ESTUDOS GENÉTICOS EM *Paecilomyces lilacinus*(THOM.) SAMSON,
AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES

IDA CHAPAVAL PIMENTEL
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

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

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 1991

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

Pimentel, Ida Chapaval
P644e Estudos genéticos em Paecilomyces lilacinus (THOM.)
Samson, agente de controle biológico de nematóides,
Piracicaba, 1991,
115p, ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fungo para controle biológico 2. Fungo nematófago - Genética I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba

CDD 589.2

ESTUDOS GENÉTICOS EM *Paecilomyces lilacinus* (THOM.) SAMSON,
AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES

IDA CHAPAVAL PIMENTEL

Aprovada em: 09.04.1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo ESALQ/USP

Prof. Dr. Itamar Soares Mello CNPDA/EMBRAPA

Profa.Dra. Regina M. Dechechi Gomes Carneiro CNPFT/EMBRAPA

Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Orientador

Aos meus filhos

David e Pedro

DEDICO

Ao espôso e amigo
Arnoldo Meister Pimentel,
aos meus pais e sogros

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. João Lúcio de Azevedo pela orientação, estímulo e confiança.
- À Dra. Regina Maria Dechechi Gomes Carneiro pela linhagem de *P. lilacinus* concedida.
- À Dra. Aline Pizzirani-Kleiner por sua amizade, sugestões e incentivo.
- Aos técnicos do Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética, ESALQ-USP, em especial à Carlos A. Nolasco.
- Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos, ESALQ-USP em particular à Marina E. Vega, Marisa Vieira Queiroz, Maria Helena F. Fungaro, Olívia M. N. Arantes, Cláudio Costa e Mid Pacheco de Almeida pelas sugestões, apoio e cooperação amiga.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Genética - ESALQ-USP.
- Às funcionárias da Biblioteca do Departamento de Genética - ESALQ-USP, Nilse T.P. Sigrist, Terezinha de Jesus L. Barrete e Olívia R. Pachan pela atenção e presteza.
- Aos amigos do curso de pós-graduação, pela convivência sempre interessante.
- Ao pesquisador Itamar S. Mello pela amizade e estímulos constantes.

- Ao Departamento de Tecnologia Rural e ao Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes - ESALQ-USP.
- Ao CENA-ESALQ-USP pela utilização da fonte de Co⁶⁰.
- Ao Biólogo Luis Anselmo Lopes pelo auxílio na utilização da fonte radioativa acima citada.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Prof. Juarez Gabardo.
- Ao Celmar T. C. de Mattos pelo trabalho de datilografia.
- Ao Fernando A. Sedor e Sideval Ruppel pelas fotografias e figuras apresentadas neste trabalho.
- Aos amigos Isaías Olívio Geraldi, Ila Cardim Rego e Solange Guidolin Caniatti pela amizade, convívio e apoio constante.
- Ao Arnaldo Meister Pimentel pelo carinho, companheirismo e amizade durante a elaboração deste trabalho.
- Ao CNPq-Ministério da Educação pela bolsa de estudos fornecida durante o período de março de 1987 a fevereiro de 1988.
- À FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudos fornecida durante os anos de 1988 a 1990.
- À todos que direta ou indiretamente auxiliaram na elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Classificação e morfologia de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	5
2.2. Germinação, crescimento e esporulação de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	6
2.3. Modo de infecção de <i>P. lilacinus</i>	8
2.4. Potencial de biocontrole de <i>P. lilacinus</i>	10
2.5. Melhoramento genético em fungos.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Linhagem utilizada.....	22
3.2. Meios de Cultura.....	22
3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO et alii, 1953).....	22
3.2.2. Meio Completo (PONTECORVO et alii, 1953 modificado).....	23
3.2.3. Meio Mínimo Líquido.....	23
3.2.4. Meio Batata-Glicose-Ágar (BDA).....	23
3.2.5. Meio Batata-Glicose Líquido.....	24
3.2.6. Meio de Malte.....	24
3.2.7. Meio Mínimo acrescido de 4% de meio Batata-glicose-ágar.....	24
3.2.8. Meio BDA com estabilizador osmótico.....	24

3.2.9. Meio ágar-água.....	25
3.3. Soluções utilizadas.....	25
3.3.1. Solução de vitaminas.....	25
3.3.2. Solução caseína hidrolizada.....	25
3.3.3. Solução de ácido nucléico.....	26
3.3.4. Solução de salina.....	26
3.3.5. Solução "Tween 80".....	26
3.3.6. Solução estoque dos suplementos adicionados ao meio mínimo.....	27
3.3.7. Solução de albumina 50%.....	27
3.3.8. Soluções de álcool etílico.....	27
3.3.9. Solução de Giemsa.....	28
3.3.10. Solução de fixação.....	28
3.3.11. Solução de Benomyl.....	28
3.3.12. Solução de Dietilsulfato (DUARTE, 1971)...	29
3.3.13. Solução de enzimas para produção de protoplastos.....	29
3.4. Tampões e Estabilizadores Osmóticos utilizados...	29
3.4.1. Tampão fosfato 0,125M pH 7,0.....	29
3.4.2. Tampão fosfato 0,2M pH 5,8.....	29
3.4.3. Tampão fosfato 0,02M pH 7,0.....	30
3.4.4. Tampão fosfato 0,02M pH 5,6.....	30
3.4.5. Estabilizador osmótico KCl 2,4M.....	31
3.4.6. Outras soluções de KCl.....	31
3.4.7. Estabilizador osmótico MgSO ₄ 1,6M.....	31
3.4.8. Outras soluções de MgSO ₄	32

3.5. Preparo de filtros, palitos de transferência e esterilização.....	32
3.5.1. Sistema de filtros para técnica de enriquecimento.....	32
3.5.2. Uso de palitos esterilizados para transferência de colônias.....	32
3.5.3. Esterilização e incubação.....	33
3.6. Coloração de núcleos de conídios.....	33
3.6.1. Limpeza das lâminas e lamínulas.....	33
3.6.2. Preparo da lâmina.....	33
3.6.3. Coloração.....	34
3.7. Medida do tamanho dos conídios.....	34
3.8. Determinação do número de núcleos por conídio....	35
3.9. Crescimento da linhagem selvagem em diferentes meio de cultivo.....	35
3.10. Sobrevivência à luz ultra-violeta.....	35
3.11. Sobrevivência à radiação gama.....	36
3.12. Sobrevivência ao DES.....	37
3.13. Obtenção de mutantes auxotróficos.....	38
3.13.1. Método de isolamento total.....	38
3.13.2. Método de filtração em meio mínimo líquido.....	39
3.14. Obtenção de mutantes morfológicos.....	40
3.15. Caracterização dos mutantes auxotróficos.....	40
3.16. Teste de reversão.....	41
3.17. Teste de sintrofismo.....	42

3.18. Crescimento e conidição em meio BDA.....	42
3.19. Verificação da estabilidade genética.....	43
3.20. Curva dose-resposta ao fungicida Benomyl.....	43
3.21. Análise genética.....	44
3.21.1. Obtenção do heterocário.....	44
3.21.2. Isolamento de colônias prototróficas.....	44
3.22. Produção de protoplastos.....	45
3.23. Regeneração de protoplastos.....	46
3.24. Coloração de protoplastos.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. Verificação do crescimento em diferentes meios de cultivo.....	48
4.2. Medida do tamanho dos conídios e determinação do número de núcleos por conídios.....	50
4.3. Verificação da estabilidade genética.....	53
4.4. Sobrevivência à mutagênicos físicos e químicos...53	
4.4.1. Sobrevivência à luz ultra-violeta.....	53
4.4.2. Sobrevivência à radiação gama.....	57
4.4.3. Sobrevivência ao Dietilsulfato.....	60
4.5. Obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos.....	63
4.5.1. Teste de reversão.....	70
4.6. Ciclo parassexual em <i>P. lilacinus</i>	70
4.6.1. Obtenção do heterocário.....	70
4.7. Isolamento e regeneração de protoplastos.....	74
4.8. Curva dose-resposta ao fungicida Benomyl.....	78

4.9. Crescimento e conidição em meio BDA.....	83
5. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
APÊNDICE.....	106

ESTUDOS GENÉTICOS *Paecilomyces lilacinus* (THOM.) SAMSON,
AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES

Autora: IDA CHAPAVAL FIMENTEL

Orientador: PROF.DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Esta pesquisa apresenta estudos genéticos na linhagem de *Paecilomyces lilacinus* com os seguintes objetivos: avaliar o crescimento e esporulação em diferentes meios de cultura; isolamento de mutantes auxotróficos e morfológicos nesta linhagem; verificação da ocorrência do ciclo parassexual; definição de um protocolo eficiente para o isolamento e regeneração de protoplastos, determinar a sensibilidade da linhagem ao Benomyl, e, avaliar algumas características dos mutantes obtidos para uma possível utilização destes como agentes de biocontrole. Todos os objetivos acima enumerados visaram fornecer subsídios para posteriores estudos da genética básica, bem como para o estabelecimento de um programa de melhoramento genético nesta linhagem.

Foram ensaiados três agentes mutagênicos, a

luz ultra-violeta, os raios gama e o dietilsulfato, e dois métodos de isolamento de mutantes, o método de isolamento total e o de enriquecimento por filtração. O tratamento mutagênico que se mostrou mais adequado foi aquele com radiação gama seguido pelo método de isolamento total para a seleção de colônias mutantes.

Mutantes com duplas marcas auxotróficas foram utilizados e obtiveram-se películas heterocarióticas nos cruzamentos realizados, porém, verificou-se a ocorrência de sintrofismo não sendo possível a definição do ciclo parasexual na linhagem em estudo.

O protocolo mais eficiente para o isolamento de protoplastos foi obtido a partir da protoplastização do micélio, usando como estabilizador osmótico $MgSO_4$ 0,8M onde foi obtida a melhor porcentagem de regeneração.

A dose de Benomyl necessária para inibir a germinação e crescimento do fungo pelo método de semeadura foi de 3,0 ug/ml e pelo método de inoculação de 2,0 ug/ml.

Foram isolados mutantes morfológicos a partir dos três agentes mutagênicos utilizados e estes apresentaram uma grande variabilidade genética em relação ao crescimento e produção de conídios, características importantes para utilização destes como possíveis agentes de biocontrole.

GENETIC STUDIES IN *Paecilomyces lilacinus* (THOM.) SAMSON,
A NEMATODE AGENT OF BIOLOGICAL CONTROL

Author: IDA CHAPAVAL PIMENTEL

Adviser: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

This research presents a genetic studies in a strain of *Paecilomyces lilacinus* with the following objectives: to studying the growth and sporulation in several culture media; isolation of auxotrophic and morphological mutants of this strain; determination of the occurrence of the parasexual cycle; definition of an efficient protocol for the isolation and regeneration of protoplasts, determination of the strains sensivity to Benomyl and evaluation of some characteristics of the mutants for a possible use in biological control. All the objectives numbered above intended to contribute for the basic genetics studies and also for the establishment of a genetic improvement program in this strain.

Three different mutagenic agents were tested: ultra violet light, gamma rays and diethylsulfate; and two

methods for mutants isolation - the method of total isolation and the method of enrichment through filtration. The most appropriate mutagenic treatment was that with gamma rays followed by the total isolation method to the selection of mutant colonies.

Double auxotrophic mutants were used and heterokaryotic mats were obtained in the performed crosses. However the occurrence of sintrofism made the definition of the parasexual cycle difficult in this strain.

The most efficient protocol for protoplast isolation was obtained from protoplastization of mycelium using 0,8M $MgSO_4$ as osmotic stabilizer, where the best percentage of regeneration was obtained.

The dose of Benomyl necessary to inhibit the growth and sporulation of the strain was 3,0 $\mu g/ml$ by the plating method and 2,0 $\mu g/ml$ by the inoculation method. Morphological mutants were isolated from three mutagenic agents and these presented a great genetic variability in relation to conidia growth and production, wich are important characteristics for using these agents in biological control.

1. INTRODUÇÃO

A Agricultura é um dos principais fatores responsáveis pelo rompimento do equilíbrio de populações na natureza. O manejo adequado dessa nova dinâmica de populações é ponto vital para a manutenção de ecossistemas produtivos no tempo e no espaço e, portanto para a sobrevivência na terra.

Entre os parasitos de plantas, os nematóides são em parte responsáveis por grandes perdas na produção agrícola.

A presença de nematóides faz aumentar os gastos com defensivos, a começar com os próprios nematicidas empregados, além disso as plantas infestadas apresentam-se mais suscetíveis aos ataques por outros organismos, exigindo tratamentos adicionais com fungicidas, bactericidas, inseticidas, acaricidas e outros, onerando o cultivo, levando o agricultor a adotar como medida de controle a rotação com plantas menos remuneradoras, muitas vezes antieconômicas. Os nematóides, portanto, limitam o uso do

solo reduzindo a produtividade.

Dentre os principais métodos de controle estão o uso de variedades resistentes ou tolerantes e a aplicação de nematicidas. No caso do controle químico, muitos são os efeitos negativos como: custo elevado, risco de contaminação do meio ambiente, intoxicação do homem, alteração do balanço de microrganismos do solo e ainda perda da eficiência pois solos tratados sucessivamente com nematicidas podem vir a formar populações resistentes.

Com relação ao controle varietal, a resistência específica muito comum nos vegetais e o frequente antagonismo entre rusticidade e características desejáveis apresentam-se como os mais importantes obstáculos.

Assim, parece cada vez mais evidente que deve-se procurar desenvolver metodologias e técnicas de controle biológico para serem utilizadas em integração com outras medidas de controle, visando não a erradicação do parasita, mas sim a manutenção da população a um nível de equilíbrio dentro da biocenose do solo. Este processo similar ao que ocorre na natureza, não tem efeitos negativos como o controle químico.

É conhecido há mais de cinquenta anos a existência de patógenos obrigatórios como os fungos em presença de cistos e de ovos de nematóides fitoparasitas (KORAB, 1929; RADEMACHER & SCHMIDT, 1933; ROZYSPAL, 1934; VAN DER LAAN, 1953 e 1956), mas o interesse pelo seu potencial de biocontrole veio a ocorrer no último decênio.

Entre os microrganismos parasitas de nematóides encontra-se o fungo *Paecilomyces lilacinus*. Este fungo tem mostrado um controle bastante eficiente do nematóide das galhas *Meloidogyne incognita*, na cultura da batata (JATALA, 1979).

Devido a sua importância e potencialidade, é indispensável que estudos genéticos sejam conduzidos, o que proporcionará o desenvolvimento de um eficiente programa de melhoramento. Assim, a indução de mutações e os processos parassexuais neste microrganismo permitirá a combinação de características consideradas desejáveis no controle biológico em um único organismo, tal como aumento da patogenicidade.

O presente trabalho teve por objetivos:

1. Verificar a ocorrência de parassexualidade em *P. lilacinus*;
2. Avaliar o crescimento e esporulação de *P. lilacinus* em diferentes meios de cultura;

3. Obter mutantes morfológicos e auxotróficos, os quais serão utilizados para verificação do ciclo parassexual;
4. Determinar a metodologia de obtenção e regeneração de protoplastos;
5. Determinar a sensibilidade ao fungicida Benomyl, utilizando técnicas de inoculação e semeadura;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação e morfologia de *Paecilomyces lilacinus*

Paecilomyces lilacinus é um Eucarioto, pertencente a classe dos Deuteromicetos, ordem Moniliales (Hyphomycetes).

Este fungo foi originalmente classificado no gênero *Penicillium*, como *Penicillium lilacinum* THOM (1910), mas SAMSON (1974) reclassificou-o como *Paecilomyces* BAIN, em razão do aspecto dos conidióforos que surgem de fiá-lides, e de sua semelhança com *Paecilomyces marquandii*, onde de fato estas duas espécies foram consideradas como intermediárias entre os dois gêneros, o mesmo ocorreu com *Penicillium jantinelum* (DOMSCH & GAMS, 1980).

Em razão da larga distribuição e das ligeiras variações micológicas, este fungo recebeu várias denominações assim como: *Graphium cicadicola* SPEG (1911). *Spicaria violacea* FETCH, 1932; *Spicaria rubidopurpurea* AOKI, 1941, que SAMSON considerou como sinônimos.

Segundo a descrição de SAMSON (1974), as hifas vegetativas apresentam-se hialinas com um diâmetro de 2,5 a 4,0 μ m (Fig.1); as colônias crescendo em meio de ágar-malte atingem um diâmetro de 5 a 7 cm com 14 dias a 25 °C, consistem de um feltro basal de micélio floconoso, o qual inicialmente apresenta-se branco, mas na esporulação passa a uma coloração violácea, os exsudatos são limitados e o odor é indistinto.

2.2. Germinação, crescimento e esporulação de *P. lilacinus*

O conhecimento dos requisitos nutricionais para germinação, crescimento e esporulação é de fundamental importância para se determinar o meio de cultura propício, compreender o metabolismo e caracterizar geneticamente um fungo.

P. lilacinus se desenvolve em uma ampla faixa de temperatura de 8 a 38 °C (DUNCAN, 1973) independente da origem geográfica dos isolados; seu crescimento é nulo a 5 °C e apresenta um ótimo de temperatura de crescimento entre 26 a 30 °C (BORUTT, 1960; PITT, 1973).

No que diz respeito a microflora, é conhecido que os fungos suportam mais os solos ácidos que as bactérias e que os actinomicetos. Segundo DOMSCH & GAMS (1980) *P. lilacinus* tolera um pH entre 2 e 10 e seu pH ótimo é de 6,5.

Ótima esporulação tem sido observada em meio contendo NaCl a 1%, ótimo crescimento sem produção de conídios a 3% (MERT & DIZBAY, 1977) e esporulação reduzida à partir de 5 a 10% de NaCl (TRESNER & HAYES, 1971). Se adapta após 12 horas com 14 a 24% de $MgSO_4$, e modificações morfológicas ocorrem a fortes concentrações de NaCl e $MgSO_4$ (MERT & DIZBAY, 1977; PITT, 1973; TRESNER & HAYES, 1971). Apresenta o crescimento limitado a um potencial osmótico de -270 bars em meio de NaCl (TRESNER & HAYES, 1971).

P. lilacinus utiliza fontes de carbono e energia de um grande número de compostos carbônicos, entre os quais a maior parte dos monossacarídeos (hexoses e pentoses) e dissacarídeos. Amido é utilizado e ocorre degradação das pentosanas (xilanas) pelas vias 1,6 -A, 1,3 -B e 1,6 -B glucanases (BROWN, 1972; LASKIN & LECHE-VALIER, 1973; SIMONSON & LIBERTA, 1975). A absorção de açúcares é estimulada pela presença do ácido nicotínico que acelera o crescimento do fungo e a acumulação de carboidratos e de lipídios (DUNCAN, 1973; NAGUIB, 1960; PHILIPS & WALKER, 1958).

P. lilacinus utiliza a maioria das formas minerais e orgânicas de nitrogênio (NO_3 , NH_4 , extrato de levedura e peptona) e parece que a concentração desses elementos é mais importante no meio do que a forma como eles são utilizados (DUNCAN, 1973).

Segundo CARNEIRO (1986) *P. lilacinus* não apresenta atividades celulolítica e pectinolítica, é fracamente hemicelulolítico; porém apresenta bom poder ligninolítico. Apresenta-se fortemente amilolítico e proteolítico (ANDREEVA et alii, 1972; BORUT, 1960; DOMSH, 1960; JANKE & HOLZER, 1929; NORDBRING-HERTZ, 1968). A sua atividade quitinolítica é moderada (NORDBRING-HERTZ, 1968; OKAFOR, 1967).

É citado o efeito antibiótico (BILAI et alii(a) 1964; MARCHISI & COLLA, 1972) e fungistático (BILAI et alii (b), 1964; BRIAN & HEMMING, 1947) do filtrado de cultura de *P. lilacinus* e dois antibióticos que dele são extraídos: a lilacinin mais ativa contra os fungos do que contra as bactérias GRAM+ (YAMANO, 1971) e a leucostatina fortemente bactericida (GRAM+) e fungicida (ARAI et alii, 1973).

P. lilacinus tem sido encontrado com alta frequência em solos tratados com fungicidas, captan, quin-tozene, thiran e benomyl (WAINWRIGHT & PUGH, 1975). A germinação dos conídios é inibida por fatores micostáticos do solo (DIX, 1972).

2.3. Modo de infecção de *P. lilacinus*

As relações entre fungos e nematóides são provavelmente multidimensionais e variáveis. Os tipos prin-

cipais de atividades que afetam deletériosamente a fase reprodutiva do ciclo do nematóide, são o rompimento enzimático de elementos estruturais e fisiológicos e distúrbios metabólicos conduzidos a partir da biossíntese e transferência de substâncias tóxicas difusíveis pelo fungo (MORGAN-JONES et alii, 1983, 1984a).

P. lilacinus se caracteriza por atacar massas de ovos de nematóide exercendo uma pressão rigorosa na sua capacidade reprodutiva, antes do início de seu ciclo reprodutivo (DUNN et alii, 1982).

Os ovos do gênero *Meloidogyne* são envolvidos por uma matriz gelatinosa de natureza glicoprotéica secretada por seis células glandulares retais (BIRD & ROGERS, 1965) que asseguram uma proteção aos ovos contra a dessecação (WALLACE, 1968).

Da forma como os ovos se apresentam graças a natureza da sua parede, o ovo é o estágio do ciclo de vida do nematóide mais resistente, porém, sua imobilidade o torna mais vulnerável que os estágios móveis ao ataque de micélio dos fungos do solo (MORGAN-JONES & RODRIGUEZ-KABANA, 1985).

DUNN et alii, (1982) observaram a penetração dos ovos de *Meloidogyne* por hifas de *P. lilacinus* (Fig. 2A e 2B). A parede dos ovos dos nematóides consti-

tuem-se de três camadas, uma membrana vitelínica externa, delgada de natureza proteica, uma camada intermediária espessa de quitina e uma camada lipídica interna (BIRD, 1968). Ocorre a penetração hifal através dos poros minúsculos formados a partir da dissolução da camada vitelínica, devido provavelmente a um enfraquecimento enzimático desta camada, a camada de quitina é então exposta ao fungo sendo quebrada por ele. Devido a vacúolos que se formam entre a camada quitinosa e a lipídica ocorre entumescimento do ovo, e a camada lipídica que seria a mais interna quase que desaparece completamente. A penetração da hifa permanece intacta no interior dos ovos, o fungo utiliza todo o material nutritivo de uma possível larva que esteja embrionada então continua a crescer vegetativamente ou ainda formar estruturas de frutificação (MORGAN-JONES & RODRIGUEZ-KABANA, 1985).

2.4. Potencial de biocontrole de *P. lilacinus*

É conhecido há mais de cinquenta anos a existência de patógenos obrigatórios como os fungos, em presença de cistos e de ovos de nematóides fitoparasitas (KORAB, 1929; RADEMACHER & SCHMIDT, 1933; ROZYSPAL, 1934; VAN DER LAAN, 1953 e 1956), mas o interesse pelo seu potencial de biocontrole veio a ocorrer no último decênio.

No que diz respeito ao gênero *Meloidogyne*

poucos trabalhos são conhecidos. da microflora característica a respeito de seu estágio larval (LINFORD & OLIVEIRA, 1938), bem como no fato de que massas de ovos estão suscetíveis à ação desses parasitas. Foi entre 1978 e 1979, que STIRLING e MANKAU observaram na Califórnia um parasita ativo e específico de massas de ovos de *Meloidogyne:Dactylella oviparasitica*. Em seguida JATALA et alii (1979) observaram no Perú, ovos de *Meloidogyne incognita* presente sobre raízes de batata parasitados por *P. lilacinus*. O primeiro experimento de inoculação realizado por estes autores, mostrou que o fungo parasitava as fêmeas e os ovos de *Meloidogyne*, assim como os cistos de *Globodera pallida* (STONE) BEHRENS e destruía 80 a 90% dos ovos da primeira geração, após dez a doze semanas de incubação. Em 1981, FRANCO et alii, estudaram em laboratório, o biocontrole de *G. pallida* por *P. lilacinus* e observaram que houve redução da eclosão dos ovos estimulados pela exposição em meio de exsudatos de raízes de batata, mostrando a correlação com aumento da infestação dos ovos pelo fungo. Outros experimentos conduzidos em 1980 e 1981 por JATALA et alii, no campo, em batatas cultivadas em parcelas enriquecidas com matéria orgânica (10t/ha) e tratadas com diversos nematicidas (50kg/ha de Nematicur 50; 5kg/ha de Furadan 50; 2,5 kg/ha de Temik 10G), comparando os tratamentos juntamente com *P. lilacinus*. O controle de *Meloidogyne* pelo fungo foi confirmado, pois 86% das massas de ovos estavam

infectadas, a metade dos ovos destruídos e o índice de galhas foi reduzido significativamente quando comparado com os outros tratamentos. Este foi o primeiro relato de uma aplicação bem sucedida de biocontrole de *M. incognita* sob condições de campo.

P. lilacinus tem sido frequentemente isolado em laboratório, de ovos de *Meloidogyne arenaria* de amendoim (GODOY et alii, 1983), a partir de ovos de *M. incognita* (MORGAN-JONES et alii, 1984b), de cistos de *Heterodera glycines* de soja (GINTIS et alii, 1983), mostrando a sua frequência quando comparado com outros fungos parasitas de ovos. Estudos preliminares em casa de vegetação indicaram que *P. lilacinus* é eficiente na redução de infestações por *M. arenaria* (GODOY et alii, 1983). Uma redução de 54% no número de galhas por grama de raiz fresca foi registrado nos solos os quais *P. lilacinus* foi acrescentado, como oposto ao solo controle. Os fungos foram recuperados no final do experimento com alta frequência no solo ao qual tinha sido adicionado, indicando boa competitividade e capacidade de colonização. Pequenos blocos de tomate (*Lycopersicum esculentum* cv. Tropic) altamente infestados com *Meloidogyne javanica* foram tratados com *P. lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*. Observou-se que após o tratamento a população de ovos foi diminuída em 80% nos tratamentos com os dois fungos (GASPARD & MANKAU, 1985).

Nem todas as linhagens de *P. lilacinus* apresentam a mesma eficiência, DUNN et alii (1982) observaram que uma linhagem proveniente de solos agrícolas mexicanos, isolada próximo de *Sclerotinia minor*, foi incapaz de colonizar ovos de *M. incognita*. RODRIGUEZ-KABANA et alii (1984) observaram que uma linhagem isolada de ovos de *M. arenaria* foi bem mais eficaz contra o nematóide que uma linhagem isolada de inseto (Equador) e ainda mais eficaz que uma linhagem isolada de *H. glycines*, este último entretanto mais frequente no solo.

Estas observações sugerem a existência de biotipos de *P. lilacinus* diferentes quanto a sua amplitude e estabilidade no solo bem como sua capacidade de controle de *Meloidogyne* e sua importância na escolha do isolado para determinar a eficiência relativa de uma linhagem.

Sua importância como agente no controle biológico recentemente entrou em evidência nos campos infestados por *M. incognita* na Malásia, Panamá, Perú, Filipinas, Porto Rico, Estados Unidos e outros países (CANDANEDO et alii, 1983) o que justifica a extensão de seu emprego como nematicida.

Nas Filipinas o produto, chamado "BIOCON" desenvolvido por DAVIDE (TIMM, 1988) é utilizado em grande escala no controle de nematóides que parasitam ovos e

também no controle de *Radopholus similis*.

2.5. Melhoramento genético em fungos

As duas molas mestras da variabilidade existente entre os organismos são a mutação e a recombinação quer sejam elas espontâneas ou induzidas. Assim um programa de melhoramento genético de um microrganismo útil no controle biológico pode ter início através do isolamento, caracterização e seleção de linhagens mais virulentas e mais agressivas ao hospedeiro de interesse.

Muitos agentes físicos e químicos podem aumentar grandemente a frequência espontânea de mutação aumentando a variabilidade natural. Porém como as mutações são aleatórias, pode ocorrer o aparecimento de muitos mutantes com características indesejáveis juntamente com aqueles de interesse, daí a importância do conhecimento de técnicas seletivas. (AZEVEDO, 1986).

Além da mutação que é responsável pela geração de variabilidade, os diferentes mutantes gerados podem combinar-se diferentemente no mesmo ou em indivíduos distintos pela recombinação. Por meio da recombinação é possível combinar características consideradas 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 sabe-se que entre eles o ciclo sexual é ausente e ainda são poucos os que possuem o ciclo parassexual bem definido.

O ciclo parassexual foi descoberto em *Aspergillus nidulans* por PONTECORVO & ROPER (1952), e desde então vem sendo intensamente estudado.

Segundo PONTECORVO (1956) o ciclo parassexual é caracterizado pela seguinte sequência de eventos: heterocariose, fusão de núcleos originando diplóides heterozigotos e produção de recombinantes via permuta genética e haploidização.

A heterocariose é estabelecida através da fusão de hifas com mutantes auxotróficos diferentes e complementares em meio não suplementados. Além da origem pela anastomose de hifas adjacentes e migrações de núcleos de uma hifa para outra (ROPER, 1952), a heterocariose pode ocorrer por mutação (CUNHA, 1969; ISHITANI & SAKAGUCHI, 1956; TINLINE, 1962). Como os conídios no heterocário são haplóides, estes apresentam as deficiências nutricionais de uma ou de outra linhagem parental, sendo portanto, incapazes de crescer em meio mínimo.

Como consequência da proximidade de núcleos diferentes no mesmo citoplasma, existe a possibilidade de ocorrer a fusão de núcleos ou cariogamia, originando conídios diplóides heterozigotos e prototróficos. A frequência desse evento é normalmente muito baixa (1 diplóide por 10^4 a 10^7 conídios coletados de heterocário) mas esta frequência pode ser aumentada com a utilização de agentes físicos como a luz ultra-violeta (ISHITANI et alii, 1956) ou agentes químicos como a colchicina (SHCHERBAKOVA & RESVAYA, 1978) e cânfora (DAY & JONES, 1969; PONTECORVO et alii, 1953a, 1953b; ROPER, 1966).

Os diplóides somáticos heterozigotos assim obtidos assemelham-se as linhagens selvagens com relação a características morfológicas e nutricionais, e alguns critérios para confirmação do diplóide são: (a) crescimento da colônia com as propriedades fenotípicas esperadas de acordo com as linhagens haplóides cruzadas; (b) conteúdo de DNA por núcleo (HEAGY & ROPER, 1952); (c) volume dos conídios quando comparados com a linhagem haplóide, sendo que algumas vezes o diplóide pode apresentar o volume igual ao dobro do haplóide (*A. nidulans*; ROPER, 1952) e em outros não (*Ustilago maydis*; HOLLIDAY, 1961; *Cochiliobolus sativus*; PAPA, 1973; TINLINE, 1962; MESSIAS, 1977 em *A. flavus* e PAPA, 1978 em *A. parasiticus*).

ISHITANI et alii (1956) verificaram que *A. sojae* e *A. oryzae*, apesar de não haver diferença em relação ao volume dos conídios, diplóides podem ser separados de haplóides pela frequência do número de núcleos por conídio. Resultados semelhantes são reportados por MESSIAS e AZEVEDO (1980).

A condição diplóide permite a formação de recombinantes que surgem por permuta mitótica e/ou não disjunção mitótica, eventos que podem ser seguidos ou não pela haploidização.

Além de sua importância como fonte de variabilidade, o ciclo parassexual favorece estudos de ordem genética, como por exemplo, mapeamento genético em fungos imperfeitos (AZEVEDO, 1972, 1976), melhoramento de características de interesse econômico (BONATELLI JR, 1977; MESSIAS, 1979; SERMONTI, 1969) e ainda estudos de origem e relações genéticas entre raças fisiológicas de fungos fitopatogênicos (AZEVEDO, 1976).

Além das 41 espécies de fungos filamentosos pertencentes a vários gêneros nas quais a parassexualidade foi demonstrada (AZEVEDO, 1976; MESSIAS, 1979), outras espécies como os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (MESSIAS & AZEVEDO, 1980) e *Paecilomyces fumos-roseus* (RIBA & RAVELOJOANA, 1984), foram relatados como

possuindo este ciclo.

Estudos genéticos no gênero *Paecilomyces* são escassos e as tentativas de obtenção de heterocário descritas na literatura não apresentaram resultados satisfatórios.

RIBA et alii (1980) demonstraram a possibilidade de obtenção de recombinantes mitóticos estáveis em *P. fumoso-roseus* através da fusão de protoplastos de linhagens marcadas geneticamente.

Em alguns casos, como já verificado em algumas linhagens de entomopatógenos e mesmo em outras de interesse industrial, o cruzamento via ciclo parassexual é impedido devido a incompatibilidade genética entre linhagens, então, lança-se mão da técnica da fusão de protoplastos.

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

Figura 1 - *Paecilomyces lilacinus*

cof = conidióforo
 co = conídio
 br.I = braço primário
 me = metula
 fd = fiálide

Figura 2A - Ovo de *Meloidogyne incognita* parasitado por *P. lilacinus* (as setas indicam a hifa emergindo do ovo colonizado) (modificado de DUNN et alii, 1982).

Figura 2B - Penetração do ovo de *Meloidogyne arenaria* por *P. lilacinus* (esquemático). (Baseado em MORGAN-JONES et alii, 1984).

hi = hifa infestante
mv = membrana vitelínica
cq = camada quitinosa
cl = camada lipídica

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagem Utilizada

A linhagem utilizada de *Paecilomyces lilacinus* originalmente isolada de ovos de *Meloidogyne incognita* em cultura de batata do CIP (International Potato Center) no Perú foi fornecida gentilmente pela Dra. Regina Maria D. Gomes Carneiro (Centro Nacional de Pesquisas de Fruteiras de Clima Temperado (CNPFT/EMBRAPA-Pelotas, RS).

3.2. Meios de Cultura

3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO et alii, 1953)

NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl	0,5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g

Glicose	10,00g
Ágar Difco	15,00g
Água destilada	1000,00ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 10% (p/v)	

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

Adicionou-se ao meio mínimo (item 3.2.1.)

Peptona	2,0g
Caseína hidrolizada	1,5g
Extrato de Levedura	0,5g
Solução de vitaminas	1,0ml
Solução de ác.nucléicos	1,0ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 10% (p/v)	

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

Preparado segundo o item 3.2.1, não sendo adicionado ágar.

3.2.4. Meio Batata-Glicose-Ágar (BDA).

Batata	200,0g
Dextrose	20,0g

Ágar	15,0g
Água destilada	1000,0ml
pH ajustado para 6,0 com NaOH 4%	

3.2.5. Meio Batata-Glicose Líquido

Preparado segundo o item 3.2.4, não sendo adicionado ágar.

3.2.6. Meio de Malte

Malte	2%
Ágar	1,5%
Água destilada	1000,0ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.7. Meio Mínimo acrescido de 4% de Meio de Batata-Glicose-Ágar

Adicionou-se a o meio mínimo líquido (item 3.2.3.) 4% de meio de Batata-Glicose-Ágar líquido (item 3.2.5.). Distribuiu-se 2,5 ml em tubos que foram autoclavados e conservados em refrigerador a 4 ° C.

3.2.8. Meio BDA com estabilizador osmótico.

Preparado segundo o item 3.2.5 em dupla concentração. No momento do uso foi diluído em KCl 0,8M;

1,0M; 1,2M (item 3.2.4) na proporção de 1:1.

3.2.9. Meio ágar-água.

Ágar	15,0g
Água	1000,0ml

3.3. Soluções Utilizadas

3.3.1. Solução de vitaminas

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

A solução foi colocada 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	100,0mg
Água destilada esterilizada	10,0ml

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

3.3.3. Solução de ácido nucleico.

Ácido nucleico de leveduras: 2,0g em 15 ml de solução 1N de HCl

Ácido nucleico de leveduras: 2,0g em 15 ml de solução 1N de NaOH

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 40ml com água destilada. Autoclavou-se e a solução foi conservada em refrigerador a 4 C.

3.3.4. Solução salina (0,85%)

NaCl	8,5g
Água destilada	1000,0ml

A solução foi distribuída em frascos (9 ml por frasco), autoclavada e conservada em refrigerador a 4 C.

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

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

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

3.3.6. Soluções estoque dos suplementos adicionados ao meio mínimo

Os estoques de suplementos foram preparados adicionando-se cada um deles em frascos escuros contendo 10ml de água destilada esterilizada. Estes foram posteriormente aquecidos por 15 minutos e conservados no refrigerador a 4 C.

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

A solução de albumina foi obtida colocando a clara de ovo em um becker e esta foi 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.

3.3.8. Soluções de álcool etílico

As soluções foram preparadas nas concentrações 95 e 70%. As diluições do álcool para produção das soluções foram realizadas com água destilada.

3.3.9. Solução de Giemsa

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

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

3.3.10. Solução de Fixação

Esta solução foi preparada no momento do uso, na proporção de 3 álcool etílico absoluto : 1 ácido acético glacial.

3.3.11. Solução de Benomyl (50% de princípio ativo)

1 - (Butilcarbamil) - 2 - benzimidazol

carbamato de metila (Benlate)	100,0mg
Água destilada esterilizada	100,0ml

O Benomyl foi dissolvido em 1ml de acetona e acrescentou-se a água.

3.3.12. Solução de Dietilsulfato (DES) (DUARTE, 1971).

Dietilsulfato (DES)	0,1ml
Solução de "Tween 80" 10% v/v	4,9ml

3.3.13. Solução de enzima para a produção de protoplastos (HAMLYN et alii, 1981)

Estabilizador osmótico (KCl 0,8, 1,0 ou 1,2M)	5,0ml
Novozym 234 ("Novo Industries")	2,5mg
Celulase CP ("John & Sturge")	2,5mg

3.4. Tampões e estabilizadores osmóticos utilizados

3.4.1. Tampão fosfato 0,125M pH 7,0

KH ₂ PO ₄	5,304g
K ₂ HPO ₄	10,614g
Água destilada	100,0ml

O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 10% (p/v).

3.4.2. Tampão fosfato 0,2M pH 5,8

Solução A:

NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	24,0g
Água destilada	1000,0ml

Solução B

Na HPO_2	12	H ₂ O	71,6g
	2	4	2
Água destilada			1000,0ml

Na obtenção da solução tampão 0,2M pH 5,8, misturou-se uma proporção de nove para um das soluções A e B, respectivamente. O pH foi ajustado com as soluções A e B e completado até 1000ml com água destilada. As soluções A e B foram mantidas separadamente em refrigerador.

3.4.3. Tampão fosfato 0,02 M pH 7,0

Solução A

NaH_2PO_4	12	H ₂ O	3,73g
	2	4	2
Água destilada			1000,0ml

Solução B:

KH_2PO_4			2,40g
	2	4	
Água destilada			1000,0ml

Na obtenção da solução tampão pH 7,0 misturou-se uma proporção de sete para três das soluções A e B, respectivamente.

3.4.4. Tampão fosfato 0,02M pH 5,6

Solução A:

NaH_2PO_4			2,4g
	2	4	
Água destilada			1000,0ml

Solução B:

Na HPO ₂	2,8g
4	
Água destilada	1000,0ml

Na obtenção da solução tampão 0,02M pH 5,6 misturou-se uma proporção de nove para um das soluções A e B respectivamente. O pH foi ajustado com as soluções A e B e completado até 1000ml com água destilada.

3.4.5. Estabilizador osmótico KCl 2,4 M

Dissolveu-se 178,94g de KCl em aproximadamente 500ml de solução A de tampão fosfato 0,2M. Agitou-se em agitador magnético até a dissolução total e levou-se ao potenciômetro adicionando-se solução B de tampão fosfato 0,2M até o pH 5,8. Completou-se o volume até 1000ml com tampão fosfato 0,2M pH 5,8. Autoclavou-se e conservou-se em refrigerador.

3.4.6. Outras soluções de KCl

Soluções de KCl 2,0; 1,6; 1,2; 1,0; 0,8M foram feitas a partir da diluição da solução de KCl 2,4M com tampão fosfato 0,2M pH 5,8.

3.4.7. Estabilizador osmótico MgSO₄ 1,6M

Dissolveu-se 394,37g de MgSO₄ . 7H₂O em aproximadamente 500ml de solução A de tampão fosfato 0,02M.

Agitou-se em agitador magnético até a dissolução total e levou-se ao potenciômetro adicionando solução B de tampão fosfato 0,02M até o pH 5,6 e completou-se o volume até 1000ml com tampão fosfato 0,02M pH 5,6. Autoclavou-se e conservou-se em refrigerador.

3.4.8. Outras soluções de $MgSO_4$

4

Soluções de $MgSO_4$ 1,2; 0,8 e 0,6M foram obtidas a partir da diluição da solução de $MgSO_4$ 1,6M com tampão fosfato 0,02M pH 5,6.

4

3.5. Preparo de filtros, palitos de transferência e esterilização.

3.5.1. Sistema de filtros para técnica de enriquecimento.

No interior de filtros de vidros foram fixadas seis camadas de gaze (mantidas esticadas) com auxílio de fita crepe. Este conjunto foi envolto em papel alumínio a 120°C.

3.5.2. Uso de palitos esterilizados para transferência de colônias.

Palitos roliços adquiridos no comércio foram lavados em água por 6 vezes consecutivas e esterilizados em forno por 3 horas. Depois de usados foram novamente lava-

dos, secos e esterilizados para posterior uso.

3.5.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções utilizadas foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 graus centrígrados. A temperatura de incubação foi de 28 graus centígrados.

3.6. Coloração de núcleos de conídios (TANAKA et alii, 1979).

3.6.1. Limpeza das lâminas e lamínulas

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

3.6.2. Preparo da lâmina

Espalhou-se uma pequena gota de albumina 50% (item 3.5.7) com o dedo sobre uma lamínula. A lamínula foi passada várias vezes sobre uma chama de bico de Bunsen para secar bem. Para visualização de núcleos e conídios, a lamínula foi pressionada sobre conídios previamente cultivados em BDA por 7-8 dias a 28^o C.

O material foi fixado durante 15 minutos em uma solução de álcool etílico; ácido acético na proporção de 3:1, a temperatura ambiente. A seguir fez-se a hidra-

tação em solução de álcool 95 e 70% e água destilada por cinco minutos em cada fase. Posteriormente o material sofreu hidrólise ácida em presença de HCl 1N a 62°C durante 11 minutos em banho-maria. Lavou-se por 3 vezes consecutivas em água destilada e uma vez em solução tampão fosfato 0,125M pH 7,0 sendo a seguir efetuada a coloração do material.

3.6.3. Coloração

O material foi corado com 9ml de solução de tampão fosfato pH 7,0 (item 3.4.1.) mais 1 ml de Giemsa (item 3.3.9.) durante 20-30 minutos. O excesso do corante foi retirado por lavagem com o mesmo tampão e levado para observação ao microscópio ótico.

3.7. Medida do tamanho dos conídios

Conídios provenientes de cultura de 8 dias de crescimento, foram colocados com auxílio de palitos de madeira esterilizados (item 3.5.2) em uma gota de água sobre uma laminula e cobertos com laminula, e o diâmetro dos mesmos foi estimado com auxílio de uma ocular micrométrica Carl Zeiss 4892628 (8x) em objetiva de 100x.

3.8. Determinação do número de núcleos por conídio.
(ROBINOW & CATEN, 1969).

Conídios desenvolvidos em MM e MC por 7-8 foram preparados como nos itens 3.6.2. e 3.6.3. e assim determinou-se a porcentagem média do número de núcleos por conídios. Foram empregados 400 conídios.

3.9. Crescimento da linhagem selvagem em diferentes meios de cultivos.

A linhagem foi inoculada, com fio de platina no centro das placas contendo meio mínimo (item 3.2.1.), meio BDA (item 3.2.4.), meio completo (3.2.2.) e meio de malte (item 3.2.6.).

A variabilidade no crescimento apresentada pela linhagem foi verificada através da medida do diâmetro das colônias em centímetros com 7, 10 e 14 dias de crescimento.

3.10. Sobrevivência a luz ultra-violeta (AZEVEDO & COSTA, 1973).

Foram feitas suspensões de conídios da linhagem 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 (10⁷ conídios/ml). Essas suspensões foram diluídas em solução salina 0,85% até conter

cerca de 10^6 conídios/ml. Irradiou-se em placas de Petri esterilizadas, sob ultra-violeta de ondas curtas (5 joules/m²/s) Mineralight Lamp model UVSL-25 115 volts 60H 0,16 Amps), no escuro em diferentes tempos de exposição. 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 BDA. As placas foram incubadas a 28⁰ C em ausência de luz durante 7-8 dias, e o número de colônias sobreviventes 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:

$$\frac{\text{número de colônias}}{\text{número de colônias no tempo}} \times 100$$

Foi estimado deste modo, o tempo de irradiação que permite 5% de sobrevivência.

3.11. Sobrevivência a radiação Gama

Uma suspensão de conídios de *P. lilacinus* foi feita em solução de "Tween 80" e o número de conídios/ml foi estimado em câmara de Neubauer. Essa suspensão foi diluída em solução salina 0,85% até 10^6 conídios/ml. Tubos de ensaio com volume de 1 ml desta concentração de conídios foram irradiados com raios gama (Fonte

60

de Co - CENA - USP) a uma distância da fonte de 26cm, com uma taxa de dose de 2 225,07 Gray por hora. As doses acumulativas foram de 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 Gray. O controle foi um tubo com o mesmo volume que não foi irradiado. Após irradiação, alíquotas de 1,0ml foram retiradas de cada tubo, convenientemente diluídas em solução salina 0,85% e 0,1 ml de cada diluição semeada em placas com meio BDA e incubadas a 28 °C por 7 dias. A contagem de colônias isoladas por placa foi feita após este período e a curva de sobrevivência foi traçada considerando-se o número de colônias obtidas na dose 0 (controle) de irradiação como sendo 100% de sobrevivência. Para a determinação da porcentagem de sobrevivência nas demais doses, procedeu-se como no item 3.10. Foi estimado deste modo, o tempo de irradiação que permitiu 1% de sobrevivência.

3.12. Sobrevivência ao DES (DUARTE, 1971)

Uma suspensão de conídios de *P. lilacinus* foi diluída em solução salina 0,85% para a concentração aproximada de $1,5 \times 10^6$ conídios/ml.

Foi inoculado em cada tubo com 5,0ml de solução de DES (item 3.3.12.), 1,0 ml da suspensão de conídios. O controle do experimento foi feito a partir de um tubo com 5,0 ml de solução "Tween 80" 10% mais 1,0 ml da suspensão de conídios. Os tubos inoculados foram mantidos

em banho-maria a 28 graus centígrados durante 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. Após esses períodos uma alíquota de 1,0 ml foi retirada de cada tubo e convenientemente diluída, sendo 0,1 ml de cada diluição semeada em placas com meio BDA. As placas controles foram consideradas como 100% de sobrevivência. Para a determinação da porcentagem de sobrevivência nos demais tempos do tratamento procedeu-se como no item 3.10.

3.13. Obtenção de mutantes auxotróficos

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

Conídios da linhagem *P. lilacinus* foram colocados em solução de "Tween 80", foram contados em hemátimetro onde procurou-se obter 10^7 conídios/ml. Suspensões de conídios foram diluídas em solução salina 0,85%(1:10) e submetidas ao tratamento com os mutagênicos ultra-violeta e raios gama, na dose necessária para obter 5% de colônias sobreviventes que foram obtidas com 4 minutos de exposição em ultra-violeta, e 1% de sobrevivência encontradas submetendo-se os conídios a uma dose de 600 gray de raios gama, a partir da fonte de ^{60}Co descrita no item 3.11. Posteriormente estas suspensões irradiadas foram diluídas e semeadas em meio BDA. Depois de 7-8 dias de crescimento a 28°C as colônias sobreviventes foram transferidas para meio mínimo

uma a uma com auxílio de palitos de madeira esterilizados na disposição $5 \times 5 + 1$ (26 pontos) (AZEVEDO et alii, 1976), e incubadas a 28°C durante 7-8 dias. Assim as colônias que não se desenvolveram neste meio foram consideradas possíveis mutantes auxotróficos.

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

Após o tratamento apropriado com a luz ultravioleta (item 3.10), na dose necessária para obter 5% de conídios sobreviventes foram colocados 3 ml da suspensão de conídios em erlenmeyers contendo 50 ml de meio mínimo líquido. Deixou-se incubando por 24 horas em agitador rotatório a 150-180 rpm a uma temperatura de 28°C . Findo este período, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em 4 camadas de gaze esterilizado em capela de fluxo laminar. O mesmo procedimento foi repetido com 48 e 72 horas de incubação. Após a última filtração, passou-se o filtrado para tubos plásticos de centrifuga (dividindo-se em alíquotas iguais) e centrifugou-se por 10 minutos a 4 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi coletado com pipeta, recolhido em 3 ml de solução salina e diluído em diluições adequadas. Posteriormente plaqueou-se 0,1 ml das soluções em placas de Petri contendo meio BDA e incubou-se a 28°C . Depois de 4-5 dias verificou-se crescimento. As colônias foram transferidas para meio mínimo em

placas com 26 pontos a fim de averiguar a presença de auxotróficos.

3.14. Obtenção de mutantes morfológicos.

Os mutantes morfológicos foram selecionados através de observação visual da morfologia alterada da colônia após tratamento com mutagênicos ultra-violeta, radiação gama e dietilsulfato.

3.15. Caracterização dos mutantes auxotróficos (AZEVEDO & 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 BDA.

Após 10 dias de crescimento a 28^o C, essas colônias foram analisadas quanto a 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 nucléico (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 nucléicos 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 acima, acrescentando ao meio de caracterização o requisito nutricional referente a mutação simples.

3.16. Teste de reversão.

As linhagens duplo mutantes foram ensaiadas quanto a reversão das marcas nutricionais. Para tanto, concentrações de 10^7 conídios/ml foram obtidas, sendo 0,1ml da suspensão foi semeado em meio mínimo com um dos requisitos nutricionais no caso de mutantes com dupla

deficiência. O crescimento foi verificado após 96 horas de incubação.

3.17. 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.

3.18. Crescimento e conidiação em meio BDA.

Os esporos da linhagem selvagem e das linhagens mutantes foram inoculados com auxílio de uma alça de platina no centro da placa contendo meio BDA.

A variabilidade no crescimento apresentada pela linhagem selvagem e pelas linhagens mutantes foi verificada através da medida do diâmetro das colônias (cm) após 15 dias de crescimento.

Para a determinação da quantidade de esporos produzidos pelas linhagens, três discos de 0,5 cm de diâmetro cada um, foram retirados após 15 dias de crescimento e colocados em tubos com 2,5 ml de solução "Tween 80". Após agitação para desagregação dos esporos, o seu número foi estimado através da contagem em câmara de Neubauer, e a produção avaliada em relação a área da colônia através da seguinte relação:

∅ disco.....esporulação da linhagem
(média de 3 contagens)

∅ colônia..... X

X = esporulação da colônia

Para tal experimento, utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado.

3.19. Verificação da estabilidade genética

O cultivo de *P. lilacinus* com fio de platina, foi feito em placas com meio BDA. O inóculo foi feito a partir de uma colônia isolada. As placas foram incubadas por 7 dias, visando a verificação da possibilidade de liberação de setores.

3.20. Curva dose-resposta ao fungicida Benomyl

Suspensões de conídios da linhagem selvagem proveniente de cultura de 8 dias de crescimento foram diluídas em solução salina e alíquotas de 0,1 ml semeadas em placas com BDA contendo concentrações crescentes de Benomyl. Após 10 dias de incubação a 28 °C contou-se o número de colônias que se desenvolveram nestas placas. Concomitantemente, com um fio de platina, os conídios foram repicados em placas de BDA com as mesmas concentrações crescentes do fungicida. Foi calculada a dose de Benomyl necessária para inibir em 50% o crescimento das colônias.

3.21. Análise genética

3.21.1. 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% do meio BDA (item 3.2.7.). Após 7 dias de inoculação 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 7 dias de crescimento a 28 °C.

3.21.2. Isolamento de colônias prototróficas

Conídios foram coletados de setores heterocarióticos em solução de "Tween 80" e semeados em placas de Petri contendo meio mínimo sólido. Foram utilizadas concentrações de 10^6 a 10^7 conídios por placa, sendo o número de conídios estimado em Câmara de Neubauer. As placas foram incubadas por 5-7 dias. As colônias que cresceram isoladas com coloração de conídios e morfologia uniformes, foram selecionadas e seus conídios transferidos para meio mínimo sólido por estria. Após 4 a 6 dias foi observado o crescimento de colônias isoladas, que no critério seletivo adotado deveria ter a coloração de conídios e a morfologia semelhantes a colônia original.

3.22. Produção de protoplastos.

Cerca de 10^7 conídios/ml de uma suspensão de "Tween 80" foram inoculados em 50 ml de meio de Batata-Glicose líquido (item 3.2.5.) em frascos de 125 ml. As culturas foram incubadas sob agitação (150 rpm) a 28°C durante 24 horas. Após este período, o conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo em papel filtro e lavado com 5 ml de KCl 0,8, 1,0 ou 1,2M (itens 3.4.5. e 3.4.6.), MgSO_4 0,6 ou 0,8M (itens 3.4.7. e 3.4.8.). O peso úmido do micélio foi determinado e montado o seguinte sistema lítico (em erlenmeyer de 50 ml):

- a. solução osmótica (KCl 0,8, 1,0 ou 1,2 M, MgSO_4 0,6M ou 0,8M)
- b. Novozym 234 ("Novo Industries"): 25,0mg
- c. Celulase CP ("John & Sturge"): 25,0mg
- d. Micélio úmido : 250mg

Incubou-se durante 3 horas a 28°C em agitador rotatório (150 rpm) para que ocorresse a digestão enzimática da parede celular. Após as 3 horas os protoplastos foram coletados através de centrifugação a 400 rpm /30 segundos e observados ao microscópio ótico a fim de constatar a presença de protoplastos. Utilizou-se o sobrenadante, sendo o precipitado descartado. O sobrenadante

foi centrifugado a 400 rpm / 10 minutos e o precipitado foi ressuspensão em 4 ml do estabilizador em uso, sendo que esta operação foi repetida por mais duas vezes. Posteriormente foi feita a contagem em câmara de Neubauer no microscópio ótico.

3.23. Regeneração dos protoplastos

Os protoplastos obtidos segundo o item 3.22. foram diluídos no estabilizador em uso e semeados (0,1 ml) em placas com meio de regeneração (meio BDA + KCl 0,8 M; meio BDA + KCl 1,0M; meio BDA + KCl 1,2M; meio BDA + MgSO₄ 0,6 M; meio BDA + MgSO₄ 0,8M) e incubados por 72 a 96 horas, sendo que o mesmo procedimento foi utilizado usando-se meio BDA sem estabilizador osmótico (controle). Após esse período a contagem das colônias desenvolvidas no meio controle indicou o número de conídios e fragmentos viáveis, enquanto que em meio com BDA mais estabilizador osmótico destes, houve crescimento dos protoplastos. A diferença do número de colônias entre estes dois meios possibilitou o cálculo da frequência de regeneração de protoplastos, o qual foi feito pela fórmula:

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

a = número de colônias crescidas em meio BDA com estabilizador osmótico

b = número de colônias crescidas em meio BDA

c = número de protoplastos em suspensão

3.24. Coloração de protoplastos (BORGES, 1987).

Duas a três gotas do precipitado obtido na primeira centrifugação (400 rpm / 30 segundos do item 3.22.) foram colocados em lâminas bem limpas, inclinadas aproximadamente 45 graus. Estas lâminas foram deixadas por 15 minutos a temperatura ambiente para secagem, sendo após esse período imersas, por 5 minutos, em metanol absoluto. Posteriormente as lâminas foram parcialmente secas (à temperatura ambiente) e imersas em HCl 1N por dois minutos a 60 °C, lavadas em água corrente e água filtrada. Sobre a lâmina foi colocada uma camada de tampão fosfato 0,02 M pH 7,0, gotejando-se 3 a 5 gotas de Giemsa e deixando corar por dois minutos. Lavou-se em água corrente e depois que as lâminas secaram fez-se a montagem da lamínula e observou-se ao microscópio ótico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Verificação do crescimento em diferentes meio de cultivo

O estabelecimento de meios de cultivo definidos é importante no estudo genético de microrganismos, uma vez que diferenças tanto no tipo quanto na quantidade de fonte de carbono e nitrogênio podem provocar respostas distintas no crescimento da linhagem em estudo.

Segundo DUNCAN (1973) *P. lilacinus* utiliza formas minerais e orgânicas de nitrogênio (NO_3 , NH_4 , extra-
to de levedura Difco e peptona Difco). Ele considera que a concentração destes elementos é mais importante que a forma como ele é utilizado.

P. lilacinus é tipicamente heterotrófico, encontra suas fontes de carbono e energia de um grande número de compostos carbônicos, na maioria monossacarídeos (hexoses e pentoses) e dissacarídeos; ele degrada igualmente as pentosanas (xilanas) nas formas 1,6A -1,3B et 1,6B gluacanases (BROWN, 1972; LASKIN & LECHEVALIER, 1973; SIMON-

SON & LIBERTA, 1975)

Um teste com diferentes fontes de açúcares (frutose, glucose, arabinose, xilose, sacarose e maltose) em meio líquido CZAPEK-PITT, mostrou que a linhagem de *P. lilacinus* desenvolveu-se da mesma maneira nos seis açúcares.

Os resultados das análises de variância para o caráter medida do diâmetro da colônia em diferentes meios de cultivo estão apresentados nas Tabelas 1, 3 e 5 do Apêndice. Pela análise de variância pode-se verificar que foram obtidos coeficientes de variação experimental que podem ser considerados satisfatórios. Observou-se ainda que para o intervalo de tempo de 7 dias houve diferença significativa entre tratamentos ao nível convencional de probabilidade, devemos ainda observar que o valor obtido para F (3.20) está próximo ao limite de significância de 95% . Para as outras duas leituras (10 dias e 14 dias) o teste de F apresentou-se altamente significativo, indicando a ocorrência de variação de crescimento em função do meio utilizado.

Nas Tabelas 2, 4 e 6 do Apêndice, são apresentadas as médias obtidas nos quatro meios, juntamente é apresentado o Teste de Tukey dando uma indicação das diferenças entre os tratamentos. Foram observadas diferenças

significativas pelo teste de Tukey para o caráter medida do diâmetro da colônia em diferentes meios de cultivo, nos intervalos de tempo de 10 e 14 dias, para o intervalo de tempo de 7 dias não foi observado diferença significativa, embora o teste de F tenha demonstrado significância, tal resultado divergente deve-se ao fato de se tratarem de testes diferentes com níveis de exigência também diferentes. No intervalo de tempo de 10 dias o meio de malte diferiu significativamente do meio BDA e meio mínimo e o meio completo e meio BDA diferiram do meio mínimo. No intervalo de 14 dias o meio completo e meio de malte diferiram significativamente do meio BDA e meio mínimo, mas o meio mínimo e BDA não diferiram entre si, bem como meio de malte e meio completo também não diferiram entre si.

4.2. Medida do tamanho dos conídios e determinação do número de núcleos por conídios.

Foram analisados 300 conídios de *P. lilacinus* onde o diâmetro médio encontrado foi de $2,43 \times 2,23 \mu\text{m}$ o que vai de acordo com os trabalhos de BROWN & SMITH (1957) citados por SAMSON (1974) e DOMSH & GAMS, (1980). Os conídios apresentaram-se elipsoidiais a fusiformes ($2,5-3,0 \mu\text{m} \times 2,0-2,2 \mu\text{m}$ de diâmetro) dispostos em cadeias divergentes, os quais algumas vezes apresentaram-se entrelaçados, com aspecto hialino, clamidósporos estiveram ausentes.

Com relação ao número de núcleos por conídios verificou-se em todos os conídios analisados somente a presença de um núcleo por conídio, o que facilitou a obtenção e seleção de mutantes.

A Figura 3 mostra a coloração dos núcleos de conídios de *P. lilacinus*.

Figura 3 - Coloração de conídios de *P. lilacinus* (aumento de 100x)

4.3. Verificação da Estabilidade Genética

A partir da metodologia descrita no item 3.19 não foram observados setores em todas as 100 colônias ensaiadas em placas de Petri com meio completo, demonstrando assim que a linhagem de *P. lilacinus* possui uma boa estabilidade genética.

4.4. Sobrevivência a mutagênicos físicos e químicos.

Segundo BURNETT (1976), o processo de indução de mutação é reconhecidamente um dos mais utilizados no melhoramento microbiano e geralmente é verificado que um efetivo rendimento de mutantes é somente conseguido quando a proporção de sobreviventes do material exposto ao agente mutagênico é muito baixa, assim como 1 a 5% ou menor ainda. Assim, foram determinados no presente trabalho a dose ou tempo de tratamentos adequados para a obtenção de mutantes, que proporcionasse aproximadamente 1 a 5% de sobrevivência de conídios de *P. lilacinus*.

4.4.1. Sobrevivência a Luz Ultra-violeta

Suspensões de conídios da linhagem de *P. lilacinus* foram irradiadas com luz ultra-violeta como descrito no item 3.10.

A frequência de sobrevivência dos conídios em diferentes tempos de irradiação estão sumarizados na Tabela

i. A partir destes dados foi obtida a curva de sobrevivência que pode ser vista na Figura 4.

A dose capaz de inviabilizar 95% dos conídios foi obtida com um tempo de exposição de 4 minutos para a linhagem de *P. lilacinus*.

Tabela 1 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes em diferentes tempos de irradiação a luz ultra-violeta. (Os dados constituem a média de três repetições).

Tempo de irradiação (minutos)	Número de sobreviventes (conídios/ml)	% relativa de sobrevivência
0	$1,2 \times 10^4$	100
1	$1,0 \times 10^4$	83
2	$1,0 \times 10^3$	46
3	$3,4 \times 10^3$	28
4	$5,0 \times 10^2$	4
8	$0,3 \times 10^1$	0,025

Figura 4 - Curva de sobrevivência da linhagem de *P. lilacinus* em diferentes tempos (minutos) de irradiação a luz ultra-violeta

4.4.2. Sobrevivência a Radiação Gama

Suspensões de conídios da linhagem de *P. lilacinus* foram submetidas a radiação Gama como descrito no item 3.11. A porcentagem de sobrevivência da linhagem a diferentes doses de radiação está sumarizada na Tabela 2, e a respectiva curva de sobrevivência está representada na Figura 5.

Este mutagênico mostrou-se também muito eficiente em inviabilizar conídios de *P. lilacinus*. A dose necessária para causar 99% de letalidade foi de cerca de 600 Gray (Tabela 2).

Tabela 2 - Número e porcentagem de conídios sobreviventes a diferentes doses de radiação Gama (Os dados constituem a média de três repetições).

Dose (gray)	Número de sobreviventes (conídios/ml)	% relativa de sobrevivência
0	$7,8 \times 10^4$	100,00
100	$7,0 \times 10^4$	90,13
200	$5,1 \times 10^4$	61,99
400	$1,0 \times 10^4$	12,82
600	$7,6 \times 10^2$	1,31
800	$1,5 \times 10^2$	0,19
1000	$0,2 \times 10^1$	0,02

Figura 5 - Curva de sobrevivência a radiação Gama da linhagem de *P. lilacinus*.

4.4.3. Sobrevivência ao Dietilsulfato (DES)

A sobrevivência do Dietilsulfato foi verificada conforme descrito no item 3.12.

Os resultados da exposição dos conídios em tempos crescentes a este mutagênico são vistos na Tabela 3 e a curva de sobrevivência na Figura 6.

O tempo necessário para inviabilizar 95% dos conídios está entre 60 e 90 minutos para a linhagem de *P. lilacinus*.

Tabela 3 - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes a diferentes tempos de exposição ao DES (os dados constituem a média de três repetições)

Tempo (minutos)	Número de sobreviventes (conídios/ml)	% relativa de sobrevivência
0	$1,7 \times 10^5$	100,00
30	$7,6 \times 10^4$	27,00
60	$9,8 \times 10^3$	5,83
90	$6,7 \times 10^3$	4,00
120	$6,9 \times 10^2$	0,41
150	$3,0 \times 10^2$	0,18

Figura 6 - Curva de sobrevivência ao DES da linhagem de *P. lilacinus*.

4.5. Obtenção de mutantes Auxotróficos e Morfológicos

Após tratamento com os mutagênicos, foram utilizados dois métodos de isolamento de mutantes, o isolamento total (item 3.13.1) e o de filtração em meio mínimo líquido (item 3.13.2).

A Tabela 4 e a Figura 7 mostram os mutantes morfológicos obtidos .

A Tabela 5 apresenta os mutantes auxotróficos isolados com uma deficiência simples. Foram isolados seis mutantes auxotróficos simples, sendo que alguns dos mutantes apresentam também marcas morfológicas. A Tabela 6 mostra os mutantes auxotróficos com dupla deficiência. Foram isolados cinco mutantes auxotróficos com dupla deficiência.

Apesar da eficiência dos raios ultra-violeta, apenas dois mutantes morfológicos estáveis foram obtidos através do método empregado. O maior número de mutantes morfológicos estáveis foi obtido empregando a radiação gama quando comparado ao método de irradiação com luz ultra-violeta e a utilização do mutagênico químico dietilsulfato (DES). Com relação ao isolamento de mutantes auxotróficos utilizando o método de isolamento total encontrou-se uma baixa frequência, lançou-se mão do método de filtração (CATCHSIDE, 1954) que não se mostrou muito adequado para P.

lilacinus.

A baixa frequência de mutantes, tanto morfológicos como auxotróficos, utilizando a luz ultra-violeta pode ser resultado de um eficiente sistema de reparo.

Devido a falta de êxito na obtenção de mutantes com ultra-violeta, os conídios passaram a ser tratados com raios gama, em dose necessária para obter 1% de sobrevivência, e o método do isolamento total foi utilizado para recuperar mutantes auxotróficos e morfológicos.

A frequência dos mutantes auxotróficos induzidos por radiação gama foi de 0,565% onde de setecentas e duas colônias analisadas isolaram-se quatro mutantes com dupla deficiência. A Tabela 6 lista os fenótipos dos mutantes obtidos.

Considerando que foi empregado o método de isolamento total, a frequência pode ser considerada alta quando comparada com outros trabalhos descritos na literatura como o de RIBA & RAVELOJOANA (1984), os quais obtiveram dois mutantes auxotróficos no fungo entomopatogênico *Paecilomyces fumoso-roseus* e nos trabalhos de MESSIAS (1979) e BAGALHI (1987) que obtiveram uma frequência de 0,1% e 0,3% respectivamente através do método de isolamento total em *M. anisopliae*.

Tabela 4 - Mutantes morfológicos da linhagem de *P. lilacinus* obtidos através da irradiação ultra-violeta (U.V.), raios gama (R.G.) e dietilsulfato (DES)

Número Protocolar	Fenótipo
U.V.- 1 *	Rosa claro nos bordos da colônia e violeta no centro
U.V.- 2	Violeta predominando com manchas brancas
R.G.- 1 *	Rosa claro, ramificação das hifas nos bordos da colônia
R.G.- 2	Rosa claro no centro da colônia, alternando até a bordo da colônia listra branca e rosa escuro
R.G.- 3	Rosa claro uniforme
R.G.- 4	Branco, cotonoso ("fluffy")
R.G.- 5	Rosa claro, rugoso
R.G.- 6	Branco no centro, alternando listras rosa claro e escuro
R.G.- 7	Rosa claro com estrias compacto
R.G.- 8	Rosa claro com estrias desde o centro até o final da colônia ("fluffy")
R.G.- 9	Rosa claro listras rosa escuro nos bordos
R.G.- 10	Rosa escuro

Tabela 4 - Mutantes morfológicos da linhagem de *P. lilacinus* obtidos através da irradiação ultra-violeta (U.V.), raios gama (R.G.) e dietilsulfato (DES)

Número Protocolar	Fenótipo
R.G - 11	Rosa claro no centro alternando listras claras e escuras
DES - 1	Rosa claro com estrias
DES - 2	Rosa escuro ("fluffy") centro da colônia branco

* o mutante U.V.- 1 possui uma deficiência auxotrófica para lisina, e o mutante R.G.- 1 possui uma deficiência auxotrófica para metionina

Tabela 5 - Mutantes auxotróficos simples de *P. lilacinus*
obtidos por meio de irradiação com ultra-
violeta e radiação gama

Número Protocolar	Notação	Deficiência
U.V. - 1	lis 1	Lisina
R.G. - 1	met 1	Metionina
R.G. - 15	gua 1	Guanina
R.G. - 14	gua 2	Guanina
R.G. - 9	gua 3	Guanina
R.G. - 8	gua 4	Guanina

Tabela 6 - Mutantes auxotróficos duplos de *P. lilacinus*
obtidos por meio de irradiação com raios gama

Número protocolar	Notação	Fenótipo
<hr/>		
R.G. - 15	gua 1 val 1	Guanina e Valina
R.G. - 14	gua 2 arg 1	Guanina e Arginina
R.G. - 9	gua 3 his 1	Guanina e Histidina
R.G. - 8	gua 4 his 2	Guanina e Histidina
R.G. - 1	met 1 arg 2	Metionina e Arginina

Figura 7 - Mutantes morfológicos de *P. lilacinus* (15 dias de crescimento a 28 °C). 1 - Linhagem selvagem; 2- U.V.-1; 3- U.V.-2; 4- R.G.-1; 5- R.G.-2; 6- R.G.-3; 7- R.G.-4; 8- R.G.-5; 9- R.G.-6; 10- R.G.-7; 11- R.G.-8; 12- R.G.-9; 13- R.G.-10; 14- R.G.-11; 15- DES-1; 16- DES-2.

4.5.1. Teste de Reversão

Os mutantes R.G.-14 e R.G.-8 apresentaram uma taxa de reversão menor que um em 10^6 a 10^7 conídios por ml e os mutantes R.G.-15 e R.G.-9 apresentaram uma taxa maior que um em 10^6 a 10^7 conídios por ml (Tabela 7).

Tabela 7 - Teste de reversão de mutantes de *P. lilacinus*

Mutantes	Frequência de reversão em	
	10^6	10^7 conídios/ml
R.G. -15	> 1	
R.G. -14	< 1	
R.G. - 8	< 1	
R.G. - 9	> 1	

4.6. Ciclo Parassexual em *P. lilacinus*

4.6.1. Obtenção do heterocário

No presente trabalho foi feita a tentativa de obtenção de diplóides através da verificação da ocorrência do ciclo parassexual nesta linhagem. A sequência de eventos deste ciclo pode ser resumida como sendo: a) heterocariose; b) fusão de núcleos (formação do diplóide); c) recombinação mitótica e d) haploidização (BURNETT, 1976).

Conídios provenientes de linhagens portadoras de marcas genéticas complementares foram colocados para crescer em meio mínimo acrescido de 4% de meio BD líquido, conforme descrito no item 3.21.1.

Após 7 dias de incubação a 28^o C pode ser constatada a formação de película, possivelmente heterocariótica. A película formada foi transferida para meio mínimo onde em alguns cruzamentos pode ser visto o desenvolvimento irregular do heterocário (Figura 8).

Após constatada a possível formação do heterocário, isolou-se um número muito elevado de colônias em meio mínimo (item 3.21.2) (68 colônias do cruzamento 1 em 220 colônias do cruzamento 2). Foi feita a medida do diâmetro dos conídios dos mutantes e dos prováveis diplóides obtidos nos cruzamentos realizados e não foi constatada diferença no tamanho das diferentes classes de conídios. Segundo ROSIM et alii (1978), existem algumas evidências de que este critério de medição do tamanho dos conídios como diferenciação entre haplóides e diplóides não é muito válido em *Aspergillus niger*.

A partir dos resultados obtidos há a possibilidade de ter ocorrido a formação de heterocário, mas não se pode descartar a possibilidade do processo de sintrofismo estar existindo durante a combinação dos conídios na

tentativa da formação do heterocário.

Segundo RIBA (1978) citado por RIBA & RAVELO-JOANA (1984) o ciclo parassexual de *Paecilomyces fumos-roseus* não deve ser igual ao típico processo parassexual descrito por PONTECORVO et alii (1953) e PONTECORVO & SERMONTI (1954) para *Aspergillus nidulans* e *Penicillium chrysogenum*, visto que para a espécie em questão não houve possibilidade de se distinguir entre heterocários e diplóides, *Cephalosporium mycophilum* (TUVESOM, 1961), *B. bassiana* (YURCHENKI, 1974), *B. tenella* (PARIS, 1977) também apresentam um estágio de heterocário instável.

Figura 8 - Crescimento em MM obtido pela transferência de película nos mutantes R.G.-15 // R.G.-1 (à esquerda e R.G.-8 // R.G.-1 (à direita) em *F. lilacinus*

4.7. Isolamento e Regeneração de Protoplastos

A metodologia utilizada para o isolamento e regeneração de protoplastos foi aquela descrita nos itens 3.22 e 3.23., respectivamente.

A Tabela 8 apresenta os resultados referentes ao isolamento e regeneração de protoplastos de *P. lilacinus*. Segundo DAVIS (1985) um grande número de estabilizadores osmóticos, que incluem sais inorgânicos, açúcares e açúcares alcóolicos, tem sido usados como estabilizadores no isolamento de protoplastos de fungos. É bem conhecido que o tipo e a concentração do estabilizador podem influenciar tanto o rendimento como a estabilidade dos protoplastos, dependendo também do organismo. Em geral, sais inorgânicos são os mais apropriados para o isolamento de protoplastos de fungos filamentosos que açúcares, sendo que açúcares alcóolicos são mais apropriados para leveduras. Isto foi confirmado neste trabalho em relação a linhagem *P. lilacinus* já que bons rendimentos foram obtidos com estabilizadores $MgSO_4$ e KCl .

4

Segundo PEBERDY (1979) o processo de reconstituição da parede e subsequente regeneração tem sido o aspecto de protoplastos de fungos mais intensamente estudado; porém não se conhecem as razões pelas quais a frequência de regeneração é tão variável. Houve uma diferença de

regeneração a partir do uso do estabilizador KCl em diferentes concentrações (Tabela 8). O estabilizador KCl 0,8M apresentou pouca diferença comparado com o mesmo estabilizador KCl a uma concentração de 1,2M (3,485% e 2,906% respectivamente), enquanto que o estabilizador KCl 1,0M apresentou uma taxa de regeneração bem mais baixa de 0,3% de regeneração. Com relação ao estabilizador $MgSO_4$ a variação na concentração do estabilizador não proporcionou um aumento significativo na porcentagem de regeneração e $MgSO_4$ 0,6M apresentou uma taxa de 4,963% e $MgSO_4$ 0,8M 5,538% de taxa de regeneração. Comparações entre $MgSO_4$ e KCl como sistemas estabilizadores em *Aspergillus nidulans* (ISAAC, 1978; ISAAC et alii, 1978) mostraram que $MgSO_4$ causou uma fragmentação micelial e uma rápida liberação de protoplastos depois de um período inicial de digestão lítica. KCl, entretanto, apresentou uma liberação de protoplastos mais regular.

Uma alta produção de protoplastos foi obtida em *Fusarium tricinctum* e *Fusarium oxysporum* utilizando $MgSO_4$ a uma concentração de 1,4 M e KCl a uma concentração de 1,2 M respectivamente. (LINCH et alii, 1985). Os resultados obtidos mostram como uma mesma espécie de fungo pode reagir a uma ligeira variação da concentração de um mesmo estabilizador osmótico como também a diferentes estabilizadores osmóticos.

A Figura 9(A e B) mostra a coloração de núcleos de protoplastos de *P. lilacinus* obtidos a partir do micélio (HAMLYN et alii, 1981). Nesta Figura podem ser notados protoplastos de tamanho e número de núcleos variáveis.

Tabela 8 - Isolamento e regeneração de protoplastos de *P. lilacinus* obtidos a partir de protoplas-tização do micélio.

Concentração dos estabilizadores	Número de protoplastos ⁶ (x 10 /ml)	Meios de regeneração	Percentagem de regeneração
KCl 0,8 M	2,85	BDA+KCl 0,8 M	3,485%
KCl 1,0 M	1,25	BDA+KCl 1,0 M	0,3%
KCl 1,2 M	1,95	BDA+KCl 1,2 M	2,906%
MgSO ₄ 0,6 M	0,90	BDA+MgSO ₄ 0,6 M	4,963%
MgSO ₄ 0,8 M	1,00	BDA+MgSO ₄ 0,8 M	5,538%

Figura 9 (A e B) - Coloração de núcleos de protoplastos obtidos com três horas de tratamento enzimático. Protoplastos uni, bi e trinucleados de *P. lilacinus* (aumento de 100x).

4.8. Curva dose-resposta ao fungicida Benomyl

A sensibilidade da linhagem de *P. lilacinus* ao fungicida Benomyl foi averiguada conforme descrito no item 3.20.

O número de esporos que germinaram nos meios contendo doses crescentes deste fungicida e a medida do diâmetro médio das colônias nestas doses foi estimado com 10 dias de crescimento, e as respectivas médias se encontram na Tabela 9. As curvas dose-resposta são visualizadas na Figura 10.

Um grande número de fungicidas reduz o crescimento de fungos nematófagos quando aplicados ao solo ou testados "in vitro". "Benomyl" e Metyl tiofanato reduzem a atividade de *A. oligospora* e *A. conoides* atacando *Rotylenchus robustus*, mas estes fungicidas também possuem ação nematicida, dificultando a interpretação dos resultados (DIBS, 1976). Alguns fungicidas reduzem o crescimento de *A. irregularis* "in vitro" e outros como o pentacloroni-trobenzeno (PCNB) e o prothiocarb tem efeito com menos que 10.000 ppm (CAYROL & FRANKOWSKI, 1980b). Alguns fungicidas como o captafol aplicado ao solo aumentam a multiplicação de *H. schachtii* mas isto pode ser devido a redução na competição de fungos infectando raízes bem como uma redução de fungos parasitas (CRUMP & KERRY, 1983).

Fungicidas podem ser empregados no desenvolvimento seletivo e podem ser importante no isolamento de fungos nematófagos específicos do solo.

Apesar dos efeitos desfavoráveis, o emprego integrado destes defensivos com produtos biológicos vem sendo utilizado com sucesso. Como exemplo pode ser citado o produto chamado "BIOCON" (TIMM, 1988), preparado a partir do fungo *P. lilacinus* atacando ovos de nematóides do gênero *Meloidogyne* e que mostrou controlar 50-90% das culturas parasitadas pelos nematóides. Além do eficiente controle, o custo da aplicação destes produtos é bem menor uma vez que os produtos químicos deterioram e precisam ser reaplicados aproximadamente após 3 meses, o "BIOCON" continua no solo sem necessidade de reaplicação durante pelo menos 3 colheitas sucessivas.

Os resultados das análises de variância, com dados transformados para $\sqrt{x + 1}$, para sensibilidade da linhagem de *P. lilacinus* ao fungicida Benomyl utilizando os métodos de inoculação e semeadura são apresentados na Tabela 7 do Apêndice. Nessa tabela é apresentada também as médias e os respectivos coeficientes de variação experimental.

A precisão das análises avaliadas por meio dos coeficientes de variação apresentou níveis satisfatórios. Para inoculação e semeadura os coeficientes de va-

riação foram respectivamente 1,10% e 6,36%. Observa-se ainda que para os dois métodos o teste de "F" deu resultados significativos para dosagens.

As Tabelas 8 e 9 do Apêndice mostram respectivamente o número de conídios e as médias dos diâmetros das colônias, e as respectivas diferenças significativas ao nível de 5% pelo teste de Tukey, que dá uma indicação das diferenças entre tratamentos. Constata-se ainda que o fungo *P. lilacinus* como era de se esperar apresentou médias menores a medida que se aumentava as dosagens do fungicida até o limite de 2,0 µg/ml por inoculação e 3,0 µg/ml por semeadura. Após estas dosagens houve ausência de reação uma vez que elas tornaram-se letais ao *P. lilacinus*. Desta forma, baseado no resultado deste trabalho constata-se que as dosagens do Benomyl para haploidização do *P. lilacinus* gira em torno de 2,5 µg/ml quando semeado e 1,5 µg/ml quando inoculado, uma vez que a partir destas dosagens não há mais sobrevivência do fungo.

Tabela 9 - Sensibilidade ao Benomyl de *P. lilacinus* estimada através da medida do diâmetro da colônia (cm) e do número de conídios ($N \times 10^5$) germinados em doses crescentes deste fungicida (média de 3 repetições).

Doses $\mu\text{g/ml}$	Inoculação ϕ da colônia(cm)	Semeadura número de conídios($N \times 10^5$)
0	4,68	3,29
1,0	1,36	1,95
1,5	0,80	1,54
2,0	0,00	0,69
2,5	0,00	0,32
3,0	0,00	0,015
3,5	0,00	0,00
4,0	0,00	0,00

Figura 10 - Curva dose-resposta ao fungicida Benomyl da linhagem *P. lilacinus*

4.9 Crescimento e conidiação em meio BDA

A avaliação do crescimento e conidiação da linhagem selvagem e dos mutantes morfológicos obtidos a partir de irradiação com raios ultra-violeta, radiação gama e dietilsulfato foram obtidos de acordo com o descrito no item 3.18.

O número médio de conídios da linhagem selvagem e dos mutantes morfológicos obtidos podem ser visualizados na Tabela 10 e na Figura 11.

Observa-se que a produção de conídios da linhagem de *P. lilacinus* após 15 dias de crescimento em meio BDA foi inferior a maioria dos mutantes exceto aos mutantes R.G.-1, R.G.-4, R.G.-5, R.G.-7, R.G.-8 e ao DES -2.

Os mutantes que apresentaram-se mais promissores para possível utilização no biocontrole de nematóides foram por ordem crescente U.V.-2; R.G.-11; U.V.-1; R.G.-9; R.G.-6; R.G.-10; DES-1; R.G.-2 e R.G.-3.

Sabe-se porém que a patogenicidade destes fungos parasitas de ovos de nematóides são determinadas por inúmeros fatores desde o rompimento enzimático de elementos estruturais e fisiológicos além de distúrbios metabólicos conduzidos a partir da biossíntese e transferência de substâncias tóxicas difusíveis pelo fungo (MORGAN-JONES et

alii, 1983,1984).

Conclui-se, que somente uma alta produção de conídios não é dado suficiente para avaliar a agressividade de penetração da hifa do fungo com alta e efetiva infestação posterior. Sendo assim, esta característica de alguns mutantes apresentarem uma produção de conídios superior à linhagem selvagem de *P. lilacinus* é interessante para ser ensaiada em bioensaios em casa de vegetação e posteriormente aplicação no campo para um controle mais efetivo de ovos de nematóides.

Tabela 10 - Número médio de conídios dos mutantes morfológicos de *P. lilacinus* obtidos através de ultra-violeta (U.V.), raios gama (R.G.) e dietil-sulfato (DES), estimados através de uma amostra de 5 mm de diâmetro.

Mutantes morfológicos e linhagem selvagem	número médio de conídios ⁷ x 10 /ml
<i>P. lilacinus</i>	6,960
U.V. - 1	12,308
U.V. - 2	8,9175
R.G. - 1	2,294
R.G. - 2	20,368
R.G. - 3	21,432
R.G. - 4	5,959
R.G. - 5	4,225
R.G. - 6	14,400
R.G. - 7	4,5725
R.G. - 8	5,25
R.G. - 9	13,0095
R.G. - 10	16,9125
R.G. - 11	10,78
DES - 1	19,8835
DES - 2	2,5875

Figura 11 - Comparação da produção de conídios entre a linhagem selvagem de *P. lilacinus* e os mutantes morfológicos obtidos por irradiação com raios ultra-violetas (U.V.), raios gama (R.G.) e dietilsulfato (DES).

5. CONCLUSÕES

1. Os meios completo e meio mínimo descritos por PONTECORVO et alii (1953) apresentam-se adequados para o crescimento da linhagem de *P. lilacinus* utilizada.

2. A radiação gama foi considerada como o melhor indutor de mutações no fungo estudado, e o melhor método de obtenção de mutantes auxotróficos foi o do isolamento total. A metodologia de enriquecimento por filtração se mostrou ineficiente quando comparado a do isolamento total.

3. No isolamento e regeneração de protoplastos, o melhor protocolo para obtenção de protoplastos foi aquele em que utilizou o micélio com $MgSO_4$ 0,8M como estabilizador osmótico e as enzimas Novozym 234 e Celulase CP.

4. A dose do fungicida Benomyl necessária para inibir a germinação e o crescimento do fungo foi de 3 $\mu g/ml$ pelo método de semeadura e 2 $\mu g/ml$ pelo método de inoculação.

5. Existe uma grande variabilidade genética entre os mutantes morfológicos obtidos por mutagênicos químicos e físicos de *P. lilacinus* quanto ao crescimento e produção de conídios, características importantes para utilização destes como agentes de biocontrole bem como para utilização dos mesmos em um programa de melhoramento genético.

6. Não foi possível distinguir com certeza a formação do heterocário entre diversos mutantes com marcas auxotróficos e morfológicas postulando-se inclusive a ocorrência de sintrofismo entre as linhagens mutantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREEVA, N. A.; USHAKOVA, V. I.; EGOROV, N. S. Study of proteolytic enzymes of different strains of *Penicillium lilacinum* (Thom) in connection with their fibrinolytic activity. *Microbiology*, Washington, 41:364-8, 1972.
- ARAI, T.; MIKAMI, Y.; FUKUSHIMA, K.; UTSUMI, T.; YAZAWA, K. A new antibiotic leucinostatin derived from *Penicillium lilacinum*. *Journal of Antibiotics*, Tokyo, 26:157-61, 1973.
- AZEVEDO, J. L. O ciclo parassexual em fungos. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 3:157-68, 1972.
- AZEVEDO, J. L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 2:3-15, 1976.
- AZEVEDO, J. L. Melhoramento genético em microrganismos. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 38:1161-8, 1986.
- AZEVEDO, J. L. & COSTA, S. O. P. Exercícios práticos de genética. São Paulo. Ed. Nacional. 1973. 288p.

AZEVEDO, J. L.; OLIVEIRA, A.; ROCHA CAMPOS, A. J.

Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 2:237-41, 1976.

BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch)

Sorokin. Piracicaba. 1987. 123p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

BILAI, V. I. ; PIDOPLICHKO, N. M. ; DYMOVICH, V. A.

Antibacterial properties of *Penicillium* species from the rhizosphere of agricultural plants. Mykrobiologichnyi Zhurnal, Kyiv, 26:3137, 1964a.

BILAI, V. I. ; PIDOPLICHKO, N. M. ; NEKOLSKAYA, E. A. ; DYMOVICH, V.

A. Antifungus properties of the species of *Penicillium*. Mykrobiologichnyi Zhurnal, Kyiv, 26:42-5, 1964b.

BIRD, A. F. Changes associated with parasitism in

nematodes: III Ultrastructure of the egg shell, larval cuticle and contents of the subventral oesophageal glands in *Meloidogyne javanica*, with some observations on hatching. Journal of Parasitology, Lancaster, 54:475-89, 1968.

BIRD, A. F. & ROGERS, G. E. Ultrastructural and histochemical

studies of the cells producing the gelatinous matrix in *Meloidogyne*. Nematologica, Leiden, 11:231-8, 1965.

- BONATELLI JUNIOR, R. Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1977, 126p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- BORGES, M.I. Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA de alto peso molecular de *Aspergillus niger*. Campinas, 1987. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- BORUT, Sh. An ecological and physiological study on soil fungi of the Northern Negev (Israel). Bulletin of Research Council of Israel, Jerusalém, 8D:65-80, 1960.
- BRIAN, P. W. & HEMMING, H. G. Production of antifungal and antibacterial substances by fungi, preliminary examination of 166 strains of fungi imperfecti. Journal of General Microbiology, London, 1:158-67, 1947.
- BROWN, R.G. Stimulation of Beta(1,6) - Glucanase production by oxidized pustulan. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 18:1543-50, 1972.
- BURNETT, J.H. Mycogenetics. London, John Wiley & Sons, 1975. 375p.

- CANDANEDO, E.; LARA, J.; JATALA, P.; GONZALES, F. Control biológico del nematodo *Meloidogyne incognita* con el hongo *Paecilomyces lilacinus*. In: Abstracts of Proceedings. Society of Caribbean, Caribbean, 1983.
- CARNEIRO, R. M. D. G. Etude des possibilites d' utilisation du champignon nematophage *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, 1974, come agente de lutte biologique contre *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889), Shitwood, 1949. Languedoc, 1984. 119p. (Doctorat - Université des Sciences et Techniques du Languedoc).
- CATCHESIDE, D. G. Isolation of nutritional mutants *Neurospora crassa* by filtration enrichment. *Journal General Microbiology*, London, 11:34-6. 1954.
- CAYROL, J. C. & FRANKOWSKI, J. P. Connaissances nouvelles sur le champignon nematophage. *Arthrobotrys irregularis* (Roual 350). *Revue Horticole*, Paris, 203:33-8, 1980.
- CUNHA, P. R. A study of aspects of heterokaryosis in *Aspergillus nidulans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 68:119-67, 1969.
- DAVIS, B. Factors influencing protoplast isolation. In: PEBERDY, J. & FERENCZY, L., eds., *Fungal protoplasts*. Marcel Dekker, 1985. p.45-71.

DAY, A. W. & JONES, J. K. Sexual and parasexual analysis in *Ustilago violacea*. *Genetical Research*, Cambridge, 14:195-221, 1969.

DIBS, S. Nebenwirkungen von systemischen fungiziden auf pflanzenparasitäre Nematoden und nematodenfungende Pilze. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Stuttgart, 83:359-62, 1976.

DIX, N. J. Effect of soil fungistasis on spore germination and germ tube growth in *Penicillium* species. *Transactions British Mycological Society*, London, 58:59-66, 1972.

DOMSCH, K. H. Das Pilzspektrum, einer Bodenprobe. 3. Nachweis der Einzelpilze. *Archiv für Mikrobiologie*, Berlin, 35:310-39, 1960.

DOMSCH, K.H. & GAMS, W. *Compendium of soil fungi*. New York, Academic Press, 1980. 859p.

DUARTE, F. A. M. Genetic and allied effects of certain esters of inorganic acids in *Aspergillus nidulans*. *Experientia*, Basel, 27:966-7, 1971.

DUNCAN, B. Nutrition and fat production in submerged cultures of a strain of *Penicillium lilacinum*. *Mycologia*, Lancaster, 65:211-4, 1973.

DUNN, M. T. ; SAYRE, R. M.; CARREL, A.; WERGIN, W. P.
Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus*
(Thom). Samson as observed with scanning electron
microscopy. *Scanning Electron Microscopy*, Chicago,
3:1351-7, 1982.

FISHBEIN, L.; FLAMM, W. G.; FALK, H. L. Chemical mutagens.
Academic Press, New York, 1970. 364p.

FRANCO, J.; JATALA, P.; BOCANGEL, M. Efficiency of *Paecilomyces*
lilacinus as a biocontrol agent of *Globodera pallida*.
Journal of Nematology, Riverside, 13:438-9, 1981.

GASPARD, J. T. & MANKAU, R. Targeting root-knot nematode
developmental stages with fungae antagonists.
Phytopathology, Lancaster, 75:1344, 1985.

GINTIS, B. D.; MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Fungi
associated with several developmental stages of
Heterodera glycines from Alabama soybean field soil.
Nematropica, Auburn, 13:181-200, 1983.

GODOY, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; MORGAN-JONES, G. Fungal
parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in Alabama soil. A
mycological survey and greenhouse studies. *Nematropica*,
Auburn, 13:207-13, 1983.

HAMLYN, P. F.; BRADSHAW, R. E.; MELLON, F. M.; SANTIAGO, C. M.; WILSON, J. M.; PEBERDY, J. F. Efficient protoplast isolation from fungi commercial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, 3:321-5. 1981.

HEAGY, F. C. & ROPER, J. A. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*, London, 170:713-4, 1952.

ISAAC, C. S. Metabolic properties of protoplasts from *Aspergillus nidulans*. Nottingham, 1978. (Ph. D. Thesis, University of Nottingham).

ISAAC, S.; RYDER, N. S.; PEBERDY, J. F. Distribution and activation of chitin synthase in protoplast fractions released during the lytic digestion of *Aspergillus nidulans* hyphae. *Journal of General Microbiology*, London, 105:45-50, 1978.

ISHITANI, G. & SAKAGUCHI, K. Hereditary variation and genetic recombination in koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*) V. Heterokaryosis. *Journal of General and Applied Microbiology*, Tokyo, 2:345-400, 1956.

ISHITANI, G.; IKEDA, Y.; SAKAGUCHI, K. Hereditary variation and genetic recombination in koji-moulds (*Aspergillus oryzae* and *A. sojae*) VI. Genetic recombination in heterozygous diploids. *Journal of General and Applied Microbiology*, Tokyo, 2:401-30, 1956.

JANKE, A. & HOLZER, H. Ueber die Schimmelpilzflora des Erdbodens. Zentralblatt Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene, Jena, 79:50-74, 1929.

JATALA, P.; KALTENBACH, R.; BOCANGEL, M. Biological control of *Meloidogyne incognita* acrita and *Globodera pallida* on potatoes. Journal of Nematology, Riverside, 11:303, 1979.

JATALA, P.; KALTENBACH, R.; DEVAUX, A. J.; CAMPOS, R. Field application of *Paecilomyces lilacinus* for controlling *Meloidogyne incognita* on potatoes. Journal of Nematology, Riverside, 12:226-7, 1980.

JATALA, P.; SALAS, R.; KALTENBACH, R.; BOCANGEL, M. Multiple application and long term effect of *Paecilomyces lilacinus* in controlling *Meloidogyne incognita* under field conditions. Journal of Nematology, Riverside, 13:445, 1981.

KORAB, J.J. Results of a study of the nematode *Heterodera schachtii* at the nematode laboratory of the Belaya tserkov Research Station. Sbornik sarkovogo semenovod Kogo upr, 8:29-67, 1929.

LASKIN, A.I. & LECHAVALIER, H.A. Handbook of microbiology. Cleveland, C. R. C. Press, 1973. 150p.

LINFORD, M. B. & OLIVEIRA, J. M. Potentials agents of biological control of plant parasitic nematodes. *Phytopathology*, Lancaster, 28:14, 1938.

LORDELLO, L. G. E. *Nematóides das plantas cultivadas*. 8 ed. São Paulo, Nobel, 1986. 314p.

LINCH, P. T.; COLLIN, H. A.; ISSAC, S. Isolation and regeneration of protoplasts from *Fusarium tricinctum* and *Fusarium oxysporum*. *Transactions of the British Mycological Society*. London, 85:135-40, 1985.

MANKAU, R. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, 18:425-40, 1980.

MARCHISIO, V. F. & COLLA, A. Su alcuni micromicetis ad attività antibiotica di un terreno agrario. *Allionia*, Turim, 18:97-102. 1972.

MERT, H. H. & DIZBAY, M. The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinus* species. *Mycopathologia*, Den Haag, 61:125-7, 1977.

MESSIAS, C. L. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, 1977. 75p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

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

MESSIAS, C. L. & AZEVEDO, J. L. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society, London, 75:473-7, 1980.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Phytonematode pathology Fungal modes of action. A perspective. *Nematropica*, Auburn, 15:107-14, 1985.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J. F.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Phytonematode pathology: ultrastructural studies; I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. *Nematropica*, Auburn, 13:245-60, 1983.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J. F.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Phytonematode pathology: ultrastructural studies; II Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. *Nematropica*, Auburn, 14:57-71, 1984a.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J. F.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Fungae parasites of *Meloidogyne incognita* in an Alabama soybean field soil. *Nematropica*, Auburn, 14:93-6, 1984b.

NAGUIB, K. Growth and metabolism of *Penicillium lilacinum* Thom. with references to the effects of riboflavin and nicotinic acid. *Archiv fur Mikrobiologie*. Berlin, 35:296-302, 1960.

NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. *Microbiological Sciences*, Oxford, 5:108-14, 1988.

OKAFOR, N. Decomposition of chitin by microorganisms isolated from a temperate and a tropical soil. *Nova Hedwigia, Lehre*, 13:209-26, 1967.

PAPA, K. E. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, New York, 65:1201-5, 1973.

PAPA, K. E. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, New York, 70:766-73, 1978.

PARIS, S. Heterocaryons chez *Beauveria tenella*. *Mycopathologia*, Den Haag, 61:67-75, 1977.

PEBERDY, J. F. Fungal protoplasts: isolation, reversion, and fusion. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto 33:21-39, 1979.

- PHILIPS, E. & WALKER, T. K. Mycological formation of fat 5 factors with influence the formation of fat surface cultures of *Penicillium lilacinum* (Thom). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, 9:223-7, 1958.
- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*, 11 ed. São Paulo, Nobel, 1985, 466p.
- PITT, J. I. An appraisal of identification methode for *Penicillium* species novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia*, New York, 65:1135-7, 1973.
- PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. *A Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, 10:393-400, 1956.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 6:vii, 1952.
- PONTECORVO, G.; SERMONTI, G. Parasexual recombination in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology*, London, 11:94-104, 1954.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; FORBES, E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiology*, London, 8: 198-210, 1953a.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONDS, L. M.; McDONALD, K. D.; BUFTON, W. J. The genetic of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetic*, New York, 5:141-238, 1953b.

- RADEMACHER, B.; SCHMIDT, O. - Die bisherigen Erfahrungen in der Bekämpfung des Rubennematoden (*Heterodera schachtli*) SCHN auf dem Wege der Reizbeeinflussung. *Archiv Pflanzenb*, Berlin, 10-237-96, 1933.

RIBA, G. & RAVELOJOANA, A. The parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize). Brown and Smith. *Canadian Journal of Microbiology*. Ottawa, 30:922-6, 1984.

RIBA, G.; GLANDARD, A.; RAVELOJOANA, A.; FERRON, P. Isolement de recombines mitotiques stables de "type intermédiaire" chez *Metarhizium anisopliae* (Met.) par hybridation biotypes sauvages. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences; Séances Naturelles*, Montrouge. 291:657-60, 1980.

ROBINOW, C. F. & CATEN, C. E. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Science*, Cambridge, 5:403-31, 1969.

ROPER, J. A. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, Basel, 8:14-5, 1952.

- ROPER, J. A. The parasexual cycle. In: AINSWORTH, G. C. & SUSSMAN, A. S. *The fungi*. New York, Academic Press, 1966. p. 589-617.
- ROSIM, R. T.; GARCIA JUNIOR, O.; BARACHO, I. R. Tamanho de conídios e núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *Aspergillus niger*. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 30:487-92, 1978.
- ROZYSPAL, J. Houby na had atky repnem *Heterodera schachtii*. Schmidt v. Morovskych pudah. *Vestník Československé Akademie zemědělské*, Prague, 10:412-22, 1934.
- SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*, Baarn, 6:1-119, 1974.
- SANTOS, J. M. dos. Fitoenfermidades causadas por nematóides com ênfase sobre a identificação do problema e métodos gerais de controle. "Curso de Controle Fitossanitário". Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA, 1982, 22p.
- SAYRE, R. N. Promising organisms for biocontrol of nematodes. *Plant Disease*, St. Paul, 64:527-32, 1980.
- SCHERBAKOVA, E. Ya; RESVAYA, M. N. Formation of diploids in *Aspergillus niger* and their biosynthesis of citric acid. *Microbiologiya*, New York, 46:1064-9, 1978.

- SERMONTI, G. Genetics of antibiotic producing microorganisms. London, John Wiley & Sons, 1969, 398p.
- SIMONSON, L.G. & LIBERTA, A. E. New source of fungal dextranase. *Mycologia*, New York, 67:845-62, 1975.
- STIRLING, G. R. & MANKAU, R. *Dactylella oviparasitica*, a new fungal parasite of *Meloidogyne* eggs. *Mycologia*, New York, 70:774-83, 1978.
- STIRLING, G. R. & MANKAU, R. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode eggs by *Dactylella oviparasitica*. *Journal of Nematology*, Riverside, 11:282-8, 1979.
- 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*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, Tokyo, 45:182-91, 1979.
- TAYLOR, A. L. & SASSER, J. N. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (especies de *Meloidogyne*). Proyecto Internacional de *Meloidogyne*, 1983.
- TIMM, M. "Biocon". Controls nematodes biologically. *Biotechnology*, 5:772, 1988.

- TINLINE, R. D. *Cochiliobolus sativus*. V. Heterocaryosis and parasexuality. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 40:425-37, 1962.
- TINLINE, R.D. & McNEILL, B. H. Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 7:147-70, 1969.
- TRESNER, H. D. & HAYES, J. A. Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. *Applied Microbiology*, Baltimore, 22:210-5, 1971.
- TUVESON, R. & COY, D. Heterocaryosis and somatic recombination in *Cephalosporium mycophilum*. *Mycologia*, New York, 53:244-53, 1961.
- VAN DER LANN, P. A. Een Schimmel als parasiet van de cysteinhoud van het aardappelcystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* Wollenw). *Tijdschrift voor plantenziekten*, Wageningen, 59:101-3, 1953.
- VAN DER LANN, P. A. Onderzoekingen over schimmels die parasiteren op de cysteinhoud van het aardappelcystenaaltje (*Heterodera rostochiensis* Woll). *Tijdschrift voor plantenziekten*, Wageningen, 62:305-21, 1956.

- WAINWRITH, M. & PUGH, G. J. F. The effects of fungicides on certain chemical and microbiol properties of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 6:263-7, 1974.
- WALLACE, H. R. The influence of soil moisture on survival and hatch of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, Leiden, 14:231-42, 1968.
- YAMANO, T. Lilacinin. *Japan Patent News*, Tokyo, 7:122-522, 1971.
- YURCHENKO, L. V.; ZAKHAROV, T.; LEVITIN, M. Génétique du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill; III. Etude de l'hétérocaryose. *Genetica*, Gravenhage, 10:95-101, 1974.

APENDICE

Tabela 1 - Análise de variância da medida do diâmetro da colônia de *P. lilacinus* nos diferentes meios de cultura em um intervalo de tempo de 7 dias

F.V.	G.L.	SQ	QM	F
Tratamentos	3	1,14	0,38	3.20%
Resíduo	32	3,79	0,1184	
Total	35	4,93		

C.V. = 12,5258%

* Existem diferenças significativas entre tratamentos ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Teste de Tukey para médias da medida do diâmetro da colônia de *P. lilacinus* nos diferentes meios de cultura em um intervalo de tempo de 7 dias.

Meios de cultura	¹ Médias	Tukey 5%
MC	3,0063	a
Meio de Malte	3,0111	a
BDA	2,9722	a
MM	2,60	a

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

1 = Médias transformadas para $\sqrt{x + 1}$

DMS 5% = 0,4189

Tabela 3 - Análise de variância da medida do diâmetro da colônia de *P. lilacinus* nos diferentes meios de cultura em um intervalo de tempo de 10 dias.

F.V.	G.L.	SQ	QM	F
Tratamentos	3	5,1329	1,7110	19,14**
Resíduo	30	2,68	0,0894	
Total	33	8,24		

C.V. = 7.087%

** Existem diferenças significativas entre tratamentos ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela 4 - Teste de Tukey para médias da medida do diâmetro da colônia de *P. lilacinus* nos diferentes meios de cultura em um intervalo de tempo de 10 dias.

Meios de cultura	Médias ¹	Tukey 5%
Meio de Malte	4,71	a
MC	4,59	ab
BDA	4,244	b
MM	3,74	c

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

1 = Médias transformadas para $\sqrt{x + 1}$

DMS 5% = 0,3640

Tabela 5 - Análise de variância da medida do diâmetro da colônia de *P. lilacinus* nos diferentes meios de cultura em um intervalo de tempo de 14 dias

F.V.	G.L.	SQ	QM	F
Tratamentos	3	12,1343	4,0448	32,3969**
Resíduo	29	3,6207	0,1249	
Total	32	15,7550		

C.V. = 5.942%

** Existem diferenças significativas entre tratamentos ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 6 - Teste de Tukey para médias da medida do diâmetro da colônia de *P. lilacinus* nos diferentes meios de cultura em um intervalo de tempo de 14 dias.

Meios de Cultura	Médias ¹	Tukey 5%
MC	6,625	a
Meio de Malte	6,469	a
BDA	5,56	b
MM	5,19	b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

1 = Médias transformadas para $\sqrt{x + 1}$

DMS 5% = 0,4303

Tabela 7 - Análise de variância para sensibilidade de *P. lilacinus* ao fungicida Benomyl através dos métodos de inoculação e semeadura

		Métodos	
Fontes de variação	G.L.	1	1
		Inoculado	Semeado
Quadrados Médios			
Dosagens	7	0,7204**	0,4784**
Resíduo	16	0,0002	0,0074
Total	23	0,2194	0,1507
C.V. (%)		1,1023	6,3566
Média		1,2830 ²	1,3533 ²

** = significativo ao nível de probabilidade de 1% pelo teste de "F"

1 = Análise realizada com dados transformados para $\sqrt{x+1}$

2 = Médias transformadas para $\sqrt{x+1}$

Tabela 8 - Tabela de médias com teste de Tukey do número de conídios de *P. lilacinus* pelo método de semeadura

i			
Número de ordem	Dosagem	Médias	Tukey 5%
01	0,0	6,2045	a
02	1,0	5,1511	b
03	1,5	4,7731	c
04	2,0	3,8901	d
05	2,5	3,4453	e
06	3,0	3,0150	f
07	3,5	3,0000	f
08	4,0	3,0000	f

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Diferença mínima significativa = 0,1309

i= Médias transformadas para $\sqrt{x + 1}$

Tabela 9 - Tabela de médias com teste de Tukey dos diâmetros das colônias de *P. lilacinus* pelo método de inoculação

Número de ordem	Dosagem	Médias ¹	Tukey 5%
01	0,0	7,1514	a
02	1,0	4,6152	b
03	1,5	4,0246	c
04	2,0	3,0000	d
05	2,5	3,0000	d
06	3,0	3,0000	d
07	3,5	3,0000	d
08	4,0	3,0000	d

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

Diferença mínima significativa = 0,04

¹= Médias transformadas para $\sqrt{x + 1}$