

ROSANE YOSHIDA

ESTUDOS GENÉTICOS NO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN

Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Vanessa Kava-Cordeiro

Curitiba
1996

Aos meus queridos e amados pais
Yuzaburo Yoshida e Satiko Yoshida.

OFEREÇO

Aos meus irmãos, Denise, Marly,
Shigueki, Lucy, Takashi e Regina.
Ao Beto.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Seriam inúmeros os agradecimentos a serem feitos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta monografia. Porém quero deixar aqui registrados os meus agradecimentos em especial:

À Prof^a Vanessa Kava-Cordeiro pela orientação, ensino, apoio e amizade durante todo o período de realização deste trabalho. Pelo estímulo dado em muitos momentos preciosos e necessários, resultando nesta monografia.

Às amigas e companheiras de estágio Patrícia Dاوزoto e Maria Fernanda que em muitos momentos auxiliaram e ensinaram.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná na realização da etapa de Microscopia de varredura do fungo.

A todos do Departamento de Genética que propiciaram o estágio na disciplina de estágio I e II em Genética.

A Todos do Laboratório de Citogenética Animal pela atenção dada e empréstimo dos equipamentos.

À grande amiga Tiyomi Nakaba pelo auxílio nos cálculos estatísticos e acima de tudo sua amizade e disposição em qualquer momento.

À Aya Fukui pelo apoio na realização da parte gráfica e sua grande amizade e companheirismo.

Ao Guto pelo empréstimo da máquina fotográfica.

Às grandes amigas Akemi Fukui, Marisa Arakaki e Marici Sugisawa em todo o tempo presentes apoiando e incentivando.

À amiga, colega e companheira de curso Adriana Gomes que durante todos os anos de graduação esteve presente com sua grande amizade.

A Deus, em todo tempo presente me sustentando.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
SUMÁRIO.....	iii
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS.....	iv
LISTA DE FOTOS.....	v
RESUMO.....	vi
1) INTRODUÇÃO.....	1
2) OBJETIVOS.....	10
3) MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1) LINHAGENS.....	11
3.2) MEIOS DE CULTURA.....	15
3.3) SOLUÇÕES.....	16
3.4) PREPARO DE MATERIAL.....	21
3.5) SUSPENSÃO E ESTIMATIVA DE CONCENTRAÇÃO DE CONÍDIOS.....	22
3.6) CURVA DE SOBREVIVÊNCIA À LUZ ULTRAVIOLETA.....	23
3.7) OBTENÇÃO DE MUTANTES.....	24
3.8) ISOLAMENTO DE COLÔNIAS MUTANTES.....	25
3.9) TESTE DE REVERSÃO.....	28
3.10) OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIO.....	28
3.11) OBTENÇÃO DE DIPLÓIDES E RECOMBINANTES HAPLÓIDES.....	29
3.12) COLORAÇÃO DE NÚCLEO.....	30
3.13) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	30
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1) OBTENÇÃO DE MUTANTES.....	32
4.2) TESTE DE REVERSÃO.....	38
4.3) CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS COM DIFERENTES COLORAÇÕES.....	38
4.4) OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIO.....	42
4.5) ANÁLISE DOS RECOMBINANTES.....	43
4.6) OBTENÇÃO DE DIPLÓIDES.....	44
4.7) COLORAÇÃO DE NÚCLEO.....	44
4.8) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	48
5) CONCLUSÃO.....	49
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 1: MUTANTES UTILIZADOS NO TRABALHO.....	11
TABELA 2: MUTANTES OBTIDOS PELA EXPOSIÇÃO DAS LINHAGENS AOS RAIOS ULTRAVIOLETA DURANTE 1 MINUTO.....	32
TABELA 3: FREQUÊNCIA (%) DE OBTENÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS COM 1 MINUTO DE EXPOSIÇÃO À LUZ ULTRAVIOLETA.....	37
TABELA 4: FREQUÊNCIA (%) DE OBTENÇÃO DE MUTANTES MORFOLÓGICO COM 1 MINUTO DE EXPOSIÇÃO À LUZ ULTRAVIOLETA.....	37
TABELA 5: PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA (%) DE CADA LINHAGEM EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO AGENTE MUTAGÊNICO (LUZ ULTRAVIOLETA).....	39
GRÁFICO 1: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DA LINHAGEM VERDE (<u>ARG 3</u>).....	40
GRÁFICO 2: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DA LINHAGEM AMARELA (<u>ARG 3 YLO 1</u>).....	40
GRÁFICO 3: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DA LINHAGEM AMARELA ESCURO (<u>ARG 3 YLO 2</u>).....	41
GRÁFICO 4: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DA LINHAGEM VINHO PÁLIDO (<u>ARG 3 PVI1</u>).....	41

LISTA DE FOTOS

FOTO 1: LINHAGEM RG AMARELO ESCURO.....	12
FOTO 2: LINHAGEM <u>ARG</u> 2.....	12
FOTO 3: LINHAGEM <u>ARG</u> 3.....	13
FOTO 4: LINHAGEM <u>ARG</u> 3 <u>YLO</u> 1.....	13
FOTO 5: LINHAGEM <u>ARG</u> 5.....	14
FOTO 6: LINHAGEM <u>PABA</u> 1 <u>NIC</u> 1 <u>PVI</u> 1.....	14
FOTO 7: VÁRIAS COLÔNIAS AMARELA (RG AMARELO ESCURO) COM UMA COLÔNIA AO CANTO VINHO PÁLIDO.....	33
FOTO 8: LINHAGEM RG AMARELO ESCURO COM SEU MUTANTE MORFOLÓGICO <u>PVI</u> 1	34
FOTO 9: LINHAGEM RG AMARELO ESCURO COM SEU MUTANTE MORFOLÓGICO AMARELO PARDO 1.....	34
FOTO 10: LINHAGEM <u>ARG</u> 3 COM SEU MUTANTE MORFOLÓGICO <u>YLO</u> 2.....	35
FOTO 11: LINHAGEM <u>ARG</u> 3 COM SEU MUTANTE MORFOLÓGICO <u>PVI</u> 1.....	35
FOTO 12: LINHAGEM <u>ARG</u> 3 COM SEU MUTANTE MORFOLÓGICO <u>YLO</u> 3.....	36
FOTO 13: ANASTOMOSE DE HIFAS DO CRUZAMENTO ENTRE AS LINHAGENS <u>PABA</u> 1 <u>NIC</u> 1 <u>PVI</u> 1 E <u>ARG</u> 3 <u>MET</u> 1 <u>YLO</u> 1.....	43
FOTO 14: VÁRIOS CONÍDIOS UNINUCLEADOS E AO CENTRO HIFAS UNINUCLEADAS - LINHAGEM <u>PABA</u> 1 <u>NIC</u> 1 <u>PVI</u> 1	45
FOTO 15: CONÍDIO BINUCLEADO E VÁRIOS CONÍDIOS UNINUCLEADOS - <u>PABA</u> 1 <u>NIC</u> 1 <u>PVI</u> 1.....	45
FOTO 16: CONÍDIO BINUCLEADO E ALGUNS CONÍDIOS GRANDES - HETEROCÁRIO.....	46
FOTO 17: CONÍDIO GRANDE (PROVÁVEL DIPLÓIDE) E ALGUNS UNINUCLEADOS - HETEROCÁRIO.....	46
FOTO 18: CONÍDIÓFORO EM PONTA DE HIFA COM NÚCLEO SE DIVIDINDO.....	47
FOTO 19: CONIDIÓFORO RAMIFICADO COM CONÍDIOS SE FORMANDO NAS PONTAS - HETEROCÁRIO.....	47
FOTO 20: VÁRIOS CONÍDIOS DA LINHAGEM RG AMARELO ESCURO VISTOS POR MICROSCOPIA DE VARREDURA.....	48

RESUMO

Foram obtidas, com o auxílio da luz ultravioleta, 14 linhagens mutantes do fungo *Metarhizium anisopliae*, sendo 9 mutantes para a biossíntese de requisitos nutricionais (mutantes auxotróficos) e 5 mutantes para a coloração de conídios (mutantes morfológicos), todos estáveis pois não apresentaram taxa de reversão das mutações. Mutantes morfológicos obtidos foram comparados com a linhagem de coloração selvagem (verde) quanto a resistência à luz ultravioleta. Pelos resultados obtidos, pode-se reforçar a hipótese de que a pigmentação dos conídios é um fator de resistência à ação da luz ultravioleta, pois a linhagem verde mostrou ser mais resistente. Foram realizados 2 cruzamentos diferentes para a obtenção do heterocáριο. Destes cruzamentos houve a formação de película heterocariótica que foi colocada em meio de cultura mínimo (MM). No heterocáριο, pode-se observar a formação de colônias esverdeadas com conídios relativamente maiores em relação ao dos parentais, indicando a formação de diplóides a partir do heterocáριο. Não foi possível detectar recombinantes diretamente do heterocáριο, não sendo possível a verificação da parameiose.

1) INTRODUÇÃO

O uso intensivo de tradicionais pesticidas químicos no combate a pragas em lavouras pode causar grandes prejuízos às populações que se utilizam de derivados vegetais como fonte de alimento e também a todo o ecossistema. Isto porque, diversas pragas quando expostas durante sucessivas vezes a pesticidas químicos podem ser selecionadas, restando linhagens resistentes que se reproduzem normalmente, tornando o uso destes pesticidas ineficientes. Pode-se citar como exemplo o uso de pesticidas no combate a cupins no Norte da América e em todo o mundo. Os pesticidas deixaram de ser eficientes no combate desta praga porque não causavam mais a morte dos cupins, foram selecionados e tornaram-se resistentes, ou simplesmente os cupins mudavam-se de ambiente (ZOBERI, 1995).

Em decorrência desta problemática, observa-se a necessidade de utilizar métodos naturais para o controle de pragas, como por exemplo, o controle biológico.

Muitos fatores tem contribuído a favor da utilização de microrganismos patógenos para o controle biológico, como a facilidade de produção e aplicação dos mesmos e também pela conscientização dos problemas e riscos que podem advir da utilização indiscriminada de pesticidas químicos em relação à qualidade ambiental e qualidade dos produtos a seres consumidos pela população. Dentre os microrganismos utilizados para o controle biológico, destaca-se o fungo *Metarhizium anisopliae*.

No Brasil, os primeiros resultados favoráveis à utilização de *M. anisopliae* como controle biológico, datam dos anos 70, quando Pietro Guagliumi, juntamente com um grupo liderado pela Dra. Maria de Lourdes Aquino, iniciaram sua utilização para o controle de cigarrinha da folha de cana de açúcar no Estado de Pernambuco. Com a aplicação de uma mistura fúngica que

continha o micélio, conídio e parte do substrato conseguiram resultados excelentes que foram sendo divulgados, iniciando-se, nos demais Estados mais ao sul, sua utilização numa tentativa de controle de *Mahanarva posticata*, uma cigarrinha que causa grandes prejuízos nas plantações de cana no nordeste do Brasil (MESSIAS, 1989).

Este fungo também apresenta bom potencial para o controle de muitas outras espécies insetos (ALVES, 1986), como: *Chalcodermus aneus* (= *C. bimaculatus*), manhoso (LORD, 1986; QUINTELA et al., 1989; BAGALHI, 1987); *Anthonomus grandis*, bicudo do algodão (JARAMILLO & ALVES, não publicado, em ALVES, 1986); *Hypothenemus hampei*, broca-do-café (LECUONA et al., 1986); formiga do gênero *Atta* (ALVES & SOSA GÓMEZ, 1983); *Atta sexdens piriventris*, formiga saúva (DIEHLFLEIG et al., 1988), *Heliothis armigera* (GOPALAKRISHNAN & NARAYANAN, 1988, 1989); *rubriceps*, praga de cana-de-açúcar (SAMUELS et al., 1989b); *Antitrogus parvulus*, praga de cana-de-açúcar (SAMUELS et al., 1990); *Manduca sexta*, praga do tabaco (SAMUELS et al., 1988; HASSAN et al., 1989); *Nilaparvata lugens* (SAMUELS et al., 1989a); *Ceratitis capitata*, mosca-de-frutas (GARCIA et al., 1985, 1989); *Otiorhynchus sulcatus*, inseto praga de plantas ornamentais como azaléia, begônia e gerânio (REINECKE et al., 1990), gafanhotos (GOETHEL et al., 1995), entre outros.

Sua patogenicidade também já foi comprovada em insetos de interesse médico como: *Rhodnius prolixus* (SILVA & MESSIAS, 1986); *Triatoma infestans* (SILVA et al., 1989); os vetores da doença de Chagas em geral (RANGEL et al., 1989); *Glossina morsitans morsitans*, mosca tsé-tsé (KAAYA, 1989; KAAYA & OKECHI, 1990); os mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles stephens* (PATEL et al., 1990).

O *M. anisopliae* é enquadrado na categoria de parasita facultativo pois tem a capacidade de desenvolver-se em ambientes naturais mesmo na ausência de seus hospedeiros (FARGUES & REMAUDIERE, 1977).

Pertencente à subdivisão Deuteromycotina, ordem Moniliales, família Moniliaceae, foi descrito pela primeira vez por Metschnikoff em 1879, na Rússia,

parasitando larvas de *Anisopliae austriaca*, sendo então denominado *Entomophthora anisopliae*. Em 1883, Sorokin o classifica como *Metarhizium anisopliae* e, apesar de ter recebido outras denominações até o final da década de 60, este foi o nome definitivo adotado para o fungo. Técnicas moleculares avançadas tem sido utilizadas para melhor classificar e caracterizar este microrganismo devido ao aumento de seu uso no controle biológico. Técnicas de DNA “finger-printing” tem sido utilizadas para auxiliar na identificação da propriedade de controle biológico das raças e na correlação particular do genótipo pela marca no DNA com a patogenicidade particular do grupo (SAMSON, 1994).

O gênero *Metarhizium* compreende 2 espécies: *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, sendo que a primeira apresenta 2 variedades: variedade *anisopliae* com conídios entre 3,5-9,0 µm de comprimento e a variedade *major* com conídios entre 9,0-18,0 µm de comprimento (TULLOCH, 1976).

Os conídios apresentam coloração esverdeada, são cilíndricos com as pontas arredondadas e freqüentemente mais estreitos no meio. São formados a partir de conidióforos originados diretamente das hifas hialinas e são geralmente uninucleados (TINLINE, 1971), com pequena proporção de binucleados (MESSIAS & AZEVEDO, 1980) ou mesmo multinucleados em algumas linhagens (LUNA, 1985).

As hifas são freqüentemente uninucleadas em seus segmentos, podendo ocorrer 2 ou mais núcleos, sendo que estes segmentos multinucleados geralmente aparecem em pontas de hifas (LUNA, 1985).

A existência de células hifais com mais de um núcleo e anastomoses comuns entre esporos, tubos germinativos e hifas, propiciam a obtenção de heterocários, apesar da dificuldade em perpetuar esta condição, devido aos conidióforos uninucleados que dificultam a transmissão desta condição heterocariótica aos conídios (TINLINE & NOVIELLO, 1971).

O fungo *M. anisopliae* apresenta crescimento ótimo em temperaturas entre 25°C e 30°C e tem seu crescimento prejudicado acima de 30°C ou abaixo de 7°C (VILACORTA, 1978). Segundo ALVES & NOGUEIRA (1984) em temperaturas

abaixo de 16°C e acima de 36°C a germinação dos conídios é nula, havendo perda de viabilidade após exposição a 40°C por 24 horas. A rapidez no desenvolvimento do micélio e a conseqüente rapidez na evolução da infecção dependem da temperatura sendo que FERRON (1978), considera entre 27°C e 28°C a melhor temperatura de desenvolvimento para este fungo.

M. anisopliae suporta uma variação de pH de 2,0 a 8,5, sendo que 6,9 é a melhor condição para crescimento e esporulação (VEEN, 1968).

É um microrganismo pouco exigente em relação à fonte nutritiva, desenvolvendo-se em diversos meios de cultura.

Parece existir correlação positiva entre a presença de luz e a produção de esporos. SANTOS (1978) manteve culturas de *M. anisopliae* em condições de escuro total ou com luz alternada, notando que as culturas submetidas à condições de ausência total de luz apresentavam grande dificuldade na produção de esporos.

Na fase parasitária, após a germinação dos conídios, *M. anisopliae* desenvolve estruturas denominadas apressórios (FERRON, 1978) e produz algumas exoenzimas responsáveis pela degradação da cutícula do inseto que, com o auxílio mecânico dos apressórios, permitem a penetração do fungo no interior do inseto (ST. LEGER et al., 1991a). Após a penetração, este geralmente assume formas leveduriformes denominadas blastósporos que se espalham rapidamente por vários tecidos do hospedeiro. O crescimento de micélio no interior do inseto e as toxinas produzidas pelo fungo são os responsáveis pela morte do inseto, mas, esta geralmente não ocorre antes que este inseto esteja recoberto por conídios, disseminando a infecção (ST. LEGER et al., 1991b).

É possível induzir a formação de apressórios *in vitro*, colocando-se uma estrutura rígida e preferencialmente hidrofóbica em contato com os tubos germinativos (ST. LEGER et al., 1989). Os blastósporos também podem ser produzidos em laboratório em meios de cultura líquidos. O aumento da concentração de açúcar em meio de cultura, favorece a formação de blastósporos (HUMPHREYS et al., 1989).

Tem se notado a grande variabilidade existente entre linhagens de *Metarhizium anisopliae* em diferentes regiões do Brasil, diferenciando-se pela maior produção de esporos, maior virulência e maior resistência à luz ultravioleta (PAMPHILE, 1992). Vários parâmetros têm sido utilizados para a caracterização destas linhagens, como estudos comparativos da morfologia e fisiologia das mesmas (ALVES et al., 1986; AGUIAR, 1991) e através de técnicas eletroforéticas (DE CONTI et al., 1980; COSTA, 1989; VALADARES, 1989; PAMPHILE, 1992).

Recentemente começaram a surgir os primeiros resultados de estudos da genética molecular de *M. anisopliae*, como a transformação de linhagens para a resistência ao fungicida benomyl (GOETTEL et al., 1990; BERNIER et al., 1989a) sendo que este sistema básico de transformação poderá ser utilizado para outros genes, a clonagem de genes envolvidos na virulência do fungo (BERNIER et al., 1989b), o estudo de linhagens por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (PIPE et al., 1989), a obtenção de cariótipos eletroforéticos de linhagens através de PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) (KAVA-CORDEIRO et al., 1993) e estudos de padrões polimórficos por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (FUNGARO et al., 1994).

Até hoje não se utiliza todo potencial entomopatogênico do *M. anisopliae*, em parte porque pouco se sabe sobre sua genética e também por este apresentar a desvantagem de não possuir o ciclo sexual, fator que limita os trabalhos clássicos de melhoramento genético.

Com a descoberta do ciclo parassexual em 1952 por PONTECORVO & ROPER no fungo *Aspergillus nidulans* e posteriormente em outros fungos, várias barreiras para o estudo genético de fungos que não apresentavam ciclo sexual foram superadas.

Para a Genética, o ciclo parassexual em fungos constitui um poderoso sistema de análise genética, permitindo o mapeamento de genes nos diferentes grupos de ligação, o mapeamento dos centrômeros, uma análise mais detalhada da permuta mitótica e do processo de haploidização e, principalmente abre a

possibilidade de um estudo genético em fungos imperfeitos, estudo este que só pode ser feito depois da descoberta do ciclo parassexual (AZEVEDO, 1972).

O ciclo parassexual caracteriza-se por apresentar uma fase diplóide, geralmente bastante estável, que surge pela anastomose de hifas com núcleos haplóides diferentes, seguida de fusão nuclear. A anastomose de hifas ocorre quando hifas de indivíduos diferentes fusionam-se originando uma hifa com núcleos diferentes (heterocário). Estes núcleos podem sofrer fusão, originando um núcleo diplóide. Este diplóide pode persistir por várias divisões mitóticas. Neste estágio pode ocorrer recombinação e a haploidização ocorre devido a não disjunção através da aneuploidia (PONTECORVO, 1956).

Do ponto de vista aplicado, o ciclo parassexual possibilitou o melhoramento genético em fungos economicamente importantes e que não apresentam ciclo sexual (SERMONTI, 1969; MESSIAS, 1979; BONATELLI JR., 1981) e também permitiu explicar o aparecimento de novas raças fisiológicas em fungos fitopatogênicos (BUXTON, 1956, 1962; AZEVEDO, 1976).

Para o *Metarhizium anisopliae*, o primeiro passo para o ciclo parassexual, a heterocariose, foi demonstrado por TINLINE & NOVIELLO (1971), mas, o ciclo parassexual completo, com a obtenção de diplóides e segregantes foi demonstrado por MESSIAS (1979), AL-AIDROOS (1980) e MESSIAS & AZEVEDO (1980). Os autores trabalharam com marcas para resistência (AL-AIDROOS, 1980) e marcas para coloração dos conídios e auxotrofia (MESSIAS & AZEVEDO, 1980; AL-AIDROOS, 1980).

Segundo MESSIAS & AZEVEDO (1980) o tamanho dos conídios haplóides e diplóides não difere significativamente, porém, o diâmetro do núcleo dos conídios diplóides é maior do que o diâmetro do núcleo dos conídios haplóides e a quantidade de DNA nos conídios diplóides é, em média, 1,8 vezes maior do que nos conídios haplóides. Também não foram encontrados conídios diplóides com mais de um núcleo, ou seja, eles eram sempre uninucleados.

Já BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982) encontraram diferença significativa entre o tamanho dos conídios haplóides e diplóides. O tamanho dos

conídios diplóides era significativamente maior e foi utilizado como parâmetro na identificação dos diplóides.

MAGOON & MESSING-AL-AIDROOS (1984) definiram 4 critérios que podem ser utilizados na determinação da ploidia dos recombinantes resultantes do ciclo parassexual: diâmetro do conídio, diâmetro do núcleo do conídio, estabilidade da colônia em presença de benlate e morfologia da colônia.

MAGOON & MESSING-AL-AIDROOS (1986) propuseram a existência de 2 vias metabólicas para a biossíntese da pigmentação dos conídios. Pela análise dos segregantes obtidos no ciclo parassexual, fizeram o mapeamento de mais 2 marcas genéticas nos 5 grupos de ligação propostos por BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982).

LUNA & AZEVEDO (1985) utilizando 2 linhagens (A4 e E6) de *M. anisopliae* com características morfológicas divergentes e com marcas auxotróficas complementares obtiveram, pelo ciclo parassexual, possíveis diplóides que apresentavam um volume nuclear maior que as linhagens parentais e que mantinham a capacidade de atacar insetos.

Outros autores (SILVEIRA, 1983; FRIGO, 1983; SILVEIRA & AZEVEDO, 1987; PAMPHILE, 1992) relataram a dificuldade e até a impossibilidade de obtenção de heterocários entre linhagens diferentes e também entre alguns mutantes originados da mesma linhagem. Com a utilização da metodologia de fusão de protoplastos para esta espécie, algumas dificuldades da obtenção de heterocários foram superadas (SILVEIRA, 1983; SILVEIRA & AZEVEDO, 1987). FRIGO (1983) utilizou uma variação desta técnica, denominada técnica do "doador morto" (FERENCZY, 1981; HOPWOOD & WRIGHT, 1981) que mostrou ser efetiva na obtenção de diplóides e segregantes entre linhagens distintas.

Outro processo de recombinação detectado em *M. anisopliae* é a parameiose. Este termo foi proposto por BONATELLI JR. et al. (1983) para designar um certo tipo de instabilidade dos núcleos diplóides heterozigotos que, após alta taxa de recombinação, sofrem haploidização nas hifas heterocarióticas, guardando semelhança com o processo meiótico.

Evidências da ocorrência da paramiose podem ser observadas em diversos outros trabalhos descritos na literatura. Observa-se, no entanto, que a detecção dos recombinantes haplóides no heterocário nem sempre é precisa, sendo muito confundida pelos autores como sendo "diplóides" (que não segregam) ou como parentais auxotróficos revertentes (BAGALHI, 1987).

BERGERON & MESSING-AL-AIDROOS (1982) obtiveram recombinantes haplóides diretamente do heterocário, evidenciando a alta instabilidade dos diplóides.

SILVEIRA & AZEVEDO (1987) interpretam a alta instabilidade de produtos de fusão com base no processo da paramiose. Este processo também foi verificado por BAGALHI (1987) e estudado com maior profundidade por BAGAGLI et al. (1991).

A descoberta do processo da paramiose em *M. anisopliae* ampliou as possibilidades de melhoramento genético neste fungo possibilitando a obtenção de linhagens que combinem características favoráveis dos pais para o controle biológico (AZEVEDO, 1989), tornando-os cada vez mais eficazes no controle de pragas em locais com características distintas.

Para a indução do ciclo parassexual em laboratório e para uma possível verificação do processo paramiótico, é necessário induzir mutações, pois através da obtenção de mutantes é possível investigar estes dois processos e assim, contribuir para futuros trabalhos de melhoramento genético neste fungo.

Vários agentes mutagênicos tem sido utilizados na obtenção de mutantes em fungos, e eles se dividem basicamente em 2 tipos: mutagênicos físicos e mutagênicos químicos.

Dentre os mutagênicos físicos, os mais utilizados são a luz ultravioleta (TINLINE & NOVIELLO, 1971; MESSIAS & AZEVEDO, 1980; MAGOON & MESSING-AL-AIDROOS, 1986; MESSIAS et al., 1986; SILVEIRA & AZEVEDO, 1987; GOLDMAN, 1988; PACCOLA-MEIRELLES, 1988; BAGAGLI et al., 1991; KAVA-CORDEIRO, 1993) e entre as radiações ionizantes, o raio gama

(GOLDMAN, 1988; PACCOLA-MEIRELLES, 1988; PIMENTEL, 1991; KAVA-CORDEIRO, 1993).

Dentre os mutagênicos químicos mais utilizados estão o DES (Dietilsulfato) (GOLDMAN, 1988; PIMENTEL, 1991), o EMS (Etilmetanosulfonado) (AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978; MAGOON & MESSING-AL--AIDROOS, 1986) e o ácido nitroso (SIDDIQI, 1962; AZEVEDO, 1970; GOLDMAN, 1988; PACCOLA-MEIRELLES, 1988; KAVA-CORDEIRO, 1993).

Para o presente trabalho será utilizado a luz ultravioleta como agente mutagênico, por esta apresentar várias facilidades de manuseio e disponibilidade no laboratório, além de sua comprovada eficácia na obtenção de mutantes para este fungo (KAVA-CORDEIRO et al., 1995). A luz ultravioleta, uma radiação não ionizante, dissipa sua energia para os átomos que encontra, elevando os elétrons de orbitais exteriores para níveis de alta energia, um estado referido como excitação. As moléculas contendo átomos na forma iônica ou no estado de excitação são quimicamente mais reativas do que as que contêm átomos no seu estado estável normal. A reatividade aumentada dos átomos presentes nas moléculas de DNA é a base dos efeitos mutagênicos da luz ultravioleta causando principalmente a troca de bases do DNA. A luz ultravioleta é absorvida principalmente pelas bases púricas e pirimídicas (mais ativamente em 254 nm), obtendo como principal produto da absorção de UV os hidratos de pirimidinas e os dímeros de pirimidinas, sendo os dímeros de pirimidinas (principalmente dímeros de timina) o principal efeito mutagênico deste agente, pois causa, aparentemente, alteração da dupla hélice de DNA, interferindo na replicação precisa do DNA (GARDNER ; SNUSTAD, 1986).

Segundo BURNETT (1975), o processo de indução de mutação é reconhecidamente um dos mais utilizados no melhoramento microbiano, e geralmente, é verificado que um efetivo rendimento na obtenção de mutantes é somente conseguido quando a proporção de sobreviventes do material exposto ao agente mutagênico é muito baixa, entre 1 a 5% ou até menor.

2) OBJETIVOS

Este trabalho possui como objetivo principal contribuir para o estudo genético do fungo *Metarhizium anisopliae*, importante agente de controle biológico e, como objetivos específicos:

- obter mutantes morfológicos e auxotróficos de *M. anisopliae*,
- induzir o ciclo parassexual,
- detectar recombinantes a partir do heterocário, evidenciando a parameiose,
- analisar recombinantes obtidos a partir dos diplóides do ciclo parassexual,
- determinar parâmetros mais seguros para identificação de diplóides.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) LINHAGENS:

A linhagem selvagem do fungo *M. anisopliae* (denominada AL), utilizada neste trabalho foi inicialmente cedida pelo laboratório de Genética de Microrganismos, ESALQ/USP. Foi coletada no Estado de Alagoas, parasitando insetos da espécie *Deois flavopicta* (Ordem Homóptera). Os mutantes desta linhagem utilizados neste trabalho foram obtidos por KAVA-CORDEIRO (1993). Estes são listados na tabela 1.

TABELA 1: MUTANTES UTILIZADOS NO TRABALHO

Linhagem	Caracterização morfológica
RG amarelo escuro	Amarelo escuro (mutante morfológico)
<u>arg</u> 2	Verde (selvagem)
<u>arg</u> 3	Verde (selvagem)
<u>arg</u> 3 <u>ylo</u> 1	Amarela (mutante morfológico)
<u>arg</u> 5	Verde (selvagem)
<u>pab</u> 1 <u>nic</u> 1 <u>pvi</u>	Vinho pálido (mutante morfológico)

Sendo os mutantes “arg” deficientes na biossíntese de arginina, “paba” deficiente para ácido *p*-aminobenzóico, “nic” para ácido nicotínico; Os mutantes morfológicos “ylo” apresentam conídios de coloração amarela os “pvi” apresentam conídios de coloração vinho pálido e “RG am. esc.” conídios de coloração amarelo escuro.

Estas linhagens são mostradas a seguir por fotos:

FOTO 1: LINHAGEM RG AMARELO ESCURO

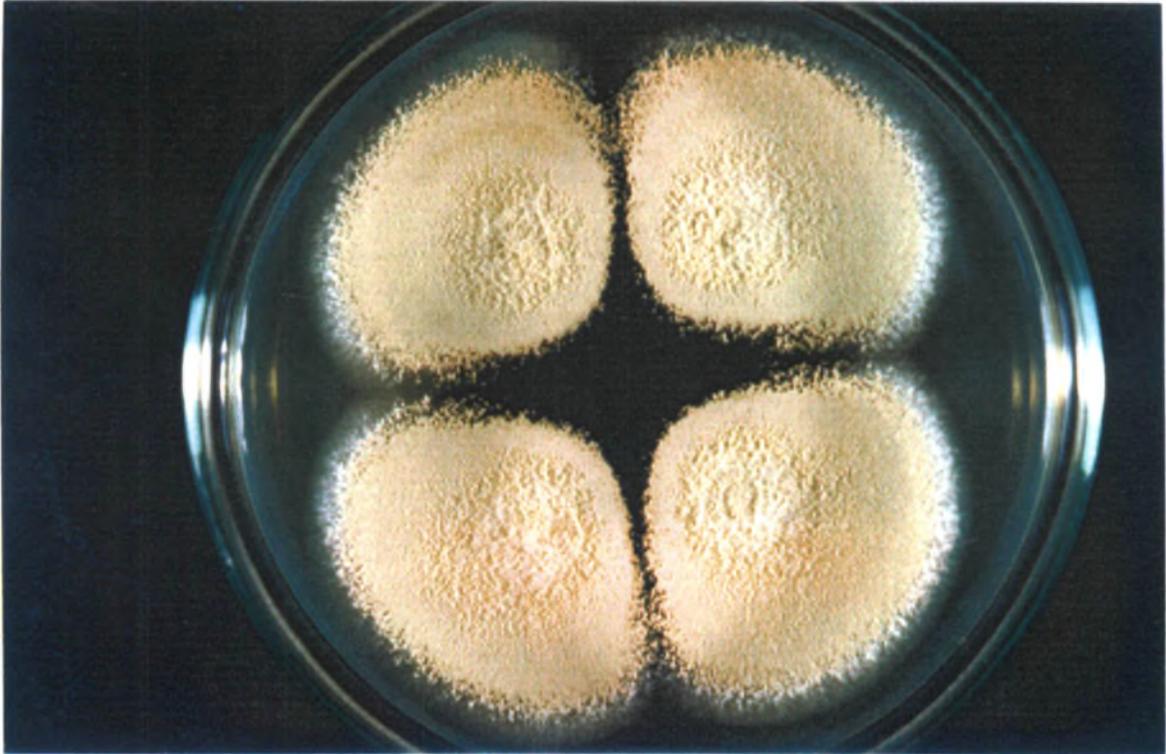


FOTO 2: LINHAGEM ARG 2



FOTO 3: LINHAGEM ARG 3

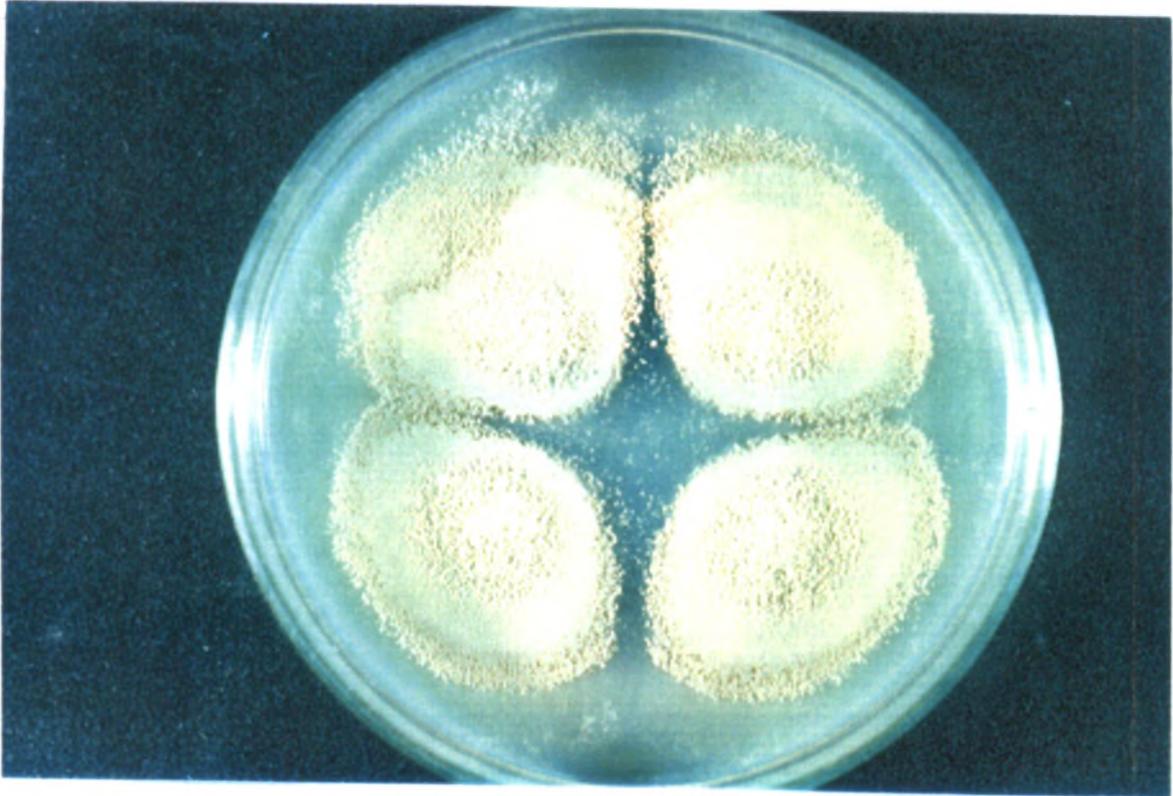


FOTO 4: LINHAGEM ARG 3 YLO 1



FOTO 5: LINHAGEM ARG 5

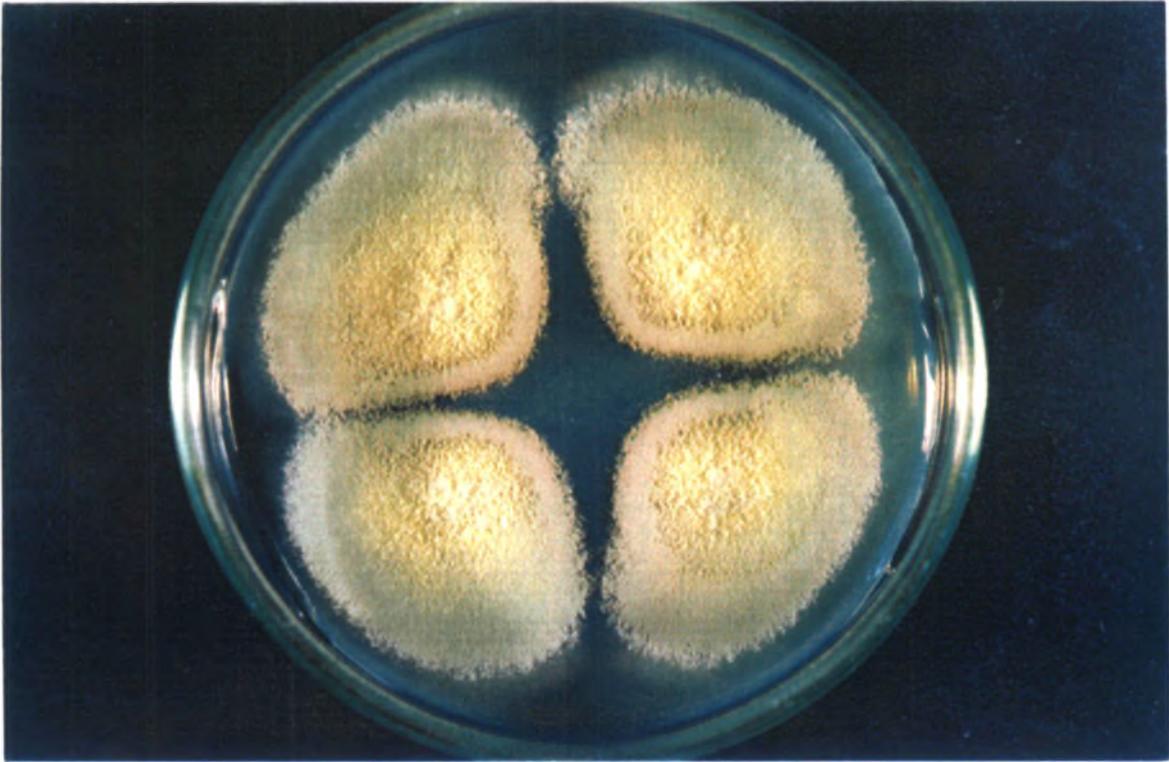
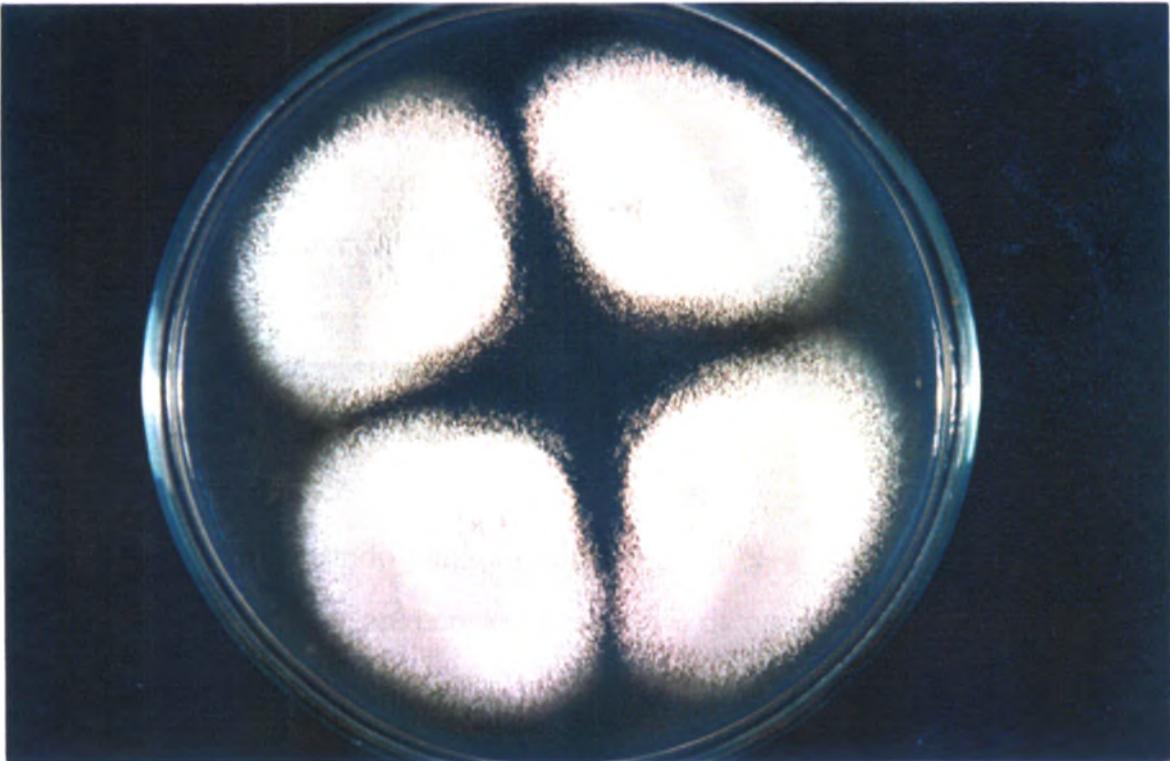


FOTO 6: LINHAGEM PABA 1 NIC 1 PVI 1



3.2) MEIOS DE CULTURA:

3.2.1) Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO *et al.*, 1953)

- NaNO ₃	6,0 g
- KH ₂ PO ₄	1,5 g
- MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
- FeSO ₄	0,02 g
- ZnSO ₄	0,02 g
- Glicose	10,0 g
- Água destilada	p/ 1000 ml

O pH será ajustado para 6,8 com NaOH 1 N.

Para MM sólido será acrescentado 1,5% de ágar DIFCO.

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

Meio Mínimo adicionado de:

- Extrato de levedura	2,0 g
- Peptona	2,0 g
- Caseína hidrolisada	1,5 g
- Solução de vitaminas	1,0 ml

O pH será ajustado para 6,8 com NaOH 1 N.

Para MC sólido será acrescentado 1,5% de ágar bacteriológico.

3.3) SOLUÇÕES:

3.3.1) Solução de Vitaminas

Ácido Nicotínico	100,0 mg
Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico	0,2 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg
H ₂ O destilada esterilizada	p/100 ml

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

3.3.2) Solução de Aminoácidos

- Caseína hidrolisada	0,1 g
- H ₂ O destilada esterilizada	p/ 10 ml

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

3.3.3) Solução salina

- NaCl 0,85% (p/v) em H₂O destilada.
- Alíquotas de 9,0 ml foram colocadas em frascos, autoclavadas e mantidas a 4°C.

3.3.4) Solução de "Tween 80"

- "Tween 80" 0,1% (v/v) em H₂O destilada.
- Alíquotas de 2,5 ml foram colocadas em tubos de ensaio, autoclavadas e mantidas a 4°C.

3.3.5) Suplementos nutricionais adicionados ao MM

Aminoácidos	SOLUÇÃO ESTOQUE
- Prolina	10 mg/ml (p/v)
- Metionina	"
- Leucina	"
- Histidina	"
- Glutamina	"
- Asparagina	"
- Ácido Glutâmico	"
- Treonina	"
- Ácido Aspártico	"
- Lisina	"
- Valina	"
- Serina	"

- Glicina	"
- Isoleucina	"
- Cistina	"
- Tirosina	"
- Fenilalanina	"
- Triptofano	"
- Arginina	"
- Cisteína	"

Vitaminas	SOLUÇÃO ESTOQUE
- Ácido <i>p</i> -Aminobenzóico	0,05 mg/ml
- Biotina	0,04 mg/ml
- Ácido Nicotínico	0,1 mg/ml
- Riboflavina	0,1 mg/ml
- Piridoxina	0,05 mg/ml
- Tiamina	0,05 mg/ml

Ácido nucléico	SOLUÇÃO ESTOQUE
- Adenina	5 mg/ml

Os estoques dos suplemento foram preparados em frascos contendo 10 ml de H₂O destilada esterilizada que foram posteriormente aquecidos em banho-maria (98°C) por 15 minutos e mantidos a 4°C. Os estoques de vitaminas foram conservados em frascos escuros.

No momento do uso, foi acrescentado 0,1 ml da solução do suplemento necessário para 20 ml de meio de cultura em placa de Petri.

3.3.6) Albumina 50% (TANAKA *et alii* 1979)

Todo o volume da clara de um ovo foi colocado em um Becker e picotado com tesoura pequena por cerca de 1 hora, vagarosamente sem deixar formar espumas. Filtrou-se em papel filtro (o processo é lento, cerca de 3 horas). Ao volume filtrado, adicionou-se igual volume de glicerina (1:1). A solução foi guardada sob refrigeração a 4°C, adicionando-se uma pequena porção de cânfora para ajudar na preservação.

3.3.7) HCl 1N

- HCl concentrado 82,50 ml
- Água destilada p/1000 ml

A solução foi conservada à temperatura ambiente.

3.3.8) Tampão fosfato pH 6,9 (0,2M)

* Solução A - Fosfato de Sódio Dibásico

- NaH₂PO₄ 24,0 g
- H₂O destilada p/1000 ml

* Solução B - Fosfato de Sódio Monobásico

- Na₂HPO₄ 28,4 g
- H₂O destilada p/1000 ml

As soluções A e B foram conservadas em refrigerador a 4 °C.

Misturar no momento do uso:

- 45 ml da solução A;
- 55 ml da solução B.

* Cuidando para pH 6,9.

3.3.9) Solução de Giemsa

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

Misturou-se o Giemsa com Glicerina a 60 °C. Após resfriamento, foi adicionado o metanol. Filtrou-se e a solução corante foi armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente.

3.3.10) Solução Karnowsky

- | | |
|------------------------------------|---------|
| - Glutaraldeído 25% | 0,8 ml |
| - Paraformaldeído 8% | 5 ml |
| - CaCl ₂ | 0,5 ml |
| - H ₂ O destilada | p/10 ml |

Completar com 3,7 ml de Tampão Cacodilato de Sódio 0,2 M.

3.3.11) Tampão Cacodilato de Sódio pH 6,9

* Solução A

- Cacodilato de Sódio 0,2 M
- H₂O destilada p/ 100 ml

* Solução B

- HCl 0,2 M

Colocar a solução A e acertar o pH com a solução B de HCl gota a gota.

3.4) PREPARO DE MATERIAL

- Esterilização:

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera por 20 minutos.

Vidrarias e palitos de transferência foram esterilizados em forno Pasteur a 180°C por 4 horas.

- Incubação:

Placas foram incubadas a 28°C para o crescimento do fungo em estufa tipo BOD com luz ininterrupta por 8 dias.

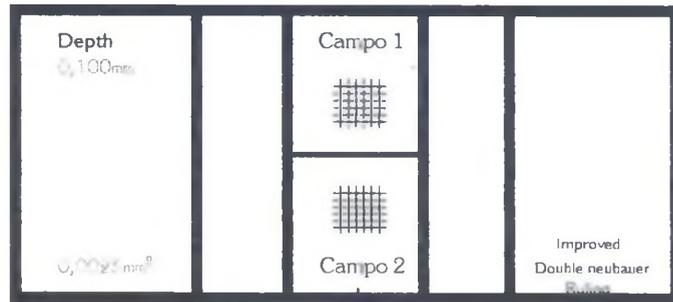
3.5) SUSPENSÃO E ESTIMATIVA DE CONCENTRAÇÃO DE CONÍDIOS

Uma pequena amostra de esporos de uma colônia, semeada em MC por 8 dias de incubação, foi coletada com o auxílio de uma alça de platina. Esta amostra foi colocada em solução "Tween 80" 0,1% e agitada com o agitador de tubos. A solução de Tween é uma espécie de detergente capaz de fazer com que os esporos separem-se um do outro para que se possa fazer uma posterior contagem dos mesmos.

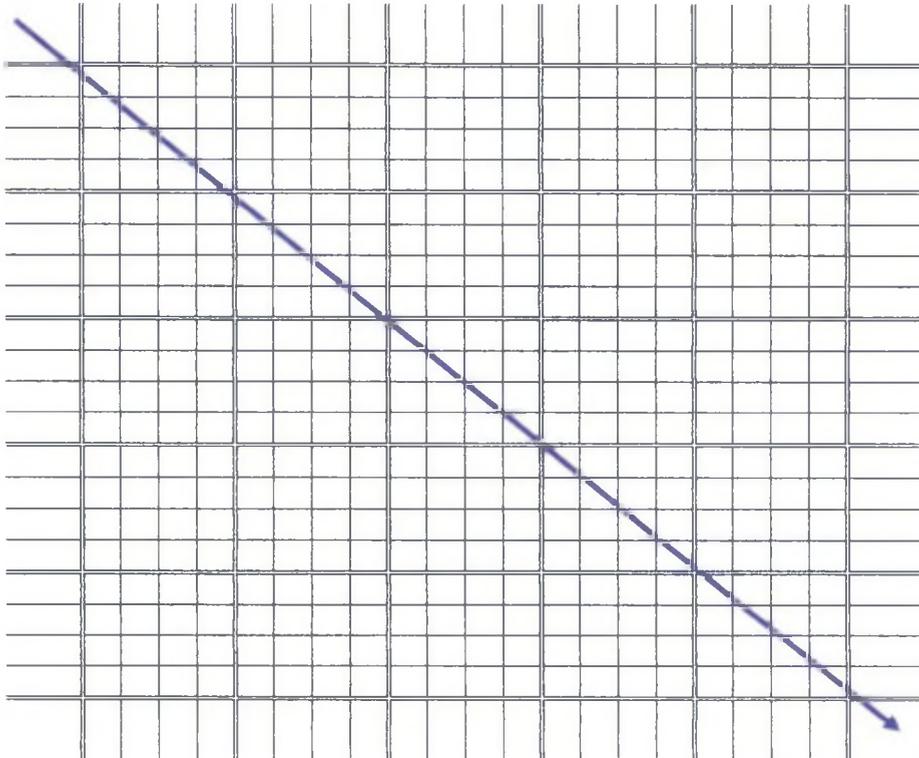
Depois de agitada foi estimada a concentração de esporos na suspensão de esporos com o auxílio da câmara de Neubauer. A estimativa do número de esporos é feita através da contagem dos esporos na Câmara de Neubauer. Esta contagem pode proceder de várias formas, e neste caso foi feita como descrito abaixo:

Foram contados os esporos dos 5 quadrículos da diagonal de cada campo, multiplicados por 5 e depois por 10^4 para obter a concentração de esporos/ml.

CÂMARA DE NEUBAUER



Sentido da contagem dos conídios



3.6) CURVA DE SOBREVIVÊNCIA À LUZ ULTRAVIOLETA

Foram testadas 4 linhagens de *M. anisopliae* com diferentes marcas morfológicas. Estas linhagens foram deixadas em diferentes tempos de

exposição à luz ultravioleta para verificar se havia diferença na taxa de sobrevivência entre elas.

As linhagens testadas foram: arg 3 (verde), arg 3 ylo 1 (amarela), arg 3 pvi 1 (vinho pálido), arg 3 ylo 2 (amarelo escuro).

Foram utilizados os seguintes tempos de exposição à luz ultravioleta: em tempo 0 (controle), 1 minuto, 2 minutos e 4 minutos.

3.7) OBTENÇÃO DE MUTANTES

Suspensões de conídios com concentrações estimadas obtidas como descrito anteriormente, foram diluídas em solução salina (diluição 1:10) (solução mãe), sendo esta solução, utilizada para o tratamento com luz ultravioleta.

O controle foi feito a partir da solução mãe que foi diluída convenientemente (para proporcionar de 20 a 100 colônias/placa) e plaqueada em MC. O restante da solução mãe foi vertida em placa de Petri esterilizada sem meio de cultura e esta exposta à luz ultravioleta durante 1 minuto (neste tempo a placa foi mantida aberta). As condições de irradiação eram em ambiente com fonte luminosa amarela, além da luz proporcionada pela lamparina utilizada para manter a assepsia.

A solução foi diluída e semeada em placa de Petri contendo MC. Como o tempo é cumulativo, a solução mãe foi irradiada mais 1 minuto, diluída e plaqueada em MC. O mesmo procedimento foi adotado para o tempo de 4 minutos.

Todas as placas semeadas foram guardadas em recipiente metálico (ambiente escuro), e colocadas em estufa a 28°C por 24 horas. Foram colocadas na ausência de luz para evitar que houvesse o processo de reversão de prováveis mutações obtidas (fotorreativação). A fotorreativação envolve uma

enzima que retira diretamente os dímeros de timina (principal mutação causada pela luz UV), sem a remoção de qualquer nucleotídeo. Essa enzima liga-se aos dímeros de timina no DNA, no escuro, mas não cataliza as pontes que ligam as moléculas de timina sem energia derivada da luz visível (GARDNER, SNUSTAD, 1986).

3.8) ISOLAMENTO DE COLÔNIAS MUTANTES

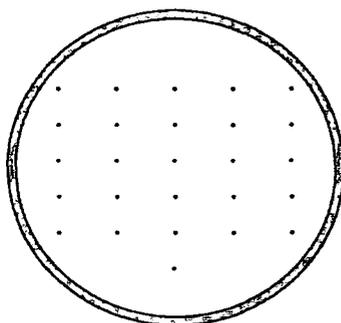
3.8.1) Isolamento de mutantes morfológicos:

O isolamento de mutantes morfológicos foi feito por inspeção visual, por comparação da morfologia da colônia original com as colônias crescidas, nas placas de MC onde foram semeados os conídios expostos à Luz UV.

3.8.2) Isolamento de mutantes auxotróficos:

O isolamento de mutantes auxotróficos foi feito pelo método descrito por PONTECORVO *et al.*, 1953.

Conídios foram retirados das colônias sobreviventes ao agente mutagênico e transferidos com o auxílio de palitos previamente esterilizados em forno Pasteur a 180°C, para placas contendo MM na distribuição de 5x5+1 (AZEVEDO & COSTA, 1973), como mostrado na figura abaixo.



Quando a linhagem irradiada já possuía uma deficiência auxotrófica, o requisito nutricional foi adicionado ao MM, para todos os ensaios necessários. No caso de 2 deficiências auxotróficas, o mesmo procedimento foi utilizado.

Após 48 horas de incubação, as colônias que não cresceram foram consideradas mutantes auxotróficos.

O ponto de repique onde não houve crescimento foi recortado e transferido para MC e após incubação à 28°C por 8 dias, os conídios obtidos foram utilizados em ensaios para detectar qual deficiência nutritiva poderiam ter.

Os mutantes foram repicados em:

- MM (controle);
- MM+solução de vitaminas;
- MM+solução de aminoácidos;
- MM+ácido nucléico (ade)*

Todas as placas foram colocadas em estufa para crescimento dos mutantes por 48 horas. O crescimento ou não dos mutantes em uma das placas e não em MM, indicaria portanto a deficiência destes, se para aminoácidos, para vitaminas ou para o ácido nucléico adenina*, que era o único ácido nucléico disponível no laboratório.

***OBS:** A deficiência na via metabólica para as bases pirimídicas no fungo *M. anisopliae* é letal, pois as bases pirimídicas quando não produzidas pelo fungo, mesmo que sejam adicionadas ao meio de cultura, não são absorvidas pelas células (KAVA-CORDEIRO et al., 1995). Desta forma só pode haver deficiência para adenina ou para guanina, caso contrário, se deficiente para a produção de citosina ou timina, o fungo não sobrevive.

Depois de incubado por 48 horas foi possível identificar em que placa cresceu e identificar especificamente para qual nutriente o mutante é deficiente.

- Quando deficiente para **aminoácidos**, foram utilizadas 6 placas colocando os 20 aminoácidos em combinações para evitar desperdícios e facilitar o teste. Foi feita a 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 5 por exemplo, o mutante seria para o aminoácido Asparagina (Asn), se o crescimento fosse verificado nas placas 1 e 3 seria para Treonina (Thr), pois são nestas placas que se repete este aminoácido, da mesma forma, se crescesse nas placas 2 e 6, a mutação seria para Valina, pois é o aminoácido que se repete nestas placas e assim sucessivamente.

- Quando deficiente para **vitaminas**, foi feito o teste para cada uma das seis vitaminas para identificar especificamente qual vitamina o mutante não consegue produzir. Foram feitas combinações como no procedimento para aminoácidos, resultando nas seguintes combinações:

- 1 - MM+biotina+riboflavina+piridoxina
- 2 - MM+ácido ρ -Aminobenzóico+riboflavina+tiamina
- 3 - MM+ácido nicotínico+piridoxina+tiamina

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

- Quando deficiente para **ácidos nucléicos**, como o laboratório só dispunha do ácido nucléico adenina somente este foi testado. Porém, como o

fungo *M. anisopliae* só pode ser deficiente para 2 ácidos nucleicos, se não cresceu em MM+Adenina, pode-se sugerir que a deficiência está na produção de Guanina, porém para a confirmação seria indispensável o teste.

Os mutantes auxotróficos identificados foram testados novamente (MM+nutriente) para confirmação.

As linhagens mutantes obtidas foram repicadas e guardadas em tubo de ensaio com MC inclinado, em refrigerador.

3.9) TESTE DE REVERSÃO:

Todas as linhagens mutantes utilizadas e obtidas no trabalho foram ensaiadas quanto a reversão das marcas nutricionais. Para isso, suspensões com concentrações de 10^7 conídios por ml obtidas de colônias de mutantes auxotróficos foram semeadas em MM, MM + 1º suplemento e MM + 2º suplemento e MM + os 2 suplementos no caso de mutantes auxotróficos duplos. O crescimento (ausência ou presença) foi verificado após 96 horas de incubação.

3.10) OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIO

- Método 1 (MESSIAS e AZEVEDO, 1980):

Conídios obtidos de 2 linhagens mutantes complementares (com 2 deficiências auxotróficas cada uma e com mutações morfológicas diferentes) foram colocados no mesmo tubo de ensaio contendo 2,5 ml de MM líquido suplementado com 4% de MC líquido para permitir uma germinação inicial dos conídios. Estes tubos foram incubados por 10 dias a 28°C e a película formada na superfície do meio foi transferida para placas contendo MM sólido. Após mais 10 dias de incubação a 28°C, uma extremidade desta película foi novamente

transferida para placas contendo MM sólido e a seguir, incubadas a 28°C por mais 10 dias, para evitar crescimento devido a resquícos de MC vindo dos tubos.

- Método 2 (INGLE e HASTIE, 1974):

Conídios obtidos de 2 linhagens mutantes complementares (com 2 deficiências auxotróficas cada uma e com mutações morfológicas diferentes) foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de MM líquido suplementado com 4% de MC líquido. Após homogeneização, foram transferidas, com o auxílio de uma pipeta, gotas da suspensão para a tampa de uma placa de Petri plástica, esterilizada. Na parte de baixo da placa de Petri 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 heterocarióticas formadas nas gotas foram transferidas para placas com MM e incubadas a 28°C por 8 dias.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPA

3.11) OBTENÇÃO DE DIPLÓIDES E RECOMBINANTES HAPLÓIDES

Foram feitas suspensões de conídios a partir do heterocário e estas foram plaqueadas em MM, MM+suplementos nutricionais da geração parental combinados de forma alternada e em MC.

Colônias que crescessem em MM seria diplóides ou revertentes haplóides (baixa probabilidade devido a estabilidade dos mutantes obtidos). Colônias que crescessem em MM+suplementos nutricionais alternados (ex: MM+suplemento 1 P1 + suplemento 1 P2) seriam recombinantes obtidos a partir do heterocário (parameiose) e em MC, cresceriam todos os tipos anteriores.

Os diplóides obtidos a partir do heterocário, foram analisados quanto ao diâmetro e comprimento do conídio.

Os recombinantes obtidos pela haploidização dos diplóides e através da paramiose seriam analisados quanto às marcas morfológicas e auxotróficas.

3.12) COLORAÇÃO DE NÚCLEO (TANAKA *et alii* 1979)

Uma lamínula foi untada com albumina 50%, seca no bico de Bunsen depois comprimida contra uma colônia. Com o material aderido à lamínula, este foi desidratado em metanol absoluto durante 15 minutos. Hidratou-se o material em HCl 1N a 60° C por 10 minutos. Lavou-se 3 vezes em água destilada e depois 1 vez em tampão fosfato pH 6,9. O material foi então corado durante 10 minutos em 1 ml de solução Giemsa misturado com 9 ml de tampão fosfato pH 6,9. Depois de corada, a lamínula com o material foi rapidamente lavada 2 vezes em tampão fosfato pH 6,9. Feito isso, a lâmina foi montada e posteriormente observada em microscópio óptico.

3.13) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Primeiramente o material foi fixado em solução Karnovsky e depois lavado durante 1 minuto 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M;

Depois o material foi desidratado com álcoois em ordem crescente de concentração:

- 10 minutos em álcool 70%;
- 10 minutos em álcool 90%;
- 10 minutos em álcool 100%;
- 10 minutos em álcool 100%;

Após a desidratação em álcool, foi feita outra desidratação com o auxílio de CO₂ em aparelho de BALZERS SCD-010 até atingir ponto crítico;

Desidratado o material, foi feito uma metalização com ouro em aparelho BALZERS SCD-030;

Depois destes procedimentos é que foi possível a observação e fotografia em microscópio eletrônico PHILIPS SEM-505.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) OBTENÇÃO DE MUTANTES

Após expor cada linhagem à luz ultravioleta durante 1 minuto, foram obtidos 5 mutantes morfológicos, 9 mutantes auxotróficos. Estes resultados estão apresentados na tabela 2:

TABELA 2: MUTANTES OBTIDOS PELA EXPOSIÇÃO DAS LINHAGENS AO RAIOS ULTRAVIOLETA DURANTE 1 MINUTO

LINHAGEM IRRADIADA	MUTANTES OBTIDOS
AL RG amarelo escuro	<u>his</u> 1 RG amarelo escuro <u>phe</u> 1 RG amarelo escuro <u>pvi</u> 1 amarelo pardo 1
<u>arg</u> 2	<u>arg</u> 2 <u>met</u> 1 <u>arg</u> 2 <u>cis</u> 1
<u>arg</u> 3	<u>arg</u> 3 ác. nucléico 1* <u>arg</u> 3 <u>ylo</u> 2 (amarelo escuro) <u>arg</u> 3 <u>pvi</u> 1 <u>arg</u> 3 <u>ylo</u> 3 (amarelo claro)
<u>arg</u> 5	<u>arg</u> 5 ác. nucléico1*
<u>arg</u> 3 <u>ylo</u> 1	<u>arg</u> 3 <u>ade</u> 1 <u>ylo</u> 1 <u>arg</u> 3 <u>met</u> 1 <u>ylo</u> 1 <u>arg</u> 3 ác. nucléico 1* <u>ylo</u> 1

* As linhagens identificadas como deficientes para ácido nucléico (arg 3 ác. nucléico 1, arg 5 ác. nucléico 1 e arg 3 ác. nucléico 1 ylo 1) foram assim identificadas por não crescerem em nenhum dos meios seletivos (MM+aminoácidos, MM+vitaminas e MM+adenina). Desta forma, pode-se supor que os mutantes que não cresceram em nenhum dos meios citados sejam deficientes na biossíntese de guanina, porém seria necessário o teste adequado para confirmar esta hipótese.

Para o isolamento de mutantes morfológicos, como exemplo segue a foto 7 que mostra a obtenção de uma colônia mutante morfológico vinho pálido (pvi) a partir do tratamento com luz ultravioleta da linhagem RG amarelo escuro.

FOTO 7: VÁRIAS COLÔNIAS AMARELAS (RG AMARELO ESCURO) COM UMA COLÔNIA AO CANTO (↓) VINHO PÁLIDO (PVI)



Todos os mutantes morfológicos apresentadas na tabela estão mostrados a seguir por fotos:

FOTO 8: LINHAGEM RG AMARELO ESCURO (ESQUERDA) COM SEU MUTANTE MORFOLOGICO PVI 1 (DIREITA)

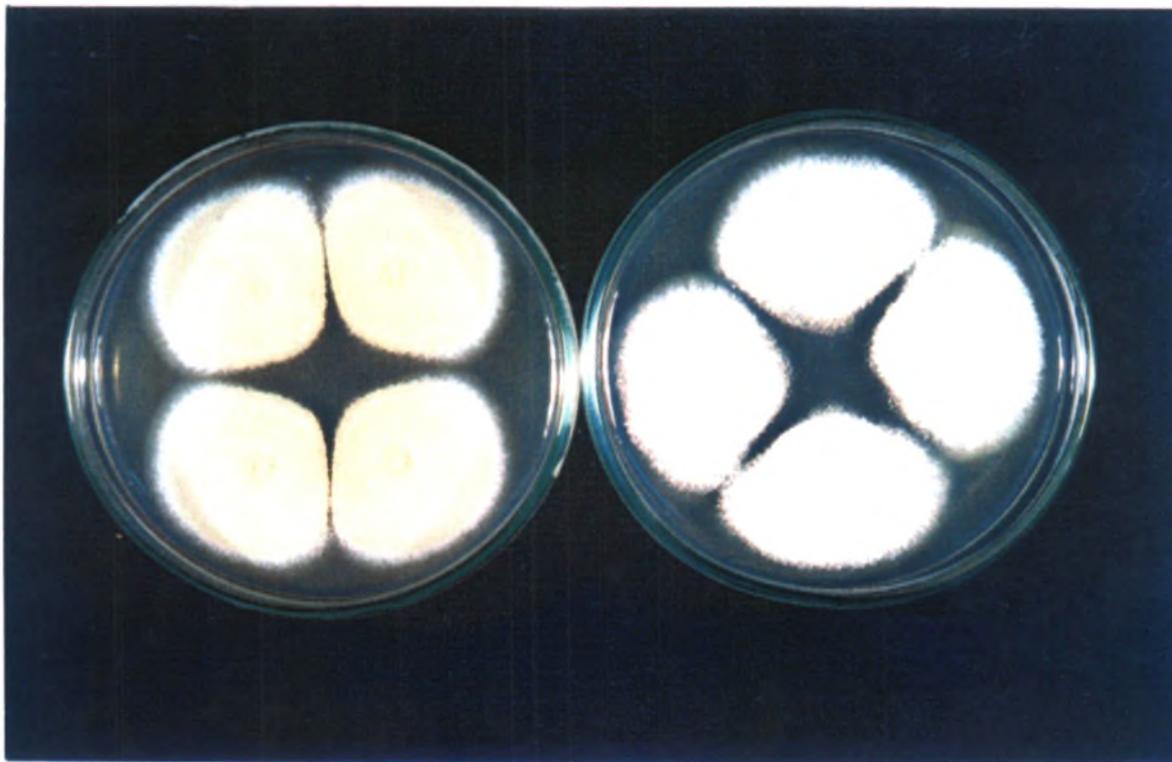


FOTO 9: LINHAGEM RG AMARELO ESCURO (ESQUERDA) COM SEU MUTANTE MORFOLOGICO AMARELO PARDO 1 (DIREITA)

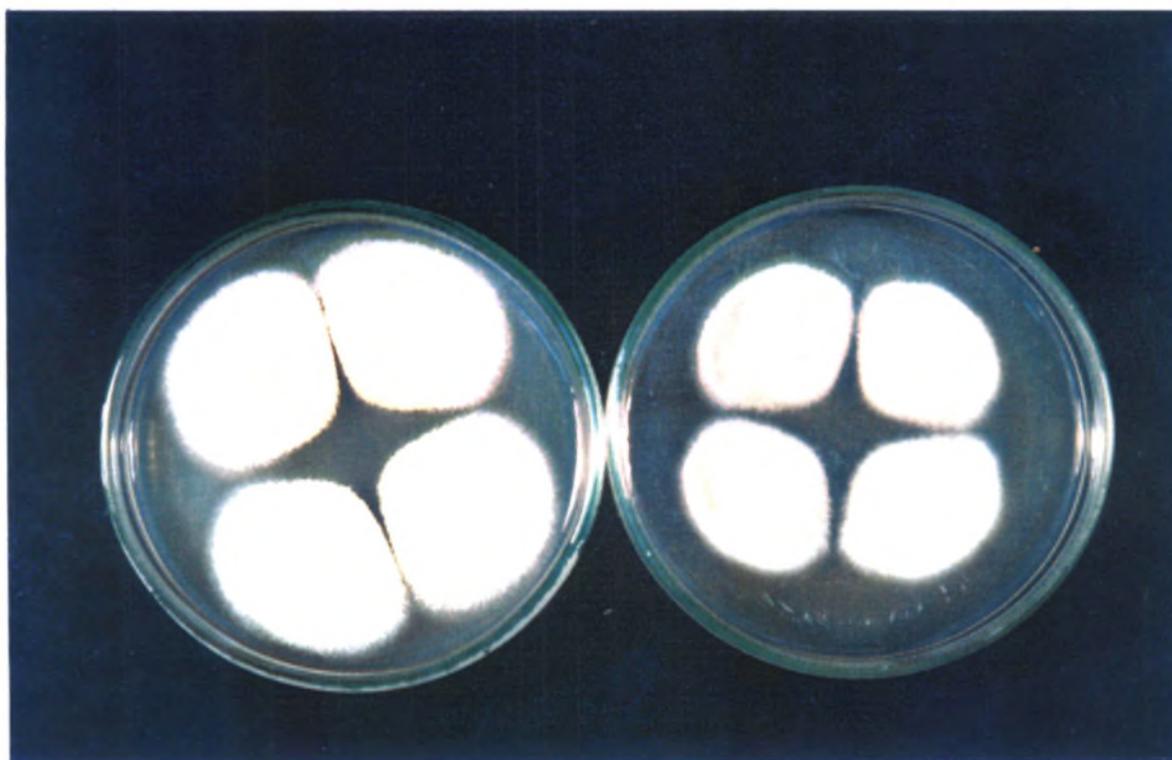


FOTO 10: LINHAGEM ARG 3 (ESQUERDA) COM SEU MUTANTE MORFOLÓGICO YLO 2 (DIREITA)



FOTO 11: LINHAGEM ARG 3 (ESQUERDA) COM SEU MUTANTE MORFOLÓGICO PVI 1 (DIREITA)

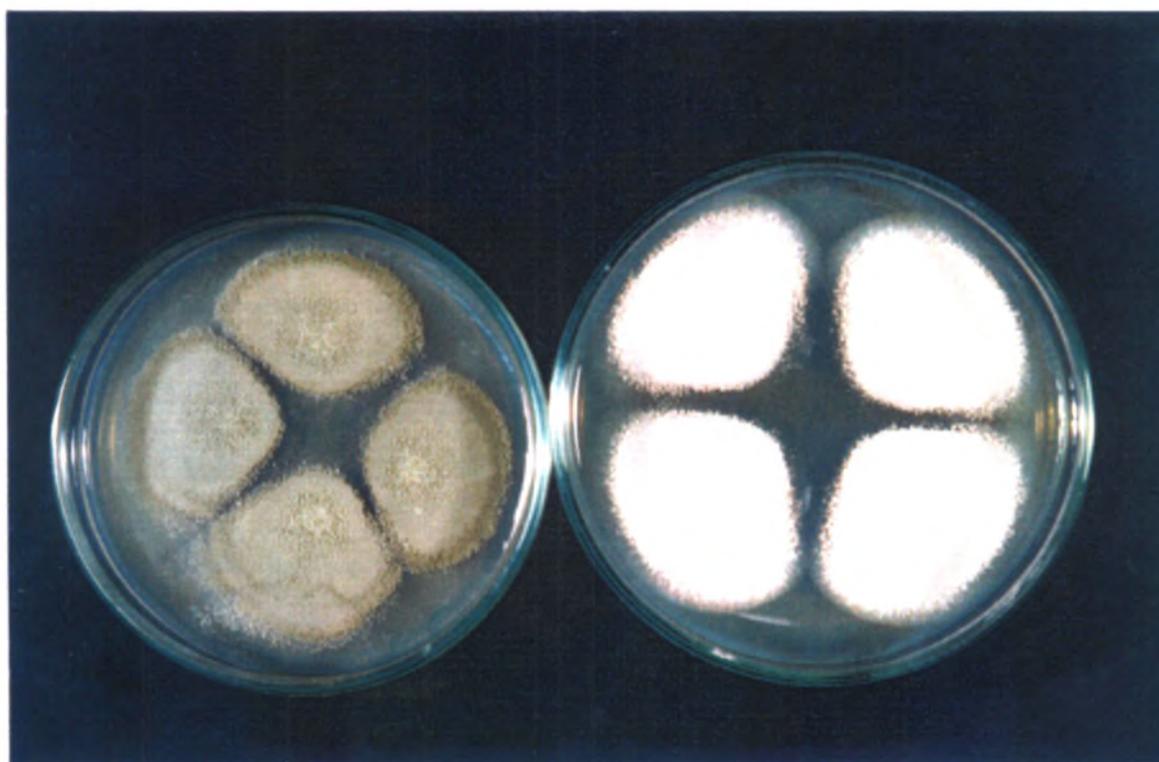
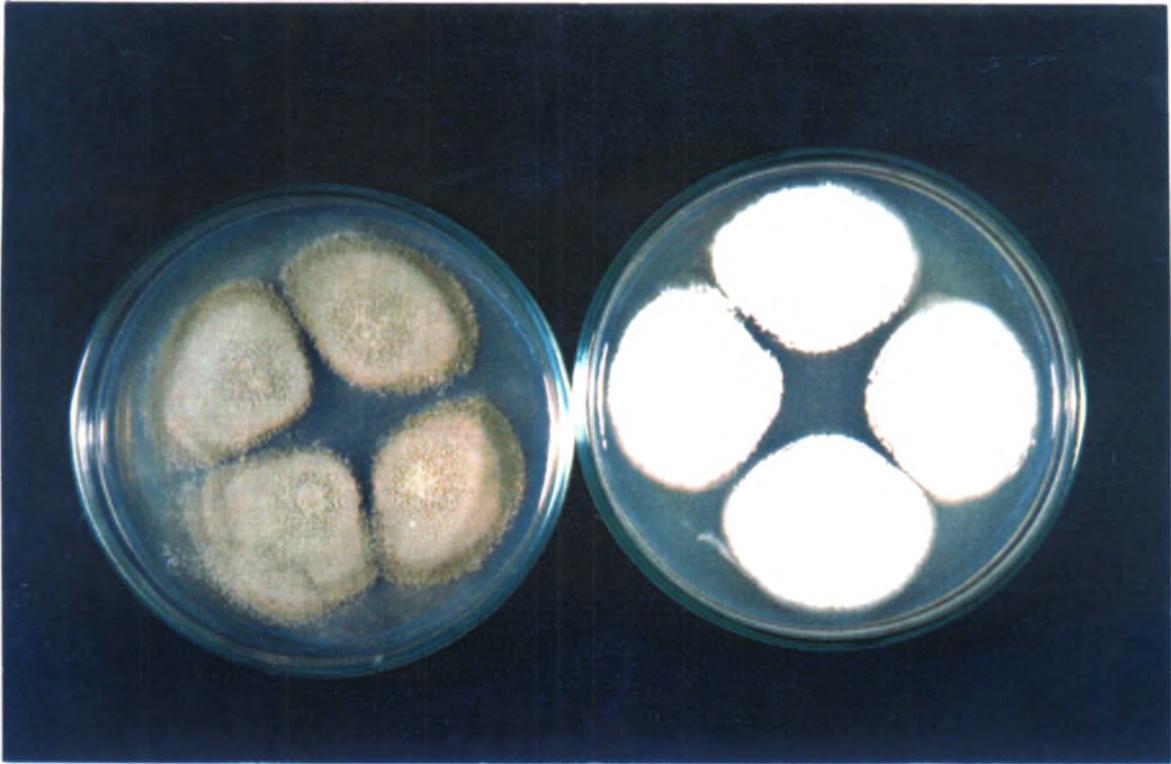


FOTO 12: LINHAGEM ARG 3 (ESQUERDA) COM SEU MUTANTE MORFOLÓGICO YLO 3 (DIREITA)



A partir da obtenção de todos estes mutantes, tanto morfológicos, auxotróficos ou mesmo auxotróficos e morfológicos, foi possível calcular a frequência de obtenção de mutantes de cada linhagem irradiada, sumarizados na tabela 3 (mutantes auxotróficos) e tabela 4 (mutantes morfológicos).

TABELA 3: FREQUÊNCIA (%) DE OBTENÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS COM 1 MINUTO DE EXPOSIÇÃO À LUZ ULTRAVIOLETA

Linhagem	No de colônias ensaiadas	No de mutantes auxot. Obtidos	frequência (%)
<u>arg 2</u>	1007	2	0,198
<u>arg 3</u>	1470	1	0,068
<u>arg 3 ylo 1</u>	1631	3	0,184
<u>arg 5</u>	980	1	0,102
RG amar. escuro	780	2	0,256
<u>arg 3 pvi 1</u>	305	0	0
<u>arg 3 am. esc. 1</u>	191	0	0
Total	5868	9	-
Média	-	-	0,15337

De todas as linhagens expostas ao agente mutagênico testadas para obtenção de mutantes, somente nas linhagens arg 3 pvi 1 e arg 3 am. esc. 1 não foi possível encontrar mutantes. Isto pode ser devido ao fato de terem sido testadas muito poucas colônias em relação às demais linhagens.

TABELA 4: FREQUÊNCIA (%) DE OBTENÇÃO DE MUTANTES MORFOLÓGICOS COM 1 MINUTO DE EXPOSIÇÃO À LUZ ULTRAVIOLETA

Linhagem	No de colônias ensaiadas	No de mutantes morfol. Obtidos	frequência (%)
<u>arg 2</u>	1007	0	0
<u>arg 3</u>	1470	3	0,204
<u>arg 3 ylo 1</u>	1631	0	0
<u>arg 5</u>	980	0	0
RG amar. Escuro	780	2	0,256
<u>arg 3 pvi 1</u>	305	0	0
<u>arg 3 am. Esc. 1</u>	191	0	0
Total	5868	5	-
Média	-	-	0,0852

Mutações morfológicas foram menos frequentes em relação às mutações auxotróficas. Somente em 2 linhagens (arg 3 e RG amarelo escuro) foram obtidas mutações morfológicas.

A linhagem RG amarelo escuro já era um mutante morfológico, porém obteve-se 2 mutações para a sua coloração: vinho pálido e amarelo pardo.

4.2) TESTE DE REVERSÃO

Todas as linhagens mutantes utilizadas no trabalho e as obtidas durante o trabalho relacionadas na tabela 2, foram testadas para verificar se houve alguma reversão espontânea das mutações.

Foram semeados 10^7 conídios/placa com MM e nenhum mutante apresentou crescimento nesta quantidade de conídios semeados. Para os mutantes com mais de 1 mutação auxotrófica (arg 3 ade 1 ylo 1, arg 3 met 1 ylo 1 e paba 1 nic 1 pvi 1), estes foram semeados em concentração de 10^7 conídios em placas com MM, MM+1° suplemento e MM+2° suplemento e em todas as placas não houve crescimento de colônias revertentes.

A partir dos resultados do teste de reversão, pode-se constatar a estabilidade dos mutantes obtidos e desta forma, permitir uma maior segurança na utilização destes para a obtenção de heterocários.

4.3) CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DAS LINHAGENS COM DIFERENTES COLORAÇÕES

Para obter-se os resultados das curvas de sobrevivência das 4 linhagens testadas, foram feitas 3 irradiações para cada linhagem e contadas as colônias que sobreviveram depois de 1, 2 e 4 minutos de exposição ao agente

mutagênico. Também foi feito um controle (tempo 0'), e contadas as colônias crescidas neste ensaio.

Feitas todas as contagens, foi tirada uma média dos 3 ensaios, sendo os resultados sumarizados na tabela 5.

TABELA 5: PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA (%) DE CADA LINHAGEM EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO AGENTE MUTAGÊNICO (LUZ ULTRAVIOLETA).

Linhagem	Tempo de exposição à U.V		
	1 min.	2 min.	4 min.
Verde (<u>arg 3</u>)	8,22	0,59	0,087
Amarela (<u>arg 3 ylo 1</u>)	2,06	0,17	0,094
Vinho pálido (<u>arg 3 pvi 1</u>)	2,61	0,32	0,090
Amar. esc. (<u>arg 3 ylo 2</u>)	1,48	0,83	0,049

A partir destes resultados, pôde-se plotar os gráficos, demonstrados a seguir:

Gráfico 1: Curva de sobrevivência da linhagem verde (arg 3) em diferentes tempos de exposição ao agente mutagênico raio ultravioleta.

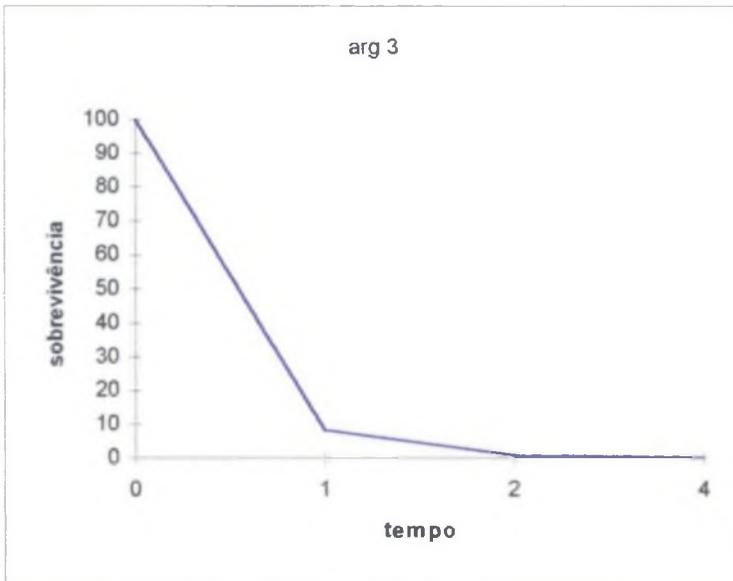


Gráfico 2: Curva de sobrevivência da linhagem amarela (arg 3 ylo 1) em diferentes tempos de exposição ao agente mutagênico raio ultravioleta.

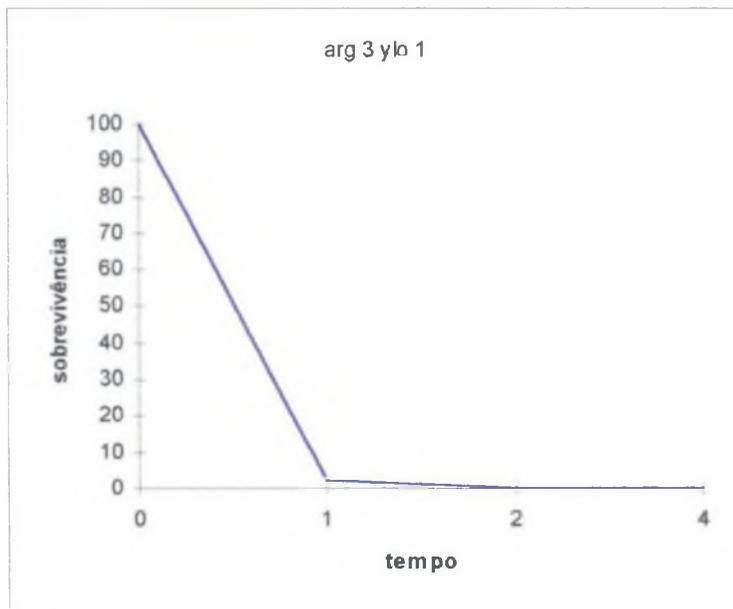


Gráfico 3: Curva de sobrevivência da linhagem amarela escuro (arg 3 ylo 2) em diferentes tempos de exposição ao agente mutagênico raio ultravioleta.

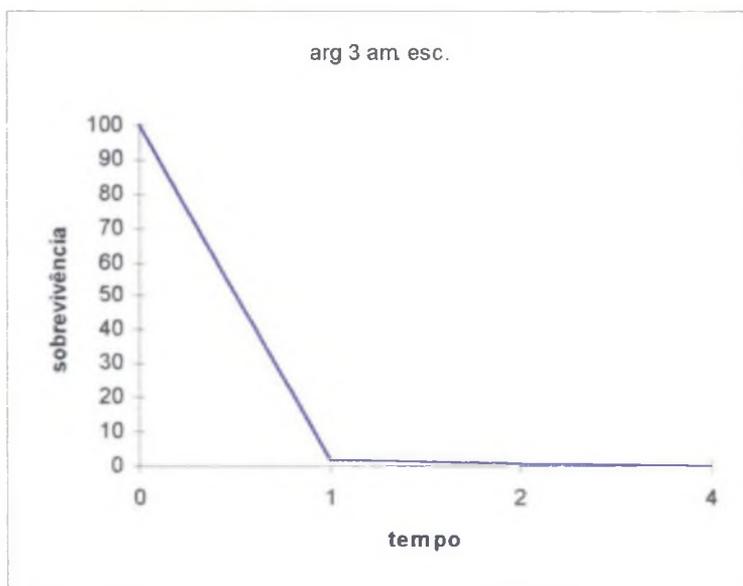
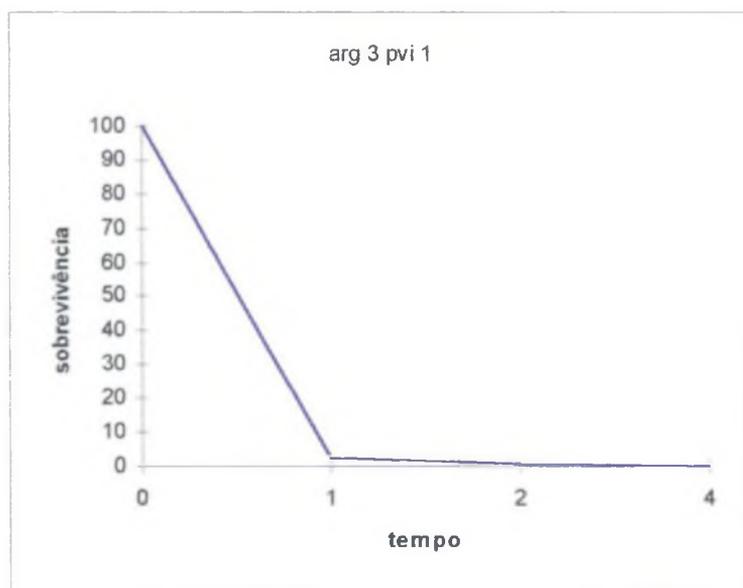


Gráfico 4: Curva de sobrevivência da linhagem vinho pálido (arg 3 pvi 1) em diferentes tempos de exposição ao agente mutagênico raio ultravioleta.



Com os resultados obtidos, fêz-se uma análise estatística das médias de todas as irradiações nos diferentes tempos. O teste estatístico utilizado para a análise foi o de Kruskal-Wallis. As restrições para o teste, com aproximação ao χ^2 com (K-1) graus de liberdade são de que as amostras sejam independentes, o número de classes seja de $K > 3$ e que o tamanho amostral seja pequeno.

Foi possível a utilização deste teste pois, as amostras (médias) são independentes, o número de classes (linhagens) é igual a 4 e o tamanho da amostra (número de médias) para cada linhagem é igual a 3.

Os resultados da análise estatística permitiu-nos concluir que houve uma diferença significativa ($p=0,08$) entre as linhagens para 1 minuto de exposição ao agente mutagênico e comparando as linhagens entre si, o teste mostrou diferença significativa ($p=0,057$) entre as linhagens verde (arg 3) e amarelo escuro (arg 3 ylo 2), sendo a linhagem verde mais resistente ao raio ultravioleta do que a linhagem amarela.

Estas análises foram realizados com a orientação dos monitores do Departamento de Estatística da UFPR.

4.4) OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIO

Foram realizados os seguintes cruzamentos:

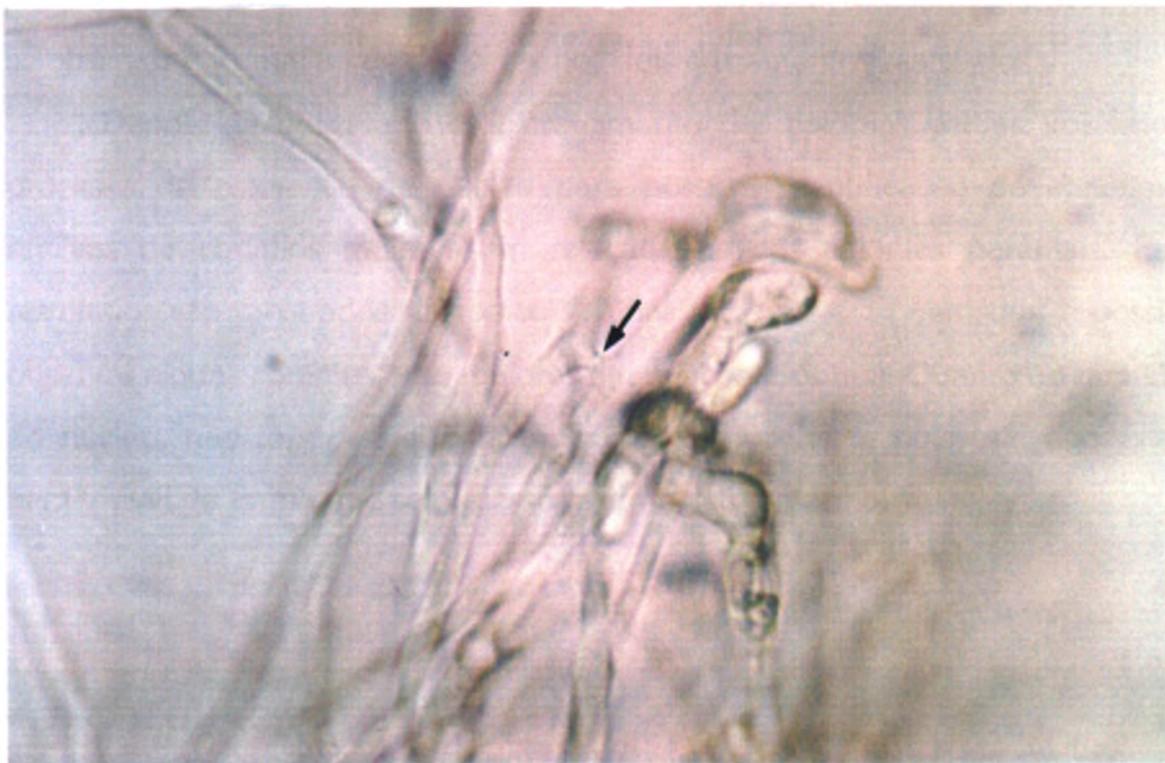
paba 1 nic 1 pvi 1 X arg 3 ade 1 ylo 1;

paba 1 nic 1 pvi 1 X arg 3 met 1 ylo 1.

Destes dois cruzamentos, obteve-se a formação da película heterocariótica pelos dois métodos utilizados (MESSIAS & AZEVEDO, 1980 e INGLE & HASTIE, 1974). Depois de transferidas as películas em MM, em ambas houve crescimento e esporulação, sendo estas esporulações variando entre cinza esverdeado a cinza amarelado.

Da película heterocariótica formada do cruzamento entre as linhagens paba 1 nic 1 pvi 1 e arg 3 met 1 ylo 1 foi feita uma lâmina e observado em microscópio óptico. Foi possível observar anastomose de hifas (Foto 13), comprovando mais uma vez a formação do heterocário.

FOTO 13: ANASTOMOSE DE HIFAS DO CRUZAMENTO ENTRE AS LINHAGENS PABA 1 NIC 1 PVI 1 E ARG 3 MET 1 YLO 1.



4.5) ANÁLISE DOS RECOMBINANTES

Dos dois heterocários formados, somente o do primeiro cruzamento (paba 1 nic 1 pvi 1 X arg 3 ade 1 ylo 1) foi testado quanto aos possíveis recombinantes formados. No entanto, não foi possível detectar nenhuma recombinação entre estas linhagens.

Como o mutante arg 3 met 1 ylo 1 foi obtido somente ao final do trabalho e em consequência também o heterocário, esta etapa de análise de recombinates não foi possível cumprir para este último cruzamento.

4.6) OBTENÇÃO DE DIPLÓIDES

A partir do crescimento de colônias verdes do heterocário em MC, pôde-se observar a formação de diplóides nos dois cruzamentos realizados.

Depois de observado este crescimento das colônias verdes, foi feito o processo de coloração de núcleo para possível identificação de conídios e núcleos de conídios maiores em relação aos das colônias parentais. Estes resultados são mostrados no tópico 4.7 nas fotos 16 e 17 em que é possível observar alguns conídios bem maiores em relação a outros. Quanto ao tamanho do núcleo, não foi possível concluir nada com precisão, pois este não estava bem visível de forma que se pudesse medir o seu tamanho.

4.7) COLORAÇÃO DE NÚCLEO

Feita a coloração de núcleo de algumas linhagens de *M. anisopliae*, foi possível visualizar:

- Conídios uninucleados (Foto 14);
- Conídios binucleados (Fotos 15 e 16);
- Conídios grandes (prováveis diplóides) de heterocário (Foto 16 e 17);
- Conidióforo com núcleo se dividindo (Foto 18);
- Conidióforo ramificado com conídios em formação (Foto 19).

FOTO 14: VÁRIOS CONÍDIOS UNINUCLEADOS E AO CENTRO HIFAS UNINUCLEADAS - LINHAGEM PABA 1 NIC 1 PVI 1 - Aumento 1000X

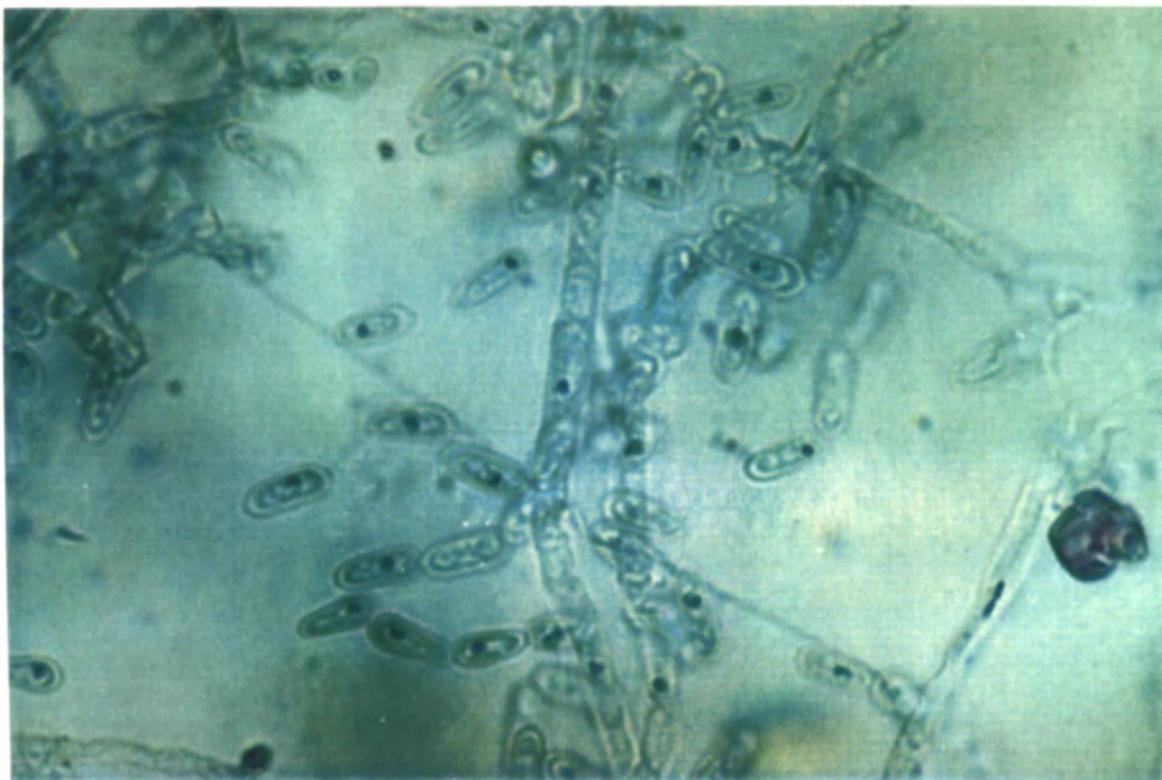


FOTO 15: CONÍDIO BINUCLEADO (↓) E VÁRIOS CONÍDIOS UNINUCLEADOS - PABA 1 NIC 1 PVI 1 - Aumento 1000X



FOTO 16: CONÍDIO BINUCLEADO (↓) E ALGUNS CONÍDIOS GRANDES (PROVÁVEIS DIPLÓIDES) (♂) - HETEROCARIO (paba 1 nic 1 pvi 1 X arg 3 ade 1 ylo 1) - Aumento 1000X



FOTO 17: CONÍDIO GRANDE (PROVÁVEL DIPLÓIDE) (↓) E ALGUNS UNINUCLEADOS - HETEROCARIO (paba 1 nic 1 pvi 1 X arg 3 met 1 ylo 1) - Aumento 1000X



FOTO 18: CONIDIÓFORO EM PONTA DE HIFA COM NÚCLEO SE DIVIDINDO (↓) - ARG 3 ADE 1 YLO 1 - Aumento 1000X



FOTO 19: CONIDIÓFORO RAMIFICADO COM CONÍDIOS SE FORMANDO NAS PONTAS - HETEROCARIO (paba 1 nic 1 pvi 1 X arg 3 met 1 ylo 1) - Aumento 1000X



4.8) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O objetivo desta etapa do projeto seria a visualização das estruturas presentes no fungo estudado. Estruturas estas: conídios, conidióforos, hifas, além disto, a comparação mais precisa de um conídio haplóide de um conídio diplóide, para comprovar a formação do conídio diplóide pela heterocariose induzida.

Porém, por problemas técnicos que ocorreram durante o processo (defeito no microscópio eletrônico de varredura), não foi possível concluir esta parte do trabalho, sendo possível somente a visualização de conídios da linhagem RG amarelo escuro, mostradas na foto 20.

FOTO 20: VÁRIOS CONÍDIOS DA LINHAGEM RG AMARELO ESCURO VISTOS POR MICROSCOPIA DE VARREDURA - aumento 2500X

5) CONCLUSÕES

1 - O agente mutagênico luz ultravioleta provou ser eficiente na obtenção de mutantes para o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, obtendo-se 5 mutantes morfológicos e 9 mutantes auxotróficos, todos a partir de 1 minuto de exposição à luz ultravioleta.

2 - A linhagem verde (arg 3) mostrou ser mais resistente à luz ultravioleta no tempo de 1 minuto de exposição, indicando uma relação positiva entre a pigmentação de conídio e a resistência à luz ultravioleta.

3 - Os 2 métodos para obtenção de heterocáριο utilizadas (MESSIAS & AZEVEDO, 1980 e INGLE & HASTIE, 1974), possibilitaram a obtenção da película heterocariótica demonstrando ser eficiente a obtenção de heterocáριο entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*, porém o segundo (INGLE & HASTIE, 1974) mostrou ser mais rápido e prático.

4 - O crescimento de colônias verdes do heterocáριο e o tamanho dos conídios significativamente maiores em relação aos dos parentais, são alguns dos indícios que nos levam a acreditar que houve a formação de conídios diplóides a partir da formação do heterocáριο.

5 - Foi possível detectar a presença de conídios uninucleados e binucleados em *M. anisopliae*, a partir da técnica de coloração de núcleo.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N.T.O. **Variabilidade em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin quanto à germinação de conídios, conteúdo protéico e atividade enzimática.** Campinas, 1991. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
- AL-AIDROOS, K. Demonstration of parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 22, p. 309-314, 1980.
- AL-AIDROOS, K.; ROBERTS, D.W. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence toward mosquito larvae. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 20, p. 211-219, 1978.
- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos.** São Paulo: Editora Manole Ltda. 1986, 407p.
- ALVES, S.B.; SOSA-GÓMEZ, D.R. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **Poliagro**, Bandeirantes, v. 5, n. 1, p. 1-9, 1983.
- ALVES, S.B.; NOGUEIRA, Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia** 9, Londrina, 1984. Resumos. Londrina, 1984. p. 170.
- AZEVEDO, J.L. Recessive lethal induced by nitrous acid in *Aspergillus nidulans*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 10, p. 111-117, 1970.

- AZEVEDO, J.L. O ciclo parassexual em fungos. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 3, p. 157-168, 1972.
- AZEVEDO, J.L. ; COSTA. S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo:EDUSP, 1973. 288p.
- AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopath.**, Piracicaba, v.2, p. 3-15, 1976.
- AZEVEDO, J.L. ; OLIVEIRA, A.; CAMPOS, A.J.R. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 2, p. 237-241, 1976.
- AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético em fungos utilizados no controle biológico de insetos: utilização do processo paramiótico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 84, supl. III, p. 27-29, 1989.
- BAGALHI, E. **Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Piracicaba, 1987, 124p. Thesis (M.Sc.)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BAGAGLI, E. ; VALADARES, M.C.C. ; AZEVEDO, J.L. Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 14, p.261-271,1991.
- BERGERON, D. ; MESSING-AL-AIDROOS, K. Haploidization analysis of heterozygous diploids in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v.24, p.643-651, 1982.

- BERNIER, L.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K.; CLARKSON, J.M.
Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 261-266, 1989a.
- BONATELLI JR., R. **Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger***. Piracicaba, 1981. 91 p. Tese (Doutorado) - 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*. **Rev. Brasil. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 6, p. 399-405, 1983.
- BURNETT, J.H. **Mycogenetics**. London: John Wiley & Sons, 1975.375p.
- BUXTON, E.W. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **J. Gen. Microbiol.**, London, v. 15, p. 133-139, 1956.
- BUXTON, E.W. Parasexual recombination in the banana wilt *Fusarium*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, London, v. 45, p. 274-279, 1962.
- COSTA, C. **Diversidade Biológica em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Piracicaba, 1989. 182p. Thesis (PhD)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- DE CONTI, E. ; MESSIAS, C.L. ; DE SOUZA, H.M.L. ; AZEVEDO, J.L.
Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. **Experientia Basel**, v. 36, p. 293-294, 1980.

- DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; PACHECO, M.R.M. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v. 40, p. 1103-1105, 1988.
- FARGUES, J.; REMAUDIERE, G. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 62, v. 1, p. 31-37, 1977.
- FERENCZY, L. Microbial protoplast fusion. In: GIOYER, S.W.; HORWOOD, D.A. **Genetics as a tool in microbiology**. Cambridge : Cambridge University Press, 1981. p. 1-35.
- FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Ann. Rev. Entomol. Soc.**, Stanford, v. 23, p. 409-442, 1978.
- FRIGO, S.M. **Variabilidade e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Piracicaba, 1983. 119p. Thesis (PhD)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- FUNGARO, M.H.P. ; VIEIRA, M.L.C. ; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. ; AZEVEDO, J.L. Similaridade entre isolados de *Metarhizium anisopliae* baseado em análise de RAPD. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.17, p.188, 1994 (Abstract).
- GARCIA, A.T.E.; BARACHO, I.R.; SOUZA, H.M.L.; MESSIAS, C.L. Virulência de linhagens mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae*, em *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera, Tephritidae). **Rev. Bras. Entomol.**, São Paulo, v. 29, p. 267-270, 1985.

- GARCIA, A.T.E.; SOUZA, H.M.L.; MESSIAS, C.L.; PIETRABUENA, A.E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae*, nas diferentes fases de desenvolvimento de *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera, Tephritidae). **Rev. Bras. Entomol.**, São Paulo, v. 33, p. 17-23, 1989.
- GARDNER, E.J. ; SNUSTAD, D.P. **Genética**. Cap. 9. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1986. 497p.
- GOETTEL, M.S.; LEGER, J.S.; BHAIRI, S.; JUNG, M.K.; OAKLEY, B.R.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Pathogenicity and growth of *Metarhizium anisopliae* stably transformed to benomyl resistance. **Curr. Genet.**, Heidelberg, v. 17, n. 2, p. 129-132, 1990.
- GOETTEL, M.S.; JOHNSON, D.L.; INGLIS, G.D. The role of fungi in the control of grasshoppers. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**. 73 (Suppl 1 A-D): S 71-S 75. 1995.
- GOLDMAN, G.H. **Estudos genéticos e produção de celulase em *Aspergillus niger***. Piracicaba, 1988. Thesis (M. Sc.)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GOPALAKRISHNAN, C.; NAKAYANAN, K. Occurrence of two entomofungal pathogens, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *minor* Tulloch and *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, on *Heliothis armigera* Hubner (Noctuidae Lepidoptera. **Curr. Sci. (Bangalore)**, v. 57, n. 15, p. 867-868, 1988.
- GOPALAKRISHNAN, C.; NAKAYANAN, K. Studies on the susceptibility of *Heliothis armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic

- fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *anisopliae* Tulloch. **Entomon**, Trivandrum, v. 14, n. 3-4, p. 191-197, 1989.
- HOPWOOD, D.A.; WRIGHT, H.M. Protoplast fusion in *Streptomyces*, fusions involving ultraviolet irradiated protoplasts. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 126, p. 21-27, 1981.
- HUMPHREYS, A.M.; MATEWELE, P.; TRINCI, A.P.J.; GILLESPIE, A.T. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. **Mycol. Res.**, Cambridge v. 92, n. 3, p. 257-264, 1989.
- 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.
- KAAYA, G.P. *Glossina morsitans morsitans*. Mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 107-114, 1989.
- KAAYA, G.P.; OKECHI, M.A. Horizontal transmission of mycotic infection in adult tse-tse, *Glossina morsitans morsitans*. **Entomophaga**, Paris, v. 35, n. 4, p. 589-600, 1990.
- 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.

- KAVA-CORDEIRO, V. ; QUEIROZ, M.V. ; AZEVEDO, J.L. Cariótipo eletroforético de *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.16, p.200, 1993 (Abstract).
- KAVA-CORDEIRO, V.; LUNA-ALVES-LIMA,E.A. ; AZEVEDO,J.L. Survival And Mutant Production Induced By Mutagenic Agents In *Metarhizium anisopliae*. **Scientia Agricola**, v. 52, nº 3, p. 548-554, 1995.
- LECUONA, R.E.; FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; BLEICHER, E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, à broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). **An. Soc. Entomol. Bras.**, Itabuna, v. 15, supl.,p. 21-27, 1986.
- LORD, J.C. Fungos entomopatogênicos. In: **Curso de controle microbiológico de pragas de caupi e feijão, 3, Goiânia**. Goiânia : EMBRAPA, 1986. 15 p.
- LUNA, E.A. **Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Rio de Janeiro, 1985, 260p. Thesis (PhD)- Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- LUNA, E.A.; AZEVEDO, J.L. Obtenção de possíveis diplóides entre linhagens de *metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v. 37, supl., 721, 1985.
- MAGOON, J. ; MESSING-AL-AIDROOS, K. Determination of ploidy of sectors formed by mitotic recombination in *metarhizium anisopliae*. **Trans Br. Mycol. Soc.**, Cambrige, v. 82, p. 95-98, 1984.

- MAGOON, J. ; MESSING-AL-AIDROOS, K.M. Epistatic relationships and linkage among colour markers of the imperfect entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v.28, p.96-100, 1986.
- MESSIAS, C.L., Fungos, sua utilização para o Controle de Insetos de Importância Médica e Agrícola. **Memb. Inst. Oswaldo Cruz**, RJ, 84-III: 57-59, 1989.
- MESSIAS, C.L. **Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Piracicaba, 1979. 73p. Thesis (PhD)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MESSIAS, C.L. ; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.75, p. 473-477, 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*. **J. Invertebr. Pathol.**, Duluth, v. 47, p. 231-233, 1986.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D. **Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Vuill.)**. Piracicaba, 1988. 193 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.
- PAMPHILE, J.A. **Estudos genéticos no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Piracicaba, 1992, 105p. Thesis (M.Sc.)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- PATEL, K.C.; PATEL, S.C.; GUPTA, D.K. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria brongniartii* as pathogens of mosquito larvae. **Indian J. Microbiol.**, Maharashtra, v. 30, n. 1, p. 59-62, 1990.
- PIMENTEL, I.C. **Estudos genéticos em *Paecylomyces lilacinus* (THOM) Samson, agente de controle biológico de nematóides.** Piracicaba, 1991, 115p. Thesis (M. Sc.)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PIPE, N.D.; HEALE, J.B.; BAWBRIDGE, B.W.; GILLESPIE, A.T. DNA RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of strains of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* Monograph. **British Crop Protection Council** v. 43, p. 247, 1989. In: Progress and prospects in insect control. Proceedings of an International Conference.
- PONTECORVO, G. ; ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploid in *Aspergillus nidulans*. **J. Gen. Microbiol.**, v.6, p. Vii, 1952.
- PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 10, p. 393-400, 1956.
- PONTECORVO, G. ; ROPER, J.A. ; HEMMONS, L.M. ; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.J.W. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**; New York, v. 5, p. 141-238, 1953.
- QUINTELA, E.D.; WRAIGHT, S.P.; WRAIGHT, S.G.; ROBERTS, D.W. Controle de *Chalcodermus bimaculatus* por *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, supl. 3, p. 145, 1989.

- RANGEL, D.E.N.; MESSIAS, C.L.; PIEDRABUENA, A.E. Virulence of *Metarhizium anisopliae* against Chagas'disease vectors. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, supl. 3, p. 164, 1989.
- REINECKE, P.; ANDERSCH, W.; STENZEL, K.; HARTWIG, J. BIO 1020, a new microbial insecticide for use in horticultural crops. Brighton Crop Protection Conference. **Pests and Diseases**, v. 1, p. 49-54, 1990.
- SAMSON, R.A . Constraints associated with taxonomy of biocontrol fungi. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**. 73 (Suppl 1 A-D): 83-S 88. 1995.
- SAMUELS, K.D.Z.; HEALE, J.B.; LLEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 53, n. 1, p. 25-31, 1989a.
- SAMUELS, K.D.Z.; PINNOCK, D.E.; ALLSOPP, P.G. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina Hyphomycetos) as a biological control agent of *Snopus rubriceps* (Macquart) (Diptera Stratiomuuidae). **J. Aust. Entomol. Soc.**, Sidney, v. 28, n. 1, p. 69-74, 1989b.
- SAMUELS, K.D.Z.; PINNOCK, D.E.; BULL, R.M. Scarabeid larvae control in sugarcane using *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 55, n. 1, p. 135-137, 1990.
- SAMUELS, R.I.; CHARNLEY, A.K.; REYNOLDS, S.E. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 51-58, 1988.

- SANTOS, A.L.L. **Influência de alguns fatores do crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.** Piracicaba, 1978. 148 p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.
- SERMONTI, G. **Genetics of antibiotic producing microorganisms.** London : Wily Inter-Science, 1969. 389 p.
- SIDDIQI, O.H. Mutagenic action of nitrous acid on *Aspergillus nidulans*. **Genetical Research**, Cambridge, v. 3, p.303-314, 1962.
- SIEGEL, S. **Estatística Não-Paramétrica.** McGraw-Hill. São Paulo. p. 209-213. 1975.
- SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L. Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 48, p. 368-374, 1986.
- SILVEIRA, W.D. **Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.** Piracicaba, 1983. 153 p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.
- SILVEIRA, W.D. ; AZEVEDO, J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme and Microbial Technology**, Stonehan, v.9, p.149-152, 1987.
- ST LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; GOETTEL, M.S.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Exp. Mycol.**, Duluth, v. 13, p. 274-288, 1989.

- ST LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, O.W.; STAPLES, R.C. Pre-penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 58, p. 168-175, 1991a.
- ST LEGER, R.J.; HAJEK, A.E.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, O.W. Fungi for the biocontrol of insects tools and trends. In: STAHL, U.; TUDZYNSKI, P. (eds.). **Molecular biology of filamentous fungi**. Berlim : Proceedings of the EMBO - Workshop, 1991b. p. 45-63.
- TANAKA, Y. ; MURATA, N. ; KATO, H. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. **Ann. Phytopaty. Soc. Japan**, 45: 182-191, 1979.
- TINLINE, R.D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**, New York, v. 63, p. 713-771, 1971.
- TINLINE, R.D. ; NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogeneous fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**, New York, v. 63, p. 701-712, 1971.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, Cambridge, v. 66, n. 3, p. 407-411, 1976.
- VALADARES, M.C.C. **Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Piracicaba, 1989. 160 p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.

VEEN, K.H. Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. **Meded. Landbouwhoges. Wageningen**, Wageningen, v. 68, p. 1-77, 1968.

VILACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorok. In: Congresso Latinoamericano de Entomologia, 3; Congresso Brasileiro de Entomologia, 4, Bahia, 1978. **Resumos**, 1978. p. 70.

ZOBERI, M.H. *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of reticulitermes flavipes (Isoptera, Rhinotermitidae). **Mycologia**. 87 (3): 354-359. May-Jun. 1995.