus sativus* (TINLINE, 1962) e *A. flavus* (PAPA, 1973; MESIAS, 1977) este último mais caracterizado com o fenômeno da redução do número de núcleos como uma das maneiras para a visualização do diplóide, como também ocorre com uma espécie indeterminada de *Aspergillus*, estudada por PEREIRA (1978).

Desta forma o ciclo parassexual permite a produção de recombinantes, que envolve permuta mitótica que ocorre no estágio de 4 fios e, haploidização; este tipo de permuta, descrito por STERN (1936) em *Drosophila*, também é conhecido e estudado por KAUFER (1958, 1961), PONTECORVO e KAUFER (1958) e ROPER (1966) entre outros, em *A. nidulans*. A permuta mitótica é um evento raro. Em relação ao comportamento mitótico os cromossomos com seus centrômeros se dividem e, as cromátides de cada homólogo vão para polos opostos. Após a permuta mitótica, dependendo da segregação dos cromatídeos, os núcleos filhos serão homozigotos para alguns marcadores para os quais previamente eram heterozigotos. Após a permuta mitótica tem-se núcleos homozigotos para todos os alelos ligados e distais em relação ao ponto de permuta. Marcadores proximais ao ponto de permuta e, marcadores em outros braços cromossômicos, continuam heterozigotos. Assim a análise dos recombinantes mitóticos possibilita o conhecimento da ordem dos genes e posição do centrômero em um braço cromossômico individual; no entanto,

segundo *ROPER (1966)* estas análises apresentam limitações como: quando são analisados os braços cromossômicos não se tem a idéia sobre a associação dos genes em relação a todos os grupos de ligação que pode ser mostrado pela haploidização; outra limitação é a necessidade de alelos com características especiais recessivos ou semi-dominantes, localizados distalmente para fornecer meios para seleção das classes resultantes da permuta mitótica, ainda outra limitação é que essas análises não propiciam uma avaliação rápida das frequências de recombinação como no caso das análises meióticas. Mesmo com as dificuldades para se estimar a frequência absoluta com que ocorre permuta mitótica (*ROPER, 1966*) foi sugerido que ocorre uma permuta para cada 50 divisões mitóticas.

Dos segregantes obtidos de um diplóide existem três classes que não surgem por permuta mitótica. Essas classes são haplóides, diplóides por não-disjunção e aneuplóides (*ROPER, 1966*).

PONTECORVO e KÄFER (1958) encontraram colônias de *A. nidulans*, instáveis após terem semeado conídios de diplóides heterozigotos em meio completo. Através de análise desses tipos instáveis, *KÄFER (1961)* encontrou várias classes de aneuplóides, como os hiperdiplóides geralmente do tipo $2n + 1$ que aparecem numa frequência de um para 150 colônias e, os hiperhaplóides $(n + 1)$ que aparecem em frequência de 1: 1000. Um fator comum para os aneuplóides foi uma reduzida taxa de

crescimento e produção de setores normais devido à perda do cromossomo em excesso.

O ciclo parassexual tem sido verificado em vários gêneros de fungos filamentosos. AZEVEDO (1976), reporta 36 espécies que já tiveram seu ciclo parassexual caracterizado e, dentre estas, 8 (oito) são do gênero *Aspergillus*. Outros trabalhos tem sido desenvolvidos e, as espécies que já apresentam ciclo parassexual, além daquelas já revisadas por AZEVEDO (1976) : são *Humicola* sp. (BERTOLDI e CATEN, 1975); *Aspergillus* sp. 321 (PEREIRA, 1978), possivelmente *Beauveria bassiana* (YURCHENKO e col., 1974) e, ainda *Acremonium chrysogenum* (BALL e HAMLIN, 1978), sendo este último obtido por um processo de fusão de protoplastos. De fato, raros são os casos de tentativas com a não caracterização do ciclo como ocorreu em *Neurospora* (ROPER, 1966) e *Colletotrichum lagenarium* (DUTTA e GARBER, 1960).

O ciclo parassexual além de ser um sistema que favorece os estudos de ordem genética, possibilitando o mapeamento de grupos de ligação, oferece ainda a possibilidade de variação para os fungos que não apresentam ciclo sexual.

Ele permite, por exemplo, o mapeamento de genes nos respectivos grupos de ligação. Assim, FORBES (1959) construiu uma linhagem de *Aspergillus nidulans*, contendo marcadores em todos os oito grupos de ligação. Desta maneira tendo-se uma linhagem mutante com um gene a ser localizado em um

grupo de ligação, basta que se proceda uma análise pelo ciclo parassexual, e, com a haploidização, este gene será mapeado juntamente com algum marcador da linhagem mestra (Mc CULLY e FORBES, 1965).

A identificação dos grupos de ligação pode também ser feita através de análise mitótica como ocorreu em *A. niger* (LHOAS, 1967), *Penicillium chrysogenum* (BALL, 1971), *P. expansum* (GARBER e BERAHA, 1965), *Humicola* sp. (BERTOLDI e CATEN, 1975), *A. flavus* (PAPA, 1976), *Verticillium albo atrum* (HASTIE, 1964), *Dictyostelium discoideum* (WRIGHT e col., 1977), *Aspergillus* sp. 321 (PEREIRA, 1978). O ciclo parassexual permite ainda o estudo de dominância e recessividade de genes em um mesmo núcleo em um citoplasma comum; revisões especializadas sobre o assunto podem ser encontradas (ROPER, 1966; AZEVEDO, 1972). O mesmo ciclo parassexual permitiu também pesquisas sobre instabilidade mitótica pois os microrganismos são bastante acessíveis para estudos desta natureza. Revisões a respeito podem ser encontradas em AZEVEDO (1972), MENEZES e AZEVEDO (1978), ALMEIDA (1976) e NIFFINEGER e SOUZA (1979). Finalmente, do ponto de vista aplicado, o ciclo parassexual possibilita a recombinação em fungos economicamente importantes e que não apresentam ciclo sexual. Assim, o melhoramento genético de muitas espécies de importância industrial tem sido realizado por este processo conforme pode ser visto na revisão de SERMONTI (1956, 1959, 1969), BURNETT (1975) e MACDONALD (1976).

Também esse sistema de recombinação permitiu explicar o aparecimento de novas raças fisiológicas em fungos fitopatogênicos. O caso clássico é o descrito por BUXTON (1956, 1962) onde diplóides heterozigotos obtidos de *Fusarium oxysporum* f.s. *pisi*, a partir de heterocários da raça 1 virulenta ao cultivar Onward de ervilhas e a raça 2 virulenta para o cultivar Alaska, deram recombinantes mitóticos virulentos a ambos os cultivares e também para um terceiro o Delviche commando.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagem utilizada

A linhagem de *Metarhizium anisopliae* var. *minor*, utilizada no presente trabalho foi isolada de insetos adultos de *Deois* sp. (Hom. Cerc.) coletados no Estado de Espírito Santo e, que nos foi gentilmente enviada pelo Dr. José Aires Ventura, pesquisador junto a Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária - EMCAPA. A caracterização como *M. anisopliae* var. *minor* de acordo com JOHNSTON (1915) foi feita por MESSIAS e col. (1978). Este inseto (*Deois* sp.) é também conhecido por cigarrinha das pastagens das quais é uma das principais pragas de importância econômica.

4.2. Meios de Cultura e Soluções utilizadas

4.2.1. Meio mínimo (*PONTECORVO e col. 1953*) (MM)

NaNO_3	6,00 g
KH_2PO_4	1,50 g
KCl	0,50 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,50 g
FeSO_4	0,01 g
ZnSO_4	0,01 g
Glicose	10,00 g
Ágar	15,00 g
Água destilada	1.000 ml

O pH foi ajustado para 6,9 com NaOH ou HCl 1N.

4.2.2. Meio completo (*PONTECORVO e col. 1953*) (MC)

Este meio foi preparado adicionando-se ao meio mínimo as seguintes substâncias:

Peptona	2,00 g
Caseína Hidrolisada	1,50 g
Extrato de leveduras	0,50 g
Solução de vitaminas	1,00 ml
Ácido nucléico de leveduras	2,50 ml

O pH foi ajustado para 6,9 com NaOH ou HCl 1N.

4.2.3. Meio mínimo mais 1% de meio completo

Adicionou-se ao meio mínimo, 1% de meio completo; distribui-se 2,5 ml por tubo e esses tubos foram conservados em refrigerador após autoclavagem.

4.2.4. Solução salina

Preparou-se uma solução de cloreto de sódio 0,85% dissolvendo-se o sal em água destilada. Nove mililitros da solução foram colocados em cada frasco e autoclavou-se em seguida.

4.2.5. Solução de tween 80

Adicionou-se tween 80 à água destilada, numa concentração de 0,1% (v/v) e 2,5 ml da solução foram colocados em tubos de ensaio que foram autoclavados e a seguir, conservados em refrigerador.

4.2.6. Solução de 1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno (Cloroneb)

Obteve-se a solução utilizada dissolvendo-se 100 mg de Cloroneb em 10 ml de água destilada esterilizada. Conservou-se em refrigerador a 4°C.

4.2.7. Solução de vitaminas

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

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

4.2.8. Solução de caseína hidrolisada

Cem miligramas de caseína hidrolisada foram colocadas em frasco contendo 10 ml de H₂O destilada, sendo esta parcialmente esterilizada em banho-maria por 15 minutos. A seguir colocou-se em frasco escuro e conservou-se em refrigerador.

4.2.9. Hidrolisado de ácido nucléico de levedura

Ácido nucléico de leveduras (Oxoid) 2 gramas em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico.

Ácido nucléico de leveduras (Oxoid) 2 gramas em 15 ml de solução de hidróxido de sódio.

Ambas as soluções foram aquecidas por 20 minutos, a 100°C e em seguida, misturadas. Ajustou-se o pH para 6,0 filtrando-se em seguida. O volume foi completado para 40 ml e guardou-se a preparação em refrigerador, sob clorofórmio.

4.2.10. Extrato de leveduras

Foi utilizada uma solução de extrato de leveduras 100 miligramas em 10 mililitros de H₂O destilada. Em seguida esta foi parcialmente esterilizada e mantida em frasco escuro em refrigerador.

4.2.11. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Substâncias	Concentrações
Ácido p-aminobenzóico	50 µg/ml
Tiamina	50 µg/ml
Piridoxina	50 µg/ml
Arginina	50 µg/ml
Metionina	50 µg/ml

4.2.12. Solução de albumina (ROBINOW e CATEN, 1969)

A solução de albumina foi obtida adicionando-se 5% de clara de ovo a água destilada esterilizada. Manteve-se a solução no refrigerador, em frasco escuro.

4.2.13. Soluções de álcool etílico

Estas soluções foram utilizadas para a hidratação do material, nas seguintes concentrações: 50%, 70% e 95%. Realizou-se a diluição com água destilada.

4.2.14. Solução de ácido acético glacial

A solução foi preparada utilizando-se álcool absoluto, ácido acético glacial e ácido láctico na proporção de 6:1:1 respectivamente.

4.2.15. Fixador HCl

Preparou-se o fixador, utilizando-se 82,5 ml de HCl (Densidade 1,19) em 1000 ml de H₂O em balão volumétrico.

4.2.16. Tampão fosfato

KH ₂ PO ₄	0,60 g
NaHPO ₄	2,80 g
Água destilada	1.000 ml

Após a preparação, a solução foi mantida em refrigerador.

4.2.17. Solução de Giemsa

Dissolveu-se 1 grama de Giemsa em 54 ml de gli

cerina, a quente após esfriamento, foram adicionados 84 ml de metanol (P.A.), filtrou-se e aqueceu-se em banho-maria. A seguir a solução foi mantida em frascos.

4.3. Métodos de Estudo de Aspectos Citológicos da linhagem utilizada

4.3.1. Aspectos Citológicos

Cultivou-se o fungo em estudo em placas de Petri contendo MC, sobre o qual após solidificação colocou-se uma lâminula, inoculando-se o fungo em quatro pontos equidistantes. Incubou-se por sete dias a temperatura de 28°C. Em seguida o material foi corado com Giemsa (PAES DE BARROS, 1977) e realizou-se as observações com relação as estruturas tais como: hifas, conidióforos e conídios.

4.3.1.1. Observação do número de núcleos da linhagem selvagem

Com objetivo de se verificar o número de núcleos em conídios desta linhagem coletou-se conídios da mesma com 7 dias de crescimento em lâminulas com uma gota de solução de albumina a 5%. Após secagem os conídios foram fixados durante 10 minutos, em solução fixadora de álcool absoluto ácido acético glacial e ácido láctico (6:1:1). Em seguida fez-se hidratação em álcool em diferentes concentrações a saber: 95%,

70%, 50% e em água destilada. Logo após o material sofreu hidrólise em HCl 1 N, durante 5 minutos, a temperatura ambiente e, durante 6 minutos, na temperatura de 62°C, em banho-maria com temperatura controlada. A seguir o material foi lavado cinco vezes em água tamponada (Tampão fosfato pH 7) corado por 15 minutos (10 ml tampão fosfato para 18 gotas de solução de Giemsa) e observado ao microscópio. Os núcleos, após esse tratamento, aparecem com coloração avermelhado-azulado. Esta técnica foi proposta por *PAES DE BARROS (1977)*.

4.3.1.2. Verificação do diâmetro do núcleo e tamanho do conídio na linhagem selvagem

Com o material preparado pelo processo no item 4.3.1.1. procedeu-se a medida dos núcleos e conídios, utilizando-se uma ocular micrométrica.

4.3.1.3. Observação do número de núcleos, tamanho de núcleos e conídios em mutantes e diplóides

Inocularam-se conídios destas diferentes linhagens em meio completo e após desenvolvimento coletaram-se conídios das mesmas, com 7 dias de crescimento, em lâmina com uma gota de solução de albumina 5%, conforme técnicas descritas nos itens 4.3.1.1. e 4.3.1.2.

4.4. Sobrevivência à luz ultra-violeta

Conídios da linhagem E_g selvagem foram transferidos para solução de tween 80, estimando-se o número de conídios por mililitro através de hematímetro, ao microscópio. Em seguida, a suspensão de conídios foi diluída em solução salina (1:10), colocada em placa de Petri esterilizada e, efetuou-se a irradiação, mantendo-se a suspensão irradiada a uma distância de 15 cm da fonte de luz ultra-violeta 2.537 Å, em ambiente claro, em diferentes tempos. Após cada irradiação e diluições apropriadas, semeou-se 0,1 ml por placa com MC. As placas foram incubadas a 28°C em ausência de luz artificial e, após sete dias, procedeu-se a contagem do número de colônias. Considerando-se o número de colônias sobreviventes, calculou-se a porcentagem de sobrevivência utilizando-se a metodologia para o cálculo da LD₉₅ proposta por *BARACHO e col. (1977)*. Com os dados obtidos construiu-se a curva de sobrevivência.

4.5. Obtenção dos mutantes auxotróficos, morfológicos e teste de reversão

4.5.1. Obtenção de Mutantes Auxotróficos e Morfológicos

Conídios de linhagem E_g selvagem, com sete dias de desenvolvimento, foram transferidos para tubos de ensaio contendo solução de tween 80. Em seguida contou-se o número de conídios em hematímetro, procurando-se obter uma concentração de apro

ximadamente 10^7 conídios por mililitro.

A suspensão de conídios foi diluída (1:10) em solução salina e irradiada (UV), durante treze minutos tempo este capaz de inviabilizar 95% dos conídios.

A suspensão irradiada foi diluída e dessa diluição semeou-se 0,1 ml por placa de Petri, contendo MC. A seguir as placas foram incubadas a 28°C , por sete dias. Após esse tempo, conídios das várias colônias foram transferidos para placas de Petri, sendo inoculados na distribuição 5 x 5 mais 1, em MM (AZEVEDO, OLIVEIRA e ROCHA CAMPOS, 1976) e incubadas a 28°C . As colônias que não se desenvolveram neste meio foram consideradas mutantes. Cortando-se o ágar sobre o qual os conídios foram inoculados, transferiam-se os blocos obtidos para tubos inclinados contendo meio completo. Assim, conseguiam-se novos conídios para ensaio das deficiências nutricionais. Para o ensaio dessas deficiências, os conídios de possíveis mutantes, foram suspensos em tubos contendo solução de tween 80, e semeou-se uma alíquota de 0,2 ml desta suspensão bem densa, por "pour plate", para 20 ml de MM, ainda líquido, à temperatura de 45°C . Transferiu-se o conteúdo dos tubos para placas de Petri, que foram a seguir incubadas a 28°C . Após 24 horas, gotas de solução de caseína hidrolisada, vitaminas, extrato de leveduras e ácido nucléico foram distribuídas cuidadosamente em diferentes locais das placas e estas foram novamente incubadas. Após 7 dias um crescimento ao redor destas soluções indi

cava a deficiência do mutante e posteriormente, ensaiou-se conforme o caso, cada aminoácido, vitamina e base nitrogenada, procurando-se a caracterização final do mutante. Assim foram obtidos os mutantes simples. Isolaram-se também aqueles mutantes que mesmo crescendo no meio mínimo se diferenciavam da linhagem selvagem quanto a aspectos morfológicos. A irradiação destes morfológicos permitiu, através da mesma técnica já descrita, a obtenção de mutantes com duas marcas, uma para morfologia e outra para deficiência nutricional.

4.5.2. Teste de reversão

Todas as linhagens mutantes foram ensaiadas para reversão das marcas nutricionais. Para tal, utilizou-se MM e meio suplementado com o requisito nutricional da linhagem. O crescimento neste meio possibilitou o cálculo da frequência de reversão para as diferentes marcas. Assim, confídios das linhagens foram suspensos em solução de tween 80 e após diluição apropriada semeados em placas preparadas conforme descrito acima.

4.6. Técnicas de análise Genética

As técnicas de análise genética foram as mesmas normalmente utilizadas para obtenção do ciclo parassexual em fungos, descritas inicialmente por *PONTECORVO e col. (1953)* e que constam de: obtenção de heterocário e de diplóides, e a obtenção de segregantes a partir desse diplóide.

4.6.1. Obtenção de heterocário

Conídios das linhagens que se diferenciavam quanto à morfologia e marcas nutricionais, foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de MM líquido, suplementado com 1% de MC, o que permite uma pequena germinação dos conídios.

Depois de 8 dias de incubação, formou-se uma película na superfície do meio, devido a fusão de hifas, pela deficiência nutricional das mesmas. Transferiu-se a película para placa contendo MM ^sólido, originando-se então setores heterocarióticos, pois somente estes poderiam se desenvolver, por apresentarem núcleos diferentes, que se complementam em suas hifas.

4.6.2. Obtenção de diplóides

Conídios dos setores heterocarióticos, foram ressuspendidos em solução de tween 80 e posteriormente, semeados em MM. Obteve-se, assim colônias que se desenvolvem neste meio e que são possíveis diplóides. Em seguida, destas colônias transferiram-se somente conídios com auxílio de alça de platina para solução de tween 80; após contagem em hematómetro realizou-se diluição apropriada em solução salina visando-se a obtenção de um número desejável de colônias por placa. Tomou-se então 0,1 ml desta diluição e, semeou-se em MM e MC, para evidenciar-se o crescimento. Incubou-se a temperatura de 28°C, e após o sétimo dia foi feita a leitura das placas.

4.6.3. Haploidização dos diplóides

A haploidização foi feita utilizando-se MM contendo os requisitos nutricionais das linhagens que foram cruzadas mais 100 µg/ml de Cloroneb. O qual segundo *AZEVEDO e col. (1977)*, tem a propriedade de evidenciar setores haplóides.

Os segregantes haplóides foram analisados em relação aos fatores de crescimento e morfologia.

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos Citológicos em *M. anisopliae* var. *minor*

Uma visão macroscópica revelou que o microrganismo em estudo apresenta-se com produção de micélio branco e conídios amarelos quando jovens passando a verdes com o tempo. Os conídios quando maduros se desprendem em placas do micélio. Os estudos citológicos revelaram que as hifas apresentam-se septadas exibindo grande variação de tamanho dos septos bem como, apresentando-se com um núcleo ou dois por septo. Dos septos partem estruturas que inicialmente são finas e que se constituirão em conidióforos, nestes ocorre um núcleo, com o tempo estas estruturas tornam-se mais volumosas, o núcleo se divide e, um núcleo filho passa para os conídios que vão se formando a partir deste conidióforo, os conídios assim formados permanecem em cadeias. A Figura 1 mostra uma hifa característica com a ocorrência de um núcleo ou dois por septo mostrando também o conidióforo no início de seu desenvolvimento. Destes septos tam

bém podem partir estruturas anormais, que darão origem a conidióforos anormais, que no entanto produzem conídios. Na Figura 2 tem-se também um prolongamento de hifa que produz uma série de estruturas anormais, como conidióforos, do qual esta se formando um conídio que já recebeu um núcleo filho.

Conídios podem se fundir, assim como hifas, conídios geralmente são encontrados fundindo-se lateralmente ou pela parte polar. Na Figura 3 observa-se estas fusões. Os conídios são cilíndricos ou ovalados, podendo conter um ou dois núcleos por conídio, numa proporção de 95% de uninucleados para 5% de binucleados. Na Figura 4 pode ser visualizado conídios típicos de *M. anisopliae* var. *minor*.

5.2. Sobrevivência a luz ultra-violeta (UV)

Uma suspensão de conídios da linhagem E_g selvagem de *M. anisopliae* var. *minor*, foi irradiada (UV) conforme descrito no item 4.4. A Tabela 1 apresenta os resultados de sobrevivência obtidos. Utilizando-se da metodologia citada por BARACHO e col. (1977) obtem-se uma LD_{95} em um tempo de 12,78 minutos para a luz ultra-violeta e condições usadas.

Figura 1. Mostra uma hifa característica com a ocorrência de um núcleo ou dois núcleos por septo, pode ser visualizado também um prolongamento fino que se constituirá em um conidióforo. (10X; 16X)

Figura 2. Ocorrência de hifas das quais os septos dão origem a prolongamentos, conidióforos que são anormais, dos quais já é notado a formação de conídio. (10X; 16X).

Figura 3. Observa-se uma fusão característica de conídios que está ocorrendo lateralmente e pelas partes polares. Estes conídios partem de um único conidióforo. Nos conídios observa-se um núcleo. De um dos conídios, o mais terminal, nota-se a formação de hifa pela germinação. (10X; 16X)

Figura 4. Observa-se conídios típicos de *M. anisopliae* var. *Minor* contendo um e dois núcleos. Na frequência de 95% de uninucleados para 5% de conídios binucleados. (10X; 63X).

Tabela 1. Porcentagem de conídios de *M. anisopliae* var. *minor*, sobreviventes a luz UV. (Média de 3 experimentos).

Tempo de Irradiação (UV) em minutos	Nº de conídios sobreviventes	% Sobrevivên- cia
0	239	100,00
4	131	54,81
8	29	12,13
12	14	5,85
16	7	0,03

Com os dados da Tabela 1 construiu-se uma curva de sobrevivência (Fig. 5).

5.3. Obtenção de Mutantes

Usando-se luz ultra-violeta durante 13 minutos, obteve-se mutantes auxotróficos e morfológicos para coloração de conídios numa frequência de 0,28% a 0,01%, respectivamente. A Figura 6 mostra os passos para obtenção destes mutantes. Na Tabela 2 podem ser visualizados os mutantes obtidos bem como, a simbologia utilizada para caracterizá-los.

Figura 5. Curva de sobrevivência da linhagem selvagem de *M. anisopliae* var. *minor* irradiada com luz ultra-violeta. 2537 Å.

Figura 6. Passos seguidos para obtenção dos mutantes morfológicos e auxotróficos de *Metarhizium anisopliae* var. *minor*. {UV = ultra-violeta. Os outros símbolos se encontram na Tabela 2}.

Tabela 2. Simbologia dos mutantes de *M. anisopliae* var. *minor* obtidos por irradiação a luz ultra-violeta 2.537 Å.

Linhagem original Irradiada	Morfologia (conídio)	Mutante Nutricional	Simbologia do mutante
E _g	(ylo) amarelo	piridoxina (pir)	ylo, pir
	(pin) ¹ vinho pálido	ac.p-aminoben- zôico (pab)	pin, pab
	(pin) vinho pálido	arginina (arg)	pin, arg
	(whi) branco	tiamina (tia)	whi, tia
	(gre) ² verde	metionina (met)	gre, met

1 - Coloração do conídio caracterizada como vinho pálido (Pale vinaceous 1" f - 85) pela tabela de R.W. RAYNER - A Mycological Colour Chart - 1970. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey.

2 - Não foi utilizado para obtenção de diplóide.

5.4. Teste de Reversão

Os mutantes foram ensaiados para verificação da estabilidade das marcas nutricionais e morfológicas para que pudessem serem utilizados com devida segurança na análise genética. A frequência de reversão espontânea para as marcas esta apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Frequência de reversão espontânea de diferentes mutantes de *M. anisopliae* var. *minor* utilizados no presente trabalho.

Mutantes	Frequência de Mutantes em 10^6 conídios
<i>ylo, pir</i>	<1
<i>pin, pab</i>	<1
<i>pin, arg</i>	<1
<i>whi, tia</i>	<1

Os mutantes morfológicos, assim como os auxotróficos são bastantes estáveis não tendo sido evidenciado reversão em 10^6 conídios.

5.5. Análise Genética

5.5.1. Obtenção do heterocário

Heterocários de diferentes linhagens mutantes produzidos conforme descrito no item 4.6.1. foram obtidos. As linhagens mutantes que foram usadas para constituir os diferentes heterocários foram: (*ylo, pir + pin, arg*); (*ylo, pir + pin, pab*) e (*whi, tia + ylo, pir*).

As películas heterocarióticas no oitavo dia de desenvolvimento, apresentam-se densas, transferidas para MM, se desenvolvem de maneira restrita formando pequenos setores

heterocarióticos. A constituição dos setores não é tão vigorosa como ocorre com *Aspergillus nidulans*. Os conídios são de coloração verde, cor da linhagem selvagem.

5.5.2. Obtenção de diplóides

Conídios dos heterocários obtidos dos diferentes cruzamentos após serem transferidos para o MM (10^6 por placa), produziram nesse meio algumas colônias prototróficas com coloração do tipo selvagem. Conídios coletados destas colônias, após suspensão em solução de tween 80 e diluição apropriada, foram semeados em MM e MC, para a confirmação da prototrofia dos possíveis diplóides somáticos heterozigotos. A Tabela 4 mostra os resultados obtidos.

Tabela 4. Crescimento de conídios que se desenvolveram tanto em MM e MC, oriundos de colônias que cresceram em MM, prototróficas e de coloração selvagem após transferência do heterocário.

Possível Diplóide	Nº esperado de colônias	Nº colônias com crescimento	
		MC	MM
<i>whi, tia</i> // <i>ylo, pir</i>	52	52	57
	22	16	17
<i>ylo, pir</i> // <i>pin, pab</i>	62	60	56
	36	22	26
<i>ylo, pir</i> // <i>pin, arg</i>	100	59	63
	19	26	21

Os diplóides foram obtidos em uma frequência média de 1,6 diplóides por 10^6 conídios, Tabela 5.

Tabela 5. Frequência média da obtenção de diplóides em *M. anisopliae* var. *minor* em 10^6 conídios.

Diplóide	Nº Médio de colônias
<i>ylo, pir // pin, arg</i>	1,6
<i>ylo, pir // pin, pab</i>	1,8
<i>whi, tia // ylo, pir</i>	1,4

A Tabela 6, mostra a constituição dos diferentes diplóides obtidos em *M. anisopliae* var. *minor*.

Tabela 6. Diplóides heterozigotos obtidos entre diferentes mutantes de *M. anisopliae* var. *minor*.

Constituição no heterocário	Diplóide heterozigoto
<i>ylo, pir + pin, arg</i>	(<i>ylo, pir // pin, arg</i>)
<i>ylo, pir + pin, pab</i>	(<i>ylo, pir // pin, pab</i>)
<i>whi, tia + ylo, pir</i>	(<i>whi, tia // ylo, pir</i>)

5.5.3. Haploidização dos diplóides

A utilização de 1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno (Cloroneb) permitiu a obtenção de setores haplóides, conforme descrito no item 4.6.3., que foram purificados. A análise des

tes segregantes permitiu a construção da Tabela 7, mostrando a constituição genética dos diferentes segregantes haplóides obtidos. A Figura 7 mostra um diplóide de *M. anisopliae* var. *minor* sendo haploidizado, com a formação de setores típicos. Os diplóides não apresentaram haploidização em MC em ausência de Cloroneb.

Tabela 7. Segregantes de diferentes heterozigotos diplóides de *M. anisopliae* var. *minor*.

Diplóides	Nº de Setores analisados	Genótipo	Segregantes			
			Branco (whi)	Amarelo (ylo)	Verde (gre)	Vinho pálido (pin)
<i>ylo, pir // pin, arg</i>	13	<i>pir arg</i>	-	-	-	-
		<i>pir +</i>	-	7	-	-
		<i>+ arg</i>	-	-	-	-
		<i>+ +</i>	-	-	6	-
<i>ylo, pir // pin, pab</i>	25	<i>pir pab</i>	-	-	-	-
		<i>pir +</i>	-	1	-	-
		<i>+ pab</i>	-	-	-	15
		<i>+ +</i>	-	-	9	-
<i>whi, tia // ylo, pir</i>	25	<i>tia pir</i>	-	-	-	-
		<i>tia +</i>	5	-	-	-
		<i>+ pir</i>	-	10	-	-
		<i>+ +</i>	-	-	10*	-

* - 2 setores de cor verde limão, diferente do tipo selvagem, sendo, caracterizados pelo fraco desenvolvimento inicial e uma grande produção micelial.

+ = representa o alelo selvagem.

Figura 7. Mostrando a formação de setores típicos em diplóides de *M. anisopliae* var. *minor*. A indução dos setores foi feita utilizando-se 1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno (Cloroneb).

5.5.4. Diâmetro nuclear e tamanho de confídio da linhagem selvagem, mutantes, e diplóides de *M. anisopliae* var. *minor*

Após a coloração pelo método descrito no item 4.3.1.1., foi possível realizar-se a medida do tamanho do confídio bem como, do diâmetro do núcleo nas linhagens selvagem, mutantes e diplóides. A Tabela 8 mostra os dados obtidos.

Tabela 8. Diâmetro do núcleo, tamanho do confídio da linhagem selvagem, mutantes e diplóides heterozigotos de *M. anisopliae* var. *minor*.

Linhagem	Tamanho do confídio em μm^*	Diâmetro em μm^* do núcleo
Haplóides		
E_g (selvagem)	5,80	0,98
<i>whi</i> , <i>tia</i>	5,17	1,13
<i>ylo</i> , <i>pir</i>	5,47	1,03
<i>pin</i> , <i>pab</i>	6,02	1,40
<i>pin</i> , <i>arg</i>	5,55	1,22
Diplóides		
(<i>ylo</i> , <i>pir</i> // <i>pin</i> , <i>arg</i>)	4,94	1,86
(<i>ylo</i> , <i>pir</i> // <i>pin</i> , <i>pab</i>)	5,18	1,97
(<i>whi</i> , <i>tia</i> // <i>ylo</i> , <i>pir</i>)	5,08	1,77

* Os valores representam a média de 15 medidas.

6. DISCUSSÃO

6.1. Aspectos Citológicos

Os estudos propriiciaram a realização de medidas do diâmetro nuclear, tamanho do conídio, e ainda a observação dos fenômenos como: fusão de hifas e fusão entre conídios, além de permitir a observação da ocorrência de estruturas anormais em *M. anisopliae* var. *minor*, como também foi estudado por *TINLINE e NOVIELLO (1971)* em uma linhagem 8-P-1 de *M. anisopliae*, isolada de uma larva de elaterídeo, o *Hypolithus bicolor* (Each).

O aspecto citológico é de grande valor como uma técnica auxiliar nos estudos de ordem genética. Vários autores utilizaram-se de processos citológicos para distinguir linhagens haplóides e diplóides em fungos, pela observação da variação do número de núcleos por conídio.

Em *M. anisopliae*, var. *minor* pelas técnicas em-

pregadas pode ser observado que os conídios apresentam-se uninucleados e binucleados em uma proporção de 95% de uninucleados para 5% de binucleados (*MESSIAS e col. 1978*).

O fenômeno da anastomose de hifas visualizado, demonstrou o processo físico inicial para a obtenção de heterocários, assim como a fusão de conídios, (Figura 3), que também pode levar à formação de hifas heterocarióticas, aumentando então a chance de obtenção destes heterocários e consequentemente de diplóides. Em *M. anisopliae* var. *minor* as hifas apresentam-se com um núcleo por septo, no entanto também pode ocorrer mais que um núcleo. Os conidióforos apresentam-se igualmente uninucleados. As fusões que ocorrem entre diferentes hifas, podem agora serem melhores estudadas através do diplóide, visando-se demonstrar por um processo genético a ocorrência deste fenômeno visualizado citologicamente.

Ainda com relação ao aspecto citológico, podem ser referidos os mutantes para coloração de conídios, a mutação morfológica obtida para conídios, principalmente aquela para a coloração branca, constitui-se em excelente material para estudos citológicos, pois não apresentam a ocorrência de pigmento presente na linhagem selvagem.

6.2. Obtenção de Mutantes e sua estabilidade

6.2.1. Sobrevivência a luz ultra-violeta

Utilizando-se de luz ultra-violeta foi possível a construção de uma curva de sobrevivência evidenciando-se uma correlação entre a dose e o efeito produzido.

Variação no tipo de curva é observado por vários autores com relação ao grau de ploidia do organismo irradiado. Em uma linhagem de *Aspergillus* sp 321, obteve-se um tipo de curva sigmoide (múltiplos toques) evidenciando-se assim que este microrganismo apresenta material genético em duplicata, PEREIRA (1978). MESSIAS e col. (1976) também observou a ocorrência de curva do tipo sigmoidal em *A. flavus*.

Macroconídios de *Neurospora crassa* (ATWOOD e NORMAN, 1949) tratados com luz ultra-violeta apresentam uma curva de sobrevivência do tipo sigmoidal, estes são multinucleados, apresentando em média 2,67 núcleos por conídio.

A curva obtida no presente trabalho apresenta-se do tipo exponencial o que pode caracterizar a pequena porcentagem de conídios binucleados, 5% binucleados e 95% de conídios uninucleados (MESSIAS e col. 1978).

A dose capaz de inviabilizar 95% dos conídios foi obtida com um tempo de exposição a ultra-violeta de 13 minutos, no entanto este tempo está relacionado com a fonte de

irradiação; SANTOS (1978) obteve uma sobrevivência de 1 a 5% em um tempo igual a 2,40 minutos utilizando outra fonte de luz ultra-violeta.

6.2.2. Mutantes

Irradiando-se conídios da linhagem E_g selvagem de *M. anisopliae* var. *minor*, com luz ultra-violeta obtiveram-se mutantes morfológicos e auxotróficos. Os morfológicos obtidos apresentam-se bastante estáveis. Foram conseguidos também, mutantes deficientes nutricionais para a síntese de aminoácidos e vitaminas. O mutante para a biossíntese do aminoácido metionina não foi empregado no presente trabalho, pois apresenta-se com conídios verdes o que dificulta a caracterização do diplóide. Todos os mutantes isolados são muito apropriados para estudos genéticos pois durante a obtenção procurou-se não selecionar-se mutantes que apresentavam crescimento residual ("leaky"). A ocorrência de uma grande proporção de mutantes deficientes para a biossíntese de vitaminas pode ter sido até certo ponto estimulada pelo método de seleção, pois os deficientes para a síntese de vitaminas isolados se mostraram ótimos mutantes por não se desenvolverem como aqueles chamados "leaky".

Nos ensaios de reversão realizados verificou-se que as marcas envolvidas no estudo apresentam-se bastante estáveis não obtendo-se nenhuma colônia nem mesmo germinação de

confídios. Pelos dados do ítem 5.4. verifica-se que as marcas utilizadas são ótimas, sendo a frequência de reversão menor do que $1/10^6$ confídios. No entanto outros tipos de mutantes poderão ser procurados, como aqueles resistentes a luz ultra-violeta, a drogas e para a produção de enzimas em trabalhos futuros, o que poderá permitir, agora com o ciclo parassexual melhores estudos, relacionados com a patogenicidade aos insetos, ou mesmo para estudos da genética formal em microrganismos.

A luz ultra-violeta foi eficiente na obtenção de mutantes auxotróficos, e a frequência com que estes aparecem está em torno de 0,28% que dá um baixo rendimento quando comparado com aqueles obtidos em *Aspergillus nidulans*, um mutante em 200 colônias analisadas (PONTECORVO e col. 1953).

Sugere-se então que sejam estudados outros mutagênicos, tanto físicos como químicos, os quais poderiam apresentar melhores rendimentos. SANTOS (1978) verificou que radiação ionizante como os raios γ , são efetivos em causar morte a confídios de uma linhagem de *M. anisopliae*, e que poderia ser empregado para a obtenção de mutantes.

FINCHAM, DAY e RADFORD (1979) em revisão, observam que o rendimento de certos mutantes apresenta variação entre espécies e em cada caso há um requisito nutricional que ocorre com maior frequência. Em *Aspergillus* sp 321 PEREIRA (1978) obteve com mais frequência mutantes para a biossíntese de metionina, em torno de 26,3% e biotina em torno de 21%. Em

Neurospora crassa, em 144 mutantes obtidos 16,6% apresentavam deficiências para metionina e 14,6% para adenina, em *Ophistoma multiannulatum* em 200 mutantes 21% eram deficientes para biossíntese de arginina e 17% para tiosulfato ou compostos que apresentam enxofre reduzido; em *Venturia inaequalis* de 100 mutantes analisados, 19% eram deficientes para uridina ou citrulina e 18% para arginina.

6.3. Ciclo Parassexual

6.3.1. Obtenção do heterocário

A formação do heterocário balanceado tem sido enfatizada como um dos principais passos durante a obtenção do ciclo parassexual.

Os mutantes utilizados sendo oriundos de uma mesma linhagem a constituição do heterocário foi facilmente conseguida, obtendo-se películas bem formadas que desenvolveram-se em MM adicionado de 1% de MC com uma constituição bastante densa onde pode se visualizar a formação de conídios verdes e de cor parentais.

Esse método é semelhante ao que vem sendo usado para outros fungos. No entanto, a quantidade de MC, teve que ser reduzida para obtenção de resultados mais favoráveis; isto talvez seja devido a utilização de mutantes para vitaminas onde pequenas quantidades já são suficientes para um crescimento

ótimo da linhagem. O fenômeno da heterocariose é básico, para a ocorrência do ciclo parassexual. A complementação entre as marcas envolvidas sempre é muito importante para a manutenção destes; uma fraca complementação pode levar a um não desenvolvimento em MM o que dificultaria a formação do diplóide. *TIN-LINE e NOVIELLO (1971)* trabalhando com uma linhagem 8-P-1 de *M. anisopliae*, empregando a mesma técnica, do presente trabalho, não conseguiu o desenvolvimento de alguns heterocários devido a baixa complementação entre as marcas utilizadas.

Pelas observações citológicas constata-se a anastomoses entre conídios e entre hifas, podendo aumentar a chance da formação de heterocários. Este fenômeno, se ocorrendo na natureza poderia servir como um processo de variação natural.

A cor dos conídios no heterocário com o tempo torna-se verde, cor do tipo selvagem verificando-se então que esta não é autônoma, pois em um caráter autônomo a cor de um conídio uninucleado em um heterocário é determinada exclusivamente pelo genótipo de cada conídio, enquanto que em um caráter não autônomo a cor do conídio é determinada pelo genótipo presente no heterocário. Com relação a esta observação, alguns autores, como *STROMNAES e GARBER (1963)* verificaram que em *Aspergillus fumigatus* duas séries de alelos múltiplos para a coloração de esporos se comportam diferentemente quanto à autonomia. Enquanto uma das séries tem a característica autôno-

ma na outra ela não é autônoma. O fato de ser autônomo ou não, pode ser dependente de uma característica de um locus, e está relacionado com o tipo de componente determinado pelo locus em um passo bioquímico que difunde substâncias ou não.

6.3.2. Obtenção do Diplóide

A obtenção do diplóide foi feita logo após a transferência de conídios da película heterocariótica para MM onde crescem colônias que apresentam coloração do tipo selvagem e são prototróficas.

Uma quantidade conhecida de conídios oriundos destas colônias novamente semeados em MC e MM para obtenção do número de conídios semeados bem como para verificar-se que apresentavam capacidade de germinação foi realizada evidenciando o número semelhante de colônias no MM e no MC conforme resultado na Tabela 4. Sendo o MM, seletivo só permitiria o desenvolvimento de colônias prototróficas, ou seja, diplóides heterozigotos, não permitindo o crescimento de colônias do tipo parental.

Os diplóides foram obtidos com uma frequência de $1,6 \text{ em } 10^6$ conídios semeados. Esta frequência é baixa em relação aqueles fungos que apresentam-se com conídios multinucleados (TINLINE e McNEILL, 1969), como asidiomicetos dicarióticos. No entanto, ela se compara a obtida para outros fungos como o *A. nidulans* (PONTECORVO e col. 1953).

Teoricamente a cariogamia pode ser controlada de

uma maneira positiva por um indutor presente em células sexuais ou por uma maneira negativa por um repressor (KR) presente em células somáticas, ou pela combinação de ambos. Estudos com os Basidiomicetos, *Schizophyllum commune* e *Ustilago violacea*, sugerem que o controle primário pode ser negativo embora eles não excluam um mecanismo positivo (CATEN e DAY, 1977).

A caracterização do tamanho do conídio bem como do núcleo foram realizadas procurando-se evidenciar uma diferença entre os haplóides e diplóides; os resultados demonstram que o tamanho do conídio não é uma avaliação aconselhável para distinguir-se entre os diplóides e haplóides; por outro lado o tamanho do núcleo variou entre o diplóide e o haplóide e também enquanto a linhagem selvagem apresenta uma proporção de 5% de conídios binucleados os diplóides não apresentam conídios binucleados. Somente analisando-se a variação de tamanho destas estrutura, já se mostrou ineficiente para distinguir-se entre haplóides e diplóides em *A. oryzae*, *A. sojae* (IKEDA e col. 1957), *A. flavus* (PAPA, 1973; MESSIAS, 1977) e *Aspergillus* sp. 321 (PEREIRA, 1978), espécies que apresentam conídios multinucleados no estágio haplóide. Baseando-se na característica da variação do tamanho de conídio, alguns autores tem sugerido que *M. anisopliae* var. *major*, possa ser um diplóide por apresentar-se com conídios maiores que a variedade *minor*. Pelos resultados obtidos no presente estudo sugere-se que outras medidas sejam realizadas como por exemplo a avaliação da quantida-

de de DNA, mutabilidade e volume nuclear, uma vez que os diplóides não apresentam-se com aumento no tamanho do conídio.

Verificada a formação do diplóide somático dentro de uma mesma linhagem de *M. anisopliae* var. *minor*, a tentativa de obtenção de diplóides entre linhagens diferentes poderia ser feita procurando-se a obtenção do vigor de híbrido, utilizando-se a técnica de letais balanceados para a estabilização do diplóide formado. Este diplóide poderia apresentar melhores características ao controle biológico de insetos.

6.3.3. Segregantes dos Diplóides

Dos três diplóides obtidos, segregantes haplóides foram conseguidos em todos os casos (Tabela 7), mas somente após a indução por um agente de haploidização, o cloroneb; tentativas de haploidização espontânea ou mesmo induzida pela *p*-fluorofenilalanina, um agente de haploidização largamente usado em fungos filamentosos (CLUTTERBUCK, 1974) foram infrutíferas. Casos de diplóides bastante estáveis são relatados em Basidiomicetos (CASSELTON, 1965) e portanto possivelmente também os diplóides de *M. anisopliae* var. *minor* sejam estáveis embora somente futuras observações sobre o comportamento desses diplóides em outros meios de cultura e temperaturas diversas é que poderão elucidar sobre sua real estabilidade. Mesmo em cloroneb, um fungicida que propicia uma alta taxa de haploidização em *A. nidulans* (SANTANA, 1974) o número de setores obtidos

a partir do diplóide em *M. anisopliae* var. *minor* foi apenas de cerca de 1,5 por colônia. Pelo comportamento dos diplóides obtidos, pode-se sugerir que a variedade *major* seja também um diplóide como tem sido proposto. No entanto esta observação deve somar-se a outros dados como por exemplo o conteúdo de DNA.

Dos três diplóides analisados, 63 setores obtidos independentemente mostraram um certo modelo de recombinação, onde o número de combinações parentais foi bem superior ao número de setores recombinantes (Tabela 7). Isso talvez possa refletir o fato de que *M. anisopliae* apresente apenas um pequeno número de grupos de ligação na realidade o número de cromossomos da espécie parece ser de aproximadamente 4 pelas observações citológicas em hifas e conídios (MESSIAS, não publicado). No entanto, não pode ser também descartada a possibilidade de que o agente haploidizante empregado selecione certas combinações de marcadores genéticos em detrimento de outras combinações, uma vez que já é sabido que o cloroneb em *A. nidulans* (AZEVEDO, SANTANA e BONATELLI, 1977) seleciona setores haplóides que contenham certos marcadores genéticos específicos como é o caso do gene *pyr A₄*. Nos três diplóides por nós conseguidos e analisados tem, em todos os casos um componente haplóide comum (*ylo pir*). Uma vez que se sabe que por indução através da luz ultra-violeta de mutantes auxotróficos, pode-se também produzir aberrações cromossômicas como translocações isso levaria a uma predominância de tipos parentais. De fato,

MACDONALD (1965) estudando diplóides heterozigotos em *Penicillium chrysogenum* observou uma alta frequência de segregantes haplóides dos tipos parentais e tentou explicar o fenômeno pela existência de translocações em uma das linhagens. Assim, exemplificando, em um caso de uma espécie com $n = 2$ cromossomos, uma translocação de segmento de um cromossomo para outro daria um diplóide que poderia segregar os tipos parentais balanceados mas os tipos recombinantes seriam portadores de deleções (e portanto letais) ou de duplicação e selecionados contra em agentes haploidizadores (AZEVEDO e ROPER, 1970). Mais diplóides entre linhagens com outros marcadores genéticos terão que ser construídos para que se tenha uma melhor ideia do fenômeno da recombinação mitótica em *M. anisopliae* ou mesmo para o mapeamento genético da espécie. Inclusive o fenômeno da permuta somática em diplóides ainda não foi evidenciada no presente caso. Dos tipos recombinantes obtidos todos eles foram prototróficos (6, 9 e 10 casos obtidos nos 3 diplóides analisados) e classificados apenas visualmente pela emergência de setores no meio com cloroneb. Como é difícil distinção entre diplóides e haplóides pelo tamanho do conídio e como não foi feita uma análise do tamanho de núcleos desses setores, podemos inclusive supor que eles sejam ainda diplóides que por uma razão não definida emergiram no meio com o agente seletor de setores haplóides; em apenas dois casos, fenótipos diferentes do tipo diplóide foram conseguidos e esses podem refletir alguma interação entre os marcadores usados, especialmente para colora-

ção. De qualquer forma fica patente que qualquer tentativa de uma discussão mais aprofundada é ainda prematura e maior número de marcadores genéticos, de diplóides e de setores haplóides de verão ser analisados para que se tenha uma idéia mais definida para o processo.

7. CONCLUSÕES

Em relação aos resultados obtidos e discutidos podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. A luz ultra-violeta foi efetiva na obtenção de mutantes permitindo o isolamento de mutantes morfológicos para a coloração de conídios bem como mutantes auxotróficos (aminoácidos e vitaminas) com as frequências de 0,01 e 0,28% respectivamente.

2. Através da obtenção de heterocários balanceados, diplóides heterozigotos e segregantes mitóticos, ficou demonstrado vários passos do ciclo parassexual em *Metarhizium anisopliae* var. *minor*.

3. O tamanho do conídio não permite a distinção entre linhagens haplóides e diplóides. No entanto, o volume nuclear pode constituir-se em um método de distinção entre linha

gens haplóides e diplóides.

4. Os mutantes morfológicos para a coloração branca dos conídios em virtude da falta de pigmentação podem constituir-se em excelente material para estudos de aspectos citológicos neste fungo.

5. A espécie *M. anisopliae* var. *minor* constitui-se em um ótimo material para o estudo da genética em microrganismos eucariotos.

8. SUMMARY

This research was accomplished in order to characterize the parasexual cycle in the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *minor* isolated from adult insects of *Deois* sp. (Hom. Cerc.).

Auxotrophic mutants for aminoacid and vitamin biosynthesis, as well as morphological mutants, were obtained by using ultraviolet light.

These mutants were utilized in the formation of balanced heterokaryons, which in term served as a basis for the obtention of diploids.

Diploids were then hybridized through the addition of 1.4 Dichloro-2.5-Dimetoxilbenzene (Chloroneb) to the selective medium.

The analysis of haploid sectors thus obtained,

indicated the segregation of parental and recombinant markers, both for morphological characters and for nutritional requirements.

The use of cytological techniques allowed to observe, the fusion of conidia and the fusion of hypha in the haploid strain, as well as to measure conidia and nuclei size variation in haploid and diploid strains.

The two kinds of strain could not be separated by measuring conidia size.

Diploid conidia nuclei were, however, larger than those in the haploid strains.

9. LITERATURA CITADA

ALMEIDA, L.M., 1976. Obtenção de linhagens com duplicações cromossômicas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter e sua instabilidade. Piracicaba, ESA/LQ/USP. 122 p. (Tese de Mestrado).

ATWOOD, K.C. e A. NORMAN, 1949. On the interpretation of multi hit survival curves. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 35:696-709.

AVERY, O.T., C.M. MACLEOD e M. McCARTY, 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcae types. *Journal of Experimental Medicine*, 79: 137-158.

AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non conformity in *Aspergillus* successive and transposable genetic changes. *Genetical Research* (Cambridge), 16:79-93.

- AZEVEDO, J.L., 1972. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, 3:157-168.
- AZEVEDO, J.L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, 2:3-15.
- AZEVEDO, J.L., A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replí-
cador multifio para transferencia de esporos de fungos fi-
lamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2:237-241.
- AZEVEDO, J.L., E.P. SANT'ANA e R. BONATELLI Jr., 1977.
Resistance and Mitotic instability to Chloroneb and 1,4-
oxathin in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research*, 48:
163-172.
- BALL, C., 1971. Haploidization analysis in *Penicillium chry-*
sogenum, *Journal of General Microbiology*, 66:63-69.
- BALL, C. e J.L. AZEVEDO, 1976. Genetic Instability in
Parasexual Fungi. In: 2nd International Symposium on the
Genetics of Industrial Microorganisms. New York, Academic
Press, 243-251.
- BALL, C. e P.F. HAMLIN, 1978. The Genetics of *Acremonium chry-*
sogenum. *Revista Brasileira de Genética*, 1:83-96.
- BARACHO, I.R. e R.T. ROSIN, 1977. Tabela por La Kalkulado de
MD₉₅, en fungoj. *Sciencia Revuo de Internacia Sciencia*
Asocio Esperantista Beograda, Jugoslavia, 28:223-226.

- BARRON, G.L., 1962. The parasexual cycle and linkage relationships in the storage rot fungus *Penicillium expansum*. *Canadian Journal Botany*, 40:1603-1613.
- BEADLE, G.W. e E.L. TATUM, 1941. Genetic control of biochemical reaction in *Neurospora*. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, 27:499-506.
- BERTOLDI, M. e C.E. CATEN, 1975. Isolation and haploidization of heterozygous diploid strains in a species of *Humicola* sp. *Journal of General Microbiology*, 91:63-73.
- BURGES, H.D. e N.W. HUSSEY, 1971. *Microbial control of insects and mites* London, Academic Press 801 p.
- BURNETT, J.H., 1975. *Mycogenetics*. London, John Wiley and Sons. 375 p.
- BURNS, J.A. e D.V. GERSTEL, 1967. Flower color variegation and instability of a block of heterochromatin in *Nicotiana*. *Genetics*, 57:155-167.
- BUXTON, E.W., 1956. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of General Microbiology*, 15:133-139.
- BUXTON, E.W., 1962. Parasexual recombination in the banana-milt *Fusarium*. *Transaction of the British Mycological Society*, 45:274-279.

- CASSELTON, L.A., 1965. The production and behaviour of diploids of *Coprinus lagopus*. *Genetical Research*, 6:190-208.
- CATEN, C.E. e J.L. JINKS, 1966. Heterokaryosis: Its significance in mild homothallic ascomycets and fungi imperfecti. *Transaction of the British Mycological Society*. 49:81-93.
- CATEN, C.E. e A.W. DAY, 1977. Diploidy in plant Pathogenic Fungi. *Annual Review Phytopathology*. 15:295-318.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1974. *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C. (ed.). *Handbook of Genetics*. I. New York, Plenum Press, p. 446-510.
- DAVIS, R.H., 1966. Mechanisms of inheritance. 2-Heterokaryosis. In: Ainsworth, G.C. e A.S. Sussman, ed. *The Fungi*, II New York Academic Press, 805 pp.
- DAY, A.W. e J.L. JONES, 1969. Sexual and parasexual analysis in *Ustilago violacea*. *Genetical Research*, 11:63-81.
- DUTTA, S.K. e E.D. GARBER, 1960. Genetics of phytopathogenic fungi. III An attempt to demonstrate the parasexual cycle in *Colletotrichum lagenarium*. *Botanical Gazette*, 122:118-121.
- FINCHAN, J.R.S., P.R. DAY e A. RADFORD, 1979. *Fungal Genetics*. Oxford, Blackwell Sci. Publ. 404 p.

- FORBES, E., 1959. Use of mitotic segregation for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus nidulans*. *Heredity* 13:67-80.
- GARBER, G.W. e L. BEHARA, 1965. Genetic of phytopathogenic fungi XIV - The parasexual cycle in *Penicillium expansum*. *Genetics*, 52:487-492.
- GUAGLIUMI, P., 1972. Resultados preliminares da luta biológica contra a "cigarrinha-da-folha" da cana-de-açúcar no estado de Pernambuco. *Brasil Açucareiro*, 80:49-51.
- HASTIE, A.C., 1964. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. *Genetical Research*, 5:305-315.
- HOLLIDAY, R., 1961. Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genetical Research*, 2:231-249.
- HUBER, J., 1958. Untersuchungen zur physiologie insektentöten der Pilze. *Archive Mikrobiologie*, 29:257-276.
- IKEDA, Y., K. NAKAMURA, K. UCHIDA e G. ISHITANI, 1957. Two attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidization. *Journal of General and Applied Microbiology*, 3:93-101.

- ISHITANI, G. e K. SAKAGUCHI, 1956. Hereditary variation and genetic recombination in Koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*). V. Heterocaryosis. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2:345-400.
- JOHNSTON, J.R., 1915. The Entomogenous Fungi of Porto Rico. *Government of Porto Rico Board of Commissioners of Agriculture*, Rio Pedras. Bulletin 10: 26 - 28 p.
- KÄFER, E., 1958. An 8-chromossome map of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 9:105-145.
- KÄFER, E., 1961. The process of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46:1581-1609.
- LATCH, G.C.M., 1965. *Meterrhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) Sorokin, strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8:384-396.
- LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in *Aspergillus niger*. *Genetical Research*, 10:45-61.
- LIHNELL, D., 1944. Grönmykos Försakeo av *metarrihizium anisopliae*. (Metsch) Sorok. II. Fysiologiska undersökningar över grönmykosens svamp. Stat. Växtskyodsanst. *Stockholm meddel.*, 43:59-90.

MACDONALD, K.D., J.M. HUTCHINSON e W.A. GILLET, 1965.

Heterozygous diploids of *Penicillium chrysogenum* and their segregation patterns. *Genetics*, 36:378-397.

MACDONALD, K.D., 1976. 2nd International symposium on Genetics of Industrial Microorganisms. New York Academic Press 636 p.

McCLINTOCK, B., 1951. Chromosome organization and genetic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16:13-47.

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

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

MESSIAS, C.L., A. MARTINELLI, Fº, H. FONSECA e J.L. AZEVEDO, 1976. Isolamento de mutantes em linhagens de *Aspergillus flavus*, Link produtoras de aflatoxina. *Relatório Científico*, ESALQ/USPPiracicaba. SP. Brasil. 8:100-103.

- MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de Aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, ESALQ/USP. 75 p. (Tese de Mestrado).
- MESSIAS, C.L., J.L. AZEVEDO, E. DE CONTI e H.M.L. de SOUZA, 1978. Aspectos biológicos e indução de mutantes em *Metarhizium anisopliae*. Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia. p. 69.
- NIFFINGGER e SOUZA, D.R., 1979. Aspectos Genéticos e Citológicos da Instabilidade Mitótica em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, ESALQ/USP. 244 p. (Tese Mestrado).
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidem) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP. 81 p. (Tese de Mestrado).
- PAPA, K.E., 1973. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68:1201-1205.
- PAPA, K.E., 1976. Linkage groups in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 68:159-165.
- PEREIRA, J.O., 1978. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus* Piracicaba, ESALQ/USP. 108 p. (Tese de Mestrado).

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

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

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

PONTECORVO, G., 1963. Microbial Genetics: Retrospect and Prospect. *Proceedings of the Royal Society of Biology*, 158:123-146.

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

ROPER, J.A., 1966. The parasexual cycle. In: G.C. Ainsworth e A.S. Sussman ed. *The fungi*, II New York, Academic Press, p 589-617.

ROBINOW, C.F. e C.E. CATEN, 1969. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, 5:403-431.

SANT'ANA, E.P., 1974. Alteração na frequência de recombinação mitótica e mutantes resistentes a fungicidas em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP 63 p. (Tese de Mestrado).

- SANTOS, A.L.L., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP. 148 p. (Tese de Mestrado).
- SERMONTI, G., 1956. Complementary gen which effect penicillin yields. *Journal of General Microbiology*, 15:599-608.
- SERMONTI, G., 1959. Genetics of penicillin production. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 8:950-966.
- SERMONTI, G., 1969. *Genetics of antibiotic producing microorganisms*. London. Wily Inter-Science. 389 p.
- STERN, C., 1936. Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 21:625-730.
- STROMNAES, O. e E.D. GARBER, 1963. Heterocaryon and the parasexual cycle in *Aspergillus fumigatus*. *Genetics*, 48:653-662.
- TINLINE, R.D., 1961. *Cochliobolus sativus*. IV. Drug resistance, color and nutritionally exacting mutants. *Canadian Journal of Botany*, 39:1695-1704.
- TINLINE, R.D., 1962. *Cochliobolus sativus*. V. Heterokaryosis and parasexuality. *Canadian Journal of Botany*, 40:425-437.
- TINLINE, R.D. e B.H. McNEILL, 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 7:147-170.

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

TINLINE, R.D. e C. NOVIELLO, 1971. Heterokaryosis in the Entomogenous fungus, *Metarrhizium anisopliae*. *Mycologia*, 63:701-712.

TULLOCH, M., 1976. The Genus *Metarrhizium*. *Transaction of the British Mycological Society* 66:407-411.

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

YURCHENKO, C.V., I.A. ZAKHAROV e M.M. LEVITIN, 1974. Genetics and selection of *Beauveria bassiana* and entomopathogenic fungus. III. Estudios of heterocariosis. *Genetika*, 10: 95-101.

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

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

ZINDER, N.D. e J. LEDERBERG, 1952. Genetical exchange in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 64:679-694.