

BC/13710
IB/80403



NEIVA TINTI DE OLIVEIRA AGUIAR

VARIABILIDADE EM LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae* VAR
anisopliae (METSCH) SOROKIN QUANTO À GERMINAÇÃO DE CONÍ-
DIOS, CONTEÚDO PROTÉICO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

Este exemplar corresponde a Redação
final de Tese defendida pela
candidata Neiva Tinti de Oliveira
Aguar.

8/04/91
U. M. F. A.

Tese apresentada ao Departa-
mento de Genética e Evolução
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do
grau de Doutor em Ciências
Biológicas

Campinas-SF

NEIVA TINTI DE OLIVEIRA AGUIAR ^{rb}

VARIABILIDADE EM LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae* var
anisopliae (METSCH.) SOROKIN QUANTO A GERMINAÇÃO DE CONÍ-
DIOS, CONTEÚDO PROTÉICO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Orientador: Prof. Dr. CLAUDIO LUIZ MESSIAS ^{rb}

_{o. cad.}

Tese apresentada ao Departa-
mento de Genética e Evolução
da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do tí-
tulo de Doutor em Ciências
Biológicas

Campinas - SP

-1991-

7B/9103254

CLASSIF.	T/1071
AUTOR	Ag 93w
V.	EX.
TOMBO B2	13710
	EB

CM00030564-1

Aos meus pais
Nivaldo Tinti de Oliveira
e
Nivalda Rocha de Oliveira
(in memoriam)
e irmão
Neivaldo Tinti de Oliveira
Dedico

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Claudio Luiz Messias pela orientação, amizade e estímulo oferecidos.
- Ao prof. Dr. Aquiles Eugenio Piedrabuena pelo grande apoio, amizade, estímulo, auxílio na análise estatística, sugestões e discussão do manuscrito.
- Ao prof. Dr. Renato Bonatelli Junior, pela amizade, sugestões e discussão do manuscrito.
- À prof. Dra Alline Pizzarani-Kleiner pelas sugestões e discussão do manuscrito.
- À Superintendência de Contrôles de Endemias (SUCEN). Mogi-Guaçu, pelo fornecimento dos Triatomíneos utilizados neste trabalho.
- Ao pesquisador Antenor Nascimento Ferraz Filho, do laboratório da SUCEN (Mogi-Guaçu) pela atenção no fornecimento dos Triatomíneos utilizados neste trabalho.
- Ao prof. Dr. Otávio Henrique Pavan pela correção do "Abstract".
- A todos os amigos do Departamento de Genética e Evolução, em especial ao Juverlandi, Regina, Marcia, Dilaine e Ricardo, pelo carinho e dedicação com que me acolheram.
- À Celia, Tereza, Silvia e Patricia da Secretaria do Depto de Genética pela amizade e presteza oferecidas.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO -----	1
2. REVISÃO DE LITERATURA -----	3
2.1. Contrôlo Biológico -----	3
2.2. Posição Taxonômica e características de <i>M. anisopliae</i> -----	7
2.3. Características culturais -----	11
2.4. Variabilidade em <i>M. anisopliae</i> -----	14
2.5. Patogenicidade em <i>M. anisopliae</i> -----	15
3. MATERIAL E MÉTODOS -----	31
3.1. Linhagens de <i>M. anisopliae</i> utilizadas -----	31
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas -----	31
3.2.1. Ácidos nucleicos de levedura -----	32
3.2.2. Solução de vitaminas -----	32
3.2.3. Meio mínimo -----	33
3.2.4. Meio completo -----	34
3.2.5. Meio de arroz -----	35
3.2.6. Solução de Tween 80 -----	35
3.2.7. Solução salina -----	36
3.2.8. Solução saturada de sulfato de potássio -----	36
3.2.9. Solução de hipoclorito de sódio -----	36
3.2.10. Tampão fosfato 0,1M pH 7,0 -----	37

3.2.11.	Solução de soroalbumina bovina -----	37
3.2.12.	Reagente coomassie brilliant blue ---	37
3.2.13.	Reagentes para atividade amilolítica-	38
3.2.13.1.	Reagente A -----	38
3.2.13.2.	Reagente B -----	39
3.2.13.3.	Reagente arsenomolibdato --	39
3.2.14	Reagentes para eletroforese -----	39
3.2.14.1.	Solução estoque de tampão de corrida -----	39
3.2.14.2.	Solução estoque de tampão Tris-Cl pH 8,9 -----	40
3.2.14.3.	Solução estoque de tampão Tris-Cl pH 6,7 -----	40
3.2.14.4.	Solução estoque de gel- separador -----	41
3.2.14.5.	Solução estoque de gel empilhador -----	41
3.2.14.6.	Solução de persulfato de amônia -----	41
3.2.14.7.	Solução de riboflavina ----	42
3.2.14.8.	Solução de azul-de- bromofenol -----	42
3.2.14.9.	Gel separador -----	42
3.2.14.10.	Gel empilhador -----	42
3.2.14.11.	Preparação da amostra para a	

eletroforese -----	43
3.2.14.12. Solução de fixação -----	43
3.2.14.13. Solução de coloração -----	43
3.2.14.14. Solução de descoloração ---	44
3.3. Bioensaio -----	44
3.3.1. Hospedeiro -----	44
3.3.2. Obtenção do inóculo de <i>M. anisopliae</i> ----	45
3.3.3. Bioensaio -----	45
3.3.4. Reisolamento das linhagens em insetos mortos -----	47
3.3.5. Análise estatística da virulência das linhagens -----	48
3.4. Sincronização de conídios -----	48
3.5. Determinação de proteína total -----	50
3.6. Determinação das atividades amilolítica, lipolítica e quitinolítica em conídios de <i>M. anisopliae</i> -----	51
3.6.1. Obtenção dos extratos de conídios para a análise da atividade enzimática -----	52
3.6.2. Determinação da atividade enzimática em conídios intactos na presença de substrato -----	53
3.6.3. Determinação da atividade enzimática em conídios intactos na ausência de substrato -----	53

3.6.4. Determinação da atividade amilolítica --	54
3.6.5. Determinação da atividade lipolítica ---	55
3.6.6. Determinação da atividade quitinolítica -	55
3.7. Eletroforese dos extratos de conídios com diferentes tempos de germinação-----	57
3.8. Determinação do tempo de germinação mínimo (TGM) da linhagem E9 -----	59
3.9. Determinação do efeito da seleção de conídios precocemente germinados sobre o TGM -----	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	61
4.1. Determinação do TGM para a linhagem E9 -----	61
4.2. Efeito da seleção de conídios precocemente germinados sobre o valor TGM -----	61
4.3. Análise de proteína total -----	70
4.4. Eletroforese dos extratos de conídios com diferentes tempos de germinação -----	80
4.5. Atividade amilolítica de conídios de <i>M. anisopliae</i> -----	82
4.5.1. Atividade amilolítica de extratos de conídios com diferentes tempos de germinação -----	82
4.5.2. Atividade amilolítica de conídios diferentes tempos de germinação em preseça de amido -----	89
4.5.3. Atividade amilolítica de conídios	

em ausência de amido -----	93
4.6. Atividade lipolítica de conídios de	
<i>M. anisopliae</i> -----	96
4.6.1. Atividade lipolítica em extratos	
de conídios com diferentes tempos	
de germinação -----	96
4.6.2. Atividade lipolítica em conídios	
com diferentes tempos de germinação	
em presença de Tween 20 -----	97
4.6.3. Atividade lipolítica em conídios em ausência	
de tween 20 -----	102
4.7. Atividade quitinolítica de conídios de	
<i>M. anisopliae</i> -----	103
4.7.1 Atividade quitinolítica em extratos	
de conídios com diferentes tempos de	
germinação -----	103
4.7.2. Atividade quitinolítica em conídios	
com diferentes tempos de germinação	
em presença de quitina -----	108
4.7.3. Atividade quitinolítica em conídios	
em ausência de quitina -----	112
4.8. Bioensaio-----	115
4.8.1. Reisolamento das linhagens	
de <i>M. anisopliae</i> a partir de	
ninfas mortas -----	115

4.8.2. Virulência das linhagens -----	117
4.8.2.1. Concentração letal 50% (LC50) -	117
4.8.2.2. Tempo letal 50% (LT50) -----	117
4.8.2.3. Hipótese de paralelismo -----	118
4.8.2.4. Potência relativa -----	120
4.9. Virulência e atividade enzimática em	
<i>M. anisopliae</i> -----	123
5.0. CONCLUSÕES -----	127
6.0. RESUMO -----	129
7.0. ABSTRACT -----	132
7.0. BIBLIOGRAFIA -----	135

LISTA DE TABELAS

1. Tempo de germinação médio (TGM) de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em MM líquido sob agitação, a 28°C.
----- 62
2. Número de conídios germinados da linhagem E9 de *M. anisopliae* após 4 passos de seleção de conídios precocemente germinados em MM líquido sob agitação a 28°C.
----- 62
3. Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* após seleção de conídios precocemente germinados----- 66
4. Análise de variância dos dados obtidos sobre o nº de conídios germinados em 500 conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* após seleção de conídios germinados precocemente.----- 66
5. Teste de Tukey para a causa de variação "tempo de germinação "sobre o número de conídios germinados" ---- 67
6. Teste de Tukey para a causa de variação "seleção de conídios" sobre o número de conídios germinados" ----- 67

7.	Desdobramento do efeito principal "seleção de conídios precocemente germinados" com a interação "tempo de germinação x seleção" -----	68
8.	Conteúdo de proteína total de conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> com diferentes tempos de germinação.-----	72
9.	Análise de variância dos dados obtidos sobre o número de proteína total de conídios de <i>M. anisopliae</i> com diferentes tempos de germinação. -----	74
10.	Teste de Tukey dos dados obtidos sobre o conteúdo de proteína total de conídios de <i>M. anisopliae</i> com diferentes tempos de germinação. -----	74
11.	Desdobramento do efeito principal "Tempo de germinação" com a interação "Linhagem x Tempo de germinação" em termos de proteína total em conídios de <i>M. anisopliae</i> com diferentes tempos de germinação. -----	76
12.	Curva de calibração da medida de glicose obtida pelo método de NELSON (1944). -----	83

13. Atividade amilolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após diferentes tempos de germinação. ----- 83
14. Análise de variância sobre os dados obtidos sobre a atividade amilolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação. ----- 84
15. Teste de Tukey sobre os dados obtidos sobre a atividade amilolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae*.----- 87
16. Desdobramento do efeito principal "tempo de germinação" com a interação "Linhagem x Tempo de germinação" em termos de atividade amilolítica de extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* ----- 87
17. Atividade amilolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* em diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,2mg/ml de amido.----- 90
18. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade amilolítica de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM

contendo 0,2mg/ml de amido.-----	90
19. Teste de Tukey dos dados obtidos sobre a atividade amilolítica de conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> com diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,2mg/ml de amido. -----	91
20. Desdobramento do efeito principal "tempo de germinação" em termos de atividade amilolítica de conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> com diferentes tempos de germinação MM contendo 0,2mg/ml de amido. -----	91
21. Atividade amilolítica em conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> após 24 horas de incubação em MM em ausência de amido.-----	94
22. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade amilolítica de conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> após 24hs de incubação em MM em ausência de amido.-----	94
23. Médias de atividade amilolítica de conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> após 24hs de incubação em MM em ausência de substrato -----	94

24. Atividade lipolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação. ----- 99
25. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade lipolítica de extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.--
----- 99
26. Teste de Tukey dos dados obtidos sobre a atividade lipolítica de extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.- 100
27. Atividade lipolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* em diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,01ml/ml de Tween 20.----- 100
28. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade lipolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae*, com diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,01ml/ml de Tween 20.----- 101
29. Teste de Tukey sobre os dados obtidos sobre a atividade lipolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae*, com diferentes tempos de germinação em MM

contendo 0,01ml/ml de Tween 20.-----	101
30. Desdobramento do efeito "Tempo de germinação" com a interação "Tempo de germinação x Linhagem" em termos de atividade lipolítica em conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> com diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,01ml/ml de Tween 20.-----	104
31. Atividade lipolítica de conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> após 24 horas de incubação em MM na ausência de Tween 20.-----	104
32. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade lipolítica de conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> com 24 horas de incubação em MM em ausência de Tween 20.-----	105
33. Curva de calibração da medida de N-acetilglicosamina obtida pelo método de Reissig et al. (1955).-----	105
34. Atividade quitinolítica em extratos de conídios de três linhagens de <i>M. anisopliae</i> após diferentes tempos de germinação.-----	107

35. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade quitinolítica em conídios de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.----- 107
36. Teste de Tukey sobre os dados obtidos sobre a atividade quitinolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação ----- 109
37. Desdobramento do efeito principal "Tempo de germinação" com a interação "Tempo de germinação x Linhagens" em termos de atividade quitinolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.----- 109
38. Atividade quitinolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 15mg/ml de quitina.----- 111
39. Análise de variância da atividade quitinolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 15mg/ml de quitina.----- 111

40. Teste de Tukey dos dados obtidos sobre a atividade quitinolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 15mg/ml de quitina.----- 113
41. Desdobramento do efeito "tempo de germinação" com a interação "tempo de germinação x linhagens" em termos de atividade quitinolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 15mg/ml de quitina.----- 113
42. Atividade quitinolítica de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após 24 horas de incubação em MM em ausência de quitina.----- 114
43. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade quitinolítica de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após 24 horas de incubação em MM em ausência de quitina.----- 114
44. Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após 5 dias da exposição às linhagens E9, Pergro, BSA e V14 de *M. anisopliae*.----- 116

45. Porcentagem de mortalidade acumulada de *R. prolixus* em diferentes dias após a exposição a uma concentração de 30×10^4 conídios/ml das linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae*.----- 116
46. Concentração Letal 50% e intervalos de confiança (IC) das linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae* expressos em 10^5 conídios/ml.----- 119
47. Tempo letal 50% (LT50) e Intervalos de Confiança (IC) das linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae* .--
----- 119
48. Teste de χ^2 para comparação dos Lt50 das linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae*.----- 121
49. Potência relativa (R) e seus intervalos de confiança (IC) para os LC50 das linhagens E9, Pegro e V14 de *M. anisopliae* com relação à linhagem E9.----- 121

LISTA DE FIGURAS

1. Porcentagem de germinação em MM de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em vários períodos de incubação.-63
2. Efeito da seleção de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* sobre a porcentagem de germinação em diferentes tempos de incubação.----- 65
3. Conteúdo de proteína total de conídios das linhagens E9, Pegro e BSA de *M. anisopliae* em quatro tempos de germinação.----- 73
4. Gráfico do ajustamento do tempo de germinação em relação à quantidade de proteína total contida em conídios de *M. anisopliae*.----- 78
5. Representação esquemática dos padrões obtidos em eletroforese de proteína total de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* em gel de poliacrilamida, corrida vertical e sistema descontínuo.----- 81
6. Intervalos de confiança da Potência relativa das linhagens E9 (1), Pegro(2), BSA(3) e V14(4) de *M. anisopliae*.----- 122

1. INTRODUÇÃO

O fungo filamentoso entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* vem sendo utilizado como agente microbiano no controle biológico de insetos pragas de importância agrícola, inclusive no Brasil desde meados da década de 1970, contra as cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata*) e das pastagens (*Zulia entreceriana* e *Deois schach*).

M. anisopliae apresenta grande variabilidade genética no que tange a diversos aspectos, inclusive à produção de enzimas extracelulares (amilases, lipases, proteases e quitinases) citadas por diversos autores como importantes no processo de patogênese. Muitos destes autores relacionam variações na produção destas enzimas à variações na virulência de linhagens do fungo (ROBERT & AL AIDROOS, 1985 e SILVA & MESSIAS, 1986). A produção destas enzimas relacionadas com as fases iniciais de penetração do fungo no inseto, tem sido estudada com detalhes e é um aspecto muito discutido na literatura (SAMSINÁKOVÁ &

MISIKOVÁ, 1973; PARIS & FERRON, 1978; GRULA *et al.* 1984; SILVA & MESSIAS, 1986; ST LEGER *et al.*, 1986a; St LEGER *et al.*, 1986b; ST LEGER *et al.*, 1989 e SAMUELS *et al.*, 1989).

A germinação dos conídios é o primeiro passo para a infecção do inseto, seguida pela formação de estruturas denominadas apressórios que vão efetivar a penetração da cutícula, numa combinação de ação mecânica e enzimática.

O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos relacionados à germinação de conídios de três linhagens de *N. anisopliae*, tais como, o efeito da seleção de conídios precocemente germinados sobre o tempo de germinação mínimo (TGM); as modificações na quantidade de proteína total nos conídios durante o processo de germinação e, a atividade intra e extracelular nos conídios, de enzimas relacionadas com a penetração do fungo no inseto, bem como a variação desta atividade também no processo de germinação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTRÔLE BIOLÓGICO

O fungo *M. anisopliae* var *anisopliae* vem sendo utilizado como uma alternativa de controle de populações de insetos pragas, de importância médica e agrícola. Por se tratar de um microorganismo, no caso um fungo filamentoso, verifica-se o uso da expressão "controle microbiano de insetos", que nada mais é que um método de controle biológico. DE BACH(1968), definiu o controle biológico como sendo a ação de parasitos, predadores e patógenos no sentido de manter a população de um determinado organismo praga em níveis inferiores aos que existiriam em sua ausência, ou, em termos práticos, em nível populacional abaixo do nível de dano econômico.

Visando a obtenção de maior produtividade e sanidade de safras de plantas cultivadas, foram desenvolvidas técnicas agrícolas diversas e, dentre elas o uso de inseticidas químicos que tiveram enorme difusão. Verificou-se, entretanto, que o uso

inadequado e indiscriminado desses produtos tem causado desequilíbrios ecológicos, que afetam inclusive, o próprio homem. FRANZ(1961) e CAMERON(1963) ressaltaram os efeitos tóxicos desses produtos, sua ação sobre os próprios inimigos naturais ou competidores dos insetos pragas, e também, sobre outros insetos úteis, como os que promovem a polinização.

Todos estes problemas ligados ao uso dos inseticidas levaram os pesquisadores a um maior interesse pela prática alternativa do controle biológico. KIRSCHBAUM(1985), refere-se às vantagens dos inseticidas biológicos enfatizando a sua alta especificidade, inocuidade ao homem, animais e meio ambiente, bem como a ausência de resíduos tóxicos decorrentes de seu uso que possam entrar em cadeias alimentares ou afetar suprimentos naturais de água. ROBERTS(1989), em trabalho de revisão sobre controle biológico de insetos por fungos, ressalta a necessidade de pesquisa sobre alternativas não químicas para o controle dos insetos pragas, e relata que os fungos entomopatogênicos vem tomando um papel importante dentro dessas alternativas. O

mesmo autor cita ainda que praticamente, todas as ordens de insetos são susceptíveis à doenças fúngicas e que os fungos são particularmente importantes no controle dos insetos sugadores de plantas e dos insetos da ordem Coleoptera pois a maioria deles não é susceptível a doenças causadas por bactérias e vírus.

O fungo *M. anisopliae* tem sido apontado como um agente de controle biológico de grande potencialidade. VEEN (1968), citou que este entomopatógeno tem como hospedeiros mais de 200 espécies de insetos, os quais, segundo FARGUES *et al.* (1975), pertencem a 43 famílias e 7 ordens. Vários autores registraram a ação entomopatogênica de *M. anisopliae* sobre diferentes espécies de insetos e as tentativas de utilizá-lo em controle biológico (BALFOUR-BROWNE, 1960; ZACHARUK & TINLINE, 1968; GOYER & BENJAMIN, 1971; FERRON *et al.*, 1975; MOURA COSTA, 1978; SHERLOCK & GUITTON, 1982; DAOUST *et al.*, 1982; LATCH & KAIN, 1983; GARCIA *et al.*, 1985; MESSIAS *et al.*, 1986; LECUONA *et al.*, 1986; AGUDA *et al.*, 1987; HUXAM *et al.*, 1989; SAMUELS *et al.*, 1989 e ROBERTS *et al.*, 1989).

No Brasil, *M. anisopliae* vem sendo utilizado contra insetos da ordem Homoptera, conhecidos como cigarrinhas da cana-de-açúcar (*Mahanarva posticata* STAL) e das pastagens (*Zulia entreriana* BERG e *Deois schach* (F.)). GUAGLIUMI(1970), foi um dos primeiros pesquisadores no Brasil a se interessar pelo uso do fungo em campo contra a cigarrinha da cana-de-açúcar. Em 1972, o próprio GUAGLIUMI concluiu, após experimentos em campo, que o fungo era de grande importância para o controle da cigarrinha no Estado de Pernambuco e recomendou a sua utilização como uma forma viável e alternativa ao controle desta praga. MENDONÇA & COSTA (1980), empregaram *M. anisopliae* no Estado de Alagoas contra a cigarrinha da folha da cana-de-açúcar (*M. posticata*) no ano de 1979 e obtiveram bons resultados de controle. MARQUES(1981), relatou que o IAA/PLANALÇUCAR utilizou *M. anisopliae* em plantações de cana-de-açúcar nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte num total de 101.105 ha atingindo ninfas e adultos de *M. posticata* numa proporção de 23,14 e 40,39% respectivamente. ALVES et al.(1984),

relataram que *M. anisopliae* também estava sendo utilizado para o controle das cigarrinhas das pastagens, gêneros *Deois* e *Zulia*, e estimando que anualmente 120.000 ha de pastagens estavam sendo tratadas com formulações comerciais à base deste fungo no Brasil.

A utilização deste tipo de controle vem sendo tentada também com insetos vetores de doenças de importância para a saúde pública. MESSIAS(1989), cita a utilização de *M. anisopliae* no controle de vetores da doença de Chagas.

2.2 POSIÇÃO TAXONÔMICA E CARACTERÍSTICAS DE *M. anisopliae*

Segundo PETCH(1931), o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* foi isolado pela primeira vez de um besouro, *Anisoplia austriaca*, na Rússia por METSCHNIKOFF, tendo recebido a denominação de *Entomophthora anisopliae*. Em 1883 SOROKIN reclassificou o isolado de METSCHNIKOFF para um novo gênero, *Metarhizium*. PETCH(1931), citou ainda que o mesmo fungo foi descrito por vários autores, em diferentes hospedeiros, com ou-

tras denominações como *Oospora destructor*, *Septocylindrium suspectum* e *Penicillium anisopliae*. Espalhou-se pela literatura uma grafia incorreta do gênero com um "r" adicional (*Metarrhizium*) que, segundo TULLOCK(1976), deveu-se à dificuldade de obtenção da descrição original.

O gênero *Metarhizium* pertence à Subdivisão Deuteromicotina, Classe Deuteromycetes e Família Moniliaceae (ALEXOPOULOS,1983). São reconhecidas duas espécies, *M. anisopliae* e *M. flavoviride* (TULLOCK, 1976 e RIBA *et al.*, 1990). Segundo BARON(1968), o fungo possui corpo de frutificação semelhante a um esporodóquio, conidióforos ramificados do tipo fiálides, que geram conídios em cadeia, não septados, cilíndricos e em geral hialinos ou com leve pigmentação.

Vários autores encontraram diferentes tamanhos de conídios de isolados de diversos hospedeiros de *M. anisopliae* e PETCH(1931), sugeriu que espécies ou variedades poderiam ser separadas por este critério. BALFOUR-BROWNE(1960), citou que os conídios variam de tamanho em diferentes raças, de 4,8 a 14µm

de comprimento, sendo que os tipos de conídios menores seriam mais comuns. TULLOCK(1976), baseando-se no trabalho de JOHNSTON em 1915, que propôs a separação em formas longas e curtas de conídios de *M. anisopliae*, definiu duas variedades para a espécie baseando-se principalmente no tamanho dos conídios, a variedade *anisopliae*, de conídios curtos (3,5 a 9,0 μ m de comprimento) e a variedade *major* de conídios longos (9,0 a 18 μ m de comprimento). LUNA(1985), estudando várias linhagens de *M. anisopliae* obteve indicações de que a grande variação na forma e tamanho de conídios parece ser característica do gênero, não se relacionando tão estritamente às condições de cultura.

M. anisopliae apresenta conídios uninucleados, mas uma pequena porcentagem, em torno de 5%, exibe dois ou mais núcleos(ZACHARUK,1970a;VEEN,1967;TINLINE,1971; MESSIAS & AZEVEDO, 1980 e LUNA,1985). Em 1971 TINLINE & NOVIELLO, sugeriram que os conídios binucleados estariam em processo de germinação. AZEVEDO & MESSIAS(1981), estudando 8 isolados do fungo quanto ao volume e tamanho dos conídios sugeriram que a variedade

major poderia ser tetraploide, ou, que os conídios seriam tetranucleados.

O processo de heterocariose em *M. anisopliae* foi descrito por TINLINE & NOVIELLO em 1971. MESSIAS(1979), MESSIAS & AZEVEDO(1980) e AL-AIDROOS(1980), demonstraram o ciclo parassexual neste fungo. SILVEIRA(1983), obteve protoplastos de *M. anisopliae* e a fusão entre protoplastos de mutantes morfológicos e auxotróficos. BAGALHI & AZEVEDO(1988), relataram a ocorrência de paramiose também em *M. anisopliae*. Atualmente, métodos de biologia molecular já possibilitaram a transformação genética neste fungo(BERNIER *et al.*, 1989 e GOETTEL *et al.*, 1990) criando-se assim mais um mecanismo disponível para a obtenção de novos genômas. Todos estes trabalhos proporcionaram maiores possibilidades de estudos genéticos e de melhoramento da espécie, aspectos de grande interesse para o controle biológico utilizando *M. anisopliae*.

2.3 CARACTERÍSTICAS CULTURAIS

Em meios de cultura sólidos *M. anisopliae* forma colônias circulares de coloração esverdeada ou branco amarelada. HUBER(1958), citou que este fungo é pouco exigente em termos nutricionais e outros autores constataram o seu bom desenvolvimento em diferentes meios de cultura(ADAMEK,1965; EVILAKOVA,1966; HIDALGO-SALVATIERRA & BERRIOS,1972; AQUINO,1974 e VILLACORTA,1978).O arroz cozido tem sido bastante utilizado para a produção em massa do fungo com muitas vantagens tais como ,boa produção de esporos, baixo custo e fácil manuseio(AQUINO *et al.*,1975 e 1977; MARQUES *et al.*,1981; DAoust & ROBERTS,1983 e BARBOSA *et al.*,1985). Além disto, os meios Mínimo e Completo descritos por PONTECORVO *et al.*(1953) para *Aspergillus nidulans* também tem sido bastante empregados em estudos sobre *M. anisopliae*. LI & HOLDON(1990), trabalhando com dois isolados de *M. anisopliae*, testaram o efeito de 8 carboidratos, 6 ácidos orgânicos, 17 fontes de nitrogênio e 6 vitaminas sobre a germinação de conídios, crescimento micelial e

esporulação em meio de agar. Os carboidratos foram testados sempre com peptona ou com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. Todos os carboidratos aumentaram a esporulação. A sorbose inibiu o crescimento com ambas as fontes de nitrogênio e inibiu a germinação dos conídios no meio onde a fonte de nitrogênio era o nitrato de potássio. O amido produziu grande esporulação em meio onde a fonte de nitrogênio era a peptona, e glicose, maltose e manose produziram maior esporulação em meio onde a fonte de nitrogênio era o nitrato de potássio. Os ácidos orgânicos oxálico, sórbico e tartárico inibiram completamente a germinação dos conídios enquanto que os ácidos acético, cítrico e málico reduziram o crescimento e a esporulação mas não inibiram a germinação. *M. anisopliae* foi capaz de utilizar nitratos de sódio e de amônia como fonte de nitrogênio. Apenas a cisteína inibiu o crescimento e a esporulação. A treonina, lisina e sulfato de amônia produziram os melhores níveis de esporulação. Nenhuma vitamina aumentou o crescimento ou a esporulação dos isolados. A piridoxina inibiu a germinação de ambos os isolados

e, a biotina e riboflavina de apenas um deles.

A temperatura ótima para o crescimento do fungo, segundo vários autores, situa-se entre 25 e 30°C (LATCH, 1965; EVILAKOVA, 1966; MOURA COSTA & MAGALHÃES, 1974; BASTOS & DA MATA, 1976; VILLACORTA, 1978 e SANTOS, 1978)

Segundo HUBER (1958), a faixa de pH para o crescimento de *M. anisopliae* situa-se entre 3,5 e 8,5, sendo o ótimo 6,9.

Os conídios de *M. anisopliae* não são capazes de germinar em água destilada, necessitando de uma fonte exógena de nutrientes para que isto ocorra (HASSAN *et al.*, 1989). DILLON & CHARNLEY (1990), verificaram que o prévio embebedimento dos conídios de *M. anisopliae* em água destilada, seguido da adição de nutrientes reduz o tempo de aparecimento dos tubos germinativos e, em alguns isolados, provoca também o aumento da taxa de germinação.

ARRAIS DE MATOS (1983), verificou que os conídios deste fungo germinam assincrônicamente em Meio Mínimo, e, em

aproximadamente 12 horas, 90% deles já apresentam tubo germinativo.

2.4 VARIABILIDADE EM *M. anisopliae*

M. anisopliae apresenta uma grande variabilidade genética, já assinalada por diversos autores que observaram entre outros parâmetros, variações a nível citológico, nos perfis bioquímicos e biológicos, nos padrões eletroforéticos e imunoeletroforéticos e, em análises de pirólise acoplada à cromatografia gasosa (FARGUES *et al.*, 1975; VALE *et al.*, 1980; FARGUES *et al.*, 1981; DURIEZ-VAUCELLE, 1981; SOZA GOMES & ALVES, 1983; MESSIAS *et al.*, 1983; LUNA, 1985; RIBA *et al.*, 1986; RIBA *et al.*, 1987; e SAMUELS *et al.*, 1989). O estudo dos padrões eletroforéticos tem permitido comparações entre linhagens selvagens, além de incrementar o conhecimento de alterações que ocorreram em mutantes obtidos artificialmente, recombinantes, e produtos de fusão protoplasmática (DE CONTI *et al.*, 1980; SILVEIRA, 1983; SILVA & AZEVEDO, 1983; ST LEGER *et al.*, 1986; VALADARES, 1989 e

SAMUELS *et al.*, 1989). ROSATO *et al.* (1981), verificaram que diferentes isolados de *M. anisopliae* também apresentam variações quanto à produção de enzimas extracelulares relacionadas com a penetração do fungo no inseto (proteases, amilases, lipases e quitinases), variações estas que permitiriam inclusive, a obtenção de um perfil da origem geográfica das espécies. Segundo alguns autores, as variações na produção destas enzimas podem estar relacionadas também a variações na virulência dos vários isolados de *M. anisopliae* (ROBERT & AL-AIDROOS, 1985; SILVA & MESSIAS, 1986).

2.5. PATOGENICIDADE DE *M. anisopliae*

Dois termos têm sido amplamente utilizados quando se trata de avaliar o efeito de um fungo sobre o inseto hospedeiro: patogenicidade e virulência. Geralmente são considerados como termos intercambiáveis, mas, segundo FUXA & TANADA (1987), patogenicidade estaria mais relacionado a grupos ou espécies de patógenos, enquanto virulência, determinaria o grau desta pato-

genicidade dentro de um grupo de espécies ou patógenos.

A entomopatogenicidade de um fungo, ou seja a capacidade de produzir doença em insetos, depende da ocorrência de eventos sequenciais que se iniciam pela deposição do esporo sobre a cutícula do inseto seguida pela germinação, penetração da hifa através do tegumento, colonização do interior e exteriorização do fungo com produção de esporos sobre o cadáver do inseto (ROBERTS & HUMBER, 1983). Luz, temperatura, umidade, viabilidade e características da germinação dos conídios, tamanho do inóculo e virulência dos isolados são fatores críticos que se relacionam ao patógeno assim como susceptibilidade e densidade populacional se relacionam ao hospedeiro (BALFOUR-BROWNE, 1960; SHAERFFENBERG, 1964; CLERK & MADELIN, 1965; LATCH, 1965; MC LEOD *et al.*, 1966; BELL & HAMALE, 1974; RIZZO, 1977; DOBERSKI, 1980 e 1981; HANEL, 1981; DAOUST *et al.*, 1983a; ROBERTS & HUMBER, 1983 e PRIOR & ARURA, 1985; HASSAN *et al.*, 1989 HUXAM *et al.*, 1989 e DILLON & CHARNLEY, 1990).

A germinação do conídio do fungo entomopatogênico é o primeiro passo para a infecção. Temperatura e umidade afetam o processo de germinação de diversos fungos, entre eles os entomopatogênicos. Em geral alta umidade relativa é necessária para a germinação (ROBERTS & CAMPBELL, 1977). HYWEL-JONES & GILLESPIE (1990), trabalhando com três isolados de *B. bassiana* e de *M. anisopliae* em laboratório, verificaram que a temperatura afetou a taxa de germinação de ambos. Os conídios de *M. anisopliae* germinaram mais rapidamente que os de *B. bassiana*, e, numa faixa de temperatura de 25-30°C 95% dos conídios de *M. anisopliae* germinaram em 10-14 horas enquanto que os de *B. bassiana* em 10-25 horas na mesma faixa de temperatura.

HASSAN *et al.* (1989), relataram o efeito de um embebedimento prévio dos conídios de *M. anisopliae* sobre a taxa de germinação e sobre o índice de mortalidade no hospedeiro *Manduca sexta*. Os autores trabalhando com um isolado de *M. anisopliae*, verificaram que conídios previamente embebidos durante 20 horas em água destilada esterilizada e colocados sobre

a cutícula dos insetos hospedeiros, germinaram e formaram apressórios muito mais rapidamente que conídios não tratados por embeбimento. Além disto, insetos tratados com conídios previamente embebidos mostraram um índice de mortalidade significativamente maior que os insetos tratados com conídios que não sofreram embeбimento. Os autores sugerem que a velocidade e sincronia da germinação e formação de apressórios são fatores limitantes no processo de patogênese.

Segundo ANDERSEN(1979), a cutícula dos insetos, primeira barreira para a penetração do fungo, pode ser dividida em epicutícula, constituída de lipídeos e proteínas, e procutícula, constituída de proteínas, lipídeos, quitina, pigmentos e matéria inorgânica. Sabe-se que além da resistencia mecânica, a cutícula também pode oferecer uma resistência química através de substâncias nela presentes que exercem ação inibitória sobre o fungo (GRULA *et al.*,1984; LACEY *et al.*,1988 e MESSIAS e PUPIN,1990). MESSIAS & PUPPIN(1990), relataram que os lipídeos presentes na epicutícula de *Diatraea saccharalis*, entre eles os

ácidos caprílico e capróico inibem o crescimento de *M. anisopliae*. Atualmente, aceita-se que o mecanismo de penetração dos fungos na cutícula dos insetos envolve a ação de enzimas degradadoras dos componentes desta cutícula como proteases, amilases, lipases e quitinases, e, a ação de pressão mecânica (ST LEGER *et al.*, 1988; St LEGER *et al.*, 1989 e 1989b e ROBERTS, 1989). BALFOUR-BROWNE, em 1960 sugeriu que a penetração de fungos entomopatogênicos na cutícula dos insetos se daria pela secreção de enzimas de degradação que possibilitariam a invasão posterior da cavidade interna. ROBINSON (1966), trabalhando com *M. anisopliae* entre outros fungos entomopatogênicos, concluiu que o processo de penetração no inseto era em parte mecânico e em parte enzimático. MADELIN (1968), relatou que a enzima quitinase auxiliaria a penetração dos fungos entomopatogênicos. MC CAULEY *et al.* (1968), trabalhando com hospedeiros Elaterídeos observou que no processo patogênico de *M. anisopliae* estavam envolvidos uma ação histolítica inicial, o bloqueio mecânico do intestino do inseto, modificações patoló-

gicas da hemolinfa e produção de toxinas pelo fungo.

O processo patogênico inclui a formação, após a germinação do conídio, de estruturas de infecção denominadas apressórios. Os trabalhos de ZACHARUK (1970a, 1970b e 1970c; 1971 e 1973), utilizando microscopia eletrônica em diversas fases do processo patogênico por *M. anisopliae*, relatam, entre outras observações, grande atividade metabólica secretora nas células apressoriais do fungo, pela abundante presença de mitocôndrias, dictiossomos, e retículo endoplasmático. Relatam ainda, o desaparecimento da camada lipídica da cutícula do inseto no ponto de contacto com o apressório, indicando uma possível utilização deste material pelo patógeno, e a presença de um muco envolvendo as paredes apressoriais que serviria provavelmente, como adesivo. Este autor também sugere que o processo de penetração do fungo na epicutícula do inseto seria facilitada pela pressão mecânica sendo primariamente, enzimática.

ST LEGER *et al.* (1989), demonstraram que conídios de *M. anisopliae* após germinarem são induzidos a formar apressó-

rios quando o tubo germinativo contacta uma superfície dura. Demonstraram ainda que as frequências de diferenciação em estruturas infectivas, é muito maior quando as superfícies são hidrofóbicas (teflon ou polipropileno por exemplo) do que quando são hidrofílicas (celofane). Esta diferenciação conseguida *in vitro*, foi estimulada por baixos níveis de nutrientes que continham nitrogênio. A diferenciação durante a patogênese parece ser estimulada pela presença, em combinação, de aminoácidos e lipídeos componentes da epicutícula e da superfície hidrofóbica, fato evidenciado através da análise de meios multicomponentes. A inibição da síntese de DNA e RNA não impediu a germinação dos conídios de *M. anisopliae* mas bloqueou a diferenciação, quando os inibidores foram aplicados antes da segunda divisão nuclear, o que pode indicar que os estímulos tigmotrópicos e químicos para a produção de apressórios estão relacionados à segunda divisão nuclear.

A produção de exoenzimas por fungos entomopatogênicos tem sido bastante estudada. GABRIEL (1968b), anali-

sando histoquímicamente cutículas de insetos infectados por *Entomophthora coronata* encontrou uma correlação entre a atividade lipolítica e os pontos de penetração na cutícula.

GABRIEL(1968a), testou em meios de cultura a produção de lipase, quitinase e protease por vários fungos entomopatogênicos e considerou a quitinase com sendo uma enzima adaptativa, uma vez que a quitina não foi degradada quando estavam presentes outras fontes de carbono. Quanto à atividade lipolítica, o autor observou uma seletividade de substratos, não havendo degradação de compostos de ácido oleico e caprílico. ST LEGER *et al.* (1986b), demonstraram posteriormente, que a síntese de quitinase é regulada pelos produtos de degradação da quitina através do mecanismo de indução-repressão e sugeriram a existência de uma correlação negativa entre crescimento e produção de quitinase. ST LEGER *et al.* (1988), através de estudo utilizando n-alcanos como única fonte de carbono, concluíram que a produção de lipases por *M. anisopliae* ocorre de maneira indutiva.

Com relação a proteases, KUCERA & SAMSINÁKOVÁ(1980),

isolaram proteases de *M. anisopliae*, separando dois componentes, um, com atividade neutra, que foi denominado protease P1 e outro, com atividade alcalina, que foi denominado protease P2, prevalecendo a P1 em termos de efeito sobre o inseto *Galleria mellonella*. KUCERA(1984), isolou de insetos, substâncias que tinham atividade inibidora sobre estas proteases de *M. anisopliae*. ST LEGER *et al.*(1987), verificaram a presença de enzimas proteolíticas em nove isolados de Deuteromicetos entomopatogênicos, entre eles *M. anisopliae*. GOETTEL *et al.* (1989), utilizando métodos sorológicos demonstraram em *M. anisopliae* que a protease P1 é produzida durante a penetração na cutícula do hospedeiro pelos apressórios e pela hifa penetrante, havendo uma combinação entre a degradação e a pressão mecânica. Inicialmente, a protease P1 foi encontrada confinada à vizinhança imediata das estruturas fúngicas, mas se difundiu na cutícula nos estágios posteriores. Além disso, esta enzima foi encontrada ligada à parede celular em hifas crescidas em condições de rápida indução de sua síntese. ST LEGER *et al.*

(1989a), relataram que uma protease com atividade de quimoelastase foi o principal produto protéico obtido quando conídios de *M. anisopliae* produziram estruturas de infecção sobre uma superfície artificial ou *in situ*, durante penetração na cutícula do hospedeiro. A produção desta quimoelastase foi favorecida por baixos níveis de nutrientes, insuficientes para que se produzisse uma repressão catabólica. A adição de nutrientes facilmente utilizáveis, como a alanina, causou um crescimento extensivo da hifa sobre a cutícula do hospedeiro, mas reprimiu a penetração e a síntese destas quimoelastases. O controle da produção da enzima ocorre a nível de transcrição, pois a adição de 8-azoguanidina e actinomicina D inibiram sua produção. Os autores comentam ainda, que o processo patogênico envolvendo a morfogênese e a produção de enzimas degradadoras da cutícula, parece ocorrer somente quando o patógeno necessita estabelecer uma relação nutricional com o hospedeiro.

A degradação da cutícula parece ocorrer de maneira sequencial. SAMSINÁKOVÁ *et al.* (1971), utilizaram misturas de

enzimas comerciais lipases, proteases e quitinases e, também, filtrados de cultura de *B. bassiana* sobre cutículas de *G. mellonella* e observaram que as lipases e proteases atacaram a cutícula antes das quitinases. ST LEGER *et al.* (1986a), usando cutículas de inseto como indutor, isolaram proteases e quitinases de fungos entomopatogênicos, e verificaram que, as proteases atacaram a cutícula antes das quitinases sendo que a combinação das duas enzimas pareceu aumentar a degradação da cutícula.

Fatores como, velocidade de germinação dos conídios, produção de enzimas extracelulares e produção de toxinas entre outros, estão relacionados com a virulência de um fungo entomopatogênico. AL AIDROOS & ROBERTS (1978), observaram um mutante espontâneo de *M. anisopliae* que apresentava densa produção de conídios, rápida germinação e produção de toxinas *in vitro*, e alta virulência. AL AIDROOS & SEIFERT (1980), relacionaram a velocidade de germinação dos conídios de *M. anisopliae* com virulência. RIBA *et al.* (1985), em estudos genéticos sobre a viru-

lência de *M. anisopliae*, relataram que a mesma deve ser o resultado da manifestação da interação de muitos genes, como ocorre em fungos fitopatogênicos.

O papel da produção de exoenzimas na virulência de fungos entomopatogênicos é assunto de extensiva discussão na literatura. SAMSINÁKOVÁ & MISIKOVÁ(1973), trabalhando com vários fungos entomopatogênicos, não encontraram relacionamento entre produção de exoenzimas e virulência das linhagens. Vários trabalhos com *B. tenella* e o hospedeiro *Melolontha melolontha* sugerem que uma alta produção de lipase estaria relacionada à maior virulência da linhagem, o mesmo não ocorrendo com a produção de proteases e quitinases (SEGRETAIN *et al.*, 1971; PARIS & SEGRETAIN, 1975 e 1978; PARIS *et al.*, 1975 e PARIS & FERRON, 1979). Outros trabalhos, com *B. bassiana* e o hospedeiro *Heliothis zea* indicaram não haver relacionamento entre produção de lipases, proteases e quitinase e virulência (GRULA *et al.*, 1978; CHAMPLIN & GRULA, 1979; PEKRUL & GRULA, 1979; SMITH *et al.*, 1981 e GRULA *et al.*, 1984). PAVLYUSHIN(1978), testando a pato-

genicidade de linhagens de *B. bassiana* a vários insetos, observou que linhagens com menor virulência exibiam reduzidas atividades proteolítica e lipolítica. O mesmo autor, verificou ainda, que um mutante induzido por luz UV com altos níveis de atividade proteolítica, também apresentava maior virulência a *G. mellonella*.

AL AIDROOS & SEIFERT(1980), verificaram em *M. anisopliae*, que mutantes com atividade amilolítica aumentada, exibiam alta virulência a larvas de *Culex pipiens*, mas, mutantes para a atividade proteolítica, não apresentavam modificação na virulência. SUNDARABU *et al.*(1984), relacionaram os níveis de produção de lipases e quitinases com a virulência de *M. anisopliae* var *major* a *Oryctes rhinoceros*. ROBERT & AL AIDROOS(1985), observaram um relacionamento entre mutações para a atividade amilolítica e hipervirulência, o mesmo não ocorrendo com mutações para as atividades proteolítica e lipolítica em *M. anisopliae*. SILVA & MESSIAS(1986), realizando bioensaios com o inseto *Rhodnius prolixus*, verificaram que mutantes de *M.*

anisopliae que deixaram de produzir lipases e amilases, tiveram virulência menor que a das linhagens selvagens, enquanto que mutantes para a produção de proteases, não apresentaram níveis de virulência significativamente diferentes dos níveis das linhagens selvagens. Além disto, linhagens revertentes para a produção das duas primeiras enzimas tiveram seus níveis de virulência restaurados, concluindo os autores que a virulência das linhagens se altera quando ocorrem modificações na produção de enzimas. SAMUELS *et al.* (1989), estudando 25 isolados de *M. anisopliae* verificaram que, entre outras características, como rápida germinação e pequeno volume do conídio, os isolados que apresentavam alta virulência a um inseto praga do arroz *Nilaparva lugens* (HOMOPTERA: DELPHACIDAE), mostravam produção detectável de quitinases, proteases e lipases, mas o mesmo não ocorria para a produção de amilases.

O processo de degradação enzimática da cutícula dos insetos parece envolver mecanismos muito complexos de interação com o hospedeiro específico. ST LEGER (1986a), sugeriu um meca-

nismo de ligação eletrostática entre grupos carregados positivamente nas proteases produzidas por *M. anisopliae* e os grupos carboxilas da cutícula dos insetos, verificando que a adsorção das enzimas na cutícula era inibida pelo bloqueio das cargas destes grupos carboxila.

M. anisopliae, como outros fungos entomopatogênicos, produz toxinas, compostos de baixo peso molecular e de papel também discutido na patogênese. Em 1962, KODAIRA, referiu-se à produção de toxinas em meio de cultura pelo fungo *Dospora destructor*, que foram denominadas dextruxinas A e B (PF 185 e 234°C respectivamente). A produção em meio de cultura destas toxinas por *M. anisopliae* foi confirmada por outros autores (ROBERTS, 1966a, 1966b e 1969 e VEEN, 1968). ROBINSON (1966), relacionou a patogenicidade de *M. anisopliae* com a produção de toxinas e enzimas. Em 1981, ROBERTS descreveu para *M. anisopliae*, quatro dextruxinas (A, B, C e D) e uma citocalasina. O autor relatou ainda, que as toxinas eram eficientes para matar insetos por via oral, contato ou injeção na hemocèle, agindo

através de paralisia tetânica. SAMUELS *et al.* (1988), trabalhando com três isolados de *H. anisopliae* e com o hospedeiro *Manduca sexta*, relataram que o isolado mais virulento produziu maiores quantidades de dextruxinas *in vitro* do que isolados de menor virulência. Da hemolinfa dos insetos infectados com o isolado de maior virulência foi recuperada a dextruxina A, o mesmo não tendo ocorrido com a hemolinfa de insetos inoculados com os isolados de menor virulência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS DE *M. anisopliae* UTILIZADAS

Foram utilizadas as linhagens E9, V14, Pegro e BSA de *M. anisopliae* var *anisopliae* mantidas no banco de germoplasma de fungos entomopatogênicos do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

As linhagens Pegro e E9 foram isoladas no Estado de Espírito Santo, de cigarrinhas de pastagem (*Deois flavopicta*, Homoptera:Cercopidae) infectadas naturalmente; a linhagem V14, dos EUA, de *Conoderus* sp (Coleoptera:Elateridae); e a linhagem BSA, do Estado de Alagoas, de *M. posticata* infectada naturalmente.

3.2. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.2.1. ÁCIDO NUCLEICO DE LEVEDURA(AZEVEDO & COSTA, 1973)

Solução A:

Ácido Nucleico de levedura	---	2,0g
Solução de NaOH 1N	-----	15,0ml

Solução B:

Ácido Nucleico de levedura	---	2,0g
Solução de HCl 1N	-----	15,0ml

As soluções A e B foram aquecidas separadamente em "Banho-Maria" durante 20 minutos e em seguida o pH foi corrigido para 6,0. A mistura foi filtrada, sendo o volume completado para 40ml e estocada em frasco escuro sob refrigeração.

3.2.2. SOLUÇÃO DE VITAMINAS

Ácido nicotínico	-----	100,0mg
Ácido p-aminobenzóico	-----	10,0mg
Biotina	-----	0,2mg
Piridoxina	-----	50,0mg
Riboflavina	-----	100,0mg
Tiamina	-----	50,0mg
Água destilada esterilizada	-	100,00ml

A solução foi armazenada em frasco escuro a 4°C, após sofrer o processo de Tindalização.

3.2.3. MEIO MÍNIMO(MM)(PONTECORVO *et al.*, 1953)

NaNO ₃	-----	6,0g
KH ₂ PO ₄	-----	1,5g
KCl	-----	0,5g
MgSO ₄	-----	0,5g
FeSO ₄	-----	traços

ZnSO ₄	-----	traços
Glicose	-----	10,0g
Água destilada	-----	1000,0ml

O pH foi ajustado para 6,8 com solução de NaOH(1N) ou HCl(1N). Para o meio sólido acrescentou-se 15g de ágar-ágar. A esterilização procedeu-se em autoclave a 120°C, 1 atm por 15 minutos.

3.2.4. MEIO COMPLETO(MC)(PONTECORVO *et al.*, 1953 modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Adicionou-se a 1000 ml de MM:

Peptona	-----	2,0g
Caseína hidrolizada	-----	1,5g
Extrato de levedura	-----	0,5g
Solução de vitaminas	-----	1,0ml (Item 3.2.2.)

Hidrolizado de ácidos

nucleicos de levedura ----- 2,5ml(Item 3.2.1.)

O pH foi ajustado para 6,8 com solução de NaOH(1N) ou HCl(1N). Para o meio sólido acrescentou-se 15g de ágar-ágar. A esterilização procedeu-se em autoclave a 120°C, 1 atm por 15 minutos.

3.2.5. MEIO DE ARROZ

Arroz ----- 100,0g

Água destilada ----- 70,0ml

O arroz umedecido foi colocado em sacos de polipropileno e esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos.

3.2.6. SOLUÇÃO DE TWEEN 80(0,1% v/v)

Tween 80 ----- 0,1ml

Água destilada ----- 99,0ml

Procedeu-se à esterilização em autoclave a 120°C, por 15 minutos.

3.2.7. SOLUÇÃO SALINA(0,85% v/v)

NaCl ----- 8,5g

Água destilada ----- 1000,0ml

Procedeu-se à esterilização, em autoclave a 120°C por 15 minutos.

3.2.8. SOLUÇÃO SATURADA DE SULFATO DE POTÁSSIO

Adicionou-se Sulfato de Potássio a 500ml de água destilada até a saturação, à temperatura ambiente.

3.2.9. SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO(2,5%)

Hipoclorito de Sódio(5%) ---- 5,0ml

Água destilada esterilizada - 5,0ml

3.2.10. TAMPÃO FOSFATO 0,1M pH 7,0

KH_2PO_4	-----	6,8g
NaOH	-----	1,1g
Água destilada	-----	500,0ml

O pH foi corrigido com NaOH 2N

3.2.11. SOLUÇÃO DE SOROALBUMINA BOVINA PARA A CURVA PADRÃO DE
PROTEÍNA

Soroalbumina Bovina	-----	0,001g
Solução de NaCl 0,15M	-----	5,00ml

3.2.12. SOLUÇÃO DO REAGENTE COOMASSIE BRILLIANT BLUE (CBB)

Coomassie Brilliant Blue G-250	-	0,06g
Solução de Ácido Perclórico 3%	-	1000,0ml

Dissolveu-se o CBB previamente, em um Becker contendo uma pequena quantidade de solução de ácido perclórico, e mace-rou-se com bastão de vidro. A solução restante foi adiciona-

da ao macerado, procedendo-se em seguida, a uma filtração em papel de filtro. O reagente foi testado procedendo-se a uma leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 465nm (os valores de absorbância obtidos nestas condições devem estar entre 1,3 e 1,5). Esta preparação pode ser armazenada por um ano.

3.2.13. REAGENTES PARA O TESTE DE ATIVIDADE AMILOLÍTICA

3.2.13.1. REAGENTE A

Na_2CO_3	-----	25,0g
Sal de Rochelle	-----	25,0g
NaHCO_3	-----	20,0g
Na_2SO_4	-----	200,0g

Completou-se o volume para 1000ml com água destilada.

3.2.13.2. REAGENTE B

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-----	15,0g
HCl concentrado	-----	uma gota
Água destilada	-----	100,0ml

3.2.13.3. REAGENTE ARSENMOLIBDATO

Molibdato de amônia	-----	25,0g
HCl concentrado	-----	21,0ml
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	3,0g
Água destilada	-----	450,0ml

3.2.14. REAGENTES PARA ELETROFORESE

3.2.14.1. SOLUÇÃO ESTOQUE DO TAMPÃO DE CORRIDA(Tris-glicina

pH 8,3)

Glicina	-----	28,8g
---------	-------	-------

Dissolveu-se em 1000ml de água desmineralizada, e ajustou-se o pH para 8,3 com trizma base ou glicina

Preparo do tampão de corrida: Diluiu-se uma parte da solução estoque do tampão de corrida em 9 partes de água desmineralizada.

3.2.14.2. SOLUÇÃO ESTOQUE DE TAMPÃO TRIS-Cl pH 8,9

Trizma base	-----	36,60g
Água desmineralizada	-----	50,00ml
TEMED	-----	0,23ml

Ajustou-se o pH para 8,9 com HCl concentrado e completou-se o volume para 100ml com água desmineralizada.

3.2.14.3. SOLUÇÃO ESTOQUE DE TAMPÃO TRIS-Cl pH 6,7

Trizma base	-----	5,98g
Água desmineralizada	-----	50,00ml
TEMED	-----	0,46ml

Ajustou-se o pH para 6,7 com Hcl concentrado e completou-se o volume para 100ml com água desmineralizada

3.2.14.4. SOLUÇÃO ESTOQUE DE GEL ACRILAMIDA SEPARADOR

Acrilamida ----- 28,00g

Bis-acrilamida ----- 0,74g

Completou-se o volume para 100ml com água desmineralizada e estocou-se a 4°C no escuro.

3.2.14.5. SOLUÇÃO ESTOQUE DE GEL EMPILHADOR

Acrilamida ----- 10,00g

Bis-acrilamida ----- 2,50g

Completou-se o volume para 100ml com água desmineralizada e estocou-se a 4°C no escuro.

3.2.14.6. SOLUÇÃO DE PERSULFATO DE AMÔNIA

Persulfato de amônia ----- 0,02g

Água desmineralizada ----- 0,50ml

Preparado sempre na hora do uso.

3.2.14.7. SOLUÇÃO DE RIBOFLAVINA

Riboflavina ----- 0,004g

Água desmineralizada ----- 100,00ml

3.2.14.8. SOLUÇÃO DE AZUL-DE-BROMOFENOL

Azul-de-bromofenol ----- 0,025g

Tampão Tris-Cl pH 6,7 ----- 10,00ml

3.2.14.9. GEL SEPARADOR

Tampão tris-Cl estoque pH 8,9 ---- 3,50ml

Gel separador estoque ----- 7,00ml

Água desmineralizada ----- 17,50ml

Adicionou-se 200ul de solução de Persulfato de amônia e retirou-seo ar da solução com auxílio de uma bomba de vácuo.

3.2.14.10. GEL EMPILHADOR

Tampão tris-Cl estoque pH 6,7	---	1,50ml
Gel empilhador estoque	-----	3,00ml
Solução de Riboflavina	-----	1,50ml
Água desmineralizada	-----	6,0ml

Retirou-se o ar da solução com auxílio de uma bomba de vácuo.

3.2.14.11. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ELETROFORESE

Amostra	-----	100ul
Glicerol	-----	10ul
Solução de azul-de-bromofenol	--	10ul

3.2.14.12. SOLUÇÃO DE FIXAÇÃO

Ácido acético glacial a 20% + Metanol na proporção de 1:1. Tempo de fixação de 10 a 30 minutos

3.2.14.13. SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO

Coomassie Brilliant Blue R 250 a 0,25% em Metanol 50% + Ácido acético glacial a 10%. A solução de trabalho foi preparada pela diluição da solução acima, na proporção de 1:20, com uma mistura aquosa de Metanol a 40%, ácido acético a 5% e Glicerol 2,5%. O tempo de coloração mínimo foi de 8 horas.

3.2.14.14. SOLUÇÃO DE DESCOLORAÇÃO

Metanol a 20% + Ácido acético a 5% + glicerol a 2,5%.

3.3. BIOENSAIO COM *M. anisopliae*

3.3.1 HOSPEDEIRO

Utilizou-se como hospedeiros, ninfas de 3 instar, em regime de fome, do inseto *Rhodnius prolixus* STAL, obtidos junto à Superintendência de Contrôles de Endemias

(SUCEN), Mogi-Guaçu, SP.

3.3.2. OBTENÇÃO DO INÓCULO DE *M. anisopliae*

Conídios das quatro linhagens de *M. anisopliae* foram obtidos separadamente, através da inoculação de uma suspensão de 10^8 conídios/ml em Tween 80 a 0,01%(v/v) em meio de arroz umedecido (Item 3.2.5.), por um período de 10 dias. Os esporos produzidos foram recolhidos através do peneiramento do arroz em peneiras de metal esterilizadas.

3.3.3. BIOENSAIO

O bioensaio foi conduzido conforme metodologia proposta por MESSIAS *et. al.* (1986). Trezentos miligramas de conídios de cada uma das quatro linhagens, obtidos como citado anteriormente, foram colocados separadamente, em frascos contendo 8ml de solução salina e 2ml de solução de Tween 80 a 0,01% (v/v). As suspensões de conídios (contendo aproximadamente 10^6 conídios/ml) foram diluídas na proporção 1:10

seriadamente, até a 6 diluição. Nos bioensaios utilizou-se efetivamente, a suspensão original, e as diluições desta a saber: 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} , como doses do patógeno. Verificou-se as quantidades de conídios presentes nas suspensões, observando-se a suspensão diluída 10^{-2} em Câmara de Neubauer e realizando-se os cálculos necessários para as outras diluições. A viabilidade dos conídios de cada linhagem foi obtida pela inoculação de alíquotas destas suspensões em MM, observando-se a germinação após 24 horas e tomando-se em porcentagem os conídios germinados e não germinados num total de 500 conídios.

Discos de papel de filtro de 9cm de diâmetro, contidos em placas de Petri previamente esterilizadas, foram umedecidos homogeneamente com 2ml de suspensão de conídios, separadamente para cada linhagem nas doses apropriadas. Vinte e cinco insetos foram utilizados para as diferentes doses, e deixados caminhar sobre o papel de filtro por 30 minutos. Após este período, grupos de 5 insetos foram transfe-

ridos para frascos de polipropileno tampados com gaze, contendo uma camada de papel de filtro em sua base. Os 5 frascos de polipropileno em cada preparação foram colocados em frascos de vidro com tampa e a umidade no interior destes, foi mantida em torno de 97% de UR, colocando-se dentro deles 150ml de solução saturada de Sulfato de Potássio(WEXLER & HASEGAWA, 1954), sendo o conjunto incubado a 28°C em BOD. O frasco controle, com 25 insetos distribuídos em grupos de 5, foi preparado da mesma maneira, exceto que, neste caso foram deixados caminhar sobre o papel de filtro umedecido apenas com 2ml de solução salina + Tween 80.

A mortalidade foi avaliada diariamente e os insetos mortos retirados a cada verificação.

3.3.4. REISOLAMENTO DAS LINHAGENS EM INSETOS MORTOS DURANTE

O BIOENSAIO

Para se confirmar que a morte dos insetos era causada pela ação do fungo, cada ninfa morta foi desinfecta-

da superficialmente com uma solução de Hipoclorito de Sódio a 2,5% durante 3 minutos, lavada em três passagens com água destilada esterilizada, colocada em placa de Petri com MC e incubada a 28°C por 7 dias. Este procedimento também foi realizado para os insetos do controle.

3.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VIRULÊNCIA DAS LINHAGENS

Os resultados dos bioensaios foram expressos sob a forma de LC_{50} e LT_{50} , calculados pelo método de Probit (BLISS, 1935 e 1937 e FINNEY, 1971). Analisou-se os valores quanto à hipótese de paralelismo entre linhas de regressão, através do teste de χ^2 , de acordo com o critério adotado por BLISS (1935) e FINNEY (1971). A potência relativa da virulência das linhagens em relação ao controle foi estimada conforme COCHRAN (1938), SCOSSIROLI (1962) e FINNEY (1971).

3.4. SINCRONIZAÇÃO DE CONÍDIOS

Os processos de conidiação e germinação de esporos não são eventos sincrônicos para a maioria dos fungos. O método descrito por LAW & TIMBERLAKE(1980), com modificações, foi utilizado para a produção de conídios sincronizadamente pelas linhagens estudadas, obtendo-se, desta maneira, conídios de mesma idade em todos os experimentos.

Placas de Petri com MM sólido foram inoculadas e incubadas a 28°C por 7 dias. A seguir, os conídios produzidos foram raspados suavemente da superfície do meio de cultura e utilizados para preparar uma suspensão fortemente concentrada em solução salina. Aliquotas de 10ml da suspensão de conídios foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 1000ml contendo 300ml de MM líquido. Para cada linhagem foram utilizados 8 frascos Erlenmeyer, que foram incubados sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Após este período formaram-se "pellets" que foram filtrados em papel de filtro medindo 30x20cm colocados sobre um funil especialmente construído, acoplado a um frasco de Kitasato ao qual

foi aplicado vácuo. Os "pellets" foram lavados com 1000ml de água destilada esterilizada.

O papel de filtro com os "pellets" aderidos foi colocado sobre uma camada de pequenos cilindros de nylon embebidos em 100ml de MM, contidos em forma de vidro refratário. As formas de vidro foram cobertas com filme plástico aderente e incubadas a 28°C por 7 dias.

Após o período de incubação, os conídios produzidos sincronizadamente foram raspados do papel de filtro, colocados em água destilada esterilizada, filtrados através de gaze esterilizada e finalmente, centrifugados a 2000rpm para obtenção de uma massa úmida de conídios que foram utilizados para os testes de conteúdo de proteína total e atividade enzimática.

3.5. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

Massas úmidas de conídios das linhagens E9, Pegro e BSA de *M. anisopliae*, de peso conhecido, com 0, 7, 13 e 24

horas de germinação em MM, foram trituradas separadamente, em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido. A seguir, a massa triturada foi recolhida com 6ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,1M, e centrifugada imediatamente a 5000rpm por 25 minutos a 3°C. O sobrenadante foi recolhido, filtrado em filtro MILIPORE e dializado por 10 horas em 500ml de tampão fosfato pH 7,0, 0,1M. A quantidade de proteína presente nos extratos foi medida pelo método de BRADFORD(1976) modificado. Amostras de 40ul do sobrenadante dializado foram colocadas em tubo de ensaio com 1,5ml de tampão fosfato + 1ml de reagente CBB(Item 3.2.12). Após 2 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm.

3.6. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES AMILOLÍTICA LIPOLÍTICA E

QUITINOLÍTICA DE *M. anisopliae*

As atividades amilolítica, lipolítica e quitinolítica foram pesquisadas em conídios de 3 linhagens de *M.*

anisopliae. Foram utilizados para isto, extratos de conídios sincronizados e meios de cultura inoculados, na presença ou ausência dos substratos das enzimas.

As linhagens E9, Fegro e BSA foram sincronizadas pelo método de LAW & TIMBERLAKE(1980) descrito no Item 3.4..

3.6.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE CONÍDIOS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os conídios sincronizados foram inoculados em MM, retirados após 7, 13 e 24 horas de germinação e lavados três vezes com água destilada esterilizada através de centrifugação a 2000rpm por 10 minutos. As massas úmidas de conídios assim obtidas foram trituradas em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido, recolhidas em 6ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 e a seguir, centrifugadas a 5000rpm por 30 minutos a 3°C. Os sobrenadantes foram dialisados por 12 horas contra 500ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. Os extratos dialisados foram analisados quanto às atividades enzimáti-

cas.

3.6.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CONÍDIOS INTACTOS EM PRESENÇA DOS SUBSTRATOS

Para verificar a atividade enzimática na presença dos substratos, 20ml de MM, onde não foi adicionada a glicose, contendo os substratos separadamente, nas proporções de 0,2% de amido, 1% de tween 20, 2,4% de quitina coloidal e 1% de caseína foram inoculados com 10^7 conídios/ml de cada uma das linhagens de *M. anisopliae*. Após os tempos 0,7,13 e 24 horas de germinação, os meios de cultura foram filtrados em papel de filtro WHATMAN e a atividade enzimática pesquisada.

3.6.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CONÍDIOS INTACTOS NA AUSÊNCIA DOS SUBSTRATOS

A produção de enzimas por conídios intactos na ausência dos substratos foi verificada inoculando-se frascos de 20ml contendo MM com 10^7 conídios/ml de cada uma das li-

nhagens, pesquisou-se a atividade enzimática no meio de cultura onde os conídios estiveram nos tempos de germinação 0, 7, 13 e 24 horas após filtragem em papel de filtro WHATMAN no 1.

3.6.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA

Estudou-se a atividade amilolítica através do método de PAL *et al.* (1980), incubando-se a 35°C por 1 hora, 1ml de amostra e 1ml de amido solúvel em tampão acetato 0,2M pH 5,2. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de NELSON (1944). Colocou-se 1ml da mistura de reação em tubo de ensaio graduado até 25ml, ao qual adicionou-se 1ml de uma mistura de reagente A e B (Item 3.2.13.1 e 3.2.13.2), na proporção de 25:1. As soluções foram aquecidas por 20 minutos em banho de água fervendo sendo a seguir, resfriadas em banho de gelo. Após este procedimento, adicionou-se 1ml de reagente arsenomolibdato (Item 3.2.13.3). As soluções foram então diluídas para 25 ml com água destilada.

e a absorbância medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. O branco consistiu em 0,5ml de água destilada + 0,5ml de substrato tratados da mesma maneira.

3.6.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A atividade lipolítica foi medida pelo método de DEPLOEY *et al.* (1981), incubando-se 5ml de amostra com 5ml de Tween 20 a 3%, em tampão citrato- Na_2HPO_3 pH 7,5 a 45°C por 50 minutos. A reação foi cessada pela adição de 10ml de solução de acetona-etanol 1:1. O controle da reação consistiu de 5ml de amostra + 5ml de solução de Tween 20 colocados em banho de água fervente por 10 minutos para bloquear a atividade da amostra. A cada tubo adicionou-se 0,3ml de solução de fenolftaleína 1% em etanol 70% e procedeu-se a seguir a uma titulação com NaOH a 0,05M preparado no momento do uso.

3.6.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUITINOLÍTICA

Procedeu-se a medida da atividade quitinolítica seguindo o método de DADUST & GUNNER(1979), incubando-se 0,5ml de amostra com 0,5ml de quitina coloidal(15mg/ml) obtida pelo método de HANKIN & AGNOSTAKIS(1975) e tampão citrato 0,1M pH 5,0. A análise de N-acetil glicosaminas liberadas foi realizada segundo metodologia de REISSIG *et al.* (1955). Tubos com 0,5ml de mistura de reação e 0,1ml de tetraborato de potássio 0,8M, foram colocados em água fervente por 3 minutos e a seguir, resfriados em água de torneira. Após, adicionou-se a cada tubo 3ml de uma solução de p-dimetilaminobenzaldeído (10g de p-dimetilaminobenzaldeído em 100ml de ácido acético glacial contendo 12,5ml de HCl 10N, solução diluída 1:9 em ácido acético glacial pouco antes do uso). O padrão consistiu de 0,4ml de água destilada + 0,1ml de uma solução de tetraborato de potássio 0,8M e o branco de 0,5ml de água destilada + 0,1ml de tetraborato de potássio. As absorbâncias foram medidas imediatamente em espectrofotômetro no comprimento de onda de 585 nm.

3.7. ELETROFORESE DOS EXTRATOS DE CONÍDIOS COM DIFERENTES TEMPOS DE GERMINAÇÃO

Procedeu-se a eletroforese dos extratos obtidos como no Item 3.6.1., utilizando-se gel de poliacrilamida em corrida vertical pelo sistema descontínuo.

As placas de eletroforese foram montadas com espaçadores, e vedadas com água ágar a 4%. Preparou-se o gel separador (Item 3.2.14.9), que foi vertido no sistema de placas com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Sobre o gel separador foi colocada uma camada de 2cm de água para viabilizar a polimerização, após o que, a mesma foi retirada. O gel empilhador foi então preparado (Item 3.2.14.10) e vertido sobre o gel separador já polimerizado, novamente com auxílio de uma pipeta Pasteur. O pente de acrílico foi introduzido no gel empilhador e o conjunto deixado à temperatura ambiente até a polimerização do gel.

O pente acrílico e o espaçador inferior do sistema de placas foram retirados, e o conjunto foi fixado à cuba

de corrida. A superfície entre as placas e o tanque superior da cuba de corrida foi vedada com água ágar, e os tanques preenchidos com o tampão de corrida(Item 3.2.14.1). As amostras preparadas(Item 3.2.14.11) foram aplicadas nos poços deixados pela retirada do pente de acrílico e a cuba ligada à fonte elétrica com uma voltagem inicial de 15mA. A voltagem foi corrigida para 20mA após a passagem da frente de azul-de bromofenol pelo gel empilhador e assim mantida até o final da corrida.

Ao término da corrida, retirou-se da cuba e do sistema de placas o gel, que foi levado à solução fixadora(Item 3.2.14.12.) por 20 minutos. Após a fixação, o gel foi transferido para a solução corante(Item 3.2.14.13.), onde permaneceu por 4 horas. A descoloração com a solução descorante(Item 3.2.14.14.), procedeu-se até que as bandas se apresentassem nítidamente visíveis. Foi utilizada como padrão uma solução de soroalbumina bovina preparada segundo o Item 3.2.11..

3.8. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE GERMINAÇÃO MÍNIMO(TGM) DA LI- NHAGEM E9.

O tempo mínimo em que 85% dos conídios germinam(TGM)(ARRAIS DE MATOS,1988), foi determinado inoculando-se, com 10^6 conídios/ml sincronizados (Item 3.4.) frascos Erlenmeyer de 150ml contendo 10ml de MM líquido. Aliquotas do meio inoculado foram retiradas a cada hora, observadas ao microscópio óptico, e contados 500 conídios quanto à presença ou ausência de tubo germinativo e tomada a porcentagem de conídios germinados.

3.9. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA SELEÇÃO DE CONÍDIOS PRECOCE- MENTE GERMINADOS SOBRE O TGM

Para verificar se a seleção de conídios precocemente germinados afeta o valor da TGM, foi realizado o seguinte ensaio: conídios sincronizados pelo método descrito no Item 3.4., foram utilizados para inocular 10ml de MM contidos em frascos Erlenmeyer de 150ml com 10ml de MM(10^6 co-

nídios/ml). Após um período de incubação de 7 horas a 28°C sob agitação, o meio inoculado foi filtrado em uma camada dupla de gaze. Os conídios germinados retidos na gaze foram recolhidos em 100ml de água destilada esterilizada e diluições foram feitas para se obter colônias isoladas em placa de Petri contendo MM. Este procedimento foi repetido 4 vezes, partindo-se de conídios que apresentavam germinação precoce no tempo de 7 horas, identificando-se a variação na porcentagem de germinação dos conídios obtidos após cada tratamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DETERMINAÇÃO DO TGM PARA A LINHAGEM E9 DE *M. anisopliae*

As porcentagens de conídios germinados após 7, 8, 9, 10, 11 e 12 horas de incubação sob agitação obtidos segundo o Item 3.8., encontram-se na Tabela 1. O TGM obtido para a linhagem E9 de *M. anisopliae* foi de aproximadamente 12 horas de incubação em MM (Figura 1), apresentando uma porcentagem média de germinação de 84,80%. O resultado coincide com o obtido por ARRAIS DE MATOS(1988).

4.2. EFEITO DA SELEÇÃO DE CONÍDIOS PRECOCEMENTE GERMINADOS

SOBRE O VALOR TGM

Os valores obtidos em termos de número de conídios germinados após cada seleção de conídios precocemente germinados(Item 3.9.), encontram-se na Tabela 2 e as porcentagens respectivas na Tabela 3. O efeito das seleções sobre

TABELA 1. Tempo de germinação médio (TGM) de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em MM líquido sob agitação, a 28°C.

Horas	nº de conídios germinados ¹	Porcentagem de conídios germinados
7	28,30	5,66
8	30,60	6,12
9	78,60	15,72
10	283,60	56,72
11	339,50	67,90
12	424,20	84,80

¹ Média de três repetições, contando-se 500 conídios em cada repetição.

TABELA 2. Número de conídios germinados da linhagem E9 de *M. anisopliae* após 4 passos de seleção de conídios precocemente germinados em MM líquido sob agitação a 28°C.

Tempo de incubação (horas)	seleções ¹											
	1º			2º			3º			4º		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
7	37	49	28	42	53	55	91	100	115	285	293	283
8	47	28	42	55	34	49	114	125	110	299	302	295
9	83	75	70	90	92	161	277	291	295	382	379	390
10	270	269	276	275	283	287	380	379	375	383	391	385
11	352	341	331	363	371	357	415	421	433	435	426	419
12	420	425	430	427	431	438	443	439	448	465	451	457

¹ Foram contados 500 conídios em cada repetição

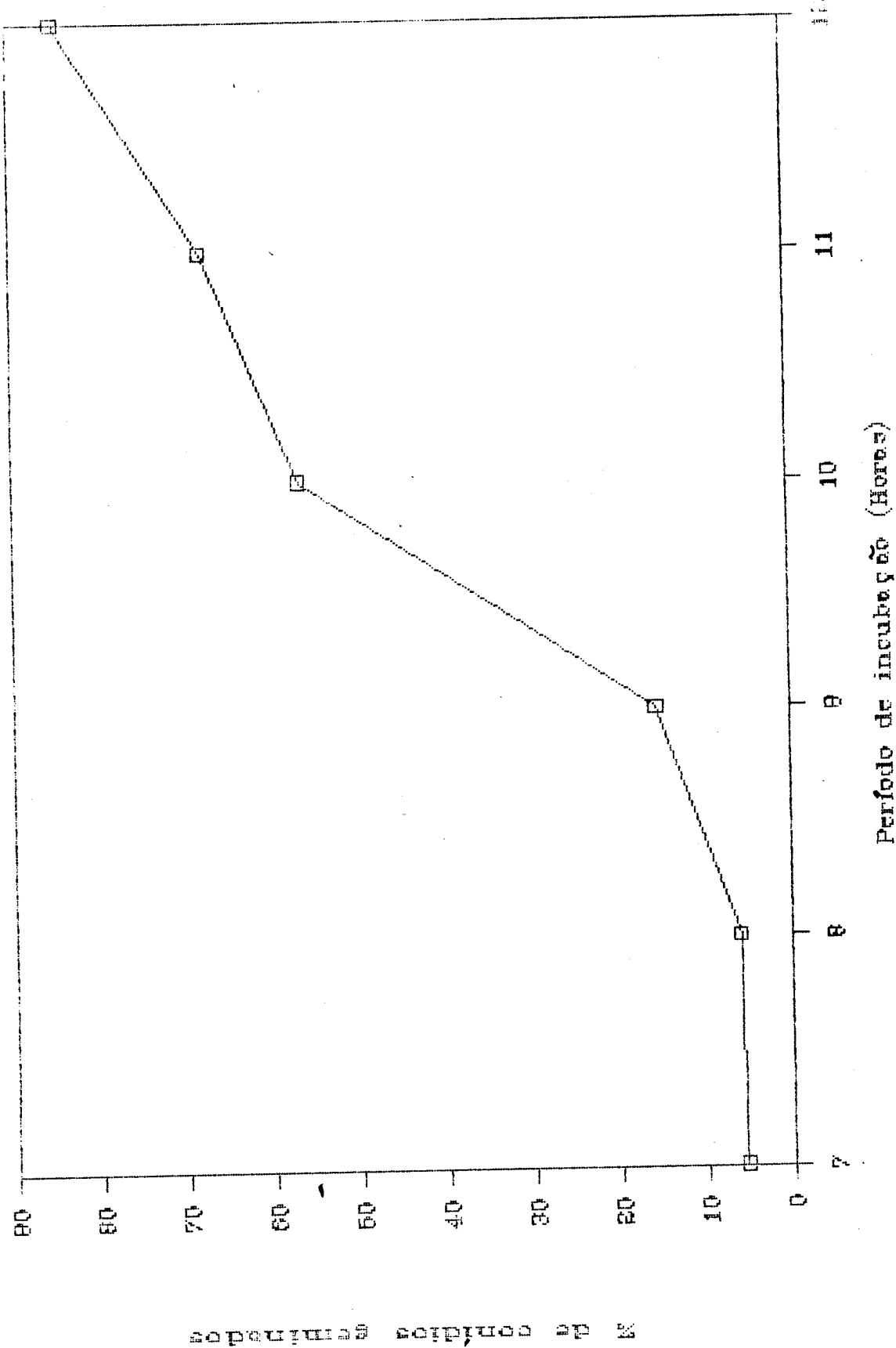


Figura 1. Porcentagem de germinação em MM de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em vários períodos de incubação.

a germinação dos conídios pode ser observado na Figura 2.

Observa-se na Tabela 4 de análise de variância, que houve diferenças significativas a nível de 5% de probabilidade nos valores de conídios germinados por quatro seleções realizadas nos diferentes tempos. Houve ainda interação significativa entre seleção e tempo de germinação.

O teste de TUKEY(Tabela 5), demonstrou que há uma variação significativa crescente no valor das médias de conídios germinados com o aumento do tempo de germinação. Há uma variação significativa crescente no valor das médias de conídios germinados em cada seleção sucessiva de conídios precocemente germinados como demonstra a Tabela 6.

O desdobramento do efeito principal "seleção de conídios precocemente germinados" com a interação "seleção de conídios precocemente germinados x tempo de germinação" mostrou que houve um efeito significativo do fator de seleção em todos os tempos de germinação(Tabela 7).

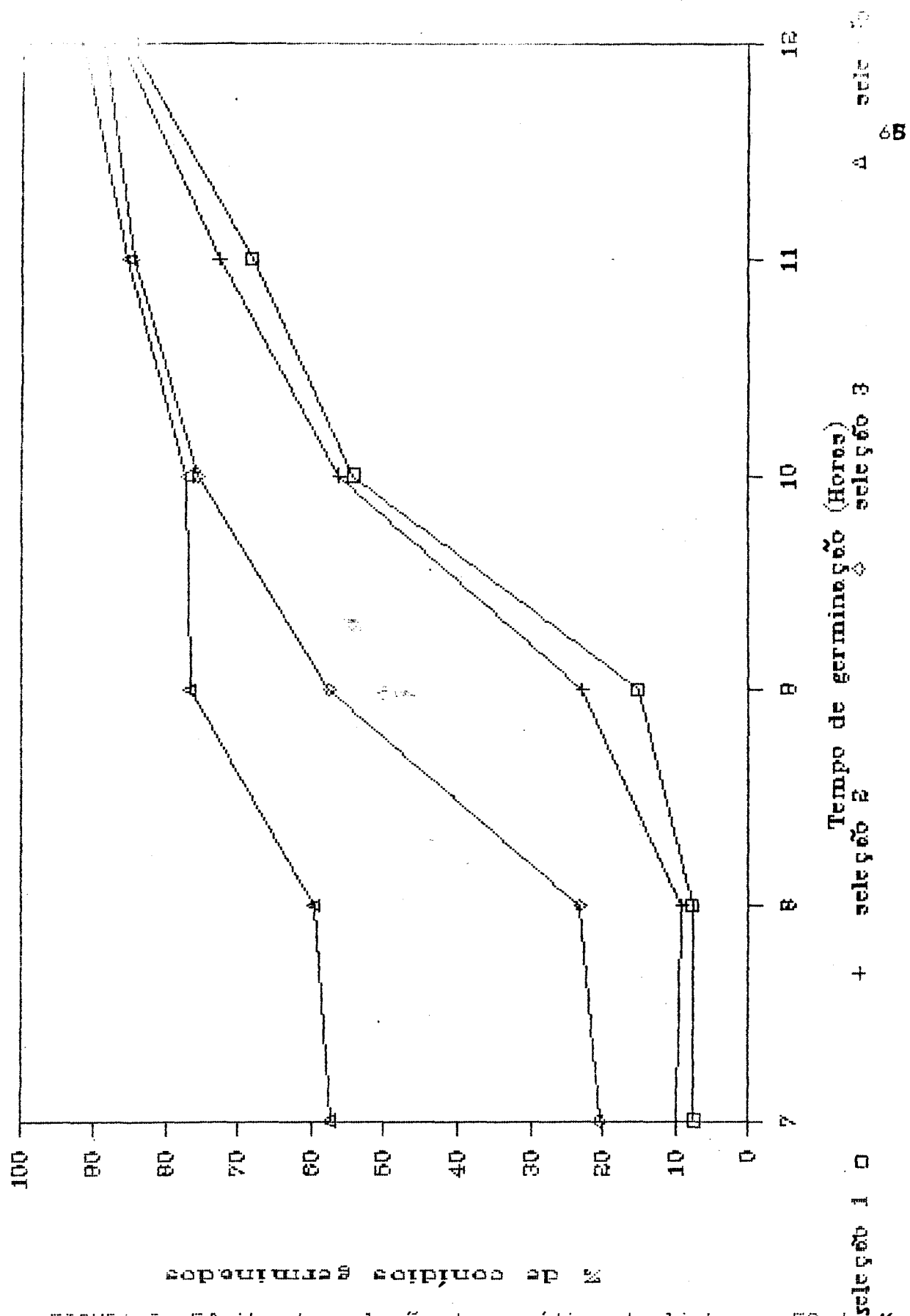


FIGURA 2. Efeito da seleção de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* sobre a porcentagem de germinação em diferentes tempos de incubação.

TABELA 3. Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* após seleção de conídios precocemente germinados.

Horas	Porcentagem de conídios germinados ¹			
	Seleções			
	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o
7	7,60	10,00	20,40	57,40
8	7,80	9,20	23,26	59,72
9	15,20	22,86	57,52	76,72
10	54,32	56,32	75,60	77,26
11	68,26	72,72	84,60	85,32
12	85,00	86,40	88,66	91,52

¹ Média de três repetições contando-se 500 conídios/repetição

TABELA 4. Análise de variância dos dados obtidos sobre o n^o de conídios germinados em 500 conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* após seleção de conídios germinados precocemente.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Seleção	5	1117192,3000	223438,47000	1783,74200*
Tempo de Germinação	3	346032,4400	115344,15000	920,80925*
Seleção x Tempo de Germinação	15	145320,5600	9688,03700	77,341020
Tratamentos	23	1608545,3000	69936,75400	558,315360
Resíduo	48	6012,6667	125,26389	-
TOTAL	71	1614558,0000		
Cv= 4,15.				

TABELA 5. Teste de Tukey para a causa de variação "tempo de germinação" sobre o número de conídios germinados.

Tempo de germinação (horas)	Médias ¹
12	439,50a ²
11	388,58b
10	329,42c
9	215,42d
8	124,83e
7	119,25e

¹ Médias de três repetições, contando-se 500 conídios em cada repetição

² Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 6. Teste de Tukey para a causa de variação "seleção de conídios" sobre o n° de conídios germinados.

Se- le- ções	Médias ¹ do n ^o de conídios germinados						Médias
	Tempos de germinação (horas)						
	12	11	10	9	8	7	
4 ^o	457,67a**	425,00a	386,33a	383,67a	298,00a	287,00a	372,94a
3 ^o	443,30ab	423,00a	378,00a	287,67b	116,33b	102,00b	291,72b
2 ^o	432,00b	365,00b	281,67b	114,33c	46,00c	50,00c	214,83c
1 ^o	425,00b	341,33b	271,66b	76,00d	39,00c	38,00c	198,50d

¹ Médias de três repetições, contando-se 500 conídios em cada repetição.

** Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 7. Desdobramento do efeito principal "seleção de conídios precocemente germinados" com a interação "tempo de germinação x seleção".

Causa de variação seleção/tempo de germ.		GL	SQ	QM	F
7	horas	3	119504,25	39834,75	318,00**
8	horas	3	130923,00	43641,00	348,39**
9	horas	3	1894548,92	63182,97	504,39**
1	horas	3	644,92	11214,97	89,53**
11	horas	8	98,25	5299,41	42,30**
12	horas	3	3,66	611,22	4,88**
Resíduo		48	6012,66	125,26	

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

As comparações de médias pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade demonstraram que: houve diferença significativa nos valores obtidos entre a 1^o e a 2^o seleção somente no tempo de germinação de nove horas; entre a 2^o e a 3^o seleção, apenas o tempo de 12 horas não mostrou diferença significativa; houve diferença significativa nos valores obtidos entre a 3^o e a 4^o seleção nos tempos 7, 8 e 9 horas, mas não houve diferença significativa no número de conídios germinados entre os tempos 10, 11 e 12 horas. Estes resultados demonstram que a 3^o seleção causou um aumento no número de conídios germinados em todos os tempos de germinação.

Os resultados demonstraram que houve uma diminuição no valor do TGM com a seleção sucessiva de conídios de germinação precoce, sendo que este foi deslocado na 3^o e 4^o seleções para o tempo de germinação de 11 horas conforme se pode observar na Tabela 3

O maior efeito das seleções foi observado porcentagens de conídios germinados nos tempos de germinação de 7 a 10 horas. A partir do tempo de germinação de 10 horas o efeito das seleções foi menor .

Segundo HASSAN *et al.* (1989), a velocidade e a sincronia da germinação dos conídios e a formação de apressórios são eventos cruciais na patogênese. DILLON & CHARNLEY (1990) observaram que conídios de *M. anisopliae* previamente embebidos em água mostram uma diminuição no tempo de germinação. A seleção de conídios precocemente germinados provocou também uma diminuição no tempo de germinação, mas principalmente aumentou a taxa de germinação nos tempos de germinação anteriores a 10 horas, o que caracteriza um aumento na velocidade de germinação.

4.3. ANÁLISE DE PROTEÍNA TOTAL

Os resultados da análise de proteína total contida em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com di-

ferentes tempos de germinação realizados conforme Item 3.5., encontram-se na tabela 8 e Figura 3. A análise de variância dos dados obtidos mostrou que houve diferença significativa a nível de 1% de probabilidade nos valores de proteína total obtidos nos quatro tempos de germinação e também nos valores obtidos entre as linhagens analisadas (Tabela 9). Além disso, pode-se observar que ocorreu interação significativa entre tempos de germinação e linhagens, indicando que o efeito dos tempos de germinação em termos de conteúdo de proteína total depende das linhagens.

Como os valores de F foram significativos ao nível de 1% de probabilidade, foi realizado o teste de Tukey para verificar como os tratamentos diferiam entre si (Tabela 10). Observou-se que o efeito médio das três linhagens diferem entre si, sendo que a linhagem E9 apresentou maior valor médio de conteúdo de proteína total, seguida das linhagens BSA e Pegro em ordem decrescente. Os efeitos médios dos tempos de germinação também diferiram entre si, sendo

TABELA 8. Conteúdo de proteína total de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Tempos de germinação (horas)	Repetições	Conteúdo de proteína total(ug)		
		Linhagens de <i>M. anisopliae</i>		
		E9	Pegro	BSA
0	r1	0,004073071 ¹	0,001113277	0,005235837
	r2	0,003998271	0,001091243	0,005437296
	r3	0,004118170	0,001137630	0,005335389
	média	0,004063171	0,001114050	0,005336174
7	r1	0,011058373	0,002488114	0,004092064
	r2	0,011364530	0,002730277	0,004406259
	r3	0,011058373	0,002488114	0,004209583
	média	0,011160425	0,002568835	0,004235969
13	r1	0,058351845	0,003132857	0,006142769
	r2	0,056347672	0,003249292	0,005815354
	r3	0,056188615	0,003249292	0,005977860
	média	0,056962710	0,003210480	0,005978661
24	r1	0,07265788	0,005401814	0,007620428
	r2	0,070418142	0,005529137	0,007833383
	r3	0,070418142	0,005529137	0,007287692
	média	0,071164721	0,005486696	0,007580501

¹ Proteína total em ug/ug de peso seco de conídios.

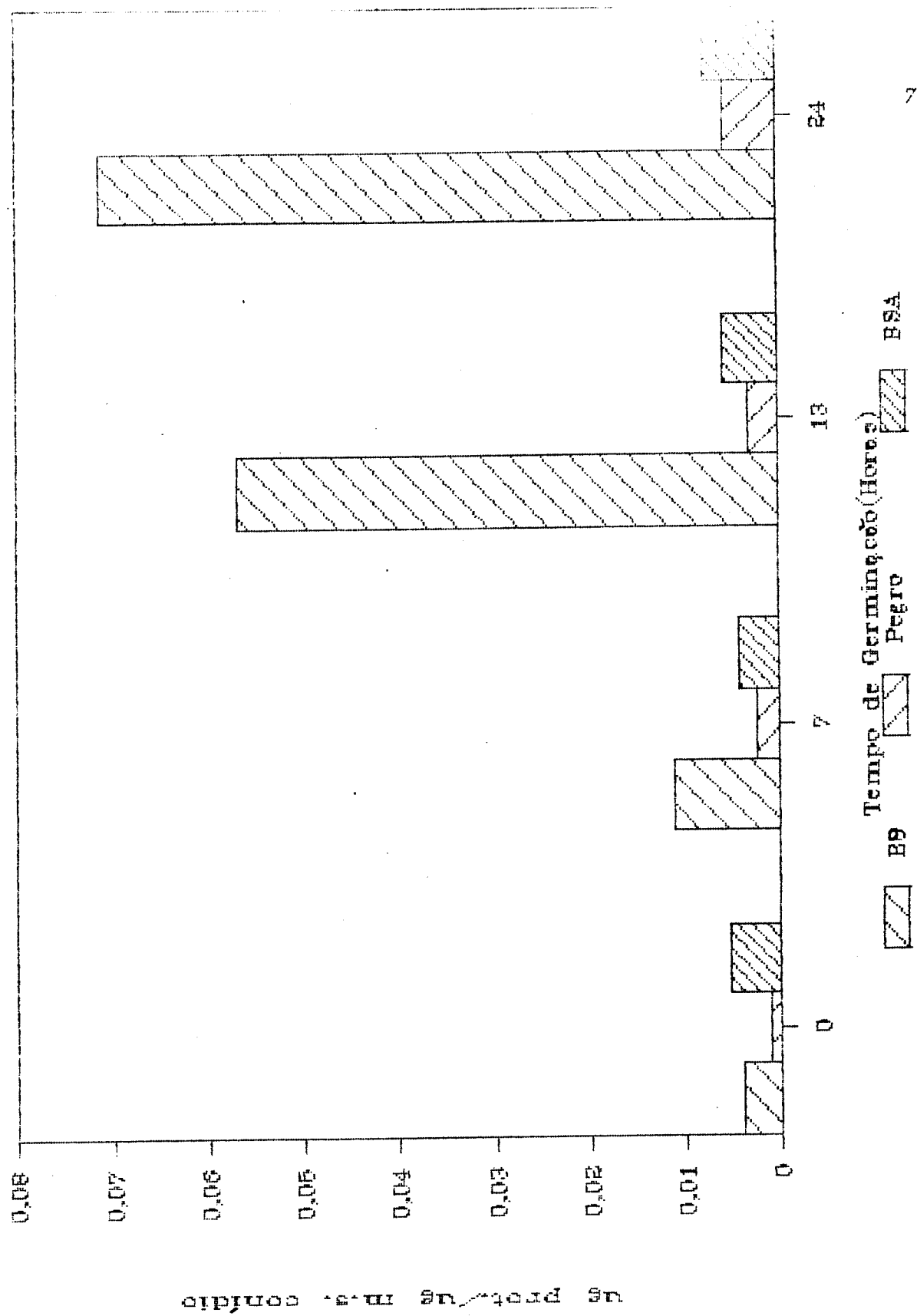


Figura 3. Conteúdo de proteína total de conídios das linhagens E9, Pegro e BSA de *M. anisopliae* em quatro tempos de germinação.

TABELA 9. Análise de variância dos dados obtidos sobre o conteúdo de proteína total de conídios de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Linhagens	2	79304413	39652207	14295,746**
Tempo de germinação	3	39064255	13021418	4694,591**
Linhagens x Tempo de germinação	6	60795243	101132540	3653,068**
Tratamentos	11	179163911	16287628	5872,152
Resíduo	24	66568,96	2773,7067	
Total	35	179230480		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 10. Teste de Tukey dos dados obtidos sobre o conteúdo de proteína total de conídios de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Linhas	Médias	Tempo de germ. (hs)	Médias	Tempo de germ./linhagens		
				E9	BSA	Pegro
E9	3583,77a	24	2807,73a	7116,47a	758,05a	548,67a
BSA	578,28b	13	2205,96b	5696,27b	597,87b	321,05b
Pegro	309,50c	7	598,84c	1116,04c	423,60c	256,88bc
		0	350,45d	406,32d	535,62c	111,48c
DMS(5%)	53,67		68,46	118,59	118,59	118,59
cv=3,53%						

que o tempo de germinação de 24 horas apresentou maior valor de proteína total seguido dos tempos de 13, 7 e 0 horas em ordem decrescente.

O desdobramento do efeito principal "Tempo de germinação" com a interação "Linhagens x Tempo de germinação" revelou que houve diferença significativa entre os tempos de germinação para todas as linhagens ao nível de 5% de probabilidade, sendo este efeito mais intenso na linhagem E9(Tabela 11).

As comparações de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade(Tabela 10) revelaram os seguintes aspectos: Na linhagem E9 as médias de conteúdo de proteína total diferem significativamente nos quatro tempos de germinação, apresentando o tempo de germinação de 24 horas maior conteúdo de proteína total seguido dos tempos 13, 7 e 0 horas em ordem decrescente. Na linhagem BSA houve diferenças significativas entre os tempos de 24, 13 e 7 horas de germinação sendo que os tempos de 7 e 0 horas não diferi-

Tabela 11. Desdobramento do efeito principal "Tempo de germinação" com a interação "Linhagens x Tempo de germinação" em termos de proteína total em conídios de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tempos de germ./ Linhagem E9	3	99385593	3312831	11943,78**
Tempos de germ./ Linhagem Pegro	3	298036,74	99345,58	35,82**
Tempos de germ./ linhagem BSA	3	175867,57	58622,52	21,13NS
Resíduo	24	66568,96	2773,71	

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS não significativo ao nível de 5% de probabilidade

ram entre si. Na linhagem Pegro, as médias do conteúdo de proteína total diferiram nos tempos de 24 e 13 horas, mas não houve diferença significativa nas médias entre os tempos de 13 e 7 horas e nem entre as médias 7 e 0 horas. Pelo que se pode observar os conídios da linhagem E9 iniciaram a síntese de proteínas entre os tempos de germinação 0 e 7 horas, a linhagem BSA a partir de 7 horas de incubação e a linhagem Pegro somente após 13 horas de incubação.

O ajustamento do modelo linear $y_i = A + Bx_i + Cx_i$ dos dados, apresentou um coeficiente de correlação de 94,49%, indicando boa afinidade entre as variáveis através do modelo ajustado. A equação de regressão obtida foi $y = 0,0026064 + 0,0011181x$ (Figura 4), do que se conclui que para um tempo zero de germinação corresponde uma quantidade de proteína total de 0,0026064 e que a cada hora no tempo de germinação, ocorre um aumento na quantidade de proteína de 0,001118ug/ug de peso seco de conídios.

proteína
total
(ug/ug de
peso seco
de coní-
dios)

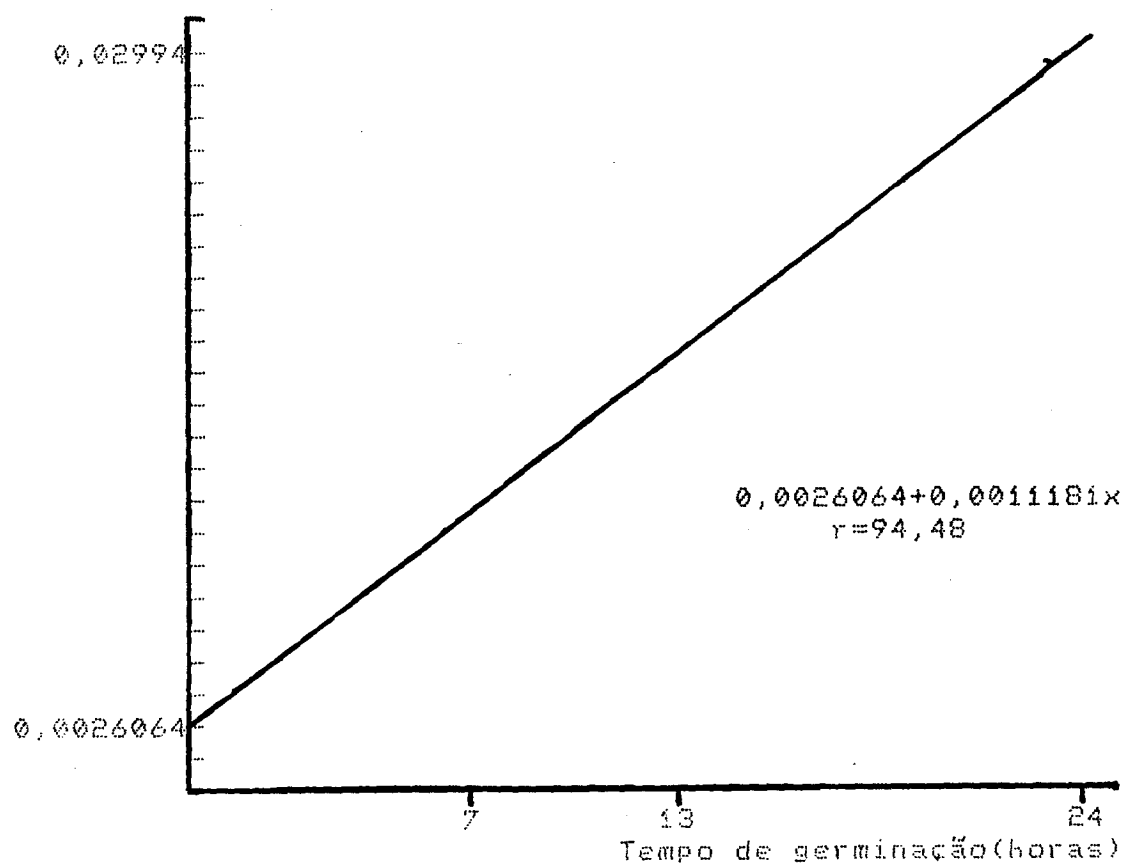


FIGURA 4. Gráfico do ajustamento do tempo de germinação em relação à quantidade de proteína total contida em conídios de *M. anisopliae*.

Observa-se sobre o conteúdo de proteína total em conídios de *M. anisopliae* que existe uma variabilidade neste caráter dentro da espécie pois o mesmo foi diferente nas 3 linhagens estudadas. O conteúdo de proteína total dos conídios sofre um aumento significativo com o aumento do tempo de incubação, em valores que dependem da linhagem envolvida. Isto indica que um processo de síntese de proteínas ocorre de maneira intensa nos conídios em processo de germinação como foi observado também em outros fungos (TURIAN, 1985). Além disso o início da síntese de proteínas nas três linhagens ocorreu em tempos diferentes. Na linhagem E9 já houve início de síntese entre 0 e 7 horas de incubação e nas linhagens Pegro e BSA entre 7 e 13 horas de incubação. ARRAIS DE MATOS (1988) observou em conídios de *M. anisopliae* que ocorre síntese de proteínas antes da formação do tubo germinativo pois os conídios tratados com o inibidor de síntese de proteína, a cicloheximida tem sua germinação inibida.

4.4. ELETROFORESE DOS EXTRATOS DE CONÍDIOS COM DIFERENTES TEMPOS DE GERMINAÇÃO

Na figura 5, estão representados esquematicamente os padrões eletroforéticos de proteínas totais dos extratos de conídios das linhagens E9, Fegro e BSA de *M. anisopliae*, obtidos conforme Item 3.7. Pod-se observar que não houve variações nos padrões entre as linhagens e nem também entre os extratos de conídios com diferentes tempos de germinação dentro de cada linhagem.

A análise de proteína total mostrou que há uma síntese crescente de proteínas com o aumento do tempo de germinação. Estas proteínas aparentemente já estavam presentes nos conídios não germinados, não havendo síntese de novas proteínas pois o padrão de bandas obtido através de eletroforese das proteínas totais, não apresentou diferenças nos tempos de germinação examinados.

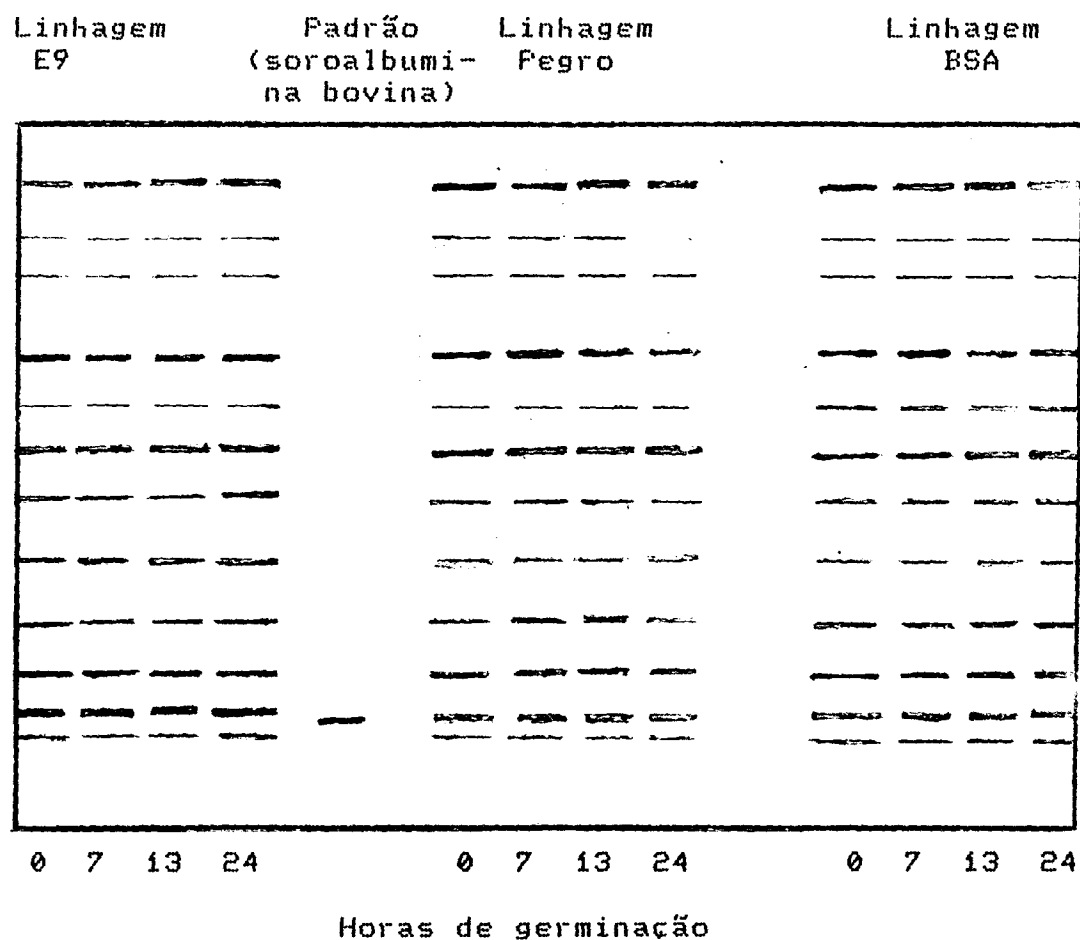


Figura 5. Representação esquemática dos padrões obtidos em eletroforese de proteína total de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* em gel de poliacrilamida, corrida vertical e sistema descontinuo.

4.5. ATIVIDADE AMILOLÍTICA DE *M. anisopliae*

A curva de calibração da medida de glicose através do método descrito por NELSON, (1944) conforme Item 3.6.4., encontra-se da Tabela 12.

4.5.1. Atividade Amilolítica em Extratos de Conídios com Diferentes Tempos de Germinação.

A quantidade de glicose liberada por extratos de conídios com diferentes tempos de germinação obtida conforme os Itens 3.6.1 e 3.6.4 encontram-se na Tabela 13. Na análise de variância dos dados obtidos (Tabela 14), pode-se verificar que houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as quantidades de enzimas presentes nos extratos das três linhagens. Entre os tempos de germinação também houve diferenças significativas, assim como também houve interação significativa entre linhagens e tempos de

Tabela 12. Curva de calibração da medida de glicose obtida pelo método de NELSON(1944).

Glicose mg/ml	Absorbância ¹
0,005	0,01547
0,025	0,08355
0,050	0,17718
0,150	0,50864
0,300	1,00000

¹ Média de três repetições

Coeficiente de correlação da curva 0,99

Equação da reta de regressão $y = 0,000122 + 0,0293686x$

Tabela 13. Atividade amilolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após diferentes tempos de germinação.

linhagens	mg de glicose/g de conídios			
	tempos de germinação(horas)			
	0	7	13	24
E9	1,210	1,510	0,382	0,297
	1,320	1,472	0,380	0,324
	1,288	1,503	0,379	0,344
Pegro	0,868	2,367	1,475	1,731
	0,878	2,521	1,493	1,647
	0,897	2,429	1,528	2,400
BSA	2,958	2,201	2,112	1,395
	3,333	2,303	2,325	1,409
	2,909	2,020	2,242	1,538

Tabela 14. Análise de variância sobre os dados obtidos sobre a atividade amilolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Linhagens	2	11,272	5,636	247,308 ***
Tempos	3	3,592	1,197	52,534 **
Linh.X Tempo	6	7,558	1,250	55,275 **
Tratamentos	11	22,421	2,038	89,442 **
Resíduo	24	0,547	0,023	
Total	35	22,968		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

germinação, o que significa que o efeito do tempo de germinação sobre a atividade enzimática varia com a linhagem envolvida.

No teste de Tukey (Tabela 15), pode-se observar que o efeito médio das três linhagens diferem significativamente entre si, sendo que a maior quantidade de enzima esteve presente no extrato da linhagem BSA seguida pelas linhagens Pegro e E9 em ordem decrescente. No efeito médio dos tempos de germinação nota-se que os extratos nos tempos de 7 horas apresentaram níveis de enzima significativamente maiores que os tempos 13 e 24 horas, os quais não diferiram significativamente entre si.

O desdobramento do efeito "Tempo de Germinação" com a interação "Linhagem X Tempo de Germinação" (Tabela 16), que os tempos de germinação tiveram efeito significativos sobre as três linhagens de *M. anisopliae*.

Em síntese os resultados indicam que a enzima está presente no conídio antes da germinação (tempo de incuba-

ção de 0 horas), e que em cada linhagem ocorrem variações na atividade enzimática dos conídios durante os tempos de germinação.

Em termos de médias (tabela 15), a linhagem BSA apresenta maior atividade enzimática que as outras duas linhagens e o tempo de germinação de 7 horas, em todas as linhagens, foi o que mostrou maior atividade da enzima.

A linhagem BSA apresentou alta atividade enzimática no conídio não germinado, havendo uma queda no tempo de 7 horas que se mantém até 13 horas onde ocorre nova queda de atividade. A linhagem Pegro apresentou a mais baixa atividade enzimática nos conídios não germinados, havendo um aumento significativo no tempo de germinação de 7 horas, uma queda de atividade no tempo de 13 horas e um novo aumento no tempo de 24 horas. Na linhagem E9 a atividade enzimática existente nos conídios não germinados sofre uma queda no tempo de germinação de 13 horas a um nível que se mantém no tempo de 24 horas.

Tabela 15. Teste de Tukey sobre os dados obtidos sobre a atividade amilolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Linh.	Médias ¹	Tempo germ. Médias (Hs)		Tempo/Linhagem Linhagem Médias*		
				E9	Pegro	BSA
BSA	2,228a ²	0	1,740b	1,272a	0,881d	3,066a
Pegro	1,686b	7	2,036a	1,495a	2,439a	2,174b
E9	0,867c	13	1,368c	0,380b	1,498c	2,226b
		24	1,231c	0,321b	1,926b	1,447c
DMS(50%) Cv=9,4699	0,1538		0,1962	0,3399	0,3399	0,3399

¹ Médias de três repetições.

² Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 16. Desdobramento do efeito principal "tempo de germinação" com a interação "Linhagens X Tempo de germinação" em termos de atividade amilolítica de extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae*.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tempo/Linhagem E9	3	3,279	1,093	47,969 **
Tempo/Linhagem Pegro	3	3,923	1,308	57,383 **
Tempo/Linhagem BSA	3	3,946	1,316	57,731 **

Resíduo 24 0,5469 0,0227

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

Pode-se observar uma grande variabilidade no comportamento dos conídios das três linhagens com relação à atividade amilolítica durante a germinação.

Evidenciou-se aqui uma variação entre as três linhagens estudadas no comportamento da atividade amilolítica nos conídios durante os estágios de germinação, fato que pode sugerir que não só a quantidade de enzima presente mas também os níveis iniciais e suas modificações durante a germinação do conídio podem ser importantes na virulência.

4.5.2. Atividade Amilolítica de Conídios em Diferentes Tempos de Germinação em Presença de Amido.

Os resultados da quantidade de glicose liberada por enzimas extracelulares de conídios de *M. anisopliae* obtidos segundo os Itens 3.6.2. e 3.6.4. encontram-se na Tabela 17. A análise de variância dos dados obtidos (Tabela 18), demonstrou que houve variação significativa, ao nível de 5% de probabilidade, entre as linhagens ensaiadas e entre os tempos de germinação utilizados. Pode-se observar também que houve interação significativa entre os tempos de germinação e as linhagens o que indica que o efeito dos tempos de germinação em termos de atividade amilolítica (enzimas liberadas no meio de cultura) depende da linhagem envolvida.

Sendo os valores de "F" significativos ao nível de 5% de probabilidade, realizou-se o teste de Tukey (Tabela 19). Observou-se que o efeito médio das três linhagens diferem entre si, sendo que a linhagem BSA apresentou o maior valor, seguida das linhagens E9 e Pegro em ordem decrescente

Tabela 17. Atividade amilolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* em diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,2mg/ml de amido.

linhagens	mg de glicose liberada/g de conídios tempos de germinação(horas)			
	0	7	13	24
E9	0	6,522	5,830	6,528
	0	6,527	6,110	6,545
	0	6,544	5,810	6,523
Pegro	0	5,096	5,162	6,010
	0	5,175	5,106	5,790
	0	5,108	5,112	5,761
BSA	0	9,600	9,764	5,130
	0	8,334	9,598	6,254
	0	8,634	9,726	5,120

Tabela 18. Análise de Variância dos dados obtidos sobre a atividade amilolítica de conídios de 3 linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,2mg/ml de amido.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	
Linhagens	2	32,67	16,34	168,81	***
Tempo	2	5,08	2,54	26,26	**
Linhagen X Tempo de germinação	4	26,46	6,61	68,35	**
Tratamento	8	64,21	8,03	82,94	**
Resíduo	18	1,74	0,10		
Total	26	65,95			

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 19. Teste de Tukey dos dados obtidos sobre a atividade amilolítica de conídios de 3 linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,2mg/ml de amido.

Linha-gens	médias	tempo de germ (horas)	Tempo de germ./Linh. Linhagens médias			
			médias	E9	Pegro	BSA
BSA	8,029a*	7	6,849a	6,531a	5,126b	8,889b
E9	6,326b	13	6,913a	5,160b	5,126b	9,696a
Pegro	5,368c	24	5,962b	6,532a	5,853a	5,501c
DMS(5%)	0,374		0,374	0,648	0,648	0,648
Cv=	4,73					

* Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não são significativas ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 20. Desdobramento do efeito principal "tempo de germinação" com a interação "linhagens X tempo de germinação" em termos de atividade amilolítica de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,2mg/ml de amido.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Tempo de germ./linhagem E9	2	0,7560	0,3780	3,9062 NS
Tempo de germ./linhagem Pegro	2	1,0575	0,5287	5,4640 NS
Tempo de germ./linhagem BSA	2	29,7244	14,8622	153,5793 **
Resíduo	18	1,7419	0,0967	

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Os tempos de germinação 7 e 13 horas não apresentaram valores médios significativamente diferentes entre si mas, o tempo de 24 horas apresentou valor médio significativamente menor que os tempos anteriores. O desdobramento do efeito "Tempo de Germinação" com a interação "Linhagens X Tempo de Germinação" (Tabela 20) revelou o efeito mais intenso dos tempos de germinação sobre a linhagem BSA.

Os resultados indicam que aparentemente não há enzimas amilolíticas na superfície dos conídios (tempo de germinação de 0 horas) ou se há, os níveis não puderam ser detectados pelo método utilizado. Pode-se observar ainda que a atividade enzimática no meio de cultura onde está ocorrendo a germinação é mais alta que a intracelular dos conídios, indicando que a enzima é produzida e rapidamente carregada para o exterior da célula.

Ocorreu uma grande variação na atividade amilolítica extracelular dos conídios das tres linhagens, que também se comportaram de maneira diferente durante o processo

de germinação.

A linhagem BSA que possui o maior nível intracelular de atividade amilolítica, também apresentou maior nível de atividade extracelular, mas as variações de atividade extracelular durante a germinação não seguiram o mesmo padrão que as variações na atividade intracelular.

4.5.3. Atividade Amilolítica em Ausência de Amido

As quantidades de glicose liberadas por conídios de *M. anisopliae* após 24 horas de incubação em MM em ausência de amido (Tabela 21) obtidas conforme os Itens 3.6.3 e 3.6.4, revelou que as enzimas amilolíticas são produzidas mesmo na ausência de substrato, embora em quantidades muito menores do que em presença do mesmo.

A análise de variância (Tabela 22), demonstra que as linhagens estudadas produzem quantidades de enzimas, si-

Tabela 21. Atividade amilolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após 24hs de incubação em MM em ausência de amido.

Linhagens	mg de glicose liberada/g de conídio		
	R1	R2	R3
E9	0,0450	0,0410	0,0418
Pegro	0,0207	0,0281	0,0192
BSA	0,0254	0,0194	0,0209

Tabela 22. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade amilolítica de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após 24hs de incubação em MM em ausência de amido.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Linhagens	2	0,000826	0,000413	33,564 **
Resíduo	6	0,000073	0,000012	
Total	8	0,000900		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 23. Médias da atividade amilolíticas de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após 24 hs de incubação em MM em ausência de substrato.

Linhagens	Médias ¹
E9	0,0426a ²
Pegro	0,0226b
BSA	0,0219b
DMS(5%)	0,00926

¹ Médias de três repetições.

² Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade

gnificativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade. No teste de Tukey (Tabela 23) pode-se observar que a linhagem E9 produziu maior quantidade de enzima em ausência de substrato e que as linhagens Pegro e BSA neste caso não diferem significativamente entre si em termos de enzima produzida.

A linhagem BSA, que apresentou altos níveis intracelulares e extracelulares em meio de cultura em presença de substrato, apresentou o menor nível de atividade amilolítica em meio de cultura na ausência do substrato. Neste caso a linhagem E9 foi a que apresentou maiores níveis da enzima em ausência de substrato.

O conhecimento a respeito da regulação da biossíntese de amilases em fungos é bastante limitado. Em *Aspergillus oryzae* a enzima alfa amilase tem sido observada ser induzida pela presença de amido ou maltose e parece ser regulada por repressão catabólica (YABUKI *et al.*, 1977). BHELLA & ATOSAAR (1987), mostraram em experimentos com *A.*

awamori, uma alfa amilase extracelular que não requer indutor exógeno. Situação similar parece ocorrer nas linhagens estudadas de *M. anisopliae* onde a atividade amilolítica também prescinde de indutor para se manifestar.

4.6. ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE *M. anisopliae*.

4.6.1. Atividade Lipolítica em Extratos de Conídios em Diferentes Tempos de Germinação.

A atividade lipolítica em extratos de conídios de *M. anisopliae* (atividade intracelular), medida através da liberação de ácidos graxos conforme Itens 3.6.1 e 3.6.5, encontra-se na Tabela 24.

Através da análise de variância dos dados obtidos (Tabela 25), observou-se que ocorreu uma variação significativa na quantidade de ácidos graxos liberados entre as linhagens estudadas, o mesmo não ocorrendo entre os tempos de

germinação cujos valores não diferiram significativamente entre si.

No teste de Tukey (Tabela 26), pode-se observar que nas linhagens E9 e BSA as quantidades de ácidos graxos liberados não diferem significativamente entre si mas, na linhagem Pegro, as quantidades observadas foram significativamente menores nas duas anteriores.

Existe atividade lipolítica intracelular antes da germinação dos conídios (Tempo de germinação de 0 horas). Os resultados demonstram também uma variação na atividade lipolítica entre as linhagens, mas não ocorreu em nenhuma das linhagens variação na atividade durante o processo de germinação.

4.6.2. Atividade Lipolítica de Conídios em Diferentes Tempos de Germinação em Presença de Tween 20.

Na Tabela 27 encontram-se os resultados em termos da quantidade de ácidos graxos liberados por conídios

três linhagens de *M. anisopliae* em diferentes tempos de germinação em presença de Tween 20. Na análise de variância (Tabela 28), pode-se observar que houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre as linhagens e também entre os tempos de germinação, bem como houve interação significativa entre tempos de germinação e linhagens.

Pelo teste de Tukey (Tabela 29), observou-se que o efeito médio da linhagem E9 não diferiu da linhagem Pegro, mas diferiu da linhagem BSA. Os maiores valores observados em termos de atividade lipolítica em presença de substrato ocorreram no tempo de germinação de 24 horas, verificando-se ainda, uma ligeira queda no tempo de 13 horas.

O desdobramento do efeito "Tempo de Germinação" com a Interação "Tempo de Germinação X Linhagens", mostrou que o efeito do tempo de germinação foi significativo nas linhagens E9 e Pegro, mas não foi significativo na linhagem BSA (Tabela 30).

Tabela 24. Atividade lipolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Linhagens	mM de ácidos graxos liberados/ug de peso seco de conídios			
	Tempos de germinação			
	0	7	13	24
E9	0,081	0,063	0,085	0,072
	0,089	0,089	0,061	0,075
	0,085	0,072	0,072	0,068
Pegro	0,030	0,028	0,023	0,031
	0,015	0,025	0,025	0,021
	0,014	0,021	0,031	0,023
BSA	0,097	0,065	0,062	0,063
	0,063	0,072	0,073	0,065
	0,066	0,067	0,060	0,085

Tabela 25. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade lipolítica de extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Linhagens	2	0,01947	0,009737	111,6049 ***
Tempo	3	0,000146	0,0000489	0,5607560NS
L X T	6	0,0004407	0,0000734	0,8418760NS
Tratamento	11	0,020062	0,00182387	20,903939**
Resíduo	24	0,002094	0,00008725	
Total	35	0,02215656		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 26. Teste de Tukey dos dados obtidos sobre a atividade lipolítica de extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Lin- ha- gens	Médias	tempo de germ. (hs)	Médias	Linhagens/Tempo de germ.			
				Tempos de germ.			
				Médias			
				0	7	13	24
E9	0,0760a*	0	0,0600a	0,085a	0,075a	0,072a	0,071a
Pegro	0,0239b	7	0,0558a	0,017c	0,024c	0,027c	0,025c
BSA	0,0698a	13	0,0546a	0,075b	0,068b	0,065b	0,071b
DMS(5%)	0,00951		0,0121	0,02103	0,2103	0,2103	0,2103
Cv=16,4998							

* Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 27. Atividade lipolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* em diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,01ml/ml de Tween 20.

Linhagens	mM de ácidos graxos liberados			
	Tempos de germinação(horas)			
	0	7	13	24
E9	0,049	0,044	0,046	0,047
	0,047	0,047	0,045	0,048
	0,047	0,043	0,044	0,049
Pegro	0,047	0,048	0,045	0,045
	0,046	0,049	0,042	0,045
	0,045	0,046	0,043	0,045
BSA	0,044	0,043	0,046	0,046
	0,041	0,046	0,043	0,045
	0,045	0,046	0,043	0,047

Tabela 28. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade lipolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,01ml/ml de Tween 20.

Causas de Variação	GL	SQ	QN	F
Linhagens	2	0,0000185	0,00000925	4,44 *
Tempos	3	0,0000263	0,00000877	4,21 *
Linhagem X Tempos	6	0,0000421	0,00000702	3,37 *
Tratamentos	11	0,0000870		3,79 *
Resíduo	24	0,0000500		
Total	35			

*significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 29. Teste de Tukey sobre os dados obtidos sobre a atividade lipolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae*, com diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,01 ml/ml de Tween 20.

Lin- ha- gens	Médias	tempo de germ. (hs)	Médias	Tempo de germ./linhagens		
				Linhagens		
				Médias		
				E9	Pegro	BSA
E9	0,04633a*	0	0,04566a	0,047a	0,046a	0,043a
Pegro	0,04558ab	7	0,04577ab	0,046b	0,047a	0,045ab
BSA	0,04458b	13	0,04411ab	0,045b	0,043c	0,044bc
		24	0,04644b	0,048a	0,045b	0,046c
DMS(5%)	0,001470		0,001876	0,00325	0,00325	0,00325
Cv=	3,17					

* Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna, não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade

Os resultados indicam que as enzimas lipolíticas estão presentes na superfície dos conídios não germinados (tempo de germinação 0 horas) das três linhagens estudadas. A atividade lipolítica extracelular em presença de substrato em média é mais baixa do que a que ocorre intracelularmente, e apresentou variações dependentes da linhagem durante o processo de germinação.

4.6.3. Atividade Lipolítica de Conídios em Ausência de Tween

20.

Os resultados da quantidade de ácidos graxos liberados por conídios das três linhagens de *M. anisopliae* após 24 horas de incubação em MM em ausência de Tween 20 obtida conforme os Itens 3.6.3. e 3.6.5. encontram-se na Tabela 31, e demonstram que, há atividade lipolítica extracelular mesmo na ausência do substrato. A análise de variância dos dados obtidos (Tabela 32) demonstrou que não houve

variação significativa ao nível de 5% de probabilidade em termos de ácidos graxos liberados pelas três linhagens estudadas. Os níveis de atividade lipolítica extracelular em ausência de substrato foram menores que os níveis intracelulares e extracelulares em presença de substrato.

4.7. ATIVIDADE QUITINOLÍTICA DE *M. anisopliae*.

A curva de calibração da medida de N-acetilglicosamina, obtida através do método de Reissig *et al.* (1955), conforme Item 3.6.6. encontra-se na Tabela 33.

4.7.1. Atividade Quitinolítica em Extratos de Conídios com

Diferentes Tempos de Germinação

As quantidades de N-acetilglicosamina liberados pelos extratos de conídios (atividade intracelular) das três linhagens de *M. anisopliae* em diferentes tempos de germina-

Tabela 30. Desdobramento do efeito "Tempo de germinação" com a interação "Tempo de germinação x linhagem" em termos de atividade lipolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 0,01ml/ml de Tween 20.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tempo de germ./ linhagem E9	3	0,0000273	0,00000911	4,37*
Tempo de germ./ linhagem Pegro	3	0,0000289	0,00000963	4,62*
Tempo de germ./ linhagem BSA	3	0,0000122	0,00000408	1,96NS
Resíduo	24	0,0000500	0,00000208	
*significativo ao nível de 5% de probabilidade				
NS não significativo ao nível de 5% de probabilidade				

Tabela 31. Atividade lipolítica de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após 24 horas de incubação em MM na ausência de Tween 20

Linhagens	mM de ácidos graxos liberados/ peso seco de conídios			
	Repetições			Médias
E9	0,035 ¹	0,038	0,032	0,035
Pegro	0,036	0,025	0,032	0,031
BSA	0,027	0,029	0,034	0,030

¹ Média de três repetições

Tabela 32. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade lipolítica de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com 24 de incubação em MM em ausência de Tween 20.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	0,000042	0,000024	1,188NS
Resíduo	6	0,000106	0,000017	
total	8	0,000044		

NS não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 33. Curva de calibração da medida de N-acetilglicosamina obtida pelo método de Reissig *et al.* (1955).

mM de N-acetilglicosamina	Absorbância
0,025	0,130760 ¹
0,050	0,255707
0,100	0,515700
0,200	0,939302
0,300	1,000000

¹ Média de três repetições

Coefficiente de correlação da curva= 0,99

Equação da reta de regressão $y = -0,05858116 + 0,216363x$

ção obtidas conforme os Itens 3.6.1. e 3.6.6. encontram-se na Tabela 34.

A análise de variância(Tabela 35), demonstrou que houve diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade, entre os valores das linhagens, entre os tempos de germinação. Houve também interação significativa entre linhagens e tempos de germinação, o que indica que o efeito dos tempos de germinação varia com a linhagem envolvida.

No teste de Tukey (Tabela 36), pode-se verificar que o efeito médio das linhagens E9 e Pegro não diferiram significativamente entre si, enquanto o efeito médio da linhagem BSA foi significativamente menor que o das anteriores. Não houve diferença significativa entre os efeitos médios dos tempos de germinação 0 e 7 horas, mas houve diferença entre os tempos de 13 e 24 horas. Houve um decréscimo na quantidade de N-acetilglicosamina liberada com o aumento do tempo de germinação.

Tabela 34. Atividade quitinolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após diferentes tempos de germinação.

Linhagens	mM de N-acetilglicosamina liberados			
	Tempos de Germinação			
	0	7	13	24
E9	0,0563	0,0273	0,0226	0,0245
	0,0478	0,0303	0,0269	0,0238
	0,0389	0,0298	0,0051	0,0236
Pegro	0,0323	0,0341	0,0293	0,0106
	0,0331	0,0357	0,0242	0,0113
	0,0296	0,0359	0,0231	0,0110
BSA	0,0195	0,0202	0,0195	0,0098
	0,0214	0,0210	0,0201	0,0110
	0,0218	0,0215	0,0213	0,0112

Tabela 35. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade quitinolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Linhagens	2	0,0008287	0,000414	21,5647 *
Tempos de Germinação	3	0,0017208	0,000573	29,8500 *
Linhagem X Tempo Germ.	6	0,0010015	0,000167	8,6868 *
Tratamentos	11	0,0035500	0,000322	16,8000 *
Resíduo	24	0,0046110	0,000019	
Total	35	0,0040120		

*significativo ao nível de 5% de probabilidade

O desdobramento do efeito "Tempo de Germinação" com a interação "Tempo de Germinação X Linhagem" (Tabela 37) mostrou que houve diferença significativa entre os tempos de germinação para todas as linhagens, sendo este efeito mais intenso nas linhagens E9 e Pegro.

Como se pode observar existe atividade quitinolítica intracelular nos conídios de *M. anisopliae* mesmo antes da germinação (tempo de germinação 0 horas) e, os níveis destas enzimas variam durante o processo de germinação dependendo da linhagem envolvida.

4.7.2. Atividade Quitinolítica em conídios de *M. anisopliae* em presença de quitina.

Os resultados observados em termos de quantidade de N-acetilglicosamina liberados por conídios de três linhagem de *M. anisopliae*, em diferentes tempos de germinação em presença de quitina, obtidos conforme Itens 3.6.2. e 3.6.6., encontram-se na Tabela 38.

Tabela 36. Teste de Tukey sobre os dados obtidos sobre a atividade quitinolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Linha- gens	Tempos de		Tempos de germ./Linhagens			
	Médias Germ.	(Hs)	Médias	Médias		
				E9	Pegro	BSA
E9	0,02974a*	0	0,03341a	0,0476a	0,0315a	0,0209a
Pegro	0,02585a	7	0,02842a	0,0291b	0,0352ab	0,0209a
BSA	0,01819b	13	0,02134b	0,0182bc	0,0255ab	0,0203a
		24	0,01520c	0,0239c	0,0233b	0,0106a
DMS(5%)	0,00447		0,005698	0,00987	0,00987	0,00987
Cv=	17,8237					

* Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 37. Desdobramento do efeito principal "Tempo de Germinação" com a interação "Tempo de Germinação X Linhagens" em termos de atividade quitinolítica em extratos de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Tempo de Germ./ Linhagem E9	3	0,001464	0,0004882	25,407 **
Tempo de Germ./ Linhagem Pegro	3	0,001030	0,0003434	17,875 **
Tempo de Germ./ Linhagem BSA	3	0,000227	0,0000757	3,941 *

Resíduo 24

*significativo ao nível de 5% de probabilidade

A análise de variância (Tabela 39), demonstrou que houve diferenças altamente significativas ao nível de 5% de probabilidade, entre as linhagens e entre os tempos de germinação. Também foi significativa a interação tempo de germinação X linhagem.

O teste de Tukey (Tabela 40), demonstrou que a linhagem E9 apresentou valores significativamente maiores que as linhagens Pegro e BSA, as quais não diferiram entre si. A atividade enzimática no tempo de germinação de 24 horas apresentou também valores significativamente menores que os tempos de 7 e 13 horas.

No desdobramento do efeito "Tempo de Germinação" com a Interação "Tempo de Germinação X Linhagens" observou-se que o tempo de germinação influenciou significativamente nas linhagens Pegro e BSA mas não na linhagem E9 (Tabela 41). Não foi detectada atividade quitinolítica extracelular na superfície dos conídios não germinados (tempo de germinação de 0 horas). A atividade quitinolítica extracelular em presença

Tabela 38. Atividade quitinolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 15mg/ml de quitina.

Linhagens	uM de N- acetilglicosamina liberados			
	Tempos de germinação			
	0	7	13	24
E9	-	0,0401	0,0365	0,0398
	-	0,0387	0,0410	0,0389
	-	0,0303	0,0374	0,0418
Pegro	-	0,0252	0,0254	0,0163
	-	0,0254	0,0252	0,0151
	-	0,0248	0,0249	0,0151
BSA	-	0,0254	0,0244	0,0152
	-	0,0246	0,0257	0,0156
	-	0,0254	0,0250	0,0148

Tabela 39. Análise de variância da atividade quitinolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 15mg/ml de quitina.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
linhagens	2	0,00161714	0,0008085	194,57**
Tempos de Germinação	2	0,00018670	0,0000938	22,58*
LinhagensX Tempo de germ.	4	0,00021560	0,0000539	12,97*
Tratamentos	8	0,00202042	0,0000252	60,77*
Resíduo	18	0,00007480	0,0000041	
total	26	0,00209522		

*significativo ao nível de 5% de probabilidade

de quitina variou com a linhagem envolvida.

4.7.3. Atividade Quitinolítica de Conídios de *M. anisopliae* em Ausência de Quitina.

Na Tabela 42 encontram-se os resultados em termos de liberação de N-acetilglicosamina por conídios das três linhagens de *M. anisopliae*, incubados por 24 horas em ausência de quitina conforme Itens 3.6.3. e 3.6.6..

A análise de variância (Tabela 43), demonstrou que houve diferenças significativas entre as linhagens. As linhagens Pegro e BSA não apresentaram valores significativamente diferentes entre si mas a linhagem E9 apresentou valores significativamente maiores que os das anteriormente citadas

Os resultados indicam que há atividade quitinolítica em ausência de substrato.

Tabela 40. Teste de Tukey dos dados obtidos sobre a atividade quitinolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 15mg/ml de quitina.

Linha- gens	Médias	Tempo de germ. (hs)	Médias	Tempo de germ./Linhagens		
				Médias		
				E9	Pegro	BSA
E9	0,038277a*	7	0,028877a	0,0363a	0,0251a	0,0251a
Pegro	0,021933b	13	0,029500a	0,0383a	0,0251a	0,0250a
BSA	0,021788b	24	0,023622b	0,0401a	0,0155b	0,0152b
DMS(5%)	0,00245		0,002453	0,00424	0,00424	0,00424
Cv= 7,45						

*Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada coluna não são significativamente diferentes ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 41. Desdobramento do efeito "Tempo de germinação" com a interação "Tempo de germinação x Linhagens" em termos de atividade quitinolítica em conídios de três linhagens de *M. anisopliae* com diferentes tempos de germinação em MM contendo 15mg/ml de quitina.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tempo de germ./ linhagem E9	2	0,00002166	0,0000108	2,60NS
Tempo de germ./ linhagem Pegro	2	0,0001862	0,0000931	22,40**
Tempo de germ./ linhagem BSA	2	0,0001953	0,00009768	23,50**

*significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 42. Atividade quitinolítica de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após 24 horas de incubação em MM em ausência de quitina.

Linhagens	µM de N- acetilglicosamina liberados/ peso seco de conídios			Médias
	Repetições			
E9	0,0415	0,0414	0,0448	0,0426
Pegro	0,0162	0,0163	0,0160	0,0162
BSA	0,0164	0,0168	0,0166	0,0166

Tabela 43. Análise de variância dos dados obtidos sobre a atividade quitinolítica de conídios de três linhagens de *M. anisopliae* após 24 horas de incubação em MM em ausência de quitina.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Linhagens	2	0,001268	0,0006343	17566,36***
blocos	2	0,0000000688	0,0000000344	0,09NS
Resíduo	4	0,000000144	0,0000000361	
Total	8	0,001268		
Cv= 0,76				

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

NS não significativo ao nível de 5% de probabilidade

4.8. BIDENSAIO

Na Tabela 45 encontram-se os resultados em porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após 5 dias da exposição a diferentes concentrações de conídios de cada uma das quatro linhagens de *M. anisopliae* ensaiadas conforme Item 3.3. As porcentagens de mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* em diferentes dias após a reexposição a uma concentração de 30×10^4 conídios/ml das linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae* encontram-se na Tabela 45.

4.8.1. REISOLAMENTO DAS LINHAGENS DE *M. anisopliae* A PARTIR DE NINFAS MORTAS

As ninfas mortas durante o bioensaio foram tratadas conforme o Item 3.3.4 do Material e Métodos para verificar se a morte foi causada pela exposição aos conídios do fungo. De todos os insetos mortos durante o bioensaio foram

Tabela 44. Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após 5 dias da exposição às linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae*.

Linhagens	Concentração de conídios	Porcentagem de mortalidade acumulada
E9	35	0
	35 x10 ²	16
	35 x10 ⁴	44
	35 x10 ⁶	96
Pegro	32	0
	32 x10 ²	12
	32 x10 ⁴	36
	32 x10 ⁶	92
BSA	32	0
	32 x10 ²	8
	32 x10 ⁴	32
	32 x10 ⁶	88
V14	31	0
	31 x10 ²	8
	31 x10 ⁴	36
	31 x10 ⁶	88

Tabela 45. Porcentagem de mortalidade acumulada de *R. prolixus* em diferentes dias após a exposição a uma concentração de 30 x10⁴ conídios/ml das linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae*.

Dias	Linhagens			
	E9	Pegro	BSA	V14
4	36	8	0	4
5	44	16	8	4
6	72	32	12	12
7	96	36	20	12
8	100	64	28	12
9	100	64	28	24
10	100	64	28	28
11	100	64	44	28
12	100	64	56	28

reisoladas as linhagens em estudo, confirmando assim a ação do fungo.

4.8.2 VIRULÊNCIA DAS LINHAGENS

Os resultados dos bioensaios foram expressos sob a forma de Concentração letal 50(LC50) e Tempo letal 50(LT50) conforme Item 3.3.5..

4.8.2.1 CONCENTRAÇÃO LETAL 50% (LC50)

A medida da virulência dos isolados foi expressa sob a forma de LC50, que é a concentração de conídios necessária para matar 50% da população de insetos num dado tempo.

Os resultados de LC50 encontram-se na Tabela 46, baseados na mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após 5 dias da exposição a diferentes concentrações de conídios conforme Tabela 46. Observa-se que a linhagem E9 foi a que apresentou menor valor de LC50 seguida pelas linhagens Pegro, V14 e BSA.

4.8.2.2. TEMPO LETAL (LT50)

O tempo letal 50% expresso em número de dias necessários para que uma dada concentração de conídios de *M. anisopliae* provoque 50% de mortalidade na população de *R. prolixus* encontra-se na Tabela 47. Os resultados foram calculados com base na mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após diferentes dias de exposição a uma dose de 30×10^4 conídios/ml de cada uma das linhagens de *M. anisopliae*. A linhagem E9 também apresentou menor valor no que se refere à LT50, seguida pelas linhagens Pegro, V14 e BSA.

4.8.2.3. HIPÓTESE DE PARALELISMO

Foi verificado o paralelismo das retas de regressão, utilizando o teste de χ^2 para as linhagens de *M. anisopliae* em relação aos LC50 observados no 5º dia após a exposição à diferentes concentrações de conídios e estão representados na Tabela 48.

Observa-se que os valores de χ^2 das linhagens

Tabela 46. Concentração Letal 50% e intervalos de confiança(IC) das linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae* expressos em 10^5 conídios/ml.

Linhagens	LC50	IC	
		inferior	superior
E9	2,5165	0,7772	8,1430
Pegro	4,9329	1,4727	16,5238
BSA	8,9608	2,7274	29,4408
V14	7,2872	0,0223	23,7663

TABELA 47. Tempo letal 50% (LT50) e Intervalos de Confiança (IC) das linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae*.

Linhagens	LT50(dias)	IC	
		inferior	superior
E9	4,9	3,9	6,0
Pegro	8,8	7,4	10,6
BSA	14,3	12,9	15,9
V14	12,7	11,1	14,5

E9, BSA e V14 não são significativos ao nível de 5% de probabilidade, não diferindo significativamente no valor angular na equação da reta de regressão e que a distribuição das respostas aderem à reta de regressão em concordância entre as curvas calculadas e observadas.

4.8.2.4. POTÊNCIA RELATIVA

Como a hipótese de paralelismo foi confirmada, pode-se calcular a Potência relativa (R) para as linhagens estudadas com relação aos LC50 (Tabela 49).

A linhagem E9 foi tomada como padrão e nenhuma das linhagens apresentou sobreposição de Intervalos de Confiança com a linhagem padrão. As linhagens Pegro, BSA e V14 apresentaram Intervalos de Confiança que se sobrepõem (Figura 6).

Tabela 48. Teste de χ^2 para comparação dos Lt50 das linhagens E9, Pegro, BSA e V14 de *M. anisopliae*.

Contrastes	GL	χ^2	Significância
Ajuste E9	2	2,2217	NS
Ajuste Pegro	2	1,7754	NS
Ajuste BSA	2	1,5137	NS
Ajuste V14	2	0,4286	NS
Total conjunto	8	5,9394	NS
Paralelismo	3	0,0235	NS
Total	11	5,9629	

NS Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

** significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 49. Potência relativa(R) e seus intervalos de confiança(IC) para os LC50 das linhagens E9, Pegro e V14 de *M. anisopliae* com relação à linhagem E9.

Linhagens	R	IC	
		inferior	superior
E9	1,00	-	-
Pegro	0,50	0,22	0,78
BSA	0,27	0,01	0,53
V14	0,34	0,08	0,60

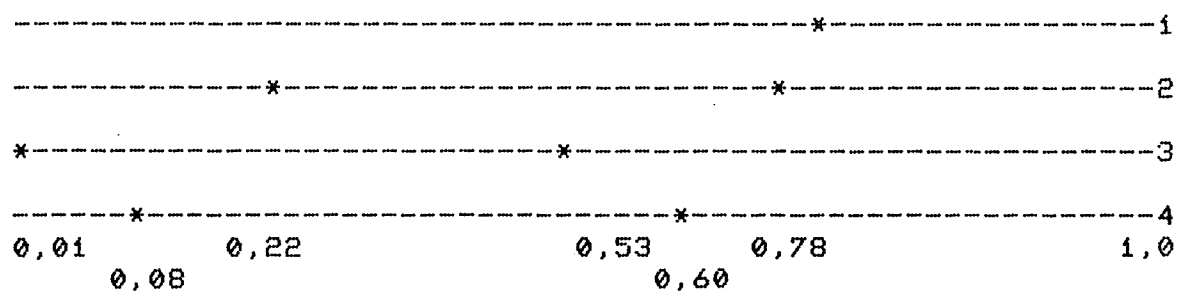


Figura 6. Intervalos de confiança da Potência relativa das linhagens E9(1), Pegro(2), BSA(3) e V14(4) de *M. anisopliae*.

4.9. VIRULÊNCIA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM CONÍDIOS DE *M.**anisopliae*

Existe uma extensa discussão na literatura sobre o relacionamento entre produção de enzimas degradadoras da cutícula e virulência em fungos entomopatogênicos (SAMSINAKOVA & MISIKOVA, 1973; GRULA *et al.*, 1978; AL-AIDROOS & SEIFERT, 1980; ROBERTS & AL-AIDROOS, 1985; SILVA & MESSIAS, 1986; SAMUELS *et al.*, 1989 e ST LEGER *et al.*, 1989)). RIBA *et al.* (1985), sugerem que a virulência em fungos entomopatogênicos é provavelmente a interação da manifestação de muitos genes. A maioria dos trabalhos relaciona variações na quantidade de enzimas produzidas ou mesmo presença ou ausência de produção destas enzimas com virulência.

Mais um aspecto a ser considerado em relação à estas enzimas pode ser não só a quantidade produzida mas também a conjugação desta quantidade com o momento de produção quando se pensa em virulência.

Após a deposição do conídio sobre a cutícula do inseto, deve haver um momento específico nos estágios iniciais da germinação, em que estas enzimas serão produzidas e atuarão na degradação da cutícula para a penetração. Desta maneira, o comportamento de uma linhagem em termos de variações na atividade das enzimas envolvidas no processo de penetração ao longo do período de germinação dos conídios pode ser também um aspecto importante ligado à virulência.

A linhagem E9, neste trabalho foi a mais virulenta em termos de mortalidade de ninfas de *R. prolixus*, seguida pelas linhagens Pegro, V14 e BSA (Tabela 49). O comportamento das linhagens E9, Pegro e BSA apresentou variações durante o processo de germinação com relação às atividades amilolítica, lipolítica e quitinolítica.

Verificou-se que aparentemente há atividade lipolítica na superfície de conídios não germinados mas, atividades amilolítica e quitinolítica não foram detectadas nesta mesma condição. SAMSINÁKOVÁ *et al.* (1971), utilizaram

misturas de enzimas comerciais lipases, proteases e quitinases e filtrados de cultura de *B. bassiana* sobre cutículas de *G. mellonella* e observaram que lipases e proteases atacaram a cutícula antes das quitinases. A epicutícula, primeira camada da cutícula, é constituída de lipídeos e proteínas, justificando a presença de atividade lipolítica detectada na superfície dos conídios.

Em termos de atividade amilolítica extracelular em presença de substrato verificou-se que a linhagem BSA exibiu altos índices em todos os tempos de germinação, apresentando entretanto menor virulência que as linhagens E9 e Pegro, o que pode indicar que alta atividade amilolítica nesta fase não está relacionada com virulência.

Quanto à atividade quitinolítica extracelular em presença de substrato pode-se salientar que, enquanto as linhagens Pegro e BSA apresentam queda de atividade entre os tempos de incubação de 13 e 24 horas, a linhagem E9 apresenta um aumento de atividade neste mesmo período. A

quitina é componente da procutícula , segunda camada da cutícula, e, deve ser degradada mais tardiamente no processo de penetração fato que, talvez ofereça alguma vantagem à linhagem E9.

5. CONCLUSÕES:

a) A seleção de conídios precocemente germinados deslocou o tempo de germinação mínimo (tempo em que 85% dos conídios estão germinados) da linhagem E9 de *M. anisopliae* de 12 horas para 11 horas de incubação em Meio mínimo.

b) O conteúdo de proteína total dos conídios das linhagens E9 Pegro e BSA de *M. anisopliae* sofre um aumento com o aumento do tempo de incubação. O início da síntese de proteínas ocorre em tempos diferentes: na linhagem E9, entre 0 e 7 horas de incubação e, nas linhagens Pegro e BSA, entre 7 e 13 horas. Aparentemente não ocorre síntese de novos tipos de proteínas, apenas dos tipos já presentes antes da germinação.

c) Existe uma variabilidade nas linhagens de *M. anisopliae* quanto aos níveis intra e extracelulares de atividade ami-

lolítica, lipolítica e quitinolítica em conídios, e também um comportamento diferente destas atividades durante o processo de germinação entre as linhagens.

d) Entre as linhagens E9, Pegro, BSA e V14, foi observado que a linhagem E9 é a mais potente para matar ninfas de *R. prolixus*, seguida pelas linhagens Pegro, V14 e BSA.

6. RESUMO

Foi estudada neste trabalho a variação em alguns aspectos da germinação de conídios de linhagens de *M. anisopliae* var *anisopliae*.

Verificou-se que o tempo de germinação mínimo (TGM), definido como o tempo em que 85% dos conídios estão germinados, para a linhagem E9 em meio mínimo foi de 12 horas de incubação. Seleções sucessivas de conídios precocemente germinados, deslocaram o TGM para 11 horas de incubação no quarto selecionamento.

Foi analisado o conteúdo de proteína total das linhagens E9, Pegro e BSA de *M. anisopliae* através do método de BRADFORD (1976), modificado, e verificou-se que há variações entre as linhagens. Observou-se que ocorre, em geral, um aumento no conteúdo de proteína total com o aumento do tempo de germinação, e que, o início da síntese de proteínas foi diferente nas linhagens estudadas. A linhagem E9 iniciou

a síntese de proteína entre os tempos de germinação de 0 e 7 horas e as linhagens Pegro e BSA entre 7 e 13 horas.

As atividades amilolítica, lipolítica e quitinolítica foram analisadas nos conídios das três linhagens de *M. anisopliae*, quanto aos níveis intracelulares, extracelulares em presença de substrato e extracelulares em ausência de substrato, durante o processo de germinação. As linhagens mostraram uma variação nos níveis intracelulares iniciais e nas modificações que ocorrem nestas atividades durante o processo de germinação. Observou-se que há atividade lipolítica extracelular, em presença de substrato, na superfície de conídios não germinados das três linhagens estudadas mas, o mesmo não acontece com as atividades amilolítica e quitinolítica. Verificou-se ainda, que ocorrem variações nos níveis das atividades enzimáticas durante o processo de germinação, variações estas que dependem da linhagem estudada. As três linhagens mostraram atividades amilolítica, lipolítica e quitinolítica extracelulares em ausência de substrato.

to.

A virulência destas três linhagens foi obtida através de bioensaio com ninfas do inseto *R. prolixus* em regime de fome. Utilizando-se o cálculo de potência relativa, pode-se observar que a linhagem E9 foi a mais virulenta, seguida pelas linhagens Pegro, V14 e BSA.

7. ABSTRACT

This work studied the variation of some aspects of the conidia germination of strains of *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*.

It was verified that the minimal germination time (TGM, defined as the period in which 85% of the conidia were germinated) for the strain E9 on Minimal Media was 12 hours of incubation. Successive selections of conidia presenting early germination at shifted the TGM to 11 hours of incubation in the fourth selection cycle.

The total protein content of the *M. anisopliae* strains, E9, Pegro and BSA was analysed by BRADFORD's method (1976), modified, and it was verified that there are variations in the total protein content related to an increase of germination time, and that the beginning of the protein synthesis was different in the studied strains. The E9 strain began the protein synthesis between 0 and 7 hours

of germination time, and the strains Pegro and BSA between 7 and 13 hours.

The intra and extracellular levels of amilolytic, lipolytic and chitinolytic activities were analysed in the three strains of *M. anisopliae* conidia in the presence of substracts and for the extracellular levels in absence of the substract during the germination process. The strains showed variation in the initial intracellular levels of the mentioned activities and in the observed modifications occurrig in these activities during the process. It was observed that there is lipolytic extracellular activity (in the presence of the substract) on the nongerminated conidia surface of all three strains, but the same does not occur with the amilolytic and quitinolytic activities.

Furthermore, it was observed, depending on the studied strain, the occurence of variation on enzymatic activity levels during the germination process. The three strains showed amilolytic, lipolytic and chitinolytic

extracellular activities in the absence of substract.

The virulence of these three strains was evaluated by bioassay of *Rhodnius prolixus* ninphae in starvation regime. Utilizing the Relative Potency method, it was observed that the E9 strain was the most virulent, followed by the Pegro, V14 and BSA strains.

8. BIBLIOGRAFIA

- ADAMEK, L. Submerge cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae*(Metsch). *Folia Microbiologica* 10:255-267. 1965.
- AGUDA, R. M.; ROMBACH, M. C.; IM, D. J. & SHEPARD, B. M. Supression of population of the brown planthopper *Nilaparva lugens*(Stal) (Homoptera:Delphacidae) in field cages by entomogenous fungi(DEUTEROMYCOTINA) in rice in Korea. *Journal of Applied Entomology* 104: 167-172. 1987.
- AL-AIDROOS, K. Demostration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 22:309-314. 1980.
- AL-AIDROOS, K. & ROBERTS, D. W. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 22:211-219. 1978.
- 1978.
- AL-AIDROOS, K. M. & SEIFERT, A. M. Polisaccharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 36:29-34. 1980.

- ALVES, S. B.; RISCO, S. H.; SILVEIRA NETO, S. & MACHADO NETO, R. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae*(Metsch.) Sorok. to *Diatraea saccharalis*(Fabr.) *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie* 97:403-406. 1984.
- ANDERSEN, S. D. Biochemistry of insect cuticle. *Annual Review of Entomology* 24:29-61. 1979.
- AQUINO, M. L. N. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no estado de Pernambuco. *Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas* (Recife) 72:1-26. 1974.
- AQUINO, M. L. N.; CAVALCANTI, A. L. B.; SENA, R. C. & QUEIROZ, G. F. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*. *Boletim Técnico da CODECAP* (Recife) 4:1-31. 1975.
- AQUINO, M. L. N.; VITAL, A. F.; CAVALCANTE, V. L. B. & NASCIMENTO, M. G. Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em sacos de polipropileno. *Boletim Técnico da CODECAP* (Recife) 5:7-11. 1977.
- ARRAIS DE MATOS, A. J. Crescimento, germinação, conidiação e resistência a luz ultra-violeta de linhagens de

Metarhizium anisopliae. Campinas, SP, 1983. 78p. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas.

ARRAIS DE MATOS, A. J. Germinação conidial em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Campinas, SP, 1988. 217p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

AZEVEDO, J. L. & COSTA, S. O. P. *Exercícios práticos de Genética*. São Paulo, Cia. Editora Nacional, 1973. p288.

AZEVEDO, J. L. & MESSIAS, C. L. Tamanho de conídios em diferentes isolamentos de *Metarhizium anisopliae*. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico* 2:5-8. 1981.

BAGALHI, E. & AZEVEDO, J. L. Paramiose e melhoramento genético do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Anais da 15ª Reunião de Genética de Microorganismos*, Piracicaba, SP, 1988. pp63.

BALFOUR-BROWNE, F. L.. The green muscardine diseases of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London* (Series A) 35:65-74. 1960.

BARBOSA, F. R.; MOREIRA, W. A. & SANTOS, G. Efeito de suces-

- sivas repicagens em arroz na virulência de *Metarhizium anisopliae* para *Deois flavopicta*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 20: 1115-1118. 1985.
- BARON, G. L. *The genera of hyphomycetes from soil*. Baltimore Williams & Wilkins Co Ed, 1968. 686p.
- BASTOS, C. N. & DA MATA, E. A. F. Influência das temperaturas e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae*(Metsch.)Sorokin. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*(Salvador) 15:5-8. 1976.
- BELL, J. V. & HAMALE, R. J. Viability and pathogenicity of entomogenous fungi after prolonged storage on silica-gel at 20°C. *Canadian Journal of Microbiology* 20:639-642. 1974.
- BERNIER, L.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. & CLARCSO, J. M. Transformation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to benomyl resistance. *FEMS Microbiology Letters* 60:261-266. 1989.
- BHELLA, R. S. & ALTOSAAR, I. Translational control of alfa amylase gene expression in *Aspergillus awamori*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 9:287-293. 1987.
- BLISS, C. I. The comparison of dosage-mortality data. *Annual*

Applied Biology 22:134-167. 1935.

- BRADFORD, M. M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254. 1976.

CAMERON, J. W. M. Factors affecting the use of microbial pathogens in insect control. *Annual Review of Entomology* 8:265-286. 1963.

CHAMPLIM, F. R. & GRULA, E. A. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. *Applied Enviromental Microbiology* 37:1122-1125. 1979.

CLERK, G. C. & MADELIN, M. F. The longevity of three insect parasiting hyphomycetes. *Transaction of the British Mycological Society* 48:193-209. 1965.

COCHRAN, W. G. The problem of the evaluation of Rotenone containing pants (Appendix). *Annals of Applied Biology* 25:426-429. 1938.

DAOUST, R. A. & GUNNER, H. B. Microbial synergists pathogenic to *Lymanthis dispar*: chitonolytic and fermentation bacterial interaction. *Journal of Invertebrate Pathology* 3:368-377. 1979

DAOUST, R. A. & ROBERTS, D. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of grow substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology* 41:161-170. 1983.

DAOUST, R. A.; WARD, M. G. & ROBERTS, D. W. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 40:228-236. 1982.

DAOUST, R. A.; WARD, M. G. & ROBERTS, D. W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 41:151-160. 1983a.

DE BACH, *Control biologico de las plagas de insectos y malas hierbas*. México, D.F. Compañía Editorial Continental SA. 1968. 949p.

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

DEPLOEY, J. J.; FORTMAN, B. & PERVA, L. Daily measurements of *Mucor miehei* lipase activity. *Micologia* 73:953-958.

1981.

DILLON, R. J. & CHARNLEY, A. K. Initiation of germination in conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 94:299-304. 1990.

DOBERSKI, J. E. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of Elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37:195-200. 1981.

DOBERSKI, J. W. & TRIBE, M. T. Isolation of entomogenous fungi from Elm Bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transaction of the British Micological Society* 74:95-100. 1980.

DURIEZ-VAUCELLE, T.; FARGUES, J.; ROBERT, P. H. & POPEYE, R. Etude enzymatique comparée de champignons entomopathogènes de genres *Beauveria* et *Metarhizium*. *Mycopathologia* 75:109-126. 1981.

EVILAKHOVA, A. Mass culture of entomopathogenic fungi. *Zashchita Rastenii Mask* 11:43. 1966.

FARGUES, J.; DURIEZ, T.; ANDRIEU, J.; POPEYE, R. & ROBERT, P.
 Etude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (Delacr.) sien champignon hiphomycète entomopathogène. *Comptes Rendus Hebdomadaires de Séances del'Academie des Sciences*, Paris (Sér. D) 281:1781-1784. 1975.

FARGUES, J.; DURIEZ, T.; POPEYE, R.; ROBERT, P. H. & BIGUET, J.. Immunological characterization of the entomopathogenic hyphomycètes *Beauveria* and *Metarhizium*. *Mycopathologia* 75:101-108. 1981.

FERRON, P.; ROBERT, P. M. & DEOTTE, A. Susceptibility of *Oryctes rhinoceros* adults to *Metarrhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 25:313-319. 1975.

FINNEY, D. J. *Probit analysis*. 3th Ed. Cambridg, Un. Press, 1971. 333p.

FRANZ, J. M. Biological Control of Pests insects in Europe. *Annual Review of Entomology* 6:183-200. 1961.

FUXA, J. R. & TANADA, Y. *Epizootiology of insects diseases*. Cap.5 . The Pathogen Population, TANADA, Y. & FUXA, J. R. Eds. John Willey & Sons, USA. 1987

GABRIEL, B. P. Enzymatic activities of some entomophthorous

fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 11:70-81. 1968.

GABRIEL, B. P. Histochemical study of the insect cuticle infected by the fungus *Entomophthora coronata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 11:82-89. 1968a.

GARCIA, A. T. E.; BARACHO, I. R.; SOUZA, H. M. L. & MESSIAS, C. L. Virulência de linhagens mutantes e diploides de *Metarhizium anisopliae* em *Ceratitis capitata* (Wied) (DIPTERA:TEPHRITIDAE). *Revista Brasileira de Entomologia* 29:267-270. 1985.

GOETTEL, M. S.; ST LEGER, R.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. *Current Genetics* 17:129-132. 1990.

GOETTEL, M. S.; ST LEGER, R. J.; RIZZO, N. W.; STAPPLES, R. C. & ROBERTS, D. W. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Journal of General Microbiology* 135:2233-2240. 1989.

GOYER, R. A. & BENJAMIN, D. M. Infection of a pine root weevil, *H. rhizophagus* by two muscardine fungi. *Journal*

of Economic Entomology 64:562. 1971.

GRULA, E. A.; BURTON, R. L.; SMITH, R.; MAPES, T. L.; CHUENG, P. Y. R.; PEKRUL, S.; CHAMPLIN, F. R.; GRULA, M. & ABEGAZ, B. Biochemical basis for entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. Conference on the production, selection and standartization of entomopathogenic fungi of Project V, Microbiological Control of Insects Pests, of the US/USSR joint working group on the production of substances of microbial. Cont. Riga, Latvia. SSR, May 20 -21. 1978.pp 192-216.

GRULA, E. A.; WOODS, S. P. & RUSSEL, H. Studies utilizing *Beauveria bassiana* as an entomopathogen. In: ROBERT, D. W. & AIST, J. R. Eds. *Infection Processes of Fungi*. USA, The Rockefeller Foundation. 1984. p147-152.

GUAGLIUMI, P. A cigarrinha das pastagens ataca a cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. *Brasil Açúcareiro* 76:89-91. 1970.

GUAGLIUMI, P. Resultados preliminares da luta contra a cigarrinha da folha da cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco. *Brasil Açúcareiro* 80:49-51. 1972.

HANEL, H. A bioassay for measuring the virulence of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*(Metsch.)

- Sorok. (fungi imperfecti) against the termite *Nasutitermis exitius* (Hiel) (Isoptera, Termitidae) biological control. *Journal of Applied Entomology* 92:9-18. 1981.
- HANKIN, L. & AGNAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67:597-607. 1975.
- HASSAN, A. E. M.; DILLON, R. J. & CHARNLEY, A. K. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54:277-279. 1989.
- HIDALGO - SALVATIERRA, O. & BERRIOS, F. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepdoptera: Pylalide). XII. Determination of the LC₅₀ of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin spores on fifth instar larvae. *Turrialba* 22:435-438. 1972.
- HUBER, J. Untersuchungen zur physiologie insektentötender pilze. *Archiv fur Mikrobiologie* 29:257-216. 1958.
- HUXAM, I. M.; SAMUELS, K. D.Z.; HEALE, J. B. & MCCORKINDALE, N. J. In vivo and in vitro assays for patogenicity of wild-type and mutant strains of *Metarhizium anisopliae*

- for three insect species. *Journal of Invertebrate Pathology* 53:143-151. 1989.
- HYWEL-JONES, N. L. & GILLESPIE, A. T. Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Mycological Research* 94:389-392. 1990.
- KIRSCHBAUM, J. B. Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. *Annual Review of Entomology* 30:51-70. 1985.
- KODAIRA, Y. Studies on the new toxic substances to insects, dextruxin A and B, produced by *Dospora destructor*. Part I. Isolation and purification of dextruxin A and B. *Agricultural and Biological Chemistry* 26:36-42. 1962.
- KUCERA, M. & SAMSINÁKOVÁ, A. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 35:304-310. 1980.
- KUCERA, M. Partial purification and properties of *Galleria mellonella* larvae proteolytic inhibitors acting on *Metarhizium anisopliae* toxic protease. *Journal of Invertebrate Pathology* 43:190-196. 1984.

- LACEY, C. M.; LACEY, L. A. & ROBERTS, D. R. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 108-118. 1988.
- LATCH, G. C. M. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 8:384-396. 1965.
- LATCH, G. C. M. & KAIN, W. M. Control of porina caterpillar (*Wiseana* spp) in pasture by the fungus *Metarhizium anisopliae*. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 11:351-354. 1983.
- LAW, D. J. & TIMBERLAKE, W. E. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 144:509-517. 1980.
- LECUONA, R. E.; FERNANDES, P. M.; ALVAS, S. B. & BLICHER, E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. à Broca do Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 15:21-27. 1986.
- LI, DONG PING & HOLDOM, D. G. Effects of carbon and nitrogen sources and vitamins on germination, growth and sporula-

tion of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*. Adelaide, Australia, August 20-24. 1990. p154.

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

MADELIN, M. F. Fungal parasites of Invertebrates I. Entomogenous fungi. In: AINSWORTH, G. C. & SUSSMAN, A. S. Eds. *The fungi* 3:227-238. 1968.

MARQUES, E. J. A cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal) (Homoptera: Cercopidae) fator limitante na produção de açúcar no Nordeste do Brasil. Pernambuco, IAA/PLANALÇUCAR, COONE, 1981. 12p (Trabalho apresentado ao VI Encontro Nacional de Entomologistas do IAA/PLANALÇUCAR, João Pessoa, 1981. p. 187-198.).

MARQUES, E. J.; VILAS BOAS, A. M. & PEREIRA, C. E. F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em laboratórios setoriais. *Boletim Técnico da PLANALÇUCAR* (Piracicaba) 3: 1-23. 1981.

- MC CAULEY, V. J.; ZACHARUK, R. Y. & TINLINE, R. D. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 12:444-459. 1968.
- MC LEOD, D. M.; CAMERON, J. W. M. & SOPER, R. S. The influence of environmental conditions on epizootics caused by entomogeneous fungi. *Revue Romaine de Biologie et Botanique* 11:125-134. 1966.
- MENDONÇA FILHO, A. F. & COSTA, J. M. B. O Problema do controle integrado da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* Stal (Homoptera: Cercopidae) no Estado de Alagoas durante a campanha de 1979. Resultados e perspectivas futuras. Maceió, IAA/PLANALÇUCAR, COONE, 1980. 13p (Trabalho apresentado ao V Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALÇUCAR, Itajaí, 1981. p170-182).
- MESSIAS, C. L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, SP, 1979, 73p. Tese de Doutorado. ESALQ, USP.
- MESSIAS, C. L. Fungos, sua utilização para controle de insetos pragas de importância médica e agrícola. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84:57-59. 1989.
- MESSIAS, C. L.; ROBERTS, D. W. & GREFIG, A. J. Pyrolysis-gas

chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*: an aid to strain identification. *Journal of Invertebrate Pathology* 42: 393-396. 1983.

MESSIAS, C. L. & AZEVEDO, J. L. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society* 75:473-477. 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*. *Journal of Invertebrate Pathology* 47:231-233. 1986.

MESSIAS, C. L. & PUPIN, A. M. The cuticular components from *Diatraea saccharalis* and their effect on *in vitro* growth of *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*. *Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*. Adelaide, Australia, August 20-24. 1990. p315.

MOHAMED, A. K.; JACKSON, S. D. & NELSON, F. R. S. Proteolytic activity of two isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of the Georgia Entomology Society* 19:275- 278. 1984.

MOURA-COSTA, M. D. Susceptibilidade do Triatomíneo *Rhodnius*

prolixus ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. *Anais da Academia de Medicina (Bahia)* 1:35-44. 1978.

MOURA-COSTA, M. D. & MAGALHÃES, Um novo meio de cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin parasito da cigarrinha das pastagens. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia* 13:57-60. 1974.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153:357-381. 1944.

PAL, A.; ROY, A. & DAS, A. Production of amilase by *Polyporus ostreiformis*. *Mycologia* 72:1134-1141. 1980.

PARIS, S.; BIZZINI, B. & SEGRETAİN, G. Purification d'une protéine caractéristique des souches pathogènes de *Beauveria tenella*. *Annales de Microbiologie* 126:193-202 1975.

PARIS, S. & FERRON, P. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria brogniarti* (= *Beauveria tenella*). *Journal of Invertebrate Pathology* 34:71-77. 1979.

PARIS, S. & SEGRETAİN, G. Caractères physiologiques de *Beauveria tenella* en rapport avec la virulence de souches

de ce champignon pour la larve du hanneton commun *Melolontha melolontha*. *Entomophaga* 20:135-138. 1975.

PARIS, S. & SEGRETAIN, G. étude de l'activité lipasique-estérasique intracellulaire de *Beauveria tenella*. *Annales de Microbiologie* 129:133-145. 1978.

PAVLYUSHIN, V. A. Virulence mechanisms of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. In: IGNOFFO, C. M. ed. *Proceedings of the first joint US/USSR conference on the production, selection and standardization of entomopathogenic fungi of Project V, Microbiological control of insect pests, of the US/USSR, joint working group on the production of substances by microbiological means*. Conf. Riga, Latvia SSR, May 20-21, 1978. p.153-171.

PEKRUL, S. & GRULA, E. A. Mode of infection of the corn carworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopic. *Journal of Invertebrate Pathology* 34:238-247. 1979.

PETCH, T. Notes on Entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 16:55-75. 1931.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMONS, L. M.; MAC DONALD, K. D. & BUTTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*

Advances in Genetics 5:141-238. 1953.

PRIOR, C. & ARURA, M. The infectivity of *Metarhizium anisopliae* to two insect pests of Coconuts. *Journal of Invertebrate Pathology* 45:187-194. 1985.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L. & LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for estimation of N-acetylamino-sugars. *Journal of Biological Chemistry* 217:959-966. 1955.

RIBA, G.; AQUINO, M. L. de & RIBEIRO, S. A. Polymorphisme chez des souches bresiliennes de l'hiphomyète entomopatogène *Metarhizium anisopliae*(Metsch.) Sorokin, inféodées à des Cercopidae. *Agronomie* 7:763-768. 1987.

RIBA, G.; AZEVEDO, J. L.; MESSIAS, C. L.; SILVEIRA, W. D. & TUVESSON, R. Studies of the inheritance of virulence in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 46:20-25. 1985.

RIBA, G. ; FOURCAD, I. B. & CAUDAL, A. Isoenzymes polymorphism in *Metarhizium anisopliae*(Deuteomycotina: Hyphomicetes) entomogenous fungi. *Mycopathologia* 96:161-169. 1986.

RIBA, G.; RAKOTONIRAINY, M. & BRIGGO, Y. Philogenic relationships within the genus *Metarhizium*. *Vth*

International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaide, Australia, August 20-24.1990
p125-131.

RIZZO, D. C. Age of three dipteran hosts as a factor governing the pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 30:127-130. 1977.

ROBERT, A. & AL AIDROOS, K. M. Acid production by *Metarhizium anisopliae*: Effects on virulence against mosquitoes and on detection of *in vitro* amilase, protease and lipase activities. *Journal of Invertebrate Pathology* 45:9-15. 1985.

ROBERTS, D. W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* I. Production in submerged and surface cultures and in inorganic and organic nitrogen media. *Journal of Invertebrate Pathology* 8:212-221. 1966.

ROBERTS, D. W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* II. Symptoms and detection in moribund hosts. *Journal of Invertebrate Pathology* 8:222-227. 1966a.

ROBERTS, D. W. Toxins from the entomogenous fungus

- Metarhizium anisopliae*: Isolation of dextruxin from submerged cultures. *Journal of Invertebrate Pathology* 14: 82-88. 1969.
- ROBERTS, D. W. Toxins. In: BURGESS, H. D. ed. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. New York, Academic Press, 1981. p 441-464.
- ROBERTS, D. W. World picture of biological control of insects by fungi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Rio de Janeiro) supl. III 84:89-100. 1989.
- ROBERTS, D.W. & CAMPBELL, A.S. Stability of entomopathogenic fungus. *Miscellaneous Publications of Entomological Society of America* 10:19-76. 1977
- ROBERTS, D. W. & HUMBER, R. A. Entomopathogenic fungi. In: Conference on infection processes of fungi, Bellagio, 1983. Report Bellagio Conference Centre, 1983. p 1-6.
- ROBINSON, R. K. Studies on penetration of insect integument by fungi. *Pest Articles News Summary (PANS)* 12:131-142. 1966.
- ROSATO, Y. B.; MESSIAS, C. L. & AZEVEDO, J. L. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 38:1-3.

1981.

SAMSINÁKOVÁ, A.; MISOVÁ, S. & LEOPOLD, J. Action of enzymatic system of *Beauveria bassiana* of the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Invertebrate Pathology* 18:322-330. 1971.

SAMSINÁKOVÁ, A. & MISIKOVÁ, S. Enzyme activities in certain entomophagous representatives of Deuteromycetes (Moniliales) in relationship to their virulence. *Ceska Mykologie* 27: 55-60. 1973.

SAMUELS, R. I.; CHARNLEY, A. K. & REYNOLDS, S. R. The role of dextruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for tobacco hornworm *Manuca sexta* *Mycopathologia* 104:51-58. 1988.

SAMUELS, K. K. Z.; HEALE, J. B. & LLEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparva lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53: 25-31. 1989.

SANTOS, A. L. L. dos. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1978. 148p (Tese de Mestrado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").

SCHAERFFENBERG, B. Biological and environmental conditions for development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. *Journal of Invertebrate Pathology* 6:8-20. 1964.

SCOSSIROLI, R. E. *Manuale di Statistica per Ricercatori*. Pavia, Ing. C. Olivetti & C. S. p.A, 1962, 241p.

SEGRETAİN, G.; PARIS, S.; FERRON, P. & ARCOUTEIL, A. Rapport entre la pathogénicité de *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemaszko pour la larve du hanneton *Melolontha melolontha* L. et la présence d'un arc de précipitation en immunoélectrophorèse. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie de Sciences, Paris* 273:140-142. 1971.

SHERLOCK, I. A. & GUITTON, N. Observation on action of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) on some of Triatominae. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 24:234-239. 1982.

SILVA, F. P. da & AZEVEDO, J. L. Esterase pattern of a morphological mutant of the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society* 81:161-163. 1983.

SILVA, J. C. & MESSIAS, C. L. Virulence of mutants and

revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 368-374. 1986.

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

SMITH, R. J.; PEKRUL, S. & GRULA, E. A. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *Journal of Invertebrate Pathology* 38:335-344. 1981.

SOZA-GOMES, D. R. & ALVES, S. B. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae*(Metsch.)Sorok.; 1. Estandartización, virulencia y actividad enzimática. *CIRPON-Revista de investigación*(Tucumán) 1:83-102. 1983.

ST LEGER, R. J.; BHAIIRI, S.; STAPLES, R. C. & ROBERTS, D. W. Cloning of *Metarhizium anisopliae* chimoelastase gene. Abstracts of SIP XXII Annual Meeting University of Maryland, Aug 20-24. 1989. p45.

ST LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S.; STAPPLES, R. C. & ROBERTS, D. W. Production *in vitro* of apressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.

Experimental Mycology 13:274-288. 1989.

ST LEGER, R. J.; BUTT, T. M.; STAPPLES, R. C. & ROBERTS, D. W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13: 253-262. 1989.

ST LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K. & COOPER, R. M. Enzymatic characterization of entomopathogens with APIZYM System. *Journal of Invertebrate Pathology* 48:375-376. 1986.

ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* 47: 167-177. 1986a.

ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of chitinolytic enzymes. *Journal of Invertebrate Pathology* 132:150 -1507. 1986b.

ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. Distribution of chimoelastases and trypsinlike enzymes in five species of entomopathogenic Deuteromycetes. *Archives of Biochemistry and Biophysic* 258:123-131. 1987.

- ST LEGER, R. J.; COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 52:356-359. 1988.
- SUNDARABU, P. C.; BALASUBRAMANIAN, M. & JAYARAJ, S. Studies on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *major* Tulloch in *Oryctes rhinocerus*(L.). *Famil Nadu Agricultural University* (Coimbatore-3). 32p. 1984.
- TINLINE, R. D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia* 63:713-721. 1971.
- TINLINE, R. D. & NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia* 63: 701-712. 1971.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society* 66:407-411. 1976.
- TURIAN, G. Polarizing processes for germ tube outgrowth from monilioid fungal spores (*Neurospora* conidial model). *Proceedings of the Indian Academy of Sciences Plant Science* 94: 165-173. 1985.
- VALADARES, M. C. C. Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

- (Metsch.) Sorokin, Piracicaba, 1989. 160p (Tese de Mestrado- Escola Superior de Agricultura " Luiz de Queiroz").
- VALE, T. L.; FRIGO, S. M.; AZEVEDO, J. L. & MESSIAS, C. L. Variabilidade em linhagens haploides e diploides de *Metarhizium anisopliae*. Resumos do VI Congresso Brasileiro de Entomologia, 1980. p346.
- VEEN, K. H. A Technique for monospore cultures and determination of nucleus number in *Metarhizium anisopliae* *Journal of invertebrate Pathology* 9:276-278. 1967.
- VEEN, K. H. Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 68:1-77. 1968.
- VILLACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolamentos de *Metarhizium anisopliae* Sorokin. Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia, 1978. p70.
- WEXLER, A. & HASEGAWA, S. Relative humidity - temperature relationship of some saturated salt solutions in the temperature range 0°C to 50°C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards* 53: 19-26. 1954.

- YABUKI, M.; HOSHINO, K. & FUKUI, S. Rapid induction of alpha amylase by nongrowing mycelia of *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 34:1-6. 1977.
- ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae Elateridae (Coleoptera) I. Dormant and germinating conidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 15:63-80. 1970a.
- ZACHARUK, R. Y. & TINLINE, R. D. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and other fungi, for five elaterids (Coleoptera) in Saskatchewan. *Journal of Invertebrate Pathology* 12:294-309. 1968.
- ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae Elateridae (Coleoptera) II. Conidia germ tubes and appressoria. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 81-91. 1970b.
- ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae Elateridae (Coleoptera) III. Penetration of the host integument. *Journal of Invertebrate Pathology* 15:372-396. 1970c.
- ZACHARUK, R. Y. Ultrastructural changes in tissues of larvae

Elateridae (Coleoptera) infected with the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology* 17:281-301. 1971.

ZACHARUK, R. Y. Penetration of the cuticular layers of Elateridae larvae (Coleoptera) by the fungus *Metarhizium anisopliae* and notes on a bacterial invasion. *Journal of Invertebrate Pathology* 21:101-106. 1973.