GENÉTICA E PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS EM LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

MARIA CLÉRIA CORDEIRO VALADARES

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.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1989

Valadares, Maria Cléria Cordeiro
V136g Genética e produção de exoenzimas em
linhagens de *Metarhizium anisopliae* var.
anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba,
1989.
160p. ilustr.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Fungo entomopatogênico - Bioquímica.
2. Fungo entomopatogênico - Genética. 3.
Enzima microbiana - Produção. I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz",
Piracicaba.

CDD 589.24

GENÉTICA E PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS EM LINHAGENS DE *Metarhizium*
anisopliae var. *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

MARIA CLÉRIA CORDEIRO VALADARES

Aprovada em: 05.06.89

Comissão Julgadora:

• Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
• Prof. ^a Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner	ESALQ/USP
• Prof. Dr. Cláudio Luiz Messias	UNICAMP

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Orientador

Aos meus pais,

José Cordeiro Valadares ("in memorian")

e Dorotêia de Oliveira Campos, que me
ensinaram o valor da luta e a felici-
dade da conquista,

DEDICO

Aos meus irmãos e amigos,
companheiros de todos os
momentos,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

- Ao *Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo*, pela preciosa e carinhosa orientação, além da amizade e estímulo constantes.
- À *Dra. Aline Ap. Pizzirani-Kleiner*, pelas sugestões, apoio e amizade.
- À amiga *Márcia Cristina Furlaneto*, pelo companheirismo em um importante período de minha vida.
- Aos amigos *Márcio Antônio Naves* e *Elza A. Luna*, pelo estímulo e incentivo.
- Aos funcionários do Laboratório de Genética de Microrganismos/ESALQ, *Sandra R. Campos*, *Carlos A. Nolasco* e em especial ao *Sr. Antônio Rocha Campos*, pela valiosa colaboração durante a fase experimental.
- Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos, pela amizade, colaboração e convivência.
- Aos amigos *Eduardo Bagalhi* e *Wanderlei Dias da Silveira*, pela concessão dos mutantes utilizados neste trabalho.
- Aos Professores, Funcionários e Amigos do Departamento de Genética da ESALQ, por tudo que me ensinaram sobre pesquisa e vida.

.iii.

- Às Bibliotecárias do CENARGEN/EMBRAPA e ESALQ/USP, em especial à Nilce T.P. Sigríst, pelas valiosas contribuições.
- Ao amigo José Sebastião Cunha Fernandes, pelo auxílio nas análises estatísticas.
- Ao Cláudio Costa, dentre outras coisas, pela amizade e versão do "summary".
- Aos Srs. Alaor de Oliveira e Milton Capreci, pelas fotografias em preto e branco e coloridas, respectivamente.
- Ao Sr. Cleusval Bissi, pelo excelente trabalho datilográfico, ao Sr. Romeu Ap. Rocha, pelo desenho do esquema de eletroforese, e a Srta. Eliane Z. Silvestre, pela confecção das Tabelas.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, bem como ao Departamento de Genética, por terem me recebido e propiciado meu treinamento.
- À EMBRAPA, por tornar possível a realização deste trabalho e em especial a Chefia do CENARGEN, representada pelo Dr. Jairo Silva, pelo apoio e estímulo.
- À FINEP pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO	xvii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	4
2.1. O fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin	4
2.2. Patogenicidade e virulência	5
2.3. Produção de toxinas e exoenzimas.	10
2.3.1. Toxinas produzidas por fungos entomo patogênicos.	10
2.3.2. Exoenzimas e fungos entomopatogênicos..	12
2.4. Aspectos genéticos dos fungos entomopatogê- nicos.	20
2.4.1. Caracterização de linhagens de <i>M. ani-</i> <i>sopliae</i>	20
2.4.2. Obtenção de mutantes de <i>M. anisopliae</i> .	23
2.4.3. Ciclo parassexual e paramiose em <i>M.</i> <i>anisopliae</i>	26
2.4.4. Aspectos do melhoramento genético de linhagens de <i>M. anisopliae</i>	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.	31
3.1. Linhagens utilizadas.	31
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas. . .	32
3.2.1. Meio Mínimo Sólido (PONTECORVO <i>et</i> <i>alii</i> , 1953).	32
3.2.2. Meio Completo Sólido (PONTECORVO <i>et</i> <i>alii</i> , 1953, modificado por AZEVE- DO & COSTA, 1973).	32

3.2.3. Meio Completo Líquido (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).	32
3.2.4. Meio Mínimo mais 2% de Meio Completo e Meio Mínimo mais 4% de Meio Completo.	33
3.2.5. Meio Mínimo 2x concentrado.	33
3.2.6. Meio Completo 2x concentrado	33
3.2.7. Meio Completo mais KCl.	33
3.2.8. Meio Mínimo mais KCl.	34
3.2.9. Meio para atividade lipolítica (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).	34
3.2.10. Meio para atividade amilolítica.	34
3.2.10.1. Meio Mínimo (segundo o item 3.2.1.), acrescido de 0,2% de amido solúvel (REAGEM, P.A.).	34
3.2.10.2. Meio Mínimo sem glucose (segundo o item 3.2.1., exceto a glucose), acrescido de 0,2% de amido solúvel (REAGEM, P.A.).	34
3.2.11. Meio para atividade proleolítica (COHEN, 1972b).	35
3.2.12. Solução de vitaminas	35
3.2.13. Suplementos adicionados ao Meio Mínimo.	35
3.2.14. Solução salina (0,9%).	36
3.2.15. Solução de Tween-80.	36
3.2.16. Solução de NaOH 4%	37
3.2.17. Solução de iodo ressublimado	37
3.2.18. Solução de leite em pó	37
3.2.19. Solução de Benlate [metil(butil-carbamoil)-2-benzimidazole carbamato] (HASTIE, 1970).	37

3.2.20. Solução de Cloroneb (1,4-dicloro-dimítoxil benzeno)	37
3.2.21. Tampão fosfato pH 5.8 (0,2 M)	38
3.2.22. Tampão McIlvaine's, pH 5.8.	38
3.2.23. Solução de KCl 1,4 M, pH 4.8.	38
3.2.24. Solução de KCl 0,7 M, pH 5.8	39
3.2.25. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M, modificada por FURLANETO (1987) (Comunicação pessoal)	39
3.2.26. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6 M.	39
3.2.27. Solução de enzimas líticas para produção de protoplastos (HAMLIN <i>et alii</i> , 1981)	39
3.2.28. Solução de polietilenoglicol (PEG) 30%	40
3.2.29. Reagentes usados para eletroforese em gel de poliacrilamida (PACCOLA-MEIRELLES <i>et alii</i> , 1988)	40
3.2.29.1. Solução estoque de Acrilamida.	40
3.2.29.2. Tampão do gel separador pH 8.9.	40
3.2.29.3. Tampão do gel empilhador pH 6.8.	41
3.2.29.4. Tampão do tanque - pH 8.9.	41
3.2.29.5. Gel separador a 10%.	41
3.2.29.6. Gel empilhador a 4%.	42
3.2.29.7. Tampão da amostra.	42
3.2.29.8. Solução corante para esterase (SHAW & PRASAD, 1970)	42
3.2.29.8.1. Estoques.	42
3.2.29.8.2. Corante.	43

3.2.30. Solução corante para proteínas. . .	43
3.2.30.1. Fixador PAGE.	43
3.2.30.2. Corante.	43
3.2.31. Soluções para citologia.	43
3.2.31.1. Tampão fosfato 0,125 M, pH 7.0.	43
3.2.31.2. Solução de Giemsa.	44
3.2.31.3. Solução de albumina 50%..	44
3.2.31.4. Solução de HCl 1N.	44
3.2.31.5. Solução de álcool etílico	44
3.2.31.6. Solução de fixação.	45
3.2.31.7. Tampão fosfato 0,02M, pH 5.8	45
3.2.32. Preparo de material, esterilização e incubação.	45
3.2.32.1. Filtros Buchner para fil- tração de micélio.	45
3.2.32.2. Palitos para transferência de colônias.	45
3.2.32.3. Esterilização e incubação	46
3.3. Caracterização das linhagens.	46
3.3.1. Avaliação da produção de exoenzimas.	46
3.3.1.1. Atividade amilolítica.	47
3.3.1.2. Atividade proteolítica (COHEN, 1972b, modificado pela auto- ra).	48
3.3.1.3. Atividade lipolítica (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).	49
3.3.2. Avaliação citológica.	49

3.3.2.1. Coloração de núcleos em conídios (TANAKA <i>et alii</i> , 1979)	49
3.3.2.2. Contagem do número de núcleos por conídio e mensuração de núcleos.	50
3.3.3. Caracterização para padrões de esterase (PACCOLA-MEIRELLES <i>et alii</i> , 1988).	51
3.3.3.1. Cultivo do fungo e extração de proteínas.	51
3.3.3.2. Placas de gel de acrilamida	52
3.3.3.3. Coloração para revelação de esterase (SHAW & PRASAD, 1970)..	53
3.4. Obtenção de mutantes.	53
3.5. Ciclo parassexual.	54
3.5.1. Teste de reversão dos mutantes auxotróficos.	54
3.5.2. Obtenção de heterocário (MESSIAS & AZEVEDO, 1980).	54
3.5.2.1. Obtenção de recombinantes prototróficos e outros tipos combinantes	55
3.5.2.1.1. Avaliação dos recombinantes prototróficos	55
3.5.3. Análise genética de recombinantes e segregantes.....	56
3.6. Estudos de protoplastos de <i>M. anisopliea</i> ...	57
3.6.1. Obtenção e regeneração de protoplastos	57
3.6.2. Fusão de protoplastos	59
3.6.3. Obtenção dos produtos de fusão e análise genética	60

	<u>Página</u>
3.6.4. Coloração de protoplastos (BORGES,1987)..	60
3.6.5. Atividade exoenzimática de colônias originadas de protoplastos regenerados.	61
3.7. Análises estatísticas	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	63
4.1. Caracterização de <i>M. anisopliae</i> quanto à produção de exoenzimas.	63
4.1.1. Atividade amilolítica das linhagens selvagens e mutantes	63
4.1.2. Atividade proteolítica das linhagens selvagens e mutantes de <i>M. anisopliae</i>	74
4.1.3. Atividade lipolítica em linhagens de <i>M. anisopliae</i>	79
4.2. Teste de reversão.	86
4.3. Ciclo parassexual e paramiose.	86
4.3.1. Obtenção de heterocário.	86
4.3.2. Obtenção de recombinantes prototróficos e outros tipos recombinantes. . .	89
4.3.2.2. Obtenção de recombinantes e análise genética.	90
4.4. Atividade amilolítica e proteolítica em recombinantes e segregantes obtidos de heterocário.	99
4.4.1. Comparação das médias de atividades amilolítica e proteolítica entre linhagens parentais, recombinantes prototróficos instáveis e estáveis, segregantes e recombinantes.	114
4.5. Protoplastos de <i>M. anisopliae</i>	117

	<u>Página</u>
4.5.1. Obtenção, regeneração e citologia. .	117
4.5.2. Fusão de protoplastos e paramiose..	120
4.5.3. Atividade amilolítica e proteolítica em colônias regeneradas de proto- plastos.	123
4.6. Caracterização eletroforética de linhagens de <i>M. anisopliae</i>	129
5. CONCLUSÕES.	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Halos de degradação de amido em colônias da linhagem E ₉ . Esquerda: meio com glicose. Direita: meio sem glicose.	73
2 - Halos de degradação de caseína, mediante revelação com azul de Comassie.	76
3 - Placa à esquerda: colônias monospóricas da linhagem selvagem E ₆ O ₁ , sem a presença de halos de precipitação de sais de laurato de cálcio. Placa à direita: colônias monospóricas do mutante E ₆ lip ⁺ apresentando 2 (duas) colônias sem halos visíveis e 2 (duas) colônias com halos de precipitação.	83
4 - Colônias da linhagem E ₆ lip ⁺ emitindo setores em meio para atividade lipolítica. . . .	84
5 - Heterocário obtido no cruzamento E ₆ -7 + E ₆ -8, mostrando regiões de setorização.	88
6 - Colônia do heterocário E ₆ -7 + E ₆ -8 proveniente de recombinantes protótrófico, produzindo novos setores, em MC.	92
7 - Padrões de α -esterase em linhagens de <i>M. anisoplíae</i>	132
8 - Esquema obtido a partir dos padrões de esterases de linhagens de <i>M. anisoplíae</i>	133

TabelaPágina

13 - Teste de Tukey para médias do índice enzimático, de linhagens, no meio para atividade amilolítica, com glicose.	72
14 - Teste de Tukey para médias do índice enzimático, de linhagens, no meio para atividade amilolítica, sem glicose.	72
15 - Índices enzimáticos das linhagens selvagens e mutantes, de <i>M. anisopliae</i> , para atividade de proteolítica em meio contendo leite. . . .	77
16 - Análise de variância da atividade proteolítica, para linhagens selvagens e mutantes de <i>M. anisopliae</i>	78
17 - Teste de Tukey para médias do índice enzimático de linhagens em meio para atividade proteolítica, contendo leite.	78
18 - Vigor do heterocário entre linhagens de <i>M. anisopliae</i>	87
19 - Frequências de colônias obtidas a partir de heterocários em meios seletivos	89
20 - Número de núcleos/conídio e diâmetro médio de núcleos em linhagens selvagens, mutantes e em possíveis diplóides (D)	93
21 - Frequências de colônias recombinantes, obtidas a partir de heterocário, entre linhagens de <i>M. anisopliae</i>	95
22 - Frequência de colônias recombinantes, obtidas a partir de heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$, em diferentes meios seletivos	96
23 - Frequência de colônias recombinantes, obtidas a partir do heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$, em diferentes meios seletivos.	96
24 - Índices enzimáticos obtidos para atividades amilolíticas e proteolíticas de recombinantes prototróficos instáveis, provenientes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	100

TabelaPágina

25 - Análises de variância da atividade amilolítica nos recombinantes prototróficos instáveis	101
26 - Teste de Tukey, para médias de índice amilolítico, de recombinantes prototróficos instáveis	101
27 - Análise de variância da atividade proteolítica nos recombinantes prototróficos instáveis	102
28 - Índices enzimáticos obtidos para atividades amilolítica e proteolítica, de recombinantes prototróficos estáveis, provenientes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	102
29 - Análise de variância da atividade amilolítica nos recombinantes prototróficos estáveis	103
30 - Análise de variância da atividade proteolítica nos recombinantes prototróficos	103
31 - Índices enzimáticos obtidos para atividades amilolítica e proteolítica, de segregantes provenientes de recombinantes prototróficos $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	104
32 - Análise de variância da atividade amilolítica dos segregantes de recombinantes instáveis do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	105
33 - Análise de variância da atividade proteolítica, de segregantes de recombinantes instáveis do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	105
34 - Teste de Tukey para médias de índice proteolítico, de segregantes obtidos a partir de recombinantes prototróficos instáveis do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	106
35 - Índices enzimáticos obtidos para atividades amilolítica e proteolítica, de recombinantes provenientes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	107
36 - Análise de variância da atividade amilolítica de recombinantes heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	107
37 - Teste de Tukey para médias de índice amilolítico, de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	108

38 - Análise de variância, da atividade proteolítica de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	108
39 - Teste de Tukey para médias de índice proteolítico, de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$	109
40 - Índices enzimáticos obtidos para atividades amilolítica e proteolítica de recombinantes provenientes do heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$	110
41 - Análise de variância da atividade amilolítica de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$	110
42 - Análise de variância da atividade proteolítica de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$	111
43 - Teste de Tukey para médias de índice proteolítico, de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$	111
44 - Médias de índice enzimático para atividades amilolítica e proteolítica, de linhagens parentais, recombinantes prototróficos, segregantes e recombinantes	115
45 - Número de protoplastos obtidos e frequência de regeneração em diferentes linhagens de <i>M. anisopliae</i>	118
46 - Frequência de número de núcleos/protoplastos	119
47 - Frequências de colônias recombinantes, obtidas no cruzamento das linhagens $E_6^{-7} + E_6^{-8}$, via fusão de protoplastos.....	121
48 - Índice enzimático para atividades amilolíticas e proteolítica de linhagens selvagens e mutantes de <i>M. anisopliae</i> , a partir de protoplastos e conídios	125
49 - Análise de variância para atividades amilolítica de linhagens selvagens e mutantes de <i>M. anisopliae</i> , a partir de protoplastos e conídios	126

TabelaPágina

50 - Teste de Tukey para médias de índice amilolítico de linhagens de <i>M. anisopliae</i> , a partir de protoplastos e conídios.	126
51 - Análise de variância para atividade proteolítica de linhagens selvagens e mutantes de <i>M. anisopliae</i> , a partir de protoplastos e conídios.	127
52 - Teste de Tukey para médias de índice proteolítico de linhagens de <i>M. anisopliae</i> , a partir de protoplastos e conídios.	127

GENÉTICA E PRODUÇÃO DE EXOENZIMAS EM LINHAGENS DE *Metarhizium*
anisopliae var. *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

AUTOR: *Maria Cléria Cordeiro Valadares*

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de se estudar a produção semi-quantitativa de exoenzimas em linhagens selvagens, mutantes, bem como em recombinantes prototróficos, possíveis diplóides, segregantes e recombinantes, obtidos via ciclo parassexual.

A caracterização das linhagens selvagens e mutantes, quanto à produção de amilase e protease mostrou que os mutantes estudados apresentam atividades efetivamente superiores às linhagens selvagens das quais se originaram. Observou-se que a ausência de fonte alternativa de carbono em meio para atividade amilolítica modifica a resposta das linhagens. Para atividade proteolítica, meio contendo leite em pó desnatado apresentou-se efetivo na detecção da variabilidade das linhagens. Já as linhagens avaliadas para produção de lipase não apresentaram atividade extracelular, em meio contendo Tween-20. Mutantes lipase positivos, obtidos por irradiação com ultra-violeta, por sua vez, mostraram-se instáveis quanto à atividade lipolítica.

Conídios obtidos de heterocário e semeados

em meios para detecção de paramiose mostraram que a recombinação mitótica ocorre. Cruzamento de mutantes da linhagem E_6 apresentou recombinantes prototróficos estáveis e instáveis, tendo-se observado possível aneuploidia ou diploidia nos recombinantes instáveis pela emissão de setores em segregantes e pelos padrões de bandas de α -esterase. Heterocários entre linhagens distintas (E_6 e E_9), permitiram que se observasse somente recombinantes híbridos, demonstrando ser maior a instabilidade do estado diplóide obtido entre diferentes linhagens do que entre linhagens da mesma origem.

Comparando-se os valores médios de atividade amilolítica, observou-se que somente os recombinantes prototróficos estáveis provenientes do heterocário entre mutantes da linhagem E_6 foram superiores aos mutantes parentais.

Quanto a atividade proteolítica dos produtos do heterocário entre mutantes da mesma linhagem E_6 , observou-se que os recombinantes prototróficos estáveis e instáveis, bem como os segregantes diferem da média dos parentais apresentando valores médios de atividade inferiores à média dos parentais. Também os recombinantes híbridos, provenientes do heterocário entre mutantes das linhagens E_6 e E_9 , apresentaram valores médios de atividades amilolíticas e proteolíticas inferiores à média dos parentais.

Colônias de linhagens selvagens e mutantes, provenientes de protoplastos regenerados, apresentaram atividades amilolítica e proteolítica, em média, superiores às atividades observadas em conídios. Observou-se assim que a protoplastização altera a produção de amilases e proteases.

THE GENETICS AND PRODUCTION OF EXOENZYMES IN SOME STRAINS OF *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

AUTHOR: *Maria Cléria Cordeiro Valadares*

ADVISER: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

SUMMARY

This work was carried out aiming to study the semi-quantitative production of exoenzymes in wild and mutant strains and in prototrophic recombinants possible diploids, segregants and recombinants obtained through parasexual cycle.

It was shown that mutants were effectively better producer of amylase and protease than the wild strains that gave origin to them. The absence of an alternative carbon source in media for testing amylolytic activity modified the performances of the strains.

Culture medium containing skimmed powder milk was efficient in detecting variability among strains concerning to proteolytic activity. For lipase production no extracellular activity was detected among the strains in medium containing Tween-20. It was shown as well that UV lipase positive mutants were unstable for lipolytic activity.

Conidia obtained from heterokaryon and plated in media for detection of parameiosis showed that mitotic recombination occurs in relatively high frequencies. Crossings

between mutants from E_6 strain resulted in stable and unstable prototrophic recombinants. Aneuploids or diploids might be suggested among those unstable prototrophic recombinants due to the emission of sectors in segregant colonies and their alpha-esterase electrophoretic pattern.

Heterocaryon between strains (E_6 and E_9) showed only hybrid recombinants and it demonstrated a higher instability in diploids obtained between different strains.

When the average values of the amylolytic activity were compared it was shown that only the stable prototrophic recombinants from heterocaryon between mutants of strain E_6 were superior to the parent mutants.

The stable and unstable prototrophic recombinants and segregants from heterocaryon between mutants of strains E_6 showed lower proteolytic activity when compared to the parent strains. Also hybrid recombinants from the heterocaryon between mutants of E_6 and E_9 strains showed lower amylolytic and proteolytic activities in relation to the parent strains.

Wild and mutant strains from regenerated protoplasts showed in average a higher amylolytic and proteolytic activity than colonies from conidia. Protoplasting was seen to alter amylase and protease production by the fungus.

1. INTRODUÇÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin é um Deuteromiceto com amplo potencial de utilização no controle de insetos pragas da agricultura. No Brasil, o *M. anisopliae* vem sendo produzido artesanalmente em meios de cultura, a baixo custo. Além de ter uma utilização efetiva no controle de *Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*, pragas da cana-de-açúcar na região Nordeste do Brasil (ALVES, 1986), também apresenta-se bastante promissor para controlar espécies de cigarrinhas que atacam pastagens, principalmente *Deois flavopicta*, *D. incompleta* e *Zulia entrecariana*.

A eficiência do fungo em causar mortalidade em insetos, se relaciona dentre outras características à produção de toxinas e exoenzimas. As amilases, proteases, lipases e quitinases são as principais exoenzimas envolvidas no processo de penetração da cutícula de insetos a qual também depende de processos mecânicos.

Inúmeras linhagens de *M. anisopliae*, isoladas de diversos insetos, têm sido amplamente estudadas em relação aos aspectos biológicos mostrando a existência de grande variabilidade natural. Dentre as variedades *major* e *anisopliae*, a *anisopliae* apresenta ampla variabilidade sendo

também mais efetiva em causar patogenicia. Tal variedade vem sendo bastante estudada geneticamente devido ao amplo potencial ainda a ser explorado.

Mutantes morfológicos, auxotróficos e para produção de exoenzimas já foram obtidos e utilizados em estudos genéticos. Recombinantes, segregantes e possíveis diplóides foram obtidos pelo ciclo parassexual via formação de heterocário, ou por fusão de protoplastos. Mecanismos de recombinação mitótica e instabilidade de diplóides, descritos em produtos de cruzamento de linhagens de *M. anisopliae* tornaram possível a verificação da ocorrência de parameiose. Apesar dos inúmeros estudos genéticos já realizados, poucos são os trabalhos relacionados a aspectos de melhoramento para produção de exoenzimas, as quais estão relacionadas à patogenicidade.

A produção de exoenzimas, devidamente explorada, pode ser de grande importância para estudos de virulência, patogenicidade e aspectos relacionados à espécie-especificidade a hospedeiros. As atividades amilolítica, proteolítica e lipolítica, dentre outras, podem ser avaliadas em meios sólidos, tornando o processo de seleção de linhagens bastante simples.

Levando-se em conta os aspectos mencionados acima, o presente trabalho visou utilizar técnicas genéti-

cas para cruzar linhagens de *M. anisopliae* e avaliar a produção de exoenzimas nos produtos de cruzamento. Objetivou-se assim:

- Estudar a variabilidade de linhagens selvagens e mutantes quanto a produção de amilases, proteases e lipases.
- Cruzar linhagens via ciclo parassexual e observar a ocorrência de paramiose.
- Determinar a produção semi-quantitativa de exoenzimas em possíveis diplóides, segregantes e recombinantes, comparando-a à produção média dos parentais.
- Estudar o efeito da protoplastização nas atividades amilolítica e proteolítica, de linhagens de *M. anisopliae*.
- Selecionar linhagens, a partir de cruzamentos, para futuros ensaios de patogenicidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* é um Deuteromiceto com amplo potencial de utilização no controle de insetos pragas. Tendo sido isolado por METSCHNIKOFF em 1879, de um curculionídeo, *Anisopliae austriaca*, foi testado por KRASSILSTCHIK em 1884, quanto à eficiência em controlar insetos, obtendo-se de 55 a 80% de mortalidade dos mesmos, em pequenas áreas (ALVES, 1986).

Pertencente à ordem Moniliales e família Moniliaceae, o gênero compreende duas variedades, separadas quanto ao tamanho dos conídios em variedades *anisopliae* e *major* (TULLOCH, 1976). Estudos realizados por LUNA (1985) mostraram que o fungo *M. anisopliae* apresenta grande variação na forma e no tamanho de conídios em ambas as variedades, o que seria uma característica do gênero, uma vez que tal variação não se relaciona com o meio de cultivo.

Seus conídios geralmente são uninucleados, podendo ocorrer um pequeno número de binucleados (TINLINE, 1971; MESSIAS, 1979; LUNA, 1985 e BAGALHI, 1987; dentre outros).

M. anisopliae é um dos patógenos mais comuns

encontrados em insetos, sendo que a produção de unidades infectivas pode ser feita em meios de baixo custo (AQUINO *et alii*, 1975 e 1977; DAOUST *et alii*, 1983; MENDONÇA & COSTA, 1987; DIEHL-FLEIG *et alii*, 1987; dentre outros), utilizando-se de metodologias bastante simples. No Brasil, a produção é feita em condições artesanais, para utilização no controle de pragas de pastagens e da cana de açúcar. Segundo ALVES (1986), em 1982 tal patógeno foi aplicado em cerca de 85.000 ha, visando ao controle das cigarrinhas da cana, *Mahanarva posticata* e *Mahanarva fimbriolata* (Homopteras : Cercopideaes).

2.2. Patogenicidade e virulência

Devido à importância dos fungos como patógenos de insetos pragas, inúmeros estudos vêm sendo realizados na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na patogenia e interações espécie-especificidade, definidas por FARGUES & REMAUDIERE (1977) como adaptação recíproca ou afinidades entre microrganismos patogênicos e espécies hospedeiras.

Segundo FARGUES (1975), *M. anisopliae* apresenta-se como patógeno de 204 espécies de insetos pertentes a 43 famílias dentre as ordens Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera.

A relação patógeno-hospedeiro vem sendo tratada com bastante interesse e os mecanismos de interação têm merecido destaque. Recentemente muito se tem feito, com o intuito de desvendar o processo das doenças de insetos, tendo ROBERTS & HUMBER (1983) descrito o desenvolvimento da doença, dividindo-a em 10 (dez) passos. O primeiro deles envolveria a ligação de conídios à cutícula de insetos, para o qual os fungos entomopatogênicos aparentemente estariam adaptados. Condições de germinação como umidade relativa, macro e microclimas e mesmo a presença de inibidores a nível de cutícula devem atuar antes do próximo passo, que seria a penetração da cutícula do inseto, a qual envolve tanto atividades físicas quanto enzimáticas. O fungo cresce na hemocele do inseto, produz toxinas, mata o hospedeiro, invade todos os seus órgãos, se exterioriza e produz unidades infectivas, que serão dispersadas.

Estudos de histopatologia muito têm contribuído na elucidação dos primeiros passos da patogenia. SWEENEY (1975) mostrou o desenvolvimento da infecção em larvas de *Culex fastigans*, causada por *Culicínomyces clavosporus*, utilizando-se de técnicas histopatológicas auxiliadas por microscopia eletrônica, evidenciando uma firme aderência dos esporos à cutícula do inseto. Esta aderência foi confirmada por TRAVLAND (1978) como sendo devido à formação

de apressórios, em *Coelomomyces psorophorae*, os quais secretam uma densa substância amorfa e permite a penetração do tubo germinativo, através da cutícula de larvas de dípteros. Tal fenômeno, descrito em alguns fungos, nem sempre é evidenciado, como um *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae), em que a penetração da hifa no inseto ocorre aparentemente por meio mecânico e enzimático, sem uma visível formação de apressórios (BREY & LATGE, 1986). Em *M. anisopliae* (LACEY *et alii*, 1978) a formação de apressório e um intenso crescimento hifal foi encontrado, durante o processo de invasão de *Culex quinquefasciens*. Outros estudos histopatológicos vêm sendo realizados com fungos entomopatogênicos, mostrando a ocorrência de perturbações tegumentares nos insetos infectados, a ontogenia do processo e principalmente as reações celulares de defesa contra a infecção (FARGUES & VEY, 1974; THORVILSON *et alii*, 1985; PIAZZA *et alii*, 1987; GUNNARSSON, 1988 e LACEY *et alii*, 1988). FARGUES *et alii* (1976) estudaram a reação hemocitária de coleópteros infectados com *M. anisopliae*, mostrando a formação de granulomas, o que indica que a especificidade pode não estar ligada somente a reações tegumentares.

Reações a nível tegumentar, em insetos hospedeiros aparecem como intensas melanizações nas regiões invadidas (LACEY *et alii*, 1988). Experimentalmente, KOIDSUMI

(1957) evidenciou a barreira tegumentar, restringindo o crescimento de fungos patogênicos, mostrando que tal fato está ligado aos lipídios presentes na cutícula dos insetos. ST LEGER *et alii* (1988) estudando a produção de fenoloxidação e pigmentos em cutícula de insetos infectados por *M. anisopliae*, sugeriram que a melanização da cutícula pode ser devido à oxidação dos fenóis e ácidos graxos presente nesta.

A transposição das barreiras físicas e fisiológicas varia quanto ao tempo de penetração, a espécie de inseto e mesmo a capacidade do fungo de quebrá-las, sendo que o modo como o inseto é infectado é muito importante na relação de especificidade (FERRON, 1978). *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* se desenvolvem na hemolinfa de insetos, mas não invadem órgãos sólidos e tecidos (PRASERTPHON & TANAKA, 1968), tendo sido observada a presença de clamidiosporos de *M. anisopliae* na hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella*. A quebra das membranas tegumentares pode prover nutrientes que atuariam como estímulo da germinação de conídios na superfície do inseto (HUNT *et alii*, 1984) e, por outro lado, pode também estimular reações celulares ativadoras de hemócitos (GUNNARSSON, 1988).

No que se refere à patogenicidade, além dos aspectos ligados a interação fungo hospedeiro, considera-se importante o efeito da dose usada (BLISS, 1980; HANEL, 1981;

PRIOR & ARURA, 1985 e outros), assim como o método de aplicação e o ciclo da doença (CARRUTHERS *et alii*, 1985).

A manutenção da capacidade infectiva do fungo, cultivado em meios artificiais tem merecido atenção, uma vez que a virulência diminui em cultivos laboratoriais sucessivos. Desta forma, a passagem do fungo em insetos mostra um efeito marcante sobre a virulência (DAOUST & ROBERTS, 1982; FARGUES & ROBERTS, 1983; SAMSINAKOVA & KALALOVA, 1983; PRIOR & ARURA, 1985), uma vez que as mudanças de ambiente inseto-meio artificial podem implicar em alterações nos mecanismos de indução enzimática, das enzimas envolvidas na penetração da cutícula dos insetos.

Viabilidade de formas infectivas, tanto quanto a virulência, merece ser destacada, considerando que a germinação de conídios é parte essencial na patogênese. Algumas condições de estocagem, segundo DAOUST *et alii* (1983) são mais críticas para a viabilidade e virulência de esporos de *M. anisopliae*, do que os substratos sobre os quais são produzidos.

Experimentos com patógenos podem ser feitos em laboratório como indicativos de condições de eficiência em campo, desde que condições variáveis possam ser controladas, pois fatores como temperatura, umidade, densidade populacional, alimentação dos insetos e fotoperíodo, dentre ou-

tros, podem produzir resultados inconsistentes (BURGES & THOMPSON, 1971). Assim, visando à utilização em campo e, consequentemente a uma produção comercial, além da manutenção da viabilidade e virulência das unidades infectivas durante a estocagem e aplicação, também o efeito da formulação deve ser considerado. DAOUST (1983) mostrou que formulações de *M. anisopliae* feitas à base de óleos, dentre outras, resultam em rápido declínio da viabilidade dos esporos.

A eficiência da utilização em larga escala necessita de padronizações, mesmo a nível de ensaios laboratoriais, o que pode ser feito por comparações de isolados, quanto à patogenicidade sobre espécies variadas de insetos (BURGES & THOMPSON, 1967; HANEL, 1981; FARGUES, 1983a; ALVES, 1986; HALL, 1988 e ROBERTS, 1988).

2.3. Produção de toxinas e exoenzimas

2.3.1. Toxinas produzidas por fungos entomopatogênicos

Fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Nomuraea rileyi*, dentre outros, produzem compostos de baixo peso molecular, altamente tóxicos a insetos. Mesmo fungos saprofíticos, como os *Aspergillus* produzem metabólitos secundários, os quais apresentam potencial para

uso como inseticidas (WRIGHT *et alii*, 1982). Tal potencial não vem sendo muito explorado devido à alta toxidez que esses compostos apresentam a mamíferos.

Desde sua descoberta e devido a eficiência em causar mortes de insetos, as toxinas têm sido objeto de estudos. Duas destas substâncias tóxicas foram isoladas e caracterizadas por KODAIRA (1961) e TAMURA *et alii* (1964), a partir de filtrados de culturas de *Aspergillus ochraceus* e *Oospora destructor* respectivamente. Denominadas destruxinas A e B, tais toxinas foram purificadas por cromatografia e testadas em larvas de bichos da seda, apresentando uma LD₁₀₀ (dose letal suficiente para matar 100%) muito baixa para ambas (KODAIRA, 1962).

Segundo ROBERTS (1981), as toxinas são eficientes para matar insetos por via oral, contato ou injeção na hemocela, e provocam a morte devido a paralisia tetânica que observada em insetos intoxicados se manifestam como visíveis tremores (ROBERTS, 1966a) dentre outros sintomas.

A elucidação da estrutura de tais compostos, bem como os mecanismos responsáveis pela sua liberação a partir de esporos ou micélio de fungos como *M. anisopliae* e *B. bassiana*, são reportados por SUZUKI *et alii* (1966), KUCERA & SAMSINAKOVA (1968), ROBERTS (1969), CRISAN (1971), SUZUKI *et alii* (1971), MURAKOSHI *et alii* (1978) e KAIJANG & ROBERTS (1986).

Em *M. anisopliae*, tais metabólitos foram isolados em meios de cultura com fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio (ROBERTS, 1966a) tendo sido detectados também em larvas moribundas de *Galleria mellonella* e *Bombyx mori* (ROBERTS, 1966b). Estes metabólitos, denominados destruxinas, são compostos de seis ciclodepsipeptídeos com esqueleto básico de β alanina, alanina, valina, isoleucina e prolina, originadas de um precursor PD (protodestruxina). As quatro diferentes destruxinas (A, B, C e D) e as citocalasinas, encontradas em *M. anisopliae* são descritas em revisão de ROBERTS (1981), na qual é salientado o fato de exoenzimas serem erroneamente intituladas toxinas.

2.3.2. Exoenzimas e fungos entomopatogênicos

Os insetos apresentam uma cutícula que funciona como barreira entre a célula e o ambiente e como parte do exoesqueleto. Inúmeros são os estudos referentes à composição desta cutícula, em várias espécies de insetos. A cutícula pode ser dividida em camadas denominadas epicutícula e procutícula. Quanto à epicutícula, sua constituição básica é lipídica e protéica, não tendo sido detectada a presença de quitina. A procutícula, por sua vez, é essencialmente composta de proteínas e quitinas, podendo apresentar também lipídeos, pigmentos, materiais inorgânicos e ou-

tras pequenas moléculas (ANDERSEN, 1979).

Atuando como uma barreira complexa e rígida, a cutícula dos insetos necessita ser quebrada e/ou digerida para permitir a instalação e o desenvolvimento de fungos patogênicos. Os fungos entomopatogênicos são eficientes em transpor tais barreiras, seja por processos mecânicos, enzimáticos ou por combinação de ambos (ROBERTS, 1981). Tal potencial mecânico/enzimático parece ser a chave mestra de toda a patogenia, pois a penetração do fungo na hemocela representa a quebra de integridade física do inseto e mesmo a capacidade deste se desenvolver, usando como alimento a matéria orgânica do hospedeiro.

Estudos histoquímicos das cutículas de insetos (GABRIEL, 1968b), infectados com *Entomophthora coronata*, mostraram uma correlação positiva entre a atividade lipolítica e os pontos de penetração do fungo no inseto, indicando que o processo não é meramente mecânico.

Exoenzimas, lipases, proteases, amilases e quitinases são produzidas pelos fungos entomopatogênicos, "in vitro", o que facilita o estudo destas e a avaliação da correlação entre estas e outras características envolvidas na virulência.

GABRIEL (1968), utilizando meios de cultura específicos, testou a atividade lipolítica, quitinolítica e

proteolítica de *Entomophthora apiculata*, *E. thaxteriana*, *E. virulenta* e *E. coronata*, comparando-as às atividades de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. A quitinase, produzida por tais fungos, foi considerada como enzima adaptativa, uma vez que em presença de fontes alternativas de carbono, a quitina do meio não foi degradada.

Estudando os mecanismos de produção e regulação de enzimas quitinolíticas por *M. anisopliae*, ST LEGER *et alii* (1986b) mostraram que na verdade a síntese da quitinase é regulada pelos produtos de degradação da quitina, através de mecanismos de indução-repressão. A repressão foi determinada quando do aparecimento de altos níveis de polissacarídeos no meio, principalmente em formas insolúveis. Sugerem também uma correlação negativa entre crescimento e produção de quitinase.

Quanto à atividade lipolítica, *M. anisopliae* apresentou uma relação seletiva quanto aos ácidos graxos, não produzindo lipases para digestão de óleo de oliva e óleo de côco, os quais são compostos de ácidos oléico e ácido cáprico e caprílico, respectivamente (GABRIEL, 1968a).

Segundo ST LEGER *et alii* (1988), a capacidade de *M. anisopliae* utilizar *n*-alcanos como única fonte de carbono revela que este produz lipases, sendo que o contato

da hifa do fungo com hidrocarbono insolúvel pode ser um pré-requisito. Um período inicial, de alguns dias, antes da utilização dos alcanos parece ser necessário para que o esqueleto hidrocarbônico seja dissolvido, ou mesmo para uma adaptação do fungo, considerando que microrganismo não parecem assimilar alcanos intactos.

A atividade proteolítica foi detectada em meios de cultura contendo gelatina ou leite em pó desnatado (GABRIEL, 1968a), enquanto PERSSON *et alii* (1984) utilizando peptídeos sintéticos mostraram que *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentam pouca capacidade de hidrolizar caseína e nenhuma capacidade de hidrolizar "azacoll".

Alguns estudos das exoenzimas têm levado ao isolamento e purificação destas. A partir de substratos de cultura de *B. bassiana* (KUCERA, 1984) foram purificadas duas frações proteicas, em colunas Sefadex, sendo a fração de maior peso molecular, ácida e a de menor peso uma fração básica. Tal complexo proteolítico, erroneamente denominado toxinas, apresentou eficiência em matar larvas de *G. mellonella*. Já em *M. anisopliae* as proteases apresentam dois componentes com atividades neutra (protease P_1) e alcalina (protease P_2), prevalecendo a protease P_1 com alta toxidez a *G. mellonella* e atividade coagulante de leite (KUCERA & SAMSINAKOVA, 1980).

Estudando a atividade proteolítica, MOHAMED *et alii* (1984) mostraram que em *M. anisopliae* a protease produzida "in vitro" apresenta sua atividade máxima no 4º dia de crescimento do fungo, possui estabilidade térmica a 40°C e ampla tolerância de pH tendo ótimo a pH 8.0, o que condiz com os resultados de KUCERA & SAMSINAKOVA (1980).

Quanto ao tipo de cultura, LEOPOLD & SAMSINAKOVA (1970) estudaram as exoenzimas produzidas por *B. bassiana* em culturas estacionária e submersa, as quais não parecem ter efeito diferente na produção de proteases, lipases e quitinases. O ótimo da produção de quitinase foi obtido em culturas de 4 a 5 dias, com atividade a pH 5.0, tendo sido classificada como enzima constitutiva. Protease e lipase tiveram um ótimo de produção em culturas de 6 a 7 dias de crescimento, tendo a protease se mostrado eficiente em degradar peptona e gelatina, mas não caseína.

Na tentativa de elucidar a sucessão cronológica das enzimas, na penetração da cutícula de insetos, SAMSINAKOVA *et alii* (1971) utilizaram enzimas comerciais e filtrados de cultura de *B. bassiana* sobre larvas de *Galleria mellonella*. Os resultados obtidos indicaram que as lipases e proteases atacam a cutícula antes da quitinase o que foi confirmado por ST LEGER *et alii* (1986a), os quais utilizaram

proteases e quitinases purificadas a partir de filtrados de meio de cultura de *M. anisopliae* e testaram sobre cutícula de larvas e exúvias.

A combinação das proteases e quitinases apresenta um considerável aumento da atividade degradativa de cutículas de insetos, quando comparadas com o uso de cada exoenzima individualmente (ST LEGER *et alii*, 1986a). BAJAN *et alii* (1980) já haviam mostrado que não existia uma correlação entre a produção de quitinase por *B. bassiana* e infecção à *G. mellonella*, pois linhagens com alta atividade quitinolítica apresentavam-se ineficientes, enquanto que linhagens com baixa atividade eram muito eficientes. No entanto, SMITH *et alii* (1981) encontraram correlação entre atividades proteolíticas e quitinolíticas e degradação de cutícula de *Heliothis zea*. A forte ligação proteína-quitina da cutícula de larvas de *H. zea* pode ser rompida sequencialmente pelas proteases e quitinases de *B. bassiana*, o que pode ser demonstrado com a utilização de mutantes deste fungo, para produção destas exoenzimas.

A atividade proteolítica é bastante discutida e sua eficiência na degradação de cutículas pode estar ligada aos inibidores de proteases detectados por KUCERA (1982), na hemolinfa de larvas de *G. mellonella* infectadas por *M. anisopliae*.

A infecção de larvas é possível não somente pelo aumento da atividade proteolítica do fungo, mas também pela ausência de inibidores como resposta do processo patológico, pois, uma vez isolados e parcialmente purificados, tais inibidores atuam sobre as proteases P_1 e P_2 de *M. anisopliae* (KUCERA, 1984).

HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) descreveram metodologias para avaliar a produção de exoenzimas por fungos em meios sólidos, a qual é notada pela capacidade de degradar substratos e produzir halos visíveis. Assim, amilases, proteases, lipases, quitinases e outras exoenzimas podem ser avaliadas semiquantitativamente, sendo que o método mostrou-se adequado para determinar variantes da mesma espécie, o que pode facilitar estudos genéticos.

Utilizando meios sólidos, ROSATO *et alii* (1981) avaliaram a atividade exoenzimática de 11 (onze) isolados de *M. anisopliae*, mostrando que, pelos índices amilolítico, proteolítico, lipolítico e quitinolítico, é possível obter um perfil que se relaciona à origem geográfica das linhagens. Isolados de diferentes regiões e diferentes hospedeiros, que apresentaram índices enzimáticos similares, poderiam ter tido uma origem comum, sendo que tais padrões podem ainda ser válidos para estudos de dispersão do fungo, a partir de correlação entre a origem geográfica e o padrão exoenzimático

de cada linhagem.

A literatura mostra controvérsias quanto à correlação entre produção de exoenzimas por fungos e sua virulência à insetos. Tal fato pode estar ligado à diversidade de linhagens e às diferentes metodologias e/ou espécies de insetos utilizados nos ensaios. SOZA-GOMES & ALVES (1983), avaliando a atividade exoenzimática de isolados de *M. anisopliae*, mostraram que há uma correlação positiva entre atividades amilolítica e proteolítica e uma correlação negativa destas em relação à atividade lipolítica. Apesar de não ter sido observada nenhuma correlação entre produção de exoenzimas e virulência, as linhagens mais virulentas foram as que apresentaram índices de atividade lipolítica mais elevados. SMITH *et alii* (1981) também sugerem que as lipases sejam necessárias no processo de penetração da cutícula de insetos como *H. zea*. Segundo SILVA (1985), a virulência de *M. anisopliae* a *Rhodnius prolixus* é alterada em função de modificações na produção de exoenzimas, produzidas por mutações do fungo, mostrando que há uma correlação da virulência e atividades amilolítica e lipolítica. Também através do uso de mutantes de *M. anisopliae*, ROBERT & MESSING-AL-AIDROSS (1985) observaram que mutantes com maior atividade amilolítica apresentavam maior virulência enquanto que as alterações nas atividades lipolítica e proteolítica não afe-

tam a virulência à *Culex pipiens*.

As relações entre exoenzimas e virulência envolvem eventos pouco conhecidos, pois as interações do fungo ou suas enzimas com a cutícula dos insetos são complexas. Segundo ST LEGER *et alii* (1986a), as enzimas extracelulares do fungo *M. anisopliae* têm considerável afinidade por cutículas. Mecanismos de adsorção da enzima à cutícula parecem ser pré-requisitos para a degradação, o que explica a ocorrência de degradações localizadas. Tal adsorção é inibida pelo bloqueio das cargas dos grupos carboxilas da cutículas, com detergentes catiônicos, o que comprova a existência de mecanismos de ligação eletrostática entre os grupos carregados positivamente das proteases básicas e os grupos carboxilas da cutícula.

A atuação localizada das enzimas, explicadas pelos mecanismos de adsorção, apresentam grande importância, uma vez que previne a desidratação prematura do hospediero, tornando possível a instalação e o desenvolvimento do patógeno (ST LEGER *et alii*, 1986a).

2.4. Aspectos genéticos dos fungos entomopatogênicos

2.4.1. Caracterização de linhagens de *M. anisopliae*

Inúmeras linhagens do fungo *M. anisopliae* têm

sido objeto de estudo, visando identificar a variabilidade natural ou mesmo a criação de variabilidade, importantes no sentido de tornar-se possível detectar interações entre certos fatores e aquilatar a estabilidade das linhagens, tornando possível uma padronização (AZEVEDO & MESSIAS, 1985).

A existência de uma grande variabilidade natural já foi identificada, mediante estudos de diferentes características como: crescimento, germinação, morfologia, meios de cultivo, tamanho de esporos, número de núcleo por esporos, fatores ambientais físicos ou químicos, virulência a diversos hospedeiros, padrões eletroforéticos, produção de toxinas e exoenzimas dentre outros.

A variabilidade em fungos imperfeitos pode ser devido ao conhecido fenômeno da heterocariose, sendo que segundo VEEN (1967) seria necessário estudar culturas monopóricas, para se reduzir a variabilidade ou mesmo detectá-la.

Estudos citológicos de diversas linhagens procedentes de diferentes regiões do Brasil, mostraram uma variação quanto ao número de núcleos por conídios, estruturas reprodutivas, tamanho e morfologia de conídios juntamente com uma complexa variação da pigmentação, dentre outras características citológicas, as quais são bem discutidas por LUNA (1985).

Perfis biológicos e bioquímicos de isolados de *M. anisopliae*, SOZA-GOMEZ & ALVES (1983) e ALVES (1985) mostram que há uma grande variação entre as linhagens selvagens.

Estudos sorológicos, por sua vez, permitem distinguir linhagens de *M. anisopliae* (FARGUES *et alii*, 1975) e os padrões obtidos por imunoeletroforese podem corresponder a padrões morfológicos de esporos (FARGUES *et alii*, 1981). DURIEZ-VAUCELLE *et alii* (1981) mostraram que diferentes perfis antigênicos de linhagens de *M. anisopliae* condizem com as diferentes atividades enzimáticas reveladas por eletroforese e imunoeletroforese.

Variações quanto aos padrões eletroforéticos vêm sendo bastante utilizadas para caracterizar linhagens selvagens, mutantes e recombinantes, de *M. anisopliae* (De CONTI *et alii*, 1980; ROSATO *et alii*, 1981; SILVEIRA, 1983; SILVA & AZEVEDO, 1983; ST LEGER *et alii*, 1986). PACCOLA-MEIRELLES (1988) mostrou que em *B. bassiana*, segregantes originados por fusão de protoplastos, apresentam bandas de esterase não observadas nos mutantes parentais.

A produção de exoenzimas em meio sólido também vem sendo utilizada para caracterizar linhagens de *M. anisopliae*, procedentes de diversas regiões geográficas e de

diversos hospedeiros (ROSATO *et alii*, 1981; SOZA-GOMEZ & ALVES, 1983; SILVA, 1985; LEITE, 1984 e outros).

Segundo AZEVEDO & MESSIAS (1985), apenas com a variabilidade natural já demonstrada, poder-se-iam obter linhagens melhoradas, se as características vantajosas de cada linhagem fossem associadas em um único isolado.

2.4.2. Obtenção de mutantes de *M. anisopliae*

As mutações são, de modo geral as molas mestras da genética, uma vez que criam variabilidade, cujas marcas facilitam a seleção de recombinantes.

Os fungos entomopatogênicos, em especial o *M. anisopliae*, devido à sua importância como controlador de inúmeras pragas da agricultura, têm sido objeto de estudos genéticos, os quais visam a criação de variabilidade ou à amplificação da variabilidade natural das diversas linhagens.

Muitos mutantes de *M. anisopliae* têm sido isolados, seja com o auxílio de diversos agentes mutagênicos (AL-AIDROSS & SEIFERT, 1980; SMITH *et alii*, 1981; FRIGO, 1983; SILVEIRA, 1984; LUNA, 1985; ROBERT & MESSING-AL-AIDROSS, 1985; MESSIAS *et alii*, 1986; BAGALHI, 1986; SILVA, 1986) seja naturalmente, pois mutantes espontâneos foram descritos por

SAMSINAKOVA & KALALOVA (1983) e AL-AIDROSS & ROBERTS (1978).

Um mutante espontâneo, selecionado a partir de cultura monospórica de linhagem selvagem de *M. anisopliae*, se mostrou mais virulento à larvas de mosquitos que o parental (AL-AIDROSS & ROBERTS, 1978). O uso de cultura monospórica para selecionar mutantes espontâneos mostrou-se efetivo também para *B. bassiana*, pois SAMSINAKOVA & KALALOVA (1983) selecionaram seis mutantes espontâneos com efeito surpreendentemente maior sobre a virulência e patogenicidade.

Quanto às mutações para hipervirulência, estas parecem estar relacionadas ao tempo de germinação dos esporos e à produção de conídios, assim como à capacidade de produzir exoenzimas como amilases, proteases e lipases. AL-AIDROSS & ROBERTS (1978) descreveram um mutante de *M. anisopliae* que apresentava densa esporulação, germinação precoce e aumento na produção de destruxinas, sendo que apresentava também hipervirulência. Também mutantes deficientes para degradação de amido se mostram eficientes em penetrar larvas de mosquito, germinar e esporular mais rapidamente e produzir mais toxinas que a linhagem selvagem (AL-AIDROSS & SEIFERT, 1980), sendo caracterizados como hipervirulentos. A fonte de proteínas pode estar relacionada à germinação e à esporulação, sendo que mutantes protease ne-

gativos variam quanto ao crescimento, o que não está relacionado à virulência. ROBERT & MESSING-AL-AIDROSS (1985) também encontraram relação entre mutantes para atividade amilolítica e hipervirulência, o que não foi detectado para as atividades lipolítica e proteolítica. Utilizando mutação e reversão para produção de exoenzimas, SILVA (1985) mostrou que mutantes amilase e lipase negativos apresentam menor virulência que os parentais, sendo que a reversão das mutações restabelece também a virulência.

Dentre os mutantes de *M. anisopliae*, ressalta-se o grande número de mutantes para auxotrofia, os quais são fundamentais para os estudos de recombinação (FRIGO, 1983; SILVEIRA & AZEVEDO, 1984; LUNA, 1985; MESSIAS *et alii*, 1986 e BAGALHI, 1987). O agente mutagênico mais comumente utilizado é a luz ultra-violeta e a técnica de enriquecimento por filtração, descrita por SILVEIRA & AZEVEDO (1984) aumenta de 23 a 61 vezes o número de mutantes selecionados.

Nem todos os efeitos de uma mutação causada por luz ultra-violeta são conhecidos e as mudanças morfológicas e/ou nutricionais observadas podem envolver vários loci ou um único, envolvendo também efeitos pleiotrópicos. Segundo MESSIAS *et alii* (1986), a redução da virulência de mutantes auxotróficos e a restauração desta no diplóide obtido do cruzamento destes mutantes, podem estar associados à re-

dução ou perda de atividade enzimática nos mutantes que no diplóide seria restabelecida.

2.4.3. Ciclo parassexual e paramiose em *M. anisopliae*

Segundo AZEVEDO (1972), para o estudo genético de qualquer organismo, há necessidade de se existir mutantes que difiram do selvagem e também que o organismo apresente um sistema de recombinação.

Fungos imperfeitos como *M. anisopliae*, não apresentam ciclo sexual, sendo que o processo de recombinação genética ocorre como uma alternativa de sexo ou ciclo parassexual, descritos neste fungo por MESSIAS (1979), MESSIAS & AZEVEDO (1980) e simultaneamente por AL-AIDROSS (1980). PONTECORVO (1953) descreve o ciclo parassexual pela formação de heterocário, dada pelas anastomose de hifas com núcleos diferentes, fusão de núcleos, ocorrência de permuta mitótica e haploidização.

Também em *M. anisopliae* o ciclo parassexual é importante porque permite a obtenção de diplóides estáveis e recombinantes (MESSIAS, 1979) além de estudos de mapeamento de genes (MESSIAS & AZEVEDO, 1980; BERGERON & MESSING-AL-AIDROSS, 1982; MAGOON & MESSING-AL-AIDROSS, 1986; LUNA, 1985) e até mesmo estudos de dominância e recessividade.

Os diplóides obtidos via ciclo parassexual podem ser diferenciados dos haplóides, mediante medidas de diâmetros de conídios e núcleos, alterações morfológicas, estabilidade das colônias em presença de benlate e mesmo pela quantificação do DNA de conídios (MESSIAS & AZEVEDO, 1980; SILVEIRA, 1983; MAGOON & MESSING-AL-AIDROSS, 1984; LUNA & AZEVEDO, 1985; BAGALHI, 1988). O diâmetro de conídios haplóides e diplóides diferem significativamente (MAGOON & MESSING-AL-AIDROSS, 1984), enquanto LUNA & AZEVEDO (1985) mostram um maior volume nuclear nos possíveis diplóides comparados aos parentais. SILVEIRA (1983) mostrou que, pela quantificação de DNA de conídios, é possível confirmar o estado diplóide de colônias que não setorizam em presença de benlate, o que difere do observado por BAGALHI (1987).

Cruzamentos entre algumas linhagens não se mostram efetivos, uma vez que não há formação de heterocários (SILVEIRA, 1983; BAGALHI, 1987). Tal fato deve estar ligado a incompatibilidade de paredes entre as linhagens; entretanto, esta característica deve ser associada ao tipo de mutante, pois LUNA (1985) obteve heterocários entre as mesmas linhagens utilizadas por SILVEIRA (1983) e BAGALHI (1987).

Alternativa a não formação de heterocário, possivelmente pela incompatibilidade a nível de parede, é a

fusão de protoplastos. Assim a digestão da parede com enzimas líticas e posterior fusão dos protoplastos, mostrou-se efetiva na obtenção de produtos recombinantes entre linhagens que não formam heterocário (SILVEIRA, 1983). Outros trabalhos envolvendo fusão de protoplastos têm sido realizados (FRIGO, 1983; BAGALHI, 1987). A utilização da técnica do "doador morto", na qual uma das linhagens é inativada (morta), mostrou-se eficiente para obtenção de diplóides e segregantes entre diferentes linhagens (FRIGO, 1983).

A instabilidade de núcleos diplóides heterozigotos, que apresentam uma alta taxa de recombinação e haploidização nas hifas heterocarióticas, foi estudada em *Aspergillus niger* por BONATELLI Jr. *et alii* (1983), que propuseram o termo parameiose para designar o fenômeno. Em *M. anisopliae*, a ocorrência da parameiose foi relatada por BAGALHI (1987), sendo que SILVEIRA & AZEVEDO (1987) se baseiam neste fenômeno para discutir a alta instabilidade de produtos de fusão intra e interlinhagens deste fungo.

2.4.4. Aspectos do melhoramento genético de linhagens de *M. anisopliae*

Apesar de se conhecer muitos dos aspectos genéticos ligados à recombinação de linhagens de *M. anisopliae*, poucos são os trabalhos que visam ao melhoramento aplicado

ã capacidade de matar insetos.

Recentemente, alguns experimentos têm sido realizados, tentando-se relacionar recombinantes e diplóides obtidos por heterocariose ou fusão de protoplastos com patogenicidade. GARCIA *et alii* (1985) mostraram que mutantes e diplóides, da linhagem E_q de *M. anisopliae*, não são mais efetivos em causar mortalidade a *Ceratitis capitata* do que a linhagem selvagem. Já VALADARES *et alii* (1985) mostraram que diplóides eram mais efetivos que os parentais em causar mortalidade à *Nezara viridula* e *Spodoptera frugiperda*, mas não à *Deois flavopicta*.

Diplóides obtidos por RIBA *et alii* (1985) mostraram virulências aproximadamente iguais às linhagens selvagens, e os segregantes auxotróficos obtidos dos heterocários mostram virulência igual aos parentais mutantes envolvidos no cruzamento.

MESSIAS *et alii* (1986), estudando dois mutantes e um diplóide da linhagem selvagem E₉, mostraram que os mutantes têm sua virulência reduzida em relação ao selvagem, enquanto que o diplóide restaura a virulência. Também BAGALHI (1987) encontrou relação entre deficiência auxotrófica e virulência, sendo esta restabelecida em recombinantes prototróficos.

Formação de compostos pela mistura de diferentes recombinantes híbridos, para aplicação em insetos, pode ser um método eficiente na obtenção de uma linhagem melhorada para o efetivo controle de insetos (BAGALHI, 1987).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* utilizadas neste trabalho, pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos, ESALQ/USP e estão abaixo relacionadas.

Linhagem	Fenótipos*	Observações
E ₆	selvagem	1
E ₆ -7	vio met ⁻ bio ⁻	2
E ₆ -8	ylo pir ⁻ lis ⁻	2
E ₉	selvagem	1
E ₉ -19	ylo leu ⁻ rib ⁻	3
E ₉ -20	ylo leu ⁻ ade ⁻	3
E ₆ ⁰ ₁	selvagem	4

Observações:

- .1- Linhagens selvagens, procedentes do Estado do Espírito Santo e isolados de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae).
- .2- Mutantes obtidos por SILVEIRA (1983).
- .3- Mutantes obtidos por BAGALHI (1987).
- .4- Linhagem selvagem, procedente do CENARGEN/EMBRAPA. Isolada originalmente do Estado do Espírito Santo, reisolada de *Zúlia entreriana* (Homoptera: Cercopidae) e novamente reisolada de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera).

* - ade, bio, leu, lis, met, pir, rib designam respectivamente requisitos nutricionais para adenina, biotina, leucina, lisina, metionina, piridoxina e riboflavina.

vio e ylo designam coloração violeta e amarela, em oposição a coloração selvagem (verde).

3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

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

NaNO ₃	6.0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl.	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,001 g
ZnSO ₄	0,001 g
Glicose.	10,0 g
Ágar	15,0 g
H ₂ O (destilada).	1000,00 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

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

Meio Mínimo acrescido de:

Extrato de levedura. . .	0,5 g
Peptona.	2,0 g
Caseína hidrolizada. . .	1,5 g
Solução de vitaminas . .	1,0 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

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

Preparado segundo o ítem 3.2.2., não sendo adicionado ágar.

3.2.4. Meio Mínimo mais 2% de Meio Completo e Meio Mínimo mais 4% de Meio Completo

Ao meio mínimo foram acrescidos 2% e 4% de meio completo (v/v). Tubos de ensaio contendo 2,5 ml de meio mínimo mais 2% de MC e MM mais 4% de MC foram autoclavados, e mantidos em refrigerador.

3.2.5. Meio Mínimo 2x concentrado

Preparado segundo o item 3.2.1. tendo a quantidade de cada componente dobrada, exceto a água.

3.2.6. Meio Completo 2x concentrado

Preparado segundo o item 3.2.2. tendo a quantidade de cada componente dobrada, exceto a água.

3.2.7. Meio Completo mais KCl

Preparado segundo o item 3.2.6. sendo que o mesmo foi diluído na proporção 1:1, no momento do uso, com KCl 1,4 M em tampão fosfato pH 5,8.

3.2.8. Meio Mínimo mais KCl

Preparado segundo o ítem 3.2.5., sendo diluído na proporção de 1:1, no momento do uso, com KCl 1,4 M em tampão fosfato pH 5,8.

3.2.9. Meio para atividade lipolítica (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975)

Peptona.	10,0 g
NaCl	5,0 g
CaCl	0,1 g
Ágar	20,0 g
H ₂ O (destilada).	1000,00 ml

pH ajustado para 6,0 com NaOH 4%

Tween-20 (esterilizado).... 1% (no momento do uso).

3.2.10. Meio para atividade amilolítica

3.2.10.1. Meio Mínimo (segundo o ítem 3.2.1.), acrescido de 0,2% de amido solúvel (REAGEM, P.A.).

3.2.10.2. Meio Mínimo sem glucose (segundo o ítem 3.2.1., exceto a glucose), acrescido de 0,2% de amido solúvel (REAGEM, P.A.).

3.2.11. Meio para atividade proteolítica (COHEN, 1972b)

Meio Mínimo (segundo item 3.2.1.) tendo sido subtraído o NaNO_3 e acrescido como fonte de nitrogênio 1% de solução de leite em pó desnatado (10% p/v), marca MOLICO - NESTLÉ.

3.2.12. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico	100 mg
Ácido p-aminobenzóico	10 mg
Tiamina.	50 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina.	50 mg
Riboflavina	100 mg
H ₂ O destilada e esterilizada. . .	100 ml

A solução foi aquecida em banho-maria por 15 minutos, resfriou-se, adicionou-se clorofórmio e manteve-se em refrigerador, em frasco escuro.

3.2.13. Suplementos adicionados ao Meio Mínimo

Prepararam-se soluções estoques, segundo concentrações (Tabela a seguir), em água destilada esterilizada. Após aquecimento em banho-maria por 15 minutos, os es

toques foram mantidos em refrigerador.

	Solução estoque (100 ml H ₂ O)	Quantidade usada pa ra placa de cultura (20 ml de meio)
Leucina	1,0 g	0,1 ml
Lisina	1,0 g	0,1 ml
Metionina	1,0 g	0,1 ml
Riboflavina	10,0 mg	0,1 ml
Biotina	2,0 mg	0,1 ml
Piridoxina	5,0 mg	0,1 ml
Adenina	0,5 g	0,1 ml

3.2.14. Solução salina (0,9%)

Cloreto de sódio. 9,0 g
H₂O (destilada) 1000,0 ml

Foram colocados 10 ml por frasco com tampa rosqueável. A solução foi autoclavada por 20 min a 120°C e mantida em refrigerador.

3.2.15. Solução de Tween-80

Colocou-se 0,1 ml de Tween-80 em 99,9 ml de H₂O destilada. Distribuiu-se em tubos de ensaio (2,5 ml/tubo), tampou-se, autoclavou-se e manteve-se em refrigerador.

3.2.16. Solução de NaOH 4%

NaOH. 4 g
H₂O (destilada). 100 ml

3.2.17. Solução de iodo ressublimado

Iodo ressublimado. 1,0 g
Álcool absoluto. 100,0 ml

3.2.18. Solução de leite em pó

Pesou-se 10 g de leite em pó, homogenizou-se em 100 ml de H₂O destilada e esterilizada. Aqueceu-se em banho-maria por 10 min.

3.2.19. Solução de Benlate -[metil(butil-carbono)- 2-benzimidazole carbamato] (HASTIE, 1970)

Dissolveu-se 100 mg de benomyl em 1 ml de acetona. Acrescentou-se 10 ml de H₂O destilada e aqueceu-se em banho-maria por 10 minutos. Manteve-se em refrigerador.

3.2.20. Solução de Cloroneb (1,4-dicloro- dimitoxil benzeno)

Dissolveu-se 100 mg de cloroneb em 10 ml de H₂O destilada e esterilizada. A solução foi mantida em refrigerador.

3.2.21. Tampão fosfato pH 5.8 (0,2 M)

Solução A:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 31,2 g
 H_2O destilada. 1000,0 ml

Solução B:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 35,6 g
 H_2O destilada. 1000,0 ml

Soluções A e B foram mantidas em refrigerador. Para o preparo do tampão, no momento do uso, misturou-se 920 ml de sol. A com 80 ml de sol. B.

3.2.22. Tampão McIlvaine's, pH 5.8

Solução de ácido cítrico: 21,0 g em 1000 ml de H_2O destilada.

Solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 32,0 g em 1000 ml de H_2O destilada.

Misturou-se 184,25 ml da solução de ácido cítrico e 315,75 ml da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

3.2.23. Solução de KCl 1,4 M, pH 5.8

Dissolveu-se 104,38 g de KCl em 500 ml de solução A (item 3.2.21.), com agitação e aquecimento. Corrigiu-se o pH para 5.8 com solução B (item 3.2.21.). Completou-se o vo-

lume para 100 ml, com tampão fosfato pH 5.8. Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C e manteve-se o estoque em refrigerador.

3.2.24. Solução de KCl 0,7 M, pH 5,8

Diluiu-se 1:1 a solução de KCl 1,4 M (item 3.2.23), com tampão fosfato pH 5.8.

3.2.25. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M modificada por FURLANETO (1987) (Comunicação pessoal)

Dissolveu-se 158,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pequeno volume do tampão McIlvaine's (item 3.2.22.). Ajustou-se o pH para 5.8 com a solução de Na_2HPO_4 e completou-se o volume para 1000 ml com o referido tampão.

3.2.26. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6 M

Diluiu-se na proporção de 1:1 a solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M em tampão McIlvaine's pH 5.8.

3.2.27. Solução de enzimas líticas para produção de protoplastos (HAMLIN *et alii.*, 1981)

Em 1,0 ml de KCl 0,7 M (segundo item 3.2.24), adicionou-se 5,0 ml de enzima lítica sendo 2,5 mg de "celulase CP" e 2,5 mg de Novozyn 234.

3.2.28. Solução de polietilenoglicol (PEG) 30%

Solução A: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14,7 g

Água destilada ... 1000,00 ml

Solução B: Glicina 35,5 g

Água destilada ... 1000,00 ml

Adicionou-se 10 ml da solução A e 10 ml da solução B, ajustou-se o pH para 8.0 com NaOH 4% e adicionou-se PEG6000 na concentração de 30%. As soluções foram autoclavadas e mantidas em refrigerador.

3.2.29. Reagentes usados para eletroforese em gel de poliacrilamida (PACCOLA-MEIRELLES *et alii*, 1988)

3.2.29.1. Solução estoque de Acrilamida

Acrilamida 75 g

Bis-acrilamida..... 2 g

 H_2O destilada250 ml

Filtrou-se a solução e manteve-se em refrigerador.

3.2.29.2. Tampão do gel separador pH 8.9

Tris-base..... 45,75 g

 H_2O destilada..... 60,0 ml

Ajustou-se o pH para 8.9 com HCl 1N.

Completoou-se o volume para 100 ml, com H_2O destilada.

A solução foi filtrada e mantida à temperatura ambiente.

3.2.29.3. Tampão do gel empilhador pH 6.8

Tris-base 7,475 ml

H₂O destilada.....60,00 ml

Ajustou-se o pH para 6.8 com HCl 1N e completou-se o volume para 100 ml, com H₂O destilada.

3.2.29.4. Tampão do tanque - pH 8.9

Tris-base 6,32 g

Glicina 3,99 g

H₂O destilada100,00 ml

Ajustou-se o pH para 8.9 com glicina, completou-se o volume para 1000 ml, com H₂O destilada e manteve-se em refrigerador.

3.2.29.5. Gel separador a 10%

Tampão do gel separador

(ítem 3.2.29.2..... 1,5 ml

Acrilamida (ítem 3.2.29.1) 5,0 ml

Água destilada 8,4 ml

Perssulfato de amônia (10%) 0,113 ml

TEMED 0,005 ml

3.2.29.6. Gel empilhador a 4%

Tampão do gel empilhador (item 3.2.29.3...)	0,75	ml
Acrilamida (item 3.2.29.1)	1,00	ml
Água destilada.	5,70	ml
Persulfato de amônio(10%)	0,056	ml
TEMED.	0,0075	ml

3.2.29.7. Tampão da amostra

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

Completou-se o volume para 25 ml, com H₂O destilada e manteve-se estocada a -2°C.

3.2.29.8. Solução corante para esterase (SHAW & PRASAD, 1970).

3.2.29.8.1. Estoques

A- α -naftil acetato. . .	0,1	g
Acetona.	5,0	ml
H ₂ O destilada	5,0	ml
B- β -naftil acetato. . .	0,1	g
Acetona.	5,0	ml
H ₂ O destilada	5,0	ml

3.2.29.8.2. Corante

Fast Blue RR"	50,0	mg
Tris-HCl 0,5 M pH 7.1	5,0	ml
α -naftil acetato.	0,75	ml
β -naftil acetato.	0,75	ml
H ₂ O destilada	43,5	ml

3.2.30. Solução corante para proteínas

3.2.30.1. Fixador PAGE

Metanol.	22,5	ml
Ácido acético.	5,0	ml
H ₂ O destilada.	22,5	ml

3.2.30.2. Corante

Azul de Comassie ("Bri lhant Blue R250").	50,0	mg
Fixador PAGE.	50,0	ml

3.2.31. Soluções para citologia

3.2.31.1. Tampão fosfato 0,125 M, pH 7.0

Solução A:

NaH ₂ PO ₄	27,8	g
H ₂ O destilada.	1000,00	ml

Solução B:

Na ₂ HPO ₄	53,65	g
H ₂ O destilada.	1000,00	ml

Misturou-se 45 ml da solução A com 55 ml da solução B, completou-se o volume para 1000 ml e ajustou-se o pH para 7.0 com solução A ou B.

3.2.31.2. Solução de Giemsa

Diluiu-se uma parte de giemsa em 66 partes de glicerina, a 60°C. Após resfriamento, misturou-se com 66 partes de metanol e manteve-se à temperatura ambiente.

3.2.31.3. Solução de albumina 50%

Colocou-se a clara de um ovo em becker estéril e, com tesoura esterilizada, cortou-se a clara por uma hora. Filtrou-se, usando papel filtro, e adicionou-se igual volume de glicerina. A solução foi mantida em refrigerador.

3.2.31.4. Solução de HCl 1N

HCl	24,75 ml
H ₂ O destilada.....	300,00 ml

3.2.31.5. Solução de álcool etílico

Preparadas nas concentrações de 90 e 70% mediante diluições apropriadas em água destilada.

3.2.31.6. Solução de fixação

Utilizou-se 3 volumes de álcool etílico (absoluto) para 1 volume de ácido acético glacial. A solução foi preparada no momento do uso.

3.2.31.7. Tampão fosfato 0,02 M, pH 5.8

Diluiu-se solução 3.2.21., na proporção de 1:10 em água destilada.

3.2.32. Preparo de material, esterilização e incubação

3.2.32.1. Filtros Buchner para filtração de micélio

Foram preparados com os papéis filtros, Whatman nº 1, em seu interior, envolvidos em papel alumínio e autoclavados.

3.2.32.2. Palitos para transferência de colônias

Palitos comuns, após serem fervidos em água por duas vezes, foram colocados para secar. Quando secos, foram colocados em frascos com tampas rosqueáveis, autoclavados.

dos e levados à estufa (170°C) por 4 horas

3.2.32.3. Esterilização e incubação

Vidrarias foram lavadas e esterilizadas em forno (170°C) por 4 horas, exceto nos casos em que era necessária autoclavagem.

Meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, marca Fabbe, por 20 minutos à 120°C, exceto casos de substâncias que sofrem efeito de altas temperaturas e/ou aqueles que não necessitam esterilização.

A incubação foi feita em incubadora tipo BOD, marca FANEM, com temperatura regulada para 28°C. Em casos de incubação com agitação, utilizou-se agitador marca SUPERHOM, mantendo-se a temperatura de 28°C.

Exceções serão descritas nas metodologias específicas.

3.3. Caracterização das linhagens

3.3.1. Avaliação da produção de exoenzimas

As exoenzimas, amilase, protease e lipase, produzidas por *M. anisopliae*, foram avaliadas semiquantitativamente em meios sólidos. Conídios das diversas linha-

gens foram coletados em solução de Tween-80, que permite de sagregação dos mesmos. Semearam-se diluições apropriadas em placas de meio completo (ítem 3.2.2.), de tal forma a se obterem cerca de 30 a 50 colônias monospóricas por placa. Após 7 (sete) dias de incubação a 28°C, as colônias monospóricas foram transferidas para meios de avaliação das exoenzimas, com auxílio de palitos estéreis. Para linhagens mutantes, com marcas auxotróficas, aos meios para atividades amilolítica, proteolítica e lipolítica foram adicionados os respectivos requisitos nutricionais.

A avaliação da produção de exoenzimas foi feita com 5 (cinco) dias de incubação, a 28°C, tendo o índice enzimático sido estimado pela razão das medidas dos diâmetros das colônias mais halos pelos diâmetros das colônias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 (três) repetições por colônia e pelo menos 10 (dez) colônias por linhagem.

3.3.1.1. Atividade amilolítica

A avaliação da atividade amilolítica, ou capacidade de degradar amido, foi feita em meio sólido (ítem 3.2.10.). Comparou-se a atividade amilolítica na presença e ausência de fonte alternativa de carbono, glucose, utili

zando-se os meios descritos nos ítems 3.2.10.1. e 3.2.10.2., respectivamente.

A medida da atividade foi obtida, mediante coloração da placa de cultura com solução de iodo ressublimado, ítem 3.2.17., o qual revela halos claros ao redor das colônias, correspondentes a área de degradação do amido.

3.3.1.2. Atividade proteolítica (COHEN, 1972b, modificado pela autora).

Utilizou-se a capacidade de degradação da caseína do leite em pó, como única fonte de nitrogênio, para se medir a atividade proteolítica do fungo.

Após o período de incubação, em meio para atividade (ítem 3.2.11.), utilizou-se 5 ml por placa, de solução de azul de Comassie, ítem 3.2.30., para revelação. O azul de Comassie cora o meio de azul claro, tornando possível a visualização do halo transparente ao redor das colônias, onde a caseína do leite foi degradada. Descolorante, preparado segundo o ítem 3.2.30.1., foi utilizado quando necessário, para melhorar a visualização das bordas do halo.

3.3.1.3. Atividade lipolítica (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975)

Sorbitan monolaurato (Tween-20) foi adicionado ao meio preparado segundo o item 3.2.9., para observação da produção de lipase.

Após 5 (cinco) dias de incubação, as placas de cultura foram mantidas em refrigerador (4°C) por 12 horas, para revelação do halo. Cristais de sais de cálcio do ácido láurico, liberados pela enzima, torna possível a visualização de halos ao redor das colônias.

3.3.2. Avaliação citológica

3.3.2.1. Coloração de núcleos em conídios (TANAKA *et alii*, 1979)

Utilizaram-se colônias com 15 dias de crescimento em meio completo, a 28°C. Coletaram-se conídios, com o auxílio de uma lamínula, vertida sobre a colônia, tendo esta sido previamente fixada com solução de albumina 5%, preparada segundo o item 3.2.31.1. Fixou-se por 30 minutos em solução de álcool/ácido acético (item 3.2.31.6.). Lavou-se a lamínula por duas vezes, sendo a primeira lavagem feita em álcool etílico 90% por 5 (cinco) minutos e a segunda em álcool etílico 70% por 30 (trinta) minutos.

Passou-se três vezes em água destilada e fez-se uma hidrólise em HCl 1N, a 60°C por 10 minutos. Para retirada do HCl, lavou-se três vezes em água destilada e uma vez em tampão, por 5 minutos, o que permite também a reidratação. Manteve-se a lamínula por 20 minutos em solução de giemsa (ítem 3.2.31.2.) diluída de 1:5 em tampão fosfato. Retirou-se o excesso de corante com 3 (três) lavagens em tampão 0,2 M, pH 7.0. Ver-teu-se a lamínula em lâmina, retirou-se o excesso de água com papel filtro e observou-se ao microscópio.

3.3.2.2. Contagem do número de núcleos por conídio e mensuração de núcleos

Para cada linhagem contaram-se 300 (trezentos) conídios, sendo que dentre estes consideraram-se os que continham um ou mais núcleos.

A mensuração foi feita com o auxílio de ocular micrométrica, previamente calibrada. Procedeu-se a medida de 30 (trinta) núcleos por linhagem.

3.3.3. Caracterização para padrões de esterase (PACCOLA-MEIRELLES *et alii*, 1988)

3.3.3.1. Cultivo do fungo e extração de proteínas

Conídios das linhagens testadas foram coletadas em solução de Tween-80 e inoculados em frascos erlenmeyers, contendo 50 ml de meio completo líquido (ítem 3.2.3.). Incubaram-se os frascos a 28°C por sete dias. O micélio produzido foi coletado em funil Buchner contendo papel filtro, com auxílio de bomba de vácuo. Lavou-se o micélio duas vezes, para retirada do meio de cultivo, secou-se com papel de filtro e avaliou-se o peso.

A cada 300 mg de micélio, adicionou-se 1 ml de tampão do gel empilhador (ítem 3.2.29.3.) e triturou-se em homogeneizador elétrico por 5 (cinco) minutos, mantendo-se as amostras sempre em banho gelo-água. O extrato obtido foi conservado em banho gelo-água, em refrigerador, por 12 (doze) horas, para completar a extração. Centrifugaram-se as amostras por 20 (vinte) minutos a 20000 g, em centrífuga refrigerada.

Os extratos protéicos, sobrenadantes, foram transferidos para frascos, vedados e conservados a aproximadamente -10°C, em congelador.

3.3.3.2. Placas de gel de acrilamida

As placas foram montadas em sistema vertical e vedadas com ágar-água (4%). Preparou-se o gel separador à 10% (ítem 3.2.29.5.), vertendo-o na placa com o auxílio de seringa de vidro. Completou-se o restante da placa com água, para polimerização, após o que a água foi retirada. Preparou-se o gel empilhador a 4% (ítem 3.2.29.6.) vertendo-o em seguida, acima do gel separador, também com auxílio de seringa. Introduziu-se o pente sobre o gel empilhador e conservou-se à temperatura ambiente, para polimerização.

Polimerizado o gel, retirou-se o pente e o espaçador inferior das placas, limpou-se o ágar-água, fixou-se a placa à cuba de corrida e lavaram-se os poços deixados pelo pente, com o tampão de corrida. Vedou-se a superfície entre a placa e o tanque superior, com ágar-água e preencheu-se o tanque inferior da cuba, com tampão, tomando-se o cuidado de eliminar bolhas.

As amostras, preparadas com tampão (ítem 3.2.29.7.), na proporção 1:1, foram aplicadas nos poços. Preencheu-se o tanque superior com tampão (ítem 3.2.29.4.), iniciou-se a corrida com 100V, sendo que ao final do gel empilhador, elevou-se a voltagem a 200, mantendo-a até o final da corrida.

3.3.3.3. Coloração para revelação de esterase (SHAW & PRASAD, 1970)

Ao término da corrida, o gel foi retirado da placa e colocado em solução corante (ítem 3.2.29.8.) até o aparecimento das bandas. Retirou-se o gel do corante, mantendo-o em água.

3.4. Obtenção de mutantes

Conídios foram coletados em solução de Tween-80. Transferiu-se 1 ml da solução para 9 ml de solução salina. Procedeu-se à contagem do número de conídios da solução e irradiou-se por 1,5 minutos, para se obter 5% de sobrevivência, seguindo dados de BAGALHI (1987). Procederam-se diluições apropriadas e semearam-se em meio completo, de tal forma a se obter de 30 a 50 colônias por placa.

Selecionaram-se mutantes para produção de lipase, pela técnica do isolamento total, ou seja, pelo ensaio de todas as colônias obtidas, em meio contendo Tween-20 (ítem 3.2.9.).

3.5. Ciclo parassexual

3.5.1. Teste de reversão dos mutantes auxotróficos

Conídios das linhagens, com marcas auxotróficas, foram coletados em solução de Tween-80, de tal forma a se obter 10^7 conídios/ml. Semeou-se 0,1 ml da solução, em placas contendo meio mínimo e incubou-se a 28°C por 7 dias. A avaliação foi feita mediante contagem de colônias que cresceram neste meio.

3.5.2. Obtenção de heterocário (MESSIAS & AZEVEDO, 1980)

Conídios das duas linhagens, cada qual com uma marca morfológica e duas auxotróficas, foram coletados com o auxílio de alça de repicagem, e inoculadas em tubos contendo 2,5 ml de meio mínimo líquido suplementado com 2 e 4% de meio completo líquido. Incubaram-se os tubos a 28°C por 10 dias e observou-se a formação de uma película heterocariótica. Dividiu-se esta película em quatro partes, as quais foram transferidas para placas de meio mínimo sólido. Incubou-se a 28°C por cerca de 15 dias, para crescimento dos heterocários. Coletaram-se conídios dos heterocários, vertendo-se 10 ml de solução salina nas placas de crescimento, homogeneizando-os o quanto possível e transferiu-se a sus

pensão para frascos esterilizados com o auxílio de pipetas.

3.5.2.1. Obtenção de recombinantes prototróficos e outros tipos recombinantes

Suspensão de conídios das colônias heterocarióticas, obtidas segundo o item 3.5.2., foi semeada, mediante diluições apropriadas, em meio completo, meio mínimo e meio mínimo mais requisitos combinados dos mutantes que originaram o heterocário. Incubaram-se as placas a 28°C por aproximadamente 10 (dez) dias e observou-se o número de colônias crescidas em cada tipo de meio.

3.5.2.1.1. Avaliação dos recombinantes prototróficos

Colônias provenientes de MM, foram ensaiadas quanto à estabilidade.

Transferiram-se as colônias para MC, MC + cloroneb e MC + benlate, nas concentrações de 1,0; 1,5 e 2,0 µg/ml de meio. Incubaram-se as placas a 28°C por 10 dias e observou-se o aparecimento de setores.

Setores originados de colônias prototróficas instáveis foram repicados para placas mestras, com MC, para posterior análise genética.

O grau de ploidia foi verificado, mediante coloração de conídios, crescidos em MC por 15 dias, seguindo metodologia descrita no item 3.3.2. Mediram-se 30 núcleos de colônias que setorizaram e de colônias que não setorizaram.

3.5.3. Análise genética de recombinantes e segregantes

Colônias, provenientes de heterocário, crescidas em MC e MM mais requisitos combinados dos parentais, foram transferidas para placas mestras, com MC, na disposição de 26 pontos ($5 \times 5 + 1$).

As colônias oriundas de MC foram repicadas a partir de sua placa mestra com auxílio de multialça para MC, MM, MM mais requisitos dos parentais e MM contendo três dos requisitos dos dois mutantes (parentais), de tal forma a permitir a detecção de marcas recombinantes.

Recombinantes, produtos de parameiose, selecionados em placas contendo combinações dos requisitos dos parentais, foram analisados quanto à marcas recombinantes. Repicaram-se as colônias, a partir de cada tipo de placa mestra, com o auxílio de multialça, para placas contendo MM mais três dos requisitos dos dois parentais, MC

e MM como controle.

Setores provenientes de colônias recombinantes prototróficos instáveis isolados segundo o item 3.5.2.1.1 foram também analisados em placas contendo MM e MM mais três requisitos, tendo sido o controle feito em placas de MC.

As avaliações de crescimento foram feitas no 2º e 3º dias de incubação a 28°C, e nunca após o 5º dia, quando o crescimento de prototróficos pode propiciar o sintrofismo.

O cálculo da frequência de colônias recombinantes foi feito baseando-se no número de colônias de cada tipo recombinante em relação ao total de colônias analisadas para cada meio seletivo.

3.6. Estudos de protoplastos de *M. anisopliae*

3.6.1. Obtenção e regeneração de protoplastos

Coletaram-se conídios em solução de Tween-80 e inoculou-se cada uma das linhagens, em frascos erlenmeyers, contendo 50 ml de MC líquido (item 3.2.3.). Incubaram-se os frascos em agitador, a 150 rpm, por 24 horas, a 28°C.

O micélio crescido, foi coletado por filtração em funil de Buchner, previamente esterilizado, e com auxílio de bomba de vácuo, lavou-se o micélio, por duas vezes, com solução de KCl 0,7 M em tampão fosfato 0,2 M, preparadas segundo o item 3.2.20. Transferiu-se o micélio para placas de Petri, de plástico, devidamente pesadas e esterilizadas, verificando-se o peso úmido do micélio.

Cada 50 mg de micélio obtido foi transferido para frascos esterilizados aos quais foram adicionados 1 ml de solução de enzimas líticas, preparadas no momento do uso, segundo o item 3.2.27. Incubou-se por 3 horas em agitador com 150 rpm, a 28°C.

Após este tempo, transferiu-se o material para tubos cônicos, de centrífuga e centrífugou-se por 20 a 25 segundos a 400 rpm (ponto 2 - centrífuga Excelsa Baby). Coletou-se o sobrenadante e centrifugou-se a 2900 rpm (ponto 4 - centrífuga Excelsa Baby) por 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 3 ml de solução estabilizadora (item 3.2.24. ou 3.2.26.). Centrifugou-se novamente por 15 minutos e lavou-se os protoplastos mais uma vez, para remoção da enzima lítica. Transferiu-se a suspensão final para frascos esterilizados.

A estimativa do número de protoplastos produzidos foi obtida mediante contagem em hematímetro.

Para regeneração, procederam-se diluições em solução estabilizadora, e semearam-se em MC (ítem 3.2.2.) e MC mais estabilizadores. Incubaram-se por 72 horas a 28°C e contaram-se as colônias.

Calculou-se a frequência de regeneração, baseando-se no número de protoplastos obtidos e na diferença entre o número de colônias crescidas em MC + KCl ou MC + (NH₄)₂SO₄ e MC, segundo a fórmula:

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

onde:

a = número de colônias crescidas em meio com pleto com estabilizador osmótico;

b = número de colônias crescidas em meio com pleto;

c = número de protoplastos da suspensão.

3.6.2. Fusão de protoplastos

Misturaram-se quantidades iguais de protoplastos das linhagens a serem cruzadas, obtidos segundo o ítem 3.6.1. Centrifugou-se a suspensão a 2.900 rpm por 10 minutos sendo os protoplastos do ~~precipitado~~ ressuspendidos em 1 ml de solução de PEG (ítem 3.2.28.), e incubados a 28°C

por 10 min. Adicionaram-se 10 ml da solução estabilizadora (item 3.2.24.) e centrifugou-se a 2.900 rpm por 10 minutos . Ressuspendeu-se o precipitado mais uma vez em solução estabilizadora, centrifugou-se, sendo o precipitado finalmente coletado em 5 ml de estabilizador. Procederam-se diluições apropriadas e colocou-se 0,1 ml em placas de cultura reobrando com fina camada de meio de cultura.

3.6.3. Obtenção dos produtos de fusão e análise genética

O produto de fusão foi semeado em MC, MC + KCl, MM + KCl e meio mínimo com marcas combinadas dos parentais mais KCl. Avaliaram-se as frequências de recombinantes mediante contagem do número de colônias crescidas em cada tipo de meio e procedeu-se à análise genética segundo os itens 3.5.2.1.1. e 3.5.3.

3.6.4. Coloração de protoplastos (BORGES, 1987)

Coletou-se o precipitado, obtido na primeira centrifugação (item 3.6.1.) e espalhou-se em lâminas previamente lavadas com água e álcool. Deixou-se secar por 15 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma hidrólise em HCl 1N, a 60°C por 6 (seis) minutos. Lavou-se em água

corrente para retirada do excesso de micélio aderido à lâmina. Lavou-se uma vez mais em água destilada e procedeu-se à coloração com Giemsa, diluída de 1:5 em tampão fosfato 0,02 M, por 2 (dois) minutos. Lavou-se em água corrente e observou-se ao microscópio óptico.

A estimativa do número de núcleos por protoplasto foi obtida mediante contagem de 100 protoplastos devidamente separados quanto à quantidade de núcleos.

3.6.5. Atividade exoenzimática de colônias originadas de protoplastos regenerados

Colônias crescidas em MC + KCl foram mantidas em incubadora por 7 (sete) dias, sendo então transferidas, com o auxílio de palitos esterilizados para meios teste de atividades amilolítica (ítem 3.2.10.2.) e proteolítica (ítem 3.2.11.).

Incubou-se por 5 (cinco) dias a 28°C e procedeu-se à avaliações, segundo ítem 3.3.1.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 3 repetições por colônia.

3.7. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente através de testes F, t e Tukey, segundo os delineamentos experimentais dos ensaios.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização de *M. anisopliae* quanto à produção de exoenzimas

A variabilidade quanto à produção de amilase, protease e lipase, em linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae* foi estudada a partir de colônias provenientes de conídios individuais (monospóricas).

4.1.1. Atividade amilolítica das linhagens selvagens e mutantes

A atividade amilolítica, expressa na forma de índice enzimático, foi obtida a partir de colônias das linhagens selvagens (E_6 e E_9) e mutantes (E_6-7 , E_9-19 e E_9-20) crescidas em meio para atividade amilolítica contendo ou não glicose, estando os resultados representados nas Tabelas 1, 3, 5, 8 e 10.

As análises de variâncias, Tabelas 2, 4, 6, 7, 9 e 11, mostram que não há variabilidade nas linhagens quanto à produção de amilase, a não ser para o mutante E_6-7 onde se detectou uma pequena variação para atividade das colônias (Tabela 7).

Tabela 1 - Índice enzimático da linhagem E₆ em meio para atividade amilolítica com glicose e sem glicose, em três repetições.

COLONIAS	INDICE ENZIMATICO							
	COM GLICOSE				SEM GLICOSE			
	I	II	III	MEDIA	I	II	III	MEDIA
1	1,15	1,14	1,15	1,147	1,50	1,67	1,50	1,557
2	1,14	1,23	1,23	1,200	1,62	1,91	1,42	1,650
3	1,00	1,14	1,14	1,093	1,58	1,54	1,33	1,483
4	1,07	1,10	1,08	1,083	1,64	1,80	1,42	1,620
5	1,36	1,14	1,13	1,210	1,43	1,62	1,43	1,493
6	1,25	1,31	1,23	1,257	1,73	1,54	1,43	1,567
7	1,17	1,14	1,07	1,127	1,46	1,36	1,38	1,400
8	1,15	1,38	1,25	1,260	1,46	1,55	1,50	1,503
9	1,33	1,14	1,00	1,157	1,58	1,58	1,31	1,490
10	1,20	1,13	1,08	1,137	1,62	1,83	1,42	1,623

Tabela 2 - Análise de variância da atividade amilolítica na linhagem E₆.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Colonia	9	0,0157	1,0316 n.s.	9,143%
Meio	1	2,0646	134,8836 *	
Colonia X Meio	9	0,0147	0,9633 n.s.	
Residuo	40	0,0153		

* = significativo a 5%

n.s. = não significativo

c.v. = coeficiente de variação

Tabela 3 - Índice enzimático da linhagem E₉, em meio para atividade amilolítica com glicose e sem glicose, em três repetições.

COLONIAS	INDICE ENZIMATICO							
	COM GLICOSE				SEM GLICOSE			
	I	II	III	MEDIA	I	II	III	MEDIA
1	1,21	1,55	1,33	1,363	1,25	2,10	1,90	1,750
2	1,13	1,25	1,27	1,217	1,13	1,54	1,67	1,447
3	1,20	1,36	1,25	1,270	1,43	1,64	1,73	1,600
4	1,13	1,33	1,25	1,237	1,31	1,80	1,60	1,570
5	1,33	1,21	1,14	1,227	1,54	1,50	1,33	1,457
6	1,45	1,07	1,21	1,243	1,54	1,14	1,29	1,323
7	1,25	1,07	1,14	1,153	1,43	1,54	1,33	1,433
8	1,27	1,21	1,21	1,230	1,54	1,36	1,33	1,410
9	1,13	1,07	1,17	1,123	1,29	1,20	1,80	1,430
10	1,14	1,08	1,18	1,133	1,43	1,07	1,89	1,463

Tabela 4 - Análise de variância da atividade amilolítica na linhagem E₉.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Colonia	9	0,0461	1,1251 n.s.	15,001%
Meio	1	1,0827	26,2437 *	
Colonia X Meio	9	0,0123	0,2975 n.s.	
Residuo	40	0,0413		

* = significativo a 5%

n.s. = não significativo

c.v. = coeficiente de variação

Tabela 5 - Índice enzimático da linhagem mutante E_6-7 em meio para atividade amilolítica com glicose e sem glicose, em três repetições.

COLONIAS	INDICE ENZIMATICO							
	COM GLICOSE				SEM GLICOSE			
	I	II	III	MEDIA	I	II	III	MEDIA
1	1,15	1,07	1,09	1,103	1,75	1,85	1,69	1,763
2	1,07	1,13	1,07	1,090	1,54	1,75	1,75	1,680
3	1,00	1,14	1,07	1,070	1,77	2,00	1,85	1,873
4	1,07	1,14	1,08	1,097	1,77	1,69	1,83	1,763
5	1,07	1,14	1,21	1,140	1,92	2,00	2,00	1,973
6	1,13	1,21	1,14	1,160	1,92	1,75	1,92	1,863
7	1,08	1,14	1,21	1,143	1,85	1,92	2,17	1,980
8	1,13	1,14	1,15	1,140	1,92	1,69	1,92	1,843
9	1,15	1,07	1,21	1,143	1,75	1,92	1,92	1,863
10	1,13	1,20	1,15	1,160	1,69	1,92	1,92	1,343

Tabela 6 - Análise de variância para atividade amilolítica na linhagem mutante E_6-7 .

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Colonia	9	0,0188	2,4883 n.s.	5,860%
Meio	1	7,7760	1027,2206 *	
Colonia X Meio	9	0,0097	1,2911 n.s.	
Residuo	40	0,0075		

* = significativo a 5%

n.s. = não significativo

c.v. = coeficiente de variação

Tabela 7 - Teste de Tukey para médias de índice enzimático, das colônias da linhagem mutante E₆-7.

NUMERO COLONIA	MEDIAS DE INDICES ENZIMATICOS	GRAU DE SIMILARIDADE	
		5%	1%
7	1,562	a	A
5	1,557	a	A
6	1,512	ab	A
9	1,503	ab	A
10	1,502	ab	A
8	1,492	ab	A
3	1,472	ab	A
1	1,433	ab	A
4	1,430	ab	A
2	1,385	b	A

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

- d.m.s. 1% = 0,1989
5% = 0,1684

Tabela 8 - Índice enzimático da linhagem mutante E₉-19, em meio para atividade amilolítica com glicose e sem glicose, em três repetições.

COLONIAS	INDICE ENZIMATICO							
	COM GLICOSE				SEM GLICOSE			
	I	II	III	MEDIA	I	II	III	MEDIA
1	1,00	1,00	1,00	1,000	1,89	1,89	2,00	1,927
2	1,00	1,00	1,00	1,000	2,33	2,11	1,79	2,077
3	1,00	1,00	1,00	1,000	1,88	1,67	2,22	1,923
4	1,00	1,00	1,00	1,000	1,90	2,13	2,11	2,047
5	1,00	1,00	1,00	1,000	2,00	2,00	2,14	2,047
6	1,00	1,00	1,00	1,000	2,11	2,11	2,13	2,117
7	1,00	1,00	1,00	1,000	2,23	2,00	2,11	2,113
8	1,00	1,00	1,00	1,000	2,00	1,78	1,88	1,887
9	1,00	1,00	1,00	1,000	1,13	1,89	1,89	1,637
10	1,00	1,00	1,00	1,000	2,00	1,78	1,78	1,853

Tabela 9 - Análise de variância da atividade amilolítica na linhagem mutante E₉-19.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Colonia	9	0,0333	1,6222 n.s.	9,686%
Meio	1	13,9009	675,2389 *	
Colonia X Meio	9	0,0333	1,6222 n.s.	
Residuo	40	0,0206		

* = significativo a 5%

n.s. = não significativo

c.v. = coeficiente de variação

Tabela 10 - Índice enzimático da linhagem mutante Eg-20 em meio para atividade amilolítica com glicose e sem glicose, em três repetições.

INDICE ENZIMATICO								

COLONIAS	COM GLICOSE				SEM GLICOSE			
	I	II	III	MEDIA	I	II	III	MEDIA

1	1,07	1,15	1,15	1,123	2,18	2,18	1,92	2,093
2	1,15	1,25	1,25	1,217	2,27	2,09	1,91	2,090
3	1,08	1,15	1,15	1,127	1,91	2,00	1,92	1,943
4	1,15	1,15	1,07	1,123	1,62	2,30	1,91	1,943
5	1,15	1,08	1,08	1,103	2,18	2,56	2,30	2,347
6	1,10	1,18	1,10	1,127	2,11	2,11	2,09	2,103
7	1,10	1,33	1,22	1,217	2,63	2,56	1,92	2,370
8	1,20	1,40	1,33	1,310	2,63	2,33	2,18	2,380
9	1,33	1,30	1,30	1,310	2,56	2,78	2,00	2,447
10	1,15	1,08	1,08	1,103	2,09	2,56	2,70	2,450

Tabela 11 - Análise de variância da atividade amilolítica na linhagem mutante Eg-20.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Colonia	9	0,0774	1,4043 n.s.	13,981%
Meio	1	15,2208	276,0139 *	
Colonia X Meio	9	0,0623	1,1300 n.s.	
Residuo	40	0,0551		

* = significativo a 5%

n.s. = não significativo

c.v. = coeficiente de variação

Observou-se variabilidade somente entre colônias do mutante auxotrófico E_6-7 e ainda assim apenas com 5% de significância.

A Tabela 12 resume os valores médios obtidos para atividade amilolítica de linhagens, em meio com e sem glicose, apresentados nas Tabelas 1, 3, 5, 8 e 10. As Tabelas 13 e 14 apresentam os testes de comparação de médias do índice enzimático de linhagens, em meio para atividade amilolítica com e sem glicose.

Compararam-se os valores médios de cada meio e observaram-se diferenças significativas a 5 e 1% em teste de Tukey, tendo o meio sem glicose revelado maiores médias de índice enzimático que o meio com glicose.

Nas análises realizadas para comparação de médias de linhagens quanto à atividade amilolítica em meios com e sem glicose (Tabelas 13 e 14) observou-se que os perfis enzimáticos das linhagens são diferentes em cada tipo de meio. Em meio sem glicose as linhagens mutantes E_9-20 , E_9-19 , E_6-7 e E_6-8 apresentaram valores médios de atividade amilolítica maiores que os parentais selvagens. Já no meio com glicose as linhagens selvagens não apresentaram diferenças em relação aos mutantes. Na Figura 1 observa-se halos de degradação de amido, em meios com e sem glicose.

Tabela 12 - Índice enzimático de linhagens, mutantes e selvagens de *M. anisopliae* em meio para atividade amilolítica, com e sem glicose.

TIPO DE MEIO	LINHAGEM	ÍNDICE ENZIMÁTICO/COLONIA (+)										MÉDIA
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
MM (++) COM GLICOSE	E 6	1,147	1,200	1,093	1,083	1,210	1,257	1,127	1,260	1,157	1,137	1,167
	E-7 6	1,103	1,090	1,070	1,097	1,140	1,160	1,143	1,140	1,143	1,160	1,125
	E-8 6	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,230	1,030
	E 9	1,363	1,217	1,270	1,237	1,227	1,243	1,153	1,230	1,123	1,133	1,220
	E-19 9	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	E-20 9	1,123	1,217	1,127	1,123	1,103	1,127	1,217	1,310	1,130	1,103	1,177
MM SEM GLICOSE	E 6	1,557	1,650	1,483	1,620	1,493	1,567	1,400	1,503	1,490	1,623	1,539
	E-7 6	1,767	1,680	1,873	1,763	1,973	1,863	1,980	1,843	1,863	1,343	1,795
	E-8 6	1,920	1,830	1,430	1,430	1,710	1,750	1,600	1,670	1,730	1,620	1,669
	E 9	1,750	1,447	1,600	1,570	1,457	1,323	1,433	1,410	1,430	1,463	1,488
	E-19 9	1,927	2,077	1,923	2,047	2,047	2,117	2,113	1,887	1,637	1,853	1,963
	E-20 9	2,093	2,090	1,943	1,943	2,347	2,103	2,370	2,380	2,447	2,450	2,217

(+) valores médios de 3 (três) repetições.

(+)(+) MM - meio mínimo de PONTECORVO et alii (1953) modificado por AZEVEDO & COSTA (1973).

Tabela 13 - Teste de Tukey para médias do índice enzimático, de linhagens, no meio para atividade amilolítica, com glicose.

LINHAGEM	MEDIAS	5%	1%
E 9	1,220	a	A
E-20 9	1,177	ab	AB
E 6	1,167	ab	AB
E-7 6	1,125	abc	AB
E-8 6	1,030	bc	AB
E-19 9	1,000	c	B

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado

d.m.s. a 1% = 0,1797
5% = 0,1516

Tabela 14 - Teste de Tukey para médias do índice enzimático, de linhagens, no meio para atividade amilolítica, sem glicose.

LINHAGEM	MEDIAS	5%	1%
E-20 9	2,217	a	A
E-19 9	1,963	b	B
E-7 6	1,795	c	BC
E-8 6	1,669	cd	CD
E 6	1,539	de	DE
E 9	1,488	e	E

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado

d.m.s. a 1% = 0,1797
5% = 0,1516

Figura 1 - Halos de degradação de amido em colônias da linhagem E₆. Esquerda: meio com glicose. Direita: meio sem glicose.

Observaram-se que, linhagens que apresentam índices enzimáticos iguais a 1 (um) em meio contendo amido e glucose, têm índices significativamente diferentes em meio contendo somente amido.

LEITE (1984) comparou atividade amilolítica de linhagens de *M. anisopliae* em concentrações diferentes de substrato, mostrando que não há linearidade de resposta. ROSATO *et alii* (1981), por sua vez, ensaiaram a produção de

amilase em 11 (onze) linhagens, observando que 3 (três) destas apresentaram índices iguais a 1 (um), coincidindo com os índices obtidos em mutantes amilase negativos (SILVA, 1985). Tais resultados podem estar relacionados à presença de fontes alternativas de carbono, como extrato de levedura, peptona ou mesmo a glucose, as quais afetariam a linearidade das respostas à concentração de amido, ou à presença de halos, uma vez que o sistema de regulação da produção de amilase é do tipo repressivo e indutivo (ROBERT & MESSING-AL-AIDROSS, 1985).

Assim, pode-se ressaltar que os resultados obtidos em meio contendo somente amido devem expressar melhor o verdadeiro potencial amilolítico das linhagens, bem como a variabilidade existentes entre os mutantes e seus respectivos parentais selvagens.

4.1.2. Atividade proteolítica das linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae*

Colônias monospóricas das linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae* foram avaliadas quanto à atividade proteolítica em meio contendo leite ou contendo gelatina. Em meio contendo gelatina observou-se crescimento das colônias sem no entanto se verificar halos de exportação das exoenzimas, ao contrário do que ocorre no meio

contendo leite onde visualizou-se halos de degradação os quais foram realçados pela coloração com azul de Comassie (Figura 2).

GABRIEL (1968a) observou atividade proteolítica em meios contendo gelatina ou leite em pó sugerindo entretanto que este fato não é uma indicação de que os fungos entomopatogênicos sejam capazes de utilizarem diferentes tipos de proteínas sendo a atividade enzimática dependente de substratos, os quais podem atuar como indutores ou inibidores das proteases.

Assim, o fato de linhagens apresentarem halos de degradação em meio com leite e não as apresentarem em meio com gelatina, pode estar ligado à capacidade de tais linhagens utilizarem estas fontes proteicas. Também deve-se ressaltar a presença de fonte alternativa de nitrogênio, NaNO_3 no meio contendo gelatina a qual por uma questão de economicidade metabólica pode ter sido preferencialmente utilizada pelo fungo propiciando crescimento, sem necessidade de degradação da gelatina.

A capacidade de degradar caseína ou leite também foi observada por AL-AIDROSS & SEIFERT (1980), em mutantes G^+ (para degradação de gelatina aumentada) e G^- (degradação de gelatina diminuída), os quais apresentavam-se respectivamente como M^- (negativos para degradação de lei

te) e M^+ (positivos para degradação de leite). Também ROBERT & MESSING-AL-AIDROSS (1985) observaram que alguns mutantes apresentavam atividade proteolítica intensa em meio com gelatina e pouca atividade em meio contendo leite, enquanto outros apresentavam atividade intensa em meio contendo leite e pouca atividade em meio contendo gelatina.

Figura 2 - Halos de degradação de caseína, mediante revelação com azul de Coomassie.

Os índices enzimáticos apresentados na Tabela 15 foram analisados estatisticamente, mostrando que não há variabilidade dentro de linhagens. Entretanto entre linhagens detectou-se diferenças significativas, conforme análises representadas nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 15 - Índices enzimáticos das linhagens selvagens e mutantes, de *M. anisopliae*, para atividade proteolítica em meio contendo leite.

COLÔNIAS	ÍNDICE ENZIMÁTICO																							
	LINHAÇÃO E ₆			LINHAÇÃO E-7 ₆			LINHAÇÃO E-8 ₆			LINHAÇÃO E-19 ₉			LINHAÇÃO E-20 ₉											
	REPETIÇÃO			REPETIÇÃO			REPETIÇÃO			REPETIÇÃO			REPETIÇÃO											
	MÉDIA			MÉDIA			MÉDIA			MÉDIA			MÉDIA											
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III									
1	1,47	1,37	1,35	1,397	1,13	1,22	1,13	1,160	1,56	1,75	1,73	1,680	1,43	1,54	1,60	1,523	1,53	1,53	1,33	1,463	1,44	1,41	1,63	1,493
2	1,40	1,35	1,40	1,383	1,08	1,13	1,08	1,097	1,57	1,79	1,56	1,640	1,57	1,67	1,62	1,620	1,33	1,42	1,33	1,360	1,29	1,57	1,67	1,510
3	1,42	1,35	1,53	1,433	1,13	1,17	1,08	1,127	1,56	1,63	1,60	1,597	1,50	1,57	1,67	1,580	1,33	1,60	1,37	1,433	1,54	1,54	1,63	1,570
4	1,35	1,30	1,45	1,367	1,04	1,13	1,13	1,100	1,71	1,73	1,60	1,680	1,50	1,50	1,62	1,540	1,53	1,11	1,47	1,370	1,67	1,47	1,80	1,647
5	1,35	1,37	1,53	1,417	1,20	1,18	1,23	1,203	1,92	1,73	1,86	1,837	1,62	1,57	1,50	1,563	1,58	1,71	1,21	1,500	1,47	1,64	1,67	1,593
6	1,32	1,35	1,45	1,373	1,16	1,29	1,13	1,200	1,79	1,56	1,71	1,687	1,60	1,53	1,28	1,470	1,44	1,25	1,38	1,357	1,67	1,67	1,69	1,677
7	1,47	1,42	1,45	1,447	1,26	1,29	1,08	1,210	1,71	1,73	1,73	1,723	1,53	1,33	1,38	1,413	1,67	1,39	1,45	1,503	1,67	1,47	1,56	1,567
8	1,47	1,45	1,53	1,483	1,17	1,22	1,18	1,199	1,62	1,66	1,76	1,747	1,50	1,53	1,50	1,510	1,50	1,50	1,57	1,523	1,79	1,44	1,60	1,610
9	1,30	1,53	1,38	1,403	1,23	1,23	1,17	1,210	1,79	1,79	1,73	1,770	1,60	1,50	1,58	1,560	1,32	1,27	1,25	1,280	1,73	1,53	1,60	1,620
10	1,42	1,53	1,45	1,467	1,08	1,08	1,13	1,097	1,92	1,79	1,56	1,757	1,54	1,45	1,57	1,520	1,38	1,00	1,28	1,220	1,73	1,41	1,53	1,557

Tabela 16 - Análise de variância da atividade proteolítica, para linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae*.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Linhagem	5	0,3583	83,5002 *	4,465%
Residuo	54	0,0042		

* = significativo a 5%
c.v. = coeficiente de variação

Tabela 17 - Teste de Tukey para médias do índice enzimático de linhagens em meio para atividade proteolítica, contendo leite.

LINHAGEM	MEDIAS	5%	1%
E-7 6	1,712	a	A
E-20 9	1,584	b	B
E-8 6	1,530	b	B
E 6	1,417	c	C
E-19 9	1,401	c	C
E 9	1,159	d	D

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

d.m.s. a 1% = 0,104
5% = 8,660

A variabilidade entre linhagens, quanto à atividade proteolítica também foi observada por ROSATO *et alii* (1981), SOZA-GÓMEZ & ALVES (1983), SILVA (1985) e LEITE (1984), dentre outros.

Observa-se que as linhagens selvagens são diferentes entre si quanto à média de seus índices enzimáticos, sendo que os mutantes auxotróficos apresentam valores médios superiores a seus respectivos parentais selvagens. Tal fato pode estar relacionado a efeitos pleiotrópicos das mutações auxotróficas ou mesmo a desvios metabólicos, relacionados à utilização de nitrogênio. SILVA (1985), estudando mutantes e revertentes para atividade proteolítica em meio contendo gelatina, não observou qualquer efeito pleiotrópico visível.

4.1.3. Atividade lipolítica em linhagens de *M. anisopliae*

Algumas linhagens selvagens do fungo *M. anisopliae* foram ensaiadas quanto à atividade lipolítica, em meio contendo Tween-20, tendo as mesmas apresentado índices enzimáticos iguais a 1 (um). Já os mutantes auxotróficos obtidos a partir da linhagem E₆, não apresentaram homogeneidade de atividade lipolítica pois ora produziam halos

de precipitação de laurato de cálcio ao redor das colônias, mesmo sem choque térmico e ora não produziam halos, mesmo após choque térmico, o qual é responsável pela revelação da atividade.

SOZA-GOMEZ & ALVES (1983) também encontraram linhagens que apresentaram índices enzimáticos iguais a 1 (um) indicando que estas linhagens não mostravam atividade lipolítica, pelo menos extracelularmente. LEITE (1984), por sua vez, notou que duas das linhagens ensaiadas quanto à produção de lipase apresentavam um padrão de precipitação de laurato de cálcio muito diferente, formando uma fina camada de precipitação ao redor das colônias em contraste com a precipitação de granulação grossa, comumente observada neste teste. O fato das linhagens selvagens crescerem em meio para teste de produção de lipase, sem no entanto revelar halos, na verdade, indicam atividade, pelo menos intracelularmente.

Quanto à mutantes auxotróficos, observou-se que colônias monospóricas do mutante E₆-7 apresentavam crescimento em meio para atividade lipolítica sem a adição de seus respectivos requisitos nutricionais, não revelando halos de precipitação do laurato de cálcio. Quando ao meio se adicionou os requisitos observou-se halos, os quais variavam de colônia para colônia, apresentando valores de índices en-

zimáticos que variavam entre 1,0 e 2,0. Também o mutante auxotrófico E_6-8 apresentou variação quanto à atividade lipolítica pois algumas colônias cresciam e produziam halos enquanto outras nem mesmo apresentavam crescimento. Poder-se-ia sugerir que as mutações auxotróficas apresentassem efeitos pleiotrópicos quanto à atividade lipolítica, ou mesmo uma instabilidade para a produção de lipase ligada à mutações a nível de regulação.

Para o estudo da variabilidade quanto à atividade lipolítica nas linhagens E_6 selvagem e E_6-7 mutante, foram analisadas 100 colônias monospóricas, em placas de meio teste para atividade, inoculando-se uma colônia por placa com 3 repetições por colônia. Observou-se então que a linhagem selvagem E_6 apresentou crescimento homogêneo (2,2 a 2,5 cm de diâmetro) e manteve o índice igual a 1 (um) enquanto que a linhagem mutante E_6-7 apresentou grande variação, ocorrendo desde não crescimento até crescimento e produção de halos, os quais foram representados na forma de índices enzimáticos com valores de 1,5 a 1,6.

Como diversos autores relacionam a atividade lipolítica à capacidade de fungos penetrarem a cutícula de insetos (GABRIEL, 1968a; SAMSINAKOVA *et alii*, 1971; SÖZAGOMEZ & ALVES, 1983; LEITE, 1984; SILVA, 1985 e STIEGER *et alii*, 1986; dentre outros) e sugerem que as mudanças na vi-

culência dos fungos entomopatogênicos podem estar relacionadas à respostas fenotípicas aos mecanismos de indução enzimática (FARGUES & ROBERT, 1983a); avaliou-se a linhagem E_6 selvagem, reisolada de *Nezara viridula* quanto à variação da atividade lipolítica. Observou-se que as colônias monospóricas da linhagem reisolada de inseto, mantiveram o crescimento homogêneo (2,2 a 2,5 cm de diâmetro) sem atividade extracelular, mostrando que o fato de matar insetos não produziu efeito sobre exportação de lipase ou mesmo causou variação quanto a esse caráter.

Do ponto de vista genético, para que um organismo seja efetivamente estudado, há necessidade de que ele apresente mutantes que sejam diferentes do tipo selvagem original (AZEVEDO, 1972). Assim irradiou-se a linhagem E_6 com luz ultra-violeta e selecionou-se mutantes para atividade lipolítica (lip^+). Obteve-se 1 (um) mutante lip^+ (com produção de halo de precipitação) em 400 colônias analisadas sendo esta frequência compatível com a obtida por SILVA (1985). Ensaiou-se o mutante $E_6 lip^+$ para auxotrofia sendo este prototrófico. Avaliando-se colônias monospóricas do mutante $E_6 lip^+$, para atividade lipolítica, observou-se que o mesmo era instável pois algumas colônias revelaram halos enquanto outras não, o que pode ser observado na Figura 3. Segundo BALL (1985) a diploidia parcial ou total, as duplicações, as mutações instáveis, os fatores citoplasmáticos e

as sequências de inserção podem ser as causas de instabilidade genética nos microrganismos, as quais segundo BONATELLI JR. (1977) podem estar ligadas à variações na produção de metabólitos, sendo estas indesejáveis nos processos aplicados. Assim, as variações de atividades observadas poderiam estar ligadas à algumas das causas citadas.

Figura 3 - Placa à esquerda: colônias monospóricas da linhagem selvagem E₆O₁, sem a presença de halos de precipitação de sais de laurato de cálcio. Placa à direita: colônias monospóricas do mutante E₆ lip⁺ apresentando 2(duas) colônias sem halos visíveis e 2(duas) colônias com halos de precipitação.

A instabilidade genética, que frequentemente é observada em fungos filamentosos pela visualização de setores (PONTECORVO & KÄFER, 1958) foi também detectada no presente trabalho. Observa-se na Figura 4, colônias monospóricas setorizando em meio para atividade lipolítica.

Figura 4 - Colônias da linhagem E₆ lip⁺ emitindo setores em meio para atividade lipolítica.

Também ST LEGER *et alii* (1986), purificando exoenzimas em filtrados de cultura do fungo *M. anisopliae*, observaram que a lipase produzida é instável, quando extracelular, e conseqüentemente não é possível sua purificação.

Entretanto, com relação ao tipo de meio utilizado para observação da atividade lipolítica, deve-se res-

saltar o fato de linhagens poderem apresentar respostas diferentes à composição dos ácidos graxos utilizados como fonte de lipídios. GABRIEL (1968a) observou que *M. anisopliae* e *P. bassiana* degradavam glóbulos de lipídios em meio bacto-lipase e por outro lado não produziam enzimas capazes de degradar óleo de oliva ou óleo de côco, sugerindo que esta reação seletiva pudesse estar relacionada à presença de diferentes ácidos graxos como ácido oléico, em óleo de oliva e ácido cáprico e caprílico em óleo de côco. Assim a atividade lipolítica em diferentes linhagens poderia estar relacionada à espécie-especificidade do fungo ao hospedeiro, uma vez que diferentes insetos podem apresentar diferentes composições lipídicas. Poderia-se considerar então que a interação enzima lipolítica e degradação da cutícula envolveria problemas com a exportação de lipases ou mecanismos de regulação tipo indução-repressão. KOIDSUMI (1957) isolou lipídios da epicutícula de larvas de *Bombyx mori*, os quais eram constituídos basicamente de ácidos cáprico e caprílico e apresentavam ação antifúngica, o que poderia sugerir uma simples incapacidade do fungo degradar esses tipos de lipídios.

Consequentemente, observa-se que o meio contendo Tween-20 pode não ser o mais adequado para avaliação da atividade lipolítica, nas linhagens E₆ selvagem e mutantes, uma vez que a atividade lipolítica destas linhagens pode estar relacionada a outros tipos de ácidos graxos.

4.2. Teste de reversão

Os mutantes auxotróficos utilizados no presente trabalho, foram semeados em MM (meio mínimo) e observou-se que a frequência de reversão das marcas foi menor que 1 em 10^7 conídios. Frequências semelhantes foram obtidas por SILVEIRA (1983) e BAGALHI (1987) para os mesmos mutantes.

4.3. Ciclo parassexual e paramiose

4.3.1. Obtenção de heterocário

Conídios das linhagens mutantes foram inoculados em MM contendo 2 a 4% de MC, observando-se a formação de películas após o 7º dia de incubação, as quais já foram observadas por MESSIAS & AZEVEDO (1980), sendo que o MM + 4% de MC se mostrou mais efetivo para formação das películas heterocarióticas. Transferiu-se as películas para meio mínimo sólido onde se verificou o crescimento dos heterocários. (Tabela 18).

Tabela 18 - Vigor do heterocário entre linhagens de *anisopliae*. M .

LINHAGENS UTILIZADAS		VIGOR DO HETEROCARIO
E ₆ vio met bio (E ₆ -7)	6	
+		+++
E ₆ ylo pir lis (E ₆ -8)	6	
E ₆ vio met bio (E ₆ -7)	6	
+		+++
E ₉ ylo leu rib (E ₉ -19)	9	
E ₆ ylo pir lis (E ₆ -8)	6	
+		+++
E ₉ ylo leu rib (E ₉ -20)	9	
E ₉ ylo leu rib (E ₉ -19)	9	
+		-
E ₉ ylo leu ade (E ₉ -20)	9	

+++ = heterocario bastante vigoroso
- = sem formação de película

Os heterocários E₆-7 + E₆-8 (E₆ vio met⁻bio⁻ + E₆ ylo pir⁻lis⁻), E₆-7 + E₉-19 (E₆ vio met⁻bio⁻ + E₉ ylo leu⁻rib⁻) e E₆-8 + E₉-20 (E₆ ylo pir⁻lis⁻ + E₉ ylo leu⁻ade⁻) apresentaram crescimentos vigorosos produzindo conídios de coloração verde. Conforme Figura 5, pode-se notar regiões de intenso crescimento também observadas por SILVEIRA (1983) tendo este sugerido uma possível diploidia nestas regiões de setorização.

Figura 5 - Heterocário obtido no cruzamento $E_6-7 + E_6-8$, mostrando regiões de setorização.

A formação de heterocário entre linhagens de diferentes origens foi conseguida também por LUNA (1985) e BAGALHI (1987) via ciclo parassexual, ao contrário de SILVEIRA (1983) que só obteve heterocário entre linhagens de origens distintas através da fusão de protoplastos.

Não se verificou formação de heterocário entre as linhagens $E_9-19 + E_9-20$ (E_9 ylo leu⁻ rib⁻ + E_9 ylo leu⁻ ade⁻) mas tal fato pode ser explicado, pelas duas linhagens

conterem a marca auxotrófica (leu^-) o que não permitiu a efetiva complementação.

4.3.2. Obtenção de recombinantes prototróficos e outros tipos de recombinantes

Conídios coletados das colônias heterocarióticas foram semeados em MC, MM e MM com suplementação combinada das marcas auxotróficas dos parentais, sendo as frequências de colônias, obtidas em cada tipo de meio, sumariadas na Tabela 19.

Tabela 19 - Frequências de colônias obtidas a partir de heterocários em meios seletivos.

HETEROCARIO	MEIOS SELETIVOS	FREQUENCIAS DE COLONIAS
<i>met bio pir lis</i> E -7 + E -8 6 6	MM	28,82
	MM+met+pir	12,35
	MM+met+lis	15,76
	MM+bio+pir	12,94
	MM+bio+lis	11,29
E -7 + E -19 6 9	MM	0,00
	MM+(leu +met)	8,04 (+)
	MM+(leu +bio)	64,30 (+)
	MM+rib+met	0,00
	MM+rib+bio	8,04 (+)

-5

(+) = valores x 10

Pode-se observar que as frequências de colônias obtidas no heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$ foram superiores às frequências obtidas no heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$, o que ressalta a facilidade de complementação, em mutantes de uma mesma linhagem. BAGALHI (1987) obteve uma maior frequência de colônias recombinantes nos meios com dupla suplementação o que denota a importância de se utilizar tais meios, uma vez que possibilitam o crescimento de recombinantes auxotróficos, conforme o observado no heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$ onde não se obteve colônias em MM tendo entretanto se selecionado colônias recombinantes em meios com dupla suplementação.

Colônias oriundas do heterocário $E_6^{-8} + E_9^{-20}$ só cresceram em MC não se detectando recombinantes em MM com suplementação ou possíveis diplóides em MM, ao contrário do que observou BAGALHI (1987) para o mesmo cruzamento, tendo esse no entanto utilizado pontas de hifas.

4.3.2.1. Obtenção de recombinantes prototróficos

O crescimento de colônias em MM, oriundas de heterocário, refletem a ocorrência de recombinantes prototróficos haplóides ou formas de diploidia ou ainda aneuploidia.

Nos heterocários analisados só se observou crescimento de colônias em MM para o cruzamento $E_6^{-7} + E_6^{-8}$. Tais

colônias apresentavam coloração amarela e foram ensaiadas quanto a estabilidade em MC, MC + benlate e MC + cloroneb. Não se detectou a presença de setores em MC + cloroneb e MC contendo 1,0 μ g de benlate ou MC + 2,0 μ g de benlate sendo esta concentração inibitória de crescimento, o que se assemelha ao observado por BAGALHI (1987). Entretanto em MC e MC + 1,5 μ g de benlate observou-se que de 90 colônias ensaiadas, 28,89% apresentaram setores em ambos os meios ou em pelo menos um deles. Todos os setores obtidos apresentaram coloração verde sendo que, pelo menos os 40 setores analisados revelaram-se prototróficos. Quando alguns destes setores foram mantidos em MC, algumas das colônias apresentaram novos setores, conforme pode-se observar na Figura 6, os quais também apresentavam-se verdes, mantendo-se prototróficos.

No momento fica difícil propor qualquer explicação ao fenômeno uma vez que o caráter amarelo é recessivo em relação ao fenótipo selvagem verde, como pode ser visto pela coloração dos heterocários entre as duas linhagens amarela e verde. Para ser melhor compreendido haveria necessidade de posteriores estudos.

Figura 6 - Colônia proveniente de recombinantes prototrófico do heterocário $E_6-7 + E_6-8$, produzindo novos setores, em MC.

SILVEIRA (1983) observou a ocorrência de setores, em meio contendo cloroneb, em colônias procedentes de MM, enquanto BAGALHI (1987) não observou setores em colônias oriundas de MM sugerindo que estas fossem na verdade recombinantes haplóides. LUNA (1985), por sua vez, sugeriu que colônias capazes de crescer em MM sem apresentar setores quando transferidas para MC, são diplóides estáveis, pois quando se comparou o diâmetro do núcleo destas com seus pa-

rentais observou-se diferenças significativas, sendo os primeiros maiores. Três possíveis diplóides foram analisados em comparação com as linhagens parentais mutantes e selvagens.

Pela avaliação do número de núcleos por conídio, pela diferença da média de diâmetro dos núcleos de possíveis diplóides em relação aos mutantes e selvagens (Tabela 20), bem como pela ocorrência de setores pode-se sugerir que colônias oriundas de MM sejam diplóides estáveis (quando não produzem setores) e diplóides instáveis (quando produzem setores), embora seja difícil explicar o aparecimento de setores verdes a partir de possíveis diplóides amarelos.

Tabela 20 - Número de núcleos/conídio e diâmetro médio de núcleos em linhagens selvagens, mutantes e em possíveis diplóides (D).

LINHAGENS	No. DE NUCLEOS/CONIDIO		DIAMETRO (+) DE NUCLEO (µm)	TESTE t
	1	2		
DO3 (++)	99,33	0,67	4,39	-
D31 (++)	100,00	0,00	4,07	
D33 (++)	99,67	0,33	4,14	
E6	99,00	1,00	3,42	-
E9	99,33	0,67	3,18	
E6-7	98,67	1,33	3,00	
E6-8	99,67	0,33	2,99	
E9-19	98,67	1,33	3,54	
E9-20	98,67	1,33	3,15	

(+) valores médios de 30 medidas

(++) DO3, D31 e D33 - possíveis diplóides

Observa-se que o diâmetro dos núcleos dos possíveis diplóides são diferentes quando comparados com os das linhagens selvagens e mutantes, a níveis de 5% (teste t).

4.3.2.2. Obtenção de recombinantes e análise genética

Colônias, oriundas de heterocários, crescidas em MC e MM mais combinações de requisitos nutricionais dos parentais foram analisadas geneticamente quanto à marcas auxotróficas.

A Tabela 21 sumariza os tipos de colônias recombinantes bem como suas frequências em relação ao total de colônias analisadas, em cada cruzamento.

As Tabelas 22 e 23 apresentam as frequências de colônias recombinantes, obtidas para cada tipo de meio seletivo, nos cruzamentos $E_6-7 + E_9-19$, respectivamente.

Observou-se em todos os cruzamentos a ocorrência de diferentes tipos de recombinantes, os quais apresentam marcas auxotróficas distintas dos parentais. No cruzamento $E_6-8 + E_9-20$ as 26 colônias recombinantes, apresentadas na Tabela 21, procederam de MC não se detectando colônias re-

Tabela 21 - Frequência de colônias recombinantes, obtidas a partir de heterocários, entre linhagens de *M. anisopliae*.

HETERO-CARIO	No. DE COLONIAS ANALISADAS	MARCAS GENETICAS	No. OBSERVADO	FREQUENCIA (%)
E -7 + E -8 6 6	130	pir	14	10,77
		lis	12	9,23
		met	02	1,54
		lis bio	02	1,54
		met pir	01	0,77
		met lis	01	0,77
		bio pir	01	0,77
		lis bio pir	05	3,85
		lis met pir	03	2,31
		met bio pir	01	0,77
		lis met bio	01	0,77
		lis met pir bio	07	5,38
		prototrofos	56	43,08
		tipos parentais	24	18,46
E -7 + E -19 6 9	89	bio	02	2,25
		met	01	1,12
		bio rib	01	1,12
		bio leu	05	5,62
		met bio leu	21	23,60
		met bio rib	01	1,12
		met bio rib leu	21	23,60
		tipos parentais	37	41,57
E -8 + E -20 6 9	26	ade	01	3,85
		pir	01	3,85
		lis	02	7,69
		leu	02	7,69
		lis leu	01	3,85
		ade lis	01	3,85
		lis leu pir	01	3,85
		ade lis leu	01	3,85
		ade leu pir	01	3,85
		tipos parentais	15	57,69

Tabela 22 - Frequência de colônias recombinantes, a partir do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$, em diferentes meios seletivos.

MARCAS RECOMBI- NANTES	MEIOS SELETIVOS				
	MM+met+lis	MM+met+pir	MM+bio+pir	MM+bio+lis	MC
pir	26,92	3,85	7,69	11,54	3,85
lis	7,69	23,08	-	19,23	-
met	-	-	-	-	7,69
lis bio	-	3,85	-	-	3,85
met pir	-	-	-	3,85	-
met lis	-	-	-	-	3,85
bio pir	-	-	-	-	3,85
lis bio pir	3,85	3,85	-	-	11,54
lis met pir	-	3,85	-	3,85	3,85
met bio pir	-	-	-	-	3,85
lis met bio	-	-	-	-	3,85
lis met pir bio	7,69	3,85	-	-	15,38
prototrofos	42,31	46,15	88,46	57,69	26,92

Tabela 23 - Frequência de colônias recombinantes, a partir do heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$, em diferentes meios seletivos.

MARCAS RECOMBI- NANTES	MEIOS SELETIVOS				MC
	MM+rib+bio	MM+leu+met	MM+lev+bio	MM+rib+met	
bio	7,69	-	-	-	-
met	-	4,55	-	-	-
bio rib	3,85	-	-	-	-
bio leu	19,23	-	-	-	-
met bio leu	50,00	36,36	-	-	-
met bio rib	-	-	6,67	-	-
met bio rib leu	15,38	13,64	93,33	-	-

combinantes em meios seletivos. Pode-se verificar na Tabela 22, que no cruzamento $E_6-7 + E_6-8$ ocorreu uma grande frequência de colônias prototróficas em todos os meios seletivos. Já no cruzamento $E_6-7 + E_9-19$ observou-se crescimento de colônias somente em meios seletivos com marcas combinadas dos parentais. BAGALHI (1987) também encontrou uma maior frequência de colônias nos meios com dupla suplementação de requisitos nutricionais, onde se combinou as marcas auxotróficas dos parentais. Tais observações ressaltam a importância de se utilizar meios seletivos para obtenção de recombinantes, os quais devem apresentar grande instabilidade. A não obtenção de produtos de recombinação entre linhagens pode assim estar relacionada ao uso de somente MC e MM para recuperação de colônias, a partir de heterocários.

A recuperação de recombinantes a partir de heterocário sugere que a fase diplóide seja altamente instável, ocorrendo haploidização ainda no estágio de hifas. Este fenômeno, denominado paramiose por BANATELLI JR. *et alii* (1983), foi descrito em vários fungos como *Cephalosporium acremonium* (BALL & HAMLYN, 1982), *A. niger* (BANATELLI JR. *et alii*, 1983), *M. anisopliae* (SILVEIRA & AZEVEDO, 1987 e BAGALHI, 1987) e em *B. bassiana* (PACCOLA-MEIRELLES, 1988).

O número e os tipos de colônias obtidas no cruzamento $E_6-7 + E_6-8$ indicam que a recombinação mitótica ocorre

com frequências relativamente altas, entre mutantes da mesma linhagem. Mesmo entre linhagens distintas, a recombinação mitótica ocorre, como observado no heterocário E_6-7+E_9-19 .

MESSIAS & AZEVEDO (1980), BERGERON & MESSING-AL-AIDROSS (1982) e LUNA (1985) sugerem que o número de grupos de ligação em *M. anisopliae* é pequeno, provavelmente em torno de 5. Pela análise dos tipos recombinantes obtidos a relação com grupos de ligação e inferências a mapeamento de genes relacionados a estas marcas torna-se difícil sendo que tais estudos deveriam envolver inúmeros outros cruzamentos através do ciclo parassexual.

A grande frequência de tipos prototróficos, obtida no heterocário $E_6-7 + E_6-8$, pode sugerir que estes se originaram de permuta mitótica. BAGALHI (1987) também sugere permuta mitótica para explicar a presença de recombinantes prototróficos selvagens em MM. SILVEIRA (1983) por outro lado observou uma frequência relativamente alta de recombinação mitótica ressaltando entretanto a dificuldade de se distinguir nos segregantes se houve haploidização, permuta mitótica ou permuta mitótica mais haploidização.

A ocorrência de tipos recombinantes diferentes do esperado para o meio seletivo, foi observada, como no caso do crescimento de colônias lis met pir bio em MM + met + lis e em MM + met + pir (Tabela 22). Tais observações podem ter sido favorecidas pela transferência das colônias recombinantes, a partir dos meios seletivos, diretamente para placas mestras de MC. A única explicação possível para tais tipos recombinantes seria de que eles sejam produtos de aneuploides. Também pela análise dos padrões de bandas de α -esterase apresentadas no item 4.6., pode-se observar que os recombinantes do heterocário $E_6-7 + E_6-8$ apresentam características de aneuploides. Entretanto para a confirmação da aneuploidia seriam necessárias novas análises e observação dos novos produtos de recombinação.

4.4. Atividades amilolítica e proteolítica em recombinantes e segregantes obtidos de heterocários.

Recombinantes e segregantes procedentes do cruzamento $E_6-7 + E_6-8$ e $E_6-7 + E_9-19$, foram analisados quanto às atividades amilolítica e proteolítica. As Tabelas 24, 28, 31, 35 e 40 apresentam os índices enzimáticos obtidos nos ensaios segui

das de suas respectivas análises estatísticas (Tabela 25, 27, 29, 30, 32-34 e 36-39).

Tabela 24 - Índices enzimáticos obtidos para atividades amilolítica e proteolítica de recombinantes prototróficos instáveis, provenientes do heterocário E_6 -7 + E_6 -8.

No. PROTOCOLAR	ÍNDICE ENZIMÁTICO (+)	
	ATIVIDADE AMILOLÍTICA	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA
DA-2	1,967	1,433
DA-3	1,867	1,500
DA-4	1,900	1,453
DA-5	1,923	1,453
DA-7	1,967	1,420
DA-8	1,833	1,443
DA-10	1,940	1,547
DA-13	1,907	1,513
DA-14	1,867	1,553
DA-21	1,833	1,570
DA-22	1,460	1,133
DA-23	1,770	1,547

(+) valores medios de 3 repetições

Tabela 25 - Análises de variância da atividade amilolítica nos recombinantes prototróficos instáveis.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Recombinante	11	0,0561	2,5895 *	7,962%
Residuo	24	0,0217		

* significativo a 5%

Tabela 26 - Teste de Tukey, para médias de índice amilolítico, de recombinantes prototróficos instáveis.

NUMERO PROTOCOLAR	MEDIAS	5%	1%
DA-2	1,967	a	A
DA-7	1,967	a	A
DA-10	1,940	a	A
DA-5	1,923	a	A
DA-13	1,907	a	A
DA-4	1,900	a	A
DA-3	1,867	ab	A
DA-14	1,867	ab	A
DA-8	1,833	ab	A
DA-21	1,833	ab	A
DA-23	1,770	ab	A
DA-22	1,460	b	A

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

d.m.s a 1% = 0,5204
5% = 0,4344

Tabela 27 - Análise de variância da atividade proteolítica nos recombinantes prototróficos instáveis.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Recombinante	11	0,0401	11,3714 *	4,067%
Residuo	24	0,0035		

* significativo a 5%

Tabela 28 - Índices enzimáticos obtidos para atividade amilolítica e proteolítica, de recombinantes prototróficos estáveis, provenientes do heterocário E₆-7 + E₆-8.

No. PROTOCOLAR	INDICE ENZIMATICO (+)	
	ATIVIDADE AMILOLITICA	ATIVIDADE PROTEOLITICA
DB 41	1,900	1,433
DB 42	2,307	1,607
DB 43	1,833	1,463
DB 44	1,940	1,490
DB 45	1,877	1,467
DB 46	1,967	1,563
DB 47	1,847	1,500
DB 48	1,837	1,523
DB 49	1,867	1,557
DB 50	2,033	1,467
DB 51	1,933	1,353
DB 52	2,080	1,500

(+) valores medios de 3 repetições

Tabela 29 - Análise de variância da atividade amilolítica nos recombinantes prototróficos estáveis.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Recombinante	11	0,0221	1,0157 n.s.	7,610%
Residuo	24	0,0217		

n.s. = não há diferença significativa

Tabela 30 - Análise de variância da atividade proteolítica nos recombinantes prototróficos estáveis.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Recombinante	11	0,0144	1,8634 n.s.	5,884%
Residuo	24	0,0077		

n.s. = não há diferença significativa

Tabela 31 - Índices enzimáticos obtidos para atividades amilolítica e proteolítica, de segregantes provenientes de recombinantes prototróficos instáveis do heterocário $E_6-7 + E_6-8$.

No. PROTOCOLAR DOS SEGREGANTES	INDICE ENZIMATICO (+)	
	ATIVIDADE AMILOLITICA	ATIVIDADE PROTEOLITICA
S-1	1,593	1,343
S-2	1,803	1,387
S-3	1,747	1,447
S-4	2,027	1,590
S-5	1,523	1,450
S-6	1,660	1,510
S-7	1,430	1,533
S-8	1,573	1,467
S-9	1,557	1,440
S-10	1,630	1,610
S-11	1,593	1,620
S-12	1,657	1,710
S-13	1,727	1,563
S-14	1,890	1,407
S-15	1,690	1,547
S-16	1,950	1,400
S-17	1,623	1,487
S-18	1,757	1,567
S-19	1,580	1,357
S-21	1,827	1,473
S-23	1,590	1,340
S-24	2,047	1,660
S-25	1,537	1,453
S-26	2,040	1,770
S-27	1,807	1,810
S-28	2,040	1,923
S-29	1,583	1,303
S-30	1,643	1,333
S-31	1,627	1,320
S-32	1,677	1,273
S-33	1,470	1,373
S-34	1,577	1,257
S-35	1,643	1,610
S-36	1,687	1,353
S-37	1,727	1,527
S-38	1,690	1,327
S-39	1,457	1,543
S-40	1,623	1,423

(+) valores médios de 3 repetições

Tabela 32 - Análise de variância da atividade amilolítica dos segregantes de recombinantes prototróficos instáveis do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Segregante	37	0,0802	1,6885 n.s.	12,883%
Residuo	76	0,0475		

n.s. = não há diferença significativa a 5%

Tabela 33 - Análise de variância da atividade proteolítica, dos segregantes de recombinantes prototróficos instáveis do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Segregante	34	0,0706	4,3925 *	8,527%
Residuo	76	0,0161		

* significativo a 5%

Tabela 34 - Teste de Tukey para médias de índice proteolítico, de segregantes obtidos a partir de recombinantes prototróficos instáveis do heterocário $E_6-7 + E_6-8$.

NUMERO PROTOCOLAR DO SEGREGANTE	MEDIAS	5%	1%
S-28	1,923	a	A
S-27	1,810	ab	AB
S-26	1,770	abc	ABC
S-12	1,710	abcd	ABCD
S-24	1,660	abcde	ABCD
S-11	1,620	abcde	ABCD
S-10	1,610	abcde	ABCD
S-35	1,610	abcde	ABCD
S-4	1,590	abcde	ABCD
S-18	1,567	abcde	ABCD
S-13	1,563	abcde	ABCD
S-15	1,547	abcde	ABCD
S-39	1,543	abcde	ABCD
S-7	1,533	abcde	ABCD
S-37	1,527	abcde	ABCD
S-6	1,510	abcde	ABCD
S-17	1,487	bcde	ABCD
S-21	1,473	bcde	ABCD
S-8	1,467	bcde	ABCD
S-25	1,453	bcde	ABCD
S-5	1,450	bcde	BCD
S-3	1,447	bcde	BCD
S-9	1,440	bcde	BCD
S-40	1,423	bcde	BCD
S-14	1,407	bcde	BCD
S-16	1,400	bcde	BCD
S-2	1,387	cde	BCD
S-33	1,373	cde	BCD
S-19	1,357	cde	BCD
S-36	1,353	cde	BCD
S-1	1,343	de	BCD
S-23	1,340	de	BCD
S-30	1,333	de	CD
S-38	1,327	de	CD
S-31	1,320	de	CD
S-29	1,303	de	CD
S-32	1,273	e	D
S-34	1,257	e	D

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado

d.m.s. a 1% = 0,4713
5% = 0,4181

Tabela 35 - Índices enzimáticos obtidos para atividades amilolítica e proteolítica, de recombinantes provenientes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$.

FENOTIPO RECOMBINANTE	NUMERO PROTOCOLAR	INDICE ENZIMATICO (+)	
		ATIVIDADE AMILOLITICA	ATIVIDADE PROTEOLITICA
prototrofico	R-1	1,627	1,473
prototrofico ylo	R-2	2,130	2,030
pir	R-3	2,000	1,963
lis	R-4	1,943	1,953
lis bio pir ylo	R-5	1,000	2,057
lis bio pir met	R-6	1,940	2,073
lis bio	R-7	2,000	2,047
lis met pir	R-8	3,223	2,150
met pir	R-9	1,833	2,027
met	R-10	3,000	1,523
met lis	R-11	3,447	1,523
lis bio pir vio	R-12	2,060	1,510
met bio pir	R-13	1,593	1,503
bio pir	R-14	1,000	1,000
lis met bio	R-15	1,910	1,543

(+) valores médios de 3 repetições.

Tabela 36 - Análise de variância da atividade amilolítica de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Recombinante	14	1,4834	16,4849 *	14,652%
Residuo	30	0,0899		

* significativo a 5%

Tabela 37 - Testes de Tukey para médias de índice amilolítico, de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$

NUMERO PROTOCOLAR DO RECOMBINANTE	MEDIAS	5%	1%
R-11	3,447	a	A
R-8	3,223	a	A
R-10	3,000	ab	AB
R-2	3,130	bc	BC
R-12	3,060	c	BCD
R-3	3,000	c	BCD
R-7	3,000	c	BCD
R-4	1,943	c	BCD
R-6	1,940	c	BCD
R-15	1,910	c	CD
R-9	1,837	cd	CD
R-1	1,627	cd	CD
R-13	1,593	cd	CD
R-14	1,000	d	D
R-5	1,000	d	D

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado

d.m.s. a 1% = 1,0634
5% = 0,9023

Tabela 38 - Análise de variância, da atividade proteolítica de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Recombinante	14	0,3314	25,2011 *	6,584%
Residuo	30	0,0131		

* significativo a nível de 5%

Tabela 39 - Teste de Tukey para médias de índice proteolítico, de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_6^{-8}$

NUMERO PROTOCOLAR DO RECOMBINANTE	MEDIAS	5%	1%
R-8	2,150	a	A
R-6	2,073	a	AB
R-5	2,057	a	AB
R-7	2,047	ab	AB
R-2	2,030	ab	AB
R-9	2,027	ab	AB
R-4	1,953	ab	AB
R-3	1,710	bc	BC
R-15	1,543	c	C
R-11	1,523	c	C
R-10	1,523	c	C
R-12	1,510	c	C
R-13	1,503	c	C
E-1	1,473	c	C
R-14	1,000	d	D

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado

d.m.s. a 1% = 0,4065
5% = 0,3449

Tabela 40 - Índices enzimáticos obtidos para atividade amilolítica e proteolítica de recombinantes provenientes do heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$.

FENOTIPO RECOMBINANTE	NUMERO PROTOCOLAR	INDICE ENZIMATICO (+)	
		ATIVIDADE AMILOLITICA	ATIVIDADE PROTEOLITICA
met	R-16	2,657	1,490
bio	R-17	1,780	1,357
bio rib	R-18	1,433	1,000
met bio	R-19	1,663	1,397
met bio rib	R-20	1,677	1,433
bio leu	R-21	1,650	1,467
met bio leu	R-22	1,610	1,257
met bio rib leu	R-23	1,367	1,363

(+) valores médios de 3 repetições.

Tabela 41 - Análise de variância da atividade amilolítica de recombinantes do heterocário $E_6^{-7} + E_9^{-19}$.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Recombinante	7	0,4754	12,8899 (*)	11,104%
Residuo	16	0,0369		

(*) significativo a 5%

Tabela 42 - Análise de variância da atividade proteolítica de recombinantes do heterocário E₆⁻⁷ + E₉⁻¹⁹.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Recombinante	7	0,0744	18,3792 (*)	4,730%
Residuo	16	0,0041		

(*) significativo a 5%

Tabela 43 - Teste de Tukey para médias de índice proteolítico, de recombinantes do heterocário E₆⁻⁷ + E₉⁻¹⁹.

NUMERO PROTOCOLAR DO RECOMBINANTE	MEDIAS	5%	1%
R-16	1,490	a	A
R-21	1,467	a	AB
R-20	1,433	ab	AB
R-19	1,397	ab	AB
R-23	1,363	ab	AB
R-17	1,357	ab	AB
R-22	1,257	b	B
R-18	1,000	c	C

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado

d.m.s. a 1% = 0,4065
5% = 0,3449

Segundo a Tabela 25 os recombinantes prototróficos instáveis apresentam diferenças significativas quanto à atividade amilolítica, entretanto, pela Tabela 26 observa-se que somente a atividade do DA-22 é diferente significativamente, ainda assim somente à 5% de significância. Quanto à atividade proteolítica, os recombinantes prototróficos instáveis apresentaram diferenças (Tabela 27) também decorrentes do baixo valor de média observando no DA-22. Segregantes, provenientes de recombinantes prototróficos instáveis não apresentaram diferenças significativas quanto à atividade amilolítica (Tabela 32) mostrando no entanto grande variabilidade para atividade proteolítica (Tabela 34).

Possíveis recombinantes prototróficos estáveis não se mostram diferentes quanto às atividades amilolítica e proteolítica, (Tabela 29 e 30).

Quanto aos recombinantes provenientes do heterocário $E_6-7 + E_6-8$ observou-se que há diferença significativa entre eles, tanto para atividade amilolítica quanto para proteolítica (Tabela 37 e 39). Também os recombinantes

obtidos do heterocário $E_6-7 + E_9-19$ apresentaram diferenças quanto às atividades amilolítica e proteolítica (Tabelas 41 e 42) entretanto somente o recombinante R-16 foi diferente dos demais, com maior valor médio de atividade amilolítica.

Observou-se que todas as colônias ensaiadas em meio para atividades enzimáticas apresentavam crescimento homogêneo, exceto os recombinantes R.11, R.8 e R.10, do heterocário $E_6-7 + E_6-8$, que apresentaram valores médios de 0,5 cm de diâmetro, em meio para atividade amilolítica. O crescimento reduzido parece não estar relacionado à deficiências auxotróficas destes recombinantes mas à vias de utilização de amido pois, em meio para atividade proteolítica os mesmos apresentaram crescimento médio entre 1,3 a 1,6 cm. Segundo Tabela 37, observa-se que os recombinantes R.11, R.8 e R.10 foram os que mostraram maiores médias de índice amilolítico, sendo portanto significativamente diferentes dos demais. O fato de recombinantes apresentarem crescimento reduzido e maior índice de atividade enzimática parece ser um problema complexo. Tais questões devem envolver mecanismos de síntese e excreção

enzimática, a qual pode estar relacionada à modificações de proteínas da parede ligadas à permeabilidade podendo envolver até mesmo alterações em sistemas de regulação. Estas questões são bem discutidas por MOSCOSO (1987) que também observou linhagens de *A. nidulans* com crescimento reduzido, em meio para atividade enzimática e que no entanto mostravam os maiores índices para produção de lipase, amilase e protease.

4.4.1. Comparação das médias de atividades amilolítica e proteolítica entre linhagens parentais, recombinantes prototróficos instáveis e estáveis, segregantes e recombinantes

A Tabela 44 apresenta as médias de índices enzimáticos para atividades amilolítica e proteolítica de linhagens parentais, recombinantes prototróficos instáveis e estáveis, segregantes e recombinantes.

Tabela 44 - Médias de índice enzimático para atividade amilolítica e proteolítica, de linhagens parentais, recombinantes prototróficos instáveis e estáveis, segregantes e outros recombinantes.

LINHAGENS	ÍNDICE ENZIMÁTICO	
	ATIVIDADE AMILOLÍTICA	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA
parentais E-7 e E-8 6 6	1,732	1,621
(1) rec. proto. instáveis (DA)	1,853	1,461
(2) rec. proto. estáveis (DB)	1,952	1,498
segregantes	1,692	1,487
recombinantes (3)	2,047	1,741
parentais E-7 e E-19 6 9	1,879	1,556
recombinantes (4)	1,718	1,346

(1) = recombinantes prototróficos instáveis.

(2) = recombinantes prototróficos estáveis.

(3) = recombinantes do heterocário E₆-7 + E₆-8.

(4) = recombinantes do heterocário E₆-7 + E₉-19.

Utilizando teste t, observou-se que em média, os recombinantes prototróficos instáveis, provenientes do heterocário $E_6-7 + E_6-8$, não apresentam diferenças em relação a média dos parentais, quanto a atividade amilolítica. Recombinantes prototróficos estáveis e outros recombinantes foram diferentes significativamente dos parentais a nível de 5%, apresentando em média valores de atividade amilolítica, superiores conforme valores apresentados na Tabela 44.

Quanto a atividade proteolítica, somente os recombinantes do heterocário $E_6-7 + E_6-8$ não apresentaram diferença significativa em relação aos parentais. Recombinantes prototróficos instáveis e estáveis, bem como os segregantes apresentaram diferenças a nível de 5% do teste t, sendo suas médias inferiores à média dos parentais.

Já os recombinantes do heterocário $E_6-7 + E_9-19$, apresentaram valores médios de atividades amilolítica e proteolítica diferentes significativamente do valor médio dos parentais, segundo teste t. Ressalta-se que também nesse caso as médias dos recombinantes apresentaram valores inferiores à média dos parentais.

Recombinação mitótica e/ou aneuploidia, relacionados à instabilidade de recombinantes prototróficos bem como à segregação e recombinação para marcas auxotróficos podem também estar relacionadas as diferenças observadas entre as diferentes classes ensaiadas para as atividades enzimáticas.

4.5. Protoplastos de *M. anisopliae*

4.5.1. Obtenção, regeneração e citologia

A Tabela 45 apresenta o número de protoplastos obtidos utilizando-se o complexo lítico composto de celulase Sturge e Novozyn 234, e a regeneração destes em dois estabilizadores osmóticos.

Observa-se uma resposta bastante variável quanto à obtenção e regeneração de protoplastos em ambos os estabilizadores, o que condiz com o obtido por SILVEIRA (1983), SILVEIRA & AZEVEDO (1987) e BAGALHI (1987), com o estabilizador KCl 0,7M.

Tabela 45 - Número de protoplastos obtidos e frequência de regeneração, em diferentes linhagens de *M. anisopliae*.

LINHAGENS	No. DE PROTOPLASTOS/ml ($\times 10^6$)		FREQUENCIA DE REGENERAÇÃO (%)	
	KCl 0,7 M	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,6 M	KCl 0,7 M	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,6 M
		2 4		2 4
E ₆	3,45	1,05	2,26	1,16
E ₉	10,90	1,55	6,83	3,83
E-7 ₆	0,65	0,20	4,92	0,50
E-8 ₆	1,20	1,25	6,08	12,69
E-19 ₉	0,15	0,40	0,08	0,00

O estabilizador osmótico KCl 0,7M de modo geral tem se mostrado efetivo para obtenção e regeneração de protoplastos de *M. anisopliae* SILVEIRA (1983), entretanto, pelo menos no que se refere à linhagem E₆-8 obteve-se o dobro da frequência de regeneração com o uso do estabilizador (NH₄)₂SO₄ 0,6M, em relação ao KCl 0,7M. Em *Trichoderma pseudokoningii* tal estabilizador apresenta-se mais eficiente que outros (FURLANETO, 1988, comunicação pessoal).

As variações de obtenção e regeneração, segundo BAGALHI (1987) e SILVEIRA & AZEVEDO (1987) devem estar relacionadas à constituição da parede celular das linhagens. Assim a busca de novos estabilizadores poderia ser de extrema importância, uma vez que as variações observadas podem refletir em resultados inconsistentes quando se tenta obter produtos de fusão de protoplastos entre estas linhagens.

Quanto à citologia, observou-se que em sua maioria os protoplastos apresentam-se uninucleados ocorrendo em menores frequências protoplastos bi, tri, tetra e mesmo pentanucleados. A frequência do número de núcleos/protoplastos apresentada na Tabela 46 condiz com o observado por BAGALHI (1987).

Tabela 46 - Frequência de número de núcleos/protoplastos.

LINHAGEM	NUMERO DE NUCLEOS/PROTOPLASTOS				
	1	2	3	4	5
E ₆	57	28	11	4	0
E ₉	56	34	08	0	2
E-7 ₆	52	24	14	4	6
E-8 ₆	56	19	09	8	8

4.5.2. Fusão de protoplastos e paramiose.

Protoplastos das linhagens E_6-7 e E_6-8 foram colocados em solução de PEG (polietilenoglicol), proporcionando a fusão destes. Os possíveis produtos de fusão foram semeados em MCKCl, MMKCl e MMKCl mais combinações de requisitos nutricionais dos parentais, para verificação da ocorrência de recombinantes, produtos de paramiose. Seguiu-se o mesmo esquema utilizado para os heterocários obtidos por anastomoses de hifas.

Verificou-se o crescimento de colônias em MCKCl e MMKCl + met + lis não se detectando colônias em outros meios seletivos bem como em MMKCl. Calculou-se a frequência de fusão pela razão do número de colônias crescidas em MMKCl + met + lis e colônias crescidas em MCKCl. a frequência de 65% de fusão observada pode sugerir uma grande compatibilidade entre as linhagens E_6-7 + E_6-8 , condizente com o observado na formação de heterocáριο. O fato de se detectar crescimento de colônias somente em MMKCl + met + lis pode indicar uma tendência de formação de tipos recombinantes, principalmente para biotina, via fusão de protoplastos. Via obtenção de heterocáριο pode-se observar outros tipos recombinantes que não ocorreram via fusão, o que sugere que a formação de recombinantes pode estar relacionada com a metodologia de cruzamento.

Procedendo-se a análise genética de 40 colônias obtidas em MCKCl e MMKCl + met + lis, observou-se as frequências de recombinantes, apresentadas na Tabela 47.

Tabela 47 - Frequências de colônias recombinantes, obtidas no cruzamento das linhagens E₆-7 x E₆-8, via fusão de protoplastos.

MARCAS RECOMBINANTES	MEIOS SELETIVOS				
	MMKCl +met+lis	MMKCl +met+pir	MMKCl +bio+pir	MMKCl +bio+lis	MC
bio	19,23	-	-	-	-
pir	-	-	-	-	42,86
lis	3,85	-	-	-	7,14
met	3,85	-	-	-	-
bio met lis	3,85	-	-	-	-
bio met lis pir	3,85	-	-	-	7,14

Comparando-se as frequências de colônias recombinantes obtidas pela fusão de protoplastos com as frequências obtidas via heterocário (Tabela 11) observou-se uma grande variação de tipos recombinantes, em ambas as formas de fusão. A ocorrência de diferentes tipos recom -

binantes, bem como a ocorrência de possíveis diplóides via heterocário pode sugerir uma maior eficiência desta via para cruzamento, pelo menos no que se refere às linhagens estudadas. Entretanto, a fusão de protoplastos parece ser efetiva para observação de mecanismos de recombinação como a paramiose, uma vez que colônias apresentam crescimento em meios seletivos, com requisitos combinados das marcas dos parentais.

SILVEIRA (1983) observou que colônias heterocarióticas, formadas em MM via fusão de protoplastos não originavam diplóides em MM, sugerindo que a formação de heterocário a partir de protoplastos com vários núcleos poderia proporcionar uma razão nuclear desbalanceada ou mesmo diplóides altamente instáveis. Assim, a ocorrência de recombinantes em MMKCl + met + lis e a não ocorrência de colônias em MMKCl podem indicar instabilidade de diplóides os quais apresentariam recombinação mitótica e segregação. Tais resultados, obtidos por fusão de protoplastos se assemelham ao observado por BALL & HAMLIN (1983) em *Cephalosporium acremonium*.

A ocorrência de paramiose em produtos de fusão de protoplastos necessita ser melhor estudada em cruzamentos envolvendo diferentes linhagens, o que permitiria não só maior compreensão dos mecanismos de recombinação mas tam

bém avaliação da relação de fusão na obtenção de recombinantes e obtenção de heterocários.

4.5.3. Atividades amilolítica e proteolítica em colônias regeneradas de protoplastos

O isolamento de protoplastos de fungos filamentosos abriu novos caminhos para estudos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Os estudos genéticos abordam principalmente as variações no número de núcleos em protoplastos, conteúdo de DNA, mecanismos de regulação de síntese protéica e mesmo hibridização interespecífica e intergenérica. ISAAC (1985) revisou alguns aspectos da atividade bioquímica de protoplastos, relacionados à regeneração e biossíntese da parede celular, secreção enzimática, sistemas de transporte, localização e atividades de enzimas, síntese de macromoléculas e outros.

Muitos dos estudos realizados envolvem protoplastos como unidades funcionais, livres de parede. Entretanto na abordagem do efeito da protoplastização na atividade exoenzimática de *M. anisopliae* utilizou-se colônias regeneradas, a partir de protoplastos.

Colônias regeneradas, a partir de protoplastos, foram mantidas em MC + KCl 0,7 M por 7 dias a 28°C sendo então repicadas diretamente para os meios teste de

atividade enzimática. As atividades amilolítica e proteolítica expressas na forma de índices enzimáticos, foram avaliadas respectivamente em meio contendo amido e em meio contendo leite em pó. No caso dos mutantes com marcas auxotróficas adicionaram-se aos meios os respectivos requisitos nutricionais. A Tabela 48 apresenta as médias de índices enzimáticos obtidos para atividades amilolítica e proteolítica em linhagens selvagens e mutantes, protoplastizadas ou não. As Tabelas 49 a 52 apresentam as análises estatísticas realizadas para as atividades enzimáticas.

Observa-se que na atividade amilolítica a interação de linhagem + protoplasto é altamente significativa a 5%. Teste de Tukey para linhagens protoplastizadas e teste de Tukey para linhagens não protoplastizadas revelaram grande variação na média de atividade, refletindo efeito da protoplastização sobre a amilase. Comparando as médias gerais de atividade amilolítica de protoplastos e conídios observamos diferença significativa a 5 e 1% conforme teste de Tukey apresentado na Tabela 50.

Quanto a atividade proteolítica observou-se o efeito da protoplastização, onde a interação protoplasto + linhagem também mostrou-se significativa (Tabela 51). Observou-se ainda que as linhagens E₉-19 e E₉ apresentaram maiores índices enzimáticos quando protoplastizadas.

Tabela 48 - Índice enzimático para atividades amilolítica e proteolítica de linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae*, a partir de protoplastos e co_nídios.

ORIGEM DAS COLONIAS	LINHAGEM	INDICE ENZIMATICO/COLONIA (+)	
		ATIVIDADE AMILOLITICA	ATIVIDADE PROTEOLITICA
PROTOPLASTOS	E 6	2,018	1,295
	E 9	1,743	1,391
	E-7 6	1,823	1,708
	E-8 6	1,708	1,644
	E-19 9	1,632	1,619
CONIDIOS	E 6	1,539	1,417
	E 9	1,488	1,159
	E-7 6	1,795	1,712
	E-8 6	1,669	1,530
	E-19 9	1,963	1,401

(+) valores médios de 10 repetições

Tabela 49 - Análise de variância para atividade amilolítica de linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae*, a partir de protoplastos e conídios.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Protoplasto	1	0,2216	14,3846 (*)	7,142%
Linhagem	4	0,1376	8,9330 (*)	
Prot. x Linh.	4	0,4526	29,3853 (*)	
Residuo	90	0,0154		

(*) valores significativos a 5%

Tabela 50 - Teste de Tukey para médias de Índice amilolítico de linhagens de *M. anisopliae* a partir de protoplastos e conídios.

ORIGEM DAS COLONIAS	MEDIAS	5%	1%
Protoplastos	1,7848	a	A
Conídios	1,6907	b	B

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 51 - Análise de variância para atividade proteolítica de linhagens selvagens e mutantes de *M. anisopliae*, a partir de protoplastos e conídios.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	Q.M.	VALOR F	C.V.
Protoplasto	1	0,1927	34,0821 (*)	5,055%
Linhagem	4	0,6111	108,0734 (*)	
Prot. x Linh.	4	0,1133	20,0437 (*)	
Residuo	90	0,0056		

(*) valores significativos a 5%

Tabela 52 - Teste de Tukey para médias de índice proteolítico de linhagens de *M. anisopliae*, a partir de protoplastos e conídios.

ORIGEM DAS COLONIAS	MEDIAS	5%	1%
Protoplastos	1,5316	a	A
Conídios	1,4438	b	B

- médias seguidas por letras distintas são diferentes entre si ao nível de significância indicado.

De acordo com os resultados apresentados observa-se que a protoplastização produziu alterações tanto na atividade amilolítica quanto proteolítica, de linhagens de *M. anisopliae*. Inúmeros são os fatores que podem estar relacionados a tais alterações, podendo-se sugerir modificações em proteínas da parede, alterações em sistemas de transporte ou mesmo em sistemas de regulação a nível de espaço periplasmático, produzidos pela digestão enzimática, sendo estes responsáveis pelas alterações nas exportações das amilase e protease.

Segundo revisão de ISAAC (1985) a digestão da parede não parece provocar alterações em atividades enzimáticas de protoplastos sendo estes utilizados para identificação e localização de sistemas enzimáticos. Entretanto tais estudos se baseiam em protoplastos como unidades funcionais livres de parede não se analisando assim as alterações provocadas, nos sistemas enzimáticos, após a regeneração da parede.

Observando-se a Tabela 19 pode-se notar uma frequência de aproximadamente 25% de protoplastos binucleados e menores frequências de tri, tetra e mesmo pentanucleados. Colônias provenientes de tais protoplastos podem apresentar condições nucleares distintas das colônias não protoplastizadas o que poderia estar relacionado às alterações

nas atividades enzimáticas. BAGALHI (1987) tentando obter mutantes de *M. anisopliae* a partir de protoplastos sugeriu que a protoplastização não provoca alterações a nível de DNA. Se estas ocorrem a frequência deve ser muito baixa podendo ser mascarada pela ocorrência de protoplastos com mais de um núcleo.

Maiores estudos deveriam ser conduzidos no sentido de elucidar as alterações produzidas pela protoplastização, uma vez que esta técnica poderia ser utilizada para produção de colônias com maiores atividades exoenzimáticas, em linhagens de *M. anisopliae*.

4.6. Caracterização eletroforética de linhagens de *M. anisopliae*

Padrões de esterases têm sido utilizados para caracterização de linhagens de *M. anisopliae*. As linhagens selvagens e mutantes bem como recombinantes prototróficos instáveis e estáveis, segregantes e recombinantes, obtidos do heterocário $E_6-7 + E_6-8$ foram caracterizados eletroforeticamente quanto à esterase. A Figura 8 apresenta os padrões de bandas de α -esterases das diferentes linhagens.

De CONTI *et alii* (1980) observaram a presença de uma banda de esterase característica de linhagem de

M. anisopliae. Como indicado na Figura 7 tal banda não foi observada, somente na linhagem E_6 . Já a linhagem E_6O1 reisolada em inseto apresentou tal banda, conforme Figura 8, sugerindo assim que a ausência desta, na linhagem E_6 , possa estar ligada à sucessivas repicagens em laboratório. Manipulações em laboratório podem produzir alterações nas linhagens de *M. anisopliae*, principalmente no que se refere à patogenicidade, sendo que tal fato pode estar relacionado à produção de enzimas.

Pode-se verificar uma ampla variação nos perfis de cada linhagem, notando-se a ocorrência de diferenças no número e mesmo na posição de bandas em linhagens mutantes, quando comparadas às linhagens selvagens, das quais estes procederam (Figura 8). Segregantes e recombinantes prototróficos apresentam padrões bastante diferentes dos demais, com menor número de bandas, não se observando entretanto diferenças entre os segregantes (S_1 e S_2). Já os recombinantes prototróficos estáveis (D_E1 e D_E2) apresentam uma banda a mais que os instáveis (D_I1 e D_I2). Quanto aos recombinantes, observa-se que há variação entre eles sendo possível entretanto agrupar alguns como o R.40, R.38 e R.36 com padrões semelhantes, o R.21 e R.15; o R.14 e R.04 bem como o R.27 e R.37.

Os recombinantes R.40, R.38 e R.36 apresentam padrões semelhantes de α -esterase entretanto apresen-

tam respectivamente 1,3 e 2 marcas auxotróficas. Também os recombinantes R.27 e R.37 apresentam padrões similares de α -esterase apresentando no entanto 3 e 4 marcas auxotróficas. Assim, parece não haver uma relação direta entre padrões de α -esterase e deficiência auxotrófica. Entretanto, tais recombinantes podem apresentar aneuploidias ou pode ser ainda, que às marcas auxotróficas destes estejam relacionadas à síntese de novas proteínas.

A presença ou ausência de bandas de esterase, em recombinantes de *B.bassiana*, diferentes do tipo parental também foi observada por PACCOLA-MEIRELLES (1988). Tal fato foi atribuído a um possível estado aneuplóide dos segregantes, à modificações de proteínas já existentes ou à presença de novas proteínas. Isto condiz com o observado em segregantes de *M. anisopliae* (S_1 e S_2), os quais setORIZAM em MC, conforme descrito no item 4.3.2.1., e apresentam padrão de bandas distinto dos parentais, segundo Figura 7. Também os recombinantes prototróficos instáveis (D_{I1} e D_{I2}) mostram tal comportamento sugerindo a condição aneuplóide destes.

SILVEIRA (1983) também observou variações no padrão de esterase em segregantes, sugerindo novas combinações gênicas e presença de novos locis como responsáveis por padrões com diferentes posições de migração.

Figura 7 - Padrões de α -esterase em linhagens de *M. anisopliae*. 1- Linhagem E_6 selvagem; 2- Linhagem mutante E_6 -7; 3- Linhagem mutante E_6 -8; 4- Linhagem selvagem E_9 ; 5- Linhagem mutante E_9 -19; 6- Linhagem mutante E_9 -20.

Figura 8 - Esquema obtido a partir dos padrões de esterases de linhagens de *M. anisopliae*.

1- E_6 selvagem.	10- Recombinante lis met pir (R.27)	19- Recombinante green (R.23) prototrófico.
2- Mutante E_6^{-7} .	11- Recombinante lis bio pir met (R.37)	20- Recombinante pir. (R.14)
3- Mutante E_6^{-8} .	12- Segregantes prototrófico- S_1 .	21- Recombinante lis. (R.04)
4- E_9 selvagem.	13- Segregantes prototrófico- S_2 .	22- Recombinante met. (R.40)
5- Mutante E_9^{-19} .	14- Recombinante prototrófico estável (DE-1)	23- Recombinante lis met bio (R.38)
6- Mutante E_9^{-20} .	15- Recombinante prototrófico estável (DE-1)	24- Recombinante met lis (R.36)
7- E_6^{01} selvagem.	16- Recombinante prototrófico instável (DI-1)	25- Recombinante lis bio (R.21)
8- Recombinante met bio pir (R.35)	17- Recombinante prototrófico instável (DI-2)	26- Recombinante met pir (R.15)
9- Recombinante lis bio pir (R.50)	18- Recombinante ylo prototrófico (R.1)	

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- Não há variabilidade, para atividades amilolítica e proteolítica, dentro de colônias de mesmas linhagens de *M. anisopliae*. Entre linhagens, observa-se diferenças significativas sendo os mutantes mais efetivos que as linhagens selvagens.
- Fonte alternativa de carbono em meio para atividade amilolítica modifica a resposta de linhagens, sugerindo que os mecanismos de regulação da amilase sejam do tipo indutivo-repressivo.
- Pelo menos para a linhagem E_6 , o meio para atividade lipolítica contendo Tween-20, não é efetivo para detecção de lipase extracelular. Mutantes da linhagem E_6 com alteração da produção de lipase, são instáveis.
- Recombinantes mitóticos ocorrem, a partir de heterocários entre mutantes da mesma linhagem original. Heterocários entre linhagens de origens distintas apresentam maior instabilidade do estado diplóide.

- Meios seletivos contendo marcas combinadas de ambos os parentais, são eficientes para obtenção de tipos recombinantes, os quais não são observados em MC e MM.
- Somente os recombinantes prototróficos estáveis obtidos, apresentam média de atividade amilolítica superior à média dos mutantes parentais.
- Colônias de linhagem selvagens e mutantes, obtidas a partir de protoplastos regenerados apresentam médias de atividades amilolítica e proteolítica, superiores a média das colônias provenientes de conídios.
- Padrões de α -esterase permitem sugerir que recombinantes e segregantes apresentam aneuploidia. Em segregantes, a setorização em MC também permite sugerir um estado aneuploide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-AIDROSS, K.M. & ROBERTS, D.W. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquitoes larvae. *Canadian Journal Genetic Cytology*, Ottawa, 20:211-9, 1978.
- AL-AIDROSS, K.M. & SEIFERT, A.M. Polysacharide and protein degradation, germination, and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 36:29-34, 1980.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B., Coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. cap.6, p.73-126.
- ANDERSEN, S.O. Biochemistry of insect cuticle. *Annual Review Entomology*, Stanford, 24:29-61, 1979.
- AQUINO, M.L.N.; CAVALCANTI, V.A.I.B.; SENA, R.C.; QUEIROZ, G.F. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *M. anisopliae*. *Boletim Técnico da CODECAP*, Recife, 4:1-31, 1975.

- AQUINO, M.L.N.; VITAL, A.F.; CAVALCANTI, V.L.; NASCIMENTO, M.G. Cultura de *Metharizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em sacos de polipropileno. *Boletim Técnico da CODECAP*, Recife, 5:1-11, 1977.
- 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. & COSTA, S.O.P. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, EDUSP, 1973. 288.
- AZEVEDO, J.L. & MESSIAS, C.L. Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos. In: Azevedo, J.L., coord. *Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*. Piracicaba, FEALQ, 1985. cap.I.4, p.111-4.
- BAGALHI, E. *Parameiose em Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1987. 123p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- BAGALHI, E. & AZEVEDO, J.L. Parameiose e melhoramento genético do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15, Piracicaba, 1988. *Anais*. Piracicaba, 1988. p.63.
- BAJAN, C.; KALALOVA, S.; KMITOWA, K.; SAMSINAKOVA, A.; MOJUECHOWSKA, M. The relationship between infectious activities of entomophagous fungi *Beauveria bassiana* and their productions of enzymes biological control of the honeybee pest *Galleria mellonella*. *Bulletin d'Academie Polonaise des Sciences. Serie des Sciences Biologiques*, Varsovie, 27:963-8, 1979.
- BALL, C. Melhoramento genético de microrganismos. In: Azevedo, J.L., coord. *Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*. Piracicaba, FEALQ, 1985. cap. I.9, p.77-81.
- BALL, C. & HAMLYN, P.F. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic *Cephalosporin C*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 5:1-13, 1982.

- BARBOSA, F.R.; MOREIRA, W.A.; SANTOS, G. Effect of successive transplantation in rice on the virulence of *Metarhizium anisopliae* against *Deois flavopicta*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 20: 1115-8, 1985
- BERGERON, D. & AL-AIDROSS, K.M. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal Genetic and Cytology*, Ottawa, 24:643-51, 1982.
- BLISS, C.I. The comparasion of dosage-mortality data. *Annual Applied Biology*, Cambridge, 22:134-67, 1953.
- BONATELLI JR., R. *Estabilidade e produção de ácido cítrico em Aspergillus niger*. Campinas, 1977. 125p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" USP).
- BONATELLI JR.R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 6:399-405, 1984.
- BORGES, M.I. *Técnicas de protoplastização e isolamento de DNA de alto peso molecular de Aspergillus niger*. Campinas, 1987. 112p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- BREY, P.T. & LATGE, J.P. Integumental penetration of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by *Conidiobolus obscurus* (Entomophthoraceae). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 48:34-41, 1986).

- BURGES, H.D. & THOMPSON, E.M. Standardization and assay of microbial insecticides. In: BURGES, H.D. & HUSSEY, N.W., ed. *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press, 1971. cap.27, p.591-622.
- CAMPBELL JR., L.L. & WILLIAMS, O.B. A study of chitin-decomposing micro-organisms of marine origin. *Journal General Microbiology*, London, 5:894-905, 1951.
- CARRUTHERS, R.I.; HAYNES, D.L.; MACLEOD, D.M. *Entomophthora muscae* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) mycosis in the onion fly, *Delia antiqua* (Diptera:Anthomyidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 45:81-93, 1985.
- COHEN, B.L. The neutral and alkaline proteases of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 75:521-8, 1972a.
- COHEN, B.L. Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, London, 79:311-20, 1972b.
- COHEN, B.L. Regulation of protease production in *Aspergillus*. *Transaction British Mycology Society*, London, 76:447-50, 1981.

CRISAN, E.V. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarhizium* spores in mosquitoes larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 17:260-4, 1971.

DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 40:107-17, 1982.

DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 41:161-70, 1983.

DAOUST, R.A.; WARD, M.G.; ROBERTS, D.W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 41:151-60, 1983.

De CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L. Eletrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, Basel, 36:293-4, 1980.

- DIEHL-FLEIG, E.; PACHECO, M.R.M.; DA SILVA, M.E.; MACHADO, V.
Produção de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*
em meios de cultura alternativos. In: REUNIÃO ANUAL DE
GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 14., Goiânia, 1987. *Anais*.
Goiânia, 1987. p.23.
- DURIEZ-VAUCELLE, T.; FARGUES, J.; ROBERTS, P.H.; POPEYE, R.
Étude enzymatique comparée de champions entomopathogènes
des genres *Beauveria* et *Metarhizium*. *Mycopathologia*,
Den Haag, 75:109-26, 1981.
- FARGUES, J.; DURIEZ, T.; ANDRIEV, S.; POPEYE, R.; ROBERT, P.
Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium*
anisopliae (Delarc.) Siem, Champignon hyphomycète
entomopathogène. *C.R. Academic Science, Serie D, Paris*,
281:1781-84, 1975.
- FARGUES, J.; DURIEZ, T.; POPEYE, R.; ROBERT, P.H.; BIGUET, J.
immunological characterization of the entomopathogenic
hyphomycètes *Beauveria* and *Metarhizium*. *Mycopathologia*,
Den Haag, 75:101-8, 1981.

FARGUES, J. & REMAUDIERE, G. Considerations on the specificity on entomopathogenic fungi. *Mycopathologia*, Den Haag, 62:31-7, 1977.

FARGUES, J. & ROBERT, P.H. Effects of passaging through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 29:576-83, 1983a.

FARGUES, J. & ROBERT, P.H. Influence de l'antécédent nutritionnel sur la virulence de deux souches de l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Mycopathologia*, Den Haag, 81:145-54, 1983b.

FARGUES, J.; ROBERT, P.H.; VEY, A. Rôle du tégument et de la défense cellulaire des coleoptères hôtes dans la spécificité des souches entomopathogènes de *Metarhizium anisopliae* (Fungi imperfecti). *C.R. Academic Science*, Serie D, Paris, 282:2223-6, 1976.

FARGUES, J. & VEY, A. Modalités d'infection des larves de *Leptinotarsa decemlineata* par *Beauveria bassiana* au cours de la mue. *Entomophaga*, Paris, 19:311-23, 1984.

- FERRON, P. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annual Review Entomological Society*, Stanford, 23:409-42, 1978.
- FRIGO, S.M. *Variabilidade e fusão de protoplastos em Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin*. Piracicaba, 1983. 119p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GABRIEL, B.P. Enzymatic activities of some entomophthorous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 11:70-81, 1968a.
- GABRIEL, B.P. Histochemical study of the insect cuticle infected by the fungus *Entomophthora coronata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 11:82-9, 1968b.
- GARCIA, A.E.; BARACHO, I.R.; SOUZA, H.M.; MESSIAS, C.L. Virulência de linhagens mutantes e diplóides de *M. anisopliae* em *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera, Tephritidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, 29:267-70, 1985.
- GUNNARSSON, S.G.S. Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 52:9-17, 1988.

- HALL, R.A. Effect of repeated subculturing on agar and passaging through and insect host on pathogenicity, morphology and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 36:216-22, 1980.
- HANEL, H. A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (fungi imperfecti) against the *Termite nasutitermes exitious* (Hill) (Isoptera, Termitidae) biological control. *Journal Applied Entomology*, Hamburg, 92:9-18, 1981.
- HANEL, H. The life cycle of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the *Termite nasutitermes exitious*. *Mycopathologia*, Den Haag, 80:137-46, 1983.
- * HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, Lancaster, 67:597-607, 1975.
- HASTIE, A.C. Benlate - induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, London, 226:771, 1970.
- HUNT, D.W.A.; BORDEN, J.H.; RAHE, J.E. Nutrient-mediated germination of *Beauveria bassiana* conidia on the integument of the bark beetle *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera : Scolytidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 44:304-14, 1984.

- ISAAC, S. Metabolic properties of protoplasts. In:
PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L. *Fungal protoplasts;
aplications in biochemistry and genetics*. New York,
Marcel Dekker, 1985. v.6, cap.8, p.173-188.
- KAIJANG, L. & ROBERTS, D.W. The production of destruxins
by the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* var.
major. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York,
47:120-2, 1986.
- KERRIDGE, D. The protoplast membrane and antifungal drugs.
In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L. *Fungal protoplasts;
aplications in biochemistry and genetics*. New York,
Marcel Dekker, 1985. v.6, cap.7, p.135-69.
- KODAIRA, Y. Toxic substance to insects, produced by
Aspergillus ochraceus and *Oospora destructor*. *Agricultural
Biological Chemistry*, Tokyo, 25:261-2, 1961.
- KODAIRA, Y. Studies on the new toxic substance to insects,
destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I.
Isolation and purification of destruxin A and B.
Agricultural Biological Chemistry, Tokyo, 26:36-42, 1962.
- KOIDSUMI, K. Antifungal action of cuticular lipids in
insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York,
1:40-51, 1957.

- KÜCERA, M. The production of toxic by the entomopathogenes fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 38:33-8, 1981.
- KÜCERA, M. Inhibition of the toxic proteases from *Metarhizium anisopliae* by extracts of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 40:299-300, 1982.
- KÜCERA, M. Partial purification and properties of *Galleria mellonella* larvae proteolytic inhibitors acting on *Metarhizium anisopliae* toxic protease. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 43:190-6, 1984.
- KÜCERA, M. & SAMSINAKOVA, A. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 12:316-20, 1968.
- KÜCERA, M. & SAMSINAKOVA, A. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 35:304-10, 1980.

- LACEY, C.M.; LACEY, L.A.; ROBERTS, D.R. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 52:108-18, 1988.
- LAMBERT, F. & PUJARNISCLE, S. Purification and properties of the proteinase produced "in vitro" by *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 30:1488-93, 1984.
- LEE, S. & IZUMIYA, N. Synthesis of a cyclohexadepsipeptide protodestruxin. *Tetrahedron Letters*, New York, 11:883-6, 1975.
- LEITE, B. *Variabilidade natural de linhagens de Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin, quanto à resistência ao ultravioleta, atividade enzimática e virulência ao vetor da doença de Chagas Panstrongylus megistus*. Campinas, 1984. 136p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- LEITE, B. Caracterização de linhagens de *Metarhizium anisopliae* e virulência ao *Panstrongylus megistus*. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 15., Piracicaba, 1988. *Anais*. Piracicaba, 1988. p.62.

LEITE, B. & MESSIAS, C.L. Atividade enzimática para linhagens de *Metarhizium anisopliae*. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 36:814, 1984.

LEOPOLD, J. & SAMSINAKOVA, A. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 15:34-42, 1970.

LUNA, E.A. *Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens mutantes e diplóides de Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin*. Rio de Janeiro, 1985. 260p. (Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).

LUNA, E.A. & AZEVEDO, J.L. Obtenção de possíveis diplóides entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 37., Belo Horizonte, 1985. *Resumos*. Belo Horizonte, 1985. p.721.

MAGOON, J. & MESSING-AL-AIDROSS, K. Determination of ploidy of sectors formed by mitotic recombination in *Metarhizium anisopliae*. *Transaction British Mycology Society*, London, 82:95-8, 1984.

- MENDONÇA, A.F. & COSTA, L.C.G. Rendimento da linhagem PL191 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes substratos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., Campinas, 1987. *Anais*. Campinas, 1987. p.248.
- MESSIAS, C.L. *Parassexualidade em Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979. 73p. (Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Parassexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transaction British Mycology Society*, London, 75:473-7, 1980.
- MESSIAS, C.L.; DAOUST, R.A.; ROBERTS, D.W. Virulence of a natural isolate, auxotrophic mutants, and a diploid of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 47:231-3, 1986.
- MOHAMED, A.K.A.; JACKSON, S.D.; NELSON, F.R.S. Proteolytic activity of two isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal Georgia Entomology Society*, 19:275-8, 1984.
- MOSCOSO, I.L. *Produção de enzimas extracelulares em haplóides, heterocários e diplóides de Aspergillus nidulans*. Campinas, 1987. 93p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).

- MURAKOSHI, S.; ICHINDE, M.; SUZUKI, A.; KANAOKA, M.; ISOGAI, A.; TAMURA, S. Presence of toxic substance in fungus bodies of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Applied Entomology Zoology*, Tokyo, 13:97-102, 1978.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D. *Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto Beauveria bassiana (Vuill.)*. Piracicaba, 1988. 193p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. *Manual de técnicas eletroforéticas em microrganismos*. Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.
- PAIS, M.; DAS, B.C.; FERRON, P. Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry*, Oxford, 20:715-24, 1981.
- PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L. *Fungal protoplasts; applications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker, 1985. v.6, 353p.
- PERSSON, M.; HALL, L.; SÖDERHALL, K. Comparison of peptidase activities in some fungi pathogenic to arthropods. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 44:342-8, 1984.

- PIAZZA, L.C.; BARROS, N.M. de; FLACH, S. M.; LOPES, M.I.L.
Caracterização citológica e histológica do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (FARLOW) Samson. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., Campinas, 1987. *Anais*. Campinas, 1987. p.224.
- PONTECORVO, G. Microbiol genetics retrospect and prospect. *Proceeding of the Royal Society, Série B*, London, 158:1-23, 1963.
- PONTECORVO, G. & KÄFER, E. Genetic analysis by means of mitotic recombination. *Advances in Genetics*, 9:71-104, 1958.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.F.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, 5:141-8, 1953.
- PRASERTPHON, S. & TANAKA, Y. The formation and circulation, in *Galleria*, of hyphal bodies of entomophthorous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 11:260-80, 1968.
- PRIOR, C. & ARURA, M. The infectivity of *Metarhizium anisopliae* to two insect pests of coconuts. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 45:187-94, 1985.
- RIBA, G.; AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L.; DIAS DA SILVEIRA, W.D.; TUVESON, R. Studies of the inheritance of virulence in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 46:20-5, 1985.

- ROBERT, A. & MESSING-AL-AIDROSS, K. Acid production by *Metarhizium anisopliae*, effects on virulence against mosquitoes and on detection of "in vitro" amylase, protease and lipase activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 45:9-15, 1985.
- ROBERTS, D.W. Toxins from the entomogeneous fungus *Metarhizium anisopliae*; I. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 8:212-21, 1966a.
- ROBERTS, D.W. Toxins of the entomogeneous fungus *Metarhizium anisopliae*; II. Symptoms and detections in moribund hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 8:222-7, 1966b.
- ROBERTS, D.W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*: isolation of destruxins from submerged cultures. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 14:82-8, 1969.
- ROBERTS, D.W. Toxins. In: Burges, H.D. *Microbial control of pest and plant diseases*. New York, Academic Press, 1981, p.441-64.

- ROBERTS, D.W. World picture of biological control of insects by fungi. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS E VETORES, 1., Rio de Janeiro, 1988. *Resumos*. Rio de Janeiro, 1988. p.6.
- ROBERTS, D.W. & HUMBER, R.A. Entomopathogenic fungi. In: CONFERENCE ON INFECTION PROCESSES OF FUNGI, Bellagio, 1983. *Report*. Bellagio, Rockefeller Foundation Study and Conference Centre Bellagio, 1983. p.1-6.
- ROBINSON, R.K. Studies on penetration of insect integument by fungi. *Pest Article News Summary Sect. B*, 12:131-42, 1966.
- ROPER, J.A. Recombinação em fungos filamentosos. In: AZEVEDO, J.L., coord. *Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética*. Piracicaba, FEALQ, 1985. cap.4, p.29-33.
- ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Production of extracellular enzymes in isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 38:1-3, 1981.
- SAMSINAKOVA, A. & KALALOVA, S. The influence of a single-spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 42:156-61, 1983.

- SAMSINAKOVA, A.; MISIKOVA, S.; LEOPOLD, J. Action of enzymatic system of *Beauveria bassiana* of the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 18:322-30, 1971.
- SHERLOCK, I.A. & GUITTON, N. Observations on the action of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) on some of *Triatominae*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, 24:234-9, 1982.
- SILVA, F.P. & AZEVEDO, J.L. Esterase pattern of a morphological mutant of the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transaction British Mycology Society*, London, 81:161-3, 1983.
- SILVA, J.C. *Virulência de mutantes exoenzimáticas de Metarhizium anisopliae var. anisopliae e seus revertentes a Rhodnius prolixus*. Campinas, 1985. 161p. (Doutorado, Universidade Estadual de Campinas).
- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. Virulência de revertentes de exoenzimas de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 38:814, 1985.
- SILVEIRA, W.D. *Obtenção e fusão de protoplastos em Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin*. Piracicaba, 1983. 153p. (Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 7:1-8, 1984.
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme Microbiology Technology*, 9:149-52, 1987.
- SMITH, R.J.; PERKUL, S.; GRULA, E.A. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 38:335-44, 1981.
- SOZA-GOMEZ, D.R. & ALVES, S.B. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok.; 1. Estandartización, virulencia y actividad enzimática. *CIRPON - Revista de Investigación*, Tucumán, 1:83-102, 1983.
- ST LEGER, R.J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R.M. Enzymatic characterization of entomopathogens with the APIZYM system. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 48:375-6, 1986.
- ST LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Production of polyphenol pigments and phenoloxidase by the entomopathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 52:215-20, 1988.

- ST LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation "in vitro" by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 47:167-77, 1986a.
- ST LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 132:1509-17, 1986b.
- ST LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 52:356-9, 1988.
- SUZUKI, A.; KAWAKAMI, K.; TAMURA, S. Detection of destruxins in silkworm larvae infected with, *Metarhizium anisopliae*. *Agriculture Biological Chemistry*, Tokyo, 35:1641-3, 1971.
- SUZUKI, A.; KUYAMA, S.; KODAIRA, Y.; TAMURA, S. Structural elucidation of destruxin A. *Agriculture Biological Chemistry*, Tokyo, 30:517-8, 1966.
- SWEENEY, A.W. The mode of infection of the insect pathogen fungus *Culicinomyces* in larvae of the mosquito *Culex fatigans*. *Australian Journal of Zoology*, Melbourne, 23:49-57, 1975.

- TAMURA, S.; KUYAMA, S.; KODAIRA, Y.; HIGASHIKAWA, S. The structure of destruxin B, a toxin metabolite of *Oospora destructor*. *Agriculture Biological Chemistry*, Tokyo, 28:137-8, 1964.
- TANAKA, Y.; MURATA, N.; KATO, K. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lavedgrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. *Annual Phytopathology Society Japan*, Tokyo, 45:182-91, 1979.
- THORVILSON, H.G.; LEWIS, L.C.; PEDIGO, L. Histopathology of *Nomuraea rileyi* in *Plathypena scabra* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 45:35-40, 1985.
- TINLINE, R.D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, Lancaster, 63:713-21, 1977.
- TRAVLAND, L.B. Initiation of infection of mosquito larvae (*Culiseta inornata*) by *Coelomomyces psorophorae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 33:95-105, 1979.
- TULLOCH, M. The genus, *Metarhizium*. *Transaction British Mycological Society*, London, 66:407-11, 1976.
- TYRREL, D. Occurrence of protoplasts in the natural life cycle of *Entomophthora egressa*. *Experimental Mycology*, New York, 1:259-63, 1977.

- VALADARES, M.C.C.; NAVES, M.A.; LUNA, E.A.; AZEVEDO, J.L.
Efetividade de mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* no controle biológico de insetos. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 37., Belo Horizonte, 1985. *Resumos*. Belo Horizonte, 1985. p.721.
- VALENTE, G.U. *Isolamento e análise genética de mutantes com alteração na produção de amiloglicosidase em Aspergillus niger*. Campinas, 1985. 113p. (Mestrado - Universidade Estadual de Campinas).
- VEEN, K.H. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 9:276-8, 1967.
- VEY, A. & QUIOT, J.M. Effect "in vitro" of *Metarhizium anisopliae* toxins on the hemocytic reaction of *Oryctes rhinoceros* coleóptera. *C.R. Academic Science, Serie D*, Paris, 280:931-5, 1975.
- VIALTA, A. *Genética e produção de amiloglicosidase em Aspergillus awamori e no híbrido interespecífico com Aspergillus niger*. Campinas, 1987. 184p. (Mestrado, Universidade Estadual de Campinas).

WRIGHT, V.F.; VESCONDER, R.F.; CIEGLER, A. Mycotoxins and other fungal metabolites as insecticides. In: Kurstak, E., ed. *Microbial and viral pesticides*. New York, Marcel Dekker, 1982. cap.17, p.559-83.

ZACHARUK, R.Y. Electron-microscope studies of the histopathology of fungal infections by *Metarhizium anisopliae*. *Publications of the Entomological Society of America*, Washington, 9:112-9, 1973.