VARIABILIDADE E RECOMBINAÇÃO GENÉTICA NO DEUTEROMICETO
Beauveria bassiana (Bals.) VUILL.

LUZIA DORETTO PACCOLA-MEIRELLES

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

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

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1988

Aos meus pais Ernesto e Jandira D. Paccola,
presença pura de simplicidade e humildade,
fonte viva de força e entusiasmo com que
sempre me encorajaram.

-E ao companheiro amigo e aliado constante,
Walter F. Meirelles.

DEDICO

VARIABILIDADE E RECOMBINAÇÃO GENÉTICA NO DEUTEROMICETO
Beauveria bassiana (Bals.) VUILL.

LUZIA DORETTO PACCOLA-MEIRELLES

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

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1988

A todos os professores que contribuíram para minha formação profissional.

A minha gratidão

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. João Lúcio de Azevedo pela orientação, estímulo e confiança;

Ao professor Dr. Sérgio B. Alves pelos isolados de B.bassiana;

Ao Dr. Acelino Couto Alfenas do Depto. de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa pela orientação nas técnicas de eletroforese;

A Jurdilei A. P. Pomini, Suzana de F. P. Mesquita e Carlos A. Paccola pelo apoio e amizade sempre constante;

Aos amigos Itamar Soares de Melo, Magali de Araújo, Silvia Maria Frigo, Artemizia Vilas Boas e Beatriz Mendes pelas sugestões, cooperação, companheirismo, convivência e alegrias compartilhadas que resultaram em um reforço de nossa amizade;

Ao amigo Roberto Torres pela convivência e colaboração na execução das análises estatísticas;

A todos os companheiros do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ em especial Gustavo Goldman, Eduardo Bagalhi, Maria J. Valarini e Claudio Costa pelo apoio e cooperação amiga;

Ao Dr. Isaias Olívio Geraldi, Dra. Aline A. P. Kleiner e Dr. Claudio Lopez pela colaboração;

Ao Sr. Antonio J. Rocha Campos, Sandra R. Campos e Carlo A. Nolasco pela eficiência nos serviços técnicos prestados e carinho recebido durante a realização deste trabalho;

Aos professores do Departamento de Genética da ESALQ pela atenção;

Aos amigos do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina pelo constante estímulo;

Aos professores da área de Citologia da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade concedida;

Ao Programa CAPES/PICD e à Universidade Estadual de Londrina pelos auxílios financeiros;

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMARIO

	Página
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Posição taxonômica e ciclo biológico de <u>Beauveria bassiana</u>	3
2.2. O uso de <u>B. bassiana</u> como bioinseticida ..	7
2.3. Fatores que influenciam no crescimento e esporulação de <u>B. bassiana</u>	10
2.4. Melhoramento genético de fungos entomopa- gênicos	15
2.4.1. Caracterização e seleção de linha- gens mais eficientes para o controle biológico	16
2.4.2. Mutação	17
2.4.3. Recombinação	18
3. MATERIAL E METODOS	25
3.1. Linhagens utilizadas	25
3.2. Meios de cultura	26
3.2.1. Meio mínimo	26
3.2.2. Meio completo sólido	26

3.2.3. Meio mínimo líquido	27
3.2.4. Meio completo líquido	27
3.2.5. Meio mínimo acrescido de 4% de meio completo	27
3.2.6. Meio completo com estabilizador osmótico	27
3.2.7. Meio mínimo com estabilizador osmótico	28
3.2.8. Meio mínimo e meio completo semi sólido 0,5%	28
3.2.9. Meio para detectar atividade amilolítica	28
3.2.10. Meio para detectar atividade proteolítica	28
3.2.11. Meio para detectar atividade lipolítica.....	29
3.2.12. Meio ágar-água	29
3.2.13. Meio para conservação de <u>B. Bassiana</u>	29
3.2.14. Meio BDA	30
3.2.15. Meio Corn Meal	30
3.2.16. Meio Sabouraud	30
3.3. Soluções utilizadas	31
3.3.1. Soluções de vitaminas	31

Página

3.3.2. Solução de caseína hidrolizada	31
3.3.3. Solução de ácido nucleico	32
3.3.4. Solução salina	32
3.3.5. Solução de "tween 80"	33
3.3.6. Solução de gelatina 8%	33
3.3.7. Solução de iodo 1%	33
3.3.8. Soluções estoque dos suplementos adicionados ao meio mínimo	34
3.3.9. Solução de albumina 50%	34
3.3.10. Solução de Giemsa	34
3.3.11. Solução de Benomyl	36
3.3.12. Solução estoque de acrilamida	36
3.3.13. Solução de alfa-naftil acetato 1% .	37
3.3.14. Solução de beta-naftil acetato 1% .	37
3.3.15. Solução reveladora de atividade esterásica	37
3.3.16. Solução de enzimas para produção de protoplastos	38
3.3.17. Solução de polietilenoglicol	38
3.3.18. Solução de nistatina	39
3.4. Tampões e estabilizadores osmóticos utilizados	39
3.4.1. Tampão fosfato pH 6,9	39
3.4.2. Tampão da amostra	40

3.4.3. Tampão do gel separador, Tris-HCl pH 8,9	40
3.4.4. Tampão do gel empilhador, Tris-HCl pH 6,8	40
3.4.5. Tampão do tanque ou eletrólito, Tris-Glicina pH 8,9	41
3.4.6. Tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,0	41
3.4.7. Tampão fosfato 0,02M pH 5,8	42
3.4.8. Estabilizador osmótico KCl/MgSO ₄ 0,05M pH 6,0	42
3.4.9. Estabilizador osmótico KCl 1,2M pH 5,8	43
3.4.10. Estabilizador osmótico de sacarose 1,2M	43
3.5. Coloração de núcleos de conídios e de tubos germinativos	44
3.5.1. Limpeza de lâminas e laminulas	44
3.5.2. Preparo de lâmina	44
3.5.3. Coloração	45
3.6. Medida do tamanho de conídios	45

3.7. Crescimento e conidiação em diferentes meios de cultura	45
3.8. Produção de exoenzimas	46
3.8.1. Detecção da atividade amilolítica .	47
3.8.2. Detecção da atividade proteolítica.	47
3.8.3. Detecção da atividade lipolítica ..	48
3.9. Sobrevivência à luz ultravioleta	48
3.10. Sobrevivência à radiação Gama	49
3.11. Sobrevivência ao ácido nitroso	49
3.12. Curva dose resposta ao fungicida Benomyl .	50
3.13. Obtenção de mutantes auxotróficos	51
3.13.1. Método de inibição de colônias prototróficas pela nistatina	51
3.13.2. Método de filtração em meio mínimo	52
3.13.3. Método de isolamento total	52
3.14. Obtenção de mutantes morfológicos	53
3.15. Caracterização dos mutantes auxotróficos .	53
3.16. Obtenção de mutantes resistentes à luz ultravioleta	55
3.17. Teste de reversão	56
3.18. Teste de sintrofismo	56
3.19. Determinação dos padrões eletroforéticos em gel de poliacrilamida	56
3.19.1. Preparo das amostras	56

3.19.2. Preparo dos géis	57
3.19.2.1. Gel separador a 10%	58
3.19.2.2. Gel empilhador a 4%	58
3.19.3. Revelação das esterases	58
3.19.4. Plastificação do gel	59
3.20. Análise genética	59
3.20.1. Obtenção de heterocário	59
3.20.2. Obtenção do diplóide e de colônias recombinantes	60
3.20.3. Haploidização dos diplóides	60
3.20.4. Análise dos produtos recombinantes	60
3.21. Produção de protoplastos	61
3.22. Regeneração dos protoplastos	62
3.23. Fusão de protoplastos	64
3.24. Análise dos produtos de fusão	64
3.25. Efeito de mutantes resistentes à luz ultravioleta sobre lagartas da broca da cana	65
3.26. Análises estatísticas	66
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1. Manutenção das linhagens	67
4.2. Caracterização dos isolados de <u>B. bassiana</u> .	73

4.2.1. Crescimento radial e conidiação em diferentes meios de cultura	73
4.2.2. Curva dose-resposta ao fungicida Benomyl	93
4.2.3. Produção de exoenzimas	99
4.2.4. Padrão eletroforético para esterases	102
4.3. Observação dos conídios e emergência do tubo germinativo de <u>B. bassiana</u>	106
4.4. Curvas de sobrevivência e mutagênicos físicos e químicos	111
4.4.1. Luz ultravioleta	111
4.4.2. Raios Gama	114
4.4.3. Ácido Nitroso	117
4.5. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos	120
4.6. Ciclo parassexual em <u>B. bassiana</u>	131
4.6.1. Obtenção do heterocário	131
4.6.2. Obtenção de produtos recombinantes	134
4.7. Obtenção, regeneração e fusão de protoplastos em <u>B. bassiana</u>	141
4.8. Efeito dos mutantes resistentes ao ultra- violeta sobre lagartas de <u>D. saccharalis</u> .	157

Página

5. CONCLUSIONES	167
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169

VARIABILIDADE E RECOMBINAÇÃO GENÉTICA NO DEUTEROMICETO
Beauveria bassiana (Bals.) VUILL.

Autora: LUZIA DORETTO PACCOLA MEIRELLES

Orientador: PROF. DR. JOAO LUCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Cinco isolados de Beauveria bassiana oriundos de diferentes regiões do Brasil foram caracterizados quanto ao crescimento e conidiação em vários meios de cultivo, produção de exoenzimas, sensibilidade ao Benomyl e padrão eletroforético para esterases. Com base nestas características observou-se uma grande variabilidade natural, que pode ser aproveitada na condução de estudos genéticos e em programas de melhoramento neste fungo. Com o objetivo de se obter mutantes auxotróficos, foram testados três agentes mutagênicos, a luz ultravioleta, os raios gama e o ácido nitroso, assim como três métodos de isolamento de mutantes, o método de inibição pela nistatina, o de enriquecimento e o de isolamento total. O tratamento mutagênico que se mostrou mais adequado foi aquele com radiação gama seguido do método de isolamento total para a seleção de colônias mutantes. Mutantes com duplas marcas

auxotróficas foram utilizados para a produção do heterocário, e conídios recombinantes foram recuperados diretamente deste, sugerindo a ocorrência de parameiose nesta espécie. A fase diplóide é altamente instável e a haploidização ocorre na hifa heterocariótica. Em alguns cruzamentos não foi possível a obtenção do heterocário, indicando a existência de incompatibilidade vegetativa entre algumas linhagens. Descreveu-se o método de produção e fusão de protoplastos. Os produtos resultantes de fusão de protoplastos liberaram espontaneamente setores haplóides recombinantes. Foram isolados, também, mutantes resistentes à luz ultravioleta e estes, ensaiados quanto a virulência em lagartas de Diatraea saccharalis, mostraram diminuição da mesma, provavelmente devido ao efeito mutagênico.

VARIABILITY AND GENETIC RECOMBINATION IN THE DEUTEROMYCETE
Beauveria bassiana (Bals.) VUILL.

Author: LUZIA DORETTO PACCOLA MEIRELLES

Adviser: PROF. DR. JOAO LUCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

Five Beauveria bassiana isolates from different regions of Brazil were characterized in relation to their growing and conidiation in several culture media, exoenzyme production, sensitivity to Benomyl and the electrophoretic pattern for esterases. A natural great variability was found and it can be used in genetic studies and further breeding programs for this fungus.

Three different mutagenic agents - ultra-violet light, gamma rays and nitrous acid were tested aiming to obtain auxothrophic mutants and three methods for mutants isolation - the nistatin inhibition, enrichment and total isolation were tested as well. As far as mutants isolation is concerned the gamma rays method was shown to be the most suitable for them followed by total isolation. Double auxothrophic mutants were used to get heterokaryons and

recombinant conidia were recovered from them suggesting that parameiosis might occur in this species. The diploid phase is highly unstable and haploidization occurs in heterokaryotic hyphae. It was not possible to get heterokaryons in some crosses indicating vegetative incompatibility among the strains. The protoplast releasing method was described and the fusion products spontaneously gave origin to recombinant haploid sectors. Also there were isolated UV resistant mutants that showed a decrease in their virulence tested in Diatraea saccharalis larvae, probably due to the mutagenic effect.

1. INTRODUÇÃO

O Deuteromiceto Beauveria bassiana, da ordem Moniliales, família Moniliaceae, responsável pela doença muscardina branca em várias espécies de insetos de interesse agrônômico, vem sendo estudado sob diferentes aspectos de sua biologia e seu uso como bioinseticida nos últimos anos vem se tornando proeminente.

Uma grande variabilidade genética natural já foi detectada neste fungo. Esta variabilidade pode ser ampliada pelo uso de indutores mutagênicos e por recombinação, muito embora pouco seja conhecido sobre o sistema de troca genética nesta espécie.

Devido a sua importância e potencialidade como bioinseticida é indispensável que estudos genéticos sejam conduzidos em concomitância com aqueles de natureza biológica, o que proporcionará o desenvolvimento de eficientes programas de melhoramento. Assim, o conhecimento da variabilidade genética já existente, a indução de mutações e os processos parassexuais para recombinação neste

microrganismo tornam-se relevantes.

O mecanismo de parassexualidade, ao lado da metodologia de fusão de protoplastos permite a combinação de caracteres desejáveis em um único organismo, e no último caso, permite o cruzamento entre linhagens incompatíveis e entre gêneros e espécies distintas.

O presente trabalho teve por objetivos:

. Caracterizar, sob vários aspectos, cinco isolados de Beauveria bassiana oriundos de diferentes regiões brasileiras.

. Obter mutantes morfológicos, auxotróficos e resistentes à luz ultravioleta, os quais seriam utilizados como ferramentas para a condução de estudos de recombinação.

. Verificar a ocorrência de parassexualidade nesta espécie.

. Determinar a metodologia de obtenção, regeneração e fusão de protoplastos com consequente recuperação de produtos recombinantes.

. Avaliar a patogenicidade de mutantes resistentes à luz ultravioleta sobre lagartas de Diatraea saccharalis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Posição taxonômica e ciclo biológico de Beauveria bassiana

Beauveria bassiana é um Eucomiceto pertencente ao grupo dos Deuteromicetos, ordem Moniliales.

¹ Schaerffenberg em 1955 (citado por MADELIN, 1966) relatou a ocorrência do estágio sexual em B. bassiana descrevendo a ocorrência de peritécios em cadáveres de insetos infectados e em lâminas de cultura. Em 1964 ² este mesmo autor reafirmou este achado, porém nenhuma evidência

1

SCHAERFFENBERG, B. Die HauptFruchtform (Ascús Form) von Beauveria bassiana (Vuill). Link und B. densa (Vuill) Link. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, 62: 544-549, 1955.

2

SCHAERFFENBERG, B. Beitrage Zur Biologie and Chemie der insektentotendem Beauveria - Pilze. I. Die Beauveria Formen. Nova Hedwigia, 8: 151-159, 1964.

adicional foi apresentada e não se tem registros até o presente, do estágio peritecial em B. bassiana. Portanto esta espécie continua ao grupo dos Deuteromicetos, ou fungos imperfeitos, que representam os fungos cuja fase sexual é desconhecida e que se reproduzem assexuadamente por conídios.

O gênero Beauveria Vuill descrito por Beauverie e Vuillemin em 1911 e 1912 respectivamente (McLeod, 1954) apresenta micélio branco ou levemente corado, com aparência "fluffy" a pulverulenta, conidióforos únicos, irregularmente agrupados ou em cachos verticilados. Em algumas espécies inflam-se na base, afinando-se para uma região que traz um conídio. Esta região aparece em "zig-zag". (BARNETT, 1958).

Este gênero foi revisado por De HOOG (1972) e contém duas espécies, B. bassiana e B. tenella (B. brongniartii). A primeira apresenta conídios globosos ou subglobosos, diferentes portanto dos conídios elipsoidais de B. tenella. Ocorrem alguns casos entretanto, onde não existem diferenças morfológicas claras entre ambas, e as referências em relação a elas devem ser tratadas com cuidado (SOSA GOMEZ, 1987).

Estas espécies são reconhecidas como controladoras de populações de insetos e a infecção é resultante da penetração de hifas via tegumento (LEFEBVRE,, 1934; VEY & FARGUES, 1977; FERRON, 1978 e PEKRUL & GRULA, 1979), a qual é facilitada por mecanismos físicos e enzimáticos. A penetração através do sistema alimentar também foi verificada (DROOME et alii, 1976), assim como pelo sistema respiratório (CLARK et alii, 1968 e HEDLUNG & PASS, 1968), uma vez que os conídios são relativamente pequenos com diâmetro médio de 2,5 µm (PEKRUL & GRULA, 1979; SANSON, 1981 e PACCOLA et alii, 1984) os quais podem atravessar o espiráculo (5,3 µm de diâmetro) e germinarem ali (PEKRUL & GRULA, 1979).

Assim sendo B. bassiana é um parasita facultativo, cujo ciclo biológico (Figura 1) apresenta duas fases distintas: uma fase parasitária e outra não parasitária.

Os conídios de B. bassiana podem germinar em qualquer região da cutícula do inseto, e os tubos germinativos penetram através da cutícula em cerca de 16 a 18 horas após a infecção (PEKRUL & GRULA, 1979). VEY & FARGUES (1977) descreveram a formação de estruturas semelhantes a apressórios durante o processo de infecção de B. bassiana em Leptinotarsa decemlineata, porém essas estruturas não foram observadas por PEKRUL & GRULA (1979) durante a infecção deste patógeno em Heliothis zea.

Figura 1 - Ciclo biológico de *B. bassiana*.

Após a penetração o micélio atinge a hemolinfa do inseto onde são formados os blastosporos, células leveduriformes originadas por brotamento. Ocorre morte do inseto, e o micélio gradualmente invade os demais tecidos. Depois da completa colonização do hospedeiro as hifas emergem para o exterior onde se desenvolvem os conidióforos, e os conídios são então, dispersos no ambiente. A morte do inseto marca o final da fase parasitária do fungo (FERRON, 1978).

2.2. O uso de B. bassiana como bioinseticida

Nos últimos anos, o uso de microrganismos entomopatogênicos no controle de insetos pragas vem recebendo atenção especial. Pelas revisões de FERRON (1978; 1985), KIRSCHBAUM (1985), KHACHATOURIANS (1986) e ALVES (1986) pode-se ter idéia do potencial dos inseticidas biológicos no controle de insetos prejudiciais à agricultura e de vetores de doenças humanas e animais.

B. bassiana é um destes eficientes agentes microbianos que vem ganhando proeminência neste campo de aplicação. MACLEOD (1954) descreve-o como sendo o isolado fúngico mais comumente encontrado em insetos mortos na natureza e, segundo ALVES (1986) infecta cerca de 200 espécies de insetos de diferentes ordens.

As pesquisas com este entomopatógeno tiveram início na União Soviética no controle de Leptinotarsa decemlineata. O desenvolvimento de processos de produção em massa levou os cientistas soviéticos a formularem um micoinseticida, o Boverin (SAMSINAKOVA, 1966 e IGNOFFO, 1975), a base de conídios de B. bassiana; a partir de então estudos em grande escala vêm sendo desenvolvidos na URSS.

Nos EUA uma linhagem de Beauveria foi usada como uma primeira tentativa no controle de insetos pragas (STEINHAUS, 1949). A partir daí poucos estudos com este genero foram realizados até 1962, quando a Nutrolite Productes INC. (Buena Park, CA) produziu quantidades experimentais de conídios de B. bassiana e distribuiu aos interessados em aplicar este bioinseticida (DUNN & MECHALAS, 1963), porém o registro do produto não foi obtido (IGNOFFO et alii, 1979).

No Brasil, estudos visando a aplicação de B. bassiana são promissores e testes laboratoriais mostraram que este fungo entomopatogênico oferece possibilidades reais no controle de pragas de interesse agrônômico (TONET & REIS, 1979), como Diabrotica speciosa e Cerotoma sp., pragas do feijão, soja e caupi (DAQUST et alii, 1983; 1985 e CARVALHO & SILVA, 1984) entre outras listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de insetos danosos à agricultura brasileira nos quais estão sendo estudados mecanismos de controle com B. bassiana.

-----	-----	-----
Espécie	Planta hospedeira	Referência
-----	-----	-----
<u>Aethalium reticulatum</u>	diversas	ALVES, 1982
<u>Aracanthus</u> sp.	caupi	DAOUST et alii, 1983
<u>Brassolis sophorae</u>	palmáceas	HABIB & ANDRADE, 1977
<u>Castnia licus</u>	cana-de-açúcar	VILLAS BOAS et alii, 1983
<u>Ceratomyia arcuata</u>	caupi	DAOUST et alii, 1983
<u>Deois flavopicta</u>	pastagem	BARBOSA et alii, 1984
<u>Diatraea saccharalis</u>	cana-de-açúcar	ALVES, 1986
<u>Diabrotica</u> sp.	caupi	DAOUST et alii, 1983
<u>Diabrotica speciosa</u>	soja	PANIZZI et alii, 1977
		TONET & REIS, 1979
<u>Edessa meditabunda</u>	soja	ALVES, 1986
<u>Hypothenemus hampei</u>	café	ROBBS, 1962
<u>Piezodorus guildinii</u>	soja	TONET & REIS, 1979
-----	-----	-----

Em outros países tais como, Canadá, França, Alemanha e Tchecoslováquia, vários programas de pesquisa relativos a aspectos teóricos e práticos estão sendo desenvolvidos, porém, este inseticida atualmente, é utilizado em grande escala apenas na URSS (KHACHATOURIANS, 1986).

2.3. Fatores que influenciam no crescimento e esporulação de Beauveria bassiana

Os requisitos nutricionais para germinação e crescimento de B. bassiana não são complexos. O processo de germinação ocorre em presença de uma fonte de carbono utilizável, e uma fonte de nitrogênio é necessária para o crescimento hifal, sendo que na sua ausência ocorre lise (SMITH & GRULA, 1981).

LEFEBVRE (1931) obteve germinação e significativo crescimento em gotas de água destilada. Em presença de peptona 2% um aumento na porcentagem de conídios germinados foi verificado. CAMPBELL et alii (1983) também verificaram germinação em meio sem fonte de carbono. Ao contrário, GABRIEL (1959) obteve pouca ou nenhuma germinação de conídios em água ou em solução salina, mas abundante em peptona 2%. Em concordância com estes resultados SMITH & GRULA (1981) observaram que conídios lavados previamente não germinam e não crescem quando inoculados em água e em meios

contendo apenas sais, mas sofrem lise. Estes autores interpretaram os resultados de LEFEBVRE (1931), como sendo devido a uma transferência direta dos conídios do meio BDA (batata, dextrose, ágar) para a gota de água sem lavagem prévia. Com isso, quantidades de nutrientes, suficientes para proporcionar germinação e crescimento, foram transferidas juntamente com os conídios.

No trabalho de SMITH & GRULA (1981) verificou-se germinação quando uma fonte de carbono foi adicionada ao meio de sais, porém, logo após ocorreu lise do tubo germinativo. A suplementação com uma fonte de nitrogênio preveniu a autólise, resultando em bom crescimento.

As exigências nutricionais de B. bassiana são simples, possibilitando este fungo ser efetivo em diversos ambientes e ser facilmente cultivado em meios naturais e em meios sintéticos contendo várias fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico (AOKI & CHIGUSA, 1968; AOKI & YANASE, 1970; KUCERA, 1971; SCHAERFFENBERG, 1964 e SAMSINAKOVA, 1966).

BARNES et alii (1975), utilizaram várias fontes de peptona no crescimento e esporulação de B. bassiana. Neopeptona, caseína hidrolizada, soitona e

casitona deram respostas semelhantes na esporulação, enquanto que extrato de levedura, gelatina e peptona bacteriológica produziram pouco micélio, embora extrato de levedura tenha proporcionado boa esporulação.

CAMPBELL et alii (1978) determinaram o efeito de vários aminoácidos no crescimento e esporulação de B. bassiana. As melhores fontes de nitrogênio tanto para crescimento quanto para esporulação foram triptofano e alanina. Segundo SMITH & GRULA (1981), um mínimo de 3 aminoácidos é requerido como fontes de carbono e nitrogênio. A melhor combinação encontrada por estes autores foi alanina, fenilalanina e leucina ou valina. Nenhum crescimento foi satisfatório em aminoácidos ensaiados individualmente ou em combinação de dois a dois.

Segundo EVALAKOVA & CHEKHOURLINA (1962) e SMITH & GRULA (1982) os ácidos graxos encontrados na superfície dos insetos, são tóxicos para germinação e crescimento de B. bassiana.

Outros compostos como glicose (SMITH & GRULA, 1981 e CAMPBELL et alii, 1983), D-sucrose, D-trealose (CAMPBELL et alii, 1983), açúcares aminados como acetil-glicosamina e glicosamina (SMITH & GRULA, 1981 e WOODS & GRULA, 1984), quitina, amido e lanolina podem ser utilizados

por B. bassiana como únicas fontes de carbono e nitrogênio (SMITH & GRULA, 1981).

Devido a versatilidade nutricional de B. bassiana, este entomopatógeno é capaz de sobreviver e ser eficiente em vários tipos de ambientes naturais (LINGG & DONALDSON, 1981; SMITH & GRULA, 1981; 1982 e CAMPBELL et alii, 1983).

Além das exigências nutricionais, o pH do meio, a umidade relativa, a temperatura e luz têm pronunciado efeito na germinação e sobrevivência de B. bassiana e muitos trabalhos definiram as condições ótimas para estes fatores.

Segundo FERRON (1981) a temperatura ótima de crescimento é próxima de 23-25 °C, porém este fungo pode suportar temperaturas de até 45 °C (ALVES, 1986).

Quanto ao fator umidade relativa (UR), FARGUES (1972) observou a mesma taxa de mortalidade em larvas de L. decemlineata infectadas por B. bassiana a UR de 55% e 100%. Resultados semelhantes foram obtidos por DOBERSKI (1981) em larvas de Scolytus scolytus em ambientes com UR variando de 51 a 97,5%, porém a morte foi mais rápida em umidades mais elevadas. RAMOSKA (1984) verificou que

B.bassiana provoca doença em Blissus leucopterus sob umidade relativa variando de 30 a 100%, porém a conidiogênese ocorre em ambientes com 75 e 100% de UR, e em Ceratomyces arcuata FERNANDES (1986) obteve boa esporulação nas combinações de 89% e 99% de UR a temperaturas de 17 °C e 24 °C.

Pelo visto, enquanto que a umidade relativa parece não ser fator crucial na germinação, a esporulação só pode ocorrer na presença de UR elevada (LINGG & DONALDSON, 1981). O mesmo foi constatado em outros fungos como Entomophthora, Aspergillus, Metarhizium, Nomuraea e em outros gêneros de entomopatógenos.

Depois de formados, a disseminação dos conídios de B. bassiana é estimulada em umidades relativas inferiores a 50% (GOTTWALD & TEDDERS, 1982).

Outro fator a ser considerado é a radiação, que pode atuar na germinação dos conídios principalmente durante os primeiros estágios de desenvolvimento do tubo germinativo. O fungo B. bassiana pode ser estimulado pela luz de curto comprimento de onda. Sob luz contínua ocorre aumento na produção de conídios (ALVES & MORAES, 1979), e o mesmo foi observado por NEGREIROS et alii (1980) quando o fungo foi exposto à luz amarela e negra.

Vários autores mostraram que luz solar e fontes artificiais de radiação ultravioleta são prejudiciais à estabilidade dos conídios de B. bassiana e de outros fungos (IGNOFFO et alii, 1977; 1979; GARDNER et alii, 1977; ALVES et alii, 1984 e DAoust & PEREIRA, 1986).

O conhecimento de fatores que influenciam o crescimento, a sobrevivência e a patogenicidade de um fungo entomopatogênico é de fundamental importância não só para o desenvolvimento de novos inseticidas biológicos como para a condução de programas de melhoramento eficientes, os quais visam minimizar certas desvantagens e acentuar as vantagens do uso desses microrganismos no controle biológico.

2.4. Melhoramento genético de fungos entomopatogênicos

A genética estuda a variabilidade dos organismos. As causas dessa variabilidade são atribuídas aos mecanismos de mutação ou recombinação quer sejam eles espontâneos ou induzidos. Assim, um programa de melhoramento de um microrganismo útil ao controle biológico pode ter início através do isolamento, caracterização e seleção de linhagens mais virulentas e agressivas ao hospedeiro de interesse.

2.4.1. Caracterização e seleção de linhagens mais eficientes para o controle biológico

A caracterização até pouco tempo, era baseada apenas nos critérios morfológicos. Hoje uma série de outros critérios são empregados, a saber, virulência (SOSA GÓMEZ & ALVES, 1983), especificidade, crescimento e esporulação, observações de conídios em microscópio eletrônico (HAMMIL, 1972 e MATANMI & LIBBY, 1975), padrões eletroforéticos e imunoeletroforéticos (DE CONTI et alii, 1980; SOSA GÓMEZ et alii, 1984; TIGANO, 1985).

O uso de meios contendo substratos para produção de exoenzimas como lipase, amilases, quitinases e proteases, importantes durante o processo de infecção no hospedeiro (KUCERA & SAMSINAKOVA, 1968; LEOPOLD & SAMSINAKOVA, 1970; PEKRUL & GRULA, 1979 e SMITH et alii, 1981), representa mais uma técnica de caracterização e seleção de linhagens entomopatogênicas através das diferenças no diâmetro dos halos formados (LEITE & MESSIAS, 1984; ROSATO et alii 1981 e SOSA GÓMEZ & ALVES, 1983).

A quantificação de ácidos graxos por cromatografia de ionização foi usada por PUPIN & MESSIAS (1984) como uma técnica auxiliar na identificação e separação de várias linhagens de M. anisopliae oriundas de

diferentes regiões brasileiras.

Os diferentes métodos citados, entre outros, permitem observar a variabilidade natural da espécie a ser estudada. Progressos em programas de melhoramento podem ser obtidos aproveitando-se esta variabilidade natural.

2.4.2. Mutação

Alguns agentes físicos e químicos podem aumentar grandemente a frequência espontânea de mutação, ampliando assim a variabilidade natural. Porém, como as mutações são aleatórias, muitos mutantes com características indesejáveis ocorrem juntamente com aqueles de interesse, sendo importante o domínio de técnicas seletivas para a obtenção destes últimos (AZEVEDO, 1986).

Muitos fungos utilizados no controle biológico tiveram sua virulência alterada depois do tratamento com mutagênicos (AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978 e AL-AIDROOS & SEIFERT, 1980). PEKRUL & GRULA (1979) através da indução com luz ultravioleta selecionaram 11 mutantes de B. bassiana com níveis variados de atividade proteolítica. PARIS & FERRON (1979) ensaiaram a virulência de 10 mutantes lipase-negativos obtidos a partir de uma linhagem de B. brongniartii virulenta lipase-positiva e, 4 mutantes

auxotróficos lipase-positivos. Todos se mostraram avirulentos, e o autor concluiu que a atividade lipolítica apenas, não é suficiente para causar aumento na virulência. CHAMPLIN et alii (1981) isolaram 5 mutantes de B. bassiana com graus variados de atividade lipolítica, quitinolítica e proteolítica com diferentes graus de patogenicidade. Nenhuma correlação positiva e direta entre virulência e síntese dessas enzimas extracelulares foi observada por estes autores. O mesmo foi encontrado por SMITH et alii (1981). Já SILVA & MESSIAS (1986) mostraram uma correlação positiva entre atividade amilolítica, lipolítica e virulência através do uso de mutantes de M. anisopliae incapazes de produzir amilase e lipase.

As mutações induzidas em fungos entomopatogênicos além de proporcionarem aumento na virulência auxiliam na elucidação dos processos básicos como recombinação e atividade gênica entre outros.

2.4.3. Recombinação

Através da recombinação é possível combinar características desejáveis em uma única linhagem. Os processos de recombinação conhecidos em fungos são, o ciclo sexual, o ciclo parassexual e as técnicas mais modernas de manipulação gênica (fusão de protoplastos, transformação e

tecnologia do DNA recombinante).

Em geral, os fungos utilizados no controle biológico são Deuteromicetos, ou fungos imperfeitos, e entre eles são poucos os que possuem o ciclo parassexual bem definido.

Pouco se conhece até o momento com relação à utilização da técnica de transformação e da tecnologia do DNA recombinante com fungos entomopatogênicos. Em recente revisão, KIRSCHBAUM (1985) relata apenas as perspectivas e o potencial destas e de outras técnicas biotecnológicas no controle de insetos, dando ênfase ao controle bacteriológico.

Os trabalhos utilizando os processos de parassexualidade e de fusão de protoplastos para obtenção de recombinantes em fungos de interesse no controle biológico, serão descritos a seguir.

O ciclo parassexual se inicia com a heterocariose. Núcleos haplóides, geneticamente diferentes eventualmente se fundem e por divisões mitóticas posteriores formam novos diplóides. Estes núcleos, no decorrer dessas divisões, podem sofrer não-disjunções cromossômicas sucessivas e retornar ao seu estado haplóide. Os haplóides,

por sua vez, podem ser recombinantes diferentes dos haplóides parentais. Outro processo que pode ocorrer durante as divisões mitóticas dos diplóides é a permuta mitótica, que também dá origem a produtos recombinantes.

Foram TINLINE & NOVIELLO (1971), utilizando mutantes resistentes a drogas e auxotróficos, que reportaram a ocorrência de heterocariose no fungo entomopatogênico *M. anisopliae* em laboratório. As marcas auxotróficas foram selecionadas facilmente pelo método de isolamento total e pelo método de enriquecimento após o tratamento com o mutagênico ultravioleta, enquanto que as marcas para resistência a drogas foram obtidas espontaneamente. O ciclo parassexual neste fungo foi descrito pela primeira vez por MESSIAS (1979); MESSIAS & AZEVEDO (1980) e AL-AIDROOS (1980). Estes autores obtiveram heterocários, diplóides e recombinantes mitóticos estáveis. MESSIAS & AZEVEDO (1980), concluíram pelos seus resultados que o número de grupos de ligação em *M. anisopliae* é pequeno, em torno de 4. BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982), através de 3 cruzamentos utilizando o ciclo parassexual analisaram a segregação de oito marcas mutantes neste fungo e localizaram estes genes em cinco possíveis grupos de ligação. Em trabalho posterior, usando a mesma metodologia MAGOON & MESSING-AL-AIDROOS (1986) encontraram duas novas marcas nestes cinco grupos de ligação. Os

diplóides obtidos se mostraram instáveis, e recombinantes haplóides originados por não disjunção ou permuta mitótica foram isolados durante a primeira repicagem do diplóide e até mesmo de heterocários. Este fenômeno de alta instabilidade do diplóide heterozigoto foi observado também em outros fungos como Aspergillus niger (LHOAS, 1967; DAS & ILCZUK, 1978 e BONATELLI Jr et alii, 1983) Cephalosporium acremonium (BALL & HAMLYN, 1982 e HAMLYN et alii, 1985) e Verticillium albo-atrum (HASTIE, 1964).

BONATELLI Jr et alii (1983) propuzeram o termo parameiose para este tipo de instabilidade. BAGALHI (1987) descreveu a parameiose em M. anisopliae, e este autor interpretou como sendo um possível mecanismo natural de amplificação da variabilidade genética em fungos imperfeitos.

Estudos genéticos no gênero Beauveria são escassos, e as tentativas de obtenção de heterocário descritas na literatura não apresentaram resultados positivos.

PARIS (1977) expôs diferentes técnicas para obtenção de heterocário entre conídios auxotróficos de B. tenella. Em nenhuma delas o autor observou anastomose de hifas, a não ser pela técnica de fusão de protoplastos.

TIGANO (1985) sugeriu a obtenção de mutantes com várias marcas genéticas para o estudo do ciclo parassexual em *B. bassiana* uma vez que os mutantes com duplas marcas auxotróficas utilizadas em seu trabalho não permitiram a evidência de hibridação.

O ciclo parassexual é mais uma ferramenta que o geneticista microbiano dispõe para conduzir um programa de melhoramento em fungos destituídos de fase sexual, na determinação do número de grupos de ligação e localização de marcas genéticas.

Em alguns casos, como já verificado em muitas linhagens de entomopatógenos e mesmo em outras de interesse industrial, o cruzamento via ciclo parassexual é impedido devido a incompatibilidade genética entre linhagens, e a técnica empregada nestas ocasiões pelo geneticista é a da fusão de protoplastos.

A fusão de protoplasto possibilita a obtenção de recombinantes entre diferentes linhagens, espécies, gêneros e até mesmo entre eucariotos e procariotos (AZEVEDO, 1986).

O isolamento de protoplastos foi observado em alguns fungos entomopatogênicos, como *M. anisopliae* (CHACEL

et alii, 1982; FRIGO, 1983 e SILVEIRA & AZEVEDO, 1987), B. tenella (PARIS, 1977), B. bassiana (KAWULA & LING, 1984 e PFEIFER & KHACHATOURIANS, 1987).

Em M. anisopliae a metodologia de isolamento e fusão de protoplastos foi bem definida por SILVEIRA (1983) e SILVEIRA & AZEVEDO (1987). Estes autores detectaram uma frequência de regeneração de 1,2 a 3,0% e uma frequência de fusão que variou de 0,9 a 44,1 em 10^5 protoplastos. Setores emergiram dos produtos de fusão, e estes foram analisados como sendo recombinantes.

FRIGO (1983) obteve produtos após fusão de protoplastos entre uma linhagem selvagem de M. anisopliae morta por luz ultravioleta e uma linhagem com duplas marcas auxotróficas e uma marca para coloração. A frequência de produtos de fusão observada foi de 41×10^{-5} . Esta técnica descrita como "doador morto" permite principalmente que possam ser conduzidos cruzamentos interespecíficos não só para verificar diferenças taxonômicas entre espécies, como também combinar qualidades favoráveis de diferentes fungos em um só, principalmente entre aqueles que, por problemas de incompatibilidade, não ocorre fusão de hifas.

Em B. tenella a metodologia para obtenção de protoplastos foi descrita por PARIS (1977). A frequência de

regeneração dos protoplastos variou de 5 a 20% em meio de Sabouraud, contendo sacarose à 0,6 M como estabilizador osmótico. Duas metodologias foram empregadas para obtenção de produtos de fusão: por centrifugação e fusão com Polietileno glicol (PEG). Nenhum resultado foi obtido pela primeira técnica, enquanto que na segunda em 12 cruzamentos utilizando marcas auxotróficas, em apenas um foi observado crescimento de colônias supostamente heterocarióticas. Porém a partir destas colônias o autor não teve êxito em isolar conídios diplóides.

A protoplastização de B. bassiana foi recentemente descrita por KAWULA & LINGG (1984) e PFEIFER & KHACHATOURIANS (1987). Os primeiros autores indicaram o uso de beta-glucuronidase para obtenção de protoplastos a partir de blastosporos e PFEIFER & KHACHATOURIANS (1987) utilizaram uma mistura de enzimas constituídas por celulase, quitinase, beta-glucuronidase e lisozima para obter protoplastos a partir de micélio e blastosporos. A regeneração não foi estudada por estes autores.

A fusão de protoplastos abriu novas perspectivas para o melhoramento e elucidação dos mecanismos genéticos que governam a virulência em fungos entomopatogênicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

As linhagens utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Sérgio B. Alves do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e encontram-se listadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Linhagens de B. bassiana, seus respectivos hospedeiros e locais de origem

Isolados	Hospedeiro planta parasitada	local de isolamento
196	<u>Diatraea saccharalis</u> - cana-de-açúcar	Pernambuco
246	<u>Stenema decora</u> - cacau	Bahia
61	<u>Cosmopolitus sordidus</u> - banana	Espirito Santo
256	<u>Euschistus heros</u> - soja	Goiás
252	<u>Hypothenemus hampei</u> - café	São Paulo

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO et alii, 1953, modificado por MONTEIRO, 1979)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.2. Meio completo sólido (PONTECORVO et alii, 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973)

Adicionou-se ao meio mínimo (item 3.2.1):

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml
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 acrescido de 4% de meio completo (MESSIAS e AZEVEDO, 1980)

Adicionou-se ao meio mínimo líquido (item 3.2.3) 4% de meio completo líquido (item 3.2.4). Distribuiu-se 2,5 ml em tubos que foram autoclavados e conservados em refrigerador.

3.2.6. Meio completo com estabilizador osmótico

Preparado segundo o item 3.2.2, em dupla concentração. No momento do uso foi diluído com KCl 1,2M (item 3.4.9) ou com sacarose 1,2M (item 8.4.11) na proporção de 1:1.

3.2.7. Meio mínimo com estabilizador osmótico

Preparado segundo o item 3.2.1, porém 2 vezes concentrado. No momento do uso diluiu-se na proporção de 1:1 com KCl 1,2M (item 3.4.9).

3.2.8. Meio mínimo e meio completo semi sólido 0,5%

O meio mínimo e o meio completo foram feitos de acordo com os itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente, porém adicionando apenas 5 gr de ágar em 1000 ml de água.

3.2.9. Meio para detectar atividade amilolítica (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975, modificado por Silva, 1985)

Meio mínimo (item 3.2.1.) porém substituiu-se a glicose por 0,2% de amido solúvel.

3.2.10. Meio para detectar atividade proteolítica (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975, modificado por Silva, 1985)

Adicionou-se ao meio mínimo (item 3.2.1) depois de autoclavado 5 ml de solução de gelatina 8% (item 3.3.6) para cada 100 ml de meio.

3.2.11.Meio para detectar atividade lipolítica
(HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975, modificado por
Silva, 1985)

Peptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
CaCl ₂	0,1 g
Agar	20,0 g
Água destilada	1000,0 ml

Autoclavou-se o meio e no momento do uso foi adicionado 1 ml de "tween 20" esterilizado, para cada 100 ml de meio.

3.2.12.Meio ágar-água

Agar	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml

3.2.13.Meio para conservação de Beauveria bassiana

No momento do uso acrescentou-se ao meio mínimo sólido (item 3.2.1) ou ao meio ágar - água (item 3.2.12) 10% de macerado de Diatraea saccharalis ou lagartas inteiras autoclavadas.

3.2.14. Meio BDA

Batata	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

Retirou-se a película da batata, deixando em infusão durante uma noite e adicionou-se os demais ingredientes.

3.2.15. Meio Corn Meal

Corn Meal-Agar (Difco)	17,0 g
Água destilada	1000,0 ml
pH ajustado para 6,0 com NaOH 4%	

3.2.16. Meio Sabouraud

Peptona	10,0 g
Glicose	20,0 g
Água destilada	1000,0 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.3. Soluções utilizadas

3.3.1. Solução de vitaminas

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

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

3.3.2. Solução de caseína hidrolizada

Caseína hidrolizada	100,0 mg
Água destilada esterilizada	10,0 ml

A solução foi esterilizada por 15 minutos em banho-maria e mantida no refrigerador a 4 °C.

3.3.3. Solução de ácido nucleico

Solução A: ácido nucleico de leveduras 2,0 g

HCl 1N 15,0 ml

Solução B: ácido nucleico de leveduras 2,0 g

NaOH 1N 15,0 ml

Cada solução foi aquecida separadamente em banho-maria durante 20 minutos. A seguir foram misturadas e o pH ajustado para 6,0 com NaOH 4%. Filtrou-se e completou-se o volume para 40 ml com água destilada. Autoclavou-se e a solução foi conservada em refrigerador a 4 °C.

3.3.4. Solução salina

NaCl 8,5 g

Água destilada 1000,0 ml

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

3.3.5. Solução de "tween 80" (0,1% - v/v)

"tween 80"	0,1 ml
Água destilada	99,9 ml

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

3.3.6. Solução de gelatina 8%

Gelatina em pó	8,0 g
Água destilada	100,0 ml

Depois de autoclavada a solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.3.7. Solução de iodo 1%

Iodo re-sublimado	1,0 g
Alcool absoluto	100,0 ml

3.3.8. Soluções estoque dos suplementos adicionados ao meio mínimo

O estoque dos suplementos foi preparado de acordo com a Tabela 3. As soluções foram esterilizadas em banho-maria durante 15 minutos e conservadas em refrigerador.

3.3.9. 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/v) e cristais de cânfora. A solução foi mantida em refrigerador a 4 °C.

3.3.10. Solução de Giemsa

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

Misturou-se o Giemsa com glicerina a 60 °C durante 30 minutos a 2 horas. Após resfriamento, foi adicionado o metanol. Filtrou-se e a solução corante foi armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente e só utilizada após 72 horas de preparo.

Tabela 3 - Soluções estoque de suplementos adicionados ao meio.

Solução estoque (100 ml de água destilada esterilizada)		Concentração final no meio de cultura
Adenina	500,0 mg	25,0 µg/ml
Ácido nicotínico	10,0 mg	0,5 µg/ml
Biotina	4,0 mg	0,2 µg/ml
Metionina	1,0 g	50,0 µg/ml
Piridoxina	5,0 mg	0,25 µg/ml
Riboflavina	10,0 mg	0,5 µg/ml
Tiossulfato de sódio	2,0 mg	100,0 µg/ml

3.3.11. Solução de Benomyl

Metil-1 (Buticarbamoil) 2-Benzimidazol

Carbonato (Benomyl) 100,0 mg

Água destilada esterilizada 100,0 ml

O Benomyl foi dissolvido em 1 gota de acetona e acrescentou-se a água. Depois de filtrado foi esterilizado em banho-maria durante 15 minutos.

3.3.12. Solução estoque de acrilamida (30% de acrilamida; 0,8% N,N' Metileno-bis-acrilamida) (LAEMMLI, 1970)

Acrilamida 75,0 g

Bis-acrilamida 2,0 g

Água desmineralizada 250,0 ml

Filtrou-se a solução e o filtrado foi mantido em refrigerador a 4 °C.

3.3.13. Solução de alfa-naftil acetato 1%

alfa-naftil acetato	1,0 g
Acetona	50,0 ml
Água destilada	50,0 ml

Armazenou-se em refrigerador a 4 °C.

3.3.14. Solução de beta-naftil acetato 1%

beta-naftil acetato	1,0 g
Acetona	100,0 ml

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

3.3.15. Solução reveladora de atividade esterásica
(SHAW & PRASAD, 1970)

"Fast Blue RR"	100,0 mg
Tris-HCl 0,5M pH 7,1	10,0 ml
alfa-naftil acetato	1,5 ml
beta-naftil acetato	1,5 ml
Água destilada	87,0 ml

3.3.16. Solução de enzimas para produção de protoplastos (HAMLYN et alii, 1981)

Estabilizador osmótico KCl/MgSO ₄	50mM	
pH 6,0		1,0 ml
"Celulase CP"		2,5 mg
"Novozima 234" (quitinase e 1Bd. gluco-		
nase, extraída de <u>T.harsiano</u>)		2,5 mg

3.3.17. Solução de polietilenoglicol (PEG) 30%

Solução A: CaCl	11,0 g
Água destilada	1000,0 ml
Solução B: Glicina	3,75 g
Água destilada	1000,0 ml

Adicionou-se 10 ml da solução A em 10,0 ml da solução B. Completou-se o volume para 100 ml com água destilada. O pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4% e adicionou-se PEG 6000 na concentração final de 30%. A solução foi autoclavada e mantida em refrigerador a 4 ° C.

3.3.18. Solução de nistatina

Nistatina	100,0 mg
H ₂ O destilada esterilizada	100,0 ml

A solução foi esterilizada em banho-maria durante 15 minutos e conservada em frasco escuro, no refrigerador.

3.4. Tampões e estabilizadores osmóticos utilizados

3.4.1. Tampão fosfato pH 6,9

Solução A: NaH ₂ PO ₄	27,8 g
Água destilada	1000,0 ml

Solução B: Na ₂ HPO ₄	53,65g
Água destilada	1000,0 ml

Misturou-se, no momento do uso, 45 ml de solução A em 55 ml de solução B. Completou-se o volume para 200 ml com água destilada. As duas soluções foram mantidas em refrigerador a 4 °C.

3.4.2. Tampão da amostra (LAEMMLI, 1970)

Glicerol	5,0 ml
Tampão do gel empilhador	2,5 ml
Azul de Bromofenol	2,5 mg

Completoou-se com água para o volume de 25 ml.

Conservou-se em congelador.

3.4.3. Tampão do gel separador, Tris-HCl pH 8,9
(LAEMMLI, 1970)

Tris-base	45,75 g
Água desmineralizada	60,0 ml

Titulou-se para pH 8,9 com HCl puro ou 1N. Quando este pH foi atingido, completou-se o volume para 100 ml com água desmineralizada. Filtrou-se e a solução foi conservada à temperatura ambiente.

3.4.4. Tampão do gel empilhador, Tris-HCl pH 6,8
(LAEMMLI, 1970)

Tris-base	7,475 g
Água desmineralizada	60,0 ml

Titulou-se para pH 6,8 com HCl puro ou 1N e posteriormente completou-se o volume para 100 ml com água desmineralizada. Filtrou-se e manteve-se a solução à temperatura ambiente.

3.4.5. Tampão do tanque ou eletrólito, Tris-Glicina pH 8,9 (LAEMMLI, 1970)

Tris-base	63,2 g
Glicina	39,9 g
Água desmineralizada	1000,0 ml

O tampão foi filtrado e armazenado a 4 °C. No momento do uso diluiu-se este tampão (1:9) em água desmineralizada (v/v).

3.4.6. Tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,0

Solução A:	KH_2PO_4	6,8 g
	Água destilada	1000,0 ml
Solução B:	K_2HPO_4	8,7 g
	Água destilada	1000,0 ml

Adicionou-se cerca de 300 ml de solução B em 1000 ml de solução A. Manteve-se em refrigerador a 4 °C.

3.4.7. Tampão fosfato 0,02M pH 5,8

Solução A:	$\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,76 g
	Água destilada	1000,0 ml

Solução B:	$\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,36 g
	Água destilada	1000,0 ml

No momento do uso adicionou-se a solução A na solução B até atingir pH 5,8. Autoclavou-se. As soluções A e B foram mantidas separadamente em refrigerador.

3.4.8. Estabilizador osmótico KCl/MgSO₄ 0,05M pH 6,0
(TRAVE et alii, 1974)

Adicionou-se à solução A do tampão fosfato pH 6,0 (item 3.4.6):

MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,23 g
KCl	52,19 g
Cisteína	0,47 g

Titulou-se com a solução B do tampão fosfato pH 6,0 (item 3.4.6) até atingir pH 6,0. Completou-se o volume para 1000,0 ml com tampão fosfato pH 6,0 (item 3.4.6). Autoclavou-se e manteve-se a solução em refrigerador a 4 °C.

3.4.9. Estabilizador osmótico KCl 1,2M pH 5,8

Adicionou-se à 500 ml da solução A do tampão fosfato pH 5,8 (item 3.4.7), 84,47 gr de KCl e titulou-se com a solução B do mesmo tampão até atingir pH 5,8. Completou-se o volume para 1000 ml com tampão fosfato pH 5,8 (item 3.4.7). Autoclavou-se e conservou-se na geladeira.

3.4.10. Estabilizador osmótico de sacarose 1,2M

Sacarose	410,76 g
Água destilada	1000,0 ml

Autoclavou-se e manteve-se em refrigerador a

4 °C.

3.5. Coloração de núcleos de conídios e de tubos germinativos (TANAKA et alii, 1979)

3.5.1. Limpeza de lâminas e laminulas

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

3.5.2. Preparo da lâmina

Espalhou-se uma pequena gota de albumina 50% (item 3.3.9) com o dedo sobre uma laminula. A laminula foi passada várias vezes sobre uma chama de bico de Bunsen para secar bem. Para a visualização de núcleos e conídios, a laminula foi pressionada sobre o material a ser analisado, enquanto que para a observação do tubo germinativo, conídios foram germinados em lâmina esterilizada contendo uma gota de meio mínimo líquido. O material foi fixado durante 1/2 hora em etanol: ácido acético na proporção de 3:1. A seguir a laminula foi fixada durante 5 minutos em álcool 95% e depois 20 minutos em álcool 70%. O material foi lavado 3 vezes em água destilada e hidrolizado em HCl 1N a 60 °C durante 7 minutos. Lavou-se por mais 3 vezes consecutivas em água destilada e uma vez em solução tampão fosfato pH 6,9 sendo a seguir efetuada a coloração do material.

3.5.3. Coloração

O material foi corado com 1 ml de solução corante Giemsa (item 3.3.10) e 9 ml de tampão fosfato pH 6,9 (item 3.4.1) durante 1/2 hora.

3.6. Medida do tamanho de conídios

Conídios provenientes de cultura de 10 dias de crescimento, foram colocados com o auxílio de palito de madeira em uma gota de água sobre uma lâmina e cobertos com laminula, e o diâmetro dos mesmos foi estimado com ocular micrométrica Carl Zeiss 4892628 (8x) em objetiva de 100x.

3.7. Crescimento e conidiação em diferentes meios de cultura

Foram feitas suspensões de conídios de diferentes linhagens em solução de "tween 80" (item 3.3.5) e com auxílio de uma alça de platina, os mesmos foram inoculados no centro de placas contendo meio mínimo (item 3.2.1) meio BDA (item 3.2.14) meio Corn Meal (item 3.2.15) e meio Sabouraud (item 3.2.16).

A variabilidade no crescimento apresentada pelas linhagens foi verificada através da medida do diâmetro

das colônias no 5^o, 7^o, 9^o e 11^o dias de crescimento.

Para se determinar a quantidade de conídios produzidos por linhagem em cada meio de cultura, 3 discos de 0,7 cm de diâmetro cada um, foram retirados de cada colônia no 11^o dia de crescimento e colocados em 2,5 ml de solução de "tween 80" a 0,1%, para desagregação dos conídios através de agitação. Os conídios foram contados em câmara de Neubauer e a produção estimada em relação à área da colônia.

3.8. Produção de exoenzimas (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975)

Suspensões de conídios provenientes de culturas de 10 dias de crescimento foram feitas em solução de "tween 80" a 0,1%, e com auxílio de uma alça de platina os conídios foram inoculados no centro das placas contendo meios com substratos específicos para a detecção da atividade exoenzimática. Após 7 dias de crescimento a 28^o C o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia foram medidos e calculado o índice de atividade enzimática (IE) através da relação:

$$IE = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro do halo}} \times 100$$

3.8.1. Detecção da atividade amilolítica

O inóculo foi feito no centro de placas contendo meio para detectar atividade amilolítica (item 3.2.9). Após 7 dias de crescimento, 10 ml de solução de iodo 1% (item 3.3.7) foram colocados sobre as colônias, a fim de revelar o halo de degradação do amido.

3.8.2. Detecção da atividade proteolítica

O inóculo foi feito em meio para detectar atividade proteolítica (item 3.2.10). Para revelação do halo de degradação de proteínas usou-se uma solução saturada de sulfato de amônia a qual formou um precipitado ao redor da colônia, tornando o halo mais claro e o ágar mais opaco.

3.8.3. Detecção da atividade lipolítica

O inóculo foi feito em meio para detecção de atividade lipolítica (item 3.2.11) e a revelação do halo de degradação pode ser evidenciada após 12 horas de permanência das placas em refrigerador a 4 °C.

3.9. Sobrevivência à luz ultravioleta (AZEVEDO & COSTA, 1973)

Foram feitas suspensões de conídios das linhagens em solução de "tween 80", e o número de conídios por ml desta suspensão foi estimado através da contagem dos mesmos em câmara de Neubauer. Essas suspensões foram diluídas em solução salina 0,85% até conter cerca de 10⁶ conídios/ml. Irradiou-se em placas de petri esterilizadas, sob luz ultravioleta de ondas curtas (5 Joules/m²/s) (Mineralight lamp model UVSL-25 115 volts 60H 0,16 Amps), no escuro. Diluições apropriadas para cada tempo de irradiação foram feitas em solução salina 0,85% e 0,1 ml foi semeado em placas de petri contendo meio completo. As placas foram incubadas a 28 °C durante 7 dias, e o número de colônias foi contado após esse período. O número de colônias obtidas no tempo zero de irradiação (controle) foi considerado como sendo 100% de sobrevivência. A porcentagem de sobrevivência para os demais tempos foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\overset{0}{n} \text{ de colônias}}{\overset{0}{n} \text{ de colônias no tempo 0}} \times 100$$

3.10. Sobrevivência à radiação Gama

Suspensões de conídios das linhagens foram feitas em solução de "tween 80" e o número de conídios/ml foi estimado em câmara de Neubauer. Essas suspensões foram diluídas em solução salina até conter aproximadamente 10⁶ conídios/ml. Estas foram submetidas a diferentes doses de radiação gama ⁶⁰Co, em uma taxa de dose de 550 Krad. Diluições apropriadas de cada dose foram feitas em solução salina e 0,1 ml foi semeado em placas contendo meio completo. As placas foram incubadas a 28^o C durante 7 dias. Após este período contou-se o número de colônias por placa e a curva de sobrevivência foi traçada considerando-se o número de colônias obtidas na dose 0 Krad (controle) de irradiação como sendo 100% de sobrevivência. Para a determinação da porcentagem de sobrevivência nas demais doses, procedeu-se como no item 3.9.

3.11. Sobrevivência ao ácido nitroso

Com o auxílio de câmara de Neubauer, foi estimado o número de conídios em uma suspensão feita em solução de "tween 80". Misturou-se 0,5 ml da suspensão em

0,33 ml de solução de nitrito de sódio a 0,5M e 9,17 ml de solução acetato pH 4,4.

Os frascos tratados e o controle foram colocados em banho-maria a 37 °C. Transferiu-se 1 ml do frasco controle para 9 ml de solução fosfato pH 7,0 e 1 ml do frasco tratado para solução fosfato em diferentes intervalos de tempo.

Diluíram-se convenientemente todas as amostras em solução fosfato e 0,1 ml das suspensões de cada intervalo de tempo foram semeadas em meio completo. Incubou-se a 28 °C e após 7 dias de crescimento contou-se o número de colônias. As placas controles foram consideradas como 100% de sobrevivência. Para a determinação da porcentagem de sobrevivência nos demais tempos de tratamento procedeu-se como no item 3.9.

3.12. Curva dose resposta ao fungicida Benomyl

Suspensões de conídios das linhagens selvagens provenientes de cultura de 10 dias de crescimento foram diluídas em solução salina e aliquotas de 0,1 ml semeadas em placas com meio completo contendo concentrações crescentes de Benomyl. Após 7 dias de incubação a 28 °C contou-se o número de colônias que se desenvolveram nestas

placas. Concomitantemente, inoculou-se, com um alça de platina, conídios em placas de meio completo com as mesmas concentrações crescentes de Benomyl. Foi calculada a dose de Benomyl necessária para inibir em 50% o crescimento das colônias.

3.13.Obtenção de mutantes auxotróficos

3.13.1.Método de inibição de colônias prototróficas pela nistatina (LAILLIER-ROUSSEAU, 1972)

Conídios foram tratados com luz ultravioleta na dose necessária para obter 1% de sobrevivência. Diluições apropriadas foram feitas e 0,1 ml dessas suspensões foi semeado em meio mínimo. As placas foram incubadas por 48 horas a 28 °C para iniciar a germinação dos conídios prototróficos. Uma fina camada de ágar contendo nistatina (100 µgr/ml de meio) (item 3.3.18) foi colocada sobre o meio mínimo. As placas foram mantidas no escuro durante 48 horas. A nistatina impede o desenvolvimento de colônias prototróficas que germinaram em meio mínimo. A seguir as placas foram expostas à luz e uma fina camada de meio completo foi adicionada. A nistatina em presença de luz é inativada e as colônias auxotróficas podem desenvolver em meio completo. Após 72 horas de crescimento as colônias visíveis no microscópio estereoscópico foram transferidas

para meio completo e posteriormente para meio mínimo em placas de 26 pontos a fim de verificar a presença de auxotróficos.

3.13.2.Método de filtração em meio mínimo líquido (CATCHESIDE, 1954)

Suspensões contendo 10^6 conídios/ml foram tratadas com luz ultravioleta na dose necessária para obter 5% de conídios sobreviventes. Após irradiação, 1 ml de suspensão foi inoculada em 5 frascos Erlenmeyer de 500 ml envoltos em papel alumínio contendo em cada um deles 100 ml de meio mínimo líquido. Após 24 horas de crescimento a 28°C sob agitação, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em quatro camadas de gase esterilizado. O mesmo procedimento foi repetido com 48 e 72 horas de incubação. O filtrado foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos. O precipitado foi então ressuspensionado em 3 ml de solução salina e 0,1 ml semeado em meio completo e incubado a 28°C durante 10 dias. As colônias foram transferidas para meio mínimo em placas com 26 pontos a fim de averiguar a presença de auxotróficos.

3.13.3.Método de isolamento total (PONTECORVO et alii, 1953)

Suspensões contendo 10^6 conídios/ml após

terem sido submetidas ao tratamento com os mutagênicos ultra violeta e raios gama, na dose necessária para obter 5% de colônias sobreviventes, foram diluídas e semeadas em meio completo. Depois de 10 dias de crescimento a 28 °C as colônias sobreviventes foram transferidas para meio mínimo em placas contendo 26 pontos e incubadas a 28 °C durante 10 dias.

O tratamento com o mutagênico ultravioleta foi conduzido no escuro, evitando assim, reparos no DNA.

3.14.Obtenção de mutantes morfológicos

Os mutantes morfológicos foram selecionados através de observação visual da morfologia alterada das colônia após tratamento com os mutagênicos ultravioleta e radiação gama.

3.15.Caracterização dos mutantes auxotróficos (AZEVEDO e COSTA, 1973)

Depois do tratamento com os mutagênicos, as colônias foram transferidas para placas contendo meio mínimo. Os pontos de meio mínimo contendo conídios que não germinaram (item 3.13) foram recortados e transferidos para meio completo.

Após 10 dias de crescimento a 28^o C, essas colônias foram analisadas quanto à auxotrofia através da transferência de conídios para placas contendo:

1. meio mínimo (MM) + 0,1 ml de caseína hidrolizada (item 3.3.2);
2. MM + 0,1 ml de solução de ácido nucleico (item 3.3.3) e
3. MM + 0,1 ml de solução de vitaminas (item 3.3.1).

O crescimento em uma destas placas indicou a deficiência de cada um dos mutantes. O conhecimento da deficiência nutricional específica só foi possível inoculando os conídios mutantes em:

- . MM + cada um dos aminoácidos separadamente, para as colônias que se desenvolveram na placa 1;
- . MM + cada um dos ácidos nucleicos separadamente, para as colônias que cresceram na placa 2 e
- . MM + cada uma das vitaminas, separadamente, para as colônias que cresceram na placa 3.

Para a caracterização dos duplos mutantes foi usada a metodologia descrita acima, acrescentando ao meio de caracterização o requisito nutricional referente à mutação simples.

3.16.Obtenção de mutantes resistentes à luz ultravioleta

Uma suspensão de conídios de 10^6 conídios/ml foi irradiada sob agitação com luz ultravioleta, durante 5 minutos. Posteriormente 1 ml da suspensão irradiada foi semeada em placas de meio completo e incubadas a 28°C durante 10 dias. As colônias sobreviventes foram novamente irradiadas em dose mais elevada e colônias mais resistentes foram isoladas. O procedimento foi repetido novamente com dose mais elevada.

Para confirmar a resistência à luz ultravioleta, suspensões destas colônias foram feitas e semeadas em meio completo, em uma diluição final de cerca de 50 a 100 conídios por placa. Metade da placa foi coberta com papelão preto (controle) e a outra metade foi irradiada com a dose para a qual ela é resistente. Após 7 dias de crescimento contou-se o número de colônias na parte submetida à irradiação e no controle. Em linhagens resistentes espera-se encontrar o mesmo número de colônias nas duas partes da placa.

3.17. Teste de reversão

As linhagens duplo mutantes foram ensaiadas quanto à reversão das marcas nutricionais. Para tanto, cerca de 10^7 conídios/ml foram semeados em meio mínimo e em meio mínimo com um dos requisitos nutricionais.

3.18. Teste de sintrofismo

Duas a duas, linhagens mutantes foram semeadas juntas (10^7 conídios/ml de cada linhagem) em meio mínimo para verificar a ocorrência de sintrofismo entre elas.

3.19. Determinação dos padrões eletroforéticos em gel de poliacrilamida (PACCOLA-MEIRELLES et alii, 1988)

3.19.1. Preparo das amostras

As linhagens foram cultivadas em meio completo líquido. Após 3 dias de crescimento a película formada foi lavada 3 vezes com água destilada em filtro Buchner à vácuo. Secou-se levemente o micélio com papel de filtro. O micélio foi triturado e posteriormente homogeneizado em tampão do gel empilhador gelado (item 3.4.4) (500 mg de micélio: 1 ml de tampão). Durante todo o

processamento, as amostras foram mantidas em gelo. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada durante 30 minutos à 18000 rpm. O sobrenadante foi coletado e parte dele foi misturado com o tampão da amostra (item 3.4.2) na proporção de 1:1 para aplicação no gel de poliacrilamida. O restante foi conservado a -20°C .

3.19.2.Preparo dos géis

O sistema usado foi o de placas verticais de 15 cm de largura, 16 cm de altura e 0,8 mm de espessura. Primeiro verteu-se o gel separador na placa (item 3.19.2.1), cobrindo-o com água para homogeneizar a polimerização. Uma vez polimerizado, a água foi retirada e verteu-se o gel empilhador (item 3.19.2.2) na placa. Antes deste gel sofrer polimerização, o pente foi introduzido com a finalidade de formar as canaletas onde posteriormente foram depositadas as amostras. Após completa e perfeita polimerização, este pente foi delicadamente retirado e as canaletas do gel lavadas com tampão eletrolito (item 3.4.5). A placa foi colocada em cuba de eletroforese vertical contendo tampão eletrólito (item 3.4.5) e a seguir as amostras foram aplicadas nas canaletas (50 ul por canaleta). Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, as canaletas foram completadas com o tampão eletrólito.

A corrida procedeu-se em refrigerador, inicialmente a uma voltagem de 100 V até a frente atingir o gel separador, logo após a voltagem foi alterada pra 200 V permanecendo até o final da corrida.

3.19.2.1. Gel separador a 10%

- . Tampão do gel separador(item 3.4.3) 3,0 ml
- . Solução de acrilamida(item 3.3.12) 10,0 ml
- . Persulfato de amônia 10% 0,225ml
- . TEMED 0,01 ml
- . Água desmineralizada 16,8 ml

3.19.2.2. Gel empilhador a 4%

- . Tampão do gel empilhador(item 3.4.4) 1,5 ml
- . Solução de acrilamida (item 3.3.12) 2,0 ml
- . Água desmineralizada 11,4 ml
- . Persulfato de amônia 10% 0,112ml
- . TEMED 0,015ml

3.19.3.Revelação das esterases

Após a corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da placa e colocado em cuba de plástico contendo 50 ml de solução reveladora (3.3.15) onde permaneceu até as

bandas aparecerem. A seguir, o gel foi lavado e fixado em solução aquosa de glicerol 10%.

3.19.4. Plastificação do gel

O gel foi envolvido em papel celofane molhado e com o auxílio de um bastidor de bordado esticou-se no máximo o papel contendo o gel. As bordas do papel foram coladas no bastidor e vários furos com agulha foram feitos a fim de escoar a água e secar rapidamente o gel. Quando completamente seco foi retirado e arquivado.

3.20. Análise genética

3.20.1. Obtenção de heterocário

Conídios provenientes de duas linhagens com marcas nutricionais complementares foram colocados em tubos contendo 2,5 ml de meio mínimo mais 4% de meio completo (item 3.2.6). Após 7 dias de incubação a 28 °C formou-se uma densa película a qual foi transferida para meio mínimo (item 3.2.1) em quatro pontos da placa, onde foi possível observar o crescimento irregular do heterocário após 20 a 25 dias de crescimento a 28 °C.

3.20.2.Obtenção do diplóide e de colônias recombinantes

Foram feitas suspensões de conídios provenientes do heterocário em solução de "tween 80", diluídas em solução salina 0,85% e semeadas em meio mínimo e em meios seletivos para as marcas envolvidas no cruzamento.

Em meio mínimo foram recuperados os diplóides e os recombinantes prototróficos, enquanto que os demais recombinantes foram recuperados nos meios seletivos.

3.20.3.Haploidização dos diplóides

Os diplóides foram inoculados em 4 pontos da placa de petri contendo meio completo e incubados a 28 °C durante 10 dias. Alguns diplóides liberaram setores os quais foram isolados e caracterizados quanto as marcas auxotróficas.

3.20.4.Análise dos produtos recombinantes

As colônias crescidas em meios seletivos foram transferidas para meio completo em placas com 26 pontos (placas mestras). O mesmo foi feito com os setores oriundos dos diplóides. Após 10 dias de crescimento a 28 °C,

essas colônias foram analisadas em meio mínimo, meio mínimo mais todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento, e meio mínimo mais todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento exceto aquele sob análise.

Com a finalidade de se descartar a hipótese de uma possível mistura de hifas entre as colônias recombinantes foram feitas suspensões de esporos das mesmas e semeadas em meio completo. Deste meio, 10 colônias monospóricas de cada recombinante foram retiradas sob microscópio estereoscópico e transferidas para meio completo em placas mestras. Estas foram novamente analisadas quanto à auxotrofia que deve seguir o mesmo padrão para as 10 colônias.

3.21. Produção de protoplastos (PARIS, 1977, modificado)

Cerca de 10^6 conídios/ml de uma suspensão em solução de "tween 80" foram inoculados em 50 ml de meio Sabouraud líquido em frascos de 125 ml. Os frascos foram incubados sob agitação (150 rpm) a 28°C durante 24 horas. Após este período, o conteúdo dos frascos foi centrifugado e lavado 3 vezes com estabilizador osmótico KCl/MgSO_4 pH 6,0 (item 3.4.8). O material foi pesado e pré-incubado a 28°C durante 1 hora no mesmo estabilizador na proporção de 50 mg

de micélio: 1 ml de estabilizador. Posteriormente foi adicionado o complexo enzimático para produção de protoplastos (item 3.3.16) na proporção de 1 ml do complexo para 50 mg de micélio. Incubou-se em agitador rotatório durante 2 horas e 30 minutos a 28 °C para que ocorresse a digestão enzimática da parede celular. Após este período amostras foram retiradas e observadas em microscópio óptico a fim de constatar a presença de protoplastos. Depois de protoplastizada, efetuou-se a filtração em filtro de nylon de 3 camadas. O filtrado foi centrifugado durante 10 segundos para retirada da enzima e o sobrenadante centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm. O precipitado foi ressuspensionado em KCl/MgSO₄ 0,05M pH 6,0 (item 3.4.8) e novamente centrifugado. Esta operação foi repetida por mais duas vezes. Finalmente o precipitado foi ressuspensionado neste mesmo estabilizador osmótico e os protoplastos contados em câmara de Neubauer no microscópio óptico.

3.22.Regeneração dos protoplastos

Os protoplastos obtidos segundo o item 3.21 foram diluídos em KCl/MgSO₄ 0,05M pH 6,0 (item 3.4.8).

Distribuiu-se cerca de 10 ml de meio com estabilizador osmótico (item 3.2.6) em placas de petri. Depois de solidificado e seco, 0,1 ml da suspensão de

protoplastos foi colocada sobre este meio sólido, e coberta com 5 ml de meio semi sólido completo 0,5% contendo estabilizador osmótico (item 3.2.8). O mesmo procedimento foi utilizado usando-se meio completo sem estabilizador osmótico (controle).

A contagem das colônias desenvolvidas no meio controle indicou o número de conídios e fragmentos viáveis de hifas presentes na solução, enquanto que em meio completo mais estabilizador osmótico 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:

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

$a = n^{\circ}$ de colônias crescidas em meio completo com estabilizador osmótico

$b = n^{\circ}$ de colônias crescidas em meio completo

$c = n^{\circ}$ de protoplastos da suspensão

3.23.Fusão de protoplastos

Os protoplastos de duas linhagens contendo marcas nutricionais complementares obtidos segundo o item 3.21, foram misturados em quantidades iguais (cerca de 10⁶ protoplastos/ml), centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos e lavados 2 vezes em KCl/MgSO₄ 0,05M pH 6,0. O precipitado foi ressuspensão em 1 ml de polietileno glicol (PEG) (item 3.3.17) a 28^o C e mantido nessa temperatura durante 10 minutos. Após este período, adicionou-se o mesmo estabilizador e centrifugou-se por 10 minutos a 3000 rpm. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Ressuspendeu-se o precipitado em 1 ml de KCl/MgSO₄ 0,05M pH 6,0 e diluições apropriadas foram feitas neste mesmo estabilizador osmótico. Cerca de 0,1 ml da suspensão foi colocada em placas contendo meio mínimo mais estabilizador osmótico (item 3.2.7) e cobriu-se com cerca de 5 ml de meio mínimo semi-sólido (item 3.2.8). O mesmo foi feito com meio mínimo sem estabilizador osmótico. Após 10 a 15 dias de crescimento foi possível o isolamento dos produtos de fusão.

3.24.Análise dos produtos de fusão

Os possíveis diplóides oriundos de fusão foram ensaiados quanto à instabilidade em meio completo. Os setores originados neste meio foram isolados e

caracterizados segundo a metodologia descrita no item 3.18.4. Mediu-se o diâmetro dos conídios desses diplóides, assim como determinou-se o padrão de esterases dos mesmos, e de alguns recombinantes.

3.25. Efeito de mutantes resistentes à luz ultravioleta sobre lagartas da broca da cana

Mutantes resistentes à luz ultravioleta foram obtidos como descrito no item 3.16.

Após 15 dias de crescimento em meio BDA, suspensões de esporos foram feitas em água destilada contendo 0,1% de "tween 80" e ajustadas para a concentração de 10^7 conídios/ml.

Lagartas de Diatraea saccharalis foram submetidas a uma lavagem com água destilada esterilizada e em seguida imersas nos seguintes tratamentos:

Tratamento 1 - suspensão de conídios da linhagem 196

Tratamento 2 - suspensão de conídios da linhagem 256

Tratamento 3 - suspensão de conídios do
mutante 196/R₁, resistente
à luz ultravioleta

Tratamento 4 - suspensão de conídios do
mutante 256/R₁, resistente
à luz ultravioleta

Tratamento 5 - solução sem patógeno
(testemunha)

As lagartas tratadas por imersão nas suspensões foram colocadas em placas de petri contendo pedaços de colmo de milho como alimento e incubadas a 28 ± 2 °C, umidade relativa $70 \pm 10\%$. As leituras de mortalidade foram efetuadas diariamente até um total de 20 dias. Foram consideradas como parasitadas pelo patógeno, as lagartas que apresentaram exteriorização das estruturas fúngicas.

3.26. Análises estatísticas

Dependendo do experimento foram feitas análises de variância, teste do χ^2 e o teste de Tukey, para comparar médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Manutenção das linhagens de B. bassiana.

A virulência do fungo e a suscetibilidade a um determinado hospedeiro são os requisitos primários para o emprego de um entomopatôgeno como inseticida biológico. A virulência não só depende da seleção de linhagens estáveis e eficazes bem como das condições em que o fungo é mantido e cultivado. Uma linhagem mesmo sendo eficiente, pode sofrer perdas na virulência dependendo dos processos de cultivo, aplicação e estocagem a que ela foi submetida.

Além do uso de linhagens multispóricas geneticamente não uniformes (AL-AIDROOS & SEIFFERT, 1980; HALL, 1980 e SAMSINAKOVA et alii, 1981), repiques sucessivos em meios sintéticos levam a uma atenuação da virulência (KAWAKAMI, 1960; HALL, 1980 e FARGUES, 1972) e diminuição na capacidade de esporulação como observado no presente trabalho. Estas propriedades se mantêm quando o fungo é inoculado na lagarta e reisolado sendo esta também, uma das maneiras de conservar um fungo entomopatôgeno. A Figura 2

mostra este tipo de manutenção. As lagartas inoculadas com B. bassiana foram mantidas em placas de petri contendo colmo de milho como alimento, e umidade suficiente para a esporulação. Após 5 a 6 dias de incubação à temperatura ambiente a superfície das larvas estavam totalmente cobertas de conídios que foram isolados e purificados em meio BDA (item 3.2.14). As lagartas contaminadas foram assim mantidas sob refrigeração à 4 °C e quando necessário novo isolamento foi feito.

O reisolamento e purificação do fungo muitas vezes torna-se trabalhoso devido a presença de outros fungos e bactérias presentes na lagarta.

Um outro procedimento que foi considerado mais prático para a conservação da capacidade de esporulação de B. bassiana, foi o cultivo em meios contendo macerado de lagartas ou as lagartas esterilizadas, como descrito no item 3.2.13 e ilustrado na Figura 3.

Figura 2 - Lagartas de Diatraea saccharalis (1) e Castnia licus (2) infectadas com B. bassiana.

Os isolados foram inoculados em meio mínimo (item 3.2.1) ou meio ágar-água contendo extrato esterilizado de Diatraea saccharalis; meio mínimo ou ágar-água contendo lagartas esterilizadas. Os controles foram o meio mínimo e o meio ágar-água. Neste último não foi verificado qualquer crescimento devido, sem dúvida, à falta de fontes de carbono e de nitrogênio, necessárias para germinação e crescimento do fungo.

Nos demais meios o fungo recuperou seu crescimento e esporulação normal, mesmo quando inoculado em meio ágar-água contendo ou a lagarta inteira ou o extrato da mesma. Assim sendo esta metodologia de manutenção dos isolados se mostrou mais conveniente e menos trabalhosa que aquela representada na Figura 2, uma vez que não há necessidade do reisolamento e purificação do fungo, pois o procedimento se desenvolve em condições de completa esterilidade.

Deve ser salientado que nenhum teste para verificar a manutenção da virulência foi realizado nos isolados mantidos nesses meios. Apenas observou-se a recuperação da esporulação que em B. bassiana diminui consideravelmente após repiques sucessivos em meios sintéticos.

SCHAERFFENBERG (1964) verificou que esporos

de B. bassiana retém a virulência até 16 repiques contínuos desde que cultivado em condições ótimas. A partir do 16^o repique a virulência diminuiu consideravelmente, já HALL (1980) observou alterações morfológicas em Verticillium lecanii após várias subculturas em meios sintéticos sem no entanto alterar a virulência deste fungo. Este mesmo autor observou uma tendência de reversão para a morfologia original, após a passagem do fungo pelo inseto.

No presente trabalho optou-se pela manutenção dos isolados em meio ágar-água acrescido de lagartas inteiras.

Alteração na virulência destes isolados assim conservados deveria ser averiguada em estudos posteriores uma vez que um aumento na infectividade de fungos entomopatogênicos foi observado em outros métodos como exposição à substâncias químicas, fatores físicos e crescimento em meios de cultura simulando ambientes naturais, como a superfície do inseto (LEOPOLD et alii, 1973¹, citado por SAMSINAKOVA & KALALOVA, 1983; CHAMPLIN et alii, 1981) e culturas monospóricas (SAMSINAKOVA & KALALOVA, 1983).

¹ LEOPOLD, J. SAMSINAKOVA, A. & MISIKOVA, S. Der enzymatische charakter der durch den entomophagen Pilz Beauveria bassiana sezernieren toxischen stoffe und die stimulation ihrer Bildung. Zentralbl. Bakteriол. Parapitenkd. infektienskr. Abt. 2: 128: 31-41.

4.2. Caracterização dos isolados de B. bassiana

Uma triagem dos isolados utilizados no trabalho foi feita de acordo com a taxa de crescimento e conidiação, produção de exoenzimas, sensibilidade ao fungicida Benomyl e diferenças nos padrões eletroforéticos para esterases.

4.2.1. Crescimento radial e conidiação em diferentes meios de cultivo

Os isolados 61, 196, 252, 246 e 256 de Beauveria bassiana foram inoculados no centro de placas de petri contendo os seguintes meios de cultura: meio mínimo (item 3.2.1), meio Corn meal (item 3.2.15), meio BDA (item 3.2.14) e meio Sabouraud (item 3.2.16), como descrito no item 3.7.

Os valores dos diâmetros médios das colônias no 5^o, 7^o, 9^o e 11^o dias de crescimento encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Diâmetro médio das colônias de 5 isolados de Beauveria bassiana em 4 meios de cultivo no 5^o, 7^o, 9^o e 11^o dias de crescimento (Média de 5 repetições).

(1)																
Meios		BDA				SB				MM				CM		
Isolados	5o	7o	9o	11o	5o	7o	9o	11	5o	7o	9o	11o	5o	7o	9o	
61	1,75	2,88	3,80	5,75	1,50	2,21	2,64	3,50	0,76	1,20	1,76	2,85	1,50	2,37	3,45	4
196	1,73	2,69	3,74	5,63	1,27	1,72	2,20	3,18	0,60	1,17	1,82	2,90	1,60	2,62	3,68	5
252	1,75	2,56	3,36	5,70	1,23	1,73	2,26	3,15	0,54	1,04	1,53	2,20	1,66	2,89	3,94	5
246	1,62	2,50	3,35	4,98	1,33	1,88	2,50	3,62	0,70	1,46	2,17	3,31	1,56	2,39	3,48	5
256	1,50	2,26	3,06	4,92	1,01	1,44	1,71	2,44	0,62	0,94	1,36	2,19	1,32	2,02	2,93	4

(1)

BDA = Meio Batata dextrose ágar

SB = Meio Sabouraud

MM = Meio Mínimo de Pontecorvo

CM = Meio Corn Meal

A Figura 4 mostra o crescimento de cada um dos diferentes isolados nos meios de cultura ensaiados, enquanto que a Figura 5 permite uma comparação do crescimento entre os mesmos isolados nos 4 meios de cultivo.

Os resultados da análise da variância para o caráter diâmetro da colônia se encontram na Tabela 5.

Figura 4 - Crescimento de cada isolado de *B. bassiana* nos 4 meios de cultivo

Figura 5 - Comparação do crescimento dos 5 isolados de *B. bassiana* em cada meio de cultivo

Tabela 5 - Análise da variância para o caráter diâmetro de colônias de 5 isolados de B. bassiana em 4 meios de cultivo no 11^o dia de crescimento.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Bloco	4	0,12219	0,0305475	0,58
meio	3	128,6368	42,8796	816,01**
Linhagem	4	8,79952	2,19988	41,86**
Linhagem x Meio	12	9,97618	0,8313483	15,82**
Resíduo	76	3,99361	0,0525475	
Total	99	151,5303		

**
significativo ($p < 0,01$)

Tabela 6 - Comparação das médias de 5 isolados de *B. bassiana* no 11^o dia de crescimento, para o caráter diâmetro das colônias em diferentes meios de cultura, através do teste de Tukey ($p < 0,01$). (Isolados seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si).

Isolados	Isolado/MM	Isolado/BDR	Isolado/CM	Isolado/S
196a	246a	61a	252a	246a
246a	196ab	196a	196a	61ab
61a	61b	246b	246b	196ab
252b	252c	256b	61c	252b
256c	256c	252b	256c	256c

Tabela 7 - Comparação do crescimento no 11^o dia de cultivo em 4 meios de cultura entre 5 isolados de B. bassiana, através do teste de Tukey ($p < 0,01$). (Meios seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si).

meios	meio/196	meio/61	meio/252	meio/246	meio/256
BDAa	CMa	BDAa	CMa	CMa	BDAa
CMb	BDAa	CMb	BDAb	BDAa	CMa
SBc	SBb	SBc	SBc	SBb	SBc
MMd	MMb	MMd	MMd	MMb	MMc

O crescimento radial foi significativamente diferente entre os isolados e entre os meios ensaiados (Tabela 5). De forma geral os isolados 196, 246 e 61 foram os que cresceram melhor em todos os meios (Tabela 6) com exceção do meio Corn Meal onde o maior crescimento foi verificado pelo isolado 252. O menor crescimento verificado foi o do isolado 256 (Figuras 4 e 5). O cruzamento entre estes isolados de maior e menor crescimento, possibilitaria o conhecimento da natureza genética dessa variação.

Quanto aos meios de cultura, todos apresentaram resultados diferentes estatisticamente (Tabela 7). Os meios BDA e CM foram os que proporcionaram melhor crescimento para todos os isolados, seguindo os meios SB e MM. Estes resultados se devem provavelmente a diferenças no tipo e na quantidade de fonte de carbono e nitrogênio utilizáveis pelo fungo em cada meio de cultura.

MONTEIRO (1988) analisou o comportamento de isolados de M. anisopliae, B. bassiana e P. marquandii em meio completo, meio completo-amido; BDA, meio de arroz, meio de aveia e meio mínimo. Em concordância com os resultados aqui obtidos, o autor observou variação no crescimento e esporulação entre espécies, entre isolados da mesma espécie e entre os meios ensaiados, sendo o meio completo com amido como fonte de carbono o que se mostrou

mais favorável ao crescimento e esporulação de B. bassiana, porém a melhor germinação foi obtida em meios contendo glicose como fonte de carbono.

Pode ser observado pela Figura 5 e pela Tabela 7 que os isolados comportam-se de maneiras distintas frente aos diferentes meios. O isolado 61 cresce melhor em BDA, o isolado 252 em CM enquanto os isolados 196, 246 e 256 crescem de forma similar em CM e BDA.

O crescimento radial é característico de cada isolado. Eles responderam distintamente quando cultivados em um mesmo meio de cultura (Tabela 6 e Figura 5).

Como descrito no item 3.7, a produção de conídios dos 5 isolados foi estimada em relação à área da colônia no 11^o dia de crescimento. Na Tabela 8 podem ser visualizados os resultados da produção média de conídios destes isolados em 4 meios de cultivo. A Figura 6 permite uma comparação da produção de conídios de cada isolado nos 4 meios de cultivo, enquanto que a Figura 7 permite observar o comportamento para o mesmo carater, em um mesmo meio.

Os resultados da análise de variância para o carater produção de conídios são vistos na Tabela 9. A comparação das médias entre isolados e entre meios de cultura pode ser visualizada nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

Tabela 8 - Produção de conídios ($N \times 10^6$) de 5 isolados de B. bassiana em 4 meios de cultivo. Média de 3 repetições.

Meio Isolado	MM	CM	BDA	SB
61	122.56	18.24	361.11	272.04
196	132.50	62.35	163.99	149.64
252	11.87	40.53	74.88	12.97
246	111.04	31.90	11.01	36.65
256	86.57	27.87	303.50	270.85

MM = Meio Mínimo

CM = Corn Meal

BDA = Batata dextrose ágar

SB = Sabouraud

Figura 6 - Comparação da produção de conídios de 5 isolados de *B. bassiana* em 4 meios de cultivo.

MM = Meio Mínimo; CM = Meio Corn Meal; BDA = Meio Batata Dextrose Agar; SB = Meio Sabouraud

Figura 7 - Comparação do comportamento de 5 isolados de *B. bassiana* em cada meio de cultivo, para o caráter produção de conídios ($N \times 10^6$).

MM = Meio Mínimo; CM = Meio Corn Meal; BDA = Meio Batata Dextrose Agar; SB = Meio Sabouraud

Tabela 9 - Análise de variância para o caráter produção de conídios de 5 isolados de B. bassiana (dados previamente transformados para a escala logarítmica)

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F	CV
Bloco	2	0.0225	0.0113	0.3423	4.76%
Linhagem	4	5.2792	1.3198	40.1139	**
Meio	3	2.3194	0.7731	23.4986	**
Linhagem x meio	12	6.0351	0.5029	15.2859	**
Resíduo	38	1.2502	0.0329		
TOTAL	59	14.9064			

**
significativo ($p < 0,01$)

Tabela 10 - Comparação das médias em 4 meios de cultivo para o caráter produção de conídios em 5 isolados de B. bassiana (isolados dentro de meios de cultura). (1)

Isolados	I/meioBDA	I/meioSB	I/meioMM	I/meioCM
61a	61a	61a	196a	196a
256a	256a	256a	61a	252ab
196a	196ab	196a	246a	246ab
246b	252b	246b	256a	256b
252b	246c	252c	252b	61b

(1) Isolados seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 11 - Comparação das médias de 5 isolados de B. bassiana para o caráter produção de conídios em 4 meios de cultivo (meio dentro de isolados. (1)

Meio	Meio/61	meio/256	meio/196	meio/246	meio/252
BDAa	BDAa	BDAa	BDAa	MMa	BDAa
SBab	SBa	SBa	SBa	SBb	CMa
MMb	MMb	MMb	MMab	CMb	SBb
CMc	CMc	CMc	CMb	BDAc	MMb

(1) Isolados seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Pelas Tabelas 10 e 11 e Figuras 6 e 7 foram observadas diferenças significativas no número de conídios produzidos pelos isolados nos diferentes meios. Em meio BDA os isolados 61, 256 e 196 se comportam de maneira semelhante, enquanto que o 252 e 246 são significativamente diferentes. O mesmo se repete no meio SB. Em meio mínimo apenas o 252 apresentou diferença na taxa de conidiação e em CM o isolado 196 foi diferenciado do 256 e do 61 mas semelhanças foram notificadas entre estes e os isolados 246 e 252.

De forma geral, os isolados 196, 256, 252 e 61 esporulam melhor em meio BDA, enquanto que o isolado 246 produziu mais conídios em MM.

O caráter produção de conídios e crescimento radial é utilizado aqui como um teste para diferenciar e caracterizar os isolados de B. bassiana. Pelos resultados obtidos observamos diferenças significativas entre os isolados, caracterizando a variabilidade existente entre eles.

O crescimento radial significativamente diferente entre isolados pode expressar hábitos ou magnitudes de crescimento diferentes, mas de modo geral não está correlacionado com a produção de conídios. O diâmetro

da colônia não está necessariamente ligado ao crescimento total da linhagem, e sim ao seu hábito de crescimento (VALE, 1984). Certas linhagens de fungos podem apresentar crescimento radial inferior, porém o desenvolvimento micelial ser preferencialmente aéreo.

As diferenças encontradas em um mesmo isolado quando cultivado em meios diferentes se deve à diversidade e quantidade de nutrientes existentes nesses meios.

SAMSINAKOVA (1966) obteve lento crescimento, mas rápida conidiação em B. bassiana usando baixas concentrações de substâncias inorgânicas. Em altas concentrações destes nutrientes foi verificado bom crescimento mas a produção máxima de esporos foi retardada.

O metabolismo de carboidratos está ligado ao processo de conidiação consequentemente, respostas distintas devem ser encontradas para diferentes fontes de carbono. CAMPBELL et alii (1983) ensaiaram 22 mono e oligossacarídeos como fontes de carboidratos em B. bassiana e M. anisopliae e concluíram que estes dois entomopatógenos são distintos da maioria dos fungos quanto ao padrão de utilização de carbono.

Quanto à utilização de nitrogênio, BARNES et

alli (1975) determinaram o crescimento e conidiação nestes mesmos fungos em várias fontes de peptona e muitas induziram bom crescimento e esporulação, o mesmo sendo observado por CAMPBELL et alii (1978) quando utilizaram vários aminoácidos e aminas como fontes de nitrogênio.

MONTEIRO (1988) observou aumento significativa na produção de conídios de B. bassiana quando amido foi utilizado como fonte de carbono.

Assim sendo, as diferenças observadas dentro de isolados nos meios de cultivo estão relacionadas com a divergência no conteúdo nutricional de cada meio utilizado enquanto que diferenças entre isolados podem ser consideradas como sendo devido a variabilidade genética peculiar a cada um.

A Tabela 12 mostra de forma resumida o meio mais adequado para o crescimento e conidiação de cada isolado, enquanto que a Tabela 13 indica os isolados que tiveram melhor taxa de crescimento e conidiação em cada meio de cultivo.

Tabela 12 - Meios de cultivo que proporcionaram melhores taxas de crescimento e conidiação em 5 isolados de B. bassiana.

<u>Isolados</u>	196	252	256	246	61
<u>Crescimento</u>	BDA;CM	CM	BDA;CM	BDA;CM	BDA
<u>Conidiação</u>	BDA;SB;MM	BDA;CM	BDA;SB	MM	BDA;SB

MM = Meio Mínimo; CM = Meio Corn Meal; BDA = Meio Batata Dextrose Agar; SB = Meio Sabouraud

Tabela 13 - Isolados de B. bassiana que apresentaram melhores taxas de crescimento e conidiação em 4 meios de cultivo.

<u>Meios</u>	MM	BDA	SB	CM
<u>Crescimento</u>	246;196	61;196	246;61;196	252;196
<u>Conidiação</u>	196;61;246;256	61;256;196	61;196;256	196;252;246

MM = Meio Mínimo; CM = Meio Corn Meal; BDA = Meio Batata Dextrose Agar; SB = Meio Sabouraud

4.2.2. Curva dose-resposta ao fungicida Benomyl

A sensibilidade dos cinco isolados ao fungicida Benomyl foi averiguada conforme descrito no item 3.12.

O número de esporos que germinaram nos meios contendo doses crescentes deste fungicida e o diâmetro médio das colônias nestas doses foi estimado com 7 dias de crescimento, e as respectivas médias se encontram nas Tabelas 14 e 15. As curvas dose-respostas são visualizadas na Figura 8.

Os defensivos químicos largamente utilizados na agricultura causam uma série de efeitos desfavoráveis na germinação, crescimento e esporulação de fungos entomopatogênicos, como relatado por HALL e DUNN (1959); CADATAL e GABRIEL (1970) e SOPER et alii (1974) em Entomophthora sp., por IGNOFFO et alii (1975) em N. rileyi; por BAJAN et alii (1977) em Paecilomyces farinosus e por BAJAN et alii (1977) e GARDNER et alii (1979) em B. bassiana.

Apesar dos efeitos desfavoráveis, o uso integrado destes defensivos com produtos biológicos vem sendo utilizado com sucesso. Como exemplo pode ser citado o

controle de Cydia pomonella, praga da macieira onde SIKURA e ZHIGAEV (1972) testaram uma mistura do produto russo Boverin e inseticidas, o que permitiu uma redução de 10 vezes a quantidade de produto químico normalmente requerido. Segundo LORIA et alii (1983) a compatibilidade de fungos entomopatogênicos com defensivos utilizados no sistema de proteção de culturas é de importância, uma vez que estes fungos têm potencial para serem empregados no controle de insetos.

GARDNER et alii (1979) estudaram o efeito de fungicidas sobre B. bassiana, entre eles o Benomyl (Benomyl). Alguns mostraram um efeito inibidor na germinação e no crescimento do fungo. Na concentração de 0,40% de Benomyl, verificou-se inibição completa deste fungo.

No presente trabalho, a dose de Benomyl necessária para inibir a germinação e o crescimento do fungo variou entre os isolados. De forma geral, a dose necessária para inibição total da germinação foi 4 µg/ml.

Por comparação das médias (Tabela 14), os isolados podem ser agrupados quanto a sensibilidade ao Benomyl durante a germinação, em ordem decrescente de resistência: 256, 196, 61, 252, 246.

A sensibilidade ao Benomyl, estimada através do crescimento radial da colônia (Tabela 15) também acusou diferenças entre os isolados. Estas diferenças foram verificadas apenas na dose 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Aqui também, os isolados puderam ser agrupados em ordem decrescente de resistência: 252 e 196; 256; 61 e 246.

Se compararmos as respostas de crescimento e de germinação em presença de Benomyl, observamos que não existe correspondência entre os isolados para estes dois caracteres, ou seja, a maior resistência durante a germinação não implica em melhor crescimento.

Como pode ser visto pelo teste de comparação de médias da Tabela 15, os isolados não diferiram entre si quanto ao diâmetro da colônia até a dose de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que no processo de germinação, as diferenças podem ser visualizadas nas doses de 1,0 e 1,5 $\mu\text{g/ml}$, nas precedentes as médias não diferiram entre si.

A dose (4 $\mu\text{g/ml}$) de Benomyl necessária para inibir a germinação e crescimento de B. Bassiana foi equivalente àquela estabelecida por GARDNER et alii (1979).

Tabela 14 - Sensibilidade ao Benomyl em 5 isolados de B. bassiana estimada através do número de conídios ($N \times 10^5$) germinados em doses crescentes deste fungicida (média de 2 repetições).

Isolados Doses ($\mu\text{g/ml}$)	256	246	61	196	252
0	45,50 ¹ _b	66,00 _a	16,65 _c	46,80 _{ab}	25,00 _c
1,0	30,45 _{ab}	28,50 _{abc}	14,65 _c	41,80 _a	19,65 _c
1,5	18,15 _a	0,00	6,30 _b	2,00 _{bc}	3,00 _{bc}
2,0	2,00 _a	0,00	0,55 _a	1,00 _a	0,65 _a
2,5	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00
4,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

¹ : Para análise da variância os dados foram transformados ($\sqrt{x+1}$).

Médias na horizontal seguidas de letras iguais, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05\%$).

Tabela 15 - Sensibilidade ao Benomyl estimada através da medida do diâmetro da colônia (cm) em 5 isolados de B. bassiana (média de 4 repetições).

Isolados Doses ($\mu\text{g/ml}$)	256	196	252	246	61
0	3,40a ¹	3,65a	3,24a	3,28a	3,84a
1,0	3,01a	2,98a	2,99a	2,45a	2,62a
1,5	0,75a	1,02a	0,80a	0,54a	0,55a
2,0	0,62a	0,72a	0,74a	0,48a	0,40a
2,5	0,25b	0,68ab	0,73a	0,00	0,00
4,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

¹ : Para análise de variância os dados foram transformados ($\sqrt{x+1}$).

Médias na horizontal seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 8 - Curva dose-resposta ao fungicida Benomyl do isolados 196, 256, 246, 252 e 61 de B. bassiana.

4.2.3. Produção de exoenzimas

Seguindo-se a metodologia descrita no item 3.8 obteve-se o diâmetro das colônias e dos halos de degradação para amilase, lipase e protease, e com base nestes pode-se calcular o índice de atividade enzimática, cujos resultados podem ser visualizados na Tabela 16.

Os resultados aqui obtidos evidenciaram diferenças entre os isolados utilizados.

Além deste teste auxiliar na caracterização dos isolados (LEITE & MESSIAS, 1984) e agrupamento dos mesmos de acordo com suas similaridades, ele pode ajudar na compreensão das relações patógeno-hospedeiro, uma vez que a penetração do fungo do tegumento do inseto é facilitada por atividades mecânicas e enzimáticas. ZACHARUK (1970 a e b) estudando a infecção de M. anisopliae em larvas de Elateridae (Coleoptera) concluiu que a penetração na epicutícula foi de natureza enzimática mas iniciada por atividade mecânica. Assim, é bem discutido o papel das enzimas extracelulares como lipase, quitinase e protease durante a penetração no hospedeiro (SAMSINAKOVA & MISIKOVA, 1973; ROSATO et alii, 1981; SMITH et alii, 1981; SMITH & GRULA, 1983).

Tabela 16 - Índice da atividade enzimática para os isolados de B. bassiana (média de 4 repetições) e respectivos teste de médias (1)

Enzimas Isolados	amilase	protease	lipase
256	0.73 c	0.45 c	0.55 b
252	0.74 bc	0.47 c	0.59 ab
61	0.80 bc	0.58 b	0.65 a
196	0.83 b	0.80 a	0.55 b
246	1.00 a	(2) (-)	0.46 c

(1) médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente através do teste de Tukey ($p < 0,05$).

(2) não realizado.

Os resultados da literatura são conflitantes quando se relaciona a produção destas enzimas com patogenicidade. Assim, certas pesquisas detectaram correlação positiva para atividade lipolítica (PARIS & FERRON, 1979; AL-AIDROOS & SEIFFERT, 1980 e SILVA & MESSIAS, 1986), atividade amilolítica (AL-AIDROOS & SEIFFERT, 1980 e SILVA & MESSIAS, 1986) e proteolítica (CHEUNG & GRULA, 1982), enquanto que outras demonstraram correlação negativa para algumas destas enzimas (PEKRUL & GRULA, 1979; CHAMPLIN et alii, 1981; SMITH et alii, 1981 e SMITH & GRULA, 1983).

Pelos resultados apresentados na Tabela 16, pode-se verificar a variabilidade no padrão de produção dessas enzimas, e agrupar os isolados de acordo com esse padrão. Assim, a classificação em ordem decrescente para produção de amilase, seria: 256; 252 e 61; 196; 246. Para protease: 256 e 252; 61; 196. Para lipase: 246; 256 e 196; 252; 61. De forma geral, o isolado 256 apresentou maiores taxas na produção destas 3 exoenzimas.

MONTEIRO (1988) empregando a mesma metodologia observou diferenças nas atividades exoenzimáticas para 2 isolados de B. bassiana oriundos da região de Manaus. Os índices enzimáticos para amilase observados por esse autor foram de 0,74 e 0,83, para protease 0,65 e 0,68 e para lipase 0,67 e 0,73 ou

seja, bem semelhantes com os resultados obtidos no presente trabalho.

Em estudos posteriores, seria interessante averiguar a correlação entre a produção destas e outras enzimas, com a virulência nestes isolados, como vem sendo discutido por outros autores.

4.2.4. Padrão eletroforético para esterases

O padrão eletroforético para esterases nos isolados de B. *bassiana* foi determinado de acordo com a metodologia apresentada no item 3.19 e a Figura 9 ilustra os resultados obtidos.

De forma geral os isolados apresentam padrões distintos no número e mobilidade de bandas. Esta variabilidade observada permitiu ao lado das outras técnicas já discutidas, caracterizar e diferenciar os isolados de B. *bassiana*, agrupando-os de acordo com suas similaridades.

A caracterização eletroforética é atualmente indispensável em um programa de melhoramento, pois possibilita acusar diferenças entre isolados morfológicamente semelhantes, com facilidade, segurança e rapidez nos resultados.

O polimorfismo ao nível das esterases foi observado por TIGANO (1985) onde descreve a heterogeneidade das alfa-esterases entre várias fontes de B. bassiana isoladas de insetos pertencentes à família Miridae.

A variabilidade aqui observada não só pelo padrão de esterases, como nos demais testes poderia ser esperada, uma vez que estes isolados são oriundos de diferentes hospedeiros em distantes regiões do país (Tabela 2).

Com base nessa variabilidade e na heterogeneidade resumida na Tabela 17, foram escolhidos 2 isolados, o 196 e 256 para condução dos estudos genéticos neste fungo.

1 2 3 4 5

1 2 3 4 5

1 - 256

3 - 246

5 - 252

2 - 196

4 - 61

Figura 9 - Padrão eletroforético de esterases dos isolados de *B. bassiana* em gel de poliacrilamida.

Tabela 17 - Comportamento dos 5 isolados de B. bassiana quanto ao crescimento, esporulação, produção de exoenzimas e sensibilidade ao Benomyl.

		196	256	252	246	61
C R E S C I M E N T O	melhor	CM	BDA	CM	CM	BDA
	meio	BDA	CM		BDA	
	A V A L I A Ç A O	BDA	+++	++	++	+++
		CM	+++	+	+++	++
		SB	++	+	+++	++
E S P O R U L A Ç A O	melhor	BDA	BDA	BDA	MM	BDA
	meio	SB MM	SB	CM		SB
	A V A L I A Ç A O	BDA	+++	++	+	+++
		CM	+++	+++	+++	++
		SB	+++	+	++	+++
P R O D U Ç Ã O I M D A E S		MM	+++	++	+++	+++
	amilase	++	+++	++	+	++
	protease	+	+++	+++	-	++
	lipase	++	++	+	+++	+
SENS. AO BENLATE		cresc.	+	++	+	+++
		germ.	++	+	++	+++

+ --> índice mais baixo
 ++ --> índice médio
 +++ --> índice mais alto
 - --> não realizado

4.3. Observação dos conídios e emergência do tubo germinativo de B. bassiana.

A técnica utilizada para a coloração nuclear de conídios e tubos germinativos está descrita no item 3.5.

Os conídios de B. bassiana são uninucleados (Figura 10), como descrito para a espécie B. tenella (PARIS, 1977).

A emergência do tubo germinativo pode ser visto com 18 horas de incubação em Meio mínimo a 28 °C (Figura 11). Com 24 horas o tubo germinativo se torna proeminente (Figura 12) e a primeira divisão nuclear foi constatada nas observações feitas com 36 horas de incubação (Figura 13).

A condição uninucleada dos conídios é bastante desejável para estudos genéticos, pois facilita a obtenção de mutantes estáveis. O conhecimento do tempo necessário para que ocorra a emergência do tubo germinativo e para que ocorra a primeira divisão mitótica do núcleo foi importante nos estudos posteriores de obtenção, regeneração e fusão de protoplastos, como será discutido no item 4.7.

Figura 10 - Conídios uninucleados da linhagem 196 de B.
bassiana (1000x), com 7 dias de crescimento.

Figura 11 - Emersão do tubo germinativo da linhagem 196 de B. bassiana após 18 horas de incubação (1000x).

Figura 12 - Tubo germinativo da linhagem 196 de B. bassiana após 24 horas de incubação (1000x).

Figura 13 - Tubo germinativo da linhagem de B. bassiana após 36 horas de incubação. O núcleo sofreu a primeira divisão mitótica (1000x).

4.4. Curvas de sobrevivência a mutagênicos físicos e químicos

4.4.1. Luz ultravioleta

Suspensões de conídios das linhagens 196 e 256 de B. bassiana foram irradiadas com luz ultravioleta como descrito no item 3.9.

Os resultados estão sumarizados na Tabela 18. As curvas de sobrevivência podem ser vistas na Figura 14.

É possível evidenciar uma correlação entre a dose e o efeito produzido quando as linhagens foram tratadas com luz ultravioleta (Tabela 18), portanto os resultados sugerem que este mutagênico é eficiente para causar letalidade em conídios de B. bassiana.

A dose capaz de inviabilizar 95% dos conídios foi obtida com um tempo de exposição de 4 a 5 minutos para a linhagem 256 e de 2,5 a 3,0 minutos para a linhagem 196.

Observa-se que a linhagem 256 é levemente mais resistente que a 196. Isto é importante, uma vez que os raios ultravioleta da luz solar são considerados como um dos fatores responsáveis pela inviabilidade dos conídios na natureza. Assim sendo, a linhagem 256 pelo menos nesta característica, apresenta vantagem sobre a 196 com relação à sua utilização no controle biológico.

5
Tabela 18 - Número de conídios ($N \times 10^5$ /ml) e porcentagem de sobrevivência à luz ultravioleta em 2 linhagens de B. bassiana. (média de duas repetições)

Linhagem Tempo (minutos)	196	256
0	51.95 (100%)	14.49 (100%)
0.5	40.20 (77,40%)	-
1.0	34.74 (66,90%)	11.36 (78,40%)
1.5	24.30 (46,77%)	11.26 (77,71%)
2.0	9.65 (18,57%)	6.63 (45,75%)
2.5	4.30 (8,28%)	3.74 (25,81%)
3.0	1.56 (3,00%)	1.39 (9,59%)
4.0	0.75 (1,44%)	0.59 (4,07%)
5.0	0.23 (0.44%)	0.08 (.0,54%)

- --> não realizado

Figura 14 - Curvas de sobrevivência à luz ultravioleta das linhagens 196 e 256 de B. bassiana.

4.4.2. Raios Gama

Suspensões de conídios provenientes de culturas com 7 dias de crescimento foram submetidas à radiação gama como descrito no item 3.10. A porcentagem de sobrevivência das linhagens 256 e 196 a diferentes doses de radiação gama está sumarizada na Tabela 19 e as respectivas curvas de sobrevivência estão representadas na Figura 15.

Este mutagênico se mostrou também muito eficiente em inviabilizar conídios de B. bassiana. A dose necessária para causar 95% de letalidade na linhagem 196 foi cerca de 50 K rad (Tabela 19), enquanto que para a linhagem 256 esta dose variou de 50 a 60 K rad (Tabela 19).

Em semelhança com os resultados obtidos com luz ultravioleta, a linhagem 256 também parece ser levemente mais resistente a radiação gama quando comparada com a linhagem 196.

4

Tabela 19 - Número de conídios ($N \times 10^4$ /ml) e porcentagem de sobrevivência à radiação gama em duas linhagens de B. bassiana (média de duas repetições).

Dose (Krad)	Linhagens	
	196	256
0	1.16 (100%)	1.16 (100%)
10	0.91 (78,01%)	1.09 (94,4%)
20	0.65 (56,03%)	0.78 (67,4%)
40	0.14 (12,15%)	0.20 (17,45%)
50	0.07 (6,29%)	0.09 (8,21%)
60	0.02 (1,98%)	0.04 (3,31%)
70	0.004 (0,37%)	0.02 (1,6%)

Figura 15 - Curva de sobrevivência à radiação gama das linhagens 196 e 256 de *B. bassiana*.

4.4.3. Ácido Nitroso

A sobrevivência ao ácido nitroso foi verificada conforme descrito no item 3.11.

Os resultados da exposição dos conídios em tempos crescentes a este mutagênico são vistos na Tabela 20, e as curvas de sobrevivência na Figura 16.

O ácido nitroso também se mostrou eficiente para causar letalidade em conídios de B. bassiana (Tabela 20 e Figura 16), mostrando uma correlação entre dose e efeito.

O tempo necessário para inviabilizar 95% dos conídios tratados está entre 30 a 40 minutos para a linhagem 256 e entre 20 a 30 minutos para a linhagem 196.

Mais uma vez a linhagem 256 se mostrou um pouco mais resistente com relação a 196.

4

Tabela 20 - Número de conídios ($N \times 10^4$ /ml) e porcentagem de sobrevivência ao ácido nitroso (média de duas repetições).

Linhagem Tempo (minuto)	196	256
0	76.00 (100%)	305.00 (100%)
5'	72.30 (95,13%)	246.00 (80%)
10'	26.00 (34,21%)	237.00 (77,70%)
15'	20.00 (26,31%)	153.00 (50,16%)
20'	9.10 (12,00%)	90.00 (29,50%)
30'	0.17 (0,23%)	29.00 (9,50%)
40'	0.00 (0,00%)	3.00 (0,98%)

Figura 16 - Curva de sobrevivência ao ácido nitroso das linhagens 196 e 256 de *B. bassiana*.

4.5. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos

Dois mutagênicos foram ensaiados para a obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos, os raios ultravioleta e os raios gama.

Foram utilizadas doses mutagênicas necessárias para obter 5% de conídios sobreviventes (Tabela 18 e 19).

Após tratamento com mutagênico, foram utilizados três métodos de isolamento de mutantes, o de inibição pela nistatina (item 3.13.1), o de enriquecimento (item 3.13.2) e isolamento total (item 3.13.3).

Apesar do efeito letal dos raios ultravioleta em B. bassiana (item 4.4.1; Tabela 18 e Figura 14), nenhum mutante auxotrófico ou morfológico estável foi obtido através dos métodos empregados. Ao contrário, uma instabilidade muito alta foi verificada. Seguindo o tratamento com este mutagênico, colônias que não cresceram em meio mínimo e colônias com morfologia alterada foram isoladas. Depois do 2^o repique para meio completo estas colônias recuperaram seu crescimento normal e passaram a crescer em meio mínimo. Considerando a possibilidade da ocorrência da reversão de marcas, conídios destas colônias supostamente revertentes foram semeados em meio mínimo e em

meio completo, onde se esperaria obter números diferentes de colônias nestes dois meios, se a hipótese de reversão fosse verdadeira. A Tabela 21 mostra estes resultados.

Pela Tabela 21 observa-se que a linhagem original 196, usada com controle não diferiu estatisticamente quanto ao número de colônias crescidas em meio mínimo e em meio completo. O mesmo ocorrendo para 196/A41. Nos demais revertentes o número de colônias crescidas em MM foi menor que em MC, sugerindo que nessas colônias existe uma mistura de conídios auxotróficos e prototróficos. A linhagem 196/A41 foi isolada inicialmente como auxotrófica, mas na realidade deve ter ocorrido retardo na germinação e não falta de crescimento.

Essa alta instabilidade observada tanto em auxotróficos como em morfológicos, pode ser resultado de um eficiente sistema de reparo à luz ultravioleta. Considerando que fungos entomopatogênicos permanecem expostos à luz solar na natureza, eles devem ser portadores de um bom sistema de proteção aos raios solares, e em B. bassiana esta defesa é acentuada devido à coloração branca de seus conídios provavelmente mais sensíveis aos raios ultravioleta quando comparado com outros fungos do solo.

Tabela 21 - Número médio de esporos provenientes de colônias supostamente revertentes, que perderam esta característica após 2 repiques sucessivos (média de 2 repetições).

Meio Linhagem	MC ($N \times 10^4$)	MM ($N \times 10^4$)	X2 ($p < 0.01$)
196 (controle)	208	288	0.92 ^{n.s.}
(1) 196/A19	877.5	612	47.32 ^{**}
196/A6	434	304	22.9 ^{**}
196/A41	103	114	0.40 ^{n.s.}
196/A1	318	172	43.60 ^{**}

(1)

196/A = colônias auxotróficas, obtidas por radiação U.V, supostamente revertentes.

** significativo a 1%

n.s. não significativo

O que chamou mais atenção foi a instabilidade dos mutantes morfológicos que após dois a três repiques sucessivos, recuperaram a morfologia original. Em geral a morfologia destes mutantes era compacta e as colônias bastante reduzidas.

Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, a luz ultravioleta tem sido utilizada na literatura como mutagênico não só para a obtenção de mutantes auxotróficos em B. bassiana (TIGANO, 1985) como também para obtenção de mutantes com produção alterada de enzimas exocelulares (PARIS & FERRON, 1979 e CHAMPLIN et alii, 1981), na dose necessária para obter 1% de colônias sobreviventes.

Devido a falta de êxito na obtenção de mutantes com ultravioleta, os conídios passaram a ser tratados com raios gama, também em uma dose necessária para obter 5% de sobrevivência, e o método de isolamento total foi utilizado para recuperar mutantes auxotróficos e morfológicos.

O sistema de isolamento de mutantes através da técnica de enriquecimento não se mostrou muito adequado para Beauveria bassiana, provavelmente devido a formação de blastosporos a partir de conídios prototróficos germinados,

principalmente após a 2^a filtração. Estes não são retidos pelas malhas do filtro, aumentando a proporção de prototróficos em relação aos auxotróficos, reduzindo assim a frequência de isolamento destes últimos.

PARIS (1977) trabalhando com luz ultravioleta em B. tenella também não obteve mutantes auxotróficos pelo método de enriquecimento. Ele explica o não isolamento de mutantes através desta técnica pelo fato de que os conídios mutantes podem apresentar crescimento residual em meio mínimo e consequentemente permanecem retidos nas malhas do filtro, durante o processo de filtração, juntamente com os conídios prototróficos germinados.

Em B. bassiana TIGANO (1985), utilizando o mesmo mutagênico e a mesma metodologia de isolamento obteve 5 mutantes simples e 3 com duplas marcas auxotróficas.

SILVEIRA & AZEVEDO (1984) obtiveram cerca de 2,34% a 6,13% de mutantes auxotróficos em M. anisopliae através desta metodologia, o que representa um aumento de 23 até 61 vezes no número de mutantes em relação ao processo de isolamento total realizado no mesmo fungo por MESSIAS (1979).

Quanto ao método de inibição pela nistatina, a dose utilizada deste antibiótico nos pareceu ineficiente para recuperar tais mutantes. Outras doses deveriam ser utilizadas. PARIS (1977) obteve 1 a 3% de mutantes com este método em B. tenella. O autor atribuiu esta baixa porcentagem à dose de nistatina utilizada ou devido a um atraso na germinação dos conídios.

A frequência de mutantes auxotróficos induzidos por radiação gama pode ser vista na Tabela 22, e a Tabela 23 lista os fenótipos destes e dos mutantes morfológicos obtidos.

Pelos resultados fica mais uma vez evidente a maior resistência da linhagem 256 em relação à 196.

Considerando que o método de seleção foi o de isolamento total, a frequência foi considerada alta, quando comparada com outros trabalhos descritos na literatura, como de PARIS (1977) em B. tenella, onde obteve cerca de 1 a 3% de mutantes pelo método de inibição pela nistatina o qual tem como objetivo o aumento na frequência de isolamento de mutantes, enquanto que MESSIAS (1979) e BAGALHI (1987) obtiveram uma frequência de 0,1% e 0,3% respectivamente através do método de isolamento total em M. anisopliae.

Seis dos mutantes auxotróficos simples foram novamente tratados com raios gama para obtenção de mutantes duplos. O método de seleção utilizado também foi o de isolamento total, e os resultados estão representados na Tabela 24.

Resultados negativos foram obtidos nos testes de reversão de marcas (item 3.17) naqueles mutantes escolhidos para a condução de estudos genéticos.

Tabela 22 - Porcentagem de mutantes de B. bassiana obtidos por radiação gama, portadores de uma marca auxotrófica.

Linhagens	o		Frequência
	n de colônias analisadas	n de mutantes obtidos	
256	936	4	0.43%
196	494	7	1.42%

Tabela 23 - Mutantes de B. bassiana portadores de uma marca auxotrófica ou morfológica obtidos por radiação gama.

Linhagens mutantes

Fenótipo

.Morfológicos

196/M1	amarelo sem conídios
196/M2	branco sem conídios
196/M4	branco compacto
196/M5	branco compacto
196/M6	branco sem conídios
196/M7	conídios brancos; fundo da colônia amarelo
196/M8	conídios brancos; fundo da colônia róseo
196/M9	amarelo escuro sem conídios
196/M10	compacto branco
196/M11	compacto branco
196/M12	branco sem conídios
196/M13	"Fluffy"
196/M14	compacto branco
256/M1	rugoso
256/M2	rugoso sem conídios
256/M3	rugoso, amarelado, sem conídios
256/M4	semi compacto

continua

continuação da Tabela 23

Linhagens mutantes

Fenótipo

.Morfológico

256/M5	compacto
256/M6	compacto com poucos conídios
256/M7	compacto
256/M8	colônia de fundo escuro
256/M10	compacto sem conídios

.Auxotróficos

196/G2	<u>met</u> 2
196/G3	<u>cys</u> 1
196/G8	<u>ade</u> 2
196/A4	<u>ctr</u> 1
196/A9	<u>ade</u> 1
196/A11	<u>met</u> 1
196/A16	<u>tia</u> 1
256/A5	<u>met</u> 3
256/A15	<u>nic</u> 1
256/A22	<u>nic</u> 2
256/A23	<u>ade</u> 3

Os símbolos ade; ctr; cys; met; nic; tia, representam respectivamente deficiências nutricionais para, adenina, citrulina, cisteína, metionina, ácido nicotínico e tiamina.

Tabela 24 - Relação dos mutantes de B. bassiana portadores de duplas marcas obtidos por radiação gama.

Mutantes	Fenótipos*
196/G2/M1	<u>met</u> 2 <u>mor</u> 2
196/G2/M2	<u>met</u> 2 <u>mor</u> 3
196/G2/M3	<u>met</u> 2 <u>mor</u> 5
196/G8/1	<u>ade</u> 2 <u>ths</u> 1
196/G8/2	<u>ade</u> 2 <u>ths</u> 2
196/G8/M1	<u>ade</u> 2 <u>mor</u> 4
196/A9/M	<u>ade</u> 1 <u>mor</u> 6
196/A11/2	<u>met</u> 1 <u>ade</u> 1
196/A11/3	<u>met</u> 1 <u>bio</u> 1
256/A5/3	<u>met</u> 3 <u>nic</u> 2
256/A15/1	<u>nic</u> 1 <u>leu</u> 1
256/A15/2	<u>nic</u> 1 <u>rib</u> 1
256/A15/4	<u>nic</u> 1 <u>ths</u> 3
256/A15/5	<u>nic</u> 1 <u>ade</u> 3
256/A15/6	<u>nic</u> 1 <u>leu</u> 1
256/A15/12	<u>nic</u> 1 <u>met</u> 4
256/A15/13	<u>nic</u> 1 <u>ade</u> 4
256/A15/14	<u>nic</u> 1 <u>bio</u> 2

* Os símbolos ade, bio, leu, met, nic, rib, ths, representam respectivamente deficiências nutricionais para adenina, biotina, leucina, metionina, ácido nicotínico, riboflavina e tiosulfato e o símbolo mor representa morfologia alterada.

4.6. Ciclo parassexual em B. bassiana

4.6.1. Obtenção do heterocário

Conídios provenientes de linhagens portadoras de marcas genéticas complementares foram colocados para crescer em meio mínimo acrescido de 4% de meio completo, conforme descrito no item 3.20.1.

Após 7 dias de incubação a 28^o C, pode ser constatada a formação ou não da película heterocariótica. Na Tabela 25 estão representados os cruzamentos realizados e os seus respectivos resultados. Depois de formada a película a mesma foi transferida para meio mínimo onde em alguns cruzamentos pode ser visto o desenvolvimento irregular do heterocário.

Não foi verificado sintrofismo (item 3.18) entre estes cruzamentos, quando as linhagens parentais foram inoculadas juntas em meio mínimo.

Observando a Tabela 25 verifica-se que em alguns cruzamentos não houve formação do heterocário, embora exista complementação das marcas entre as linhagens. Um certo tipo de incompatibilidade vegetativa na formação do heterocário deve estar ocorrendo. A não formação do

heterocário é verificada entre mutantes originados de linhagens diferentes (196 x 256) com exceção dos cruzamentos que envolveram a linhagem 256/A /2. Provavelmente esta linhagem perdeu o fator responsável pela incompatibilidade durante o processo de irradiação. Portanto, este mutante poderia ser utilizado em estudos futuros objetivando esclarecer os fatores genéticos responsáveis pela incompatibilidade dentro da mesma espécie.

Em M. anisopliae, a não formação de películas heterocarióticas também foi verificada dentro e entre linhagens (SILVEIRA, 1983; FRIGO, 1983 e SILVEIRA & AZEVEDO, 1987). Esta incompatibilidade foi atribuída ao alto grau de divergência entre as mesmas.

Tabela 25 - Formação da película heterocariótica e heterocário entre mutantes de B. bassiana.

Cruzamento	Película	Desenvolvimento do heterocário
(196 x 196)		
G8/1 x A11/3	++	++
G8/2 x A11/3	++	++
G2/M2 x G8/M1	-	-
(256 x 256)		
A15/5 x A5/4	++	++
A15/2 x A5/4	++	++
A15/4 x A5/4	++	++
(196 x 256)		
A11/3 x A15/5	+	-
A11/2 x A15/14	+	-
G8/1 x A15/2	++	++
A11/2 x A15/2	++	++
A11/2 x A15/14	++	-

++ bom desenvolvimento

+ desenvolvimento reduzido

- nenhum desenvolvimento

4.6.2. Obtenção de produtos recombinantes

Conídios foram retirados do heterocário, e semeados em meios seletivos como descrito no item 3.20.2.

Os poucos diplóides recuperados em meio mínimo mostraram-se altamente instáveis, liberando setores espontaneamente em meio completo. Nos demais meios seletivos foram recuperados conídios recombinantes diretamente do heterocário.

Os produtos recombinantes obtidos estão listados na Tabela 26.

Na Figura 17 podem ser visualizados os padrões eletroforéticos para esterase de alguns recombinantes obtidos do cruzamento 196/G8/1 x 256/A15/2. Nota-se pelo esquema da Figura 17 que o mutante 196/G8/1 apresenta um padrão distinto de bandas, quando comparado com a linhagem que lhe deu origem, a 196. Este mutante perdeu uma banda mas passou a ter uma mais pesada.

A troca e transferência gênica entre as linhagens de B. bassiana é confirmada pelos resultados da Tabela 26, pelos padrões eletroforéticos da Figura 17, onde pode ser evidenciado a perda de bandas no recombinante 2 e

8, enquanto que os demais mantiveram o padrão de um dos pais. Sem dúvida isto representa um avanço nos estudos genéticos neste fungo, e em programas de melhoramento esta transferência poderá ser feita a partir de marcadores de reconhecido valor para o controle biológico.

Pelos resultados apresentados na Tabela 26 pode-se deduzir que B. bassiana como outros fungos, apresenta um pequeno número de grupos de ligação. Observou-se ainda que no segundo cruzamento (256/A15/2 x 196/G8/1) as marcas ade ⁺ ths ⁺ nic ⁻ ou ade ⁻ ths ⁻ nic ⁺ apresentam uma tendência de segregarem juntas (cerca de 41 dos recombinantes num total de 82). Isto pode ser evidência da localização destas 3 marcas num mesmo grupo de ligação. Uma provável permuta mitótica entre ade e ths originou 19 recombinantes do tipo ade ⁻ ths ⁺ nic ⁻ e ade ⁺ ths ⁻ nic ⁺; uma permuta entre ths e nic originou 14 recombinantes do tipo ade ⁻ ths ⁻ nic ⁺ e ade ⁺ ths ⁺ nic ⁻, e duplas permutas embora sendo um evento raro no ciclo parassexual, poderiam ter dado origem aos 8 recombinantes ade ⁻ ths ⁺ nic ⁺ e ade ⁺ ths ⁻ nic ⁻.

Tabela 26 - Produtos recombinantes obtidos em 4 cruzamentos de B. bassiana, diretamente do heterocário.

Cruzamento	Total de colônias analisadas	Recombinantes	No. Observ.
*196/G8/1 x 196/A11/3	104	<u>ths</u>	01
		<u>met</u>	04
(<u>ade2</u> <u>ths1</u> x <u>met1</u> <u>bio1</u>)		<u>ade</u> <u>bio</u> <u>met</u> <u>ths</u>	02
		+ + + +	
		<u>ade</u> <u>bio</u> <u>met</u> <u>ths</u>	04
	164	<u>nic</u>	40
		<u>ade</u>	05
		<u>ths</u>	03
		<u>ade</u> <u>nic</u>	15
256/A15/2 x 196/G8/1		<u>nic</u> <u>ths</u>	02
	164	<u>ade</u> <u>nic</u> <u>ths</u>	05
(<u>nic1</u> <u>rib1</u> x <u>ade2</u> <u>ths1</u>)		<u>ade</u> <u>ths</u> <u>rib</u>	01
		<u>ade</u> <u>nic</u> <u>rib</u>	01
		<u>ths</u> <u>nic</u> <u>rib</u>	01
		<u>ade</u> <u>ths</u> <u>nic</u> <u>rib</u>	02
		+ + + +	
		<u>ade</u> <u>ths</u> <u>nic</u> <u>rib</u>	07

continua

continuação da Tabela 26

Cruzamento	Total de colônias analisadas	Recombinantes	No. : Observ.
		<u>nic</u> <u>met</u>	14
256/A15/2 x 256/A5/4	188	<u>rib</u> <u>met</u>	01
(<u>nic</u> 1 <u>rib</u> 1 x <u>met</u> 3)		<u>nic</u> + <u>met</u> + <u>rib</u> +	27
*256/A5/4 x 256/A15/4	156	<u>ths</u>	05
(<u>met</u> 3 x <u>nic</u> 1 <u>ths</u> 2)		<u>nic</u> ⁺ <u>met</u> ⁺ <u>ths</u> ⁺	02

* Nestes cruzamentos não foi possível fazer a distinção entre os recombina⁺ntes met ths e met ths .

1. <u>nic</u>	5. <u>met</u> <u>nic</u>	9. <u>ade</u>
2. <u>nic</u>	6. <u>ade</u> ⁺ <u>nic</u> ⁺ <u>met</u> ⁺ <u>rib</u> ⁺	10. 256/A15/2
3. <u>ade</u> <u>nic</u>	7. <u>ade</u> <u>nic</u>	11. 196/G8/1
4. <u>ade</u> <u>nic</u> <u>met</u>	8. <u>met</u>	12. 256
		13. 196

Figura 17 - Padrão eletroforético e representação esquemática deste padrão para esterases de alguns recombinantes do cruzamento 196/G8/1 x 256/A15/2.

A ocorrência de recombinantes com marcadores genéticos de parentais distintos descarta a possibilidade de reversão e confirma o processo de fusão nuclear seguida de haploidização.

Recombinantes foram recuperados a partir do heterocário; conseqüentemente a fase diplóide deve ser altamente instável, e a haploidização ocorre ainda no estágio de hifas, fenômeno designado de paramiose por BONATELLI JR. et alii (1983) e verificado em vários fungos como Aspergillus niger (LHOAS, 1967 e BONATELLI JR. et alii, 1983) e Cephalosporium acremonium (BALL & HAMLYN, 1982), M. anisopliae (SILVEIRA e AZEVEDO, 1984 e BAGALHI, 1987).

Em B. bassiana a alta instabilidade pode ser explicada pelo fato de que o heterocário cresce muito lentamente e esporula em torno de 25 dias, tempo suficiente para o diplóide recuperar seu estado haplóide normal. Assim as perdas cromossômicas poderiam estar ocorrendo em estágio de hifa e os conídios formados a partir destas já seriam haplóides recombinantes.

PARIS (1977) descreveu vários métodos para a obtenção de heterocário em B. tenella, porém o único método considerado eficiente foi o de fusão de protoplastos. Diplóides não foram recuperados a partir destes

heterocários, e a relação nuclear dos tipos parentais foi inferior a 1. Provavelmente, durante a protoplastização, vários núcleos são observados dentro de um mesmo citoplasma, e deve ter ocorrido fusão entre dois protoplastos com número distinto de núcleos, sem no entanto ocorrer fusão entre esses núcleos, originando assim uma proporção diferente de 1:1 com relação aos tipos parentais.

TIGANO (1988) obteve colônias supostamente diplóides em B. bassiana, que cresceram em meio mínimo, porém estas não setorizaram, mesmo após tratamento com haploidizantes químicos. Estes produtos poderiam ser haplóides prototróficos, resultantes de parameiose e não diplóides como atribuído pela autora.

Provavelmente a dificuldade encontrada por muitos autores em obter produtos recombinantes em B. bassiana se concentre na metodologia. Normalmente suspensões de conídios provenientes do heterocário são semeadas apenas em meio mínimo para isolamento do diplóide. Considerando a alta instabilidade destes núcleos, os recombinantes haplóides, com exceção dos prototróficos, não são ali recuperados, mas sim em meio completo ou em meios seletivos como apresentado neste e em outros trabalhos como os de BONATELLI JR. et alii, 1983; SILVEIRA e AZEVEDO, 1984 e BAGALHI, 1987.

No cruzamento entre 196/G8/1 x 256/A15/2, foi observada uma classe de recombinantes com crescimento residual (leaky) em MM + todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento e meio mínimo com todos os requisitos exceto a riboflavina e ácido nicotínico. Nenhum crescimento foi verificado na ausência de ade e/ou met. Porém estes mesmos produtos quando em meio completo crescem normalmente, mas esporulam menos que os parentais. Alguns liberaram setores em MM + todos os requisitos. O mesmo comportamento foi verificado nos recombinantes provenientes de fusão de protoplastos entre estes mutantes, e este fato será discutido no item 4.7.

4.7. Obtenção, regeneração e fusão de protoplastos em B. bassiana

A metodologia utilizada para protoplastização, regeneração e fusão foi aquela descrita nos itens 3.21, 3.22 e 3.23, respectivamente.

Quando conídios de B. bassiana são inoculados em meio líquido, eles germinam (Figuras 11, 12 e 13) e seguem vários estádios de desenvolvimento. BIDOCHKA et alii (1987) definiram esse padrão de desenvolvimento em 6 fases distintas:

1. o conídio
2. conídio entumescido
3. emergência do tubo germinativo
4. alongamento para formar a 1^a célula micelial
5. alongamento bipolar e crescimento do micélio
6. formação de blastosporos

A protoplastização das linhagens 196 e 256 mostrou ser eficiente no estágio 3 (24 horas de germinação), concordando com os resultados apresentados por PFEIFER & KHACHATOURIANS (1987). Estes autores obtiveram um aumento na formação de protoplastos utilizando não só tubos germinativos como também blastosporos (estádio 6). A porcentagem de protoplastização aumentou de 6,2 para 70% em blastosporos germinados. Portanto as melhores condições de cultivo para a formação de protoplastos parece ser os estádios iniciais do desenvolvimento, ou em blastosporos cuja parede celular é mais frágil que a dos conídios.

A facilidade na obtenção de protoplastos nessa fase sugere que a parede celular em desenvolvimento é mais sensível às enzimas digestivas.

No que diz respeito a estas enzimas, KAIWULA & LINGG (1984) usaram beta-glucuronidase para isolar

protoplastos a partir de blastosporos de B. bassiana enquanto que bons resultados foram encontrados por PFEIFER & KHACHATOURIANS (1987) com uma mistura de enzimas constituída por celulase, quitinase, lisozima e beta-glucuronidase. Individualmente estas enzimas não foram eficientes na protoplastização de B. bassiana.

Neste trabalho, a mistura celulase CP e Novozima 234 se mostrou eficaz.

Vários autores relatam a importância da pré incubação do material a ser protoplastizado. Em B. bassiana PFEIFER & KHACHATOURIANS (1987) ensaiaram vários compostos thiol nesta etapa. O mais adequado foi o ditiotreitól (DTT). No presente trabalho utilizou-se como pré incubador o próprio estabilizador osmótico, como descrito por PARIS (1977) para obtenção de protoplastos em B. tenella.

A metodologia empregada se mostrou adequada para a obtenção de protoplastos em B. bassiana, e estes podem ser visualizados na Figura 18.

Dois estabilizadores osmóticos foram ensaiados para a regeneração, o KCl e a sacarose resultando em uma frequência de regeneração de 33% e 35,45% respectivamente. Não há diferença significativa entre estes dois estabilizadores, e optou-se pelo uso de KCl.

Figura 18 - Protoplastos da linhagem 196 de B. bassiana
(aumento 1000x).

Após fusão com PEG entre as linhagens 196/G8/1 e 256/A15/2, as colônias que cresceram em MM + KCl foram transferidas para meio completo. Neste meio foi observada a liberação de setores que podem ser visualizados na Figura 19.

Os setores foram isolados, purificados, transferidos para meio completo e analisados quanto a auxotrofia em meios seletivos. Os resultados desta análise podem ser visualizados na Tabela 27.

Além desta análise de segregação de marcas auxotróficas, o perfil eletroforético de alguns destes recombinantes foi determinado (figura 20). Uma vez que as isoenzimas podem ser controladas por um ou por vários genes em diferentes "loci" e devido a facilidade na sua separação e identificação, elas podem ser consideradas marcadores genéticos adequados na identificação de colônias híbridas e segregantes. Este método permite também detectar a presença de novas proteínas nestas mesmas colônias.

Os mutantes 196/G8/1 e 256/A15/2 mostraram distintos padrões eletroforéticos para esterases. Os segregantes originados por fusão de protoplastos apresentaram bandas semelhantes ao 196/G8/1 ou ao 256/A15/2 ou ambos. Em alguns casos bandas não parentais foram

observadas, como nos setores Q, S1, AA, AA1, S e U, ao contrário do padrão dos segregantes do ciclo parassexual, onde a maioria apresentou bandas semelhantes a um dos pais.

A presença de bandas diferentes aos tipos parentais ou a ausência destas pode ser atribuído em primeiro lugar a uma possível aneuploidia ou seja, o segregante não recuperou ainda seu estado haplóide normal; ou, em segundo, ao desenvolvimento de proteínas com propriedades novas ou modificadas, como relatado por ANNE e PEBERDY (1981) quando compararam o padrão isoenzimático de híbridos e segregantes interespecíficos obtidos entre Penicillium chrysogenum e P. roqueforti através de fusão de protoplastos. Os autores também verificaram a presença de bandas novas nos recombinantes e nos híbridos.

Os setores da classe 10, apresentaram crescimento "leaky" (Figura 21) em todos os meios de análise, inclusive em meio mínimo acrescido de todos os demais requisitos nutricionais, porém quando transferidos para meio completo estes cresceram normalmente mas esporularam menos que os parentais. Isto também foi verificado em cruzamentos por fusão de protoplastos entre Penicillium cyaneum - fulvum e P. chrysogenum (PEBERDY et alli, 1977).

Deve ser salientado que ambos os pais apresentaram crescimento normal em meio completo e em meio mínimo mais tudo (Figura 21) descartando provavelmente a hipótese da existência de translocação em um deles.

Fato interessante é a liberação eventual de novos setores com crescimento e conidiação normal a partir dos recombinantes desta classe. Parece estar envolvido algum mecanismo de incompatibilidade citoplasmática que quando perdido proporciona bom desenvolvimento, como foi o caso da colônia n^o 13 apresentada na Figura 21 e os setores das colônias 4, 6, 7 e 12.

Deve ser lembrado que foi detectada certa incompatibilidade nos cruzamentos entre mutantes oriundos de linhagens distintas (196 x 256) (Tabela 25) com exceção deste cruzamento (196/G8/1 x 256/A15/2), como explicado no item 4.6.1.

Análises mais detalhadas dos setores destas colônias "leaky" deveriam ser feitas para explicar o crescimento dos mesmos, mas várias hipóteses poderiam ser aventadas. Primeiro, um dos pais seria portador de uma duplicação ou de uma inversão e estas, através do processo de permuta mitótica originaria translocações que se perderiam durante as divisões subsequentes dando origem aos

Figura 19 - Produtos instáveis resultantes de fusão de protoplastos entre as linhagens 196/68/1 e 256/A15/2, de B. bassiana.

Tabela 27 - Análise auxonográfica dos setores liberado pelos produtos de fusão entre as linhagens 196/G8/1 e 256/A15/2.

Classe	Fenótipo recombinante	n ^o observado
	(1)	
1	<u>ade</u>	03
2	<u>nic</u>	01
3	<u>ths</u>	01
4	<u>ade</u> <u>rib</u>	01
5	<u>ade</u> <u>ths</u>	06
6	<u>ade</u> <u>nic</u>	02
7	<u>ade</u> <u>ths</u> <u>rib</u>	02
8	<u>ade</u> <u>ths</u> <u>nic</u>	01
9	<u>ths</u> <u>nic</u> <u>rib</u>	01
10	<u>ade</u> <u>ths</u> <u>nic</u> <u>rib</u>	17
	+ + + +	(2)
11	<u>ade</u> <u>ths</u> <u>nic</u> <u>rib</u>	03

(1)

Os símbolos ade, nic, rib e ths representam deficiências nutricionais para adenina, ácido nicotínico, riboflavina e tiosulfato de sódio, respectivamente.

(2)

setores com crescimento "leaky" nos meios seletivos, porém crescimento normal em meio completo.

Figura 20 - Perfil eletroforético de esterases de segregantes de *B. bassiana* obtidos por fusão de protoplastos.

Figura 21 - Crescimento dos setores, resultantes de fusão, da classe 10 e dos tipos parentais (p) em MM + todos os requisitos nutricionais.

setores normais. Segundo, fatores citoplasmáticos de incompatibilidade seriam os responsáveis. A perda destes fatores restauraria o fenótipo original. Terceiro, outra marca auxotrófica poderia ter surgido pelo processo de permuta mitótica e sua reversão proporcionaria a liberação de setores normais. Porém, não se detectou qualquer outra deficiência nutricional aparente. Esta marca poderia ser responsável pela deficiência nutricional para algum metabólito raro presente no meio completo.

Análise dos setores e novos cruzamentos utilizando estas mesmas linhagens como um dos pais são imprescindíveis para o esclarecimento deste comportamento.

Analisando a Tabela 27 sem a classe 10, uma vez que o fenótipo real destes recombinantes não está bem esclarecido, observa-se que existe uma tendência das marcas ade th_s e nic segregarem juntas, como evidenciado no ciclo parassexual (Tabela 26).

A instabilidade verificada no ciclo parassexual (paramiose) ficou confirmada também na fusão de protoplastos. Algumas das colônias que cresceram em meio mínimo, tiveram seus conídios medidos e os resultados se encontram na Tabela 28.

Pela Tabela 28 é confirmado a instabilidade do diplóide. Observam-se que as colônias 1 e 2 apresentaram dois tamanhos de conídios (Figura 21), que foram agrupados quanto a suas semelhanças. Assim, um grupo mostra ser diplóide (1x e 2x) enquanto que o outro (1y e 2y) já seria haplóide. Outras colônias apresentaram conídios de diâmetro intermediário entre o diplóide e os tipos parentais, sugerindo que seriam aneuplóides em processo de haploidização, e as demais colônias cujos conídios são semelhantes aos tipos parentais foram consideradas haplóides prototróficas.

Isto demonstra a instabilidade do diplóide, e a haploidização iniciada ainda em estágio de hifas.

Esta instabilidade também foi verificada por TYPAS & HEALE (1977) em Verticillium, onde avaliaram o tamanho de conídios diplóides e haplóides obtidos pelo ciclo parassexual. Foi verificada uma alta frequência de haploidização dos diplóides que aumentava em função do tempo de crescimento, sendo que a frequência destes conídios diminuía acentuadamente na segunda semana de crescimento, e na quarta semana todos os conídios eram haplóides.

Figura 22 - Conídios de diferentes tamanhos (x = maiores; y = menores) pertencentes a uma colônia originada de fusão de protoplastos.

Com base nos trabalhos de TYPAS & HEALE (1977) com Verticilium e nos resultados aqui apresentados, análises dos níveis de ploidia em colônias de B. bassiana originadas por fusão de protoplastos e ciclo parassexual seria uma proposta para futuros estudos.

Tabela 28 - Diâmetro médio de conídios (um) das linhagens parentais e produtos resultantes de fusão
(1)
(média de 30 medições) .

Parentais	produtos de fusão	nível de ploidia
256/A15/2 - 2,68 cd	(2) x 3,63 a	diplóide
	1 y 2,71 cd	haplóide
196/G8/1 - 2,30 f	2 x 3,46 a	diplóide
	y 1,97 g	haplóide
	3 3,08 b	diplóide
	4 3,01 b	diplóide
	5 2,86 bc	aneuplóide
	6 2,84 bc	aneuplóide
	7 2,71 cd	haplóide
	8 2,69 cd	haplóide
	9 2,66 cde	haplóide
	10 2,63 cde	haplóide
	11 2,58 de	haplóide
	12 2,53 def	haplóide
	13 2,44 ef	haplóide

(1) médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

(2) conídios de tamanhos diferentes (x = maiores; y = menores) observados em um mesmo produto de fusão.

4.8. Efeito dos mutantes resistentes ao ultravioleta sobre lagartas de Diatraea saccharalis

Dois mutantes resistentes aos raios ultravioleta foram obtidos de acordo com o descrito no item 3.16, e denominados de 196/R1 e 256/R1.

O número de conídios e a porcentagem de sobrevivência destes mutantes à luz ultravioleta podem ser visualizados na Tabela 29, e as curvas de sobrevivência na Figura 23.

Comparando a Tabela 29 e Figura 23 com a Tabela 18 e Figura 14, observa-se que estes dois mutantes são mais resistentes ao ultravioleta que as linhagens que lhes deram origem. A linhagem 256, no tempo 5 apresenta 0,54% de sobrevivência, enquanto que o mutante 256/R, 5,62%. O mesmo é observado pela linhagem 196. No tempo 5 a sobrevivência desta foi de 0,44%, enquanto que para o mutante 196/R, esta porcentagem foi de 2,6% no mesmo tempo.

O mutante 256/R1 é mais resistente ao ultravioleta que o 196/R1, o que já era esperado uma vez que a linhagem 256 mostrou maior resistência quando comparada com a 196.

Tabela 29 - Número de conídios e porcentagem de sobrevivência à luz ultravioleta, dos mutantes 196/R1 e 256/R1 (média de 2 repetições).

Tempo	256/R1	196/R1
	no. de conídios	no. de conídios
	$\frac{5}{(x10^5)}$	$\frac{5}{(x10^5)}$
0	17,6 (100,00%)	4,3 (100,00%)
2	8,42 (47,84%)	1,31 (31,16%)
3	5,82 (33,07%)	0,30 (7%)
5	0,99 (5,62%)	0,112 (2,6%)
6	0,111 (0,63%)	0,085 (2%)
10	0,0065(0,037%)	0,0065(0,15%)
15	0,0020(0,011%)	0,0031(0,072%)

Tabela 30 - Número médio de conídios das linhagens de Beauveria bassiana selvagem e resistentes ao ultravioleta, estimados através de uma amostra de 5 mm de diâmetro.

Linhagens	no. médio de conídios x 10 ⁸ /ml (1)
256	1,523a
196	1,130a
256/R1	0,9525a
196/R1	0,0105b

(1) médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,01$).

Figura 23 - Curva de sobrevivência à luz ultravioleta dos mutantes 196/G8/1 e 256/A15/2, resistentes a esse mutagênico.

Outra característica avaliada nestes mutantes foi a produção de conídios (Tabela 30).

Observa-se que a produção de conídios da linhagem 196/R1 após 12 dias de crescimento em meio completo foi inferior às demais. Na linhagem original 196, a produção foi cerca de 13 vezes superior em relação à 196/R1, enquanto que a diferença na produção média de conídios na linhagem 256 e do mutante 256/R1 não foi estatisticamente significativa.

Outra característica interessante do mutante 196/R1 é a produção de um pigmento róseo quando cultivado em meio líquido. Segundo VINING et alii (1962) e EL BASYOUNI SOHAIR et alii (1968), os fungos do gênero Beauveria sintetizam um pigmento vermelho, a oosporeína, que difunde no meio de cultivo e pode ser observado nos insetos mortos pelo fungo. Sabe-se que este pigmento apresenta uma ação bactericida (FERRON, 1978). PARIS e FERRON (1979) observaram que em meio Sabouraud apenas linhagens patogênicas de B. brongniartii sintetizaram este pigmento, e que um mutante morfológico lipase-negativo não produziu o pigmento e foi não patogênico. Porém os autores sugerem a realização de estudos complementares a fim de se determinar precisamente a importância da síntese deste pigmento na patogenicidade da linhagem.

Estes dois mutantes resistentes à luz ultravioleta foram ensaiados quanto a patogenicidade seguindo-se a metodologia descrita no item 3.25, e os resultados encontram-se na Tabela 31.

A virulência de um entomopatógeno é determinada por um conjunto de fatores que atuam desde a penetração até a colonização do fungo no inseto. Desta forma, pode-se deduzir que a genética da patogenicidade é bastante complexa, e deve envolver efeitos pleiotrópicos como, produção alterada de enzimas necessárias para causar infecção e alterações morfológicas que impedem a penetração das hifas nos insetos, entre outros.

PEKRUL & GRULA (1979) realizaram um interessante estudo ultraestrutural da infecção de B. bassiana em Heliothis zea. Para isso, eles utilizaram mutantes exibindo níveis altos e baixos de virulência. Nestes últimos, a maioria dos conídios que germinaram produziram hifas que cresceram desgovernadas sobre a superfície do inseto. Apenas uma minoria de hifas penetram, e isto só ocorre após extensivo alongamento, ao contrário dos mutantes altamente patogênicos cuja penetração ocorre logo após a germinação. Estes e outros autores observaram também que no processo de penetração estão envolvidas atividades enzimáticas além das mecânicas, porém, a baixa

patogenicidade dos mutantes com crescimento hifal desgovernado, não é simplesmente consequência da falta de uma série de enzimas supostamente necessárias para a penetração no tegumento do inseto. Todos estes mutantes apresentaram variados níveis das três principais enzimas, protease, lipase e quitinase, enquanto que outros com níveis altos destas enzimas mostraram baixa patogenicidade. No presente trabalho a linhagem 256 apresentou maior taxa de produção de enzimas (Tabela 16).

PARIS & FERRON (1979) concluíram que a virulência em B. bassiana está ligada a presença de duas características, uma atividade lipolítica e um arco de precipitação específico obtido por imunoeletroforese. Porém estes dois fatores sozinhos não são suficientes para reger a virulência de uma linhagem, uma vez que mutantes morfológicos lipase positivo e arco de precipitação positivo se mostraram avirulentos. Segundo estes autores, mutantes deste tipo penetram no tegumento, mas são deficientes em algum dos processos que induzem a morte do inseto.

Pelo exposto, observa-se que a virulência é determinada por inúmeros fatores, que a torna extremamente complexa.

Tabela 31 - Mortalidade larval em Diatraea saccharalis provocada por linhagens selvagens e mutantes resistentes ao ultra violeta de B. bassiana, 20 dias após inoculação (10 lagartas por repetição).

Repetições	Linhagens				
	256	196	256/R1	196/R1	Testem.
1	01	03	04	00	0
2	00	05	07	00	0
3	07	03	02	02	0
4	05	07	02	01	0
5	10	06	03	00	0
TOTAL	23(46%) ¹ a	24(48%)a	18(36%)b	3(6%)c	0(0%)c

¹ Valores seguidos de letras iguais não diferem significativamente entre si quando comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Assim, o fato dos mutantes resistentes à luz ultravioleta exibirem baixa patogenicidade, pode ser atribuído às sucessivas irradiações sofridas por estes, as quais alteraram um dos fatores descritos acima. No caso do mutante 196/R1, é difícil atribuir a causa da inexpressiva mortalidade por ele provocada, quando comparada com a linhagem que lhe deu origem, sem fazer outros testes como produção de exoenzimas, observações em microscopia eletrônica da penetração das hifas, alterações morfológicas, presença de plasmídios, entre outros. Estes testes poderiam ser propostas para estudos futuros.

Como citado anteriormente, o mutante 196/R1 produz um pigmento em meio líquido, possivelmente a oosporeína, que segundo PARIS e FERRON (1979) poderia estar associada com uma alta patogenicidade. Isto não foi observado no presente trabalho.

O mutante 256/R1 também apresentou menor patogenicidade quando comparado com a linhagem original 256 (Tabela 30). As irradiações sucessivas causam alterações aleatórias no material genético, e apesar de ser possível selecionar o produto esperado (resistência à luz ultravioleta), este pode ser portador de características indesejáveis, como é o caso dos dois mutantes aqui obtidos.

Apesar destes mutantes apresentarem níveis mais baixos de virulência, eles não devem ser descartados, uma vez que o caráter resistência à luz ultravioleta é benéfico para o controle biológico, e pode ser transferido para linhagens altamente patogênicas quer seja através do ciclo parassexual ou por fusão de protoplastos.

Além do mais estes mutantes, principalmente o 196/R1,, podem ser úteis em estudos futuros que visam o conhecimento dos fatores ligados à patogenicidade.

Apesar da linhagem 256/R1 ter apresentado uma taxa de mortalidade inferior à não irradiada, é de interesse observar se este mesmo comportamento se repete no campo, onde os conídios estão diretamente expostos à radiação solar.

5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que:

a. Existe grande variabilidade genética natural entre linhagens de B. bassiana quanto ao crescimento e produção de conídios, em diferentes substratos, sensibilidade ao Benomyl, produção de exoenzimas e padrão eletroforético para esterases, características importantes para a condução de programas de melhoramento.

b. O crescimento e conidiação de B. bassiana pode ser recuperado após repiques sucessivos em meios contendo como substrato a própria lagarta do inseto hospedeiro ou o macerado da mesma.

c. Foi considerado como o melhor indutor físico de mutação a radiação gama, e o melhor método de obtenção de mutantes auxotróficos foi o do "isolamento

total". A metodologia de enriquecimento por filtração se mostrou ineficiente, provavelmente devido à formação de blastosporos em meio líquido com agitação, o que aumenta a proporção de prototróficos dificultando o isolamento dos auxotróficos.

d. A espécie B. bassiana apresenta ciclo parassexual, embora possa existir incompatibilidade vegetativa entre algumas linhagens, impedindo a formação de heterocário, o que pode ser resolvido pela fusão de protoplastos.

e. A obtenção em alta frequência, de recombinantes haplóides no heterocário, indica a ocorrência de parameiose.

f. A técnica de fusão de protoplastos se mostrou eficiente na obtenção de produtos diplóides. A alta instabilidade destes vem comprovar a ocorrência do fenômeno parameiótico, resultando em recombinantes haplóides estáveis.

g. Mutantes resistentes à luz ultravioleta, apresentam alterações na patogenicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-AIDROOS, K. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. Can. J. Genet. Cytol., 22: 309-314, 1980.
- AL-AIDROOS, K. & ROBERTS, D.W. Mutantes of Metarhizium anisopliae with increased virulence toward mosquito larvae. Can. J. Genet. Cytol., 20: 211-219, 1978.
- AL-AIDROOS, K. & SEIFFERT, A.M. Polysaccharide and protein degradation, germination, and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. J. Invertebr. Pathol., 36: 29-34, 1980.
- ALVES, S.B. Caracterização, padronização e produção de Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. Piracicaba, 1982. 95p. (Tese de Livre-docência - ESALQ/USP).
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: S.B. ALVES, Coord. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986. cap. 6, p.73-126.

ALVES, S.B. & MORAES, S.A. Influência da luz sobre o crescimento e esporulação de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. Ecossistema 4: 43-50, 1979.

ALVES, S.B., RISCO, S.H. & ALMEIDA, L.C. Influence of photoperiod and temperature on the sporulation of Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorok. Zeits. fur angew. entomol. 97: 127-129, 1984.

ANNE, J. & PEBERDY, J.F. Characterisation of inter-specific hybrids between Penicillium chrysogenum and P. roqueforti by iso-enzyme analysis. Trans. Br. Mycol. Soc. 77: 401-408. 1981.

AOKI, J. & CHIGUSA, K. Studies on the nutrition and metabolism of pathogenic fungi in muscardine disease (1). Nitrogen utilization by synthetic media of Beauveria bassiana, Isaria farinosa, and I. fumoso-rosea. J. Sericult. Sci. Japan, 37: 288-294, 1968.

AOKI, J. & YANASE, K. Studies on the nutrition and metabolism of pathogenic fungi of muscardine (2). The influences of amino acids for the formation and multiplication of hyphal bodies of Spicaria fumorosea (Wize) Vassil and of Beauveria bassiana (Bals) Vuill. J. Sericult. Sci. Japan., 39: 285-292, 1970.

AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético em microrganismos. Ciência e Cultura, 38: 1161-1168, 1986.

AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. Exercícios Práticos de Genética. Ed, São Paulo, Companhia Ed. Nacional, EDUSP, 1973. 288p.

BAGALHI, E. Parameiose em Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin. Piracicaba, 1987. 123p. (Tese-Mestrado - Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz/USP).

BAJAN, C.; KMITOWA, K. & WOJCIECHOWSKA, M. The effect of enolofos 50 and its active substance chlorfenvinphos on growth and pathogenicity of entomopathogenic fungi. Polish. Ecol. Stud., 3: 65-67. 1977. (abstract).

BALL, C. & HAMLYN, P.F. Genetic recombination studies with Cephalosporium acremonium related to the production of the industrially important antibiotic Cephalosporin C. Rev. bras. genet., 5: 1-13, 1982.

BARBOSA, F.R.; MOREIRA, W.A. & CZEPAK, C. Beauveria bassiana: promissor agente de controle biológico da cigarrinha das pastagens (Deois flavopicta). In: Congresso Brasileiro de Entomologia. 9. Londrina, 1984. p.17.

- BARNES, G.L.; BOETHEL, D.J.; EIKENBARY, R.D.; CRISWELL, J.T. & GENTRY, C.R. Growth and sporulation of Metarhizium anisopliae and Beauveria bassiana on media containing various peptone sources. J. Invertebr. Pathol., 25: 301-305, 1975.
- BARNETT, H.L. Illustrated genera of imperfect fungi. Minneapolis, Burges Publishing Company, 1958. 225p.
- BERGERON, D. & MESSING-AL-AIDROOS, K. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomogenous fungus Metarhizium anisopliae. Can. J. Genet. Cytol., 24: 643-651, 1982.
- BIDOCHKA, M.J.; PFEIFER, T.A. & KHACHATOURIANS, G.G. Development of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana in liquid cultures. Mycopathologia., 99: 77-83, 1987.
- BONATELLI Jr., R.; AZEVEDO, J.L. & VALENT, G.V. Parasexuality in a citric acid producing strain of Aspergillus niger. Rev. bras. genet. 6: 399-405, 1983.
- BROOME, J.R.; SIKOROWSKI, P.P. & NORMENT, B.R. A mechanism of pathogenecity of Beauveria bassiana on the larvae of the imported fire ant, Solenopsis richteri. J. Invertebr. Pathol., 28: 87-91, 1976.

CADATAL, T.D. & GABRIEL, B.P. Effect of chemical pesticides on the development of fungi pathogenic to some rice insects. Philippine Entom., 1: 379-395. 1970.

CAMPBELL, R.K.; BARNES, G.L.; CARTWRIGHT, B.O. & EIKENBARY, R.D. Growth and sporulation of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae in a basal medium containing various carbohydrate sources. J. Invertebr. Pathol., 41: 117-121, 1983.

CAMPBELL, R.K.; PERRING, T.M.; BARNES, G.L.; EIKENBARY, R.D. & GENTRY, C.R. Growth and sporulation of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae on media containing various amino acids. J. Invertebr. Pathol., 31: 289-295, 1978.

CARVALHO, S.M. & SILVA, S.M.T. Patogenicidade de Beauveria bassiana e Metarhizium anisopliae a Diabrotica speciosa. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 9. Londrina, 1984. p.22-27.

CATCHESIDE, D.G. Isolation of nutritional mutants of Neurospora crassa by filtration enrichment. J. Gen. Microbiol., 11: 34-36. 1954.

- CHACEL, N.M.; KITAJIMA, E.W. & AZEVEDO, J.L. Ultra estrutura de protoplastos de Metarhizium anisopliae. Bol. Grupo Pesq. Control Biol., 3: 11, 1982.
- CHAMPLIN, F.R.; CHEUNG, P.Y.K., PEKRUL, S.; SMITH, R.J.; BURTON, R.L. & GRULA, E.A. Virulence of Beauveria bassiana mutants for the Pecan Weevil. J. Econ. Entomol., 74: 617-621, 1981.
- CHEUNG, P.Y.K. & GRULA, E.A. In vivo events associated with entomopathology of Beauveria bassiana for the Corn earworm (Heliothis zea). J. Invertebr. Pathol., 39: 303-313, 1982.
- CLARK, T.B.; KELLEN, W.R.; FUKUDA, T. & LINDEGREN, J.E. Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus Beauveria bassiana to three genera of mosquitoes. J. Invertebr. Pathol., 11: 1-7, 1968.
- DAOUST, R.A. & PEREIRA, R.M. Stability of entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae on beetle-attracting tubers and cowpea foliage in Brazil. Environ. Entomol. 15: 1237-1243, 1986.

DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. & NEVES, B.P. das. Distribution, biology and control of cowpea pests in Latin America. In: S.R. SINGH, & K.O. RACHIE, ed., Cowpea research, production and utilization. New York, Wiley, 1985. p.251-266.

DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. & SOPER, R.S. The enzootic and epizootic occurrence of disease in insect species associated with cowpeas in Central, north and northeast Brazil. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 26: 86-87, 1983.

DAS, A. & ILCZUK, Z. Spontaneous segregation of a heterozigous diploid of Aspergillus niger. Folia microbiol., 23: 362-365, 1978.

DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, A.L. & AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of Metarhizium anisopliae. Experientia, 36: 293-294, 1980.

DE HOOG, G.S. The genera Beauveria, Isaria, Tritirachium and Acrodontium. Stud. Mycol. 1: 1-41, 1972.

DOBERSKI, J.W. Comparative laboratory studies on 3 fungal pathogens of the elm bark beetle, Scolytus scolytus: Effect of temperature and humidity on infection by Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae and Paecilomyces farinosus. J. Invertebr. Pathol., 37: 195-200, 1981.

DUNN, P.H. & MECHALAS, B.J. The potential of Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin as a microbial insecticide. J. Insect Pathol., 5: 491-499, 1963.

EL. BASYOUNI SOHAIR, H.; BREWER, D. & VINING, L.C. Pigments of the genus Beauveria. Can. J. Bot., 46: 441-448. 1968.

EVALAKOVA, A.A. & CHEKHOURLINA, T.A. L'activite de defense de la cuticle de la punaise des cereales (Eurygaster integriceps) contre les micro-organismes vegetaux. In: Collog. Int., Pathol. Insectes., Paris, 1962, p.137-141.

FARGUES, J. Etude des conditions d'infection des larves de doryphore, Leptinotarsa desemlineata Say, par Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. Entomophaga., 17: 319-337, 1972.

FERNANDES, P.M. Influência da temperatura, umidade relativa do ar e dose na eficiência de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. sobre Cerotoma arcuata Oliv. (Col: Chrysomelidae). Piracicaba, 1986. 68p. (Tese-mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Ann. Rev. Entomol. 23: 409-442, 1978.

FERRON, P. Pest control by the fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae. In: H.D. BURGESS, ed. Microbiol control of pests and plant diseases. London, Academic Press, 1981. p.465-482.

FERRON, P. Fungal control. In: KKKUT, G.I. & GILBERT. L.I., ed. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Oxford, Pergamon Press, 1985. vol4, p.313-346.

FRIGO, S.M. Variabilidade e fusão de protoplastos em Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin. Piracicabá, 1983. 119p. (Tese-doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

GABRIEL, B.P. Fungus infections of insects via the alimentary tract. J. Insect. Pathol., 1: 319-330, 1959.

GARDNER, W.A.; SUTTON, R.M. & NOBLET, R. Persistence of Beauveria bassiana, Nomuraea rileyi, and Nosema necatrix on soybean foliage. Environ. Entomol., 6: 616-618, 1977.

GARDNER, W.A.; SUTTON, R.M. & NOBLET, R. Evaluation of the effects of six selected pesticides on the growth of Nomuraea rileyi and Beauveria bassiana in broth cultures. J. Georgia Entomol. Soc., 14: 102-103, 1979.

GOTTWALD, T.R. & TEDDERS, W.L. Studies on conidia release by the entomogenous fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from adult pecan weevil (Curculio caryae) (Coleoptera: curculionidae) cadavers. Environ. Entomol. 11: 1274-1279, 1982.

HABIB, M.E.M. & ANDRADE, C.F. Epizootia em larvas de Brasolis sophorae causada por Beauveria bassiana, com estudo de identificação e sintomatologia. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 4. Goiânia, 1977. p.115.

HALL, R.A. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology and growth rate of Verticillium lecanii. J. Invertebr. Pathol., 36: 216-222, 1980.

HALL, I.M. & DUNN, P.H. The effect of certain insecticides and fungicides on fungi pathogenic to the spotted alfalfa aphid. J. Econ. Entomol., 52: 28-29. 1959.

HAMLYN, P.F.; BIRKETT, J.A.; PEREZ, G. & PEBERDY, J.F. Protoplast fusion as a tool for genetic analysis in Cephalosporium acremonium. J. Gen. Microbiol. 131: 2813-2823, 1985.

HAMLYN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELLON, F.W.; SANTIAGO, C.M; WILSON, J.M. & PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. Enzyme Microb. Technol. 3: 321-325, 1981.

HAMMIL, T.M. Electron microscopy of phialoconidiogenesis in Metarhizium anisopliae. Ann. J. Bot., 59: 317-326, 1972.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia, 67: 597-607, 1975.

HASTIE, A.C. The parasexual cycle in Verticillium albo-atrum. Genet. Res., 5: 305-315, 1964.

HEDLUND, R.C. & PASS, B.C. Infections of the alfalfa weevil, Hypera postica, by the fungus, Beauveria bassiana. J. Invertebr. Pathol. 11: 25-34, 1968.

IGNOFFO, C.M. Entomopathogens as insecticides. Environ. Lett. 8: 23-40, 1975.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; ALYOSHINA, O.A. & LAPPA, N.V. Laboratory and field studies with Boverin: a mycoinsecticidal preparation of Beauveria bassiana produced in the Soviet Union. J. Econ. Entomol. 72: 562-565, 1979.

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; GARCIA, C. & PINNEL, R.R. Sensitivity of the entomopathogenic fungus Nomuraea rileyi to chemical pesticides used on soybeans. Environ. Entomol., 4: 765-768. 1975.

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SIKOROWSKI, P.P.; SUTTER, G. & BROOKS, W.M. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultra violet light source. Environ. Entomol. 6: 411-415, 1977.

KAWAKAMI, K. On the change of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. Bull. Sericult. Exp. Stn. Japan, 16: 83-99, 1960.

KAWULA, T.H. & LINGG, A.J. Production of protoplasts from Beauveria bassiana blastospores. J. Invertebr. Pathol. 43: 282-284, 1984.

KHACHATOURIANS, G.G. Production and use of biological pest control agents. Trends in Biotechnol. 4: 120-124, 1986.

KIRSCHBAUM, J.B. Potential implication of genetic engeneering and other biotechnologies to insect control. Ann. Rev. Entomol., 30: 51-70, 1985.

KUCERA, M. Toxins of the entomophagous fungus Beauveria bassiana. II. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture. J. Invertebr. Pathol. 17: 211-215, 1971.

KUCERA, M. & SAMSINAKOVA, A. Toxins of the entomophagous fungus Beauveria bassiana. J. Invertebr. Pathol. 12: 316-320, 1968.

LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 681-685. 1970.

LAILLIER-ROUSSEAU, D. Adaptation et mise au point d'une technique de crible de mutants auxotrophes chez le Penicillium baarnense von Beyna. C. R. Acad. Sci. Paris., 277: 2582-2584. 1972.

LEFEBVRE, C.L. Preliminary observations on two species of Beauveria attacking the corn borer, Pyrausta nubilalis hubner. Phytopathology. 21: 1115-1128, 1931.

LEFEBVRE, C.L. Penetration and development of the fungus, Beauveria bassiana in the tissues of the corn borer. Ann. Bot., 48: 441-452, 1934.

LEITE, B. & MESSIAS, C.L. Atividade enzimática para linhagens de Metarhizium anisopliae. Bol. Grupo Pesq. Control. Biol. 5: 13, 1984.

LEOPOLD, J. & SAMSINAKOVA, A. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus Beauveria bassiana. J. Invertebr. Pathol., 15: 34-42, 1970.

- LHOAS, P. Genetic analysis by means of the parasexual cycle in Aspergillus niger. Genet. Res., 10: 45-61, 1967.
- LINGG, A.J. & DONALDSON, M.D. Biotic and abiotic factors affecting stability of Beauveria bassiana conidia in soil. J. Invertebr. Pathol., 38: 191-200, 1981.
- LORIA, R.; GALAINI, S. & ROBERTS, D.W. Survival of inoculum of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana as influenced by fungicides. Environ. Entomol., 12: 1724-1726. 1983.
- MACLEOD, D.M. Investigations on the genera Beauveria vuill and Tritirachium limber. Can. J. Bot. 32: 818-893, 1954.
- MADELIN, M.F. Fungal parasites of insects. Ann. Rev. Entomol., 11: 423-448, 1966.
- MAGOON, J. & MESSING-AL-AIDROOS, K. Epistatic relationships and linkage among colour marks of the imperfect entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. Can. J. Genet. Cytol., 28: 96-100, 1986.
- MATANMI, B.A. & LIBBY, J.L. Scanning electron microscopy of Entomophthora virulenta and Conidiobolus coronatus. J. Invertebr. Pathol., 26: 165-170, 1975.

MESSIAS, C.L. Parassexualidade em Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979. 73p. (Tese-Doutoramento - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Parasexuality of the deuteromycete Metarhizium anisopliae. Trans Br. mycol. Soc. 75: 473-477, 1980.

MONTEIRO, A.C. Isolamento e caracterização genética de supressores do mutante nic B8 em Aspergillus nidulans. Piracicaba, 1979. 145p. (Tese de mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

MONTEIRO, A.C. Aspectos Físio-Ecológicos de Isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região Amazônica (Manaus). São Carlos. 1988. 228p. (Tese de doutoramento - Univers. Federal de São Carlos).

NEGREIROS, J.; ALVES, S.B.; PEREIRA, M.J.M. & MENTEN, L.A.S. Influência de luzes de diferentes cores na esporulação de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. Ecossistema., 5: 88-91, 1980.

- PACCOLA, L.D.; FUNGARO, M.H.P. & ARANTES, O.M.N. Diâmetro de núcleos e conídios e curva de sobrevivência em diferentes isolados de Beauveria bassiana. In: Reunião Anual de Genética de Microrganismos, 11. Londrina, 1984. Programa e Resumo de Comunicações. Londrina, UEL, 1984. Resumo 63.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L. e ALFENAS, A.C. Manual de técnicas eletroforéticas em Microrganismos. Ed. FEALQ, 1988. 54p.
- PANIZZI, A.R.; CORREA, B.S.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. de; NEWMAN, G.G. & TURNIPSEED, S.G. Insetos da soja no Brasil. Boletim Técnico. EMBRAPA/CNPso, Londrina, PR. (1), 20p., 1977.
- PARIS, S. Heterocaryons chez Beauveria tenella. Mycopathologia. 61: 67-75, 1977.
- PARIS, S. & FERRON, P. Study of the virulence of some mutants of Beauveria brongniartii (Beauveria tenella). J. Invertebr. Pathol., 34: 71-77, 1979.
- PEBERDY, J.F.; EYSEN, H. & ANNE, J. Interspecific hybridization between Penicillium chrysogenum and Penicillium cyaneo-fulvum following protoplast fusion. Molec. Gen. Gent., 157: 281-284. 1977.

- PEKRUL, S. & GRULA, E.A. Mode of infection of the corn earworm (Heliothis zea) by Beauveria bassiana as revealed by scanning electron microscopy. J. Invertebr. Pathol. 34: 238-247, 1979.
- PFEIFER, T.A. & KHACHATOURIANS, G.G. The formation of protoplasts from Beauveria bassiana. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26: 248-253, 1987.
- PONTECORVO G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.D. & BUFTON, A.W.J. The genetics of Aspergillus nidulans. Adv. Genet., 5: 141-238, 1953.
- PUPIN, A.M. & MESSIAS, C.L. Ácidos graxos em diferentes linhagens de Metarhizium anisopliae como ajuda para identificação. Bol. Grupo Pesquis. Control. Biol., 5: 12, 1984.
- RAMOSKA, W.A. The influence of relative humidity on Beauveria bassiana infectivity, and replication in the chinch bug Blissus leucopterus. J. Invertebr. Pathol., 43: 389-394, 1984.
- ROBBS, C.F. Combate biológico por intermédio de microorganismos. Simpósio Brasileiro sobre Combate Biológico. Bol. Inst. Ecol. Exp. Agric., 1: 21, 1962.

ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Production of extra-cellular enzymes by isolates of Metarhizium anisopliae. J. Invertebr. Pathol., 38: 1-3, 1981.

SAMSINAKOVA, A. Growth and sporulation of submersed cultures of the fungus Beauveria bassiana in various media. J. Invertebr. Pathol., 8: 395-400, 1966.

SAMSINAKOVA, A. & KALALOVA, S. The influence of a single-spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus Beauveria bassiana. J. Invertebr. Pathol., 42: 156-161, 1983.

SAMSINAKOVA, A.; KALALOVA, S.; VLCEK, V. & KYBAL, J. Mass production of Beauveria bassiana for regulation of Leptinotarsa decemlineata populations. J. Invertebr. Pathol., 38: 169-174, 1981.

SAMSINAKOVA, A. & MISIKOVA, S. Enzyme activities in certain entomophagous representatives of deuteromycets (Moniliales) in relationship to their virulence. Ceska Mykol., 27: 55-60, 1973.

SAMSON, R.A. Identification of entomopathogenic deuteromycetes. In: H.D. BURGESS, Microbial control of pests and plant diseases. London, Academic Pres, 1981. p.93-106.

SCHAERFFENBERG, G. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by Beauveria bassiana and Metarhizium. J. Insect Pathol., 6: 8-20, 1964.

SHAW, C.R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes a compilation of recipes. Biochem. Genet., 4: 297-320, 1970.

SIKURA, I.A. & ZHIGAEVE, G.N. The effectiveness of Boverin against the coolling moth. Zash. Rast., 17: 21-22. 1972.

SILVA, J.C. Virulência de mutantes exoenzimáticos de Metarhizium anisopliae var. anisopliae e seus revertentes a Rhodnius prolixus. Campinas, 1985. 137p. (Tese de doutoramento - Universidade de Campinas - S.P.).

SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. Virulence of mutants and revertants of Metarhizium anisopliae var. anisopliae toward Rhodnius prolixus. J. Invertebr. Pathol., 48: 368-374. 1986.

SILVEIRA, W.D. Obtenção e fusão de protoplastos em Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983, 153p. (Tese-mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of Metarhizium anisopliae by the filtration enrichment technique. Rev. Bras. Genét., 7: 1-8. 1984.

SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in Metarhizium anisopliae. Enzyme. Microb. Technol. 9: 149-152, 1987.

SMITH, R.J. & GRULA, E.A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of Beauveria bassiana. J. Invertebr. Pathol. 37: 222-230, 1981

SMITH, R.J. & GRULA, E.A. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (Heliothis zea) and their effects on germination and growth of Beauveria bassiana. J. Invertebr. Pathol. 39: 15-22, 1982.

SMITH, R.J. & GRULA, E.A. Chitinase is an inducible enzyme in Beauveria bassiana. J. Invertebr. Pathol., 42: 319-326, 1983.

SMITH, R.J.; PEKRUL, S. & GRULA, E.A. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of corn earworm (Heliothis zea) by Beauveria bassiana. J. Invertebr. Pathol., 38: 335-344, 1981.

SOPER, R.S.; HOLBOOK, F.R. & GORDON, C.C. Comparative pesticide effects on Entomophthora and phytopathogen Alternaria solani. Environ. Entomol., 3: 560-562. 1974.

SOSA GÓMEZ, D.R. Toxinas, aspectos da biologia, genética, exigências térmicas e hídricas de fungos entomopatogênicos. Piracicaba, 1987. 74p. (Monografia - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP - Depto. de Genética).

SOSA GÓMEZ, D.R. & ALVES, S.B. Caracterización de once aislamientos de Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. I. Estandartización, virulencia y actividad enzimática. CIRPON, Rev. Invest., 1: 83-102, 1983.

SOSA GÓMEZ, D.R.; ALVES, S.B. & MACHADO NETO, R. Caracterización de once aislamientos de Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok. III. Inactivación de conidios com luz ultravioleta y zimogramas del sistema de alfa-esterasas. CIRPON, Rev. Invest., 2: 47-54, 1984.

STEINHAUS, E.A. Fungous infections. In: Principles of insect pathology. 1949. New York. McGraw-Hill Book Co., 757p.

TANAKA, Y.; MURATA, N. & KATO, H. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of Pyricularia. Ann. Phytopath. Soc. Japan., 45: 182-191, 1979.

TIGANO, M. Contribution à l'étude de la variabilité génétique de Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin, hyphomycète entomopathogène. Paris, 1985. 165p. (Doctorat de L'Université - Université Paris).

TIGANO, M.S. Obtenção de mutantes de Beauveria bassiana. In: Reunião Anual de Genética de Microrganismos - Simpósio Internacional de Genética de fungos filamentosos, 15. Piracicaba, FEALQ, 1988. p.41.

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

TONET, G.L. & REIS, E.M. Patogenicidade de Beauveria bassiana em insetos pragas da soja. Pesq. Agropec. Bras. 14: 89-95, 1979.

TRAVE, P.; BASTIDE, J.M. & BASTIDE, M. La formation de protoplasme par les champignons filamenteux et leur position systématique. C. R. Acad. Sc. Paris., 279: 979-982. 1974.

TYPAS, M.A. & HEALE, J.B. Analysis of ploidy levels in strain of Verticillium using a counter counter. J. Gen. Microbiol., 101: 177-180, 1977.

VALE, T.L. Influência da qualidade da luz no crescimento e esporulação do Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, SP., 1984. 78p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VEY, A. & FARGUES, J. Histological and ultrastructural studies of Beauveria bassiana infection in Leptinotarsa decemlineata larvae during ecdysis. J. Invertebr. Pathol., 30: 207-215, 1977.

- VILLAS BOAS, A.M.; MARQUES, E.J. & RIBEIRO, M.A.
Patogenicidade do fungo Beauveria bassiana (Bals.)
Vuill., sobre larvas de Castnia licus (Drury)
(Lepidoptera: castiniidae), broca-gigante-da-cana-de-
açúcar. Anais. Soc. Entom. Brasil., 12: 206-298, 1983.
- VINING, L.C.; KELLEHER, W.J. & SCHWARTING, A.E. Oosporein
production by a strain of Beauveria bassiana originally
identified as Ammanita muscaria. Can. J. Microb., 8: 931-
933. 1962.
- ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus, Metarhizium
anisopliae, infecting three species of larval Elateridae
(Coleoptera). II. Conidial germ tubes and apressoria. J.
Invertebr. Pathol., 15: 81-91, 1970a.
- ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus Metarhizium
anisopliae infecting three species of larval Elateridae
(Coleoptera). III. Penetration of host integument. J.
Invertebr. Pathol., 15: 372-396, 1970b.
- WOODS, S.P. & GRULA, E.A. Utilizable surface nutrients on
Heliothis zea available for growth of Beauveria bassiana.
J. Invertebr. Pathol., 43: 259-269, 1984.