

PATRICIA DO ROCIO DALZOTO

ESTUDOS GENÉTICOS NO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO
***Beauveria bassiana* VUILL.**

Monografia apresentada para obtenção do
Grau de Bacharel em Ciências Biológicas ,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora : Prof^a Vanessa Kava-Cordeiro.

Curitiba
1996

A meus pais , Antonio e Amélia e
minha irmã Lorena , com todo amor

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Professora Vanessa Kava-Cordeiro , que além de orientadora foi incentivadora e grande amiga em todos os momentos.

À Professora Ida Chapaval Pimentel , do Departamento de Patologia Básica da UFPR , pelas linhagens de *Beauveria bassiana*, gentilmente cedidas , bem como pelos preciosos conselhos acerca deste trabalho.

À Professora Débora do Rocio Klisiowicz , do Departamento de Patologia Básica da UFPR , pela disponibilidade em ceder os triatomíneos utilizados neste trabalho.

Ao Professor Arnoldo Meister Pimentel , coordenador da disciplina de Estágio , pela compreensão e amizade.

Ao professor Elias Karam Jr pela amizade e incentivo durante o período de estágio.

Às amigas Rosane e Maria Fernanda pelo auxílio e companheirismo no Laboratório de Genética de Microrganismos.

Ao Professor José Cunha Fernandes, pelos conselhos na parte estatística.

Ao amigo Nilson , pela boa vontade e tempo dispendido com a parte estatística do trabalho.

À Tiyomi , pela realização dos testes estatísticos.

Aos colegas dos laboratórios de Citogenética Animal e Humana , pela paciência e empréstimo dos microscópios.

A todos os professores e colegas do Departamento de Genética da UFPR , que de alguma forma , tornaram a realização desta monografia uma tarefa agradável e muito proveitosa.

Às amigas do curso de Biologia : Fabiana , Sônia e Eliene , pela amizade , incentivo e sobretudo compreensão pela minha falta de tempo para os nossos trabalhos em equipe.

Aos amigos Edimara , Edna e Irineu , pelo empréstimo do computador nas horas mais inusitadas.

Aos meus pais , Antonio e Amélia e minha irmã Lorena , pela ajuda constante em todos os sentidos , pela compreensão e confiança.

A Deus , por ter possibilitado a realização desta monografia.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
SUMÁRIO.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FOTOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	10
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 - LINHAGENS UTILIZADAS.....	11
3.2 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	12
3.3 - PREPARO DE MATERIAL.....	20
3.4 - INCUBAÇÃO.....	20
3.5 - CRESCIMENTO E CONIDIAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	21
3.6- COLORAÇÃO DE NÚCLEOS.....	21
3.7 - SOBREVIVÊNCIA À LUZ ULTRAVIOLETA.....	22
3.8 - ISOLAMENTO DE MUTANTES.....	23
3.9 - CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS.....	24
3.10 - TESTE DE REVERSÃO.....	25
3.11 - OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIO.....	26
3.12 - TESTE DE PATOGENICIDADE DE <i>Beauveria bassiana</i> SOBRE <i>Rhodnius robustus</i>	26
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 - CRESCIMENTO E CONIDIAÇÃO EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.....	29
4.2 - VERIFICAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS HIFAS E CONÍDIOS DE <i>Beauveria bassiana</i>	44
4.3 - CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DE 3 LINHAGENS DE <i>Beauveria bassiana</i> AO MUTAGÊNICO FÍSICO LUZ ULTRAVIOLETA.....	46
4.4 - OBTENÇÃO DE MUTANTES MORFOLÓGICOS E AUXOTRÓFICOS ATRAVÉS DE IRRADIAÇÃO COM O MUTAGÊNICO FÍSICO LUZ ULTRAVIOLETA.....	50
4.5 - TESTE DE REVERSÃO.....	57
4.6 - OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIO.....	58
4.7 - TESTE DE PATOGENICIDADE DE <i>Beauveria bassiana</i> SOBRE NINFAS E ADULTOS DE <i>Rhodnius robustus</i>	59
5 - CONCLUSÕES.....	62
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Média dos diâmetros, em centímetros, das colônias de 3 linhagens selvagens de <i>Beauveria bassiana</i> em 7 meios de cultura, no 12° dia de crescimento (média de 6 repetições).....	29
TABELA 2: ANAVA - Análise de variância para o caráter diâmetro da colônia de 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> em 7 meios de cultura, no 12° dia de crescimento	33
TABELA 3: Comparação múltipla entre médias do diâmetro de 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> em 7 meios de cultura, no 12° dia de crescimento, através do teste de Tuckey, com $p < 0,01$ (média de 6 repetições).....	34
TABELA 4: Comparação múltipla entre médias do diâmetro de colônias em 7 meios de cultura, para 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> , no 12° dia de crescimento, através do teste de Tuckey, com $p < 0,01$ (média de 6 repetições).....	35
TABELA 5: Médias da conidiação de 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> em 7 meios de cultura, no 12° dia de crescimento (média de 3 repetições) ($N \times 10^6$ conídios/ml).....	36
TABELA 6: ANAVA - Análise de variância para o caráter conidiação de 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> em 7 meios de cultura, no 12° dia de crescimento	40
TABELA 7: Diferenças entre as médias da interação linhagem x meio para o caráter produção de conídios para 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> em 7 meios de cultura, no 12° dia de crescimento (média de 3 repetições) ($N \times 10^6$ conídios/ml):	41
TABELA 8: Comparação múltipla entre médias de conidiação de 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> em 7 meios de cultura, no 12° dia de crescimento, através do teste de Tuckey, com $p < 0,01$ (média de 3 repetições).....	42
TABELA 9: Comparação múltipla entre médias da conidiação em 7 meios de cultura, para 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> , no 12° dia de crescimento, através do teste de Tuckey, com $p < 0,01$ (média de 3 repetições).....	43
TABELA 10: Meios de cultura mais eficientes para a produção de conídios para 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i>	44
TABELA 11: Porcentagem de sobrevivência de 3 linhagens selvagens de <i>Beauveria bassiana</i> à luz ultravioleta em diferentes tempos de exposição (média de 3 repetições).....	46
TABELA 12: Mutantes morfológicos da linhagem E2 de <i>Beauveria bassiana</i> obtidos com luz ultravioleta.....	51
TABELA 13: Mutantes morfológicos da linhagem E3 de <i>Beauveria bassiana</i> obtidos com luz ultravioleta.....	53
TABELA 14: Mutantes morfológicos da linhagem E8 de <i>Beauveria bassiana</i> obtidos com luz ultravioleta.....	54
TABELA 15: Mutantes auxotróficos de <i>Beauveria bassiana</i> obtidos com luz ultravioleta.....	55
TABELA 16: Porcentagem de mutantes auxotróficos obtidos com 1 minuto (linhagem E3) e 2 minutos (linhagens E2 e E8) de exposição à luz ultravioleta.....	56
TABELA 17: Porcentagem de mutantes auxotróficos obtidos com 1 minuto (linhagem E3) e 2 minutos (linhagens E2 e E8) de exposição à luz ultravioleta.....	57.

LISTA DE FOTOS

FOTO 1: Linhagens selvagens E2, E3 e E8 de <i>Beauveria bassiana</i>	11
FOTO 2: Morfologia externa de adultos de <i>Rhodnius robustus</i>	27
FOTO 3: Teste de patogenicidade de <i>Beauveria bassiana</i> contra adultos de <i>Rhodnius robustus</i>	28
FOTO 4: Conídios da linhagem selvagem E8 de <i>Beauveria bassiana</i> , em que visualiza-se os núcleos localizados periféricamente.(aumento 1000x).....	45
FOTO 5: Conidióforo da linhagem selvagem E2 de <i>Beauveria bassiana</i> (aumento 1000x).....	45
FOTO 6: Mutantes morfológicos da linhagem E2 de <i>Beauveria bassiana</i>	52
FOTO 7: Mutantes morfológicos da linhagem E2 de <i>Beauveria bassiana</i>	52
FOTO 8: Mutantes morfológicos da linhagem E3 de <i>Beauveria bassiana</i>	53
FOTO 9: Mutantes morfológicos da linhagem E8 de <i>Beauveria bassiana</i>	54
FOTO 10: Provável sincário formado entre os mutantes auxotróficos E8-arg ⁻ e E8-cyt ⁻ em meio mínimo.....	59
FOTO 11: Adultos e ninfas de <i>Rhodnius robustus</i> submetidos ao tratamento com <i>Beauveria bassiana</i> no vigésimo primeiro dia após o tratamento.....	60
FOTO 12: Ninfas de <i>Rhodnius robustus</i> , nascidas 20 dias após o experimento (grupo controle).....	60
FOTO 13: Detalhe dos ovos de <i>Rhodnius robustus</i> submetidos ao tratamento com a linhagem E8 selvagem, que não eclodiram até o vigésimo primeiro dia do experimento.....	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Comparação do diâmetro das colônias, em centímetros, no 12º dia de crescimento da linhagem E2 em 7 meios de cultura.....	3
FIGURA 2 -- Comparação do diâmetro das colônias, em centímetros, no 12º dia de crescimento da linhagem E3 em 7 meios de cultura.....	31
FIGURA 3 -- Comparação do diâmetro das colônias, em centímetros, no 12º dia de crescimento da linhagem E8 em 7 meios de cultura.....	31
FIGURA 4 - Comparação do diâmetro, em centímetros, das colônias de 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> , no 12º dia de crescimento em 7 meios de cultura.....	32
FIGURA 5 - Produção de conídios ($N \times 10^6$ conídios/ml) pela linhagem E2, no 12º dia de crescimento em 7 meios de cultura.....	37
FIGURA 6 - Produção de conídios ($N \times 10^6$ conídios/ml) pela linhagem E3, no 12º dia de crescimento em 7 meios de cultura.....	38
FIGURA 7 - Produção de conídios ($N \times 10^6$ conídios/ml) pela linhagem E8, no 12º dia de crescimento em 7 meios de cultura.....	38
FIGURA 8 - Comparação da produção de conídios ($N \times 10^6$ conídios/ml) por 3 linhagens de <i>Beauveria bassiana</i> , no 12º dia de crescimento em 7 meios de cultura.....	39
FIGURA 9 - Curva de sobrevivência da linhagem E2 a diferentes tempos de exposição (minutos) à luz ultravioleta (média de 3 repetições).....	47
FIGURA 10 - Curva de sobrevivência da linhagem E3 a diferentes tempos de exposição (minutos) à luz ultravioleta (média de 3 repetições).....	48
FIGURA 11 - Curva de sobrevivência da linhagem E8 a diferentes tempos de exposição (minutos) à luz ultravioleta (média de 3 repetições).....	49

RESUMO

As linhagens selvagens E2, E3 e E8 do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* foram analisadas quanto à sua variabilidade natural, através da verificação do crescimento radial e produção de conídios em sete meios de cultura. Para o crescimento radial as três linhagens comportaram-se igualmente nos diferentes meios. Os meios que proporcionaram o melhor crescimento foram o meio completo, o BDA modificado e o BDA. Para o caráter produção de conídios observou-se diferença entre as linhagens, sendo que a linhagem E3 tem melhor conidiação em meio BDA modificado, enquanto a linhagem E2 produz mais conídios em meio completo, seguido de BDA e BDA modificado. As três linhagens selvagens foram submetidas a diferentes doses do agente mutagênico físico luz ultravioleta e a partir destes tratamentos foram elaboradas curvas de sobrevivência destas linhagens a este mutagênico. Determinou-se o tempo de exposição à luz ultravioleta que proporcionou de 1 a 5 % de sobrevivência de conídios para cada linhagem, que foi de 1 minuto para a linhagem E3 e de 2 minutos para as linhagens E2 e E8. Utilizando sempre a mesma dose de mutagênico (1 minuto para a linhagem E3 e 2 minutos para as linhagens E2 e E8) foram obtidos mutantes morfológicos e auxotróficos para as três linhagens. Os mutantes morfológicos diferem do selvagem principalmente na forma da colônia e os auxotróficos apresentam deficiências para os aminoácidos arginina e cistina(linhagem E8), vitamina biotina (linhagem E3) e ácido nucléico adenina(linhagem E2). Os mutantes morfológicos E8-1 e E8-2, bem como a linhagem selvagem E8, foram testados quanto à sua patogenicidade ao triatomíneo *Rhodnius robustus*, um dos vetores do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas e foi determinado que o tempo para que ocorresse a morte das ninfas é cerca de 7 dias e dos adultos, em torno de 10 dias, indicando a patogenicidade deste fungo a este importante inseto de interesse médico.

1 - INTRODUÇÃO

O fungo *Beauveria bassiana* pertence à Subdivisão Deuteromycotina, Ordem Moniliales, Família Moniliacea. É um “fungo imperfeito” uma vez que seu estágio sexual não é conhecido, sendo sua reprodução principalmente assexuada em que os esporos são produzidos, por sucessivas divisões celulares. Por formarem-se em hifas denominadas conidióforos, os esporos podem ser chamados de conídios.

Fungos que possuem reprodução sexuada, passam a maior parte da vida no estado haplóide, formando um zigoto diplóide somente quando ocorre a fusão de hifas de dois indivíduos distintos (anastomose de hifas). Nesta hifa com núcleos diferentes (heterocário), ocorre a fusão de dois núcleos originando um núcleo diplóide. Este núcleo diplóide (zigoto) encontra-se num segmento modificado da hifa, denominado asco. Este zigoto sofre meiose, originando quatro células haplóides e estas sofrem uma divisão mitótica resultando em oito células haplóides, denominadas ascósporos, que são os esporos produzidos no ciclo sexual. Isto representa uma vantagem em termos de estudos genéticos, pois é durante a meiose que se dá a recombinação genética. Este fato pode ser observado analisando-se os ascósporos resultantes, fornecendo dados para o estudo de segregação mendeliana e confecção de mapas genéticos destes organismos.

Em condições de meio adversas, alguns fungos com ciclo sexual conhecido e também alguns Deuteromicetos, como *Beauveria bassiana*, realizam uma alternativa de sexo, denominada Ciclo Parassexual, primeiramente descrito por PONTECORVO e ROPER (1952) em *Aspergillus nidulans*. Basicamente ele ocorre quando hifas de diferentes indivíduos haplóides fundem-se (anastomose de hifas), originando uma

única hifa. Nesta hifa com núcleos diferentes (heterocário), ocorre a fusão de dois núcleos haplóides, originando um núcleo diplóide. Durante as divisões mitóticas que este núcleo sofre podem ocorrer permutas e, apesar da estabilidade do diplóide, há uma tendência ao retorno à condição haplóide. Esta condição é conseguida através de seguidas divisões mitóticas em que ocorre a não-disjunção cromossômica. Quanto mais próximo do número haplóide a célula estiver, mais rápido ela divide-se, formando setores melhorados na colônia do fungo. Os conídios resultantes do processo de haploidização, darão origem a indivíduos como os parentais e outros com características diferentes, indicando a ocorrência de recombinação. Para dinamizar o processo de haploidização e conseqüente obtenção de recombinantes pode-se utilizar substâncias que causam instabilidade mitótica como o fungicida Benlate, em dosagens determinadas.

O ciclo parassexual é importante pois é o único mecanismo que leva a uma fase diplóide estável em fungos filamentosos que realizam este processo, sendo também a principal maneira de recombinar a variabilidade genética. Em fungos deuteromicetos o estudo do diplóide permite a análise da interação alélica nos genes e a distribuição destes nos grupos de ligação.

Em condições de laboratório o ciclo parassexual pode ser induzido a partir de duas linhagens mutantes do fungo. Cada uma destas linhagens deve ter mutações auxotróficas complementares. Estas mutações auxotróficas, impedem a produção de substâncias indispensáveis à sobrevivência do fungo. Criando-se a “necessidade” de uma linhagem unir-se à outra, ocorre a anastomose de hifas, o heterocário, a formação de diplóides e a obtenção de recombinantes haplóides a partir do diplóide.

Recentemente observou-se em *Beauveria bassiana* o surgimento de conídios recombinantes no próprio heterocário, sem a prévia observação de diplóides (PACCOLA-MEIRELLES e AZEVEDO, 1989). Neste caso

ocorreu uma haploidização rápida, semelhante à meiose, num processo denominado Parameiose, descrito pela primeira vez por BONATELLI Jr *et alii* (1983) em *Aspergillus niger*. Este processo já foi observado em outros fungos, como em *Metarhizium anisopliae* (BAGALHI, 1987).

O gênero *Beauveria* foi descrito em 1911 e 1912 por Beauveria e Vuillemin, respectivamente. Seu micélio é branco ou levemente corado com aparência “fluffy” a pulverulenta, apresenta conidióforos únicos irregularmente agrupados (BARNETT, 1958). São conhecidas duas espécies: *B. bassiana* e *B. tenella* (*B. brongniartii*).

Devido às características de seu ciclo biológico é considerado entomopatogênico, pois suas hifas penetram no tegumento do inseto, alcançando a hemolinfa e causando sua morte, após o que as hifas exteriorizam-se e os conídios são liberados no ambiente. Desta forma, pode ser usado no controle biológico de insetos (PACOLLA-MEIRELLES, 1988).

Os fungos entomopatogênicos são efetivos no controle de insetos quando em condições bióticas e abióticas adequadas, são capazes de causar a morte dos mesmos, como descrito por BASSI, 1835.

O desenvolvimento do controle biológico deu-se a partir da conscientização acerca dos riscos dos pesticidas químicos, embora se reconheça que este último não possa ser completamente dispensado (MESSIAS, 1989).

Com a crescente necessidade de reduzir o uso de inseticidas químicos tem-se procurado obter produtos eficientes no controle de pragas, principalmente, através de microrganismos (VILAS BOAS *et alii*, 1992). Entretanto, fatores como a temperatura, a umidade e a radiação solar, especialmente a ultravioleta, são agentes que limitam seu uso, pois podem

causar alterações morfológicas e auxotróficas nos fungos (ROBERTS e YENDOL, 1971; ALVES *et alii*, 1984 ; LECUONA e ALVES, 1988).

Fungos entomopatogênicos são isolados naturalmente de insetos e *Beauveria bassiana* é encontrado em muitos insetos pragas no mundo inteiro (KHACHATOURIANS, 1986). Também pode ser isolado diretamente do solo, como verificado por TIGANO-MILANI *et alii*,(1993), em que foram identificados oito isolados de *Beauveria bassiana* no Brasil, nos estados de Goiás e Rio Grande do Sul.

De acordo com SOPER e WARD (1981) os fungos constituem o maior grupo de patógenos de insetos e McLEOD (1954) afirma que *B. bassiana* é o isolado fúngico mais encontrado em insetos mortos na natureza, afetando, segundo ALVES (1986) cerca de 200 espécies de insetos de diferentes ordens. O fungo *Beauveria bassiana* foi isolado das ordens Orthoptera, Lepidoptera, Homoptera, Dermaptera e Isoptera, sendo que todas as linhagens testadas promoveram o crescimento de micélio externo no corpo do inseto (WELLS *et alii*, 1995).

Estudos realizados com o “bicudo do algodoeiro”, *Anthonomus grandis*, no Ceará, Brasil, demonstraram que o uso conjunto de inseticidas e entomopatógenos pode dar bons resultados, uma vez que o produto químico causa uma vulnerabilidade na população da praga, ficando esta mais susceptível ao patógeno. Comprovou-se que a décima parte da dosagem normalmente utilizada de Deltamethrin aliada a uma suspensão de esporos de *B. bassiana* produzem o mesmo efeito que a dose usual do pesticida (BLEICHER *et alii*, 1994).

Alguns inseticidas, por outro lado, inibem completamente o crescimento do fungo como o Parathion Metílico e o Carbofuran. Um dos menos tóxicos ao fungo e mais eficiente na mortalidade de *Castnia licus*, a “broca da cana-de-açúcar” é o Phosphamidon (VILAS BOAS, 1991).

O fungo *Beauveria bassiana* é utilizado na Rússia na produção de BOVERIN, para o controle do besouro da batata, *Leptinotarsa decelneata*; na China, no controle de *Ostrina nubiales* (MESSIAS,1989). Nos EUA, testes realizados com *Camponotus pennsylvanicus*, uma formiga da terra, demonstraram ser a *B. bassiana* mais efetiva que duas linhagens de *Metarhizium anisopliae* no controle desta espécie (KELLEY-TUNIS *et alii*, 1995). Outros estudos indicam ser este fungo eficiente contra moscas da espécie *Musca domestica*, causando entre 94 e 100% de mortalidade (GEDEN *et alii*, 1995) e também contra larvas de moscas Tsetse do gênero *Glossina*, podendo ser usado como micoinseticida (KAYAA, e MUNYINYI, 1995) No Canadá *B. bassiana* é utilizado contra gafanhotos, e os conídios são aplicados em emulsão de óleo, o que parece reduzir as populações deste inseto (GOETTEL *et alii*,1995). É patogênico ao gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* devido à protease extracelular que hidrolisa a cutícula do inseto (BIDOCHKA e KACHATOURIANS, 1990) e JOSHI *et alii* (1995). afirma que um dos fatores responsáveis pela virulência de *Beauveria bassiana* é uma endoprotease que tem atividade sobre a cutícula dos insetos.

Na República Tcheca, estudos revelam que o fungo *Beauveria bassiana* pode ser usado como antagonista no controle de fungos fitopatogênicos (VESELY e KOUBOVA, 1994).

Já foi observado, também, sua patogenicidade contra outras classes de artrópodos, como os carrapatos *Rhipicephalus appendiculatus* (MWANGI *et alii*,1995).

Existem poucos indícios de que o *Beauveria bassiana* seja patogênico a outros organismos, porém, recentemente foi descrito na Espanha uma micose pulmonar causada por *Beauveria bassiana* em

tartarugas mantidas em cativeiro, vindas de Cuba (GONZALES-CABO *et alii*, 1995).

Uma preocupação com o uso de bioinseticidas é a possível patogenicidade a humanos e outros mamíferos. Em experimentos realizados com ratos comprovou-se que o *Beauveria bassiana* não causa infecção, não cresce e não sobrevive mais do que três dias quando infectado intramuscularmente em ratos sadios (SEMALULU *et alii*, 1992).

No Brasil os estudos são promissores e mostram as potencialidades reais do uso de *B. bassiana* no controle de pragas de interesse agrônômico (TONET e REIS, 1979). Este fungo já foi isolado na “broca do café”, *Hypothenemus hampei*, no norte do Espírito Santo (BENASSI, 1995). Também promove a morte de cupins *Nasutitermes* sp. que atingem plantações de cana-de-açúcar, pela ação de micotoxinas ou abrasão da cutícula, causando a desidratação do inseto (MALAGODI e VEIGA, 1995). Ainda é utilizado no controle do percevejo do colmo do arroz *Tibraca limbativentris* (MARTINS e LIMA, 1994).

Uma das técnicas que vem dando bons resultados no controle biológico de insetos no Brasil é a associação de conídios de *B. bassiana* e óleo mineral, que faz com que estes fiquem aderidos à cutícula do inseto, sendo mais efetivo na infecção, principalmente do moleque da bananeira, *Cosmopolites sordidus* (BATISTA FILHO *et alii*, 1994).

DIEHL-FLEIG *et alii*(1993), descrevem a eficiência de *Beauveria bassiana* contra formigas cortadeiras do gênero *Acromyrex*, responsáveis por danos às culturas vegetais e cujo combate tem sido feito por produtos químicos.

O Gorgulho da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, causador de danos às culturas de cana-de-açúcar açúcar em São Paulo, já foi combatido através de métodos químico, mecânico, cultural e de resistência de plantas,

sem resultados satisfatórios. O uso de *Beauveria bassiana* mostrou-se eficiente no controle deste curculionídeo (BADILLA e ALVES, 1991).

Estudos realizados com *Rhodnius prolixus*, um dos vetores do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de chagas, determinaram a patogenicidade de *Beauveria bassiana* principalmente contra o adulto e as larvas deste triatomíneo (ROMANA e FARGUES, 1992). Também é patogênico ao vetor da dengue, o mosquito *Aedes aegypt*, na sua fase larval (MIRANPURI e KACHATOURIANS, 1991).

Estudos a nível bioquímico demonstram que uma linhagem deste fungo, a EQ1, produz um pigmento vermelho, uma oosporeína, que é uma potente micotoxina que torna esta linhagem mais patogênica que as outras contra insetos pragas (EYAL *et alii*, 1994).

Este fungo produz metabólitos tanto em meio de cultura como no corpo do inseto. Estas toxinas destroem o balanço fisiológico normal do hospedeiro, causando um acúmulo de carboidratos no mesmo. Estes metabólitos parecem diminuir as proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos do hospedeiro (SHARMA *et alii*, 1994).

A produção de toxinas por *Beauveria bassiana* requer uma temperatura ótima, um pH ácido e condições diurnas de luz, mas isso não necessariamente resulta em seu crescimento máximo. Quando exposto à luz ultravioleta por quatro horas, a produção de toxinas foi aumentada, provavelmente devido a mutações em algumas células (SHARMA *et alii*, 1992).

O fungo *Beauveria bassiana* apresenta uma grande variabilidade natural, que pode ser detectada através de análises do crescimento e conidiação em diferentes meios de cultivo, bem como por técnicas de eletroforese. Analisando o polimorfismo genético existente entre diferentes linhagens de *Beauveria bassiana* através de eletroforeses de α -esterases

(isoenzimas) pode-se identificar as linhagens e contribuir com o estudo de populações selvagens deste fungo.(PACCOLA-MEIRELLES e AZEVEDO, 1990).

Segundo KHACHATOURIANS (1991), para que se possa compreender a organização genômica, a variação genética e a estabilidade dos genes faz-se necessária a caracterização filogenética deste fungo a nível molecular.

O fungo *Beauveria bassiana* possui 8 cromossomos, identificados através de eletroforese em campo pulsado, sendo o total do genoma estimado em $40,6 \pm 1.1$ Mbp, que é semelhante ao de outros fungos filamentosos (PFEIFER e KACHATOURIANS, 1993).

Entretanto, este fungo não tem sido muito estudado a nível molecular, ao contrário do que acontece com muitos fitopatógenos (NEWTON, 1987).

Visando desenvolver um programa de controle biológico realmente eficiente, são procuradas certas peculiaridades no microrganismo, como fácil disseminação, resistência a condições adversas, ótima conidiação e crescimento elevado (FRIGO e AZEVEDO,1984). Para obtenção destas qualidades, o estudo genético do fungo é muito importante, pois faz-se necessária a indução de mutações para que a variabilidade natural seja aumentada, através de agentes mutagênicos físicos e químicos (VILAS BOAS *et alii*,1992).

Analisando-se a resistência de conídios à luz ultravioleta, pode-se perceber que conídios pigmentados como os negros de *Aspergillus niger* e os verdes de *Metarhizium anisopliae* são mais resistentes que os conídios brancos de *Beauveria bassiana* . Esta condição favorável pode ser conseguida através de melhoramento genético nos micoinseticidas em potencial (IGNOFFO e GARCIA, 1992).

Conhecendo sua potencialidade como bioinseticida e sua variabilidade genética natural, o presente trabalho pretende contribuir com o estudo genético deste fungo, determinando através de curvas de sobrevivência a dose de radiação ultravioleta mais adequada à obtenção de mutantes auxotróficos e morfológicos, a partir de linhagens selvagens. Com a obtenção de mutantes pode-se investigar a ocorrência do ciclo parassexual e da paramiose, fornecendo dados para que trabalhos de melhoramento genético deste fungo possam ser realizados, aumentando as possibilidades de seu uso no controle biológico de insetos pragas e outros artrópodos de interesse econômico e médico.

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo principal a contribuição para o estudo genético de *Beauveria bassiana* e como objetivos específicos :

1. Verificar o crescimento radial e a produção de conídios em colônias de *Beauveria bassiana* em diferentes meios de cultura;
2. Verificar a morfologia do micélio e dos conídios de *Beauveria bassiana* através da técnica de coloração de núcleos ;
3. Obter curvas de sobrevivência das linhagens selvagens ao mutagênico físico luz ultravioleta ;
4. Obter mutantes morfológicos e auxotróficos através da luz ultravioleta ;
5. A partir dos mutantes obtidos, induzir o ciclo parassexual e, verificar o processo paramiótico ;
6. Testar a patogenicidade da linhagem selvagem E8 de *Beauveria bassiana* e de seus possíveis mutantes morfológicos em *Rhodnius robustus* .

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens selvagens do fungo *Beauveria bassiana* E2, E3 e E8, cedidas pela Professora Ida Chapaval Pimentel do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

A linhagem E2 apresenta colônia branca, com crescimento aéreo e poucos esporos, enquanto a linhagem E3 tem colônia amarelada, com crescimento aéreo e grande produção de esporos. A linhagem E8, por sua vez, apresenta colônia branca e compacta, com muitos esporos. A morfologia destas linhagens pode ser vista na foto 1.

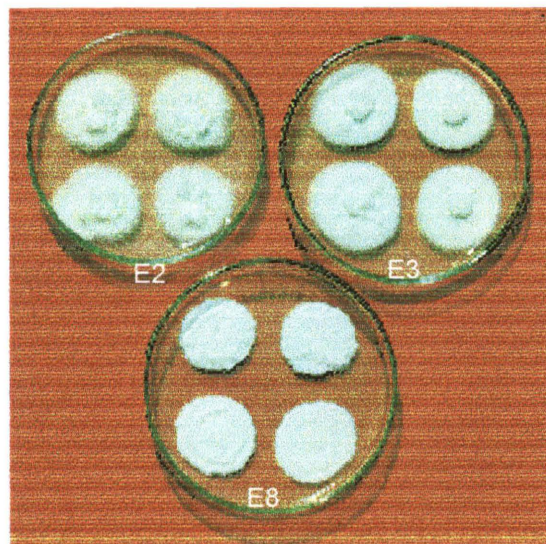


FOTO 1 - Linhagens selvagens E2, E3 e E8 de *Beauveria bassiana*

3.2 - Meios de cultura e soluções utilizadas

3.2.1 - Meio BDA (Batata Dextrose Ágar)

Batata.....200 g.

Dextrose.....20 g.

Ágar.....15 g.

Água destilada.....p/1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)

As batatas foram descascadas e cortadas em pequenos pedaços , os quais foram pesados. Acrescentou-se parte da água destilada (600 ml) e cozinhou-se até que as batatas pudessem ser amassadas. Filtrou-se a água com as batatas, com uma gaze e a este filtrado foi acrescentado os demais componentes.

3.2.2 - Meio BDA modificado (PIMENTEL,1996)

Batata.....200 g.

Dextrose.....20 g.

NaCl.....2 g.

Peptona.....2 g.

Ágar.....20 g.

Água destilada.....p/ 1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)

Para o preparo foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item

3.2.1.

3.2.3 - Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO *et alii*, 1953)

NaNO₃.....6 g.

KH₂PO₄.....1,5 g.

MgSO₄.7 H₂O.....0,5 g.

FeSO₄.....0,02 .g

ZnSO₄.....0,02 .g

Glicose.....10 g.

Água destilada.....p/ 1000 ml

Ágar DIFCO.....15 g.

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)

3.2.4 - Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO *et alii*, 1953, modificado por PACCOLA-MEIRELLES,1988)

NaNO₃.....6 g.

KH₂PO₄.....1,5 g.

MgSO₄.7 H₂O.....0,5 g.

KCl0,5 g.

FeSO₄.....0,01 .g

ZnSO₄.....0,01.g

Glicose.....10 g.

Ágar.....15 g.

Água destilada.....p/ 1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 %(p/v)

3.2.5 - Meio Completo (MC) (PONTECORVO *et alii*, 1953,
modificado por AZEVEDO E COSTA, 1973)

Meio mínimo adicionado de:

Extrato de levedura.....2 g.

Peptona.....2 g.

Caseína hidrolisada.....1,5 g.

Solução de vitaminas.....1 ml

Água destilada.....p/ 1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)

3.2.6 - Meio Corn Meal Ágar

Milho.....50 g.

Glicose.....12 g.

Ágar.....15 g.

Água destilada.....p/ 1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)

Deixar o milho de molho em água destilada por uma noite e triturar no liquidificador. Filtrar o material, ferver por 10 minutos e acrescentar os demais componentes.

3.2.7 - Meio Saboraud

Peptona.....10 g.

Glicose.....20 g.

Ágar.....15 g

Água destilada.....p/ 1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)

3.2.8 - Meio YPG (Yeast Peptone Glucose)

Extrato de levedura.....2 g.

Peptona.....10 g.

Glicose.....20 g.

Ágar.....15 g

Água destilada.....p/ 1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)

3.2.9 - Meio Maisena (descrito pela autora)

Amido de milho “Maizena”..10 g.

Açúcar refinado.....20 g.

Caseína hidrolisada.....1,5 g.

Peptona.....10 g.

Ágar.....10 g.

Água destilada.....p/ 1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 10 % (p/v)

3.2.10 - Solução de Aminoácidos

Caseína hidrolisada.....0,1 g

Água destilada.....100 ml

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e mantida a 4°C.

3.2.11 - Solução de vitaminas

ácido nicotínico.....100 mg

ácido *p*-aminobenzóico....0,2 mg

biotina.....0,2 mg

piridoxina.....50 mg

riboflavina.....100 mg

tiamina.....50 mg

Água destilada esterilizada para 100 ml.

A solução foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e mantida em frasco escuro a 4°C.

3.2.12 - Solução salina

NaCl.....0,85 g

Água destilada.....p/ 100 ml

Alíquotas de 9 ml foram colocadas em frascos, autoclavadas e mantidas a 4°C.

3.2.13 - Solução de "Tween 80"

"Tween 80" 0,1 % (v/v) em 100 ml de água destilada.

Alíquotas de 2,5 ml foram colocadas em tubos de ensaio, autoclavadas e mantidas a 4°C.

3.2.14 - Suplementos adicionados ao meio mínimo

Suplemento	Concentração
AMINOÁCIDOS	
Prolina.....	10 mg/ml (p/v)
Metionina.....	10 mg/ml (p/v)
Leucina.....	10 mg/ml (p/v)
Histidina.....	10 mg/ml (p/v)
Asparagina.....	10 mg/ml (p/v)
Ác. Glutâmico.....	10 mg/ml (p/v)
Treonina.....	10 mg/ml (p/v)
Ác. Aspártico.....	10 mg/ml (p/v)
Lisina.....	10 mg/ml (p/v)
Valina.....	10 mg/ml (p/v)
Serina.....	10 mg/ml (p/v)
Glicina.....	10 mg/ml (p/v)
Isoleucina.....	10 mg/ml (p/v)
Cistina.....	10 mg/ml (p/v)
Tirosina.....	10 mg/ml (p/v)
Fenilalanina.....	10 mg/ml (p/v)
Triptofano.....	10 mg/ml (p/v)
Arginina.....	10 mg/ml (p/v)

Cisteína..... 10 mg/ml (p/v)

VITAMINAS

Ác. ρ - aminobenzóico.....0,5 mg/ml

Biotina.....0,4 mg/ml

Ác. Nicotínico.....1,0 mg/ml

Piridoxina.....0,5 mg/ml

Riboflavina.....1,0 mg/ml

Tiamina.....0,5 mg/ml

ÁCIDOS NUCLEÍCICOS

Adenina.....5 mg/ml

Os estoques dos suplementos foram preparados, adicionando-se cada um deles em frascos contendo 10 ml de água destilada esterilizada, após o que foram aquecidos em banho-maria a 98°C por 15 minutos e mantidos a 4°C . Os estoques de vitaminas foram conservados em frascos escuros.

No momento do uso, acrescentou-se 0,1 ml do suplemento necessário para 20 ml de meio de cultura, em placa de Petri.

3.2.15 - Solução sulfocrômica

Dicromato de potássio.....20 g.

H₂SO₄ p. a.....200 ml

Água destilada.....p/ 1000 ml

Diluiu-se o dicromato de potássio em 700 ml de água destilada em aquecimento. Depois de esfriar, acrescentou-se o H₂SO₄.

3.2.16 - Solução Tampão Fosfato pH 6,9

Solução A

NaH₂PO₄.....24 g

Água destilada.....p/ 1000 ml

Solução B

Na₂HPO₄.....28,4 g

Água destilada.....p/ 1000 ml

No momento do uso, misturou-se as duas soluções até obter o pH 6,9

(aproximadamente):

Solução A.....45 ml

Solução B.....55 ml

Completo-se o volume para 200 ml com água destilada.

As soluções foram mantidas a 4°C.

3.2.17 - Solução de Giemsa

Giemsa em pó.....1 g.

Glicerina.....66 ml

Metanol.....66 ml

Misturou se o Giemsa com glicerina a 60°C durante 50 minutos a duas horas.

Após resfriamento, adicionou-se metanol.

Filtrou-se e armazenou-se em frasco escuro à temperatura ambiente, sendo utilizado somente depois de 72 horas.

3.2.18 - Albumina 50% (TANAKA *et alii*, 1979)

Colocou-se uma clara de ovo num copo de Becker e picotou-se vagarosamente com uma tesoura, durante uma hora.

Filtrou-se com papel filtro e adicionou-se glicerina (v/v) e cristais de cânfora.

Foi mantido a 4°C.

3.2.19 - HCl 1 N

HCl p.a concentrado.....82,50 ml

Água destilada.....p/ 1000 ml

3.3 - Preparo de Material

As pipetas foram mantidas em solução sulfocrômica por mínimo 1 dia, depois enxaguadas com água por 24 horas e juntamente com a vidraria e os palitos de transferência, utilizados na técnica de isolamento total de mutantes, foram esterilizados em Forno Pasteur a 180°C, por quatro horas.

As soluções e os meios de cultura foram autoclavados a 1 atm por 20 minutos .

3.4 - Incubação

As placas foram incubadas em estufa B.O.D a 25°C, por 10 a 12 dias .

3.5 -Crescimento e conidiação em diferentes meios de cultura

Conídios provenientes de colônias de 10 dias foram inoculados, com um gancho acoplado ao cabo de Kolle, no centro de placas de Petri contendo diferentes meios de cultura.

O diâmetro destas colônias foi medido com uma régua nos dias 1, 6, 8, 10 e 12 após a inoculação.

No 12º dia de crescimento foi retirada de cada colônia uma amostra de diâmetro 0,7 cm, que teve sua área calculada através da fórmula :

$$a = (\theta / 2)^2, \text{ em que } \theta \text{ corresponde ao diâmetro da}$$

amostra.

Estes conídios retirados das colônias foram suspensos em solução de “Tween 80” e tiveram suas concentrações estimadas em câmara de Neubauer.

Os resultados tiveram tratamento estatístico através do Teste de Tuckey.

3.6 - Coloração de núcleo (TANAKA *et alii*, 1979)

3.6.1 - Limpeza das lâminas

As lâminas e lamínulas foram lavadas e mantidas em álcool 70%, sendo secas com papel absorvente macio no momento do uso.

3.6.2 - Preparo da lâmina

Colocou-se na lamínula uma gota de albumina e espalhou-se com o dedo até ficar uma fina camada sobre a lamínula. Esta foi passada algumas

vezes sobre uma chama para secar. Após este processo a lamínula, foi pressionada contra uma colônia de 7 dias localizada no centro de uma placa de Petri e o material aderiu-se a ela.

Este material foi submetido por 30 minutos a uma solução de Etanol-Ácido acético na proporção 3:1, sendo em seguida colocado em álcool 95% por 5 minutos e em álcool 70% por 20 minutos. Depois, lavou-se a lamínula 3 vezes em água destilada e hidrolisou-se o material em HCl 1 N, a 60°C por 7 minutos.

Lavou-se novamente o material em água destilada e uma vez em tampão fosfato pH 6,9.

3.6.3 - Coloração

A coloração foi realizada com 1 ml de corante Giemsa e 9 ml de tampão fosfato pH 6,9 por 30 minutos. Colocou-se a lamínula numa lâmina e suas bordas foram vedadas com esmalte incolor.

O material foi observado em microscópio óptico, com objetiva de imersão, com aumento de 1000X .

3.7- Sobrevivência à luz ultravioleta

Suspensões das linhagens selvagens E2, E3 e E8 de *Beauveria bassiana* em “Tween 80” 0,1% tiveram suas concentrações estimadas em câmara de Neubauer, ao microscópio óptico. Para atingir uma concentração de aproximadamente 10^7 conídios por ml, foram feitas diluições em solução salina (1:10).

Estas suspensões diluídas foram colocadas em placas de Petri esterilizadas e irradiadas com luz ultravioleta (lâmpada germicida com 15

W) em diferentes tempos de exposição . A distância entre a lâmpada e a placa foi mantida em aproximadamente 26 cm.

Após cada período de exposição à luz ultravioleta, retirou-se uma alíquota que foi diluída convenientemente e semeou-se 0,1 ml por placa contendo meio BDA sólido. Estas placas foram incubadas a 28°C, em ausência de luz, por 24 horas.

O controle constituiu-se de uma alíquota da suspensão diluída antes de ser submetida à irradiação, que foi convenientemente diluída e plaqueada 0,1 ml/placa contendo BDA sólido.

Depois de 120 horas (5 dias) as colônias sobreviventes foram contadas e realizou-se o cálculo da curva de sobrevivência para cada linhagem. Este procedimento foi repetido por três vezes para cada linhagem, resultando em uma curva de sobrevivência correspondente à média obtida nos diferentes tempos de exposição.

3.8- Isolamento de mutantes

Os mutantes morfológicos foram isolados por inspeção visual, de acordo com as diferenças em relação às linhagens selvagens, por comparação da morfologia das colônias.

Estas e as demais colônias sobreviventes foram isoladas em placas contendo Meio Mínimo na distribuição 5x5 + 1 (AZEVEDO e COSTA,1973), de acordo com o método do isolamento total (PONTECORVO *et alii*, 1953).

Depois de 120 horas, as colônias que não cresceram foram consideradas prováveis mutantes auxotróficos e o local do meio em que foram semeadas foi recortado e semeado em meio BDA.

3.9 - Caracterização de Mutantes Auxotróficos

Os mutantes auxotróficos foram caracterizados sendo repicados em placas de Petri contendo :

MM + solução de aminoácidos

MM + solução de vitaminas

MM + adenina

Sabendo-se o tipo de deficiência nutricional de cada mutante pôde-se determinar especificamente suas marcas auxotróficas, dependendo de cada caso.

Quando deficiente para aminoácidos, foram utilizadas 6 placas contendo meio mínimo mais os 20 aminoácidos na seguinte combinação:

1. MM+Met+Pro+Thr+Lys+Ile+Phe
2. MM+Leu+Pro+Asp+Val+Cys+Trp
3. MM+His+Thr+Gly+Tyr+Trp+Arg
4. MM+Gln+Asp+Ser+Ile+Tyr+Cyt
5. MM+Asn+Lys+Ser+Cys+Tyr+Arg
6. MM+Glu+Val+Gly+Phe+Cyt

Caso houvesse crescimento na placa 1 apenas, o mutante seria deficiente para o aminoácido metionina (Met⁻). Se o crescimento ocorresse nas placas 3 e 4, por exemplo o mutante teria a marca tirosina (Tyr⁻), pois este é o único aminoácido comum às duas placas. Desta forma foram feitas as análises das mutações auxotróficas para aminoácidos.

Quando deficientes para vitaminas, os mutantes foram repicados em 3 placas contendo meio mínimo mais as 6 vitaminas, na seguinte combinação:

1. MM+biotina+riboflavina+piridoxina

2. MM+ácido p-Aminobenzóico+riboflavina+tiamina

3. MM+ácido nicotínico+piridoxina+tiamina

A interpretação dos resultados foi feita seguindo o mesmo procedimento utilizado para aminoácidos.

A deficiência para ácidos nucleicos só foi testada com a adenina, por ser o único ácido nucleico disponível no laboratório. O mutante que crescesse neste meio seria denominado Ade⁻ e se não crescesse com adenina, ácido nucleico⁻ (ade⁺).

3.10 - Teste de Reversão

As linhagens mutantes foram ensaiadas quanto à reversão de suas marcas auxotróficas, a partir de uma suspensão de conídios em solução de “Tween 80” com concentração de aproximadamente 10⁷ conídios por ml, semeada em placas contendo :

MM

MM + suplemento nutricional

Após 96 horas de incubação verificou-se se havia ou não crescimento .

3.11 - Obtenção de Heterocários

O método de obtenção de heterocário foi feito seguindo o processo de INGLE e HASTIE (1974), em que conídios obtidos de duas linhagens mutantes complementares foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de Meio Mínimo líquido suplementado com 4% de Meio Completo líquido. Após homogeneização, foram transferidas com o auxílio de uma pipeta, gotas para a tampa de uma placa de Petri plástica esterilizada. Na parte de baixo da placa foi colocado um papel filtro umedecido com água destilada esterilizada. A placa foi incubada a 28°C por 48 horas, numa posição em que as gotas ficassem suspensas, ou seja, com a tampa para cima. Após este período as películas formadas nas gotas foram transferidas para placas com Meio Mínimo e incubadas a 28°C por 8 dias ou mais, se necessário.

3.12 - Teste de patogenicidade de linhagens selvagens e mutantes de *Beauveria bassiana* sobre o triatomíneo *Rhodnius robustus*.

Os insetos utilizados foram cedidos pela Prof. Débora do Rocio do Klisiowicz do Departamento de Patologia Básica da UFPR, e seguem a seguinte classificação taxonômica :

Filo : Arthropoda
Classe : Insecta
Ordem : Hemiptera
Família : Triatomidae
Gênero : *Rhodnius*
Espécie : *Rhodnius robustus*

Como estes insetos pertencem à ordem Hemiptera, seu desenvolvimento é hemimetábolo, ou seja, a forma adulta é atingida gradualmente através de sucessivas mudas, sendo todos os estágios imaturos desde a eclosão até o indivíduo adulto são chamados ninfas BARNES, 1990.

A morfologia dos insetos pode ser vista na foto 2.



FOTO 2 - Morfologia externa de adultos de *Rhodnius robustus*

Retirou-se das colônias das linhagens E8 (selvagem) e E8-1 e E8-2 (mutantes morfológicos) um disco de diâmetro 0,7 cm, sendo a área calculada como descrito no item 3.5. Estes conídios foram diluídos em 10 ml de água destilada esterilizada, sendo esta suspensão colocada em placas de Petri.

Foram separados 8 insetos adultos, sendo distribuídos 2 para cada tratamento e 16 ninfas, distribuídas 4 para cada tratamento :

- Tratamento 1 - Suspensão de conídios da linhagem selvagem E8
- Tratamento 2 - Suspensão de conídios da linhagem mutante E8-1
- Tratamento 3 - Suspensão de conídios da linhagem mutante E8-2
- Tratamento 4 (controle)- Água destilada esterilizada.

Os barbeiros foram mergulhados na suspensão de conídios (tratamentos 1, 2, e 3) e em água destilada esterilizada (tratamento 4) com o auxílio de uma pinça e colocados em frascos de vidro com rolhas de

algodão e gaze . Estes insetos foram previamente alimentados com sangue de galinha, tornando-se desnecessária a alimentação dos mesmos durante o experimento (foto 3).



FOTO 3 - Teste de patogenicidade de *Beauveria bassiana* contra adultos de *Rhodnius robustus*. Detalhe: inseto vivo do grupo controle (tratamento 4).

Manteve-se os vidros à temperatura ambiente por cerca de 20 dias, fazendo-se observações diárias para a leitura da mortalidade e os adultos e ninfas que morreram num prazo de 10 dias após o tratamento foram considerados parasitados.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Crescimento e Conidiação em diferentes meio de cultura

Conídios provenientes de linhagens selvagens de *Beauveria bassiana* foram inoculados em placas contendo diferentes meios de cultura, como descrito no item 3.3.

No 12º dia de crescimento fez-se uma análise do diâmetro das colônias bem como da conidiação das mesmas.

4.1.1 - Crescimento radial das linhagens selvagens de *Beauveria bassiana* em diferentes meios de cultura

O crescimento radial foi verificado através da medida do diâmetro das colônias, em centímetros, obtendo-se uma média de 6 repetições, como pode ser visto na tabela 1.

TABELA 1 - Média dos diâmetros, em centímetros, das colônias de 3 linhagens de *Beauveria bassiana* em 7 meios de cultura, no 12º dia de crescimento (média de 6 repetições).

MEIO \ LINHAGEM	E2	E3	E8
BDA	5,966	4,533	4,666
BDA*	5,400	5,016	5,883
SABORAUD	4,416	4,166	4,166
CORN MEAL	4,816	3,916	4,916
MC	6,400	5,916	6,466
YPG	4,966	4,666	4,583
MAISENA	2,933	2,816	3,350

O crescimento radial das 3 linhagens pode ser visto nas figuras 1 a 3 e uma comparação entre as linhagens nos diferentes meios é demonstrada na figura 4.

A legenda a seguir é explicativa para as figuras 1, 2 e 3.

- 1 ■ - BDA
- 2 ■ - BDA*
- 3 ■ - SABORAUD
- 4 ■ - CORN MEAL
- 5 ■ - MEIO COMPLETO
- 6 ■ - YPG
- 7 ■ - MAISENA

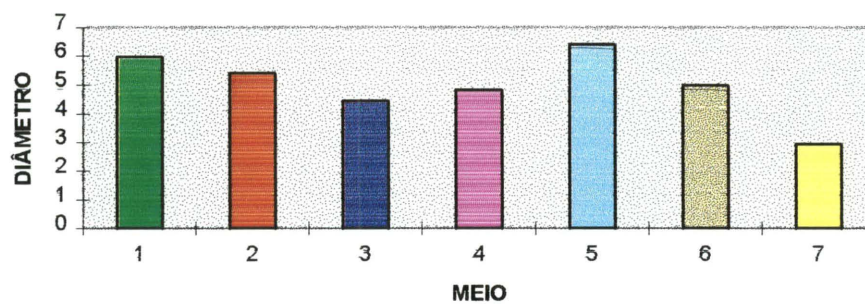


FIGURA 1 - Comparação do diâmetro das colônias, em centímetros, no 12º dia de crescimento da linhagem E2 em 7 meios de cultura.

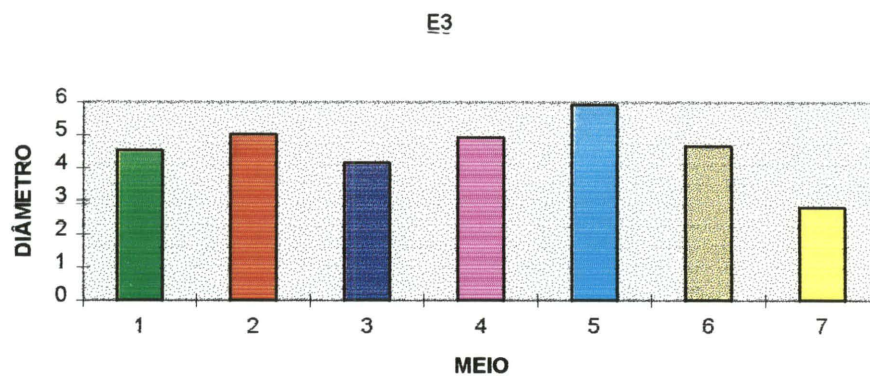


FIGURA 2 - Comparação do diâmetro das colônias, em centímetros, no 12^o dia de crescimento da linhagem E3 em 7 meios de cultura.

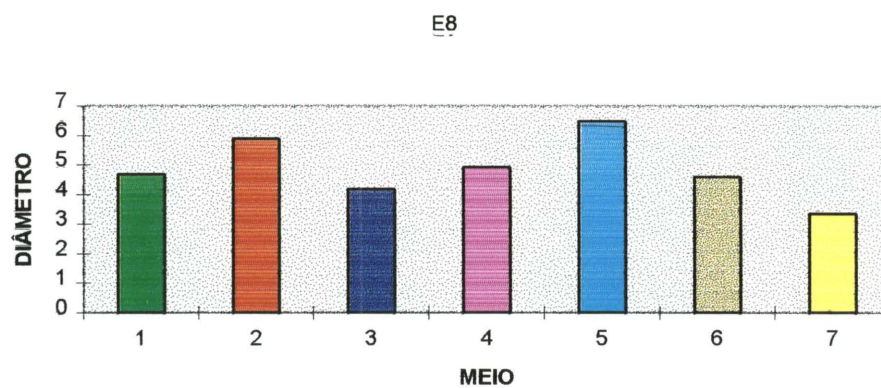


FIGURA 3 - Comparação do diâmetro das colônias, em centímetros, no 12^o dia de crescimento da linhagem E8 em 7 meios de cultura.

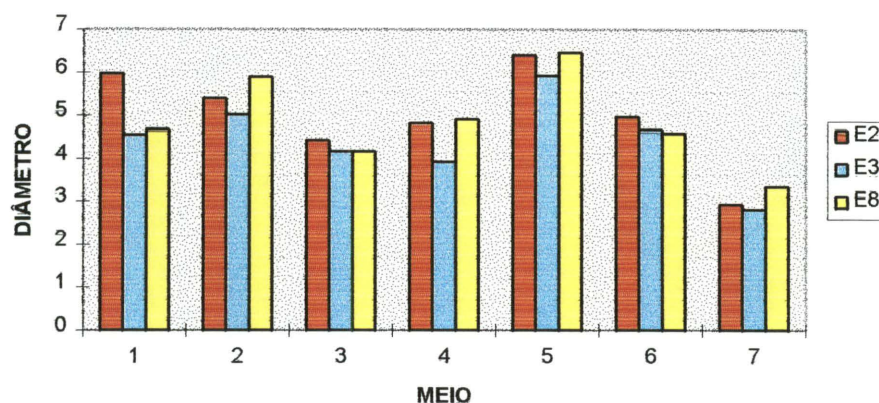


FIGURA 4 - Comparação do diâmetro, em centímetros, das colônias de 3 linhagens de *Beauveria bassiana*, no 12º dia de crescimento em 7 meios de cultura.

1 - BDA

2 - BDA*

3 - SABORAUD

4 - CORN MEAL

5 - MEIO COMPLETO

6 - YPG

7 - MAISENA

Analisando-se os valores apresentados na tabela 1 e nas figuras 1 a 4 pode-se perceber que alguns meios apresentam melhor crescimento para todas as linhagens, como o meio completo, BDA modificado e BDA. O meio que, aparentemente, condiciona o pior crescimento é o meio Maisena, e isto é compreensível uma vez que seus componentes são alternativos, como o amido de milho e o açúcar refinado. Esta tentativa de criar um meio mais econômico, a princípio, não foi satisfatória.

Para estabelecer as reais diferenças entre as linhagens e os meios de cultura para o caráter crescimento radial fez-se necessária uma análise estatística, através do teste de Tuckey, que indica se as médias diferem estatisticamente entre si. Estes dados podem ser vistos nas tabelas 2 a 4.

TABELA 2 - ANAVA -Análise de variância para o caráter diâmetro da colônia de 3 linhagens de *Beauveria bassiana* em 7 meios de cultura, no 12º dia de crescimento de acordo com os valores apresentados na tabela 1.

fonte de variação	SQ	GL	QM	F	p -valor
BLOCO	4,16095	5	0,832190	1,611	0,1639
MEIO	123,7109	6	20,61849	39,923	0,0000 *
LINHAGEM	12,58905	2	6,294524	12,188	0,0000 *
MEIO x LINHAGEM	7,887619	12	0,657301	1,273	0,2465
RESÍDUO	51,64571	100	0,516457		
TOTAL	199,9942				

* indica fonte de variação significativa

Todos os valores de F são baseados no quadrado médio dos resíduos

Os valores para linhagem e meio praticamente iguais a zero (tabela 2) indicam que pelo menos um par de médias dos meios e das linhagens diferem entre si.

A interação entre meio e linhagem não é estatisticamente significativa com o p-valor = 0,2465 (tabela 3), indicando não haver vantagens em qualquer interação.

TABELA 3 - Comparação múltipla entre médias do diâmetro de colônias de 3 linhagens de *Beauveria bassiana* em 7 meios de cultura, no 12^o dia de crescimento, através do teste de Tuckey, com $p < 0.01$ (média de 6 repetições) (Comparação entre as linhagens).

LINHAGEM	MÉDIA	HOMOGENEIDADE ENTRE AS LINHAGENS
E3	4,2690476	a
E2	4,9023810	b
E8	4,9714286	b

As letras a e b indicam diferença significativa entre as linhagens.

As linhagens E2 e E8 não diferem estatisticamente entre si para o caráter diâmetro da colônia nos diferentes meios de cultura, pois são representadas pela mesma letra, porém ambas diferem da linhagem E3.

A linhagem E3 apresenta um menor crescimento em todos os meios (tabela 1), provavelmente devido à variabilidade existente dentro da espécie.

TABELA 4 - Comparação múltipla entre médias do diâmetro de colônias em 7 meios de cultura, para 3 linhagens de *Beauveria bassiana*, no 12º dia de crescimento, através do teste de Tuckey, com $p < 0.01$ (média de 6 repetições) (Comparação entre os meios).

MEIO	MÉDIA	HOMOGENEIDADE ENTRE OS MEIOS
MAISENA	2,9555556	a
SABORAUD	3,9833333	b
CORN MEAL	4,3888889	bc
YPG	4,7444444	bcd
BDA	5,2444444	cd
BDA*	5,4444444	de
MC	6,2388889	e

As letras a,b,c, d, e indicam diferença significativa entre meios

O meio completo apresenta o melhor crescimento em diâmetro para todas as linhagens, não diferindo estatisticamente do meio BDA modificado.

O meio BDA modificado, por sua vez não difere dos meio BDA e YPG, sendo que o meio BDA não apresenta diferenças significativas dos meios YPG e Corn Meal.

Os meios YPG e Corn Meal não diferem entre si, nem o meio Saboraud difere dos dois primeiros.

O meio Maisena, confirmando a suposição inicial é realmente o meio que propicia o menor crescimento, diferindo estatisticamente de todos os demais meios testados para o caráter diâmetro da colônia.

Desta forma, os meios de cultura podem ser enumerados de acordo com o caráter crescimento radial, para as 3 linhagens, em ordem decrescente de diâmetro observado:

1. MC e BDA*
2. BDA, YPG, Corn Meal
3. Saboraud
4. Maisena

4.1.2 - Conidiação das linhagens selvagens de *Beauveria bassiana* em diferentes meios de cultura

A produção de conídios foi analisada através de estimativa em câmara de Neubauer, a partir de uma amostra com diâmetro de 0,7 cm,. As médias de 3 repetições podem ser vistas na tabela 5.

TABELA 5 - Médias da conidiação de 3 linhagens de *Beauveria bassiana* em 7 meios de cultura, no 12º dia de crescimento (média de 3 repetições).(N x 10⁶ conídios/ml).

LINHAGEM MEIO	E2	E3	E8
BDA	63,52	72,27	9,90
BDA*	70,44	142,30	33,34
SABORAUD	13,44	17,69	23,62
CORN MEAL	10,24	1,90	2,13
MC	71,99	43,45	33,15
YPG	13,59	36,55	38,24
MAISENA	10,31	19,28	4,34

A conidiação de cada linhagem nos 7 meios de cultura pode ser vista nas figuras 5 a 7, bem como uma comparação entre as 3 linhagens para este caráter encontra-se na figura 8.

A legenda a seguir é explicativa para as figuras 5, 6 e 7.

- 1 ■ - BDA
- 2 ■ - BDA*
- 3 ■ - SABORAUD
- 4 ■ - CORN MEAL
- 5 ■ - MEIO COMPLETO
- 6 ■ - YPG
- 7 ■ - MAISENA

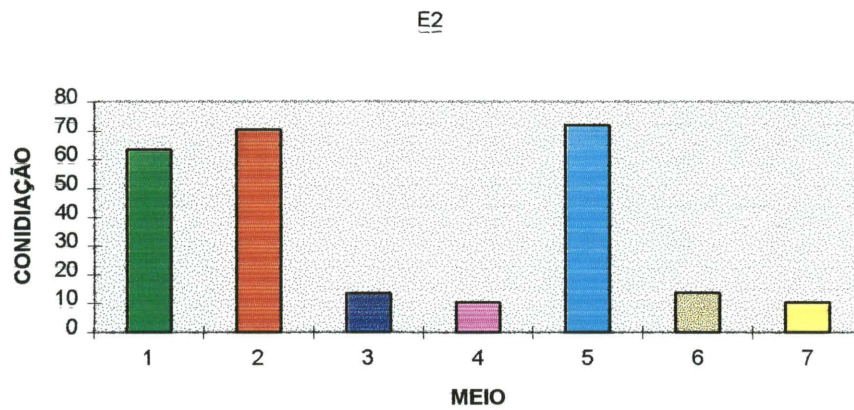


FIGURA 5 - Produção de conídios ($N \times 10^6$ conídios/ml) pela linhagem E2, no 12^o dia de crescimento em 7 meios de cultura.

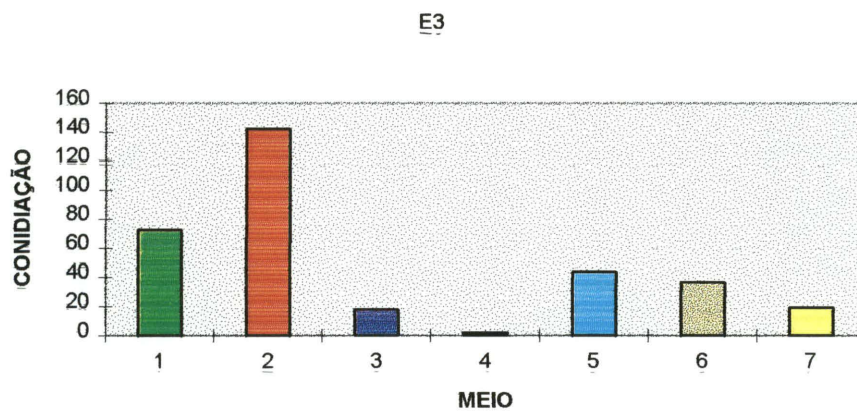


FIGURA 6 - Produção de conídios ($N \times 10^6$ conídios/ml) pela linhagem E3, no 12º dia de crescimento em 7 meios de cultura.

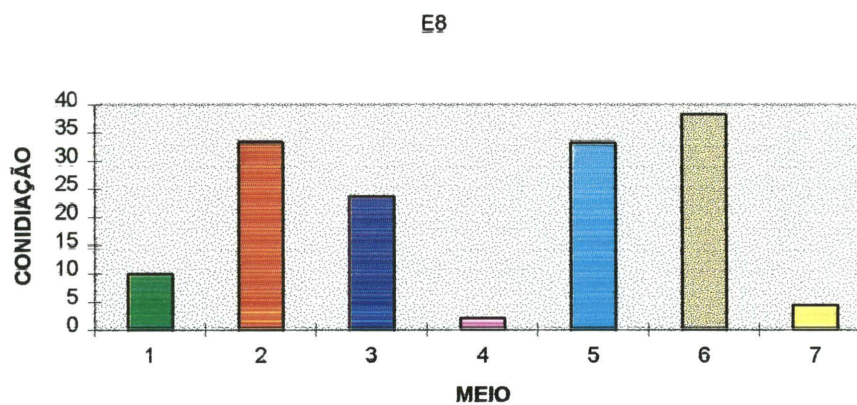


FIGURA 7 - Produção de conídios ($N \times 10^6$ conídios/ml) pela linhagem E8, no 12º dia de crescimento em 7 meios de cultura.

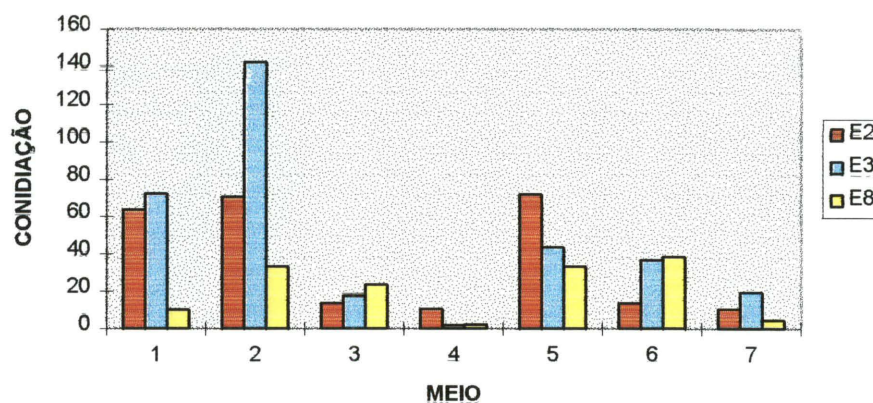


FIGURA 8 - Comparação da produção de conídios ($N \times 10^6$ conídios/ml) por 3 linhagens de *Beauveria bassiana*, no 12^o dia de crescimento em 7 meios de cultura.

1 - BDA

2 - BDA*

3 - SABORAUD

4 - CORN MEAL

5 - MEIO COMPLETO

6 - YPG

7 - MAISENA

A conidiação das três linhagens nestes sete meios demonstrou ser mais intensa em BDA modificado e em meio completo, sendo menor em meio Corn Meal, como pode ser visto na tabela 5, em que são demonstradas as médias da conidiação de cada linhagem nos sete meios.

Também neste caso os resultados foram analisados estatisticamente através do teste de Tuckey, para determinar se há diferenças estatísticas entre as médias de produção de conídios. Isto pode ser visto nas tabelas 6 a 10.

TABELA 6 - ANAVA -Análise de variância para o caráter conidiação de 3 linhagens de *Beauveria bassiana* em 7 meios de cultura, no 12º dia de crescimento.

fonte de variação	SQ	GL	QM	F	p -valor
BLOCO	699,648	2	349,8239	1,566	0,2214
MEIO	7632,256	2	3816,127	17,084	0,0000
LINHAGEM	41318,46	6	6886,410	30,829	0,0000
MEIO x LINHAGEM	22131,56	12	1844,297	8,257	0,0000
RESÍDUO	8934,944	40	223,3736		
TOTAL	80716,88	62			

Todos os valores de F são baseados no quadrado médio dos resíduos

Os p-valores para linhagem praticamente iguais a zero (tabela 6) indicam que pelo menos um par de médias dos meios e das linhagens diferem entre si. Ainda, a interação entre meios e linhagens também apresentaram médias com diferença significativa, como pode ser observado na tabela 7.

TABELA 7 - Diferenças entre as médias da interação linhagem x meio para o caráter produção de conídios para 3 linhagens de *Beauveria bassiana* em 7 meios de cultura.

LINHAGEM		E2	E3	E8
MEIO X MEIO				
BDA	BDA*	6,92	70,03*	23,44
BDA	Saboraud	59,04*	54,57*	13,71
BDA	CM	57,75*	70,37*	7,76
BDA	MC	8,47	28,81	23,25
BDA	Maisena	49,92*	35,71	28,33
BDA	YPG	53,20*	52,99*	5,56
BDA*	Saboraud	65,96*	124,61*	9,72
BDA*	CM	64,67*	140,40*	31,20
BDA*	MC	1,55	98,85*	0,19
BDA*	Maisena	56,84*	105,75*	4,89
BDA*	YPG	60,12*	123,02*	29,00
Saboraud	CM	1,28	15,79	21,48
Saboraud	MC	67,51*	25,76	9,53
Saboraud	Maisena	9,11	18,85	14,61
Saboraud	YPG	5,83	1,58	19,28
CM	MC	66,22*	41,55	31,01
CM	Maisena	7,83	34,65	36,10
CM	YPG	4,55	17,38	2,20
MC	Maisena	58,39*	6,90	5,08
MC	YPG	61,67*	24,17	28,81
Maisena	YPG	3,283	17,27	33,90

Quando a diferença entre as médias das interações é maior, em módulo, do que 46,68 significa que existe diferença significativa entre essas interações.

* indica as diferenças significativas entre os meios de cultura.

Analisando-se estes resultados (tabela 7) pode-se perceber que a produção de conídios é dependente do meio de cultura e difere para cada linhagem. A linhagem E8 apresenta uma produção de conídios estatisticamente equivalente nos 7 meios de cultura, enquanto a linhagem E2 produz mais conídios em MC, BDA e BDA*. A linhagem E3, por outro lado, tem sua conidiação máxima em BDA* e esta difere da conidiação das demais linhagens.

A diferença entre as linhagens pode ser vista na tabela 8 e entre os meios na tabela 9.

TABELA 8 - Comparação múltipla entre médias da conidiação ($N \times 10^6$ conídios/ml) de 3 linhagens de *Beauveria bassiana* em 7 meios de cultura, no 12º dia de crescimento, através do teste de Tuckey, com $p < 0.01$ (média de 3 repetições) (Comparação entre as linhagens).

LINHAGEM	MÉDIA	HOMOGENEIDADE ENTRE AS LINHAGENS
E8	20,677857	a
E2	34,300476	ab
E3	47,638095	b

As letras a e b indicam diferença significativa entre as linhagens.

As linhagens E8 e E2 não diferem estatisticamente para o caráter produção de conídios, enquanto a linhagem E2 não difere da linhagem E3. A linhagem E3 é a que apresenta maior conidiação em todos os meios de cultura difere da linhagem E8, como pode ser visto na tabela 8, em que letras diferentes indicam diferença significativa entre as linhagens..

TABELA 9 - Comparação múltipla entre médias da conidiação em 7 meios de cultura, para 3 linhagens de *Beauveria Beauveria bassiana*, no 12º dia de crescimento, através do teste de Tuckey, com $p < 0.01$ (média de 3 repetições) (Comparação entre os meios).

MEIO	MÉDIA	HOMOGENEIDADE ENTRE OS MEIOS
Corn Meal	3,267222	a
YPG	11,311111	a
Saboraud	15,266667	a
Maisena	29,463333	ab
BDA	48,565556	b
MC	49,533333	b
BDA*	82,031111	c

As letras a,b,c, d, e indicam diferença significativa entre meios

O meio BDA* é o melhor meio para produção de conídios, não sendo comparado a nenhum dos outros. Os meios MC, BDA e Maisena não diferem estatisticamente para este caráter, enquanto o meio maisena é equivalente aos meios Saboraud, YPG e Corn Meal, sendo este último o meio que confere a menor produção de conídios.

Pode-se perceber que os meios que conferem melhor crescimento radial das colônias, como o meio completo, não necessariamente condicionam a maior produção de conídios, enquanto o meio Maisena, cujo crescimento radial foi menor que nos demais meios, apresentou uma conidiação maior que os meios Saboraud, YPG e Corn Meal, não diferindo estatisticamente destes e dos meios completo e BDA, como demonstrado na tabela 9.

A partir destas análises pode-se determinar os meios mais eficientes na produção de conídios para cada linhagem, descritos na tabela 10.

TABELA 10 - Meios de cultura que proporcionam a melhor conidiação para 3 linhagens selvagens de *Beauveria bassiana*.

LINHAGEM	MEIOS
E2	MC, BDA e BDA*
E3	BDA*, BDA e MC
E8	todos os meios testados

Através da análise do crescimento e conidiação nos diferentes meios de cultivo foi possível determinar que há uma variabilidade genética entre as linhagens, uma vez que a linhagem E3 apresenta um crescimento radial menor e uma produção de conídios maior que as outras linhagens, independentemente do meio de cultura. Também estas linhagens comportam-se de maneira distinta nos diferentes meios, indicando suas diferenças genéticas.

4.2 - Verificação da morfologia de hifas e conídios de linhagens selvagens de *Beauveria bassiana* através da técnica de coloração de núcleos de TANAKA *et alii*, 1979.

Colônias de linhagens selvagens tiveram parte de seu micélio e conídios submetidos à coloração de acordo com o descrito no item 3.4 e pôde-se verificar a sua morfologia ao microscópio óptico, em objetiva de imersão, no aumento de 1000x.

Os conídios de *Beauveria bassiana* são arredondados e uninucleados (PACCOLA-MEIRELLES, 1988), sendo estes núcleos localizados

periféricamente (foto 4). Suas hifas modificam-se em estruturas dilatadas, conidióforos, onde formam-se os conídios (AINSWORTH *et alii* 1973) (fotos 5).

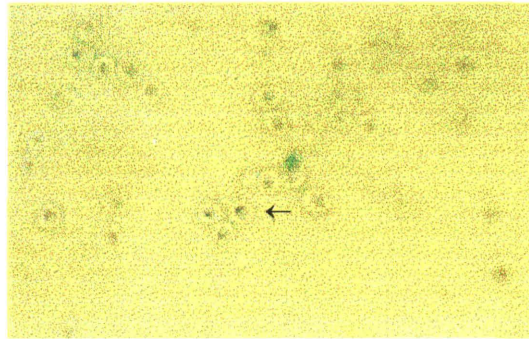


FOTO 4 - Conídios da linhagem selvagem E8 de *Beauveria bassiana*, em que visualiza-se os núcleos localizados periféricamente.(aumento 1000 X)

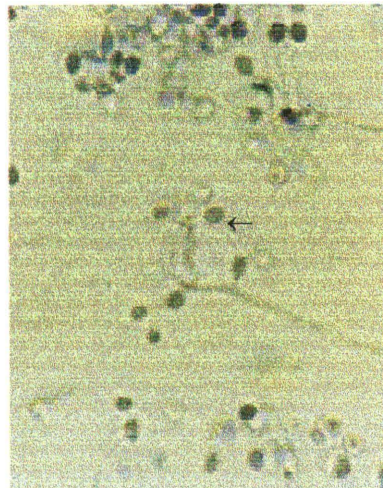


FOTO 5 - Conidióforo da linhagem selvagem E2 de *Beauveria bassiana* (aumento 1000 X).

4.3 - Curvas de sobrevivência de 3 linhagens de *Beauveria bassiana* ao mutagênico físico luz ultravioleta

Conídios de 3 linhagens de *Beauveria bassiana* foram submetidos a diferentes tempos de exposição à luz ultravioleta (item 3.5) e elaborou-se curvas de sobrevivência destas linhagens a este mutagênico, que podem ser verificadas na tabela 11 e nas figuras 9, 10 e 11.

TABELA 11 - Porcentagem de sobrevivência de 3 linhagens de *Beauveria bassiana* à luz ultravioleta em diferentes tempos de exposição (média de 3 repetições).

LINHAGEM TEMPO (min)	E2	E3	E8
0	100%	100%	100%
1	17,63%	0,729%	16,97%
2	3,012%	0,105%	1,266%
4	0,0642%	0,00252%	0,0893%
8	0,00324%	0,000103%	0,00143%

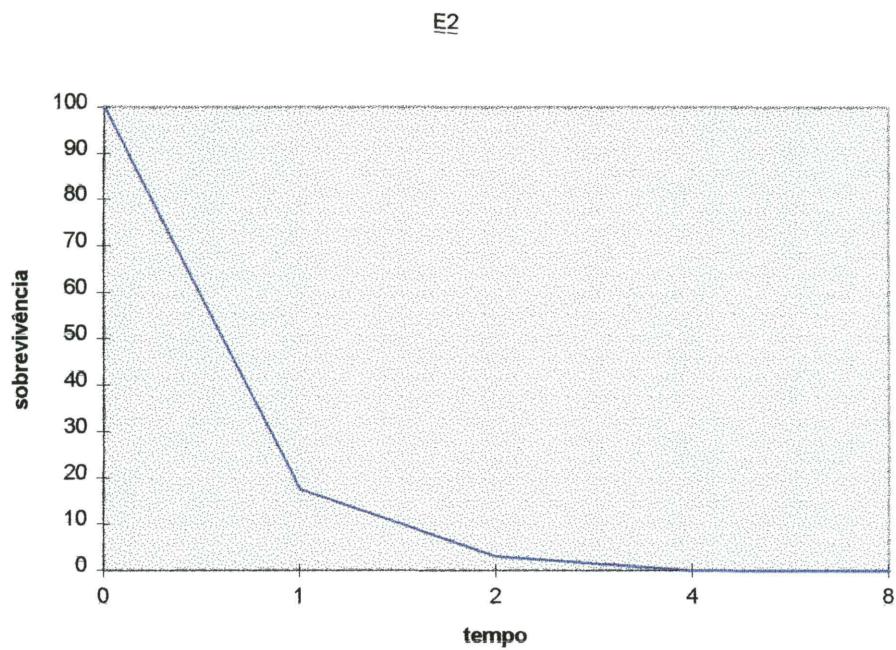


Figura 9 - Curva de sobrevivência em porcentagem da linhagem E2 a diferentes tempos de exposição (minutos) à luz ultravioleta (média de 3 repetições).

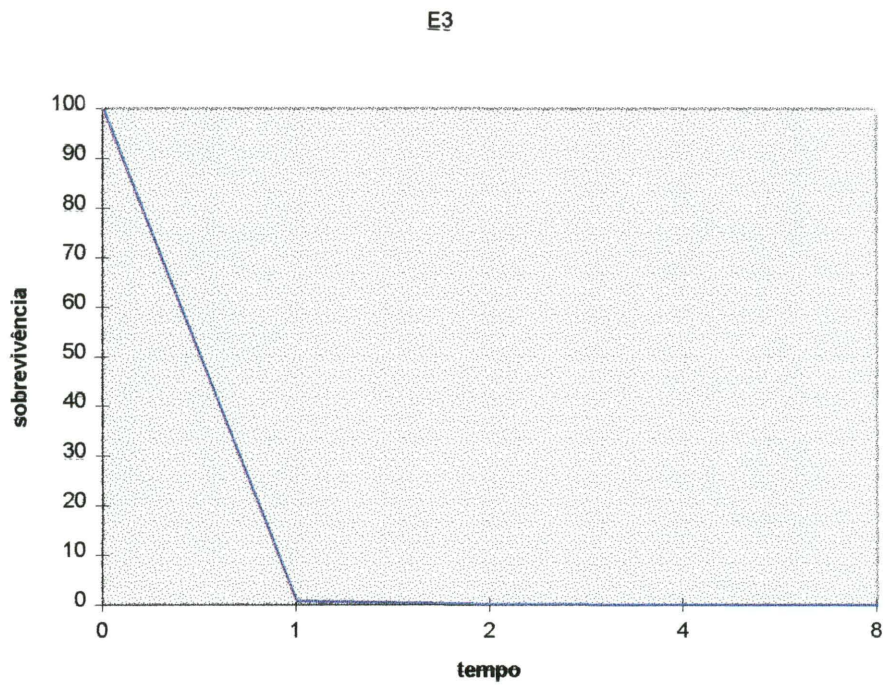


Figura 10 - Curva de sobrevivência em porcentagem da linhagem E3 a diferentes tempos de exposição (minutos) à luz ultravioleta (média de 3 repetições).

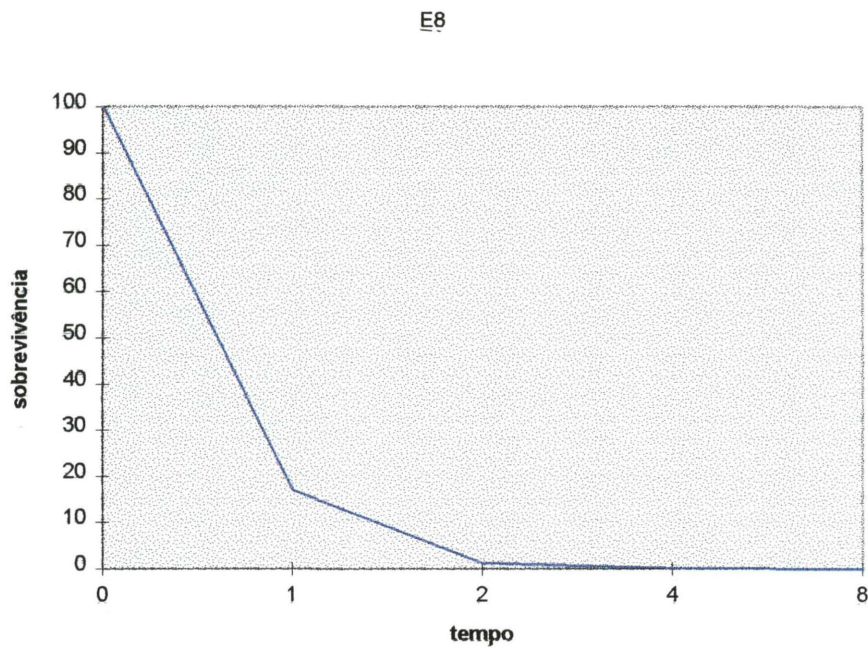


Figura 11 - Curva de sobrevivência em porcentagem da linhagem E8 a diferentes tempos de exposição (minutos) à luz ultravioleta (média de 3 repetições).

Com estas curvas, pode-se concluir que o tempo de exposição à luz ultravioleta que propicia de 1 a 5 % de sobrevivência, que segundo BURNETT, 1973, é o ideal para a obtenção de mutantes, é de 2 minutos para as linhagens E8 e E2 e menos de 1 minuto para a linhagem E3 (tabela 11).

Deste modo, percebe-se que a linhagem E3 é menos resistente à luz ultravioleta que as linhagens E2 e E8, sendo estas praticamente equivalentes.

A resistência à luz ultravioleta é uma qualidade desejável num microrganismo que pode ser usado no controle biológico de insetos, pois estará exposto aos raios UV do sol (MORLEY-DAVIES *et alii*, 1995).

Como já foi discutido no item 4.1, a linhagem E3 é realmente diferente das linhagens E2 e E8 para os caracteres crescimento radial e conidiação e como pode-se perceber (Tabela 11), também difere destas na sobrevivência à luz ultravioleta, confirmando a variabilidade genética existente entre as linhagens selvagens de *Beauveria bassiana*.

4.4 - Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos através de irradiação com o mutagênico luz ultravioleta

Os mutantes morfológicos foram isolados por inspeção visual e os auxotróficos pelo método do isolamento total de PONTECORVO *et alii*, 1953, como descrito no item 3.7

O fenótipo dos mutantes morfológicos obtidos a partir das linhagens selvagens E2, E3 e E8 estão descritos nas tabelas 12, 13 e 14.

TABELA 12 - Mutantes morfológicos da linhagem E2 de *Beauveria bassiana* obtidos com luz ultravioleta

MUTANTE	FENÓTIPO
E2-1	colônia amarelada, com algumas regiões “fluffy”, com poucos esporos
E2-2	colônia amarelada, formando grumos e com poucos esporos
E2-3	colônia branca, com aspecto “fluffy”
E2-4	colônia branca, com aspecto “fluffy”
E2-5	colônia branca, com aspecto “fluffy”
E2-6	colônia bege, com aspecto “fluffy”
E2-7	colônia bege, com crescimento compacto e irregular, com poucos esporos
E2-8	colônia branca, crescimento compacto e poucos esporos
E2-9	colônia amarelada com crescimento compacto e poucos esporos
E2-10	colônia amarelada, com crescimento aéreo

Os mutantes morfológicos da linhagem E2 de *Beauveria bassiana* podem ser observados nas fotos 6 e 7.

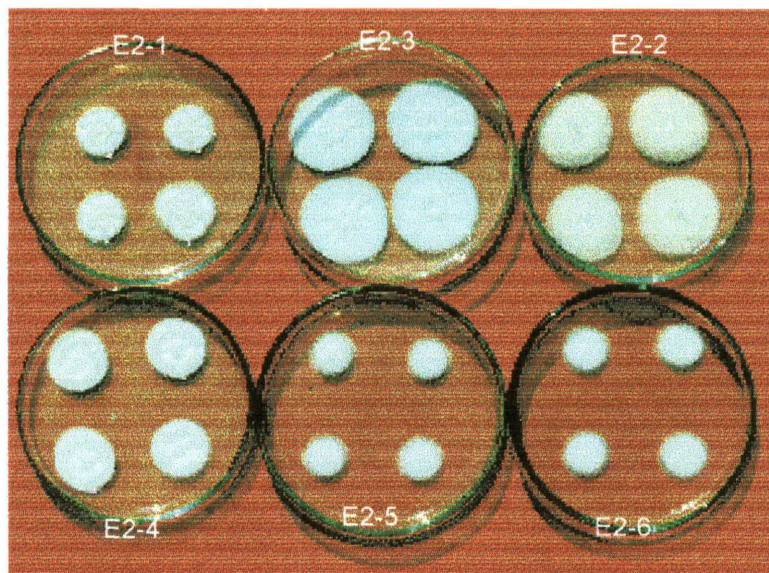


FOTO 6 - Mutantes morfológicos da linhagem E2 de *Beauveria bassiana*.

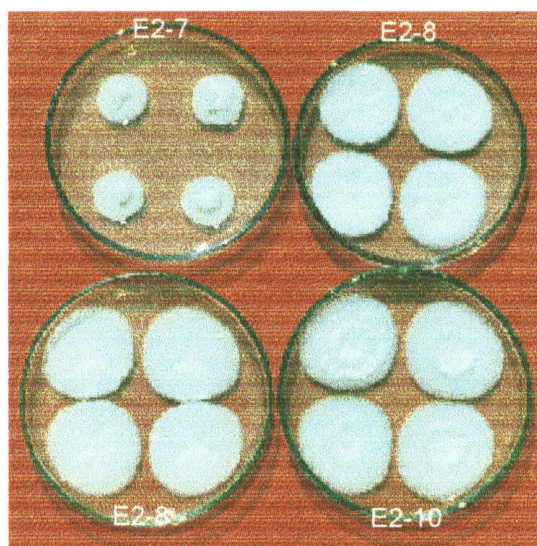


FOTO 7 - Mutantes morfológicos da linhagem E2 de *Beauveria bassiana*.

TABELA 13 - Mutantes morfológicos da linhagem E3 de *Beauveria bassiana* obtidos com luz ultravioleta

MUTANTE	FENÓTIPO
E3-1	colônia amarelada, com micélio aéreo
E3-2	colônia amarelada, com micélio aéreo
E3-3	colônia amarelada, com micélio aéreo
E3-4	colônia branca, compacta
E3-5	colônia amarelada, com micélio aéreo
E3-6	colônia amarelada, com micélio aéreo
E3-7	colônia branca, com micélio aéreo
E3-8	colônia amarelada, com micélio aéreo e crescimento regular

Os mutantes morfológicos da linhagem E3 de *Beauveria bassiana* podem ser vistos na foto 8.

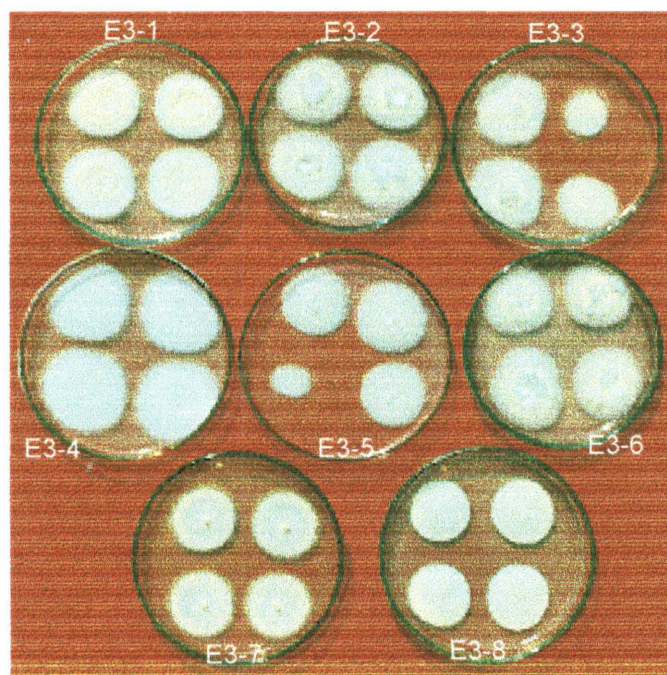


FOTO 8 - Mutantes morfológicos da linhagem E3 de *Beauveria bassiana*

TABELA 14 - Mutantes morfológicos da linhagem E8 de *Beauveria bassiana* obtidos com luz ultravioleta

MUTANTE	FENÓTIPO
E8-1	colônia branca com o centro amarelado e algumas partes com aspecto “fluffy”, com poucos esporos
E8-2	colônia amarelada, com algum micélio aéreo e muitos esporos

Os mutantes morfológicos da linhagem E8 de *Beauveria bassiana* podem ser vistos na foto 9.

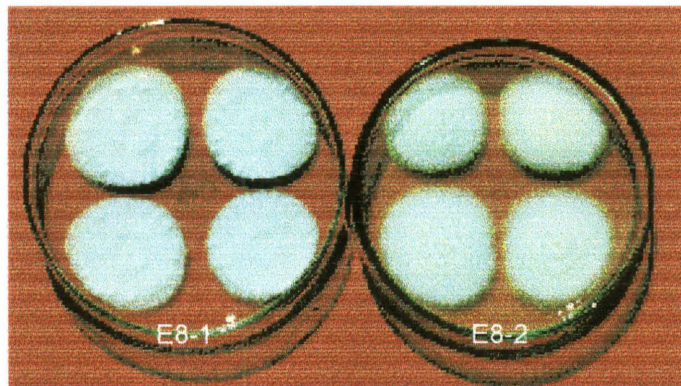


FOTO 9 - Mutantes morfológicos da linhagem E8 de *Beauveria bassiana*

Como descrito no item 3.8, os mutantes morfológicos foram isolados de acordo com as diferenças observadas entre estes e as linhagens selvagens, cujos fenótipos estão descritos no item 3.1 e podem ser vistos na foto 1.

Os mutantes morfológicos em *Beauveria bassiana* são difíceis de serem identificados, pois este fungo altera sua morfologia de acordo com o meio em que cresce, sendo sua coloração basicamente entre o branco e o amarelado, tornando complicada a caracterização dos mutantes. Apesar disso, os mutantes representados nas fotos 6 a 9, todos cultivados em meio BDA*, realmente apresentam um fenótipo diferente do selvagem.

Uma das qualidades que busca-se em micoinseticidas é a alta produção de esporos, para que a infecção ao inseto hospedeiro seja efetiva, e isto foi observado em alguns dos mutantes obtidos, como é o caso de todos os derivados da linhagem E3 e do mutante E8-2, derivado da linhagem E8.

Os mutantes auxotróficos obtidos a partir das linhagens selvagens E2, E3 e E8 são descritos na tabela 15.

TABELA 15 - Mutantes auxotróficos de *Beauveria bassiana* obtidos com luz ultravioleta.

LINHAGEM	MUTANTE	DEFICIÊNCIA
E2	E2-ade ⁺ (ác.nuc.)	ac.nucléico
E2	E2-ade ⁻	adenina
E3	E3-bio ⁻	biotina
E8	E8-arg ⁻	arginina
E8	E8-cys ⁻	cistina

O mutante para ácidos nucléicos não pôde ser identificado precisamente pela falta de disponibilidade de ácidos nucléicos, além de adenina, no laboratório de Genética de Microrganismos, sendo denominado como E2-ade⁺(ác.nuc.).

A freqüência de mutações auxotróficas obtidas com 1 e 2 minutos de exposição à luz ultravioleta, para as linhagens E3, E2 e E8; respectivamente; pode ser vista na tabela 16, em que está representado o número de colônias isoladas pelo método do isolamento total de PONTECORVO (1953) e o número de mutantes obtidos.

TABELA 16 - Porcentagem de mutantes auxotróficos de *Beauveria bassiana* obtidos com 1 minuto (linhagem E3) e 2 minutos (linhagens E2 e E8) de exposição à luz ultravioleta.

LINHAGEM	Nº COLÔNIAS	MUTANTES AUXOTRÓFICOS	FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO
E2	558	1	0,00179
E2	341	0	0
E2	465	2	0,00430
E2	99	0	0
E3	672	1	0,00148
E3	704	0	0
E3	416	0	0
E3	224	0	0
E3	960	0	0
E8	495	1	0,00202
E8	99	1	0,010
E8	713	0	0
E8	372	0	0
E8	96	0	0

A frequência de mutações morfológicas obtidas com 1 e 2 minutos de exposição à luz ultravioleta, para as linhagens E3, E2 e E8; respectivamente, pode ser vista na tabela 17.

TABELA 17 - Porcentagem de mutantes morfológicos de *Beauveria bassiana* obtidos com 1 minuto (linhagem E3) e 2 minutos (linhagens E2 e E8) de exposição à luz ultravioleta.

LINHAGEM	N ^o COLÔNIAS	N ^o MUTANTES MORFOLÓGICOS	FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO
E2	558	1	0,00179
E2	341	2	0,0058
E2	465	2	0,0043
E2	99	4	0,0404
E3	672	0	0
E3	704	1	0,00142
E3	416	0	0
E3	224	0	0
E3	960	7	0,00729
E8	495	0	0
E8	99	2	0,0202
E8	713	0	0
E8	372	0	0
E8	96	0	0

4.5 - Teste de reversão dos mutantes auxotróficos obtidos através da luz ultravioleta

Os mutantes auxotróficos foram testados quanto à reversão de suas mutações (item 3.10) e na concentração de esporos testados não houve reversão, uma vez que nenhum mutante cresceu em meio mínimo. Pode-se concluir que estes mutantes obtidos com luz ultravioleta são estáveis, ao contrário do observado por PACCOLA-MEIRELLES, 1988, e podem ser

utilizados em futuros trabalhos de genética deste fungo, na tentativa de elucidar seus processos de recombinação.

4.6 - Obtenção de heterocário

Através da metodologia citada no item 3.11 induziu-se a formação de heterocário entre dois mutantes auxotróficos da linhagem E8, arg^- e cys^- . Observou-se, que estes mutantes formaram uma película heterocariótica e esta cresceu em meio mínimo, indicando que ambos suprem mutuamente suas necessidades nutricionais. Entretanto, parece não ter ocorrido a anastomose de hifas, característica do ciclo parassexual, levando a crer que estes mutantes formaram um sincário, ou seja, associaram-se de maneira a poderem sobreviver em meio mínimo sem fundirem-se e portanto, sem realizar o ciclo parassexual e em consequência, não sofreram recombinação genética (KAVA-CORDEIRO, 1993). Este sincário pode ser observado na foto 10.

A indução da formação de heterocário é um processo bastante viável para linhagens com duas deficiências nutricionais, porém em linhagens com uma única marca auxotrófica este processo não vem sendo observado, talvez por ser mais fácil para o fungo formar um sincário ao invés de um heterocário.

Devido à estabilidade dos mutantes obtidos, estes poderão ser utilizados em trabalhos futuros e, com o auxílio de agentes mutagênicos, obter mais mutações nestas linhagens já mutantes para viabilizar a indução do ciclo parassexual e da paramiose.

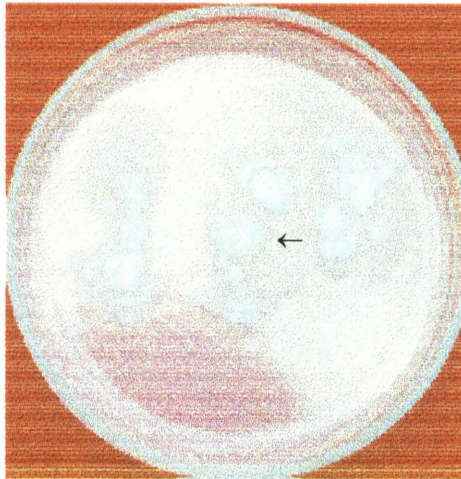


FOTO 10 - Provável sincário formado entre os mutantes auxotróficos E8-Arg⁻ e E8-Cyt⁻ em meio mínimo.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

4.7 - Teste de patogenicidade da linhagem E8 selvagem e de seus mutantes morfológicos em triatomíneos da espécie *Rhodnius robustus*.

Os insetos submetidos ao tratamento com as linhagens selvagem E8 e os mutantes morfológicos E8-1 e E8-2, como descrito no item 3.12, foram considerados parasitados, uma vez que as ninfas morreram 6 dias após o tratamento e os adultos morreram 10 dias após a inoculação do fungo (foto 11).

Os insetos do grupo controle (tratamento 4) permaneceram ativos durante 18 dias após o experimento, quando dois insetos adultos e quatro ninfas morreram. No vigésimo dia após o tratamento um adulto e duas ninfas do controle permaneciam vivos e ativos.

Os adultos do grupo controle puseram muitos ovos, cerca de 6 dias após o tratamento e estes eclodiram no vigésimo dia, como pode ser verificado na foto 12, em que as ninfas encontram-se na parede do frasco

(detalhe). Os adultos submetidos ao tratamento com a linhagem E8 selvagem também puseram ovos, porém estes não eclodiram (fotos 13).

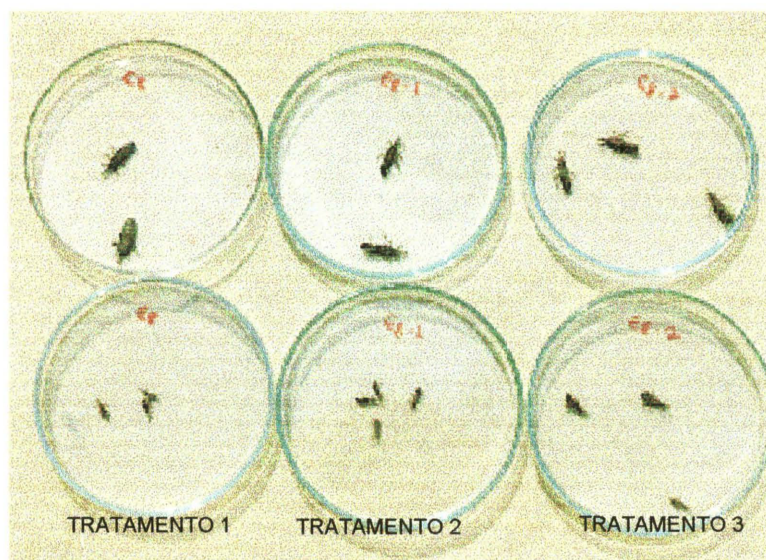


FOTO 11 - Adultos e ninfas mortos de *Rhodnius robustus* submetidos ao tratamento com *Beauveria bassiana* no vigésimo primeiro dia após o tratamento.

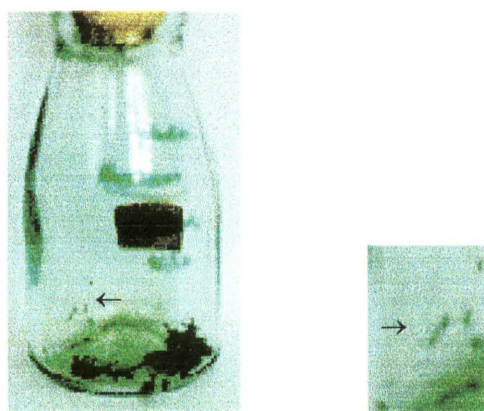


FOTO 12 - Ninfas de *Rhodnius robustus*, nascidas 20 dias após o experimento. (grupo controle). Detalhe: ninfas na parede do frasco.



FOTO 13 - Detalhe dos ovos de *Rhodnius robustus* submetidos ao tratamento com a linhagem E8 selvagem, que não eclodiram até o vigésimo primeiro dia do experimento.

ROMANA e FARGUES (1992) descrevem a patogenicidade de *Beauveria bassiana* contra o vetor da doença de chagas, o triatomíneo *Rhodnius prolixus*. Através dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que este fungo também afeta uma outra espécie, o *Rhodnius robustus*; não havendo diferença na ação da linhagem selvagem E8 e dos mutantes morfológicos E8-1 e E8-2.

Esta confirmação da patogenicidade deste fungo a este importante inseto de interesse médico pode ser útil na tentativa de extermínio destes triatomíneos, que constituem vetores de uma das doenças que ainda representam graves problemas no Brasil.

5 - CONCLUSÕES

1. O fungo *Beauveria bassiana* apresenta uma grande variabilidade natural, sendo que diferentes linhagens têm seu crescimento e conidiação alterados de acordo com o meio em que se encontram.
2. Os meios que propiciam o melhor crescimento micelial para todas as linhagens são o meio completo e o BDA modificado, enquanto que o meio responsável pela melhor conidiação para a linhagem E3 é o meio BDA modificado, enquanto para a linhagem E2 é o meio completo. A linhagem E8 não apresenta diferença estatística na produção de conídios para os sete meios testados.
3. O tempo de exposição à luz ultravioleta que proporciona de 1 a 5 % de sobrevivência é de 2 minutos para as linhagens E2 e E8, enquanto para a linhagem E3 é de menos de 1 minuto.
4. A linhagem E3 é menos resistente à ultravioleta, sendo as linhagens E2 e E8 equivalentes.
5. A luz ultravioleta é eficiente na obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos estáveis.
6. A obtenção de heterocário a partir de linhagens mutantes com uma única marca auxotrófica não foi possível, devido às características das próprias linhagens, bem como da dificuldade de indução do ciclo parassexual.
7. A linhagem selvagem E8, bem como seus mutantes morfológicos E8-1 e E8-2 são patogênicos ao vetor da doença de chagas *Rhodnius robustus*, causando a morte das ninfas 6 dias após a inoculação e dos adultos após 10 dias. Os ovos postos pelos barbeiros tratados com a linhagem E8 selvagem não eclodiram até o vigésimo primeiro dia após o tratamento, ao contrário dos ovos do grupo controle, que eclodiram no vigésimo dia,

- confirmando a patogenicidade tanto contra os adultos como contra as formas jovens deste triatomíneo.
8. O fungo *Beauveria bassiana* apresenta potencial como agente de controle biológico em insetos vetores da doença de Chagas.
 9. Há variabilidade genética entre as linhagens selvagens (E2, E3 e E8) de *Beauveria bassiana* para o crescimento radial (micelial), produção de esporos e resistência à luz ultravioleta.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A.S. **The Fungi. Vol. IV. A taxonomic Review with Keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti.** Academic Press . New York and London. 1973. p. 459.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos.** São Paulo : Manole, 1986, cap.6, p. 73-126.
- ALVES, S.B.; SILVEIRA NETO, S.; LARA HADDAD, M. Capacidade de sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (isolado E9) sobre cana-da-açúcar, nas condições de campo. **O Solo**, 76 : 39-42. 1984.
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios Práticos de Genética.** São Paulo :EDUSP, 1973, 288 p.
- BADILLA, F.F.; ALVES, S. B. Controle do Gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera - Curculionidae) com *Beauveria bassiana* em condições de laboratório e campo. **An. Soc. Entomol. Brasil.** 20(2) : 251-263. 1991.
- BAGALHI, E. **Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin.** Piracicaba, 1987. 124 p. Tese (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.
- BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados.** São Paulo: Rocca. 1990. 1179 p.
- BARNETT, H.L. **Illustred Genera of Imperfect Fungi.** Minneapolis, Burges Publishing Company, 1958, 225 p., apud PACCOLA-MEIRELLES, L.D. **Variabilidade e recombinação no fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Vuill).** Piracicaba, 1988. 193 p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP.
- BASSI, A. **Del mal del segno calcimaccio o moscardino malattia che affligge bachi da seta.** Parte 1 . Teor. Tip. Orcesi, Lodi, 1835. apud MESSIAS, C.L. Fungos, sua utilização para controle de insetos de importância médica e agrícola. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, RJ**, 84-III : 57-59. 1989.

- BATISTA FILHO, A. ; LEITÃO, A.E.F.; SATO, M.E.; LEITE, L.G.; RAGA, A. Efeito da associação *Beauveria bassiana* (BALLS) VUILL com óleo mineral, na mortalidade de *Cosmopolites sordidus* GERMAR (COLEOPTERA - CURCULIONIDAE). **An. Soc. Entomol. Brasil.** 23(3) : 379-383. 1994.
- BENASSI, V.L.R.M. Levantamento dos inimigos naturais da Broca do café *Hypothenemus hampei* (FERR) (COLEOPTERA : SCOLYTIDAE) no norte do Espírito Santo. **An. Soc. Entomol. Brasil.** 24(3) : 635-638. 1995.
- BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **J. Invert. Pathol.** 56(3) : 362-370. 1990.
- BLEICHER, E.; QUINTELA, E.D.; OLIVEIRA, I.S.R.; QUINDERÉ, A.W. Efeito do fungo *Beauveria bassiana* (BALLS) VUILL e inseticidas na população do Bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* BOH. **An. Soc. Entomol. Brasil.** 23(1) : 131-134. 1994.
- BONATELLI, Jr., R., AZEVEDO, J. L., VALENT, G. V., Parassexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. **Rev. Brasil. Genet.,** Ribeirão Preto, v.6, p.399-405, 1983.
- BURNETT, J.H. **Mycogenetics.** London: John Wiley & Sons, 1975. 375 p.
- DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; SPECHT, A.; VALIM-LABRES, M.E. Efficiency of *Beauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. control (Hymenoptera : Formicidae). **An. Soc. Entomol. Brasil.** 22(2) : 281-285. 1993.
- EYAL, J.; MABUD, A.; FICHBEIN, K.L.; WALTER, J.F.; OSBORN, L.S.; LAND, Z. Assesment of *Beauveria bassiana* Nov. EQ-1 strain, wich produces a red pigment for microbiol control. **App. Bioch. and Biotech.** 44(1) : 65-80. 1994.
- FRIGO, S. M. ; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural para crescimento, conidição e sobrevivência á luz ultravioleta em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Rev. da Agric.** 61 : 137-147. 1984. apud VILAS BOAS, A.M., PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas

- biológicos para o controle de pragas. **Arq. Biol. Tecnol.** 35 (4) : 749-761. 1992.
- GEDEN, C.J.; RUTZ, D.A.; STEINKRAUS, D.C. Virulence of different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for house flies and the parasitoid *Muscidifurax raptor*. **Biol. Control.** 5(4) : 615-621. 1995.
- GILLESPIE, A. T. and CLAYDON, N. The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. **Pest. Sci.** 27 : 203-215 . 1989. apud HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation of conditional lethal mutants of *Beauveria bassiana*. **Can. J. Microbiol.** 40 : 766-776. 1995.
- GOETTEL, M.S. ; JOHNSON, D.L.; INGLIS, G.D. The role of fungi in the control of grasshoppers. **Can. J. Bot.** 73(suppl 1) : 571-575. 1995.
- GONZALES-CABO, J.F.; ESPEJO-SERRANO, J.; BARCENA-ASENSIO, M.C. Mycotic pulmonar disease by *Beauveria bassiana* in a captive tortoise. **Mycosis.** 38(3-4) : 167-169. 1995.
- HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation of conditional lethal mutants of *Beauveria bassiana*. **Can. J. Microbiol.** 40 : 766-776. 1995.
- IGNOFFO, C. M. ; GARCIA, C. Influence of conidial color on inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. **Env. Entomol.** 21(4) : 913-917. 1992.
- INGLE, M. R. ; HASTIE, A.C., Environmental factors affecting the formation of diploids in *Verticillium albo-atrum*. **Trans.Br. Mycol. Soc.**, Cambridge, v.62,p.313-321, 1974. Apud KAVA-CORDEIRO, V. **Cariótipos eletroforéticos de linhagens selvagens e mutantes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (METSCH) SOROKIN.** Curitiba, 1993. 92 p. Tese (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.
- JAVAREGOWDA, B.; VISWESWARAGOWDA, B.L.; JAYARAMAIAH, M. Effect of solar heat treatment (sundrying) on the inactivation of the muscardine fungus *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill infecting the silkworm *Bombyx mori* l. **Entomon.** 19(1-2) : 7-12. 1994.

- JOSHI, L.; St. LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **FEMS Microb. Let.** 125(2-3) : 211-217. 1995.
- KAAYA, G. P.; MUNYINYI, D.M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse flies (*Glossina* spp) at developmental sites. **J. Inv. Pathol.** 66(3) : 237-241. 1995.
- KAVA-CORDEIRO, V., **Cariótipos eletroforéticos de linhagens selvagens e mutantes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (METSCH) SOROKIN.** Curitiba. 1993. 92p., Tese (Mestrado). Universidade Federal do Paraná.
- KELLEY-TUNIS, K.K.; BYRON, R.L.; ANDIS, M. Activity of entomopathogenic fungi in free-foragingworkers of *Camponotus pennsylvanicus*. **J. of Economic Entomology** 88(4) : 937-943. 1995.
- KHACHATOURIANS, G.G. Production and use of biological pest control agents. **Trends. Biothech.** 4 : 120-124. 1986. apud KOSIR, J.M.; MACPHERSON, J.M. and KHACHATOURIANS, G.G. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms. **Can. J. Microbiol.** 37 : 534-541. 1991.
- KHACHATOURIANS, G.G. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In **Handbook of Applied Mycology**. Vol. 2 . Human, animals and insects. Edited by D.K. Arora, K.G. Mukerjii and E. Drouhet. Marcel Dekker, New York, 1991, pp. 613-663 apud HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation of conditional lethal mutants of *Beauveria bassiana*. **Can. J. Microbiol.** 40 : 766-776. 1995.
- KHACHATOURIANS, G.G. The relationship between biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi and insect diseases. In **The Mycota** . Vol. 6. Animal and Human relationships. Edited by K. Esser ; P.A. Lemke ; D.H. Howard, and J.D. Miller. Springer Verlag, Berlin. In press . apud HEGEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation of conditional lethal mutants of *Beauveria bassiana*. **Can. J. Microbiol.** 40 : 766-776. 1995.
- LECUONA, R. E. ; ALVES, S.B., Efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petsh. and Granulose Virus on *Diatraea*

- saccharalis* (F 1794) at different temperatures. **J. Appl. Ent.**, 105:, 228-233, 1988, apud VILLAS BOAS, A. M.; PACCOLA MEIRELLES, L. D.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A., Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. **Arq. Biol. Tecnol.** 35 (4) : 749-761. 1992.
- McLEOD, D. M., Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. **Can. J. Bot.** 32:818-893. 1954, apud MESSIAS, C. L.. Fungos, sua utilização para o controle de insetos de importância médica e agrícola. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, RJ, 84-III : 57-59. 1989.
- MALAGODI, M.; VEIGA, A.F.S.L., Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill. sobre o cupim *Nasutitermes* (DUDLEY) (ISOPTERA:TERMITIDAE) em laboratório. **An. Soc. Entomol. Brasil** 24(2) :315-322, 1995.
- MARTINS, S.F.S.; LIMA, M.G.A., Fungos entomopatogênicos no controle do percevejo do colmo do arroz *Tibraca limbativentris* STAL., virulência de isolados de *B. bassiana* (Bals) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. **An. Soc. Entomol. Brasil** 23(3) : 379-383, 1994.
- MESSIAS, C. L., Fungos, sua utilização para o controle de insetos de importância médica e agrícola. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, RJ, 84-III: 57-59, 1989.
- MIRANPURI, G.S.; KHACHATOURIANS, G.G. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of mosquito *Aedes aegypti*. **Entomol. Exp. et Applic.** 59(1) : 19-28. 1991.
- MORLEY-DAVIES, J.; MOORE, D.; PRIOR, C. Screening of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria* spp conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. **Mycol. Res.** 100(1) : 31-38. 1995.
- MWANGI, E. N.; KAAYA, G.P. ; ESSEMAN, S. Experimental infections of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and natural infections of some ticks with bacteria and fungi. **J. Afr. Zoo.** 109(2) : 151-160. 1995.

- NEWTON, A. C. Markers in pathogen populations. In **Genetics and Plant Pathogens**. Edited by P. R. Day and G.J. Jellis. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1987, pp 187-194. apud KOSIR, J.M.; MACPHERSON, J.M. and KHACHATOURIANS, G.G. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms. **Can. J. Microbiol.** 37 : 534-541. 1991.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D. **Variabilidade e recombinação no deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Vuill)**. Piracicaba, 1988 .193 p., Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.
- PACCOLA-MEIRELLES, L. D. ; AZEVEDO, J. L., Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **J. Inverteb. Pathol.** 57: 172-176, 1989.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural no fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Arq. Biol. Tecnol.** 33(3) : 657-672. 1990.
- PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Eletrophoretic karyotype of entomopathogenic deuteromycete *Beauveria bassiana* . **J. Inv. Pathol.** 61(3) : 231-235. 1993.
- PIMENTEL, I.C. (Com. pess.) . 1996.
- PONTECORVO, G. ; ROPER, J. A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of poliploid in *Aspergillus niger*. **J. Gen. Microb. Reading**. v.6, p. viii, 1952.
- PONTECORVO, G. ; ROPER, J. A.; FORBES, E., Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. **J. Gen. Microbiol. Reading** v.8, 198-210, 1953.
- ROBERTS, D. W.; YENDOL, W. G., Use of fungi for microbial control of insects. In BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. 1971. **Microbial Control of Insect and Mites**, New York, Burgess and Hussey, Academic Press, p 125-149, 1971, apud VILAS BOAS, A.M., PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. **Arq. Biol. Tecnol.** 35 (4) : 749-761. 1992.

- ROMANA, C.A.; FARGUES, J.F. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, RJ.** 87(3) : 363-368. 1992.
- SHARMA, S.; AGARWAL, G.P.; RAJAK, R.C. Effect of temperature, pH and light on toxin production by *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill. **Ind. J. Exp. Biol.** 30(10) : 918-919. 1992.
- SHARMA, S.; AGARWAL, G.P.; RAJAK, R.C. Pathophysiological alterations caused in *Heliothis armigera* by toxic metabolites of *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill. **Ind. J. Exp. Biol.** 32(3) : 168-171. 1994.
- SEMALULU, S.S.; MacPHERSON, J.M.; SCHIEFER, H.B.; KHACHATOURIANS G.G. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* in mice. **J. of Vet. Med. series B** 39(2) : 81-90. 1992.
- SÓPER, R.S.; WARD, M.G., 1981. **Production, formulation and application of fungi for insect control**, p 161-181 In PAPAVIDAS, G.C., **Biological Control in Crop Production**. Allan Held, Osmun Publishers, Granada, London, Toronto, Sydney. apud MESSIAS, C.L. Fungos, sua utilização para o controle de insetos de importância médica e agrícola. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, RJ,** 84- III : 57 - 59. 1989.
- TANAKA Y.; MURATA ; KATO, H. Behavior of nucleic and chromosomes during ascus development in matting between either rice-strain on weeping Lovegrass-strains and ragi strain of *Pyricularia*. **Ann. Phytopath. Soc. Japan.** 45 : 182-191. 1979. apud PACCOLA-MEIRELLES, L.D. **Variabilidade e recombinação no deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Vuill)**. Piracicaba, 1988 .193 p., Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP.
- TIGANO-MILANI . M.S.; FARIA, M.R.; MARTINS, I.; LECUONA, R.E. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. e *Paecilomyces* sp. em solos de diferentes regiões do Brasil. **An. Soc. Entomol. Brasil** 22(1) :391-393. 1993.
- TONET, G.L.; REIS, E.M., Patogenicidade de *Beauveria bassiana* em insetos pragas da soja. **Pesq. Agropec. Bras.** 14: 89-95. 1979.

- VESELY, D.; KOUBOVA, D. In vitro effect of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (balls-Criv) Vuill. and *B. brongniartii* (Sacc) Petch on phytopathogenic fungi. **Ochrana Rostlin**. 30(2) : 113-120. 1994.
- VILAS BOAS, A.M. Efeito de inseticidas em subdoses sobre o fungo *Beauveria bassiana* e sobre as brocas da cana-de-açúcar. **Arq. Biol. Tecnol.** 34(2):287-302, jun, 1991.
- VILAS BOAS, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES,L.D.; LUNAALVES LIMA,E.A., Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. **Arq. Biol. Tecnol.** 35(4) : 749-761.1992.
- WELLS, J.D.; FUXA, J.R.; HENDERSON, G. Virulence of four fungal pathogens to *Coptotermes formosanus* (Isoptera : Rhinotermitidae). **J. Entomol. Sci.** 30(2) : 208-215. 1995.