

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/49492

IB/ 81785

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



DILAINE ROSE SILVA SCHNEIDER

ANÁLISE MORFOEPIGENÉTICA
DE LINHAGENS SELVAGENS E MUTANTES
DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Dilaine Rose Silva Schneider</i>	e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>[Signature]</i>
--	---

Dissertação apresentada
ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração:
Genética de Microrganismos

Orientador:
Prof. Dr. Associado
Claudio Luiz Messias

Campinas

2002

UNICAMP

UNIDADE IB/BIOL
 Nº CHAMADA UNICAMP
Sch 57a
 V _____ EX _____
 TOMEIO BC/ 49492
 PROC 16.837/02
 C _____ D X _____
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA _____
 Nº CPD _____

CM00168737-7

618 12 212 70

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Schneider, Dilaine Rose Silva
Sch57a Análise morfoepigenética de linhagens selvagens e mutantes de
Metarhizium anisopliae var. *anisopliae*/ Dilaine Rose Silva Schneider.--
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

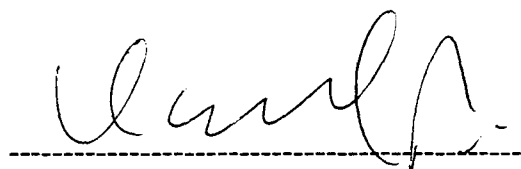
Orientador: Cláudio Luiz Messias
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia

1.*Metarhizium anisopliae*. 2.Controle biológico. 3.Morfogenese.
 I.Messias, Cláudio Luiz. II.Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia. III.Título.

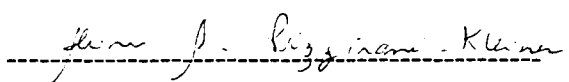
DEFESA DE TESE 06/03/2002

BANCA EXAMINADORA

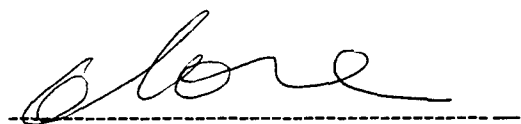
CLÁUDIO LUIZ MESSIAS

Handwritten signature of Claudio Luiz Messias in black ink, written over a horizontal dashed line.

ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

Handwritten signature of Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner in black ink, written over a horizontal dashed line.

GLÁUCIA MARIA PASTORE

Handwritten signature of Gláucia Maria Pastore in black ink, written over a horizontal dashed line.

*Aos meus pais, Dimas e Eclair,
Por terem renunciado a muitos de seus sonhos,
Por haverem me ensinado a persistir em buscar coisas valiosas...*

Dedico.

*Para o Homero,
Elisa,
Tomás,
Hugo e
Álvaro, amores da minha vida,*

Ofereço.

*Elogiar-te-ei porque fui feito maravilhosamente, dum modo atemorizante.
Teus trabalhos são maravilhosos,
De que minha alma está bem apercebida.
Meus ossos não te estavam ocultos
Quando fui feito às escondidas,
Quando fui tecido nas partes mais baixas da terra.
Teus olhos viram até mesmo meu embrião,
E todas as suas partes estavam assentadas por escrito no teu livro,
Referente aos dias em que foram formadas,
E ainda não havia nem sequer uma entre elas.
Portanto, quão preciosos são para mim os teus pensamentos!
Ó Deus, a quanto ascende a soma total deles!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma se dispuseram em contribuir para que este trabalho pudesse ser realizado, em especial às pessoas e instituições abaixo:

Ao meu orientador, Cláudio Luiz Messias, por haver me concedido a oportunidade de crescer em conhecimento científico, por ter acreditado que mesmo com minhas limitações pudesse realizar um trabalho consigo, pelas freqüentes e estimulantes conversas referentes às diversas facetas da ciência e do dia-a-dia, pelo respeito e pela amizade que sempre me demonstrou;

Ao Prof. Aquiles Eugênico Piedrabuena, do Depto. de Genética e Evolução – IB, UNICAMP, por estar sempre pronto a me ensinar muito mais do que Bioestatística, pela sua valiosa carga de conhecimento em áreas tão diversas e pelo seu desprendimento em dividi-la comigo;

Ao Prof. Ivanhoé Rodrigues Baracho, por haver me ensinado a ter uma visão crítica mais apurada da ciência e por ainda continuar sempre disposto a me ensinar, por haver me incentivado a prosseguir na realização dos meus ideais científicos e por haver dividido altruisticamente seu conhecimento;

Aos bons amigos e colegas Célia Bresil, Ernestina Rosa e Ricardo Destéfano pelo respeito, por manterem um agradável ambiente de trabalho e pelo apoio emocional e técnico desprendido e sem limites;

À minha amiga Teresa Chiodetto, que além de ter desempenhado uma inquestionável função enquanto secretária da Pós-graduação do Departamento de Genética e Evolução – IB, UNICAMP, sempre esteve (e continua estando) disposta em dividir minhas dificuldades pessoais;

À minha amiga Zaira Priess, secretária da Pós-graduação do Departamento de Genética e Evolução – IB, UNICAMP, pela longa e significativa amizade, pela disposição em me auxiliar em muitos aspectos de minha vida pessoal e estudantil;

Àqueles professores do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP que me respeitaram e se mostraram capazes de enxergar na minha pessoa algo a ser valorizado;

Ao Prof. L. C. Salomão, do Depto. de Zoologia – IB, USP, pela pronta concessão de equipamentos;

À Profa. Cristine Haeckel, CBMEG, UNICAMP, que no exercício de Coordenadora da Sub-Comissão de Pós-Graduação da Genética auxiliou na continuidade do meu treinamento profissional;

À Profa. Vera Solferini, Depto. Genética e Evolução – IB, UNICAMP, que gentilmente forneceu as larvas de *Anastrepha fraterculus*;

Ao CPQBA – UNICAMP que, nas pessoas dos doutores Edilberto Princi Portugal e Marta Cristina Duarte, gentilmente forneceu material para o desenvolvimento desta pesquisa;

Às bibliotecárias da BAE e da BC, UNICAMP, por terem tornado seus conhecimentos em suas áreas de atuação muito úteis para este trabalho;

Às bibliotecárias do IB, UNICAMP, pela disposição em me auxiliar;

Ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela concessão de equipamentos;

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal pela concessão de material para uso em microscopia;

Ao Núcleo de Medicina Experimental, especialmente à Fabiana, que gentilmente me auxiliou no uso de equipamentos;

Àquelas pessoas que, como alunos ou desempenhando suas funções individuais no Departamento de Genética e Evolução - IB, UNICAMP, me apoiaram e auxiliaram, permitindo um agradável ambiente de trabalho;

Aos meus amigos (que felizmente não são poucos), especialmente à Rosana e ao Juverlande Lugli, que sempre me fortaleceram não me deixando esmorecer;

Às amigas Edna Ornaghi e Maria de Fátima F. Santos por terem contribuído grandemente para que eu dedicasse tempo para elaborar este trabalho;

Aos professores que fizeram parte da Pré-banca de Dissertação de Tese por se disporem a vir em meu auxílio com conhecimento e senso crítico;

De antemão, aos professores da Banca de Defesa de Tese, pela disposição em utilizar sua visão aguçada para avaliar este trabalho;

À Universidade Estadual de Campinas pela disponibilidade de pessoal e de recursos;

À CAPES, por haver financiado parcialmente este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	5
3 - REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1 - Nutrientes, condições de cultivo e desenvolvimento de fungos filamentosos.....	7
3.2 - Entomopatogenicidade de fungos filamentosos.....	18
3.3 - Dimorfismo em fungos filamentosos.....	25
3.4 - Eventos epigenéticos em fungos filamentosos.....	32
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 - Linhagens utilizadas.....	41
4.2 - Manutenção das linhagens.....	41
4.3 - Inseto utilizado	41
4.3.1 - Avaliação dos parâmetros de interesse da hemolinfa.....	42
4.3.1.1 - Extração da hemolinfa das larvas	42
4.3.1.2 - Osmolaridade e pH.....	43
4.3.1.3 - Inoculação dos esporos nas larvas.....	43
4.3.1.4 - Obtenção do material para avaliação dos propágulos fúngicos na hemolinfa.....	43
4.4 - Métodos de análise.....	44
4.4.1 - Métodos visuais: macroscopia e microscopia.....	44
4.4.2 - Métodos estatísticos.....	44
4.4.3 - Métodos eletroforéticos.....	44
4.5 - Critérios para identificação da morfologia dos propágulos a nível de microscopia.....	45
4.5.1 - Conídios Aéreos.....	45
4.5.2 - Conídios Submersos.....	45
4.5.3 - Fragmentos de hifas.....	46
4.5.4 - Clamidosporos.....	46

4.5.5 - Propágulos Róseos (" PR ").....	46
4.6 - Separação dos propágulos.....	46
4.7 - Esterilização.....	47
4.8 - Reagentes e soluções.....	47
4.9 - Meios de cultivo.....	56
4.10 - Obtenção de conídios para inoculação em meio de cultivo líquido.....	63
4.11 - Inoculação em meio líquido.....	64
4.12 - Obtenção de micélio para avaliação de peso da massa seca.....	64
4.13 - Dióxido de carbono gasoso.....	65
4.14 - Avaliação da quantidade de dióxido de carbono dissolvido.....	65
4.14.1 - Gasometria para Dióxido de Carbono Gasoso.....	66
4.14.2 - Gasometria para Bicarbonato de Sódio.....	66
4.15 - Germinação das linhagens em meios utilizados como referência.....	66
4.15.1 - Germinação em Meio de Cultivo Sólido.....	66
4.15.2 - Germinação em Meio de Cultivo Líquido.....	67
4.16 - Inoculação das linhagens em meio de cultivo específico desde o início do desenvolvimento.....	67
4.16.1 - Inoculação em meios com Farinha de Milho e/ou " Corn Meal Agar ".....	68
4.16.2 - Inoculação em meios com Fosfolipídeos.....	68
4.16.3 - Inoculação em meios com Extrato de Levedura e Glicose.....	68
4.16.4 - Inoculação em meios com Extrato de Levedura e sem Glicose.....	69
4.16.5 - Inoculação em meio com Lecitina de Soja.....	69
4.16.6 - Inoculação em meio com diversas concentrações de Glicose.....	69
4.16.7 - Inoculação em meio com Colágeno e em Meio com Gelatina.....	69
4.16.8 - Inoculação em meios com Glicose e Peptona.....	70
4.17 - Inoculação das linhagens em meio de cultivo específico e sob tratamento após um número de horas de desenvolvimento.....	70
4.17.1 - Tratamento com Glicose.....	71
4.17.2 - Tratamento com Ácido Láctico.....	71
4.17.3 - Tratamento com Ácido Clorídrico 2N.....	71
4.17.4 - Tratamento com Milhocina.....	71
4.17.5 - Tratamento com Inositol.....	72
4.17.6 - Tratamento com Aminoácidos.....	73
4.17.7 - Tratamento com Sulfato de Amônio.....	73

4.18 - Avaliação do pH e da osmolaridade de diversos meios de cultivo.....	73
4.19 - Cromatografia em gel de sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE).....	73
4.19.1 - Obtenção do Material para Avaliação Qualitativa de Proteínas.....	73
4.19.2 - Quantificação do conteúdo de proteínas das amostras.....	74
4.19.3 - Separação de Proteínas pela Massa Molecular.....	74
4.19.4 - Coloração dos Géis de Poliacrilamida.....	75
4.19.5 - Caracterização eletroforética da enzima Sulfito Reductase (NADPH). 1.8.1.2 em extrato cru utilizando gel de poliacrilamida.....	75
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
5.1 - Avaliação dos parâmetros de interesse da hemolinfa.....	77
5.2 - Identificação e separação dos propágulos.....	78
5.2.1 - Identificação dos conídios aéreos.....	78
5.2.2 - Identificação dos conídios submersos.....	78
5.2.3 - Identificação dos fragmentos.....	79
5.2.4 - Identificação dos Propágulos Róseos (PR).....	79
5.2.5 - Identificação dos clamidosporos.....	80
5.3 - Gasometria e medida de pH.....	80
5.4 - Influência de aditivos na osmolalidade dos meios de cultivo.....	84
5.4.1 - Glicose como aditivo.....	84
5.4.2 - Dióxido de carbono gasoso como aditivo.....	85
5.4.3 - Milhocina como aditivo.....	87
5.4.4 - Suplementos para auxotrofia como aditivos.....	89
5.5 - Germinação das linhagens em meio de cultivo líquido e em meio sólido.....	90
5.5.1 - Germinação em meio de cultivo líquido.....	91
5.5.2 - Germinação em meio de cultivo sólido.....	96
5.6 - Avaliação do peso da massa micelial seca obtida em meio de cultivo líquido.....	98
5.6.1 - Influência do dióxido de carbono e da milhocina no peso da massa seca durante o desenvolvimento das linhagens.....	103
5.6.2 - Influência da concentração de colágeno e de gelatina no peso da massa seca das linhagens.....	107
5.7 - Desenvolvimento das linhagens nos diferentes meios de cultivo.....	110
5.7.1 - A interferência do dióxido de carbono gasoso no desenvolvimento das linhagens.....	111

5.7.1.1 - O dióxido de carbono gasoso e a produção e pigmentação de esporos.....	111
5.7.1.2 - O dióxido de carbono gasoso e o pH.....	114
5.7.1.3 - O dióxido de carbono gasoso e a produção de propágulos submersos.....	123
5.7.2 - O desenvolvimento da linhagem E9 em pH baixo.....	127
5.7.2.1 - O pH baixo em meio com diferentes concentrações de milhocina....	128
5.7.2.2 - O pH baixo em meio com diferentes concentrações de ácido láctico.....	130
5.7.2.3 - O pH baixo em meio de cultivo com diferentes concentrações de ácido clorídrico.....	132
5.7.3 - O desenvolvimento da linhagem E9 em diferentes fontes de fosfolípidos....	135
5.7.4 - Desenvolvimento da linhagem E9 em diferentes fontes de nitrogênio: Aminoácidos e Sulfato de amônio.....	138
5.7.5 - Influência do inositol no desenvolvimento da linhagem E9 em meio de cultivo.....	142
5.7.6 - Influência da hemolinfa no desenvolvimento da linhagem E9 em meio de cultivo.....	144
5.7.7 - O desenvolvimento da linhagem E9 em placas com meio sólido cobertas com dois tipos de meio de cultivo líquidos.....	146
5.7.8 - Desenvolvimento da linhagem E9 em meios de cultivo com diferentes razões extrato de levedura:glicose.....	148
5.7.9 - Desenvolvimento das linhagens selvagens E9 e 3609 em meio com cloreto de sódio e em meio com glicose e peptona.....	152
5.7.10 - Influência do colágeno e da gelatina no pH do meio de cultivo e na produção de propágulos.....	154
5.8 – Caracterização eletroforética da enzima Sulfito Redutase (NADPH).1.8.1.2 em extrato cru utilizando gel de poliacrilamida.....	157
6 - CONCLUSÕES.....	160
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171

**ANÁLISE MORFOEPIGENÉTICA
DE LINHAGENS SELVAGENS E MUTANTES
DE *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae***

RESUMO

O dimorfismo tem sido destacado inúmeras vezes como um fenômeno fundamental para a instalação da infecção micótica causada por patógenos de plantas e de animais, incluindo o homem. Fungos entomopatógenos são relativamente comuns e freqüentemente se apresentam como importantes agentes no controle de insetos-praga. Entretanto, a eficácia de um agente patogênico depende das condições ambientais, do hospedeiro e do microrganismo utilizado. O sucesso do inteiro processo infectivo na relação patógeno-hospedeiro requer o estabelecimento gradual da patogenicidade. Em cada fase do processo da instalação do parasitismo estruturas específicas de infecção, de colonização e de propagação da doença podem estar presentes ou ser exigidas. Foram elaborados diferentes meios de cultivo bem como foram fornecidas diferentes condições para o desenvolvimento de linhagens selvagens e mutantes auxotróficas de *Metarhizium anisopliae*, visando a obtenção de estruturas dimórficas de infecção que têm se mostrado associadas com a entomopatogenicidade e a virulência deste microrganismo. Pôde-se constatar que certos nutrientes e condições de cultivo bem como a linhagem utilizada, em conjunto ou isoladamente, se mostraram influentes na produção de estruturas dimórficas de propagação. Fatores morfoepigenéticos também puderam determinar quantitativamente e qualitativamente a efetividade da produção destas estruturas.

**MORPHOEPEGENETIC ANALYSIS
OF THE WILD AND MUTANT LINEAGES
OF *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae***

ABSTRACT

Dimorphism has been stressed a number of times as a fundamental phenomenon for the installation of mycoses caused by plants and animals (including man) pathogenic microorganisms. Entomopathogenic fungi are somewhat common and often turn up as important agents in the control of harmful insects. Nevertheless, the efficacy of a pathogenic microorganism depends on the environmental conditions, the host and the microorganism itself. The success of the whole infectious process in the relation pathogen-host require the gradual establishment of the pathogenicity. In each phase of the parasitism installation process specific infection structures, colonization and disease propagation can be present or required. Different media were prepared and different conditions were given for the development of wild and auxotrophic mutants lineage of *Metarhizium anisopliae*, with the objective of obtaining infectious dimorphic structures, which has been shown associated with the entomopathogenicity and virulence of this microorganism. It could be verified that some nutrients, conditions of culture and the utilized lineage, combined or in isolation, were influential in the production of dimorphic propagation structures. Morphoepeigenetic factors could also determine, qualitatively and quantitatively, the efficacy in the production of these structures.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 – Influência da concentração de glicose na osmolalidade do meio MM.....85
- Figura 5.2 – Valores médios da osmolalidade de três repetições de meios de cultivo líquidos sob influência do tratamento com dióxido de carbono gasoso em que a linhagem E9 se desenvolveu.....86
- Figura 5.3 – Valores médios de osmolalidade de três repetições de meios de cultivo líquidos sob influência de diferentes concentrações de milhocina.....88
- Figura 5.4 – Porcentagem de acréscimo na osmolalidade dos meios de cultivo líquidos em função da quantidade de milhocina adicionada.....89
- Figura 5.5 – Valores médios da osmolalidade dos meios de cultivo líquidos com três diferentes concentrações de glicose em função dos suplementos provenientes de três repetições.....90
- Figura 5.6 – Valores médios percentuais de conídios da linhagem E9 germinados em meio líquido com duas diferentes concentrações de glicose, provenientes de três repetições.....92
- Figura 5.7 – Valores médios percentuais de conídios da linhagem Y5 germinados em meio líquido com duas diferentes concentrações de glicose provenientes de três repetições.....83

Figura 5.8 – Valores médios percentuais de conídios da linhagem B/vi germinados em meio líquido com duas diferentes concentrações de glicose provenientes de três repetições.....	94
Figura 5.9 – Valores médios percentuais de conídios da linhagem X/vi germinados em meio líquidos com duas diferentes concentrações de glicose provenientes de três repetições.....	95
Figura 5.10 – Valores médios dos pesos da massa micelial seca da linhagem E9 em desenvolvimento meios de cultivo com ou sem dióxido de carbono gasoso, provenientes de três repetições.....	102
Figura 5.11 - Valores médios dos pesos da massa micelial seca da linhagem Y5 em desenvolvimento em meios de cultivo líquidos com ou sem dióxido de carbono, provenientes de três repetições.....	104
Figura 5.12 - Valores médios dos pesos da massa micelial seca da linhagem B/vi em desenvolvimento meios de cultivo líquidos com ou sem dióxido de carbono gasoso, provenientes de três repetições.....	105
Figura 5.13 - Valores médios dos pesos da massa micelial seca da linhagem X/vi em desenvolvimento em meios de cultivo líquidos com ou sem dióxido de carbono, provenientes de três repetições.....	105
Figura 5.14 - Valores médios dos pesos da massa seca após 48 horas de desenvolvimento em diferentes concentrações de colágeno, provenientes de três repetições.....	108
Figura 5.15 – Valores médios dos pesos da massa seca após 48 horas de desenvolvimento em diferentes concentrações de gelatina, provenientes de três repetições.....	109

- Figura 5.16 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que a linhagem E9 se desenvolveu.....115
- Figura 5.17 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que a linhagem Y5 se desenvolveu.....116
- Figura 5.18 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que a linhagem B/vi se desenvolveu.....117
- Figura 5.19 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que a linhagem X/vi se desenvolveu.....117
- Figura 5.20 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios de pH em meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições com duas diferentes concentrações de glicose (10g/l e 35g/l) em que a linhagem E9 se desenvolveu.....120
- Figura 5.21 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios de pH de diferentes meios de cultivo líquidos compostos à base de milho em que a linhagem E9 se desenvolveu.....121
- Figura 5.22 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos compostos à base de glicose e milho provenientes de três repetições em que a linhagem E9 se desenvolveu.....122

- Figura 5.23 – Influência da concentração de milhocina no pH do meio de cultivo provenientes de três repetições em que se desenvolveu a linhagem E9.....128
- Figura 5.24 – Influência da concentração de ácido láctico no pH do meio de cultivo líquido provenientes de três repetições em que se desenvolveu a linhagem E9.....131
- Figura 5.25 – Influência da concentração de ácido clorídrico no pH do meio de cultivo líquido provenientes de três repetições em que se desenvolveu a linhagem E9.....133
- Figura 5.26 – Valores médios de pH em meios de cultivo líquidos MM, CS e em meios acrescidos com fosfolipídeos onde a linhagem E9 se desenvolveu, provenientes de três repetições.....136
- Figura 5.27 – Valores médios de pH dos meios de cultivo líquidos acrescidos com hemolinfa onde a linhagem E9 se desenvolveu, provenientes de três repetições.....145
- Figura 5.28 – Propágulos: filamentos dentro de hifas e livres no meio de cultivo; fragmentação; artrosporos; germinação de fragmentos; quebra de corpo hifal.....159
- Figura 5.29 – Propágulos róseos (PR): dentro de hifa na hemolinfa de *Anasatrepha fraterculus*; livres no meio de cultivo e dentro de hifas; brotamento de extremidade de hifa.....161
- Figura 5.30 – Propágulos: brotamento de PR, PR livres no meio de cultivo ; pequenas esferas semelhantes a esferoplastos.....163

Figura 5.31 – Propágulos: brotamento lateral ; fissão.....	165
Figura 5.32 – Propágulos: clamidosporo livre e em brotamento; clamidosporo terminal e intercalar formando pseudomicélio; pequenas esferas refringentes dentro de hifas.....	167

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 – Linhagens selvagens utilizadas nos experimentos com respectivos hospedeiros e local de origem.....	41
Quadro 4.2 – Linhagens mutantes utilizadas nos experimentos, com suas respectivas marcas morfológicas para auxotrofia e cor de esporo.....	42
Quadro 4.3 – Distribuição de meios de cultivo sólido e líquido em placas de Petri para a observação do desenvolvimento da linhagem E9.....	72
Quadro 5.1 – Comparação entre o número de horas de desenvolvimento necessárias para se obter 30% de germinados e para a expressão da resposta inibitória de crescimento ao CO ₂	106
Quadro 5.2 – Influência do dióxido de carbono gasoso na pigmentação do tapete micelial das linhagens após 60 horas de desenvolvimento em diferentes meios de cultivo líquidos, provenientes de três repetições.....	111
Quadro 5.3 – Influência do dióxido de carbono gasoso na pigmentação da linhagem E9 após 60 horas de desenvolvimento em diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições.....	113
Quadro 5.4 – Influência de diferentes meios de cultivo líquidos com e sem dióxido de carbono no tipo de propágulos submersos da linhagens em aproximadamente 48 horas de desenvolvimento provenientes de três repetições.....	124

Quadro 5.5 – Ação do dióxido de carbono gasoso na morfologia microscópica da linhagem E9 em diferentes meios de cultivo líquidos à base de glicose e milho, provenientes de três repetições.....	126
Quadro 5.6 – Influência da concentração de milhocina no pH do meio de cultivo líquido e na produção de propágulos da linhagem E9 em 48 horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições.....	129
Quadro 5.7 – Influência da concentração de ácido láctico no pH do meio de cultivo líquido e na produção de propágulos da linhagem E9 em 36 horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições.....	131
Quadro 5.8 – Influência da concentração de ácido clorídrico no pH do meio de cultivo líquido e na produção de propágulos da linhagem E9 em diferentes horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições.....	134
Quadro 5.9 – Desenvolvimento da linhagem E9 em meios de cultivo líquidos acrescidos com fosfolipídeos, provenientes de três repetições.....	137
Quadro 5.10 – Pigmentação do tapete micelial da linhagem E9 em meios líquidos acrescidos com diferentes fontes de nitrogênio, provenientes de três repetições.....	140
Quadro 5.11 – Influência da fonte de nitrogênio na produção de propágulos da linhagem E9 em diferentes horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições.....	141
Quadro 5.12 - Influência do inositol na produção de propágulos da linhagem E9 em diferentes horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições.....	143

Quadro 5.13 – Influência do meio de cultivo líquido sobre placas com meio de cultivo sólido após 72 horas de desenvolvimento da linhagem E9, provenientes de três repetições.....	146
Quadro 5.14- Desenvolvimento da linhagem E9 após 48 horas de desenvolvimento em meios de cultivo líquidos com diferentes razões extrato de levedura: glicose, provenientes de três repetições.....	149
Quadro 5.15 – Influência de nutrientes no papel do extrato de leveduras e/ou da glicose no desenvolvimento da linhagem E9, provenientes de três repetições.....	150
Quadro 5.16 – Desenvolvimento das linhagens E9 e 3609 em meios líquidos com 2% de glicose e 1% de peptona, provenientes de três repetições.....	152
Quadro 5.17 – Desenvolvimento das linhagens E9 e 3609 em meios com 6% de glicose e 3% de peptona, provenientes de três repetições.....	153
Quadro 5.18 – Influência da concentração de colágeno e de gelatina na produção de propágulos das linhagens E9, Y5, B/vi e X/vi, provenientes de três repetições.....	155
Quadro 5.19 – Produção de propágulos em função da concentração do colágeno bem como da gelatina adicionados.....	156

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 – Valores médios relativos às concentrações de CO₂ (em mmol/L) em meios de cultivo com bicarbonato de sódio após intervalos de tempo de agitação provenientes de três repetições.....81
- Tabela 5.2 – Valores médios relativos ao pH em meios de cultivo com diferentes concentrações de bicarbonato de sódio provenientes de três repetições...82
- Tabela 5.3 – Valores médios da concentração de dióxido de carbono dissolvido em meio de cultivo (em mmol/L) submetido a diferentes intervalos de tempo de borbulhamento com CO₂ e agitação, provenientes de três repetições.....83
- Tabela 5.4 – Valores médios relativos ao pH em meio de cultivo líquido submetido a diferentes tempos de borbulhamento com CO₂ e agitação, provenientes de três repetições.....83
- Tabela 5.5 – Valores médios percentuais de conídios germinados após 12 horas de desenvolvimento em meio sólido e em meio líquido com diferentes concentrações de glicose, provenientes de três repetições.....97
- Tabela 5.6 – Valores médios provenientes de três repetições de pesos das massas secas miceliais das linhagens em meios de cultivo líquidos em diferentes horas de desenvolvimento.....101
- Tabela 5.7 – Influência do CO₂: diferenças comparativas entre os valores médios de pH e peso da massa micelial seca das linhagens em 72 horas de

desenvolvimento em dois diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições.....	119
---	-----

Tabela 5.8 – Valores médios de pH após 48 horas de desenvolvimento da linhagem E9 em meios líquidos com diferentes fontes de nitrogênio provenientes de três repetições.....	139
--	-----

1 - INTRODUÇÃO

Estima-se que sejam conhecidas 1 milhão de espécies de insetos, de um total de mais de 2,5 milhões. Deste total, aproximadamente 10% podem ser considerados pragas de agricultura ou pragas urbanas (Alves, 1998). Enormes prejuízos econômicos e sociais provêm daí.

A patologia de insetos e o controle microbiano terão mais exacerbada a sua importância no futuro, em controle dos insetos-pragas e no controle de doenças de insetos úteis. Esta abrange a etiologia (agentes causais), a sintomatologia e a epizootiologia (alcance e abrangência numérica), visando utilizá-las de acordo com o interesse imediato. A doença, sendo um processo dinâmico no qual o hospedeiro e o patógeno em íntima relação com o meio se influenciam mutuamente, resulta em modificações morfológicas e fisiológicas (Alves, 1998; Ross, 1979b). O entendimento de cada um destes passos é fundamental.

Diferentes áreas do conhecimento precisam estar interligadas para que a compreensão do processo e controle da patologia de insetos seja alcançada. A microbiologia fornece elementos básicos para a etiologia, taxonomia e diagnose; a morfologia, anatomia e fisiologia dão apoio à sintomatologia e histopatologia; a agrometeorologia, biologia, ecologia e fitotecnia fornecem elementos ao estudo da epizootiologia; a bioquímica, química, física, bioestatística, zootecnia, medicina (vacinas e vetores) e a genética estão diretamente relacionadas com o controle microbiano (Alves, 1998; Butt, Goettel, 2000).

Muitos fungos entomopatógenos são relativamente comuns e freqüentemente induzem eventos epizoóticos; deste modo se apresentam como agentes importantes no controle de insetos. A procura por fungos entomopatógenos para o uso em programas integrados de controle de pragas absorve muitos passos. Em condições de laboratório uma avaliação deve ser feita para separar os candidatos mais promissores. Simultaneamente, no entanto, muitos problemas surgem. Uma formulação é um importante fator que pode atuar aumentando a virulência por melhorar a adesão do esporo à superfície do hospedeiro, por diluir a ação fungistática de compostos na camada

epicuticular e por estimular a germinação. Germinação rápida e infecção são marcas de isolados virulentos (Butt; Goettel, 2000). Finalmente, o inóculo deve ser considerado para funcionar com efetividade, visto que a mortalidade está relacionada com a dose.

O desenvolvimento e a disponibilidade de produtos microbianos no mercado exigem que características sejam consideradas para que um patógeno possa ser comercialmente explorado. Estas características englobam a segurança, a eficácia e a viabilidade econômica, o tipo de patógeno, o espectro do hospedeiro, o modo de ação, a produção, a formulação, a aplicação, o armazenamento e a comercialização, os custos de desenvolvimento e registro, a propaganda. Como um patógeno ideal não existe, um bom candidato à exploração comercial deveria apresentar no mínimo oito destas onze características ou condições (Alves; Moino Jr.; Almeida, 1998).

Desafios, portanto, precisam ser superados. A atenuação da virulência advinda de sucessivas passagens por meio de cultivo artificial, a produção de propágulos de infecção, os efeitos das condições de cultivo na virulência e na adaptação ecológica, o armazenamento, e a formulação em si podem afetar o sucesso do uso de entomopatógenos no controle de pragas (Sosa-Gomes; Boucias; Nation, 1997).

Dos quatro métodos existentes para a produção de propágulos fúngicos em meio de cultivo artificial, a saber, cultura de superfície em meio sólido, fermentação em meio semi-sólido, cultivo submerso, e fermentação bifásica, o cultivo submerso tem sido extensivamente empregado para a produção de blastosporos e conídios submersos de isolados selecionados de fungos entomopatógenos (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000).

Considerando que tipos de propágulos específicos são necessários em diferentes fases do processo de infecção micótica em insetos (Zacharuk, 1970 a,b; 1971), a obtenção e a análise do desenvolvimento destas estruturas em laboratório são de importância fundamental. A obtenção de estruturas dimórficas de infecção, no entanto, depende do conhecimento dos fatores causais. Entomopatógenos podem expressar diferentes tipos de dimorfismo em função de variações do ambiente como a luz, temperatura, nutrientes e agentes químicos e físicos. Além disso, a natureza e a produção destas estruturas se relacionam tanto com a espécie como com a linhagem, sendo que polimorfismos genéticos também podem se mostrar influentes (Reyna-López; Simpson; Ruiz-Herrera, 1997).

O controle do dimorfismo observado na produção de propágulos e sua influência na patogenicidade e virulência têm sido estudados em patógenos humanos, mas vêm recebendo merecida atenção também em estudos de fitopatógenos e entomopatógenos (Ross, 1979; Harold, 1995). Entretanto, os processos regulatórios do dimorfismo morfológico não parecem simples, visto que mecanismos epigenéticos certamente estão envolvidos na morfogênese. A expressão do dimorfismo resulta em mudanças complexas no fenótipo e pode potencialmente afetar mais que um aspecto da fisiologia, morfologia ou virulência. Os mecanismos epigenéticos e a herdabilidade de estados epigenéticos alternativos devem ser considerados, pois células geneticamente equivalentes expressam fenótipos alternativos herdáveis (Soll, 1992).

O padrão de metilação do DNA e a presença proteínas específicas em associação correta com o material genético são, entre outros, mecanismos que podem se alterar durante transições dimórficas de patógenos, e metilação diferencial de DNA pode ser tida como universal em fungos e como um evento que ocorre durante a morfogênese (Reyna-López; Simpson; Ruiz-Herrera, 1997).

Entretanto, a morfogênese não é apenas blocos de construção molecular, mas trata-se de uma construção de estruturas complexas em uma escala maior em que processos, além de genes e produtos gênicos estão envolvidos numa escala celular que gera a forma (Harold, 1995). Muitas hifas diferenciadas requerem reforço de suas 'instruções' de diferenciação; este reforço seria parte do contexto químico, elétrico e estrutural/mecânico (ambiente) dentro do qual elas se desenvolvem normalmente. Em cada estágio do desenvolvimento de fungos a 'competência', a 'indução' e a 'mudança' têm de ser conjuntamente considerados. A morfogênese é um evento compartimentalizado em um conjunto de passos que são distintos geneticamente e fisiologicamente. A flexibilidade na expressão destes passos de desenvolvimento ilustra que a tolerância na precisão é um importante atributo da morfogênese de fungos (Moore, 1998).

Deste modo, ainda que a complexidade dos processos e a exigência de áreas relacionadas se constituam desafios a serem transpostos, a importância do estudo do desenvolvimento de linhagens patogênicas se torna evidente se quisermos controlar e entender, ainda que parcialmente, os caminhos que definem os benefícios e os danos.

2 - OBJETIVOS

Por intermédio da elaboração de diferentes meios de cultura e condições de cultivo que permitissem o desenvolvimento de linhagens selvagens e mutantes de *Metarhizium anisopliae*, objetivou-se alcançar os seguintes alvos:

- 1) Obter estruturas dimórficas de propagação, aos moldes da hemolinfa, em meios de cultivo;
- 2) Constatar a influência de diferentes nutrientes na obtenção e na natureza das estruturas dimórficas de propagação;
- 3) Verificar a relação entre a produção de estruturas dimórficas e as condições de cultivo;
- 4) Averiguar se a produção e a natureza das estruturas dimórficas de propagação se relacionam com as características morfológicas e nutricionais das linhagens utilizadas.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – Nutrientes, condições de cultivo e desenvolvimento de fungos filamentosos

Microorganismos filamentosos são de grande importância biotecnológica, sendo responsáveis por inúmeros metabólitos secundários disponíveis, especialmente antibióticos, enzimas e vitaminas (Griffin, 1994a). Para este fim, o método de cultura submersa tem sido o sistema empregado extensivamente visto que o uso destes produtos é economicamente vantajoso em diferentes setores sociais (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000).

Em cultivo submerso muitos fungos podem crescer ou como micélio disperso (freqüentemente denominado elementos de hifas) ou como “pellets”, os quais são aglomerados esféricos de muitos elementos de hifas. A morfologia pode ser, portanto, classificada em: ‘morfologia microscópica’, a qual determina a forma e o tamanho de elementos de hifa individuais; e ‘morfologia macroscópica’, que determina a forma e o tamanho dos “pellets” (Nielsen; Krabben, 1995).

Em algumas espécies de fungos filamentosos a morfologia microscópica está relacionada com a produção de metabólitos secundários, o que justifica a atenção que deve ser dada ao estudo da morfologia durante o cultivo submerso. Assim, a germinação de esporos, a extensão de extremidade de hifa, a ramificação e a fragmentação de hifas e a produção de propágulos são importantes para um balanço geral do desenvolvimento (Nielsen; Krabben, 1995).

O crescimento, no entanto, é um processo complexo com muitos componentes diferentes acompanhado em maior ou menor grau pelo desenvolvimento e diferenciação. Os fungos são microrganismos que crescem no nível celular, e os que são miceliais e coenócitos aumentam em volume, número de núcleos, e quantidade de citoplasma (Griffin, 1994 a). Considerando que existe uma certa seqüência ordenada de eventos no crescimento, o crescimento balanceado pode ser definido como o aumento ordenado em todos os componentes do organismo tal que sua composição química permaneça

constante. Entretanto, nem sempre o crescimento é balanceado, sendo frequentemente útil conhecer a causa e quando isto ocorre (Cooke; Wipps, 1993 a).

Visto que o crescimento é um processo complexo, uma definição precisa e abrangente se torna difícil. De acordo com Griffin (1994 a) este pode ser definido em relação ao critério de medida utilizado nos experimentos, o que torna crítico a escolha das técnicas e o entendimento de suas limitações para a interpretação de resultados.

Existe uma grande variedade de tipos de substâncias orgânicas que, como grupo, são utilizadas por fungos como fonte de energia. Espécies individuais, entretanto, são frequentemente seletivas quanto a seus requerimentos nutricionais, devendo crescer apenas em certos substratos (Garraway; Evans, 1984 a).

Para um substrato ser utilizado como nutriente, três critérios devem ser primeiramente empregados: o fungo deve ser capaz de sintetizar e secretar enzimas necessárias para hidrolisar o substrato em moléculas de tamanho relativamente menor; o fungo deve possuir mecanismos de absorção máxima para transportar estas moléculas para dentro da célula; e o fungo deve possuir maquinaria necessária para converter estas moléculas em energia celular bem como em blocos de construção celulares para o crescimento e desenvolvimento. A utilização do substrato deve também ser preventiva caso as condições ambientais provoquem a necessidade de qualquer um destes sistemas operar em uma razão incrivelmente baixa (Ross, 1979c).

Um entendimento da nutrição e das vias biossintéticas associadas oferecem um modo de controle da atividade em fungos, maximizando seus efeitos benéficos e minimizando seus danos (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000). No entanto, o transporte de nutrientes dentro das hifas envolve aspectos como o aparecimento do septo, que também está associado com a ramificação de hifas num processo regulado tanto pelo ambiente como pela constituição genética (Tiedt, 1993; Momany et al., 1995). A morfologia, portanto, pode ser modificada pelo ambiente por meio da sua composição de nutrientes em que a plasticidade do desenvolvimento pode ser uma resposta ao estresse ambiental e uma expressão da invocação de subrotinas morfogenéticas na sequência e/ou lugar adequados (Chiu; Moore; Chang, 1989).

Teoricamente qualquer fungo crescendo em um meio ambiente ‘ideal’ que forneça nutrientes e espaço ilimitados, deveriam permanecer não-diferenciados e exibiriam um aumento exponencial de biomassa. Quando crescesse em excesso, mas não sem limites, de fontes nutricionais o crescimento exponencial seria esperado mas terminaria num ponto em que uma fase de desaceleração poderia ser vista seguida por um período durante o qual a biomassa ou permaneceria constante ou decresceria devido à autólise (Cooke; Whipps, 1993 a). O crescimento neste ambiente poderia ser medido por períodos de tempo, e uma curva sigmoidal típica seria traçada permitindo a visualização de fases com características fisiológicas distintas. Estas seriam a denominada ‘fase lag’, com pouco ou nenhum crescimento observável; a ‘fase exponencial’, com crescimento autocatalítico; a ‘fase de decréscimo da razão de crescimento’; a ‘fase estacionária’, de comprimento variável; e a ‘fase de morte’, geralmente acompanhada de autólise (Griffin, 1994 a). Diferentes fatores de crescimento podem influir no tempo de ocorrência e de permanência para cada uma destas fases, controlando inclusive a reprodução (Cooke; Wipps, 1993b).

Modificações do micélio e da hifa são esperadas em virtude dos nutrientes disponíveis e de seu transporte para o meio intracelular. Segundo Ross (1979 a), o crescimento de extremidade de hifa e a ramificação podem ser tomados como uma condição em que toda a síntese macromolecular é dirigida para a manutenção de um estado contínuo de divisão nuclear e ramificação de hifas com nenhuma diferenciação. Assim a hifa vegetativa se apresenta tendo toda a atividade gênica dirigida para a manutenção do estado vegetativo; para mudar este estado, para diferenciar, nova atividade gênica deveria ser induzida.

No entanto este nem sempre parece ser o caso, visto que diferenciação celular já foi relatada como independente da síntese de proteínas podendo estar associada com modificações na atividade de proteínas e/ou na alteração de canais de membrana decorrente de estresse do meio (Soll; Sonneborn, 1971). Além disto, tanto um rearranjo cromossômico como modificações na heterocromatina também podem estar associados à morfogênese sem que alterações genéticas sejam necessárias (Soll, 1992; Pitlus; Rine, 1989; Aparicho; Billington; Gottschling, 1991). Poder-se-ia dizer que um controle

epigenético também seria eficaz para a diferenciação celular (Russo; Martienssen; Riggs, 1996 a).

Para uma extremidade de hifa, ou um segmento de hifa, se desenvolver em uma estrutura reprodutiva, tal parte do talo deve de algum modo se separar e se tornar uma entidade especializada. Isto deve ocorrer independente do fato de existir uma compartimentalização do núcleo ou de seus produtos gênicos. Tal início de diferenciação pode ocorrer em áreas localizadas enquanto o restante do talo continua no estado indiferenciado (Ross, 1979 a). Pesquisas em torno dos limites para as causas e os efeitos de uma diferenciação localizada bem como do que capacita uma certa porção do talo se diferenciar e quais as barreiras para este processo têm se mostrado favoráveis ao trio seqüencial de eventos a saber, competência celular, seguida de indução ambiental e de mudança correspondente à esta indução (Moore, 1998).

Scott (1976), ao estudar os aspectos genéticos e bioquímicos da morfogênese de *Neurospora crassa* verificou que há uma diferença significativa entre hifa vegetativa e hifa submersa, sendo que eventos bioquímicos podem ser comuns em mais que um estágio do ciclo de vida do organismo assim como enzimas que participam na diferenciação assexual podem não ser obrigatórias para este processo.

Wessels (1993) também verificou que na morfogênese de fungos o processo de crescimento apical requer uma expansão controlada da parede o que pode modificar o padrão de secreção de proteínas bem como o arranjo da estrutura da parede celular. O conjunto de eventos que aí se processam permitem o aparecimento de hifas especializadas quanto à assimilação de nutrientes (hifas assimilatórias e hifas conidiogênicas) e quanto à adaptação em interfaces de ambientes (hifas aéreas e hifas submersas). O autor expressou também o controle epigenético referente às fases do desenvolvimento em que proteínas do tipo hidrofobinas seriam seqüencialmente ativadas em função das condições de cultivo e do desenvolvimento. Fatores ambientais como a luz também poderiam afetar o desenrolar dos processos de desenvolvimento, visto que genes controlados pelo ciclo circadiano codificam proteínas envolvidas, dentre outros eventos, na hidrofobicidade dos esporos. Em *Neurospora crassa* genes controlados temporalmente (circadianos) são regulados em nível de transcrição (Loros; Dunlap, 1991).

Diferentes modelos de diferenciação celular têm sido apresentados (Cole, 1986; Cole; Nozawa, 1981), mostrando que fatores ambientais são capazes de modificar o crescimento vegetativo e iniciar a diferenciação de estruturas reprodutivas. Em fungos filamentosos, quando limitações resultam em um sistema desbalanceado, alterações metabólicas podem ocorrer conduzindo à diferenciação. Microciclos de conidiação (Maheshwari, 1991) bem como o aparecimento de estruturas de propagação conseqüentes de dimorfismo morfológico (Soll, 1992) podem resultar de modificações no meio de cultivo que induziriam a uma nítida separação entre fases de desenvolvimento.

Os fungos podem variar consideravelmente quanto aos seus requisitos nutricionais para fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e outros minerais, vitaminas e outros fatores de crescimento (Cooke; Whipps, 1993c). A aquisição de nutrientes pode exigir mecanismos de transporte especializados dependendo da natureza e do tamanho do nutriente, ou enzimas especializadas que facilitem esta aquisição (Griffin, 1994b). Modificações estruturais morfológicas conseqüentes ou necessárias à aquisição de nutrientes podem ser convenientes e suficientes para o sucesso neste processo. Tais modificações morfológicas traduzem um modo alternativo utilizado pelo microrganismo para se adaptar e aproveitar as condições oferecidas para seu desenvolvimento.

Diferentes sinais ambientais necessitam ser traduzidos pela célula fúngica para que sejam percebidos como informação real. Harwood (2000) verificou o envolvimento de enzimas do tipo quinase (que catalisam a transferência do grupo fosfato do ATP, ou de outro trifosfato, ao substrato) como importantes para esta tarefa. Isto talvez seja passível de uma generalização; Sanchez-Martinez; Perez-Martin (2001) verificaram que a despeito das similaridades ao nível molecular, os fungos parecem utilizar modos semelhantes para responder ao estímulo ambiental mas com diferentes resultados. É bem provável que os diferentes estágios do ciclo de vida do microrganismo interfira na resposta ao estímulo ambiental dependendo de como e quando este foi oferecido (Braga et al., 2001).

Suberkropp (1995) observou que nutrientes influenciam o crescimento, a produtividade e a esporulação de fungos filamentosos. A razão carbono:nitrogênio pode modificar a produção de estruturas de reprodução modificando a eficácia do biocontrole

(Engelkes; Nucló; Fravel, 1997; Elson; Schisler; Jackson, 1998). Barnes et al. (1975) relataram que o crescimento e a esporulação de *Metarhizium anisopliae* foram afetados pela fonte de nitrogênio utilizada, e Campbell et al. (1978) constataram que estes parâmetros também foram afetados por aminoácidos no meio de cultivo. Ronne (1995) verificou que a glicose pode atuar como repressor no metabolismo em fungos por intermédio de modificações específicas nos processos de gliconeogênese e de crescimento fermentativo. Este balanço portanto deve ser importante para eventos como fragmentação de hifas e conseqüente produção e secreção de metabólitos (Papagianni; Matthey; Kristiansen, 1999; Bottin; Kämper; Kahmann, 1996).

A quantidade e qualidade de aminoácidos no meio de cultivo pode alterar a expressão de genes envolvidos na conidiação por modificar o processo de síntese de proteínas presumidas serem fatores transcricionais que se ligam ao DNA durante o desenvolvimento (Leija; Ruiz-Herrera; Mora, 1986; Lee; Buckley; Campbell, 1975; Tripp; Paznokas, 1982; Sachs; Yanofsky, 1991). Em *Metarhizium anisopliae* aminoácidos podem estimular a produção de íons funcionando como reguladores de fator de virulência por estimular a produção de proteínas importantes para esse processo (St. Leger; Nelson; Screen, 1999). Em alguns microrganismos a assimilação de aminoácidos resulta em dimorfismo morfológico (Mayser et al., 1998).

O pH do meio de cultivo é um fator importante no estabelecimento da polaridade de hifas em crescimento, gerando modificações na morfologia por intermédio do acúmulo de outros íons e gerando turgor por aumentar a pressão osmótica celular. Muitas transições morfológicas são disparadas pelo pH; exemplos incluem indução de conidiação em *Penicillium*, brotamento e formação de tubo germinativo em *Candida*, e dimorfismo de microrganismos (Kropf; Money; Gibbon, 1995; Maccheroni et al., 1997; Saporito-Irwin et al., 1995; Malli; Epstein, 1998). Bertl; Slayman (1992) relataram que o pH do meio de cultivo pode também alterar a modulação de canais complexos da membrana celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Garraway; Evans (1984c) descreveram a influência do pH do meio de cultivo no requerimento de vitaminas, na utilização ótima de aminiácidos e de ferro, na carga do tRNA e na toxicidade de determinados compostos como o cobre. Todas estas possibilidades podem conduzir a uma alteração morfológica associada.

Segundo Tamerler (1998) o pH do meio de cultivo afetou a fisiologia de *Metarhizium anisopliae* e a produção de metabólitos. St. Leger; Nelson; Screen (1999) observaram que o pH do meio regula a expressão de genes de virulência de *Metarhizium anisopliae* e que este microrganismo responde alterando o pH exterior e produzindo enzimas específicas.

Jackson; Heath (1993) demonstraram que além do hidrogênio, íons também podem, entre outras possibilidades, influenciar no crescimento da extremidade de hifas, afetando o arranjo estrutural que é necessário para o estabelecimento da polaridade. Íons potássio, sódio, cálcio, lítio, fosfato, ferro, cobre e zinco podem também cumprir papel semelhante visto que participam no estabelecimento do turgor (Kropf; Money; Gibbon, 1995; Cooke; Wipps, 1993c) bem como no delicado balanço entre síntese e degradação de parede celular (Bartinicki-Garcia; Lippman, 1972). Xia; Clarkson; Charnley (2001) verificaram que fosfatases ácidas isoladas de *Metarhizium anisopliae* em meio de cultivo podem degradar fosfatos de açúcares encontrados na hemolinfa de *Manduca sexta*, sendo que íons fosfato livres na concentração encontrada na hemolinfa limitaram o crescimento do fungo mas um aumento na concentração do íon auxiliou no desenvolvimento.

St. Leger; Nelson; Screen (1999) observaram que íons amônia têm função na regulação de microambientes e representam um fator de virulência em diversos fungos, inclusive em *Metarhizium anisopliae*, podendo perturbar o sistema imune de hospedeiros. Íons cálcio também parecem estar envolvidos como mensageiros secundários na diferenciação de *Metarhizium anisopliae* por produzir modificações na extremidade de hifas, afetando a exocitose, a adesão no hospedeiro e, conseqüentemente, afetando posterior diferenciação (St. Leger et al., 1990).

Fungos filamentosos requerem pequenas quantidades de vitaminas para seu crescimento; estas não são nutrientes no mesmo sentido que carbono, nitrogênio e compostos orgânicos, visto que funcionam como coenzimas ou constituintes delas (Garraway; Evans, 1984b). O requerimento nutricional para vitaminas pode variar consideravelmente de acordo com o microrganismo e a linhagem, e a caracterização da deficiência em mutantes exige cuidado visto que a pureza de componentes do meio de cultivo deve ser antes assegurada (Griffin, 1994c). Seu papel como coenzima (de metil

transferases, desidrogenases, em transaminação, em carboxilação) e como componente de membrana (Cooke; Whipps, 1993c) enfatiza a importância das vitaminas no desenvolvimento e na morfologia resultante deste.

O dióxido de carbono pode alterar o metabolismo, o desenvolvimento e o crescimento de microrganismos, causando modificações na produção de enzimas específicas, por intermédio da sua indução ou repressão (Dixon; Kell, 1989). Diferentes hipóteses têm sido elaboradas para explicar o modo de ação do dióxido de carbono (McIntyre; McNeil, 1998). Uma destas hipóteses diz respeito à possível reação do dióxido de carbono com a água no interior da célula fúngica formando ions bicarbonato e liberando protons; para manter o pH interno os protons seriam liberados por um transporte ativo resultando em perda de energia, e os ions bicarbonato seriam transportados também ativamente para o exterior num processo reversível (Dixon; Kell, 1989). Tal mecanismo exigiria bombas especiais de ions bem como enzimas transportadoras específicas (Cooke; Whipps, 1993c) cujo funcionamento provavelmente seria alterado em função de modificações morfológicas na membrana e/ou parede celular.

O dióxido de carbono também pode exercer uma influência direta em enzimas por afetar suas propriedades físico-químicas, e também reagir com aminas resultando na formação de ácidos (Dixon; Kell, 1989). Além disso, o dióxido de carbono pode reagir com aminoácidos conduzindo à formação de interações eletrostáticas (entre porções internas das proteínas, entre sub-unidades de um complexo proteico ou entre proteínas e metais pesados). Sua ação, iniciada pela alteração de cargas de proteínas de membrana modificando o modo de ação destas, influencia nas mudanças estruturais morfológicas conseqüentes do meio de cultivo (McIntyre; McNeil, 1998).

McIntyre; McNeil (1998) descreveram os efeitos inibitórios do dióxido de carbono em cultivo submerso, verificando mudanças significativas tanto na macro como na micro-morfologia de fungos filamentosos; alterações na ramificação de hifas e nos seus comprimentos bem como na produção de metabólitos também estiveram associadas ao gás que dependeram do momento de sua injeção (na fase 'lag', exponencial ou estacionária). Hartman; Keen; Long (1972) verificaram que o dióxido de carbono pode ser requerido para o crescimento do fungo dimórfico *Verticillium albo-atrum* quando a

glicose ou o glicerol foram as únicas fontes de carbono, e a fixação do dióxido de carbono pareceu ser importante para a biossíntese de purinas, afetando a resposta dimórfica ao ambiente.

A importância do dióxido de carbono na produção de metabólitos por intermédio de alterações morfológicas celulares (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000) e no dimorfismo de fungos patogênicos (Rippon, 1980; McIntyre; McNeil, 1997) enfatiza a procura de genes relacionados à aerobiose e à anaerobiose que podem ser regulados pela quantidade de oxigênio (Lowry; Zitomer, 1984; Zitomer; Lowry, 1992). Talbot (1997) e Kershaw et al. (1998) relataram também a presença de proteínas morfogenéticas em hifas aéreas que respondem ao ambiente se o ar estiver presente sendo que mais de um mecanismo para o desenvolvimento aéreo parece existir. Os fenômenos físicos causados pela ação do dióxido de carbono em condições limitadas de nutrientes podem variar, no entanto, em relação a quando as condições nutricionais são ilimitadas (Sims, 1986), sendo que a produção de propágulos também pode ser dependente destas condições.

Timberlake (1993) mostrou que a produção de estruturas diferenciadas para a reprodução aérea assexual depende do controle síncrono e regulado de diferentes genes, sendo que neste processo dimórfico a competência celular é importante para a indução frente ao meio de cultivo para gerar as mudanças necessárias para a propagação. A fixação de processos de realimentação e o estímulo para a tradução de proteínas podem, no entanto, ser dependentes do meio de cultivo. A produção de estruturas de propagação submersas no meio de cultivo, obviamente, também deverá se mostrar dependente de processos que conduzam ao dimorfismo fisiológico e/ou morfológico (Soll, 1992) e a influência do dióxido de carbono bem como da agitação dos frascos onde se mantém a cultura submersa parece ser óbvia.

A disponibilidade de água é de extrema importância para o desenvolvimento de microorganismos, visto que a regulação do desenvolvimento por transporte de nutrientes, bem como a atividade de moléculas biológicas dependem da água disponível no ambiente (Cooke; Whipps, 1993d). A osmolaridade do meio de cultivo, portanto, pode determinar respostas específicas relativas à mudança de osmolaridade independente da composição do meio de cultivo, ou dependente dela (Hallsworth; Magan, 1995; Hallsworth; Magan, 1999).

Humphreys et al. (1989) observaram que o crescimento e a produção de propágulos específicos dependeram da atividade de água, sendo que condições de cultivo favoreceram diretamente a morfologia de *Metarhizium anisopliae* dependendo da linhagem; meio de cultivo sólido em geral favoreceu a produção de propágulos aéreos e meio líquido favoreceu a produção de propágulos do tipo blastosporos. Pode-se verificar que a atividade de água bem como a interface com o ar se auxiliam mutuamente na obtenção de resultados deste tipo.

Magalhães; Goettel; Frazão (2000) verificaram a importância da água disponível para a reprodução aérea de *Metarhizium anisopliae* sendo que este microrganismo foi menos exigente que o entomopatógeno *Beauveria bassiana* quanto ao desenvolvimento em ambiente com menor disponibilidade de água. Matewele; Trinci; Gillespie (1994) puderam observar que a virulência de linhagens do fungo entomopatogênico *Nephrotettix virescens* aumentou em meios com maior osmolaridade, indicando, segundo os autores, que as condições de cultivo usadas na produção de propágulos são importantes na habilidade de colonização pelo fungo a ser utilizado como micoinseticida.

A fisiologia da osmotolerância em fungos foi estudada por Blomberg; Adler (1992). Os autores constataram que a osmoregulação não implica em osmotolerância, e fatores celulares estão envolvidos em ambos os processos. O estresse osmótico entre fungos patogênicos tem se mostrado importante determinante na virulência por gerar força física e a secreção de enzimas envolvidas na degradação de parede celular e de cutícula de insetos (Money, 1995). Este balanço de forças permite a célula fúngica gerar, transmitir e perceber a tensão mecânica, sendo também utilizado para controlar sua morfologia e comportamento (Chicurel; Chen; Ingber, 1998).

Shiozaki; Russell (1995) mostraram que em leveduras o controle do ciclo celular está vinculado à disponibilidade de nutrientes e à osmolaridade do ambiente extracelular por intermédio de quinases de proteínas. Katz; Rosenberg (1971) verificaram que choque osmótico não inibiu a síntese de proteínas em *Aspergillus nidulans*, mas induziu a mudanças morfogenéticas na hifa que produziu grande quantidade de ramificação e septos.

Osmorespostas a sais também foram observadas no fungo filamentoso *Ashbya gossypii* inibindo o crescimento, gerando a produção de glicerol como osmoregulador (Föster et al., 1998). Charlang; Horowitz (1971) verificaram que a disponibilidade de água em meio de cultivo com osmolaridade alterada permitiu a perda de substâncias essenciais para a germinação de *Neurospora crassa*; os autores também observaram que esta perda produziu uma diminuição na razão de crescimento e no crescimento total, sendo que esta perda de material essencial para a germinação dependeu de certo modo da natureza do soluto, que poderia estar associado à facilidade de sua absorção pela célula fúngica.

Respostas fisiológicas e/ou morfológicas aos estímulos provenientes da alteração da osmolaridade do meio de cultivo têm sido verificadas para diversos microrganismos (Brüning et al., 1998; Heermann; Altendorf; Jung, 1998), mostrando que expressão diferencial de genes (Rensing; Monnerjahn; Meyer, 1998) incluindo aqueles envolvidos na síntese de material de parede (Gooday; Schofield, 1995) e expressão de proteínas de estresse (Fracella et al., 1997; Matthews et al., 1998; Madhani; Fink, 1998) podem ser indicativos de mecanismos próprios para este estímulo do ambiente. Estas observações devem auxiliar em estudos que busquem relacionar a patogenicidade e a osmolaridade do ambiente a ser infectado por entomopatógenos.

O efeito de ácidos graxos, orgânicos e fenólicos na germinação de *Metarhizium flavoviride* foi verificado por Barnes; Moore (1997). Os autores concluíram que certos ácidos, incluindo ácido láctico, produziram significativa inibição na germinação. A lecitina de soja, composta por diferentes ácidos graxos que podem influenciar no desenvolvimento micelial (Barnes; Moore, 1997), contém um potente vasodepressor e pode modificar a morfologia de *Metarhizium anisopliae* em meios de cultivo e a virulência dos propágulos obtidos (Kleespies; Zimmermann, 1998).

Outros fatores do ambiente, como temperatura, também se mostram bastante efetivos em estimular respostas dimórficas morfológicas, e em *Metarhizium anisopliae* fatores específicos para este estímulo, denominados HSF, foram caracterizados (Xavier; Khachatourians; Ovsenek, 1999). Thomas; Jenkins (1997) verificaram que a temperatura pode influenciar o crescimento micelial, a virulência e a reprodução aérea de

Metarhizium flavoviride; tais resultados endossam pesquisas referentes à produção de propágulos em cultivo submerso sob ação de diferentes valores de temperatura.

A produção de pigmentos de estruturas aéreas pode ser tida como um dentre os muitos aspectos fisiológicos afetados pelo ambiente. Pigmentos muitas vezes têm se mostrados como importantes para a patogenicidade de fungos entomopatogênicos, podendo interferir na produção de estruturas de infecção por alterarem a pressão necessária para o turgor (Jong et al., 1997), e por protegerem as células fúngicas de mecanismos de defesa do invasor (Wang; Aisen; Casadevall, 1995). Clutterbuck (1990) e também Aramayo; Timberlake (1993) verificaram que genes regulatórios para o desenvolvimento de estruturas aéreas diferenciadas também controlam genes envolvidos em diferentes passos do processo de produção de pigmentos (sem cor → ação da proteína WA ⇒ amarelo → ação da lacase ⇒ verde) em *Aspergillus nidulans*. Caddick; Turner (1993) mostraram que modificações nos genes envolvidos na diferenciação de estruturas para a reprodução aérea podem diretamente modificar a produção de enzimas envolvidas na produção de pigmentos. A produção de pigmentos pode então permitir uma avaliação indireta da ação de genes envolvidos na reprodução assexual e conseqüente produção de propágulos.

3.2 – Entomopatogenicidade de fungos filamentosos

O controle de pragas por intermédio de fungos entomopatogênicos não é muito recente. O ‘pai da patologia dos insetos’ foi Agostinho Bassi, que em 1834 demonstrou que o agente causal da doença do bicho-da-seda era um fungo que podia ser transmitido por alimentos que com ele estivessem contaminados, pelo contato entre lagartas sadias e contaminadas, ou mesmo por inoculação ou disseminação de esporos pelo ar. O fungo estudado por Bassi é hoje conhecido por *Beauveria bassiana* em homenagem ao seu caracterizador (Reis, 1991).

Pode ser atribuído a Louis Pasteur, no entanto, o desenvolvimento da patologia de insetos como ciência. Este pesquisador, em 1874 sugeriu que pelo fato de os fungos

matarem o bicho-da-seda estes poderiam ser utilizados no controle de plantas cultivadas (como por exemplo na praga de importância da época que era o pulgão-da-videira). Mas o mérito do uso de microrganismos no controle de pragas tem sido atribuído ao russo Metschnikoff que em 1878 estudou o controle do besouro-dos-grãos (*Anisoplia austriaca*) pelo fungo *Metarhizium anisopliae* (Reis, 1991).

No Brasil o estudo da patologia de insetos teve início por volta de 1920; no entanto, segundo Alves (1998), foi somente depois de 1964, com a ocorrência epizootica de *Metarhizium anisopliae* sobre cigarrinhas da cana-de-açúcar que os fungos receberam mais atenção dos pesquisadores. Segundo o autor, esta atenção se retrata no fato de que 50% dos trabalhos sobre patologia de insetos e controle microbiano publicados no Brasil são sobre fungos entomopatogênicos, sendo que 90% deles foi desenvolvido nas duas últimas décadas.

Os fungos, de modo geral, são dotados de extrema variabilidade no que diz respeito às suas possibilidades de exploração do ambiente, que pode abranger diferentes sistemas não-vivos ou vivos, incluindo o homem (Larone, 1995). O auge de suas habilidades e capacidades de exploração é refletido nas associações que formam com outros organismos, associações estas que vão desde com seres mortos e substâncias orgânicas decompostas até relações predatórias e parasíticas. Muitas destas associações são baseadas em requerimentos nutricionais do fungo. A variabilidade e a plasticidade do genoma do microrganismo resulta na seleção de mecanismos morfológicos, genéticos e de dispersão que permitirão a continuidade da associação (Ross, 1979b).

Segundo Messias (1991), diferentes associações simbióticas com animais e plantas podem ser desenvolvidas por diversos grupos de fungos. Poder-se-ia ter, portanto, associações simbióticas antagônicas (em que o parasita, ao causar a doença, será reconhecido como patógeno e o organismo parasitado será reconhecido como hospedeiro), mutualistas e neutras, que demonstrarão se a simbiose é benéfica ou maléfica. O grau de dependência da associação entre patógeno/hospedeiro definirá se esta é obrigatória ou facultativa.

O termo 'entomopatogênico' se refere àqueles fungos que causam micoses severas aos insetos por uma associação antagônica endossimbiótica. *Metarhizium*,

Beauveria, *Aspergillus*, *Hirsutella* e *Paecilomyces* são gêneros que se enquadram num tipo de associação antagônica endossimbiótica facultativa (Messias, 1991).

Segundo Ross (1979c) o estabelecimento da patogenicidade depende tanto do parasita como do parasitado, sendo que somente quando se verifica o desfavorecimento do desenvolvimento da parte parasitada acompanhado de distúrbio fisiológico é que se pode afirmar que o parasita é um patógeno. A virulência, uma medida quantitativa da patogenicidade, está na dependência de vários genes que devem ser expressos para permitir a manutenção dos níveis de virulência (Messias, 1991), visto que o sistema de defesa de insetos é muitas vezes eficiente (Hoffmann, 1995) desde o integumento (Marmaras et al., 1993) até o interior do inseto (Hultmark, 1993; Richman; Kafatos, 1996) exibindo processos diversos incluindo encapsulação e fagocitose (Hoffmann; Reichhart; Hetru, 1996) bem como a produção de substâncias específicas (Gloer, 1995).

O estabelecimento do parasitismo pode se desenvolver gradualmente percorrendo diferentes fases que seriam a fase de infecção, a fase de colonização e a fase de eventos “post-mortem” (Messias, 1991). Segundo Butt; Goettel (2000) o hospedeiro em geral é invadido em sua exocutícula, embora a infecção via trato digestivo ocorra em algumas espécies (Schabel, 1976); os esporos se prendem na cutícula. Segue-se a penetração no integumento por meio de uma combinação de pressão física (com ou sem estruturas próprias de penetração, segundo Butt et al., 1995; Magalhães, 2000) e de degradação enzimática da cutícula. O micélio então se ramifica na hemocela do hospedeiro. A morte do hospedeiro geralmente é devido a uma combinação de diminuição de nutrientes, invasão de órgãos e a ação de toxinas secretadas pelo fungo. As hifas geralmente emergem do cadáver e, sob condições apropriadas, produzem esporos no exterior do hospedeiro.

Cada etapa do estabelecimento do parasitismo depende da interação entre o patógeno e o hospedeiro, em que barreiras ao desenvolvimento necessitam ser transpostas por ambas as partes envolvidas.

A penetração no hospedeiro pode estar associada a sinais químicos fornecidos por ele para dar início ao processo de infecção pelo fungo (Kolattukudy et al., 1995). A eficiência da germinação na cutícula é de extrema importância. El-Sayed et al. (1993)

verificaram que o substrato cuticular influencia na expressão de enzimas de degradação da cutícula no entomopatógeno *Nomuraea rileyi*.

Segundo Sosa-Gomez; Boucias; Nation (1997), tratamentos químicos para remover as proteínas da cutícula não afetaram a adesão conidial de *Metarhizium anisopliae* na cutícula de *Nezara viridula*; no entanto, solventes de lipídios cuticulares reduziram significativamente a adesão, mostrando que lipídios e aldeídos fungistáticos podem ser eficientes no início do processo infectivo. Monod et al. (1995) também verificaram que proteases secretadas não foram essenciais para a invasão de *Aspergillus fumigatus*.

A ligação de esporos de fungos entomopatogênicos ao inseto hospedeiro pode ser mediada por fortes forças de ligação, podendo ser uma ligação passiva e não específica em que o conídio adere prontamente tanto ao inseto hospedeiro como a não-hospedeiro (Boucias; Pendland; Latgé, 1988). No entanto, Sosa-Gomes; Boucias; Nation (1997) verificaram que a composição da exocutícula já pode representar uma barreira para o desenvolvimento.

St. Leger; Bidochka; Roberts (1994b) verificaram que a germinação de *Metarhizium anisopliae* é dependente da espécie a que pertence o hospedeiro, que estimularia proteases específicas dependentes da presença e do tipo de açúcar envolvido. A adaptação de fungos aos requerimentos de seus nichos ecológicos foi mostrada por St. Leger, Joshi; Roberts (1997) estar associada à adaptação enzimática de proteases e carboidrases.

Segundo Rath; Guy; Webb (1995), a especificidade patógeno-hospedeiro para *Metarhizium anisopliae* pode depender de antígenos da superfície do esporo que seriam um fator determinante de patogenicidade, e que outros determinantes de patogenicidade seriam a produção de enzimas durante a penetração ou a produção de toxinas pelo fungo dentro do hospedeiro.

Segundo Barracco; Menezes (1985), as defesas celulares dos insetos são mediadas por células presentes na hemolinfa, denominadas hemócitos. Considera-se que existam seis tipos de hemócitos (pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, enocitóides e coagulócitos) envolvidos em vários mecanismos de defesa (fagocitose, encapsulamento, coagulação) em diferentes reações (reconhecimento,

recrutamento, defesa); segundo os autores, nos insetos, diferente de em vertebrados, as respostas de defesa não são específicas e não existe uma ‘memória imunológica’ . A eficiência deste sistema de defesa é reconhecidamente suficiente para manter a hemolinfa dos insetos como uma verdadeira barreira a ser vencida pelo fungo que almeja a colonização.

Apesar de não se ter confirmada a existência de uma memória no processo de defesa, peptídes já foram identificados com propriedades antifúngicas específicas (Levashina et al., 1995); proteínas de hemócitos de *Ceratitis capitata* já foram identificadas como responsáveis pelo reconhecimento do ‘não-próprio’ na presença de células de microrganismos (Marmaras; Charalambidis, 1992).

Lemaitre; Reichhart; Hoffmann (1997) verificaram que *Drosophila* pode exibir respostas de defesa antimicrobial sendo capaz de discriminar várias classes de microrganismos; os autores constataram que peptídeos com atividades antifúngicas só foram expressos na presença de fungos, mostrando ativação seletiva de genes num processo regulatório envolvendo cascatas proteolíticas.

Uma vez dentro do inseto, fungos entomopatogênicos podem produzir proteases que impedem a atividade de fagocitose dos hemócitos (Griesch; Vilcinskis, 1998). Hung; Boucias (1992) também verificaram que o sistema de defesa de *Spodoptera exigua* foi influenciado por mecanismos eficientes exibidos pelo fungo *Beauveria bassiana*, sendo que blastosporos e conídios induziram modos diferentes de defesa do hospedeiro.

Lopez-Lastra; Boucias (1994) verificaram que o grau de toxicidade exibido pelo fungo no interior do hospedeiro varia com o patógeno. *Beauveria bassiana*, por exemplo, ao produzir metabólitos, causou o rompimento de granulócitos e pôde matar a larva em metamorfose; entretanto, *Nomuraea rileyi* apesar de produzir metabólitos tóxicos estes não foram suficientes para um sucesso na colonização.

Beauvais et al. (1989) verificaram que os componentes de superfície de propágulos exercem um papel fundamental nesta fase do processo, sendo que propágulos específicos estimulam respostas específicas do hospedeiro. Tais respostas podem incluir proteínas de defesa como as observadas em larvas de *Manduca sexta* após infecção com entomopatógenos (Bidochka; St. Leger; Roberts, 1997).

Segundo McFarlane (1985) a nutrição do inseto pode influir na composição da hemolinfa que, por sua vez, pode influenciar grandemente a relação entre patógeno-hospedeiro. Em geral, os insetos têm em suas dietas as mesmas substâncias básicas que todos os animais superiores requerem para o crescimento e desenvolvimento de formas juvenis e para a manutenção e reprodução de adultos. Estes requerimentos podem incluir uma fonte orgânica de nitrogênio, uma fonte orgânica de energia, sais inorgânicos, água, e uma variedade de compostos químicos orgânicos em quantidades menores. Relações de simbiose com microrganismos que sintetizem nutrientes essenciais capacitam muitos insetos usufruírem de fontes de nutrientes de valor limitado.

Relações de simbiose entre insetos e microrganismos podem também influenciar na patogenicidade de fungos, visto que, como observaram Dillon; Charnley (1991), microrganismos tipo bactéria podem exercer a função de produtores de substâncias tóxicas antifúngicas. Um dos modos de o fungo continuar no processo de patogenicidade é, como já observado, após ter algumas de suas células destruídas por uma bactéria, estas liberam antibióticos na hemolinfa permitindo ao fungo continuar a colonização. O aumento de resistência do inseto à colonização também pode ser conferido pela atividade de fermentação bacteriana que produziria ácidos graxos voláteis tóxicos ao fungo.

Alimentos ingeridos por insetos também podem se mostrar tóxicos para o fungo que tenta estabelecer a patogenicidade. Estes alimentos podem tanto conter uma substância fungitóxica como o alimento, ao passar pelo processo de digestão no inseto, passa a exibir ação tóxica ao fungo (Dillon; Charnley, 1991).

Dillon; Charnley (1986) verificaram que infecção oral de *Metarhizium anisopliae* em *Schistocerca gregaria* não foi bem sucedida em virtude de toxinas bacterianas funcionarem como antifúngicas, enquanto Gunnarsson (1988) observou que a penetração cuticular teve sucesso, ainda que células de defesa do inseto tenham sido precocemente acionadas antes mesmo do fungo chegar até à epicutícula; estes resultados evidenciam certa especificidade na forma de infecção pelo fungo.

Vilcinskis; Matha (1997) verificaram que a morfologia de parede e membrana de *Metarhizium anisopliae* pode lhe conferir resistência a enzimas antifúngicas como lizosima. Esta enzima, encontrada em insetos, teve a ação neutralizada tanto pelos níveis

altos de potássio como pela presença de bloqueadores de canais de potássio, enfatizando a importância da constituição e da estrutura de propágulos no sucesso de todo o processo micótico. Esta importância é corroborada por resultados como os obtidos por Penland; Boucias (1998) referente à existência de epitopos de superfície que podem imitar as moléculas de superfície do hospedeiro conduzindo à não identificação de estruturas de colonização do fungo pelos granulócitos do hospedeiro, permitindo a livre circulação dos propágulos fúngicos na hemolinfa.

O estudo de estruturas de colonização tem sido feito para diferentes fungos entomopatogênicos em diferentes hospedeiros, como por exemplo para *Paecilomyces fumosoroseus* (Inch; Humphreys; Trinci, 1986; Vega et al., 1997), *Pandora neoaphidis* (Feng et al., 1992), *Nomuraea rileyi* (Pendland; Boucias, 1991), *Trichoderma harzianum* (Muñoz et al., 1995), *Metarhizium anisopliae* (Kaaya, 1989; Lacey; Lacey; Roberts, 1988; Riba et al., 1986; Zacharuk, 1970; Prasertphon; Tanada, 1968).

Atenção tem sido dada à fialoconidiogênese enteroblástica de *Metarhizium anisopliae* tanto *in vitro* (Hammil, 1972) como *in vivo* (Zacharuk, 1970b; Cole, 1986), bem como à descrição de características moleculares quanto ao DNA (Mavridou; Cannone; Typas, 2000; Kang; Park; Lee, 1998), a genes (Smithson et al., 1995; Screen et al., 1998; Pereira Jr. et al., 1994) e a proteínas (St. Leger; Bidochka; Roberts, 1994a; Paterson et al., 1994 a, b; Braga; Destéfano; Messias, 1999; Joshi; St. Leger, 1999).

A especificidade de *Metarhizium anisopliae* tem sido questionada quanto a ser realmente exclusiva para insetos visto ter sido verificada a lesão de córnea e rinite em humanos (Garcia et al., 1997) e hipersensibilidade seguida de alergia em mamíferos (Madison et al., 2000 a). Madison et al. (2000b), no entanto, concordaram que diferentes protocolos podem conduzir a conclusões divergentes.

De qualquer forma, *Metarhizium anisopliae* tem se despontado como um bioinseticida promissor (Kaay; Hassa, 2000) e resultados obtidos em laboratório deverão contribuir neste sentido.

3.3 – Dimorfismo em fungos filamentosos

O micélio pode ser comparado a células no estado indiferenciado de blástula, condição em que toda a síntese macromolecular é dirigida para a manutenção de um estado contínuo de divisão celular e ramificação de hifa sem qualquer diferenciação (Ross, 1979a). Modificações no ambiente podem ser traduzidas como um sinalizador para respostas num nível de diferenciação (Banuett, 1998); isto é o que ocorre quando um esporo passa da condição de dormência para o crescimento vegetativo, e, uma vez neste estado, pode responder aos estímulos ambientais com novas estruturas diferenciadas ou com um novo estado fisiológico celular. A competência, a indução e as mudanças decorrentes se processam sequencialmente e necessariamente (Ross, 1979a).

Cooke; Wipps (1993a) observaram que o ambiente pode conduzir a mudanças no micélio com respeito à adaptação de curto prazo ou à inovação de longo prazo, que são manifestadas em trocas entre modos morfológicamente e funcionalmente distintos. O micélio pode exibir considerável plasticidade de desenvolvimento por crescer em novos tipos estruturais, sendo o significado das interações entre mecanismos aí presentes ainda pobremente entendido. Fungos como *Fusarium* (Cooke; Wipps, 1993b) e a levedura *Wangliella dermatitidis* (Kester; Garret, 1995) são polimórficos e têm muitas variantes, mas a ocorrência mais comum parece ser o dimorfismo, no qual existe uma opção entre dois modos de desenvolvimento.

O ‘dimorfismo para o modo de crescimento’ é aquele em que pode haver uma troca alternada entre o crescimento unicelular (determinado) e o crescimento micelial (indeterminado); tal possibilidade, em diferentes estágios de vida, permitem ao fungo explorar as vantagens que o dimorfismo lhe confere, como tolerância a estresse e facilidade de dispersão dada pela fase leveduriforme unicelular e a capacidade de penetração em um substrato e posterior colonização dadas pela forma micelial (Cooke; Wipps, 1993 a).

Além do ‘dimorfismo para modos de crescimento’ (micelial-leveduriforme), Cooke; Whipps (1993a) alistam dois outros tipos de dimorfismo. Um é o ‘dimorfismo para a morfologia de micélio’ (efusivo e rápido, ou denso e lento) que interferirá na

exploração do ambiente ou na captação de fonte de energia; o outro é o ‘dimorfismo para o crescimento micelial’ (aéreo ou não-aéreo, que podem ocorrer simultaneamente).

Neste ponto, parece evidente que mecanismos reprodutivos tenham relação com o dimorfismo. Corroborando esta asserção, Cannon et al. (1994) relataram que o processo de morfogênese na reprodução assexual de *Aspergillus nidulans* envolve a formação de conidióforos multicelulares e uninucleados, esporos derivados mitoticamente, ou conídios, por meio de hifa vegetativa. Segundo os autores, o processo de conidiação, então, envolve uma troca dimórfica do crescimento hifal com extensão polarizada para a adição de material para a nova parede celular, para um crescimento despolarizado e inchamento do conidióforo. Todos os passos subseqüentes de desenvolvimento são não-polares, ou são um crescimento por brotamento.

Segundo Alexopoulos (1979), a reprodução é a formação de novos indivíduos com todas as características típicas da espécie. A reprodução assexual (observada em *Metarhizium anisopliae*), algumas vezes denominada ‘somática’ ou ‘vegetativa’, produz estruturas especializadas reprodutivas denominadas ‘esporos’, mas, segundo o autor, uma definição abrangente deveria incluir o método de propagação dos novos indivíduos (tal como a divisão simples de um organismo unicelular em duas células filhas, ou de um talo multicelular em um número de fragmentos que cresceriam individualmente). Assim, os métodos de reprodução assexual abrangeriam fragmentação de hifas, fissão de células somáticas em células filhas, brotamento de células somáticas ou de esporos, e produção de esporos com cada esporo germinando para formar um tubo germinativo que cresce como micélio.

Alguns fungos empregam a fragmentação de hifas como modo normal de propagação (gerando ‘artrosporos’); tais fragmentos se comportam como esporos. Se as células se tornam possuidoras de uma parede grossa antes de se separar, elas são denominadas ‘clamidosporos’. A fragmentação pode ocorrer por diversos motivos, incluindo forças externas (Alexopoulos, 1979; Nielsen; Krabben, 1995). Alexopoulos (1979) designa como ‘corpos hifais’ às células miceliais referentes a *Entomophorales*.

No entanto, Latgé (1988) ao conceituar propágulos fúngicos, esclarece que todo fungo entomopatogênico é caracterizado por um ciclo biológico bifásico: uma fase vegetativa e uma fase reprodutiva. Os esporos são responsáveis pela sobrevivência do

patógeno durante condições adversas ou na ausência de hospedeiros convenientes. Teoricamente, qualquer propágulo fúngico poderia ser considerado para a produção de micoinseticidas. O autor esclarece que em meio sólido, um micélio contínuo geralmente é produzido, enquanto que em culturas líquidas (como o interior do corpo de um inseto), o desenvolvimento do fungo é mais comumente caracterizado pela formação de células semelhantes às leveduras capazes de se reproduzir por fissão. A terminologia aplicada a estes propágulos, segundo o autor, depende do grupo sob consideração, sendo denominadas ‘blastoporos’ (Deuteromicetos), ‘corpos hifais’ (Entomophorales, Coelomicetos), e ‘segmentos de hifas’ ou ‘subtalo’ (Lagenidiales).

Nikawa et al. (1995) adotaram, para se referir ao dimorfismo de *Candida albicans*, o termo ‘fase de blastosporo’ como sinônimo de ‘fase blastoconidial’ ou ainda ‘fase leveduriforme’. Tubaki (1966), por outro lado, após admitir o uso indiscriminado a que o termo ‘blastosporo’ se submete, fez uma correlação entre ‘blastosporo’ e ‘fialosporo’ (que é o tipo de conidiação apresentada por *Metarhizium anisopliae* e alistada como ‘conidiação blástica’ por Cole; Nozawa, 1981).

Observa-se aqui que a definição de termos para a caracterização de propágulos necessita de um padrão a ser adotado. Sigler (1989) relatou os problemas na aplicação dos termos ‘blástico’ e ‘tálico’, sendo que pode ser observado um spectrum de desenvolvimento proveniente da plasticidade morfológica indo desde a fragmentação de hifas até a extrusão de uma porção de uma hifa ou de uma célula; o autor sugeriu uma integração entre os desenvolvimentos blástico e tálico.

Clutterbuck (1969) argumentou que, em *Aspergillus nidulans*, um “locus” gênico governa a mudança de hifa para a forma leveduriforme e que tal troca bem conhecida como ‘dimorfismo’ deve também ter um papel na morfogênese conidial. Mische; Chant (1995) propuseram uma analogia entre ‘brotamento’ e ‘germinação’ de esporo, bem como entre ‘início de ramificação de hifa’ e ‘extensão da extremidade de hifa’, mostrando que uma ‘mímica’ de brotamento pode existir com genes de seleção do sítio de brotamento e do estabelecimento atuando nos processos.

Cole; Nozawa (1981) propuseram que cada fungo conduz a conversão de fase com a formação de células transicionais com uma mistura de características da fase hifal e da fase leveduriforme, ressaltando que um “continuum” de desenvolvimento existe

preferencialmente a dois estados exclusivos sugeridos pelo termo ‘dimorfismo’. Haveria, portanto, segundo os autores, uma plasticidade morfogenética durante a conversão de fase.

Em função de seu papel primário no início do processo de infecção (Zacharuk, 1970 a) esporos têm sido considerados como importantes desde o início da história do controle biológico. Conídios de Deuteromicetos são facilmente produzidos em massa em meio sólido sob condições aeradas. Os conídios também podem ser obtidos em meio líquido, sendo que aí surgem por conidióforos típicos provenientes de hifas diferenciadas (Latgé, 1988) ou diretamente por microciclo de conidiação (Maheshwari, 1991).

Podemos dizer, portanto, que os propágulos aéreos de *Metarhizium anisopliae* são produzidos, de acordo com Cole; Nozawa (1981), por fialoconidiogênese do tipo blástica (enteroblástica), caracterizando os esporos como ‘blastosporos’; já propágulos em meio líquido seriam produzidos por outro tipo de conidiogênese (enterotática) ou por brotamento (que daria origem aos chamados ‘conídios submersos’). Verificar-se-ia, portanto, dimorfismo dentro de dimorfismo.

Zacharuk (1979 c) verificou que em larvas infectadas com *Metarhizium anisopliae* uma diversidade de estruturas fúngicas pôde ser encontrada. Estas variavam em tamanho, forma, vacuolarização e modo de desenvolvimento, e apareceram em fases específicas de infecção, colonização e na fase “post mortem” (Messias, 1991). Segundo o autor, três estágios estruturais foram vistos ocorrer dentro do corpo do inseto após a penetração no integumento: a hifa penetrante dá origem a ‘corpos hifais’, que se tornam distribuídos pelo interior do corpo e dá origem a uma hifa secundária em todas as partes do interior do corpo; o terceiro estágio consiste de células grandes com nutrientes abundantes armazenados e metabolicamente pouco ativas (que o autor classificou como ‘clamidosporos’) que surgiram após a morte do hospedeiro.

Estes resultados, no entanto, parecem não permitir uma generalização para a infecção por *Metarhizium anisopliae*, visto que Veen (1968) verificou o aparecimento de estruturas denominadas de ‘blastosporos’ em hemolinfa de *Schistocerca gregaria*, sem qualquer semelhança com as estruturas vistas por Zacharuk (1970) ou com as obtidas por Kaaya (1989) em infecção de *Glossina morsitans morsitans*.

Prasertphon; Tanada (1968) descreveram uma sequência para o aparecimento destes propágulos. O dimorfismo morfológico e fisiológico se mostrou, portanto, um aspecto no processo micótico que deveria também ser estudado *in vitro*.

Hegedus et al. (1992) verificaram que *Beauveria bassiana* pode produzir três tipos de esporos, a saber, conídios aéreos, conídios submersos e blastosporos, mostrando que a virulência, a hidrofobicidade e a viabilidade destas estruturas variaram, sendo que os conídios submersos se mostraram melhores agentes como micoinseticidas.

Watters et al. (2000) verificaram que o processo de ramificação de hifas é influenciado não apenas por eventos na extremidade de hifas, mas pode ser determinado também pelo ramo que o precede. Nesta visão, Ross (1979a) enfatiza que um estímulo para a diferenciação celular poderia ocorrer em áreas localizadas enquanto o restante do talo continuaria no estado indiferenciado; ainda não se sabe ao certo a causa para um micélio contínuo se tornar diferenciado na ausência de unidades individuais de organização, nem a causa e os efeitos da diferenciação localizada. Adaptando o que foi mencionado por Ross (1979d), poderíamos dizer que o brotamento lateral parece poder, portanto, surgir mediante tais condições; os fragmentos poderiam surgir por meio de uma extremidade de hifa, ou um segmento de hifa, que se desenvolveria em uma estrutura reprodutiva, ao se separar e se tornar uma entidade especializada, ocorrendo independente do fato de existir uma compartimentalização do núcleo ou de seus produtos gênicos.

Segundo Chiu; Moore (1993) a diferenciação morfológica sinalizaria a diferenciação funcional. Semelhante a todas as mudanças de morfologia, o dimorfismo para crescimento está vinculado ao importante papel que a parede celular exerce (Cooke; Whipps, 1993a; Pietro; Jorge; Terenzi, 1990), visto que o estresse nutricional e de superfície influenciam na morfologia (Koch et al., 1982) por intermédio de canais mecanossensíveis (Sckin, 1995) ou por rearranjo de constituintes de parede (Yokoyama, et al., 1994). O conseqüente metabolismo alterado também poderia conduzir à respostas dimórficas (Vivier; Lambrechts; Pretorius, 1997) apesar de este nem sempre ser o caso (Torres-Guzman et al., 1994).

Ingber (1993) mostrou, ao tratar da parede celular, que a arquitetura de tensegridade traduz mudanças na forma e mobilidade celulares que podem resultar

também de um modelamento da tensão e remodelamento químico de um conjunto molecular, preferencialmente que de uma adição ou subtração local de partes individuais. Deste modo a formação de padrões podem ser alterados apenas por um rearranjo do material já existente.

Shulman; Johnston (1999) mostraram que independente da grande diversidade de tipos celulares, mecanismos comuns parecem mediar a resposta polarizada, em que proteínas específicas estariam envolvidas. O autor reitera a afirmação de que células eucarióticas adotam um vasto conjunto de opções de morfologias, e estas formas são geralmente importantes para suas funções.

Em cultivo submerso, diferentes estruturas celulares podem ser obtidas (Gibbs; Sviour; Schmid, 2000). O meio de cultivo e as condições de cultivo deveriam permitir um certo grau de previsão neste sentido. Esta possibilidade tem sido utilizada por pesquisadores para estudar o dimorfismo de patógenos baseados na divisão dos tipos de dimorfismo relacionados com seus indutores ('dimorfismo somente para temperatura', 'dimorfismo para fatores nutricionais e para temperatura', 'dimorfismo ou para nutrição ou para ambiente somente'). Muitos patógenos colonizam seus hospedeiros na fase leveduriforme, transformando-se em micélio quando o hospedeiro se torna suficientemente debilitado. Nutrientes e modo de cultivo, portanto, são peça-chave para o estudo desta troca dimórfica (Heath, 1995).

Em virtude disto, têm sido isolados alguns genes, fatores de transcrição e proteínas supostamente relacionados com fases específicas do desenvolvimento dimórfico de *Candida albicans* (Bailey et al., 1996), *Histoplasma capsulatum* (Abidi; Roh; Keath, 1998), *Paracoccidioides brasiliensis* (Rippon, 1980), , *Blastomyces dermatidis* (Rippon, 1980), *Sporotrichix schenckii* (Howard, 1960), *Coccidioides immitis* (Rippon, 1980), *Cryptococcus neoformans* (Madhani; Fink, 1998) e de outros patógenos humanos.

O meio de cultivo e as condições de cultivo também têm se mostrado efetivos em desencadear respostas dimórficas em *Mucor* (Orlowski, 1991; 1995), *Aspergillus nidulans* (Harris et al., 1999), *Glomerella cingulata* (Lingappa; Lingappa, 1969). Em *Metarhizium anisopliae*, efeitos de aditivos nos meios de cultivo (Kleespies; Zimmermann, 1992; 1998; Adamek, 1965; Jenkins; Prior, 1993) têm evidenciado a

possibilidade do controle de respostas dimórficas em cultivo submerso, sendo que a eletromicroscopia de algumas estruturas dimórficas já foram feitas.

Diferentes indutores ao dimorfismo (pH, dióxido de carbono, aminoácidos, nitrogênio, temperatura, glicose) têm sido utilizados para o estudo deste importante aspecto do desenvolvimento de patógenos. No entanto, a caracterização das respostas ao nível molecular pode encontrar dificuldades visto que nem toda mudança morfológica necessariamente requer uma alteração na tradução de proteínas (Finney; Langtimm; Soll, 1985; Soll; Sonnerborn, 1971), nem alteração genética (Harold, 1995). Inversamente, foi verificado que variações nos níveis de mRNA podem apenas refletir as mudanças no crescimento e não estarem relacionados ao dimorfismo celular (Swoboda et al., 1994; Bossche et al., 1992). Já Hiatt et al. (1982) verificaram que mudanças na morfologia puderam ser acompanhadas pela alteração no sistema de tradução de proteínas por intermédio de fatores de síntese específicos de cada fase de desenvolvimento dimórfico.

Russell et al. (1987) averigüaram níveis diferentes de metilação do DNA no dimorfismo de *Candida albicans* o que lhes sugeriu poder existir diferença significativa na atividade gênica relacionada com cada fase; Reyna-López; Simpson; Ruiz-Herrera (1997) verificaram que há diferenças no padrão de metilação do DNA que são detectáveis durante a transição dimórfica de fungos por amplificação de polimorfismos de restrição, mostrando a universalidade da metilação em fungos e confirmando que a metilação diferencial do DNA ocorreu durante a morfogênese de fungos. Considerando que a metilação do DNA é considerada um dos mecanismos para o controle da atividade e função gênicas, relacionamos o dimorfismo com eventos epigenéticos (Riggs; Matienssen; Russo, 1996).

Latgé (1988) enfatizou a necessidade de se investigar o dimorfismo exibido por fungos patogênicos *in vitro* visto que a multiplicação de estruturas leveduriformes podem facilitar não somente a produção de massa mas também pode ser um indicativo da virulência da linhagem pois estas estruturas celulares são responsáveis por uma rápida colonização da hemolinfa.

Assim, independente da aplicação até desordenada no uso de termos e conceitos relacionados ao dimorfismo em fungos, a importância do fenômeno é reconhecida para o estabelecimento de micoses em plantas, humanos e em outros animais.

3.4 – Eventos epigenéticos em fungos filamentosos

Excelentes progressos no entendimento da arquitetura molecular de fungos têm sido alcançados num esforço conjunto de citologistas, geneticistas e bioquímicos. Embora muitas partes da célula fúngica têm sido menos estudadas que as de outros organismos, os fungos são bem requisitados para a busca de respostas a perguntas particulares por causa da disponibilidade de mutantes e do excelente controle dos processos de crescimento e diferenciação (Griffin, 1994d).

Fungos filamentosos representam um excelente modelo para a caracterização genética e molecular de eucariotos como um todo, e também fornecem um sistema ‘paralelo’ para uma variedade de fungos de importância médica, industrial e em agricultura, que são menos adequados para análise genética e molecular.

Os cromossomos de fungos são estruturados com um complexo de nucleoproteínas que compõem a região nucleoplásmica do núcleo, chamada ‘cromatina’. Pequenas quantidades de RNA também se associam com a cromatina, sendo que cada cromossomo contém uma molécula de DNA linear em fita dupla (Griffin, 1994 d).

A organização estrutural dos cromossomos têm um importante papel na regulação da função gênica (Caddick; Turner, 1993), sendo que variações estruturais podem conduzir a modificações no padrão regulatório. A forma fundamental da cromatina é obtida do DNA que se apresenta associado com proteínas básicas (histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4) e com proteínas ácidas. A principal função das histonas é manter a estrutura terciária do DNA. O complexo DNA-histona está organizado em séries de estruturas repetidas denominadas ‘nucleossomos’ (formados pelas histonas H2A, H2B, H3 e H4).

A ausência da histona H1 em alguns fungos implica em uma diferença na estrutura das fibrilas de cromatina. Os nucleossomos estão organizados no DNA dentro de fibras de 10nm de espessura, que após se condensarem formam estruturas com 30nm de espessura; a formação da fibra de 30nm depende da histona H1 (Griffin, 1994d).

Centrômeros e telômeros são duas características estruturais dos cromossomos, sendo essenciais para a replicação e segregação destes. Os centrômeros, em geral contêm muitos tipos de seqüências de DNA repetitivo, e os telômeros têm repetições

múltiplas de seqüências simples ricas em citosina no final 3'e em guanina no final 5' (Caddick; Turner, 1993).

Holliday (1990) observou que a genética cresceu da realização da possibilidade de estudar as leis que governam a transmissão de genes de geração em geração e seus efeitos fenotípicos, sem a necessidade de qualquer entendimento do processo de desenvolvimento. Com o passar do tempo, pesquisas caminharam na direção de estudar o controle da atividade gênica relacionado com o desenvolvimento. O autor lembrou que os pioneiros na Genética do Desenvolvimento foram K. Hardorn e C. Waddington.

Meins (1996) esclareceu que existem dois sistemas de herança: 1) um 'sistema genético', referente à transmissão das potencialidades de desenvolvimento entre gerações de organismos, e 2) um 'sistema epigenético', ou sistema de desenvolvimento, referente à transmissão somática de padrões de expressão gênica. Com base nestas informações, o autor lembrou que o termo 'mudança epigenética' foi introduzido para denotar alterações celulares herdáveis que não resultam de modificações genéticas permanentes e diferem das mutações clássicas. Ressaltou-se que a plasticidade de desenvolvimento de determinadas estruturas ilustra o ponto importante que se refere ao fato de que mudanças estáveis não são necessariamente irreversíveis. A determinação do desenvolvimento é um processo relativo: estados de desenvolvimento estáveis em um meio ambiente não são necessariamente estáveis em outro.

O termo 'epigenético' foi introduzido por Conrad Waddington em 1957 para descrever mudanças na expressão gênica durante desenvolvimento (seria o estudo dos mecanismos do controle temporal e espacial da atividade gênica durante o desenvolvimento do organismo completo).

Henikoff; Matzke (1997) observaram que nos termos atuais, 'epigenética' no sentido utilizado por Waddington se refere a alterações na expressão gênica sem uma mudança na seqüência de nucleotídeos. Os autores preferiram definir o termo 'epigenético' como modificações na expressão gênica que podem ser herdáveis mas são potencialmente reversíveis, incluindo mudanças na estrutura de cromatina e/ou metilação de DNA. 'Efeitos de posição' gênica remetem também ao fenômeno epigenético.

Riggs; Martienssen; Russo (1996) enfatizaram que a ‘epigenética’ é o estudo de mudanças na função do gene herdáveis mitoticamente ou meioticamente que não envolvem alterações na sequência de DNA. Segundo os autores, o controle epigenético estável da função gênica também é um componente essencial do desenvolvimento normal dos organismos com células diferenciadas.

O controle da função gênica depende do aparato genético do organismo; no entanto, a regulação da função gênica pode depender também de controle epigenético. O fenômeno epigenético em diversos organismos compreende um dos mais intrigantes problemas da genética.

Muitos pesquisadores têm focado suas atenções no estudo de mutações genéticas. Segundo Riggs; Martienssen; Russo (1996) uma pesquisa revelou que desde o final da década de 60 ao início dos anos 70 do século passado, apenas três artigos haviam sido publicados por ano usando o termo ‘epigenético’; entretanto, entre os anos 1993-1995 mais que 130 artigos por ano têm sido publicados mostrando que o interesse tem aumentado neste sentido.

Segundo Holliday (1990), as leis do controle epigenético devem ser diferentes das do controle genético devendo haver: 1) meios de alterar a expressão gênica em um tempo específico nas células em desenvolvimento, 2) segregação das atividades gênicas onde as células filhas têm diferentes estados de desenvolvimento e de diferenciação, e 3) mecanismos para garantir a herança somática estável de um dado conjunto de genes ativos ou inativos.

Riggs; Porter (1996) observaram que uma memória celular é essencial na transmissão de estados determinados para as células filhas. Os autores alistam cinco mecanismos epigenéticos possíveis: 1) ciclos estáveis de realimentação (difusão livre de fatores agindo em *trans*), 2) metilação de citosina do DNA (com a manutenção de um sistema de metilases afetando a ligação de proteínas e a função da cromatina), 3) compartimentalização nuclear (separação espacial de alelos com estados alternados de atividade dentro de compartimentos bioquimicamente diferentes, 4) separação temporal por temporização de replicação diferencial (replicação precoce de cromatina sendo diferente da replicação tardia), e 5) estrutura herdável de cromatina (complexos de nucleoproteínas herdáveis somaticamente).

Estes mecanismos epigenéticos de regulação da atividade funcional do gene conduzem a efeitos no desenvolvimento, sendo que causas diversas podem conduzir a mecanismos de regulação distintos. O silenciamento de genes por estes mecanismos torna óbvio suas importâncias no desenvolvimento. Pressões exercidas pelo ambiente podem conduzir ao acionamento destes mecanismos de regulação que por intermédio de transposição de genes (efeito de posição) e alterações na estrutura e na função de cromatina vão modificar os caminhos prescritos geneticamente sem qualquer mudança na estrutura do DNA em si (Jablonka; Lachmann; Lamb, 1992).

Os mecanismos epigenéticos de regulação gênica conduzem a alterações no padrão de restrição e no reconhecimento de seqüências repetidas ou exógenas (Kobayashi, 1996), modificando padrões de desenvolvimento; fica óbvio a importância do entendimento destes mecanismos nos processos de diferenciação em fungos, visto que o entendimento da reprodução destes microrganismos é fundamental tanto para seu uso como para seu controle.

Segundo Selker (1997), os mecanismos epigenéticos podem servir como uma defesa do genoma. Em núcleos haplóides de células sexuais de fungos como *Neurospora* e *Ascobolus*, genes duplicados são silenciados por hipermutação, por metilação de DNA ou por ambos os processos. Em alguns casos, o DNA introduzido por transformação no genoma de células de *Neurospora* pode inibir genes homólogos por um mecanismo de silenciamento, o que parece ser pós-transcricional. O DNA transformante pode disparar uma nova metilação em células vegetativas, conduzindo a um silenciamento transcricional. As regras que governam o silenciamento em células vegetativas em fungos não são definidas, mas seqüências repetidas parecem ser particularmente suscetíveis a este processo. O autor observou que *Neurospora crassa* pode exibir dois tipos de mecanismos de silenciamento (RIP e MIP, que são mecanismos que detectam seqüências duplicadas diretamente e as altera por metilação ou por mutação de ponto), além de 'transvecção' (depende de pareamento gênico) e silenciamento associado com repetição em células vegetativas (equivalente ao fenômeno de silenciamento pós-transcricional em plantas, mas envolvendo uma molécula agindo em *trans*, possivelmente um RNA aberrante).

A metilação de DNA pode silenciar células vegetativas em fungos, aparentemente por interferência indireta com a elongação da transcrição. O controle e a função da metilação ainda são pouco conhecidos em fungos, como em outros eucariotos. No entanto, parece claro que fungos são sistemas atrativos para o estudo da manutenção e surgimento de metilação, seus efeitos bem como de outros mecanismos genéticos (Selker, 1997).

Segundo Hagemann; Selker (1996), embora o genoma de *Neurospora* seja, em grande parte, não metilado, certas regiões são fortemente metiladas; isto não é restrito à seqüências simétricas (como, por exemplo, CpG). Os autores enfatizam que uma nova metilação depende de um sinal, que é definido como informação presente na seqüência que atrai a metilação para a área; a natureza deste sinal não é bem entendida. De acordo com os autores, a metilação pode inibir a expressão gênica em *Neurospora*, mas, ao menos em tecido vegetativo, ela não parece ser essencial, e não tem se mostrado como desempenhando um papel importante neste organismo.

Russo; Lee; Codón (1996), no entanto, observaram que apesar de apenas 1,44% do total de citosinas serem metiladas no conídio de *Neurospora crassa* (e durante o desenvolvimento de conídio para micélio este número cai para 0,96%, voltando a 1,6% na fase estacionária do desenvolvimento), estima-se que o microrganismo tenha um potencial para codificar mais de dez mil genes; portanto, 1% de 5-metilcitosinas podem representar a metilação de todas as citosinas de 100 genes diferentes, e o número de genes pode ser maior se alguns deles forem apenas parcialmente metilados. Então, segundo os autores, o possível número de genes metilados seria suficiente para desempenhar um papel importante no desenvolvimento; percebe-se, portanto, a necessidade do conhecimento da distribuição das 5-metilcitosinas no genoma de *Neurospora crassa* e também em outros fungos filamentosos.

Segundo Holliday (1990), o estudo dos genes estruturais, seqüências promotoras, fatores de transcrição e o padrão da expressão gênica não revelam propriamente o mecanismo do desenvolvimento. O autor esclareceu que mecanismos de controle epigenético devem incluir a herança de um conjunto de possíveis atividades do gene em cada célula especializada. Em adição ao código genético clássico seria necessário incluir a superimposição de uma camada adicional de informação que

compreenderia parte do material hereditário. O termo ‘herança epigenética’ se aplica a esta descrição, e a necessidade de um ‘código epigenético’ parece ser imprescindível (Holliday, 1996).

Caddick; Turner (1993) relataram que duas áreas principais têm sido exploradas com respeito aos estudos da expressão gênica e sua regulação em fungos filamentosos, que são ‘processos catabólicos’ e ‘processos de desenvolvimento’. Muitos trabalhos tem sido feitos com *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans* por terem disponíveis suas análises genéticas, pela sua versatilidade metabólica e pelas facilidades em geral.

Uma interação entre sistemas regulatórios é inevitável, sendo requeridos para a monitoração efetiva do meio ambiente e para evocar uma resposta apropriada. Inúmeros genes já foram identificados como envolvidos nos processos catabólicos sendo que nitrogênio, carbono, enxôfre, pH, fosfato, aminoácidos, álcoois, nitrato e nitrito, prolina e purina são efetivos nos seus controles (Holliday, 1990). Genes relacionados com desenvolvimento incluem aqueles envolvidos nos passos da formação de conidióforos.

Um componente crítico de qualquer sistema regulatório é o mecanismo pelo qual sinais do meio ambiente são monitorados e comunicados para uma molécula regulatória. Em geral, os sistemas regulatórios elucidados de *Aspergillus nidulans* por análise genética parece não envolver uma cascata interativa de moléculas regulatórias, significando que moléculas regulatórias monitoram o ambiente diretamente (Caddick; Turner, 1993).

A indução ao desenvolvimento de *Aspergillus nidulans* ocorre quando uma cultura submersa é transferida para um meio sólido. A aquisição de competência ao desenvolvimento tem sido encarada como endogenamente determinada e estando sob controle genético (Caddick; Turner, 1993). No entanto, Taname et al. (1983) e Fieldes; Amyot (1999) notaram que o tratamento de hifas com 5-Azacitidina (um análogo da citidina que age como potente inibidor da enzima Metiltransferase de DNA) produziu uma alta proporção de linhagens com o fenótipo mutante “fluffy” caracterizado pela ausência de hifa aérea e por um elevado número de conidióforos por unidade de área. Taname et al. (1983) observaram que o locus *fluF* se mostra parcialmente metilado e se torna completamente metilado na hifa madura, conduzindo à aquisição de competência

para desenvolvimento; o tratamento da hifa com 5-Azacitidina removeu os grupos metil, permitindo a perda de competência para desenvolvimento e ao fenótipo “fluffy”.

Timberlake; Barnard (1981) verificaram existir um bloco de genes (*spoC1*) que codifica para nove transcritos independentes, oito dos quais específicos para esporos e um que se acumula nas fiáldes de *Aspergillus nidulans*; os autores aventaram a hipótese de que a estrutura de cromatina-DNA esteja envolvida neste bloco regulatório, visto que ‘efeitos de posição’ apoiaram esta idéia.

O silenciamento de genes por mecanismos epigenéticos é um importante controle transcricional de repressão independente de genes e dependente da posição gênica. Em leveduras, o silenciamento transcricional é o fenômeno epigenético mais bem estudado, sendo que a estrutura de cromatina influencia a expressão de grandes regiões do genoma (Scherman; Pillus, 1997).

Diferentes níveis de metilação de DNA nas formas micelial e leveduriforme do fungo dimórfico *Candida albicans* foram verificados por Russell et al. (1987), sendo duas vezes maior na células da forma micelial que nas células em forma de levedura; no entanto, segundo os autores, este fato não necessariamente representa diferença na atividade gênica.

Soll (1992) verificou que a expressão do dimorfismo de *Candida albicans* resulta em mudanças complexas no fenótipo e pode potencialmente afetar mais que um aspecto da fisiologia, morfologia ou virulência. O autor ressaltou que mecanismos epigenéticos e a herdabilidade de estados epigenéticos alternativos devem ser considerados, pois células geneticamente equivalentes expressam fenótipos alternativos herdáveis. A heterocromatização foi também ressaltada, sendo que a existência de dois estados alternativos (estado de silenciamento e estado relaxado) para genes regulatórios posicionados próximos desta região também foi aventada como um modelo de mecanismo de regulação epigenética.

Reyna-López; Simpson; Ruiz-Herrera (1997) verificaram que o padrão de metilação do DNA pode se alterar durante transições dimórficas, sendo que metilação diferencial de DNA pode ser tida como universal em fungos e como um evento que ocorre durante a morfogênese, o que foi confirmado com a determinação da metilação de DNA em fungos dimórficos representativos dos maiores taxas de fungos (*Mucor*

rouxii, um zigomiceto; *Yarrowia lipolytica*, um ascomiceto; *Ustilago maydis*, um basidiomiceto).

Harold (1995) enfatizou que a morfogênese não é apenas blocos de construção molecular, mas trata-se de uma construção de estruturas complexas em uma escala maior em que processos, além de genes e produtos gênicos estão envolvidos numa escala celular que gera a forma (micrômetros para milímetros). O autor esclareceu que estes processos são necessariamente epigenéticos, requerendo ação conjunta de grandes números de moléculas, produzindo efeitos que são direcionais e localizados tanto no espaço como no tempo. Isto, segundo o autor, conduz o estudo da morfogênese para o domínio dos fisiologistas que estudariam sistemas complexos; não seria possível entender como as formas são herdadas até compreender como são produzidas.

Nesta mesma linha de raciocínio, Moore (1998) relatou que a morfogênese não é definida simplesmente por um programa genético pré-definido: a expressão de genes importantes para o desenvolvimento é epigenética, dependente do tempo e do espaço. Muitas hifas diferenciadas requerem reforço de suas ‘instruções’ de diferenciação; este reforço seria parte do contexto químico, elétrico e estrutural/mecânico (ambiente) dentro do qual elas se desenvolvem normalmente. Ressaltou-se, também as palavras-chave de cada estágio de desenvolvimento de fungos: ‘competência, indução e mudança’. A morfogênese é um evento compartimentalizado em um conjunto de sub-rotinas que são distintas geneticamente e fisiologicamente. A flexibilidade na expressão destas sub-rotinas de desenvolvimento ilustra que a tolerância na precisão é um importante atributo da morfogênese de fungos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 - Linhagens utilizadas

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* utilizadas nos experimentos e mostradas nos quadros 4.1 e 4.2 se encontram armazenadas no Banco de Germoplasma de Fungos Entomopatogênicos do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas, SP.

Quadro 4.1 – Linhagens selvagens utilizadas nos experimentos com respectivos hospedeiros e local de origem

Linhagem	Identificação*	Hospedeiro e origem
E9	ARSEF 925 (ATCC 60335)	<i>Deois flavopicta</i> (Espírito Santo, Brasil)
3609	IMI (I91 – 614)	<i>Patanga succincta</i> (Tailândia)

* Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF – Catalog of Strains)

O quadro 4.2 mostra as linhagens com deficiência nutricional (auxotróficas), as quais apresentavam características morfológicas provenientes de alteração genética induzida à linhagem E9 por luz ultravioleta (Messias, 1980). Neste quadro, *piro⁻*, *paba⁻* e *tia⁻* referem-se às deficiências nutricionais para piridoxina, ácido *para*-aminobenzóico e tiamina, respectivamente.

Quadro 4.2 – Linhagens mutantes isoladas da E9 utilizadas nos experimentos, com suas respectivas marcas morfológicas para auxotrofia e cor de esporo *

Linhagens mutantes	Marcas morfológicas
Y5	<i>piro⁻</i> / amarelo*
B/vi	<i>tia⁻</i> / branco
X/vi	<i>paba⁻</i> / violeta

4.2 - Manutenção das linhagens

As linhagens foram mantidas em placas de Petri com meio de cultivo sólido MMS ou MMS⁺ (itens 4.9.2 e 4.9.4) a 28°C; após completa esporulação as placas foram mantidas em refrigerador; a cada 15 dias novas placas foram feitas tendo sido inoculadas com as linhagens e mantidas como descrito.

4.3 - Inseto utilizado

Quando foi requisito experimental, utilizou-se larvas da "mosca-das-frutas" *Anastrepha fraterculus* com cerca de 10 dias de desenvolvimento. As larvas foram obtidas junto ao Laboratório de Diversidade Genética, no Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP.

4.3.1 - Avaliação dos parâmetros de interesse da hemolinfa

4.3.1.1 - Extração da hemolinfa das larvas

Após serem submetidas a devida limpeza externa, as larvas foram utilizadas para a extração de sua hemolinfa: os tecidos de revestimento dos corpos foram rompidos

com auxílio de seringa com agulha 30G 5/16" (B-D, Ultra Fine, Micro Bonded; Becton Dickinson and Company), permitindo-se o extravasamento da hemolinfa em placa de Petri esterilizada tanto contendo ou não anticoagulante (item 4.8.16). Este procedimento se deu sempre no momento do uso da hemolinfa nos experimentos onde foi requerida.

4.3.1.2 - Osmolalidade e pH

Um volume entre 5 μ l e 10 μ l de hemolinfa foi colocado em microtubos tipo Eppendorf para a realização das medidas.

O pH da hemolinfa foi determinado tanto com o eletrodo de medidor de pH (ϕ 200 pHmeter, Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, USA) como com papel para medida de pH (Carta Indicatrici di pH – Scala pH 0-14; Carlo Erba, Reagenti).

A osmolalidade da hemolinfa foi avaliada em um osmômetro 5100C Vapor Pressure Osmometer.

4.3.1.3 - Inoculação dos esporos nas larvas

Larvas sadias foram colocadas sobre a linhagem E9 inoculada em placas contendo meio de cultivo MCS (item 4.9.7). Após alguns minutos em que se permitiu às larvas ficarem suficientemente envolvidas com esporos do fungo, estas foram transferidas para frascos cilíndricos contendo alimento apropriado e vedados o suficiente para permitir entrada de ar. Os frascos foram mantidos em ambiente esterilizado e úmido com temperatura controlada em 28°C.

4.3.1.4 - Obtenção do material para avaliação dos propágulos fúngicos na hemolinfa

Ao se completarem cerca de 4 dias após a inoculação dos esporos nas larvas, a hemolinfa foi extraída como descrita no item 4.3.1. Aliquotas foram colocadas sobre lâmina posteriormente coberta com lamínula e levadas ao microscópio para observação.

4.4 - Métodos de análise

O material retirado para análise proveniente de placas, frascos ou tubos foi convenientemente tomado em três repetições, no mínimo.

4.4.1 - Métodos visuais: macroscopia e microscopia

Inspeção visual foi utilizada nas análises das placas e dos frascos (esporulação, cor do tapete micelial, cor do meio de cultivo, crescimento e conseqüente alteração de massa micelial) como complemento da avaliação microscópica feita das alíquotas retiradas destas mesmas placas e frascos. Empregou-se microscopia de luz (D-7082 Oberkochen, Carl Zeiss, Germany) com o instrumento igualmente regulado para todas as análises, também na avaliação da hemolinfa quando necessário.

4.4.2 - Métodos estatísticos

Medidas de dispersão dos valores obtidos pela execução dos experimentos foram estudadas pela Análise de Variância para Dois Fatores (ANOVA); prosseguiu-se com o Teste de Dunnett para estimativa do contraste entre valores médios (Piedrabuena, 1996). Curvas de Correlação e de Regressão (linear, quadrática e / ou cúbica) foram elaboradas para complementar as outras análises feitas (Minitab for Windows – MiniTab Inc., State College, PA - USA). Gráficos foram traçados visando melhor determinar, juntamente com as tabelas de dados, os resultados e suas abrangências.

4.4.3 - Métodos eletroforéticos

A composição de proteínas do material sob análise foi avaliada por cromatografia em gel de sulfato-poliacrilamida 8 - 10% (SDS-PAGE) como descrito por Laemmli (1970). A coloração dos géis variou de acordo com o requisito experimental (Bradford, 1976; Miedel; Hulmes; Pan, 1989; Acree; Snoff; Spittstoesser, 1971; Gomes, 1995).

4.5 - Critérios para identificação da morfologia dos propágulos a nível de microscopia

Após transcorrido certo número de horas da inoculação das linhagens nos meios de cultivo, o crescimento das linhagens foi verificado também pelo desenvolvimento associado aos vários níveis de diferenciação. Com o auxílio de microscópio, as diferenças morfológicas dos propágulos contidos nas alíquotas coletadas dos frascos sob experimento puderam ser avaliadas. Todas as observações foram feitas a fresco, por exame direto das amostras sobre lâminas de vidro cobertas com lamínula. Tamanho e desenvolvimento dos propágulos das linhagens foram analisados por comparação com aqueles típicos provenientes dos meios de cultivo usados como referência. Os critérios utilizados para a identificação morfológica dos propágulos se basearam em observações particulares bem como em comunicação pessoal com pesquisadores e em literatura corrente (Alexopoulos; Mims, 1979; Prasertphon; Tanada, 1968; Zacharuk, 1970; Veen, 1968; Cole; Nozawa, 1981).

4.5.1 - Conídios Aéreos

Foram considerados conídios aéreos todas as estruturas originárias por blastoconidiogênese de *Metarhizium anisopliae*. Tamanho e germinação dos fialoconídios típicos das linhagens puderam ser avaliados e tomados como referência após desenvolvimento nos diferentes meios de cultivo considerados como referência.

4.5.2 - Conídios Submersos

Foram considerados conídios submersos as estruturas morfolologicamente semelhantes aos fialoconídios que surgiram no meio de cultura sem que houvesse desenvolvimento de estruturas aéreas; o aparecimento de hifas conidiogênicas submersas também puderam auxiliar na identificação.

4.5.3 – Fragmentos de hifas

Os propágulos considerados como fragmentos foram os que apresentaram estruturas semelhantes a artrosporos.

4.5.4 - Clamidosporos

Foram considerados clamidosporos os propágulos grandes e esféricos, de parede espessa, que se originaram ou da extremidade de hifas (clamidosporos terminais) ou de cadeias (clamidosporos intercalares).

4.5.5 - Propágulos Róseos (“ PR ”)

Foram assim considerados os propágulos pequenos e esféricos que tanto puderam ser observados dentro das hifas como livres em determinados meios de cultivo.

4.6 - Separação dos propágulos

O meio de cultivo para se observar o aparecimento dos propágulos foi filtrado ou em malha de algodão (tipo “Miracloth”) esterilizada e duplamente dobrada ou em camada triplice de gaze esterilizada. Quando necessário, o filtrado foi mantido em agitador orbital (150rpm, 28°C) para o acompanhamento do desenvolvimento dos propágulos aí presentes. Quando o experimento assim o exigiu pôde-se também fazer a aplicação de alíquotas do filtrado (em gotas e posterior espalhamento) em placas contendo meio de cultivo adequado; o armazenamento das placas se deu em estufa regulada para 28°C.

4.7 - Esterilização

Quando houve necessidade, os experimentos foram conduzidos num ambiente esterilizado, a saber, em fluxo laminar vertical. O material em vidro foi lavado, seco em estufa (80°C), devidamente tampado e/ou embalado e posteriormente esterilizado em forno (180°C) ou em autoclave .

A esterilização das soluções e os meios de cultivo a serem utilizados se acham nas descrições dos mesmos.

As expressões “autoclavagem“ e “esterilização em autoclave” se referem à esterilização em vapor úmido sob 1atm de pressão, 121° C, por 20 minutos.

4.8 - Reagentes e soluções

4.8.1 – Solução-estoque de Ácido Lático (10%)

Ácido lático	10mL
Meio MM (item 4.9.1)	até completar 100mL

A solução foi distribuída em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.8.2 - Solução-estoque de Inositol (12%)

Inositol	1,2g
Meio MM (item 4.9.1)	até completar 10mL

A solução foi distribuída em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à autoclavagem. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.8.3 - Solução-estoque de Milhocina ("corn steep liquor")

Volumes aproximados de 100 mL de milhocina (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA, Campinas, SP) foram filtrados em gaze dupla triplamente dobrada e distribuídos em frascos com capacidade volumétrica de 250 mL. Após serem devidamente tampados, os frascos foram esterilizados em autoclave e posteriormente mantidos sob refrigeração a 10°C até o momento do uso.

4.8.4 - Solução-estoque de Aminoácidos

Visando elaborar uma solução contendo os aminoácidos em suas respectivas proporções presentes no meio para Cultura de Células de Insetos (Grace, 1960), combinou-se:

Arginina HCl	0,7g
Ácido Aspártico	0,35g
Asparagina	0,35g
Alanina	0,225g
Ácido Glutâmico	0,6 g
Glutamina	0,6g
Glicina	0,65g
Histidina	2,5g
Isoleucina	0.05g
Leucina	0,075g
Lisina HCl	0,625g
Metionina	0,05g
Prolina	0,35g
Fenilalanina	0,15g
Serina	1,1g
Triptofano	0,1g
Treonina	0,175g

Valina	0,1g
CistinaHCl	0,025g
Tirosina	0,05g
Água destilada	1000mL

A solução, filtrada em membrana esterilizada de éster de celulose com 0,22 μ m de poro (Millipore), foi armazenada em frascos esterilizados tipo Erlenmeyer convenientemente tampados e mantidos sob refrigeração até o momento de uso.

4.8.5 - Solução-estoque de Sulfato de Amônio (100mM)

Sulfato de amônio	667 mg
Meio MM (item 4.9.1)	até completar 50 mL

A solução foi filtrada em membrana esterilizada de éster de celulose com 0,22 μ m de poro (Millipore), colocada em frascos com capacidade volumétrica de 125 mL esterilizados, que foram devidamente tampados. Seguiu-se com o armazenamento refrigerado em 10 °C até o momento do uso.

4.8.6 - Solução-estoque de Glicose

Glicose	740g
Água destilada	até completar 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N ou com HCl 1N. A solução foi distribuída em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à autoclavagem. Seguiu-se com o armazenamento refrigerado em 10°C até o momento do uso.

4.8.7 - Solução-estoque de Colágeno (10%)

Colágeno em pó	2g
----------------	----

Meio MM (item 4.9.1)	até completar 20mL
----------------------	--------------------

A solução de colágeno (Ao Farmacêutico, Farmácia de Manipulação; Campinas, SP) foi filtrada em membrana esterilizada de éster de celulose com 0,22 µm de poro (Millipore), colocada em frascos esterilizados que foram devidamente tampados. Seguiu-se com o armazenamento refrigerado em 10 °C até o momento do uso.

4.8. 8 - Solução-estoque de Gelatina (10%)

Gelatina em pó	2g
Meio MM (item 4.9.1)	até completar 20mL

A gelatina usada (Ao Farmacêutico, Farmácia de Manipulação; Campinas, SP), foi incolor e isenta de açúcar. A solução foi distribuída em frascos devidamente tampados, seguiu-se com a esterilização em autoclave e posterior armazenamento refrigerado em 10 °C até o momento do uso.

4.8.9 - Solução-estoque de Vitaminas

Ácido nicotínico	100mg
Ácido para-aminobenzóico	10mg
Tiamina	50mg
Biotina	0,2mg
Cloridrato de Piridoxina	50mg
Riboflavina	100mg
Água destilada	até completar 100mL

A solução foi distribuída em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave. Seguiu-se com o armazenamento refrigerado em 10°C até o momento do uso.

4.8.10 - Solução-estoque de Lecitina de Soja (25%)

Lecitina de soja (pó)	5g
Meio MM (item 4.9.1)	até completar 20mL

De acordo com o requisito experimental a solução de lecitina de soja (Nova Natural Farmácia de Manipulação Ltda.; Campinas, SP) foi distribuída em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave, ou foi filtrada em membrana esterilizada de éster de celulose com 0,22 μm de poro (Millipore), distribuída em frascos esterilizados que foram devidamente tampados. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.8.11 - Solução Salina

NaCl	8,5g
Água destilada	até completar 1000mL

A solução foi distribuída em frascos que , após serem devidamente tampados, foram esterilizados em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.8.12 - Solução-estoque de Tiamina

Tiamina	50mg
Água destilada	até completar 100mL

A solução distribuída em frasco devidamente tampado foi esterilizada em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.8.13 - Solução-estoque de Piridoxina

Cloridrato de Piridoxina	50mg
Água destilada	até completar 100mL

A solução distribuída em frasco devidamente tampado foi esterilizada em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.8.14 - Solução-estoque de Ácido para-Aminobenzóico (PABA)

PABA	10mg
Água destilada	até completar 100mL

A solução distribuída em frasco devidamente tampado foi esterilizada em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.8.15 - Soluções e procedimento para obtenção de metil-Viologen Reduzido (MVH) - (Skyring, Trudinger, 1972)**• Solução de TRIS.HCl 1M**

TRIS	3,63g
Água destilada	até completar 30mL
Ajustou-se o pH para 6,8 com HCl.	

• Solução de Sulfato de Ferro 20mM

FeSO ₄ .7H ₂ O	168,8mg
Água destilada	até completar 30mL

• **Solução de Ácido Nítrico 2M**

HNO ₃	0,77mL
Água destilada	até completar 5mL

Esta solução necessita de cuidadoso manuseio em capela de exaustão.

• **Redução do metil-Viologen**

Solução TRIS.HCl 1M	3,3mL
Solução de FeSO ₄ .7H ₂ O	3,3mL
Metil viologen (MV)	0,0396g
Água destilada	até completar 33mL

Foi borbulhado N₂ gasoso livre de oxigênio. Aproximadamente 1g de limalha de ferro foi limpa com a Solução de HNO₃, e o recipiente foi imediatamente tampado. Após 5-15 minutos de suave agitação, o MV reduzido (MVH) deverá aparecer em cor azul-violeta.

4.8.16 - Anticoagulante para a Hemolinfa

(Cold-Buffered Insect Saline – BIS)

HEPES	50mM
NaCl	130mM
KCl	5mM
CaCl ₂	20mM
Mg Cl ₂	5mM
Citrato de Na	10mM
Água Destilada	até completar 100mL

Após o ajuste do pH para 6,5 a solução foi submetida à esterilização em membrana esterilizada de éster de celulose com 0,22 µm de poro (Millipore) e colocada

em frasco esterilizado que foi devidamente tampado. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10 °C até o momento do uso.

4.8.17 - Tampão Fosfato 0,1M

KH ₂ PO ₄	0,1M
Água destilada	até completar 1000mL

O pH foi acertado para 7,0 seguindo-se com a esterilização em autoclave. O tampão foi então mantido sob refrigeração a 10°C até o momento de uso.

4.8.18 - Composição da Milhocina ("Corn Steep Liquor")

Alistou-se abaixo os compostos existentes na milhocina ("corn steep liquor") e suas respectivas concentrações aproximadas:

Água	55,0%
Ácido Lático	10,0%
Óleo	1,0%
Proteína	22,0%
Cinzas	4,5%
Açúcares Redutores	4,0%
Solúveis	3,0%
Carboidratos	7,5%

AMINOÁCIDOS:

Alanina	1,8%
Arginina	1,1%
Ácido Aspártico	1,4%
Cistina	0,8%
Ácido Glutâmico	3,5%

Treonina	0,9%
Glicina	1,1%
Histidina	0,7%
Isoleucina	0,7%
Leucina	2,0%
Lisina	0,8%
Triptofano	0,05%
Metionina	0,5%
Fenilalanina	0,8%
Prolina	2,0%
Serina	1,0%
Tirosina	0,5%
Valina	1,2%

VITAMINAS:

Biotina	0,3mg/kg
Colina	3500mg/kg
Inositol	6000mg/kg
Niacina	80mg/kg
Ácido Pantotênico	15mg/kg
Piridoxina	9mg/kg
Riboflavina	6mg/kg
Tiamina	3mg/kg

MINERAIS:

Cálcio	0,14%
Cobre	15mg/kg
Manganês	20mg/kg
Ferro	100mg/kg
Magnésio	0,6%
Potássio	2,8%

Sódio	0,1%
Fósforo	1,8%
Selênio	0,3mg/kg
Zinco	60mg/kg
Enxofre	0,6%

4.9 - Meios de cultivo

4.9.1 - Meio Mínimo Líquido (MM)

(Pontecorvo et al., 1953)

NaNO ₃	6 g
KCl	0,52 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,52 g
KH ₂ PO ₄	1,52 g
Glicose	10 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	traços
ZnSO ₄ .7H ₂ O	traços
Água destilada	até completar 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N ou com HCl 1N. O meio de cultura foi distribuído em frascos de capacidade volumétrica igual a 250 mL, tampados e levados à esterilização em autoclave. Os frascos foram, então, mantidos sob refrigeração a 10°C até o momento de uso.

4.9.2 - Meio Mínimo Sólido (MMS)

(Pontecorvo et al., 1953)

Ao meio mínimo líquido, antes de ser esterilizado, foram acrescentados 15 g de ágar quando houve a necessidade de que este meio seja sólido. Os frascos foram, então, mantidos sob refrigeração a 10°C até o momento de uso.

4.9.3 - Meio Mínimo sem Glicose (MM)

Do meio mínimo líquido (item 4.9.1) foi retirada a glicose antes do ajuste do pH, que posteriormente foi acertado para 6,8 com NaOH 2N ou com HCl 1N. O meio de cultura foi distribuído em frascos de capacidade volumétrica igual a 250 mL tampados e levados à esterilização em autoclave. Os frascos foram então mantidos sob refrigeração a 10°C até o momento do uso.

4.9.4 - Meio Mínimo com Suplemento Nutricional para Auxotrofia:

4.9.4.1 - Meio Mínimo Líquido com Suplemento (MM⁺)

Ao MM (item 4.9.1) foi acrescentado 0,05 mL da Solução de Ácido para-aminobenbóico (item 4.8.16), ou 0,05 mL da Solução de Tiamina (item 4.8.12), ou 0,05 mL da Solução de Piridoxina (item 4.8.13) por frasco, no momento do uso.

4.9.4.2 - Meio Mínimo Sólido com Suplemento (MMS⁺)

Ao MMS (item 4.9.2), foi acrescentado 0,05 mL da solução de ácido *para*-aminobenbóico, ou 0,05 mL da solução de tiamina, ou 0,05 mL da solução de piridoxina, por placa no momento do uso (itens 4.8.12, 4.8.13, 4.8.14).

4.9.5 Meio Mínimo com Suplemento Nutricional para Auxotrofia e sem Glicose

Do Meio MM⁺ foi retirada a glicose antes da esterilização.

4.9.6 - Meio Completo Líquido (MC)

Ao MM (item 4.9.1) foram acrescentados os seguintes reagentes:

Peptona de caseína	2 g
Extrato de levedura	0,15 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1,0 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N ou com HCl 1N. O meio de cultura foi distribuído em frascos de capacidade volumétrica igual a 250 mL tampados e levados à esterilização em autoclave. Os frascos foram, então, mantidos sob refrigeração a 10°C até o momento de uso

4.9.7 - Meio Completo Sólido (MCS)

(Pontecorvo et al., 1953)

Ao meio completo líquido (MC), antes de ser esterilizado, foram acrescentados 15 g de ágar quando houve a necessidade de que este meio seja sólido. Os frascos foram então mantidos sob refrigeração a 10°C até o momento do uso.

4.9.8- Meios com Farinha de Milho e/ou " Corn Meal Agar "

4.9.8.1- Meio com Farinha de Milho (FM)

Farinha de milho	35g
------------------	-----

Água destilada	até completar 1000mL
----------------	----------------------

O meio assim preparado foi deixado em repouso por 1h, com eventual agitação. Seguiu-se com a filtração em filtro de tecido, ajuste do pH para 6,8 com NaOH 2N ou HCl 1N e distribuição em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10 °C até o momento do uso.

4.9.8.2- Meio com "Corn Meal Agar" (CM)

Corn meal agar (SIGMA)	17g
Água destilada	até completar 1000mL

O meio assim preparado foi deixado em repouso por 1h, com eventual agitação. Seguiu-se com a filtração em filtro de tecido, ajuste do pH para 6,8 com NaOH 2N ou HCl 1N e distribuição em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10 °C até o momento do uso.

4.9.8.3- Meio com Glicose e com Farinha de Milho ou "Corn Meal Agar" (GliFM; GliCM)

Alíquotas de 1mL do Meio com Farinha de Milho bem como do Meio Com "Corn meal Agar" foram combinadas com 18mL de meio com 35g/l de glicose em um volume final de 20mL. Procedeu-se, no momento do uso, com a distribuição em frascos esterilizados.

4.9.9 - Meios com Fosfolipídeos

4.9.9.1 - Meio com Fosfolipídeos (I)

Gema de ovo cozida	1g
MM	até completar 100mL

A gema de ovo foi acrescentada a 100 mL do meio MM no momento do uso. O recipiente onde se deu a mistura foi devidamente agitado, e serviu como fonte para obtenção de alíquotas distribuídas posteriormente em outros frascos.

4.9.9.2 - Meio com Fosfolipídeos (II)

No momento do uso, 2mL de gema de ovo crua foram acrescentados ao MM totalizando um volume final de 100mL. O meio foi filtrado em membrana esterilizada de éster de celulose com 0,22 µm de poro (Millipore) e colocado em frascos esterilizados que foram devidamente tampados.

4.9.10 - Meios com Extrato de Levedura e Glicose

Em todos os três meios alistados abaixo o pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N ou HCl 1N e seguiu-se com a distribuição em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.9.10.1 - Meio YG

Extrato de levedura	20g
Glicose	diferentes concentrações
Água destilada	até completar 1000mL

A glicose foi adicionada para se ter concentrações finais de 1%, 2%, 4%, 6%, 8% e 10%.

4.9.10.2 - Meio YGSal

Ao Meio YG com 1% de glicose acrescentou-se os sais presentes no meio MM (item 4.9.1).

4.9.10.3 - Meio VitGSal

Do Meio YG foi retirado o extrato de leveduras e acrescentadas as vitaminas e os sais presentes no meio MC (item 4.9.6).

4.9.11- Meios com Extrato de Levedura e sem Glicose

4.9.11.1- Meio YSal

Do Meio YG (item 4.9.10.1) foi retirada a glicose e acrescentados os sais presentes no meio MC (item 4.9.6). O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N ou HCl 1N e seguiu-se com a distribuição em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.9.11.2- Meio YSacarose

Do Meio YG (item 4.9.10.1) foi retirada a glicose e acrescentada sacarose na mesma proporção. O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N ou HCl 1N e seguiu-se com a distribuição em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.9.12 - Meio Ágar-Nutriente

Extrato de carne seca	3g
Peptona de caseína	5g
NaCl	1g
Ágar	15g
Água destilada	até completar 1000mL

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 2N ou HCl 1N e seguiu-se com a distribuição em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.9.13 - Meio CS

Com base no meio descrito por Adamek (1965), a composição do Meio CS foi a que se segue.

No momento do uso, alíquotas da Solução de Milhocina (item 4.8.3) foram adicionadas ao meio MM ou aos meios MM⁺, a fim de se obter concentrações finais de 1%, 3%, 5%, 7%, e de 10%, de acordo com o requisito experimental.

Ao meio líquido CS, antes de ser esterilizado, foram acrescentados 15 g de ágar quando houve a necessidade de que este meio fosse sólido. Os frascos foram então mantidos sob refrigeração a 10°C até o momento de uso.

4.9.14 - Meio com Cloreto de Sódio

NaCl	9,2g
Meio MM (item 4.9.1)	até completar 1000mL

Cerca de 1/2 do volume teve seu pH acertado para 4,5 e o volume restante teve seu pH acertado em 6,8. Seguiu-se com a distribuição em frascos que foram

devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10°C até o momento do uso.

4.9.15 - Meios com Glicose e Peptona

Em todos os dois meios de cultivo abaixo descritos 1/2 do volume teve seu pH acertado para 4,5 e o volume restante teve seu pH acertado em 6,8. Seguiu-se com a distribuição em frascos que foram devidamente tampados e submetidos à esterilização em autoclave. O armazenamento se deu sob refrigeração em 10 °C até o momento do uso.

4.9.15.1 - Meio Glicose-Peptona (GP I)

Glicose	20g
Peptona de caseína	10g
Água destilada	até completar 1000mL

4.9.15.2 - Meio Glicose-Peptona Concentrado (GP II)

Glicose	60g
Peptona de caseína	30g
Água destilada	até completar 1000mL

4.10 - Obtenção de conídios para inoculação em meio de cultivo líquido

Os conídios foram obtidos a partir das linhagens crescidas em placas de Petri contendo MMS ou MMS⁺ (itens 4.9.2 e 4.9.4.2) por cerca de 14 dias, em que esporulação vigorosa for observada. Procedeu-se com delicada retirada dos esporos por alça de platina esterilizada, transferindo-os para frascos contendo solução salina (item 4.8.11); seguiu-se com filtração em camadas múltiplas de gaze esterilizada com o

objetivo de se reter possíveis fragmentos de micélio. Uma alíquota foi daí retirada para a contagem dos conídios em Câmara de Neubauer.

Diluições em solução salina (ou em meio de cultura, quando o experimento assim o exigiu) foram feitas para se obter um número médio inicial de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ conídios por mililitro, que puderam ser utilizados de acordo com o requisito experimental.

4.11 - Inoculação em meio líquido

Dos conídios obtidos (item 4.10), alíquota de 1,0mL foi transferida para frascos tipo Erlenmeyer com capacidade volumétrica de 125mL contendo meio líquido num volume final de 20mL. Os frascos assim inoculados e devidamente tampados puderam ser colocados em agitador orbital a uma temperatura constante de 28°C, numa rotação de 150rpm.

Quando o estado estacionário foi requerido, os frascos foram mantidos em agitador orbital, sem rotação, a uma temperatura constante de 28°C.

Todos os experimentos tiveram início no período noturno do dia, por volta das 22h (Ross, 1979a); sempre um número de no mínimo três repetições foi realizado, salvo quando houve necessidade de outra estratégia, o que foi ressaltado na descrição do experimento.

4.12 - Obtenção de micélio para avaliação de peso da massa seca

Após inoculação em meio líquido (item 4.11) o micélio foi obtido após 24h, 36h, 48h, 60h, 72h de crescimento da linhagem sob tratamento específico (item 4.17). Para tal, procedeu-se com a filtração em filtro de papel (INLAB, tipo 10) previamente tarado (seco e pesado), para todos os frascos, com repetido processo de lavagem com água destilada esterilizada.

O micélio foi submetido à secagem em estufa regulada para 80°C e para se certificar da completa retirada de líquido, foram feitas diversas pesagens do filtro de papel com o micélio. O material foi considerado adequado para avaliação quando as medidas dos pesos se tornaram invariáveis. A diferença entre o peso inicial do filtro de papel seco e o filtro de papel com o micélio seco forneceu o peso seco da massa micelial seca.

Foram coletados os meios de cultura onde se deu o crescimento das linhagens, com o objetivo de serem usados posteriormente para análise. Estes foram armazenados de modo adequado e deixados em -70°C até o momento do uso.

4.13 - Dióxido de carbono gasoso

O dióxido de carbono gasoso utilizado nos experimentos contou com um nível de pureza igual a 99,95% (Liquid Carbonic Industrias S.A; Campinas, SP). Quando foi requerido, o fluxo de CO₂ gasoso permaneceu em 20mL/minuto.

Após um número conveniente de horas, em que 30% dos conídios se acharam germinados, o dióxido de carbono gasoso foi injetado num fluxo constante sendo que os frascos foram mantidos sob agitação de 150rpm, 28°C. Tal tratamento foi dispensado às linhagens em diferentes meios líquidos.

4.14 - Avaliação da quantidade de dióxido de carbono dissolvido

O gasômetro Radiometer ABL System 625 (Laboratório de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas, Universidade Estadual de Campinas, SP) foi utilizado com o objetivo de se avaliar o papel do fluxo de dióxido de carbono e do bicarbonato de sódio na evolução do CO₂, bem como suas influências no pH e na concentração de HCO₃⁻.

4.14.1 – Gasometria para Dióxido de Carbono Gasoso

Em frascos contendo 20mL de MM injetou-se o dióxido de carbono gasoso por diferentes intervalos de tempo, a saber: 10minutos, 1hora, 2horas e 3horas. Os frascos foram também submetidos a 10minutos, 8horas e 24horas de agitação após a injeção do gás. Foram tomados como controle os frascos que não receberam injeção de gás nem estiverem sob agitação. A manutenção e agitação dos frascos se deram como descritas no item 4.11. Visou-se também a escolha do tempo ideal de injeção do gás e obtenção de dados que conduzissem à inferência quanto a influência da agitação nos parâmetros sob observação.

4.14.2 - Gasometria para Bicarbonato de Sódio

Em frascos contendo MM duas diferentes concentrações de bicarbonato de sódio, 7mg/20mL e 14mg/20mL, denominadas respectivamente “GRACE” e “2X GRACE” (Grace, 1960), foram preparadas. Os frascos foram submetidos a distintos intervalos de tempo de agitação, a saber: 10 minutos, 8 horas e 24 horas. Foram tomados como controle os frascos que não receberam bicarbonato nem estiverem sob agitação. A manutenção e agitação dos frascos se deram como descritas no item 4.11.

4.15 - Germinação das linhagens nos meios utilizados como referência

4.15.1 - Germinação em Meio de Cultivo Sólido

Após a obtenção de conídios para inoculação (item 4.10) 0,1mL da solução com conídios foi transferido para placas de Petri contendo de 20mL de meio de cultivo sólido. Seguiu-se com espalhamento das alíquotas nas placas com alça de vidro esterilizada. As placas foram mantidas em estufa regulada para 28°C. Intervalos de duas horas foram dados entre as observações das placas ao microscópio. Cerca de 500

conídios por placa foram avaliados quanto à germinação; foi considerado como conídio germinado aquele que apresentou um tubo germinativo com comprimento aproximado de 50% da medida longitudinal média dos conídios de cada linhagem. Um número mínimo de três repetições para cada meio de cultivo específico foi feito.

4.15.2 - Germinação em Meio de Cultivo Líquido

Após a obtenção de conídios para inoculação (item 4.10), alíquotas de 1,0mL da solução com conídios foram transferidas para frascos tipo Erlenmeyer com capacidade volumétrica de 125mL contendo 19mL de meio de cultivo em diferentes frascos; estes foram mantidos em agitador orbital a 150rpm, sob 28°C. Intervalos de duas horas entre as retiradas de alíquotas dos meios de cultivo foram dados para as observações ao microscópio. Cerca de 500 conídios por frasco foram avaliados quanto à germinação: foi considerado como conídio germinado aquele que apresentou um tubo germinativo com comprimento aproximado de 50% da medida longitudinal média dos conídios de cada linhagem. Foi feito um número de três frascos de repetição para cada meio de cultivo específico.

4.16 - Inoculação das linhagens em meio de cultivo específico desde o início do desenvolvimento

Para meios específicos, o material usado para inoculação das linhagens foi preparado com o próprio meio de cultura (item 4.10). Em todos os casos MC, MM ou MM⁺ (itens 4.9.6, 4.9.1, 4.9.4.1) serviram como meios de cultivo de referência para avaliação de desenvolvimento das linhagens. Os ensaios se deram com os frascos mantidos como descrito no item 4.11. Intervalos de tempo de 12h mostraram-se convenientes para retirada de material (meio de cultura e micélio) que posteriormente foi utilizado para análise de pressão osmótica, pH, peso seco e surgimento de propágulos. Os meios específicos em que se deram as inoculações foram:

4.16.1 – Inoculação em meios com Farinha de Milho e/ou " Corn Meal Agar "

Após a inoculação das linhagens em meio FM, ou CM ou GliCM ou GliFM (itens 4.9.8.1; 4.9.8.2; 4.9.8.3) um volume final de 20mL foi atingido. Procedeu-se, então, como descrito no item 4.11.

Metade dos frascos assim preparados recebeu injeção de dióxido de carbono (item 4.13) após um número conveniente de horas que se seguiu à inoculação dos conídios. Posteriormente os frascos foram novamente submetidos ao procedimento descrito no item 4.11.

4.16.2 - Inoculação em meios com Fosfolipídeos

Gema de ovo foi acrescentada aos meios MM (linhagem E9) e MM⁺ (linhagens auxotróficas), onde se fez a inoculação das linhagens (item 4.11), totalizando um volume de 20mL por frasco. O desenvolvimento das linhagens em meio CS na concentração adequada (item 4.9.13) também foi usado como referência. A seguir procedeu-se como descrito no item 4.11. Este procedimento foi utilizado tanto quando se usou gema cozida como crua (item 4.9.9.1 e 4.9.9.2).

4.16.3 - Inoculação em meios com Extrato de Levedura e Glicose

As linhagens foram inoculadas em meio de cultivo num volume final de 20mL ; a seguir, procedeu-se como descrito no item 4.11. O desenvolvimento das linhagens em Meio CS na concentração adequada (item 4.9.14) também foi usado como referência .

4.16.4 - Inoculação em meios com Extrato de Levedura e sem Glicose

As linhagens foram inoculadas em meio de cultivo num volume final de 20mL; a seguir procedeu-se como descrito no item 4.11. O desenvolvimento das linhagens em Meio CS na concentração adequada (item 4.9.13) também foi usado como referência .

4.16.5 - Inoculação em meio com Lecitina de Soja

Alíquotas da solução de lecitina de soja (item 4.8.10) foram adicionadas ao meio MM (linhagem E9) ou ao meio MM⁺ (linhagens auxotróficas) para se obter concentrações finais de 0,5%, 1%, 3% e 5%. As linhagens foram inoculadas nos meios assim obtidos totalizando um volume de 20mL por frasco, e procedeu-se como descrito no item.4.11. Este procedimento foi utilizado tanto quando se usou lecitina autoclavada como filtrada. O desenvolvimento das linhagens em meio CS na concentração adequada (item 4.9.13) também foi usado como referência.

4.16.6 - Inoculação em meio com diversas concentrações de Glicose

Solução de glicose (item 4.8.6) foi acrescentada aos meios MM (linhagem E9) e MM⁺ (linhagens auxotróficas) a fim de se obter concentrações finais de 2%, 4%, 6%, 8% e 10%, onde se fez a inoculação das linhagens em um volume final de 20mL por frasco. A seguir procedeu-se como descrito no item 4.11, sendo que número equivalente aos frascos sob agitação foi deixado em modo estacionário. O desenvolvimento das linhagens em meio CS na concentração adequada (item 4.9.13) também foi usado como referência.

4.16.7 - Inoculação em meio com Colágeno e em Meio com Gelatina

Alíquotas da Solução de Colágeno 10% (item 4.8.7) foram transferidas para frascos contendo MM ou MM⁺, a fim de se obter concentrações finais de 0,5%, 1%, 2% e 3% de colágeno num volume final de 20mL após a inoculação. O desenvolvimento das

linhagens em meio CS na concentração adequada (item 4.9.14) também foi usado como referência. A seguir, procedeu-se como descrito no item 4.11. Este procedimento foi o mesmo adotado ao se usar solução de gelatina 10% (item 4.8.7).

4.16.8 - Inoculação em meios com Glicose e Peptona

Num volume final de 20mL após a inoculação das linhagens em meio de cultivo procedeu-se como descrito no item 4.11. O procedimento foi adotado para os meios GP I e GP II (itens 4.9.15.1 e 4.9.15.2). Nos frascos com meios de cultivo assim preparados as linhagens puderam ser avaliadas quanto ao desenvolvimento.

4.17 - Inoculação das linhagens em meio de cultivo específico e sob tratamento após um número de horas de desenvolvimento

O material usado para inoculação das linhagens foi preparado com meio MM ou MM⁺ (itens 4.11, 4.9.1 e 4.9.4.1), salvo quando o experimento requisitou outro procedimento (que foi descrito quando necessário). Para cada linhagem, após um número conveniente de horas que se seguir à inoculação, a saber, quando cerca de 30% dos conídios foram classificados como germinados (item 4.15.2), deu-se continuidade aos experimentos com os diferentes tratamentos descritos abaixo.

Em todos os casos o desenvolvimento ocorrido ao menos em um dos meios de cultivo MC, MM, MM⁺, CS na concentração adequada serviu como referência (itens 4.9.6, 4.9.1, 4.9.4.1 e 4.9.13). Os ensaios se deram como descrito no item 4.11, e o volume final após o tratamento foi sempre de 20mL por frasco (tipo Erlenmeyer, com capacidade volumétrica de 125mL). Intervalos de tempo de 12h se mostraram convenientes para retirada de material (meio de cultura e/ou micélio) que posteriormente foi utilizado na análise de osmolalidade, pH, peso seco e de surgimento de propágulos. Um número de três repetições por frasco foi tomado como adequado para os experimentos e posterior análise do material coletado. Os tratamentos a que se submeteram as linhagens foram:

4.17.1 - Tratamento com Glicose

Solução de Glicose (4.8.6) foi acrescentada aos meios MM (linhagem E9) e MM⁺ (linhagens auxotróficas) a fim de se obter concentrações finais de 2%, 4%, 6%, 8% e 10%, onde se fez a inoculação das linhagens. Metade dos frascos recebeu injeção de dióxido de carbono (item 4.13) simultaneamente ao tratamento com glicose. A seguir procedeu-se como descrito no item 4.11.

4.17.2 - Tratamento com Ácido Láctico

Aliquotas da solução de ácido láctico (item 4.8.1) foram retiradas e transferidas para os frascos a fim de que suas concentrações finais se igualem a 0,1%, 0,3%, 0,5%, 0,7% e 1%. O desenvolvimento das linhagens em meio de cultivo CS (item 4.9.13) com concentrações de 1%, 3%, 5%, 7% e 10% de milhocina também serviram como referência. Procedeu-se, então, como descrito no item 4.11

4.17.3 - Tratamento com Ácido Clorídrico 2N

Após a titulação de HCl 2N em meio MM e em água destilada, aliquotas convenientemente diferentes foram transferidas para os frascos sob tratamento. O desenvolvimento das linhagens em meio de cultivo CS (item 4.9.13) com concentrações de 1%, 3%, 5%, 7% e 10% de milhocina também foi utilizado como referência. Procedeu-se, então, como descrito no item 4.11.

4.17.4 - Tratamento com Milhocina

Aliquotas da solução de milhocina (item 4.8.3) foram transferidas para diferentes frascos contendo linhagens inoculadas em meio MM ou em meio MM⁺, em que concentrações finais de 1%, 3%, 5%, 7% e 10% puderam ser obtidas. Procedeu-se então como descrito no item 4.11.

A linhagem E9 foi inoculada em placas com meio de cultivo sólido que após 16 horas foram cobertas com meio líquido e montadas de acordo com o quadro abaixo a fim de ser observar o desenvolvimento do fungo. Os meios CS apresentaram uma concentração adequada de milhocina; os tratamentos I, II e III serviram como controle. As placas foram transportadas para estufa regulada em 28° C para serem posteriormente analisadas; amostras do meio líquido foram tomadas a fim de se verificar a produção de propágulos.

Quadro 4.3 – Distribuição de meios de cultivo sólido e líquido em placas de Petri para a observação do desenvolvimento da linhagem E9

Tratamento	Meio de cultivo sólido	Meio de cultivo líquido
I	MM	–
II	CS	–
III	MC	–
IV	MM	MM
V	MM	CS
VI	CS	MM
VII	CS	CS

4.17.5 - Tratamento com Inositol

Transferiu-se para os frascos sob tratamento, alíquota da solução de inositol (item 4.8.2) visando obter uma concentração final de 0,3%. Procedeu-se, então, como descrito no item 4.11

4.17.6 - Tratamento com Aminoácidos

Alíquotas da Solução de Aminoácidos (item 4.8.4) foram transferidas para diferentes frascos a fim de se obter uma concentração final de 1%. Procedeu-se, então, como descrito no item 4.11.

4.17.7 - Tratamento com Sulfato de Amônio

Alíquotas da Solução de Sulfato de Amônio (item 4.8.5) foram transferidas para diferentes frascos, a fim de se obter tanto uma concentração final de 5mM como 25mM. Procedeu-se, então, como descrito no item 4.11.

4.18 - Avaliação do pH e da osmolalidade de diversos meios de cultivo

Alíquotas de 0,5mL dos diversos meios de cultivo, antes e durante do desenvolvimento das linhagens foram examinadas quanto às variações do pH e da osmolalidade. Para tal usou-se o medidor de pH (ø200 pHmeter, Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, USA) e o osmômetro “Advanced Wide-Range Osmometer 3WII” (Núcleo de Medicina Experimental, Universidade Estadual de Campinas, SP).

4.19 - Cromatografia em gel de sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE)

4.19.1 - Obtenção do Material para Avaliação Qualitativa de Proteínas

O desenvolvimento e crescimento das linhagens nos diversos meios de cultivo e sob diferentes tratamentos foi acompanhado pela avaliação visual dos frascos e placas de Petri, por intermédio de microscopia e também macroscopicamente.

Visando a obtenção de material para análise em eletroforese de proteínas coletou-se amostras tanto do micélio como dos diversos meios de cultura onde se deu o crescimento e desenvolvimento das linhagens (itens 4.16 e 4.17) em frascos além dos

três utilizados para obtenção de micélio para avaliação do peso da massa seca (item 4.12).

O micélio foi submetido à desidratação em liofilizador, sendo posteriormente pulverizado em almofariz sob ação de nitrogênio líquido e tampão fosfato 0,1M (item 4.8.19). Seguiu-se com a centrifugação em 6000rpm, por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recuperado, filtrado e dialisado por 15 horas no mesmo tampão fosfato (item 4.8.17); após a retirada do sobrenadante o material restante foi desprezado. As amostras foram mantidas em microtubos tipo Eppendorf sob -70°C até o momento do uso.

As amostras do meio de cultivo foram dialisadas por 15 horas em tampão fosfato 0,1M e liofilizadas, sendo posteriormente transferidas para microtubos tipo Eppendorf e armazenadas sob -70°C até o momento do uso.

4.19.2 - Quantificação do conteúdo de proteínas das amostras

A concentração do conteúdo de proteínas nos extratos foi estimado pelo Método de Bradford (Bradford, 1976.), sendo que a curva-padrão foi traçada tomando-se albumina bovina cristalizada (BSA, SIGMA Chemical Company) como padrão e o Reagente de Bradford (Azul brilhante de Coomassie G-250) como corante. A concentração de proteínas foi avaliada em comprimento de ondas igual a 595nm em espectrofotômetro (DU Series 70 Spectrophotometer, Beckman Instruments, In., Fullerton, CA, USA).

4.19.3 - Separação de Proteínas pela Massa Molecular

Após a dosagem da concentração de proteínas (item 4.18.2), alíquotas suficientes e convenientes para uma mesma concentração final nas amostras a serem aplicadas nos poços dos géis foram tomadas dos tubos com o material para análise. Seguiu-se com a mistura individual ao tampão de amostra e aplicação em duplicatas nos poços do gel (SDS-PAGE 8-10%). Realizou-se este procedimento tanto para as amostras como para os padrões de proteína adotados. A eletroforese foi executada em corrente

elétrica constante de 20mA e diferença de potencial entre 80V e 100V, após o que os géis foram corados por diferentes processos.

4.19.4 - Coloração dos Géis de Poliacrilamida

Os géis puderam ser submetidos a diferentes processos de coloração, a saber: nitrato de prata (Gomes, 1995), fluorescamine (Miedel; Hulmes; Pan, 1989), CBB-G250 (Bradford, 1976).

4.19.5 - Caracterização Eletroforética da Enzima Sulfito Reductase (NADPH).1.8.1.2 em Extrato Cru utilizando Gel de Poliacrilamida

Após ser submetido à eletroforese (item 4.19.3) o gel foi transferido para um recipiente contendo o MVH (item 4.8.15). Adicionou-se imediatamente 26mg de Na_2SO_3 , seguindo-se com vedação rigorosa do recipiente a fim de se remover traços de O_2 e dissolver o sulfito. O gel foi incubado a 37°C até que possíveis bandas escuras de FeS aparecessem (em cerca de 1-2 horas) e posteriormente foi banhado suavemente com água destilada por diversas vezes até que o MVH clareasse. O gel foi armazenado em uma solução de 1% β -Mercaptoetanol para prevenir a oxidação das bandas de FeS.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Avaliação dos parâmetros de interesse da hemolinfa

Foram analisadas as hemolinfas extraídas de 60 larvas no estágio pré-pupal de *Anastrepha fraterculus*. A avaliação do material coletado forneceu um valor médio de pH igual a 6,7 com o eletrodo do medidor de pH e em torno de 7,0 com papel para medida de pH. A osmolalidade pôde ser estimada em $386 \pm 21 \text{mOsm/kg}$. Estes valores permitiram a elaboração de meios de cultivo que puderam ser controlados quanto a estes dois parâmetros (Woodring, 1985; Miranpuri et al., 1991).

O aparecimento de tipos específicos de propágulos *in vivo* pôde ser influenciado por diferentes fatores incluindo estágio de desenvolvimento e alimentação das larvas bem como estado celular dos conídios inoculados (nível de competência para a indução à diferenciação). Estes fatores também são tidos como importantes para a virulência de linhagens de *Metarhizium anisopliae* (Clarkson; Charnley, 1996), podendo contribuir para a seletividade da produção e dos tipos de propágulos, em nível de constituição da hemolinfa.

A inoculação dos esporos de *Metarhizium anisopliae* nas larvas mostrou-se eficiente visto que a hemolinfa retirada para a avaliação dos propágulos fúngicos apresentou a existência de pelo menos dois tipos destes, a saber, propágulos róseos ("PR") tanto dentro como fora das hifas e fragmentos de hifas.

Assim, a eficiência das linhagens em produzir propágulos quantitativamente e de modo diversificado *in vitro* pôde ser tomada como parcialmente representativa de situações *in vivo*.

5.2 - Identificação e separação dos propágulos

Na obtenção de propágulos, em geral tomados como referência a linhagem selvagem E9, pôde-se notar a variação das dimensões e volumes das estruturas fúngicas. Em função disto, a seleção destas foi possível utilizando os diferentes modos de filtração mencionados (item 4.6) em etapas distintas de um mesmo processo de separação. Este procedimento foi necessário visto que, como descrito posteriormente, houveram meios de cultivo em que mais de um tipo de propágulo pôde ser identificado.

5.2.1 - Identificação dos conídios aéreos

Conídios aéreos típicos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* apresentam comprimento longitudinal dentro dos valores de 3 μ m a 9 μ m (Tulloch, 1976). Pôde-se constatar que os conídios aéreos das linhagens apresentaram comprimento entre 5 μ m e 7 μ m. Fiálides típicas de *Metarhizium anisopliae* puderam ser observadas após cerca de 7 dias de desenvolvimento em meio sólido. Em meio líquido conídios aéreos nem sempre foram observados, o que variou com as condições de cultivo e com a linhagem, como descrito posteriormente (item 5.7). Em função da diferença na prontidão para germinação de cada linhagem (item 5.5), também pôde-se verificar uma variação no tempo para o aparecimento destes propágulos.

5.2.2 - Identificação dos conídios submersos

Em harmonia com comunicação pessoal de R.A. Samson, os conídios considerados submersos neste trabalho foram semelhantes às estruturas denominadas “blastosporos” por alguns autores (Kleespies; Zimmermann, 1992). Estes propágulos, de dimensões nitidamente maiores que os conídios aéreos (comprimento entre 18-23 μ m), tiveram tanto a capacidade de germinar como de dividir; puderam surgir por intermédio de brotamento lateral, de brotamento em extremidade de hifas e, em alguns casos, puderam ser vistos dentro de hifas (figuras 5.29 e 5.31, páginas 161 e 165

respectivamente). Seu aparecimento esteve associado às condições de cultivo (item 5.7). Os conídios submersos apresentaram excelente capacidade de germinação.

5.2.3 - Identificação dos fragmentos

Na fase do desenvolvimento de certos fungos em que ocorre a autólise, a fragmentação de hifas pode ser observada (Griffin, 1994a). Pôde-se verificar que fragmentos de hifas de comprimento variado surgiram no meio de cultivo por estímulo do ambiente: fatores epigenéticos (químicos ou físicos) alteraram o intervalo de tempo para que esta fase de desenvolvimento fosse alcançada, acelerando ou retardando o processo. Como foi possível ser verificado, o dióxido de carbono gasoso e a concentração de certos reagentes podem se incluir entre tais fatores epigenéticos.

Os artrosporos (fragmentos de hifas com comprimento em torno de 15µm) se mostraram eficientes na germinação e desenvolvimento, sendo que o sinergismo entre fatores ambientais influenciaram o surgimento e o desenvolvimento destes corpos hifais, como descrito posteriormente (figura 5.28, página 159).

5.2.4 - Identificação dos Propágulos Róseos (“PR”)

De certo modo, o aparecimento destes tipos de propágulos foi surpreendente considerando que em literatura corrente não se encontra referido a *Metarhizium anisopliae*; no dimorfismo do patógeno humano *Blastomyces dermatitidis* relatou-se estruturas semelhantes (Howard; Herndon, 1970). Os propágulos PR (de diâmetro aproximado de 3µm) foram isolados e plaqueados em meio ágar-nutriente (item 4.9.13), a fim de se certificar quanto à natureza destas estruturas que facilmente poderiam ser assumidas como contaminantes do tipo levedura. Três dias transcorridos após o plaqueamento, observou-se pequenas colônias gelatinosas de cor vermelho-escuro sem qualquer desenvolvimento micelial. Permitiu-se que as colônias atingissem 9 dias de desenvolvimento, após o que o crescimento micelial pôde ser verificado; o micélio apresentou a cor marrom em lugar da cor verde típica da suposta linhagem sob observação, provavelmente devido ao meio de cultivo. Amostras foram tomadas do

micélio, plaqueadas em MC (item 4.9.7), e após dias de desenvolvimento certificou-se tratar da linhagem E9, confirmando o microrganismo de origem dos propágulos.

Estes propágulos puderam ser observados tanto dentro de hifas como livres no meio de cultivo; são capazes de se dividir do modo leveduriforme (figuras 5.29 e 5.30, páginas 161 e 163, respectivamente). Como posteriormente descrito (item 5.7), o surgimento destes propágulos foi confirmado estar associado às condições de cultivo.

5.2.5 - Identificação dos Clamidosporos

Considerados como propágulos que surgem quando as condições são adversas (Zacharuk 1970), clamidosporos foram observados em cadeias como que formando um pseudomicélio (Alexopoulos, 1979; Lingappa; Lingappa, 1969). Clamidosporos livres (com diâmetro aproximado de 10 μ m) e em suposta divisão também foram observados (figura 5.32, página 167), e mostraram-se relacionados com as condições em cultura (item 5.7). Considerando suas dimensões e volumes, bem como a baixa capacidade de germinação, os clamidosporos parecem não ser o tipo ideal de propágulo para a colonização, mas para a fase final do estágio de infecção onde os nutrientes da hemolinfa se esgotam em função do desenvolvimento do fungo e da debilidade do hospedeiro.

Além dos propágulos anteriormente descritos, pôde-se observar filamentos e estruturas semelhantes a esferoplastos, que se mostraram relacionados com a condição de cultivo (figuras 5.28 e 5.30, páginas 159 e 163, respectivamente). Estruturas em forma de filamentos já foram descritas como envolvidas na produção de metabólitos, como glicoamilases e amilases, por *Aspergillus awamori* e por *Aspergillus niger* respectivamente (Gibbs; Senviour; Schmid, 2000). Al-Aidroos; Seifert (1980) também verificaram que em mutantes para morfologia de *Metarhizium anisopliae* a produção de glicoamilase ficou elevada.

5.3 – Gasometria e medida de pH

Visando avaliar o potencial de indução do dióxido de carbono no dimorfismo de *Metarhizium anisopliae* (McIntyre; McNeil, 1998), mostrou-se necessária a escolha de um reagente que pudesse se qualificar como gerador deste composto em meio de cultivo líquido. O reagente gerador deveria tanto manter uma concentração estável do gás como originar medidas de pH que fossem distintamente diferentes daquelas do meio de referência MM. Para tal, o bicarbonato de sódio em duas diferentes concentrações tomadas com base no meio descrito por Grace (1962) para cultura de células de insetos e dióxido de carbono gasoso injetado em diferentes tempos, foram utilizados sob agitação.

Meios de cultivo provenientes dos frascos com concentrações adequadas de bicarbonato de sódio (item 4.14.2) foram analisados quanto à quantidade de dióxido de carbono que permaneceu dissolvido no meio após intervalos de tempo de agitação a que os frascos foram submetidos. Verificou-se que os valores relativos à quantidade de dióxido de carbono dissolvido gerou curvas de regressão com equações $Y=0,300667 + 4,14E-04X - 2,31E-04X^{**2}$ (coeficiente de correlação igual a 0,619 para o meio GRACE) e $Y=0,420547 - 5,89E-03X + 4,93E-06X^{**2}$ (coeficiente de correlação igual a 0,799 para o meio 2XGRACE).

Tabela 5.1 – Valores médios relativos às concentrações de CO₂ (em mmol/L) em meios de cultivo com bicarbonato de sódio após intervalos de tempo de agitação

Meio de cultivo	Tempo de Agitação			
	0 minuto	10 minutos	8 horas	24 horas
MM	0,1689	0,1689	0,1689	0,1689
GRACE	0,244	0,359	0,2874	0,1778
2XGRACE	0,460	0,379	0,375	0,2819

Como esperado, meios de cultivo contendo bicarbonato de sódio deveriam ter o pH alterado em relação ao meio sem o reagente. A Tabela 5.2 apresenta os valores médios que retratam a evolução do pH em função da concentração do bicarbonato de sódio no meio. As curvas de regressão puderam ser traduzidas nas equações $Y=6,67038 + 9,13E-02X - 3,76E-03X^{**2}$ (com coeficiente de correlação igual a 1,000 para o meio GRACE) e $Y=6,88036 + 7,56E-02X - 2,72E-03X^{**2}$ (com coeficiente de correlação igual a 0,562 para o meio 2XGRACE).

Tabela 5.2 – Valores médios relativos ao pH em meios de cultivo com diferentes concentrações de bicarbonato de sódio

Meio de cultivo	Tempo de Agitação			
	0 minuto	10 minutos	8 horas	24 horas
MM	6,51	6,51	6,51	6,51
GRACE	6,666	6,691	7,160	6,695
2XGRACE	7,100	6,667	7,318	7,127

Considerando que o valor médio da concentração de dióxido de carbono dissolvido no meio de cultivo de referência MM foi de 0,1689mmol/L, os valores referentes às concentrações do CO₂ mostraram diferença pouco adequada aos requisitos dos experimentos, sendo um dentre eles a necessidade de contraste em relação ao MM. A instabilidade da quantidade de CO₂ dissolvido (ênfatizada pelos baixos valores para os coeficientes de correlação) e a proximidade dos valores do pH em relação ao MM (que foi de 6,5), deram evidência da inadequação do uso de bicarbonato de sódio como gerador de dióxido de carbono.

O uso do dióxido de carbono gasoso como gerador de CO₂ dissolvido foi avaliado a partir de meios de cultivo provenientes dos frascos que receberam a injeção de dióxido de carbono gasoso durante 10 minutos, 1 hora, 2 horas ou por 3 horas, e foram posteriormente agitados por diferentes intervalos de tempo. Apresentou-se na Tabela 5.3 os valores médios resultantes desta avaliação.

O dióxido de carbono gasoso também mostrou alterar os valores do pH do meio de cultivo, como mostrado pela Tabela 5.4. Entretanto, como evidenciado pela análise de variância dos valores obtidos para o pH, as diferenças entre estes foi casual.

Tabela 5.3 – Valores médios da concentração de dióxido de carbono dissolvido em meio de cultivo (em mmol/L) submetido a diferentes intervalos de tempo de borbulhamento com CO₂ e agitação

Tempo de borbulhamento	Tempo de agitação			
	0 minuto	10 minutos	8 horas	24 horas
0 minuto	0,1689	–	–	–
10 minutos	–	15,248	17,499	16,555
1 hora	–	18,846	19,688	19,825
2 horas	–	17,496	21,031	23,00
3 horas	–	20,229	20,652	20,15

Tabela 5.4 – Valores médios relativos ao pH em meio de cultivo submetido a diferentes tempos de borbulhamento com CO₂ e agitação

Tempo de borbulhamento	Tempo de Agitação			
	0 minuto	10 minutos	8 horas	24 horas
0 minuto	6,51	–	–	–
10 minutos	–	5,297	5,526	5,279
1 hora	–	5,205	5,186	5,183
2 horas	–	5,255	5,188	5,199
3 horas	–	5,209	5,200	5,227

Assim, a avaliação da quantidade de dióxido de carbono dissolvido mostrou que há diferença na disponibilidade do gás no meio de cultivo em função do reagente

utilizado como gerador (dióxido de carbono gasoso ou bicarbonato de sódio), o que está em acordo com McIntyre; McNeil (1997a, b). O dióxido de carbono gasoso mostrou-se adequado para ser usado como gerador de CO₂ devido às diferenças entre os valores de concentrações do gás serem mais contrastantes em relação ao MM do que os valores obtidos com bicarbonato de sódio. Somou-se a isto o fato de que o gás pôde manter valores de pH e concentração mais estáveis do que o bicarbonato de sódio. Optou-se, portanto, pelo tempo de 10 minutos de borbulhamento com o gás, por ser conveniente e satisfatório.

5.4 - Influência de aditivos na osmolalidade dos meios de cultivo

O potencial de água é um parâmetro importante para o desenvolvimento da maioria dos fungos, visto que, à semelhança de outros organismos, requerem água como solvente em altas concentrações (Jackson et al., 1997). Além disto, as atividades enzimáticas não podem ocorrer na ausência de água, sendo fundamental para a interação do microrganismo com o ambiente no qual existe. Considerando que a morfologia de estruturas celulares fúngicas pode ser influenciada tanto pelo potencial genético como pelo ambiente no qual estas estruturas se desenvolvem (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000), e que propágulos de *Metarhizium anisopliae* encontrados participando do processo de colonização da hemolinfa de insetos exibem certa especificidade quanto à morfologia (Clarkson; Charnley, 1996), buscou-se obter meios de cultivo com valores de osmolalidade próximos ao daquele para a hemolinfa de referência (item 5.1) por meio de compostos e reagentes como glicose, dióxido de carbono gasoso e milhocina.

5.4.1 - Glicose como aditivo

A glicose, fonte de carbono bastante utilizável por muitos microrganismos, pode atuar como fator nutricional responsável pela formação de conídios ou pela indução de formação de conidióforos em fungos (Griffin, 1994c; Ronne, 1995). Sua disponibilidade no ambiente, bem como a habilidade do fungo em utilizá-la, pode

influenciar no desenvolvimento do microrganismo. Em função disto, a glicose como gerador de osmolalidade foi avaliada em alguns meios de cultivo.

Como mostra a Figura 5.1, um aumento significativo na osmolalidade do meio pode ser visto em relação à concentração de glicose.

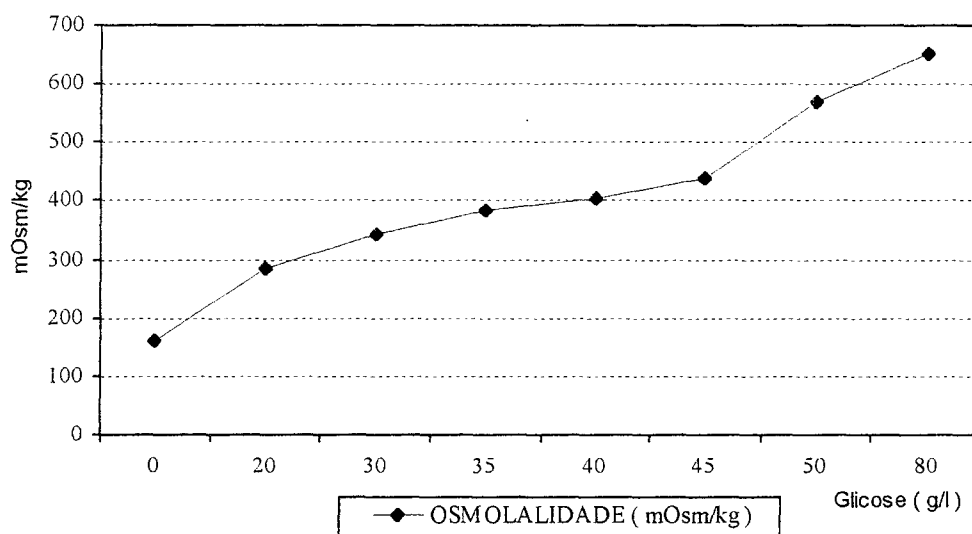


Figura 5.1 – Influência da concentração de glicose na osmolalidade do meio MM

Nota-se, portanto, que uma concentração final de glicose em torno de 35g/l deve gerar uma osmolalidade próxima daquela existente na hemolinfa utilizada como referência (item 5.1), servindo como reagente quando a osmolalidade for requisito necessário.

5.4.2 - Dióxido de carbono gasoso como aditivo

Considerado como indutor de dimorfismo em *Mucor rouxii* (Bartinicki-Garcia; Nickerson, 1962) e *Candida albicans* (Sims, 1986), o dióxido de carbono pode participar no desenvolvimento de esporo como sinal ambiental para muitos deuteromicetos (Griffin, 1994c). A reprodução de fungos septados é dependente, em grau variado, da quantidade de oxigênio do ambiente, sendo que o dióxido de carbono pode participar da

indução e controle da reprodução e/ou crescimento vegetativo (Cooke; Whipps, 1993a); já a hemolinfa de insetos, de modo variado exibe certo grau de disponibilidade de oxigênio e de dióxido de carbono, que juntamente com outros fatores pode influir no desenvolvimento dos microrganismos que ali venham a se alojar (Butt; Goettel, 2000).

Mostrou-se, pois, conveniente avaliar brevemente a influência do dióxido de carbono gasoso no desenvolvimento e crescimento de algumas linhagens de *Metarhizium anisopliae*. O dióxido de carbono gerado pela injeção do gás foi inicialmente analisado quanto à sua potencialidade em alterar a osmolalidade dos meios de cultivo onde foi requerido como tratamento. Utilizando inóculo de conídios da linhagem selvagem E9 de *Metarhizium anisopliae* pôde-se acompanhar a evolução dos valores da osmolalidade em diferentes momentos do desenvolvimento do microrganismo.

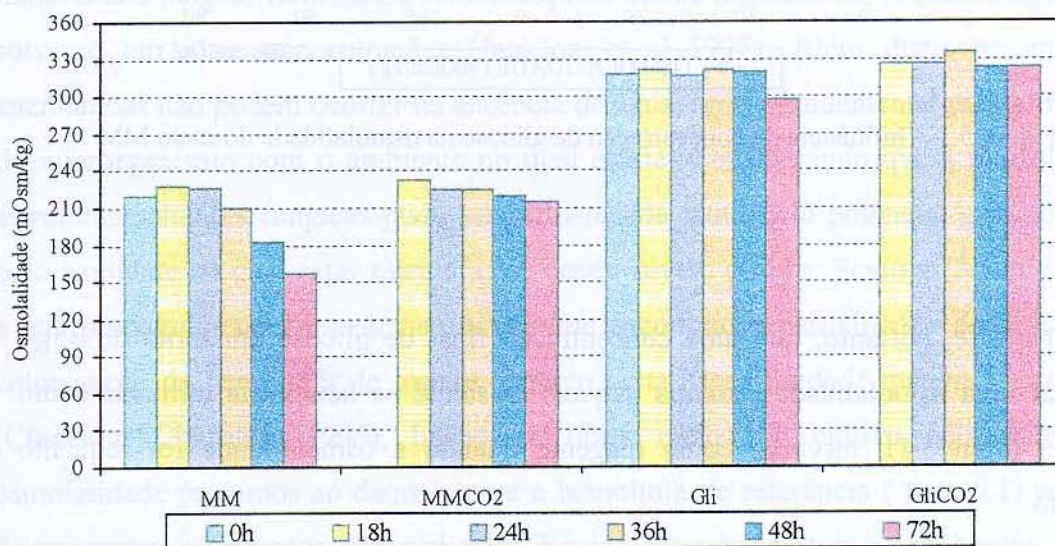


Figura 5.2 – Valores médios da osmolalidade de três repetições de meios de cultivo líquidos sob influência do tratamento com dióxido de carbono gasoso

Valores médios se acham representados na Figura 5.2 que mostra a influência do gás na osmolalidade em meios de cultivo MM e MM com glicose numa concentração tal que a osmolalidade inicial fosse próxima daquela da hemolinfa (item 5.1).

A análise de variância dos valores obtidos, seguida pelo Teste F ($F=99,84$), mostrou que para o meio de cultivo MM o gás foi efetivamente influente como tratamento apenas após 36 horas de desenvolvimento. Considerando que em função da ação do dióxido de carbono retardar o desenvolvimento da linhagem permitindo apenas um discreto aumento de peso micelial (item 5.6), a relativa estabilidade dos valores para a osmolalidade pode ser explicada pela restrita interação das células fúngicas com o meio de cultivo, levando-o a apresentar valores pouco alterados para a osmolalidade. Esta restrição ao desenvolvimento imposta pelo dióxido de carbono, portanto, poderia fazê-lo passar como um osmoregulador se os valores para a osmolalidade fossem analisados independentemente do peso micelial. Pode-se notar que os valores médios para a osmolalidade do meio MM decaem a partir de 24 horas de desenvolvimento, enquanto que no meio MM com CO₂ um discreto decréscimo é notado em torno de 72 horas; a utilização do meio de cultivo em função da adaptação da linhagem a esta situação adversa pode, portanto, explicar este resultado.

Quando a glicose foi acrescida ao meio MM, um aumento dos valores médios para a osmolalidade era esperado, sendo que o efeito sinérgico do gás como reagente foi discreto e ligeiramente eficaz em 72 horas de desenvolvimento. Novamente, o aparente efeito osmoregulador do gás se explica, conforme o item 5.6, à sua influência na produção de massa micelial visto que um número inferior de células fúngicas interagiu quantitativamente em menor grau com o meio de cultivo pouco alterando a osmolalidade deste.

5.4.3 - Milhocina como aditivo

A milhocina é um composto frequentemente utilizado em meios de cultivo para estimular a resposta dimórfica em fungos como *Candida albicans* (Larone, 1995) sendo também usado para avaliação do desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* (Adamek, 1965; Butt; Goettel, 2000). Em vista disto e pela riqueza de sua composição, a milhocina teve analisada sua influência na osmolalidade do meio de cultivo antes de ser usada como tratamento. O seu acréscimo gradual aos meios gerou valores de osmolalidade que são apresentados na Figura 5.3 como representativos de médias de repetições.

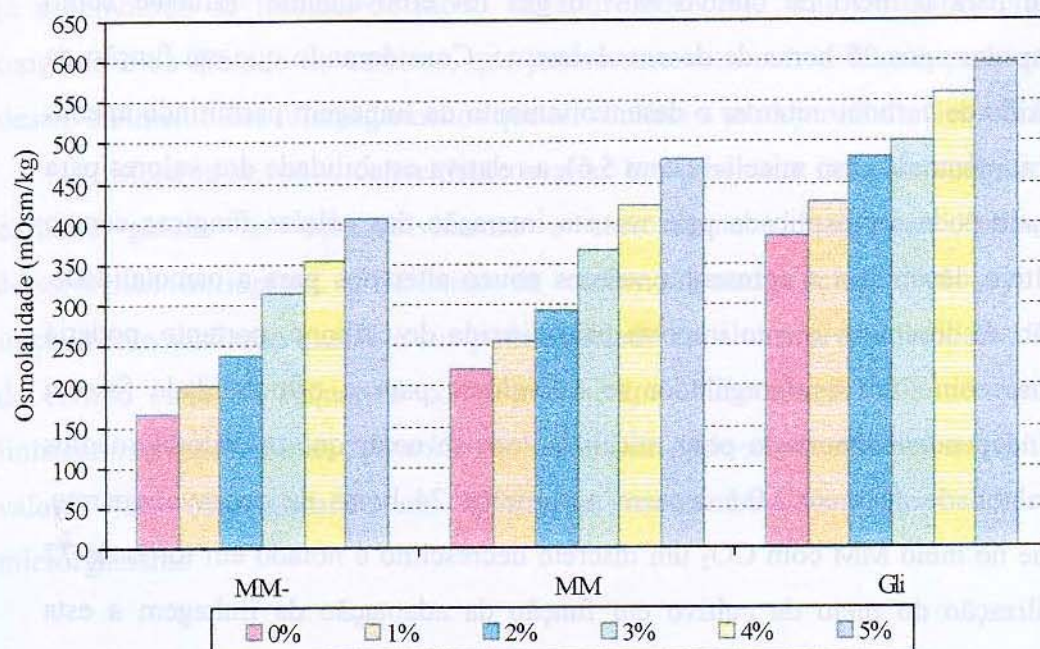


Figura 5.3 – Valores médios de osmolalidade de três repetições de meios de cultivo líquidos sob influência de diferentes concentrações de milhocina

Os meios MM⁻ (sem glicose), MM (com 10g/l de glicose) e Gli (MM acrescido de com 25g/l de glicose) foram analisados sob influência de concentrações diversas de milhocina. Concluiu-se que para reproduzir aproximadamente a osmolalidade da hemolinfa poder-se-ia optar por uma concentração final de 5%, 4% ou de 1% de milhocina nos respectivos meios. Observou-se que o composto atuou de modo cooperativo à glicose apesar de a influência na osmolalidade ser mais significativa quanto menor a quantidade de glicose no meio. Assim, uma concentração de 4% de milhocina gerou um aumento de osmolalidade de 45% no meio Gli, 90% no meio MM e 115% no meio MM⁻, como mostra a Figura 5.4.

Com base nestes resultados, a milhocina foi utilizada de modo a se adequar aos requisitos experimentais.

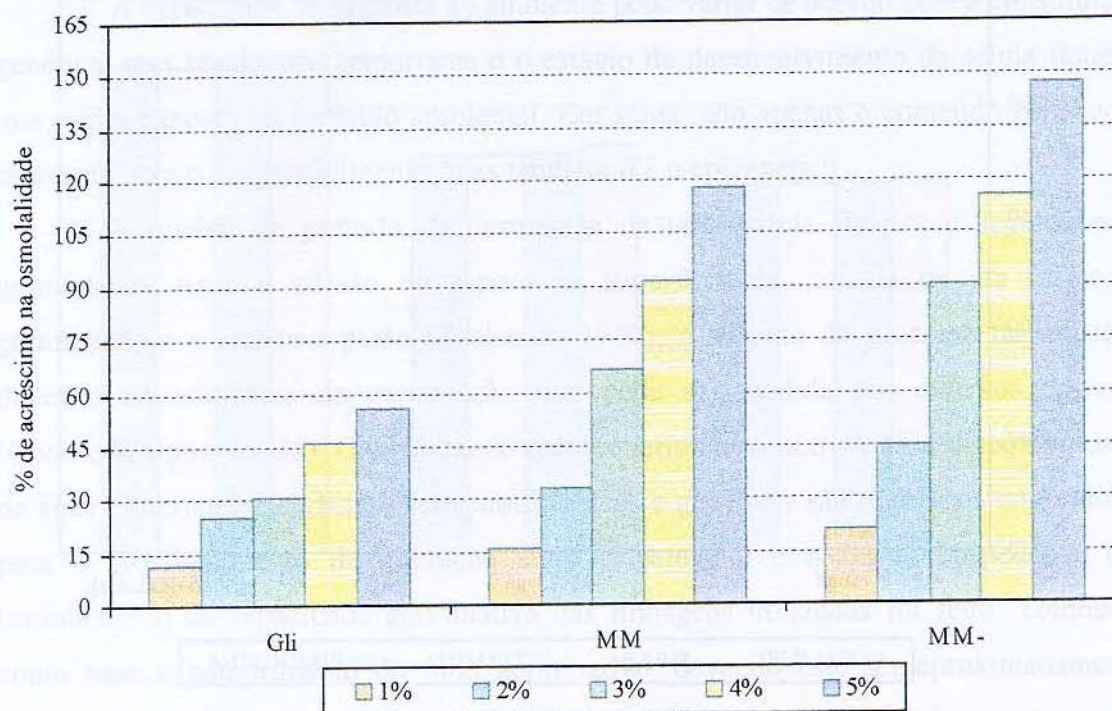


Figura 5.4 – Porcentagem de acréscimo na osmolalidade dos meios de cultivo líquidos em função da quantidade de melhócina adicionada

5.4.4 - Suplementos para auxotrofia como aditivos

Considerando que linhagens mutantes deficientes para vitaminas foram usadas em determinados experimentos, tornou-se necessária uma avaliação da influência dos suplementos nutricionais na osmolalidade dos meios de cultivo. Encontra-se na Figura 5.5 os valores médios para as medidas das osmolalidades dos meios de cultivo provenientes dos frascos em repetições. Para tal foram avaliados meios de cultivo em que a concentração de glicose foi de 0g/l (meio MM⁻), 1g/l e 10g/l (MM).

Como pôde ser visto, os suplementos para auxotrofia não apresentaram influência significativa na osmolalidade dos meios de cultivo além daquela prevista quando a glicose foi utilizada como aditivo. Assim, quando requeridos, os meios de cultivo com suplemento (meios MM⁺) puderam também ser tomados como referência.

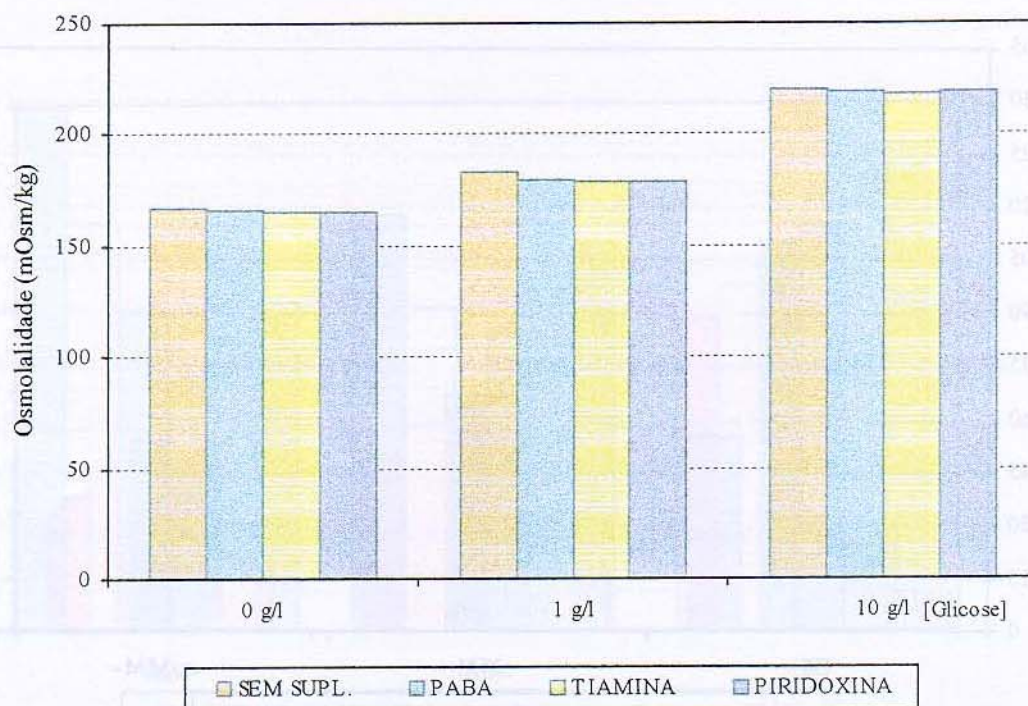


Figura 5.5 – Valores médios da osmolalidade de três repetições dos meios de cultivo líquidos com três diferentes concentrações de glicose em função dos suplementos para auxotrofia

5.5 – Germinação das linhagens em meio de cultivo líquido e em meio sólido

Um esporo é uma célula que possui toda a informação genética necessária para o desenvolvimento de um organismo e o essencial básico para o processamento de informação dentro de um espectro de desenvolvimento (Ross, 1979a). Esta informação pode permanecer em estado de suspensão caracterizando o período de desenvolvimento denominado de *dormência*. A dormência pode ser imposta tanto por condições ambientais como por um controle endógeno (Griffin, 1994a). A dormência exógena, imposta pelo ambiente, termina quando nutrientes desejáveis são oferecidos ou as propriedades inibitórias do meio são alteradas, enquanto que a dormência constitutiva requer algo além do controle ambiental. Assim, o potencial genético de uma linhagem pode ser submetido à indução para germinação de acordo com estímulos ambientais, mas a resposta a este estímulo requer competência do microrganismo de reconhecê-lo como tal.

A capacidade de resposta ao ambiente pode variar de acordo com a constituição genética, mas igualmente importante é o estágio de desenvolvimento da célula fúngica que estará exposta ao estímulo ambiental. Em suma, não apenas o conteúdo genético é relevante para o desenvolvimento, mas também o é o epigenético.

A quebra do período de dormência de uma célula fúngica é seguida pela germinação. Após a adesão do esporo na superfície da cutícula de um inseto, a germinação é o próximo passo (Zacharuk, 1970); o sucesso do processo de infecção depende da eficiência da germinação que pode ser medida por diversos critérios (Cooke; Whipps, 1993a). Considerando que requerimentos nutricionais, disponibilidade de água e nutrientes, características morfológicas e genéticas são requisitos importantes para o prosseguimento da interação entre o patógeno e o inseto hospedeiro, um levantamento da capacidade germinativa das linhagens utilizadas foi feito. Tomou-se como base o comprimento do tubo germinativo, devendo este ser aproximadamente igual à metade do comprimento médio longitudinal do esporo da linhagem (ou seja, entre 2,5-3,5 μ m).

5.5.1 - Germinação em meio de cultivo líquido

Foram testadas duas concentrações de glicose, a saber, 10g/l (meio MM) e 35g/l (meio MM acrescido de 25g/l de glicose denominado meio Gli). Os meios de cultivo onde se desenvolveram as linhagens auxotróficas foram acrescidos de suplementos nutricionais específicos para cada uma delas. Nas figuras 5.6 – 5.9 encontram-se as médias das porcentagens de esporos germinados em diferentes horas de desenvolvimento para as linhagens E9, Y5, B/vi e X/vi.

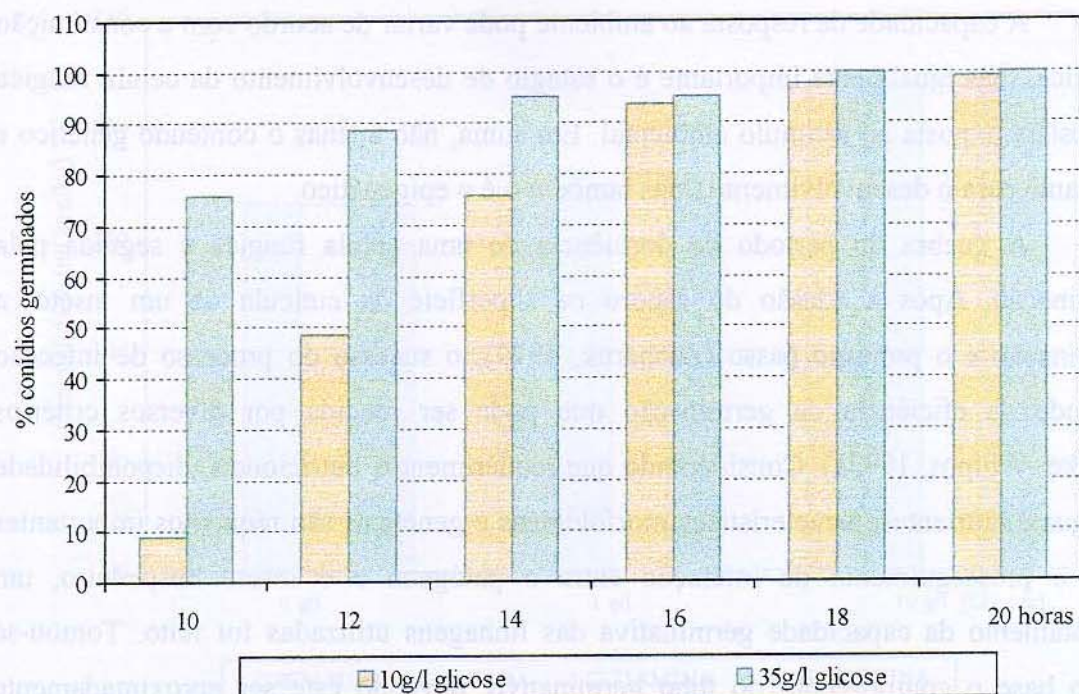


Figura 5.6 – Valores médios percentuais de conídios da linhagem E9 germinados em meio líquido com duas diferentes concentrações de glicose provenientes de três renetições

Como mostrado na figura 5.6, em meio líquido com menor concentração de glicose, pôde ser observado que a linhagem selvagem E9 apresentou uma aceleração na capacidade germinativa a partir de 10 horas de desenvolvimento atingindo seu máximo em 20 horas. Comparativamente, maior concentração de glicose ofereceu estímulo suficiente para aumentar esta capacidade germinativa em cerca de 65% e após 14 horas de desenvolvimento já se observava a formação de um patamar de equilíbrio quanto ao parâmetro analisado. A glicose, podendo atuar como estimulante de desenvolvimento de modo direto via inibição e/ou indução de processos celulares (Ronne, 1995), também poderia fazê-lo indiretamente por intermédio da alteração da osmolalidade do meio de cultivo que serviria como sinalizador de respostas em nível de desenvolvimento, possivelmente explicando os resultados obtidos para a modificação na capacidade germinativa da linhagem E9 causada pela glicose (Gooday; Schofield, 1995).

Pela representação gráfica dos valores médios percentuais dos conídios germinados da linhagem auxotrófica Y5 (Figura 5.7) verificou-se que maior concentração de glicose foi altamente estimulante à germinação desta linhagem, gerando

um aumento inicial de cerca de 81%. Este aumento poderia ser parcialmente explicado por contaminantes na glicose usada do tipo vitamina (Griffin, 1994c), visto que, comparativamente à linhagem selvagem E9 a diferença foi de cerca de 13% em 10 horas de desenvolvimento com 35g/l de glicose.

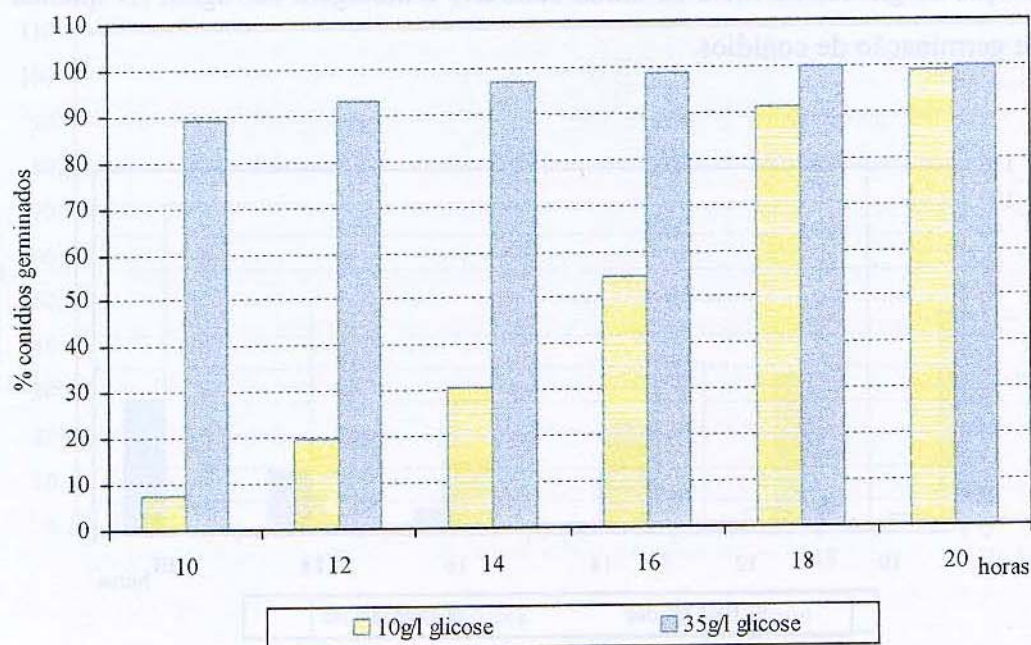


Figura 5.7 – Valores médios percentuais de conídios da linhagem Y5 germinados em meio líquido com complemento e com duas diferentes concentrações de glicose provenientes de três repetições

A piridoxina, pertencente ao grupo de fatores com atividade das vitaminas B₆, é importante para o metabolismo de aminoácidos e como coenzima nas reações de transaminação, pode ter tido, juntamente com outros nutrientes, sua aquisição facilitada do meio de cultura por intermédio de mecanismos modificados pela concentração de glicose seja em nível de alteração de canais na membrana celular ou via proteínas específicas (Cooke; Whipps, 1993d; Ronne, 1995); mesmo ao compararmos a capacidade germinativa das duas linhagens em meio com 10g/l de glicose (suplementado com piridoxina para a linhagem Y5), verificamos que a linhagem Y5 foi mais lenta que a linhagem E9, diferentemente de no meio com 35g/l de glicose, mostrando o papel

positivo da concentração da glicose para a germinação da linhagem Y5. Certamente alterações de parede ou membrana nesta linhagem mutante devem estar envolvidas nesta resposta ao açúcar, o que deve ser levado em conta na sua qualificação como adequada para iniciar o processo infectivo de acordo com a constituição da cutícula de insetos.

Conforme mostra a figura 5.8, a linhagem auxotrófica B/vi reagiu ao aumento da concentração de glicose no meio de modo contrário à linhagem selvagem E9 quando se tratou de germinação de conídios.

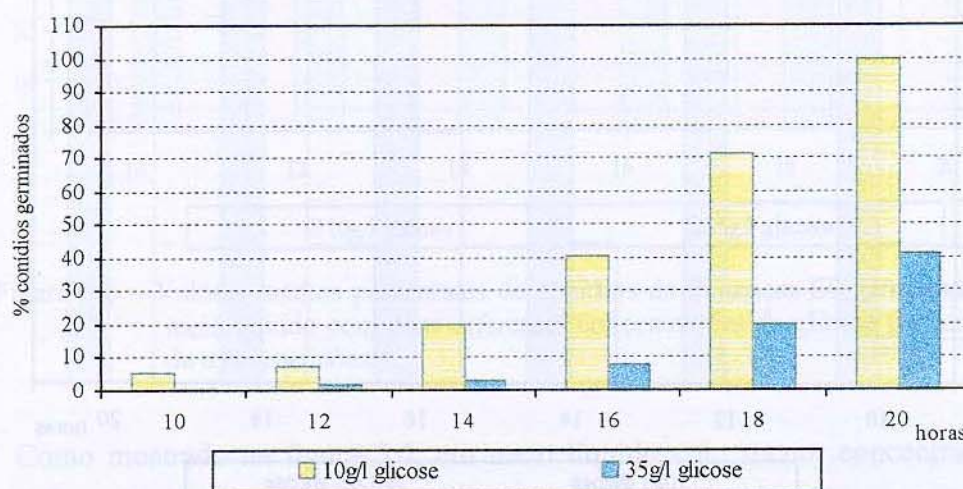


Figura 5.8 – Valores médios percentuais de conídios da linhagem B/vi germinados em meio líquido com complemento e com duas diferentes concentrações de glicose provenientes de três repetições

A linhagem B/vi é deficiente para tiamina que estruturalmente contém uma molécula de pirimidina associada a um anel de tiazol, e a deficiência nutricional pode ser suprida por se adicionar uma ou ambas as moléculas no meio de cultivo. A glicose, envolvida na esporulação de diversos fungos (Griffin, 1994a), interferiu negativamente no processo germinativo da linhagem possivelmente evidenciando que a interação com o meio foi de algum modo dificultada. Modificações estruturais morfológicas conseqüentes da maior osmolalidade, alterações em canais de membrana, mudança de atividade química celular e bloqueio por inibição competitiva, são possíveis mecanismos que explicariam o aparente efeito inibitório da glicose no meio de cultivo para esta linhagem mutante que, de acordo com estes resultados, deve ter avaliada sua qualidade

para iniciar um processo infectivo *in vivo* de acordo com a cutícula do inseto de interesse. Vale lembrar que certos açúcares podem requerer vitaminas do grupo B como tiamina, piridoxina e ácido pantotênico para uma absorção ótima (Cantarow; Schepartz, 1978).

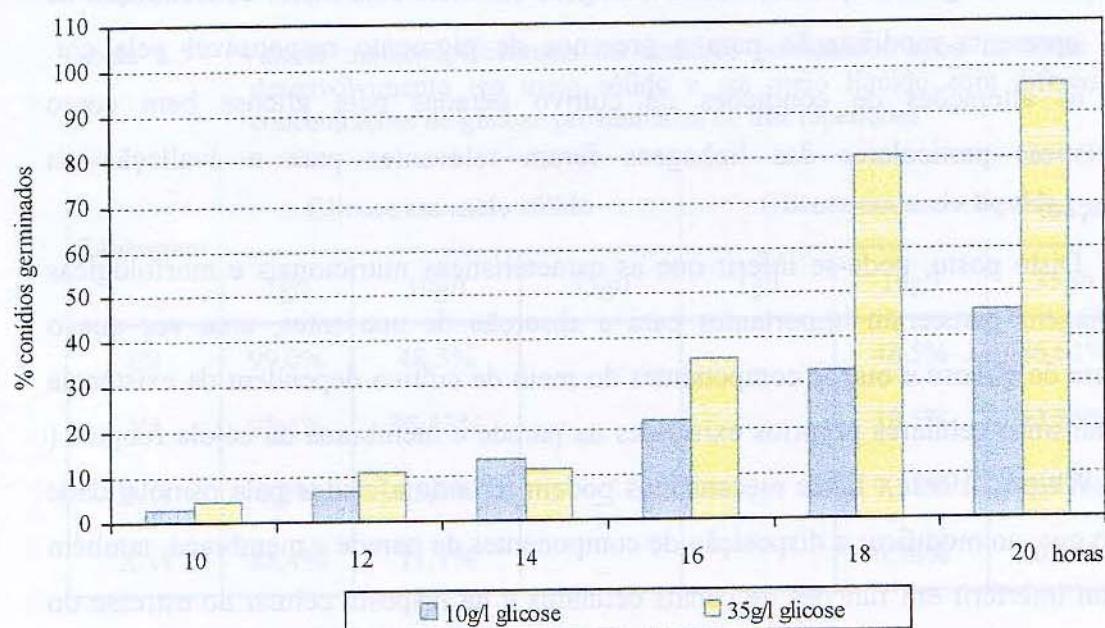


Figura 5.9 – Valores médios percentuais de conídios da linhagem X/vi germinados em meio líquido com complemento e com duas diferentes concentrações de glicose provenientes de três repetições

A linhagem X/vi é auxotrófica para ácido para-aminobenzóico. Este ácido pertence a um grupo químico vitamínico componente de compostos denominados “ácido fólico” e cuja função é a transferência de carbono (Voet, D.; Voet, J.G., 1995), sendo portanto importante para o desenvolvimento e crescimento. De acordo com a figura 5.9, apesar de mais lentamente, o desenvolvimento da linhagem seguiu o mesmo curso que a linhagem selvagem E9 quanto à germinação reagindo favoravelmente ao aumento da quantidade de glicose no meio de cultivo. Resultado semelhante foi obtido para a linhagem Y5 auxotrófica para piridoxina.

Como descrito no quadro 4.2, cada linhagem apresenta uma pigmentação particular para o esporo. A pigmentação muitas vezes se apresenta associada com respiração e metabolismo celular, podendo contribuir para uma resposta diferenciada ao

meio ambiente (Ross, 1979a). Pigmentos de fungos não são essenciais para o crescimento mas mutações associadas com carência de cor ou tendo composição de pigmento modificada (mutantes para cor de esporo) estão geralmente associadas com a reprodução visto que certos pigmentos podem agir como precursores de moléculas envolvidas no desenvolvimento (Griffin, 1994c). A linhagem B/vi, que não seguiu o mesmo padrão de germinação das outras linhagens em meio com maior concentração de glicose, apresenta modificação para a presença de pigmento responsável pela cor. Assim, as alterações de condições de cultivo geradas pela glicose bem como características particulares das linhagens foram relevantes para a avaliação da germinação.

Disto posto, pode-se inferir que as características nutricionais e morfológicas das linhagens pareceram importantes para a absorção de nutrientes, uma vez que o transporte de glicose e outros componentes do meio de cultivo dependem da existência de mecanismos celulares próprios existentes na parede e membrana da célula fúngica (Cooke; Whipps, 1993c). Estes mecanismos podem ter sido afetados pela osmolalidade do meio que, ao modificar a disposição de componentes de parede e membrana, também poderiam interferir em funções de canais celulares e na resposta celular ao estresse do ambiente (Matthews et al., 1998).

5.5.2 - Germinação em meio de cultivo sólido

Foram testadas duas concentrações de glicose em meio sólido, a saber, 1g/l e 10g/l (meio MM). Os meios de cultivo onde se desenvolveram as linhagens auxotróficas foram acrescidos de suplementos nutricionais específicos para cada uma delas. A análise foi feita em diferentes horas de desenvolvimento, sendo que na tabela 5.5 apresentou-se as médias da porcentagem de conídios germinados em meio de cultivo sólido comparado ao meio líquido após 12 horas de desenvolvimento das linhagens E9, Y5, B/vi e X/vi em diferentes concentrações de glicose.

Pôde-se notar que para linhagem selvagem E9 uma menor concentração de glicose em meio sólido favoreceu a germinação, enquanto o inverso ocorreu em meio líquido; observou-se que quando o meio de cultivo apresentou uma concentração de

10g/l de glicose (concentração esta igual à do meio sólido de manutenção da linhagem em laboratório) o número de germinados independeu do meio ser sólido ou líquido. A glicose em concentração maior em meio líquido pôde compensar a menor disponibilidade de oxigênio necessária à germinação induzindo uma resposta positiva ao estímulo dado pela concentração específica do açúcar.

Tabela 5.5 – Valores médios percentuais de conídios germinados após 12 horas de desenvolvimento em meio sólido e em meio líquido com diferentes concentrações de glicose provenientes de três repetições

Linhagem	Glicose em meio sólido			Glicose em meio líquido		
	1g/l	10g/l	35g/l	1g/l	10g/l	35g/l
E9	99,0%	48,5%	–	–	48,5%	86,61%
Y5	98,4%	98,43%	–	–	19,5%	92,86%
B/vi	6,2%	85,0%	–	–	7,28%	1,73%
X/vi	88,4%	11,1%	–	–	6,76%	10,73%

A linhagem auxotrófica Y5 apresentou-se indiferente quanto à concentração de glicose quando o meio de cultivo foi sólido; no entanto, quando o meio de cultivo foi oferecido na forma líquida uma maior concentração de glicose se mostrou preferencialmente útil à germinação. Numa concentração de 10g/l de glicose (igual à do meio sólido de manutenção da linhagem em laboratório) o meio sólido se mostrou favorável à linhagem. A melhor utilização do substrato na forma sólida pode estar associada à disponibilidade de oxigênio, uma vez que a razão de respiração freqüentemente aumenta com a germinação, sendo que o oxigênio pode se apresentar como capaz de interferir no metabolismo de glicose (Griffin, 1994c).

A linhagem auxotrófica B/vi se desenvolveu melhor preferencialmente em meio de cultivo sólido contendo uma concentração de glicose igual à do meio usado na manutenção da linhagem em laboratório. Esta aparente dificuldade de adaptação à mudança no meio de cultivo pode ser corroborada com a observação de que numa

mesma concentração de glicose, o meio, sendo líquido, não ofereceu as mesmas facilidades para a germinação da linhagem. Ainda pela figura 5.8 verifica-se que os 85% de germinados (em 12 horas de desenvolvimento em meio sólido com 10g/l de glicose) só foi alcançado após 18 horas de desenvolvimento em meio líquido com 10g/l de glicose. A disponibilidade de oxigênio, estímulo à aquisição de nutrientes e adaptação morfológica e/ou fisiológica podem, separadamente, ou em conjunto, explicar este resultado.

A linhagem X/vi, após 12 horas de desenvolvimento, mostrou maior número de conídios germinados em meio sólido numa concentração de glicose inferior àquela do meio usado na manutenção da linhagem em laboratório. Em meio de cultivo líquido, uma maior concentração de glicose ofereceu ligeira vantagem à germinação. Considerando a importância da disponibilidade de oxigênio para a germinação, o meio sólido se mostrou mais eficaz neste aspecto.

De modo geral, em 12 horas de desenvolvimento todas as linhagens apresentaram maior número de conídios germinados em meio sólido que em meio líquido. Entretanto, não apenas a composição do meio de cultivo é importante para a escolha ou rejeição de uma linhagem quanto à germinação, mas também o é o grau de acesso aos nutrientes oferecidos que o microrganismo tem em função de sua capacidade assimilatória ajustada ao meio de cultivo. Além disso, sua morfologia também pode impeli-lo a um comportamento que diferirá de acordo com a oferta de nutrientes num determinado tipo de ambiente. Assim, a capacidade adaptativa (morfológica e/ou fisiológica) é importante em análises do comportamento das linhagens no início do processo infectivo, e pode ser de extrema importância em estudos de melhoramentos de linhagens de *Metarhizium anisopliae* para este fim, e os resultados aqui apresentados visam auxiliar nesta direção.

5.6 - Avaliação do peso da massa micelial seca obtida em meio de cultivo líquido

O crescimento é um processo complexo com muitos componentes diferentes que podem contribuir para o desenvolvimento e para a diferenciação. Pode-se usar

critérios variados para a medida de crescimento individual ou de colônias mas as técnicas são sempre alvo de críticas pois a fluidez do meio, a esterilização, o inóculo, os queladores (tampões de pH) e outros fatores influenciam na avaliação (Griffin, 1994a; Ross, 1979a). Considerando que se procurou manter um determinado padrão no decorrer dos experimentos, acredita-se que os resultados possam expressar uma parcela da realidade.

Após a germinação, espera-se que o crescimento do fungo demonstre sua habilidade em superar adversidade e dar continuidade ao processo de infecção no hospedeiro. A influência de alguns fatores foram avaliados quanto a este parâmetro, e aqueles que poderiam induzir uma resposta morfológica expressa no desenvolvimento e diferenciação importantes para o processo infectivo serão apresentados no item 5.7.

5.6.1 – Influência do dióxido de carbono e da milhocina no peso da massa seca durante o desenvolvimento das linhagens

O desenvolvimento das linhagens E9, Y5, B/vi e X/vi foi avaliado por cerca de 72 horas, em intervalos de tempo de 12 horas. Na tabela 5.6 e nas figuras 5.10 a 5.13 acham-se representados os valores médios de peso de suas massas miceliais secas. A milhocina foi utilizada numa concentração tal que conduzisse a uma osmolalidade do meio àquela próxima da hemolinfa (itens 5.1 e 5.4). O dióxido de carbono gasoso e a milhocina foram oferecidos como tratamento após o número de conídios germinados de cada linhagem ter atingido cerca de 30% em meio líquido MM ou MM com suplemento para auxotrofia (item 5.5).

O dióxido de carbono mostrou-se efetivo na inibição do crescimento de todas as linhagens. Esta inibição pôde ser vista tanto em meio MM como no meio acrescido com milhocina (CSCO₂). Considerando que o CO₂ dissolvido pode influenciar a morfologia (McIntyre; McNeil, 1997a,b) alterando a parede celular de maneira estrutural (Gooday; Schofield, 1995), parece provável que uma resposta adaptativa além do transporte de nutrientes tenha sido afetada pelo composto. O impacto na morfologia e no crescimento tem sido observado em certo número de microrganismos, sendo que em alguns casos o gás pode estimular o crescimento (McIntyre; McNeil, 1998).

Têm sido propostos diversos mecanismos de ação do dióxido de carbono gasoso, incluindo sua capacidade de penetração no meio celular, alterando o pH interno da célula e conduzindo a um desequilíbrio de cargas desde a membrana até à alteração da atividade enzimática intracelular (McIntyre; McNeil, 1998; Cooke; Whipps, 1993d). Decorrente disto, poder-se-ia esperar mudanças na interação das células fúngicas com o meio de cultivo, o que foi inferido quando se observou que o gás estimulou a ramificação de hifas tornando-as mais finas e alongadas, com diminuição dos ângulos formados entre o ramo e a hifa principal, morfologia típica de hifas de dimorfismo para crescimento (Cooke; Whipps, 1993a). Esta resposta morfológica tem sido tida como conseqüente de eventos anteriores à ramificação e ser parcialmente independente da extremidade de hifa (Watters et al. 2000) bem como tem sido mostrada ser responsável pela produção específica de metabólitos em fungos (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000). Toda esta capacidade do dióxido de carbono em modificar a fisiologia e a morfologia celulares podem, portanto, justificar sua interferência na produção de massa micelial.

Tabela 5.6 – Valores médios de pesos das massas secas miceliais das linhagens em meios de cultivo líquidos em diferentes horas de desenvolvimento provenientes de três repetições

Linhagem	Meio de cultivo	Peso (mg) em horas de desenvolvimento				
		18h	24h	36h	48h	72h
E9	MM	8,27	19,00	30,20	59,90	85,60
	MM CO ₂	9,97	15,30	17,20	19,60	21,50
	CS	25,03	57,5	113,91	282,90	536,80
	CS CO ₂	45,74	70,21	79,30	96,67	96,87
Y5	MM ⁺	9,27	30,63	22,29	45,67	86,41
	MM ⁺ CO ₂	9,15	26,06	26,12	28,49	27,32
	CS	32,55	92,70	84,10	177,40	411,41
	CS CO ₂	42,60	65,00	64,80	82,40	100,61
B/vi	MM ⁺	8,17	31,47	26,37	24,13	77,23
	MM ⁺ CO ₂	9,19	22,03	18,43	21,73	19,80
	CS	28,23	69,60	59,01	122,20	323,10
	CS CO ₂	26,15	56,90	65,70	68,61	96,70
X/vi	MM ⁺	9,01	19,50	22,60	27,21	49,50
	MM ⁺ CO ₂	9,53	21,50	15,50	19,31	19,30
	CS	26,21	83,80	118,80	206,81	407,90
	CS CO ₂	24,18	84,32	112,80	103,80	104,00

O dióxido de carbono gasoso também induziu à fragmentação de hifas nos diferentes meios de cultivo o que, podendo caracterizar culturas com uma produção de metabólitos específicos (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000), corrobora os resultados quanto à morfogênese em condições de cultivo. Houveram períodos no decorrer do crescimento em que as linhagens responderam à ação do gás de modo positivo, apresentando inclusive discreto aumento da massa micelial em relação ao mesmo meio de cultivo sem o gás. Em outros momentos, o que variou com a linhagem, uma resposta inibitória à ação do gás pôde ser detectada. Deriva deste conjunto de observações que o dióxido de carbono gasoso utilizado produziu um ambiente hostil ao crescimento das linhagens, impelindo-as a alterações no crescimento e desenvolvimento.

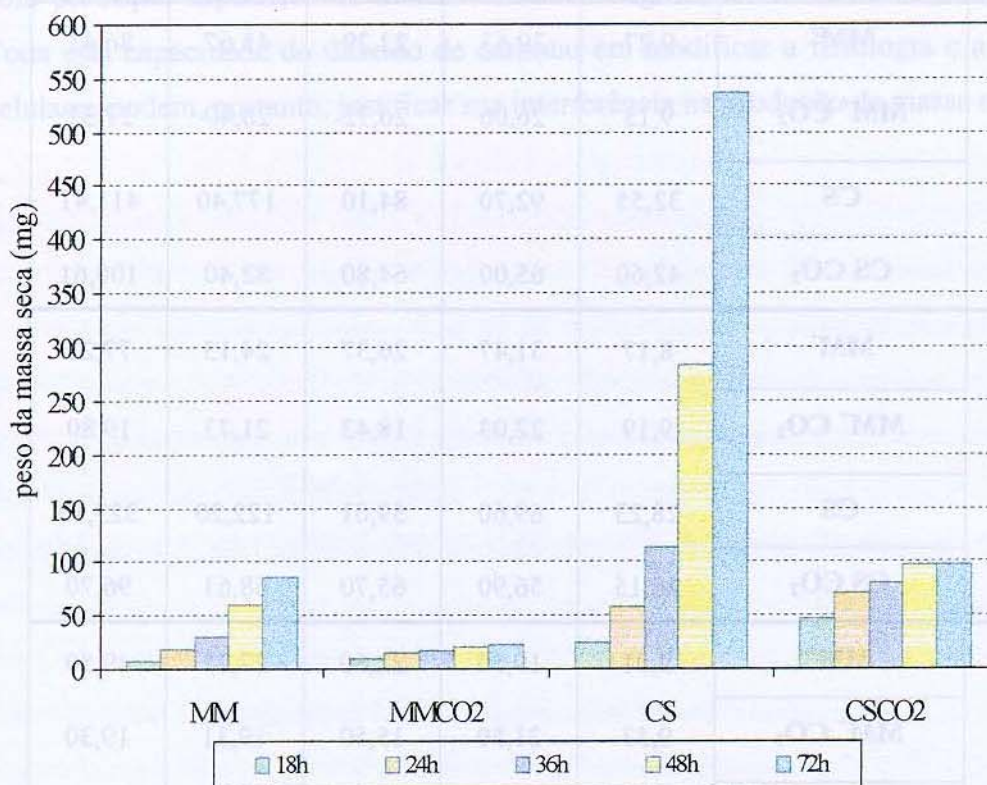


Figura 5.10 – Valores médios dos pesos da massa micelial seca da linhagem E9 em desenvolvimento em meios de cultivo líquidos com ou sem dióxido de carbono gasoso provenientes de três repetições

Com base na composição da hemolinfa do inseto de interesse, conhecendo-se o teor de CO₂ circulante, pode-se utilizar a capacidade adaptativa morfológica e fisiológica de determinada linhagem a fim de usá-la como prospectivo agente patogênico; a julgar apenas pelo peso da massa seca sob CO₂ após 48 horas de desenvolvimento em meio MM ou MM com suplemento, teríamos, em ordem decrescente Y5 > B/vi > E9 > X/vi.

A milhocina, rica em componentes necessários para o desenvolvimento do microrganismo mostrou-se, na concentração de 4% (item 5.4.3), extremamente eficaz para a produção de massa micelial de todas as linhagens. O aumento da quantidade e qualidade de nutrientes bem como o aumento da osmolalidade do meio de cultivo após a introdução da milhocina poderia explicar o estímulo ao crescimento bem como a alteração morfológica resultante da resposta das células fúngicas (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000). Como posteriormente apresentado, observou-se a produção efusiva de conídios submersos bem como a alteração no pH do meio de cultivo; o espessamento das hifas, que diversas vezes tem sido associado com a produção de metabólitos, também foi observado (Tamerler et al., 1998; Latgé, 1988). Diferente do dióxido de carbono gasoso, a milhocina sempre se mostrou estimulatória ao crescimento nos diferentes meios de cultivo.

Particularmente para a linhagem E9 (Figura 5.10) a resposta inibitória do crescimento frente ao dióxido de carbono ficou evidente a partir das 24 horas de desenvolvimento em comparação ao meio MM sem CO₂. Comparando os meios com milhocina, a resposta à ação do gás foi estimulatória até o período entre 24 - 36 horas de desenvolvimento após o que a linhagem passou a mostrar a ação inibitória do gás quanto ao crescimento. Uma resposta adaptativa ao meio CSCO₂ começou discretamente entre 36-48 horas, se mantendo até 72 horas de desenvolvimento.

A linhagem Y5 (Figura 5.11) apresentou uma resposta inibitória do crescimento frente ao dióxido de carbono já a partir das 18 horas de desenvolvimento em comparação ao meio MM sem CO₂.

Analisando os meios com milhocina, a resposta estimulatória da ação do gás se deu entre o período de 18 -24 horas de desenvolvimento após o que a linhagem passou a

mostrar inibição quanto ao crescimento. Entre o período de 48-72 horas de desenvolvimento a linhagem começou a mostrar adaptação ao meio CS CO₂.

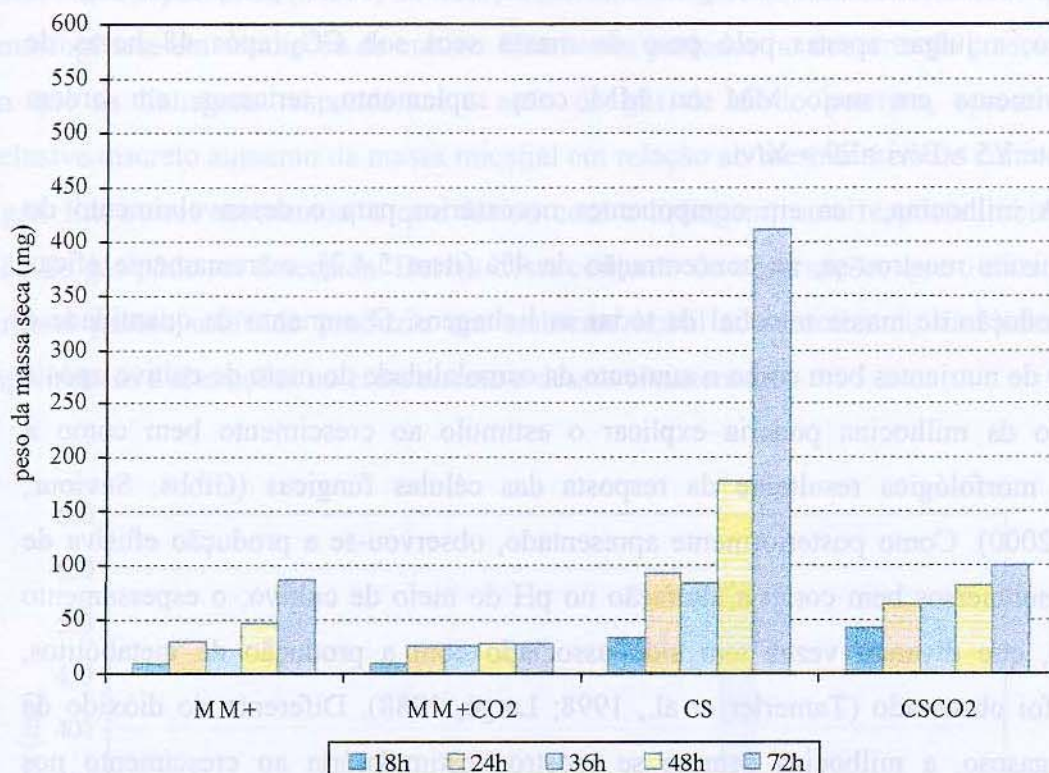


Figura 5.11 - Valores médios dos pesos da massa micelial seca da linhagem Y5 em desenvolvimento em meios de cultivo líquidos com ou sem dióxido de carbono gasoso provenientes de três repetições

A linhagem B/vi (Figura 5.12) expressou uma resposta estimulatória ao crescimento frente ao dióxido de carbono até 18 horas de desenvolvimento em comparação ao meio MM sem CO₂; já em meios com milhocina a explicitação da resposta à ação do gás foi de inibição, ainda que discreta, desde 18 horas de desenvolvimento. A linhagem começou a mostrar adaptação ao meio de cultivo CS CO₂ entre o período de 48-72 horas de desenvolvimento.

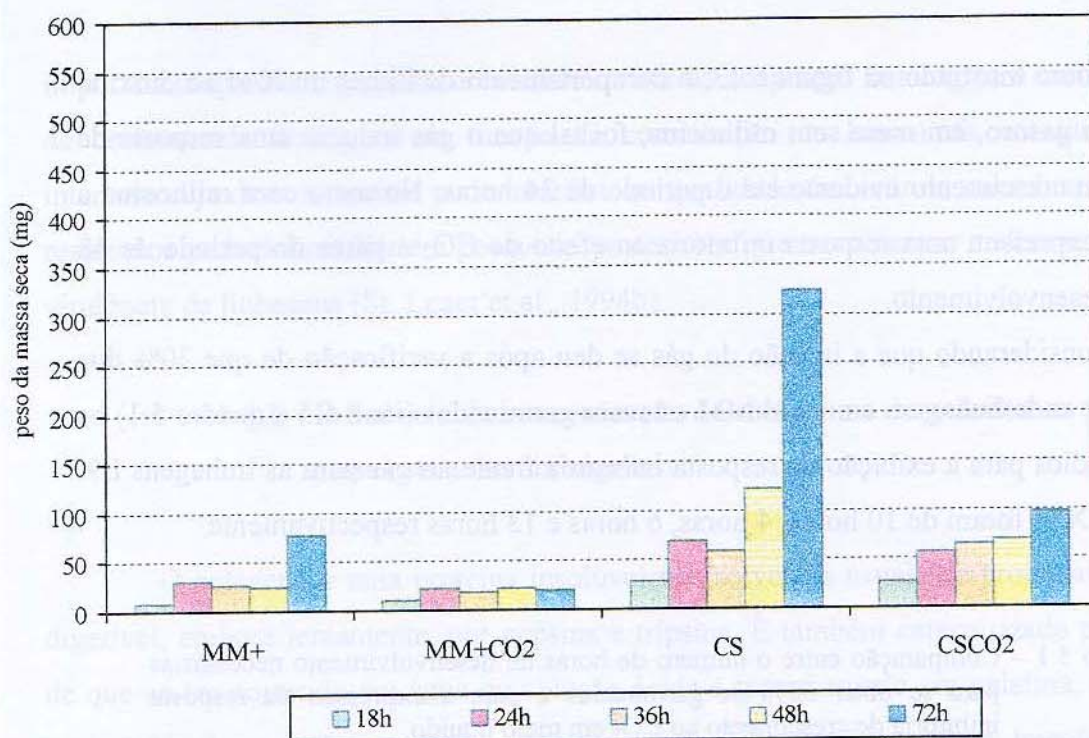


Figura 5.12 - Valores médios dos pesos da massa micelial seca da linhagem B/vi em desenvolvimento meios de cultivo líquidos com ou sem dióxido de carbono gasoso provenientes de três repetições

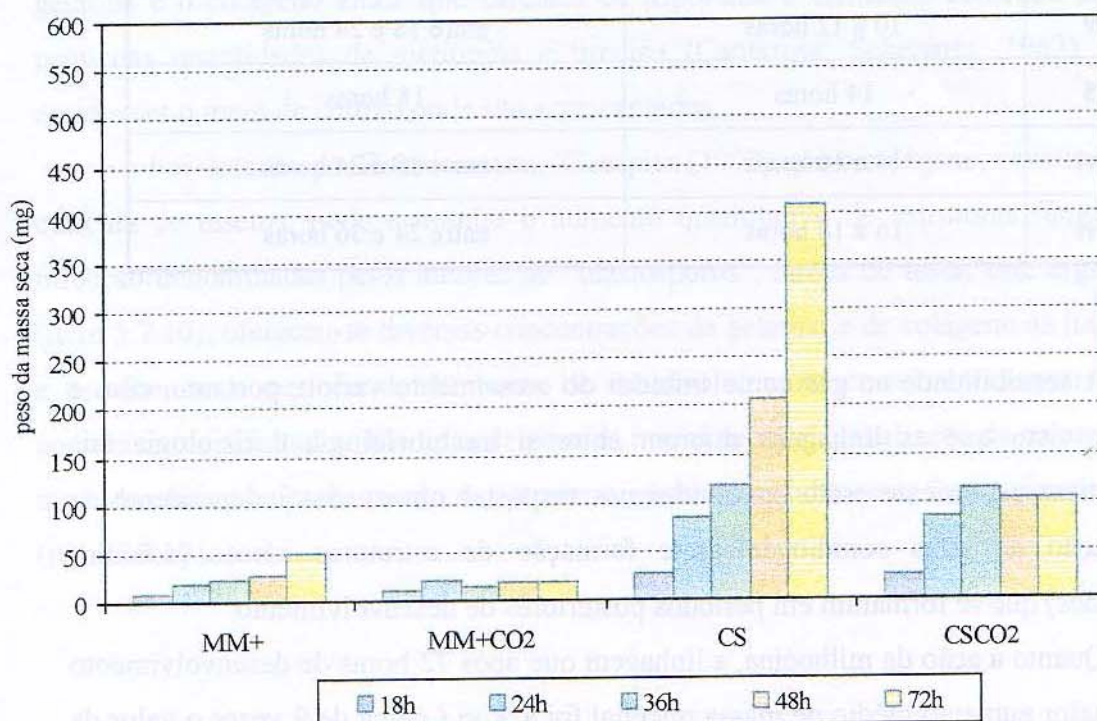


Figura 5.13 - Valores médios dos pesos da massa micelial seca da linhagem X/vi em desenvolvimento em meios de cultivo líquidos com ou sem dióxido de carbono provenientes de três repetições

Como mostrado na figura 5.13, o comportamento da linhagem X/vi ao dióxido de carbono gasoso, em meio sem milhocina, foi tal que o gás induziu uma resposta de estímulo ao crescimento evidente até o período de 24 horas. No meio com milhocina a linhagem expressou uma resposta inibitória ao efeito do CO₂ a partir do período de 48 horas de desenvolvimento.

Considerando que a injeção do gás se deu após a verificação de que 30% dos conídios de cada linhagem em meio MM estavam germinados (item 5.5 e quadro 5.1) os tempos médios para a exibição da resposta inibitória frente ao gás para as linhagens E9, Y5, B/vi e X/vi foram de 10 horas, 4 horas, 6 horas e 13 horas respectivamente.

Quadro 5.1 – Comparação entre o número de horas de desenvolvimento necessárias para se obter 30% de germinados e para a expressão da resposta inibitória de crescimento ao CO₂ em meio líquido

Linhagem	Horas de desenvolvimento em que se verifica	
	30% de conídios germinados	Evidência da inibição devida ao CO ₂
E9	10 a 12 horas	entre 18 e 24 horas
Y5	14 horas	18 horas
B/vi	14 a 16 horas	entre 18 e 24 horas
X/vi	16 a 18 horas	entre 24 e 36 horas

A sensibilidade ao gás como inibidor do crescimento variou, portanto, com a linhagem; visto que as linhagens diferem entre si na morfologia e fisiologia tais características certamente estão envolvidas nas respostas observadas independente da diferenciação de hifas conidiogênicas e formação de estruturas aéreas (conídios pigmentados) que se formaram em períodos posteriores de desenvolvimento.

Quanto à ação da milhocina, a linhagem que após 72 horas de desenvolvimento ganhou maior aumento médio de massa micelial foi a X/vi (cerca de 9 vezes o valor da massa em meio sem milhocina). Visto que *in vitro* o desenvolvimento esteve correlacionado com as condições de cultivo, estes resultados vêm corroborar a

importância que deve ser dada ao conhecimento da adaptação fisiológica e morfológica de determinada linhagem em função da constituição da hemolinfa em insetos de interesse cuja dieta alimentar pode interferir na qualidade do controle microbiano. Estes resultados poderão auxiliar em pesquisas posteriores que envolvam o melhoramento da virulência de linhagens (St. Leger et al., 1994b).

5.6.2 – Influência da concentração de colágeno e de gelatina no peso da massa seca das linhagens

O colágeno é uma proteína insolúvel nos solventes usuais de proteínas, mas é digerível, embora lentamente, por pepsina e tripsina. É também caracterizado pelo fato de que ao ser aquecido em água ou solução ácida é transformado em gelatina, a qual é mais solúvel e prontamente digerível por enzimas proteolíticas. Esta transformação provavelmente representa um processo de desnaturação. O colágeno, via de regra, apresenta um alto conteúdo de glicina (25%), e de prolina e hidroxiprolina (30%). A gelatina e o colágeno ainda que carentes de triptofano e cistina, e contendo somente pequenas quantidades de metionina e tirosina (Cantarow; Schepartz, 1963) podem enriquecer o meio de cultivo onde são acrescentados.

Foi descrito por Zimmermann; Kleespies (1998) que o colágeno, constituinte de cutícula de insetos, pode estimular o aumento quantitativo de estruturas fúngicas de infecção denominadas pelos autores de “blastosporos”. Antes de testar este argumento (item 5.7.10), ofereceu-se diversas concentrações de gelatina e de colágeno às linhagens e escolheu-se o período de 48 horas de desenvolvimento como representativo para comunicar os resultados. Medidas de peso da massa seca, pH, avaliação da coloração do meio de cultivo e aparecimento de estruturas aéreas e/ou submersas foram determinados (item 5.7.10).

Abaixo seguem os resultados referentes aos dois primeiros destes parâmetros, sendo que os outros serão mostrados posteriormente. As linhagens auxotróficas tiveram o meio de cultivo MM acrescido de suplemento nutricional.

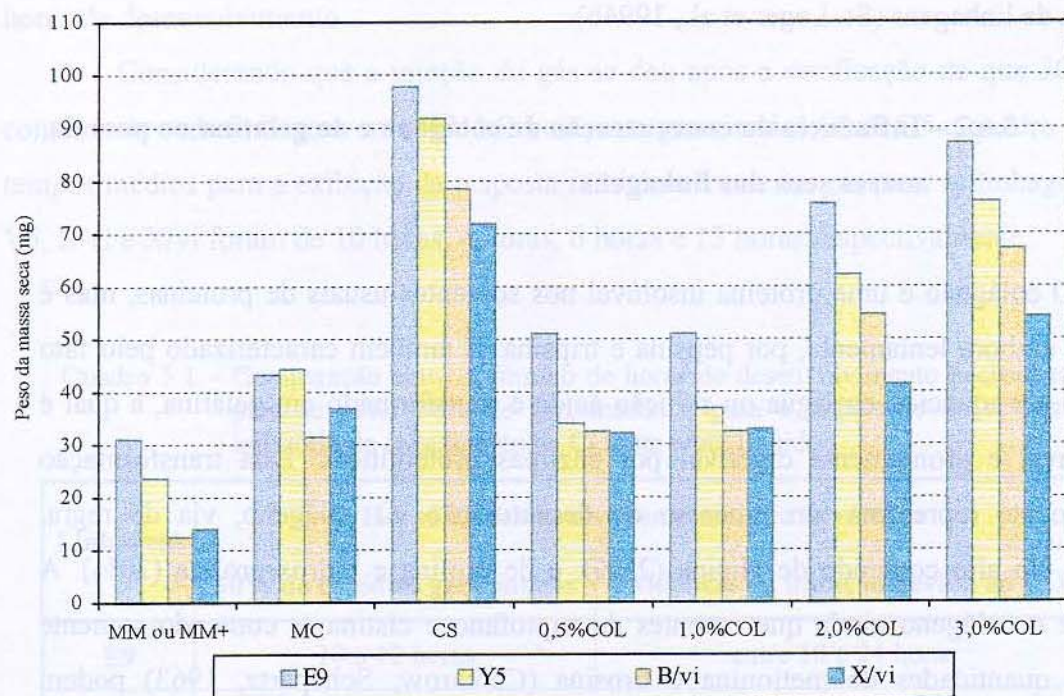


Figura 5.14 – Valores médios dos pesos da massa seca após 48 horas de desenvolvimento em meios líquidos com diferentes concentrações de colágeno, provenientes de três repetições

Pode-se inferir da Figura 5.14 que cada uma das linhagens se comportou de modo específico quanto à concentração de colágeno, refletindo em sua massa micelial a ação do composto.

Para a linhagem E9 temos, simbolicamente, que em termos de produção de massa micelial, $CS > 3\%COL > 2\%COL > 0,5\%COL = 1\%COL > MC > MM$. A linhagem Y5 apresentou um bloco de produção de massa micelial em colágeno como se segue: $CS > 3\%COL > 2\%COL > MC > 1\%COL > 0,5\%COL > MM$ com suplemento. Já a linhagem B/vi apresentou um bloco de produção de massa micelial em colágeno igual ao da linhagem E9, e a linhagem X/vi apresentou uma produção micelial como o bloco de produção da linhagem Y5, com exceção em que $1\%COL \cong 0,5\%COL$.

Da figura 5.15 pôde-se inferir que cada uma das linhagens se comportou de modo específico também quanto à concentração de gelatina, refletindo em sua massa micelial a ação do composto.

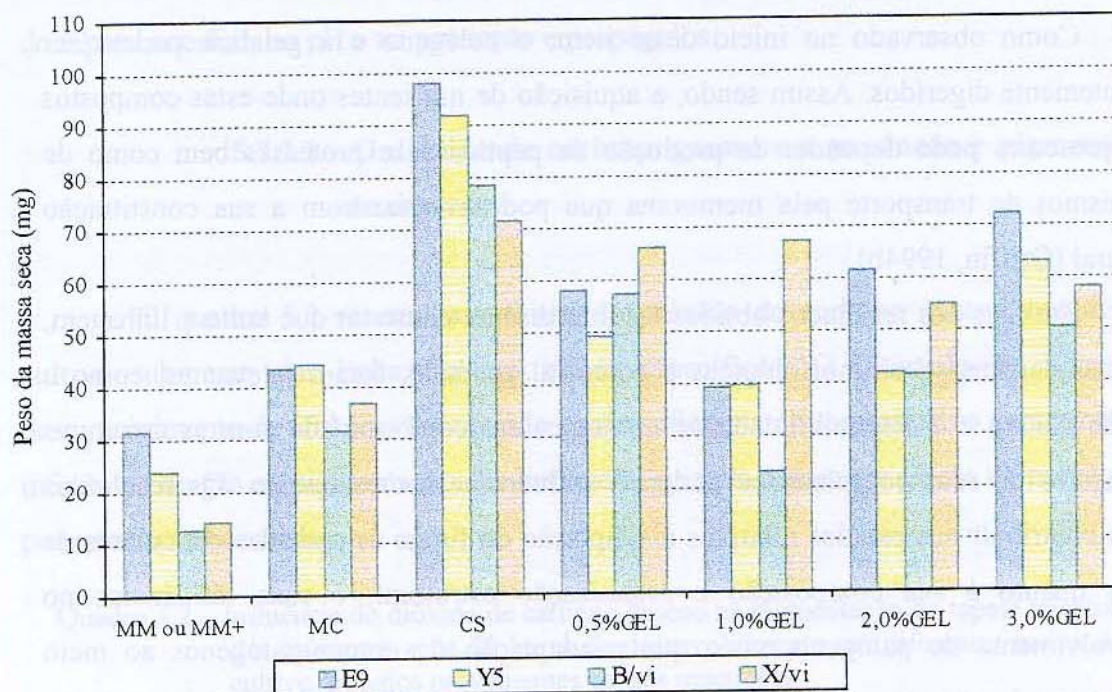


Figura 5.15 – Valores médios dos pesos da massa seca após 48 horas de desenvolvimento em meios líquidos com diferentes concentrações de gelatina, provenientes de três repetições

Para a linhagem E9 temos, simbolicamente, que em termos de produção de massa micelial, $CS > 3\%GEL > 2\%GEL > 0,5\%GEL > MC > 1\%GEL > MM$. A linhagem Y5 apresentou um bloco de produção de massa micelial em gelatina como se segue: $CS > 3\%GEL > 0,5\%GEL > 2\%GEL > MC > 1\%GEL > MM$ com suplemento. Já a linhagem B/vi apresentou um bloco de produção de massa micelial em gelatina como se segue: $CS > 0,5\%GEL > 3\%GEL > 2\%GEL > MC > 1\%GEL > MM$ com suplemento, e a linhagem X/vi apresentou como produção micelial a sequência: $CS > 1\%GEL \cong 0,5\%GEL > 3\%GEL > 2\%GEL > MC > MM$ com suplemento.

Avaliando o conjunto de valores para colágeno e gelatina pôde-se constatar que para as linhagens E9 e B/vi o colágeno nas concentrações 1-3% permitiu uma maior proliferação micelial, e numa baixa concentração (0,5%) a gelatina foi mais desejável. A

linhagem Y5 mostrou que nas concentrações 2-3% o colágeno permitiu uma maior proliferação micelial e 0,5-1% a gelatina foi mais eficiente; a linhagem X/vi produziu maior massa micelial em todas as concentrações de gelatina comparadas com as mesmas concentrações de colágeno.

Como observado no início deste item, o colágeno e a gelatina podem ser diferentemente digeridos. Assim sendo, a aquisição de nutrientes onde estes compostos estão presentes pode depender da produção de peptidases e proteases bem como de mecanismos de transporte pela membrana que podem variar com a sua constituição estrutural (Griffin, 1994b).

Em face dos resultados obtidos foi interessante constatar que tanto a linhagem, com suas características morfológicas e potencial genético, foram relevantes, como o meio de cultivo e a disponibilidade de nutrientes em conformidade com as estruturas moleculares de seus componentes puderam influenciar o crescimento. Os resultados podem contribuir nos estudos relativos à adaptação do fungo às camadas cuticulares de insetos quanto à sua composição e organização estrutural, e suas influências no desenvolvimento do patógeno, visto que a adaptação de entomopatógenos ao meio ambiente pode requerer a produção de proteases e carbohidrases (St.Leger; Joshi; Roberts, 1997; Braga; Destéfano; Messias, 1999).

5.7 – Desenvolvimento das linhagens nos diferentes meios de cultivo

A influência no desenvolvimento quanto à ação do dióxido de carbono, da variação do pH, e da osmolalidade foi avaliada nos diversos meios de cultivo. Considerando que a morfologia de propágulos fúngicos tem sido apontada como parâmetro de relevância para a patogenicidade e virulência de Deuteromicetos (Latgé, 1988), a obtenção de propágulos específicos nos diferentes meios de cultivo foi tomada como tarefa primordial nos experimentos.

5.7.1 – A interferência do dióxido de carbono gasoso no desenvolvimento das linhagens

O dióxido de carbono gasoso foi avaliado quanto à sua influência na coloração do tapete micelial, no pH e na produção e propágulos.

5.7.1.1 - O dióxido de carbono gasoso e a produção e pigmentação de esporos

O quadro 5.2 resume os efeitos do dióxido de carbono gasoso notados no cultivo submerso das linhagens em meios específicos. O intervalo de tempo de desenvolvimento de 60 horas foi tomado como suficiente e representativo para mostrar a influência do gás na pigmentação das linhagens, quando estruturas aéreas de propagação puderam ser observadas.

Quadro 5.2 – Influência do dióxido de carbono gasoso na pigmentação do tapete micelial das linhagens após 60 horas de desenvolvimento em diferentes meios de cultivo, líquidos provenientes de três repetições

Linhagem	Meios de cultivo			
	MM / MM ⁺	MM CO ₂ / MM ⁺ CO ₂	CS	CS CO ₂
E9	V*	B	V	B
Y5	A	B	A	B
B/vi	B	B	B	B
X/vi	X	B	X	B

* V= verde escuro A= amarelo escuro B= branco X= violeta

Pôde-se verificar que o dióxido de carbono tanto no meio de cultivo MM (com ou sem suplemento) como em meio com milhocina (CS), impeliu às linhagens a apresentarem a coloração branca para o tapete micelial. Sabe-se que fungos filamentosos têm mais de um tipo de proteínas morfogenéticas que são capazes de responder a condições ambientais externas por intermédio de mecanismos variados e gerar

hidrofobicidade de superfície onde o ar é uma das interfaces (Talbot, 1997); além disto, visto que pigmentos de fungos podem estar associados com a reprodução, respiração e metabolismo celulares (Ross, 1979a), o dióxido de carbono apresentou-se, portanto, como potente candidato a indutor de dimorfismo também em *Metarhizium anisopliae* visto que dificultou a produção de propágulos aéreos.

Respostas eficientes ao dióxido de carbono provavelmente necessitam de mecanismos epigenéticos adequados, sendo as alterações morfológicas a expressão mais visível destas respostas; em vista dos resultados, o impedimento provido pelo gás no aparecimento e pigmentação das estruturas aéreas mesmo na presença do ar *in vitro* fortalece o argumento de que a constituição da hemolinfa *in vivo* pode determinar o sucesso da propagação aérea do fungo, pois pigmentos em esporos podem exercer a função de proteção contra adversidade ambiental (Jong et al., 1997)

Foram também elaborados experimentos com a linhagem E9 em meios de cultivo com diferentes viscosidade e concentrações de glicose, compostos à base de milho, visando verificar a influência na coloração micelial frente ao dióxido de carbono gasoso dissolvido.

Como pode ser verificado com os quadros 5.2 e 5.3 a coloração do tapete micelial da linhagem E9 onde o gás não foi injetado se apresentou verde escuro em CS, branco em CM e verde claro em FM, o que vem mostrar que apesar de estes três meios de cultivo conterem farinha de milho como base, a confecção do meio interferiu no desenvolvimento. Isto vem corroborar as críticas emergentes quanto aos critérios utilizados pelos pesquisadores para avaliação do desempenho de linhagens sob estudo (Griffin, 1994a; Butt; Goettel, 2000).

A glicose (conduzindo a uma osmolalidade do meio próxima àquela da hemolinfa) pareceu atuar como fator que favoreceu a manutenção da pigmentação verde escuro das estruturas aéreas característica do meio de referência MM; já a modificação da coloração do filtrado do meio de cultivo que passou de amarelo claro para o amarelo escuro nos meios onde se acrescentou a glicose, poderia ser justificada pela concentração deste reagente. Por outro lado, verificou-se que quando o CO₂ foi injetado nos meios de cultivo, os filtrados apresentaram-se incolores e a cor do tapete micelial foi branca (com exceção do meio FMCO₂) mesmo quando a glicose esteve presente. Um

mecanismo específico de resposta à glicose possivelmente deve estar envolvido nestes resultados.

A produção e pigmentação de esporos é também parâmetro a ser considerado na patogenicidade e virulência de fungos visto que o desenvolvimento pode seguir caminhos determinados por esta resposta ao ambiente (Jong et al., 1997). Portanto, a sensibilidade da linhagem quanto ao estímulo ambiental retratada na produção de esporos e na alteração da coloração no intervalo de tempo necessário para a manifestação da resposta, pode ser um indicativo da rigidez epigenética consequente de um conteúdo genético protegendo a adaptação.

Quadro 5.3 – Influência do dióxido de carbono gasoso na pigmentação da linhagem E9 após 60 horas de desenvolvimento em diferentes meios de cultivo líquidos, provenientes de três repetições

Meio de cultivo	Coloração*	
	Tapete micelial	Filtrado do meio de cultivo
MM	V	a
MM CO ₂	B	I
GLI	V	A
GLI CO ₂	B	I
CM	B	I
CM CO ₂	B	I
FM	v	I
FM CO ₂	v	I
GLI CM	V	A
GLI CM CO ₂	B	I
GLI FM	V	A
GLI FM CO ₂	B	I

*V= verde escuro v= verde claro A= amarelo escuro a= amarelo claro B= branco I= incolor

A pigmentação dos esporos aéreos provenientes de estruturas miceliais pode ser alterada pela composição de vitaminas e outros nutrientes no meio de cultivo bem como pela disponibilidade destes ao fungo (Garraway; Evans, 1984). Entre os distintos mecanismos de ação, o dióxido de carbono pode alterar a permeabilidade da membrana e influenciar a aquisição de nutrientes, indiretamente permitindo variação na osmolalidade do meio, induzindo ao aparecimento de hifas mais finas e caracterizando um determinado tipo de dimorfismo (Cooke; Whipps, 1993a; McIntyre; McNeil, 1997). Como anteriormente mencionado, a pigmentação é característica de estruturas aéreas e os resultados referentes ao desenvolvimento das linhagens em cultura submersa devem ser de auxílio em estudos comparativos àqueles feitos com a colonização da hemolinfa de insetos.

5.7.1.2 - O dióxido de carbono gasoso e o pH

O dióxido de carbono também modificou a evolução do pH do meio de cultivo induzindo respostas de desenvolvimento. Meios de cultivo sem e com uma concentração de milhocina que produziu um valor de osmolalidade próxima à da hemolinfa de *Anastrepha fraterculus* (item 5.1) foram elaborados. As linhagens auxotróficas receberam aditivos suplementares às suas deficiências nutricionais.

Avaliando a figura 5.16, podemos notar que o dióxido de carbono gasoso agiu por intermédio do meio de cultivo de modo a induzir a linhagem selvagem E9 a exibir uma resposta de maneira específica frente ao ambiente dependendo dos nutrientes disponibilizados. Uma das conseqüências desta especificidade foi, como já analisada, a produção de massa micelial (figura 5.10); outra conseqüência foi percebida pela resposta adaptativa aos estímulos do ambiente evidenciada pelo pH do meio de cultivo onde a linhagem se desenvolveu.

Verificou-se que o meio MM permitiu à linhagem E9 expressar a ação do gás por intermédio da variação do pH mais facilmente do que o meio com milhocina, mostrando um possível efeito tamponante existente no meio CS. Apesar de a variação dos valores médios de pH entre os meios com milhocina (com e sem o gás) até 48 horas

de desenvolvimento ter sido pequena percebeu-se, pela produção de massa micelial (item 5.6.1) que o gás foi eficaz em impedir o desenvolvimento.

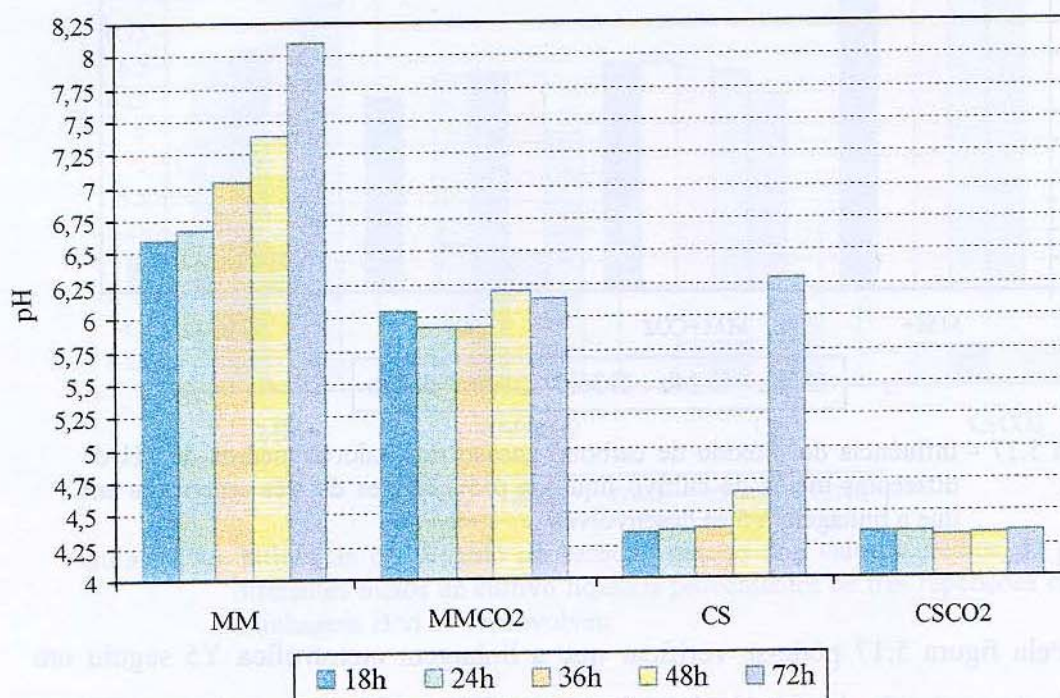


Figura 5.16 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que a linhagem E9 se desenvolveu

Vale lembrar, no entanto, que o pH do ambiente pode interferir intracelularmente com moléculas necessárias ao desenvolvimento específico, bem como extracelularmente, alterando inclusive a produção de metabólitos que gerariam outras futuras respostas pelo fungo numa cadeia de síntese molecular (McIntyre; McNeil, 1997a, b; St.Leger; Nelson; Screen, 1999).

Assim parece possível que a ação do CO_2 no desenvolvimento da linhagem E9 se deu primariamente por interferência na aquisição de nutrientes importantes para o desenvolvimento além de causar a mudança de pH inicial.

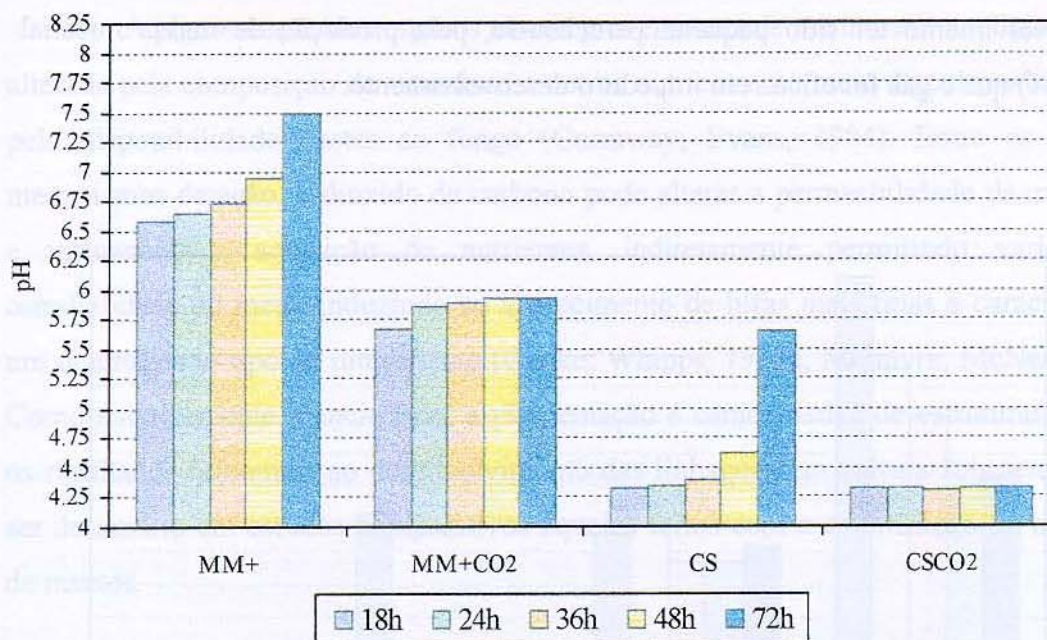


Figura 5.17 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que a linhagem Y5 se desenvolveu

Pela figura 5.17 pôde-se verificar que a linhagem auxotrófica Y5 seguiu um padrão adaptativo à ação do dióxido de carbono semelhante à linhagem selvagem E9.

Vemos que o desenvolvimento da linhagem Y5 no meio MM^+CO_2 interferiu com o pH deste meio de cultivo, o que se mostrou coerente com sua produção de massa micelial (figura 5.11). Em milhocina, o desenvolvimento da linhagem permitiu um aumento do pH que se inicia em 48 horas e foi nítido em 72 horas, o que também coincidiu com a produção de massa micelial; já quando o gás foi injetado, percebeu-se que este aumento de pH não ocorreu, evidenciando que, apesar dos valores de pH em horas anteriores de desenvolvimento terem sofrido pouca alteração comparado com o meio onde não houve injeção do gás, a ação do dióxido de carbono foi traduzida no desenvolvimento e percebida também pela evolução do pH.

A figura 5.18 apresenta os valores médios de pH para a linhagem auxotrófica B/vi como representativos de um dos aspectos do desenvolvimento da linhagem em meios de cultivo com e sem dióxido de carbono.

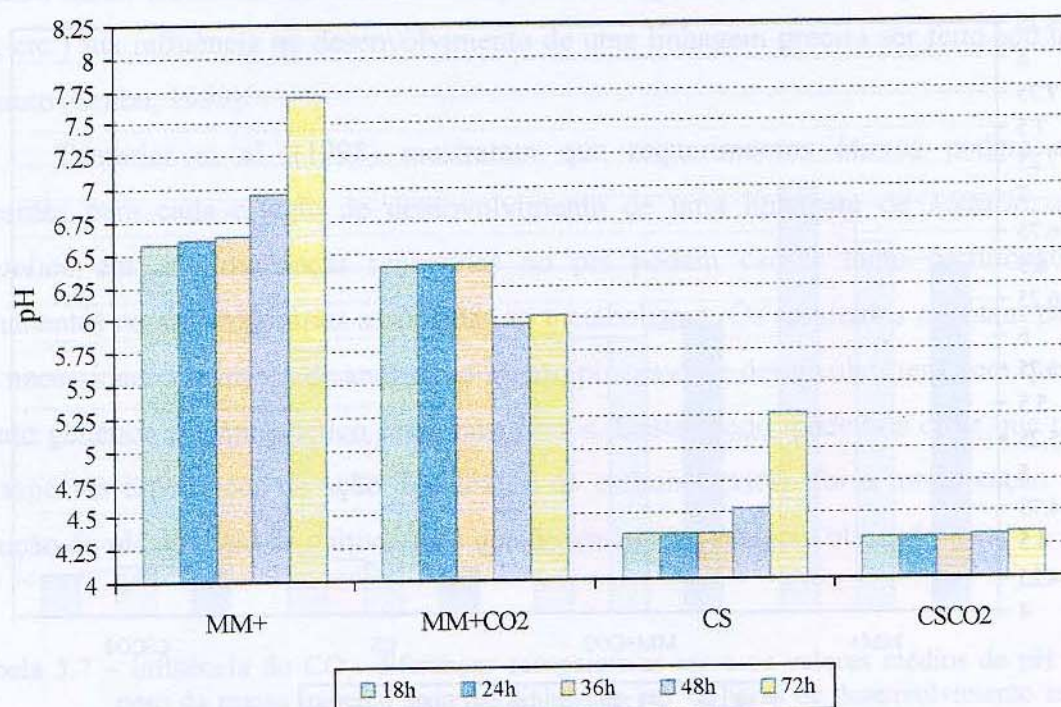


Figura 5.18 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que a linhagem B/vi se desenvolveu

Considerando que o crescimento da linhagem B/vi (figura 5.12) resultou em uma baixa interação com o meio de cultivo, provavelmente o desenvolvimento expresso pela evolução do pH do meio de cultivo independeu da produção efusiva de massa micelial (Butt; Goettel, 2000).

Em meio com milhocina, apesar da fartura de nutrientes, o dióxido de carbono parece tê-los tornado pouco acessíveis visto que ficaram impedidos de contribuir para o desenvolvimento da linhagem com a mesma eficácia que no meio sem o gás (figura 5.12). Comparativamente à linhagem selvagem E9 em 72 horas de desenvolvimento, a linhagem B/vi teve diferenças entre valores de pH em meio com e sem o gás menores que a linhagem E9, o mesmo se dando com a produção da massa micelial que poderia novamente indicar uma capacidade adaptativa da B/vi um pouco melhor em comparação com a E9, provavelmente devido a diferenças fisiológicas e estruturais entre as linhagens.

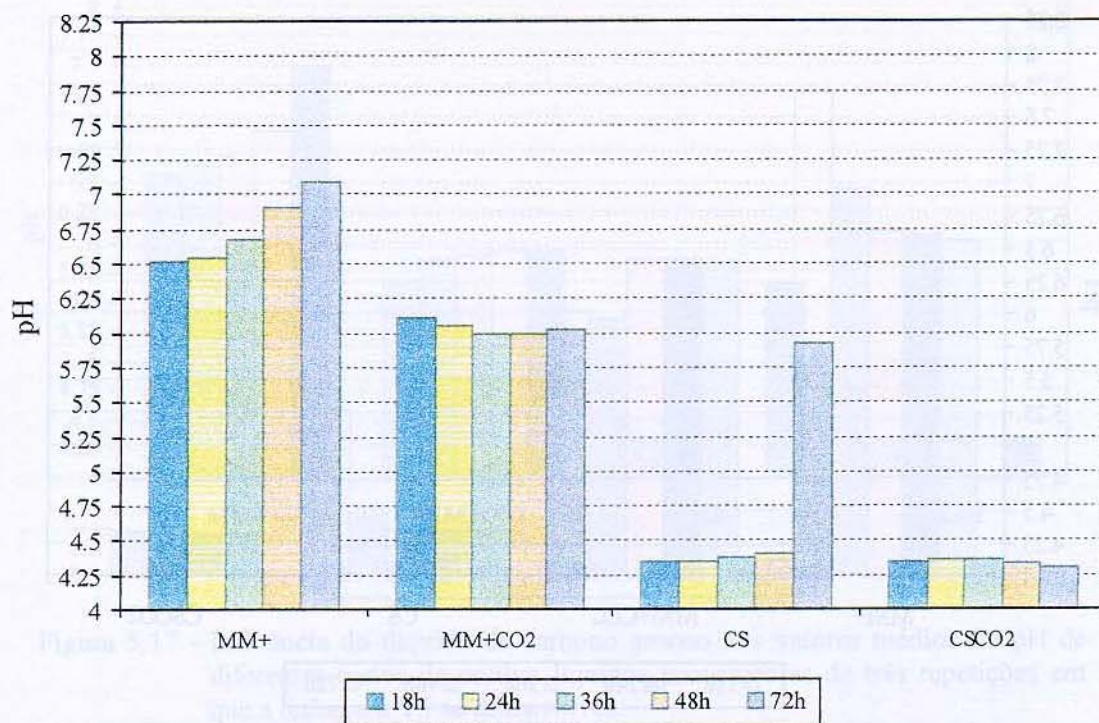


Figura 5.19 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que a linhagem X/vi se desenvolveu

Pela figura 5.19 verificou-se, mais uma vez um certo padrão adaptativo da linhagem auxotrófica ao meio em que o gás foi injetado. Entretanto, a X/vi foi a linhagem que em 72 horas de desenvolvimento teve as menores diferenças entre os valores de pH com e sem dióxido de carbono em meio MM^+ (Tabela 5.7), o mesmo se dando com as diferenças entre os valores médios para os pesos de massa seca neste mesmo tempo de desenvolvimento. Isto evidenciou que em meio MM^+ esta linhagem aparentemente foi a que melhor se adaptou à injeção do gás, não desconsiderando que seu crescimento também foi o menor neste meio de cultivo em relação às outras linhagens.

Assim, após 72 horas de desenvolvimento, a linhagem X/vi foi a que mostrou menores diferenças de valores de pH entre os meios MM^+ e MM^+CO_2 , em que também apresentou menores diferenças para peso de massa micelial seca; em meio com milhocina este perfil de resposta foi apresentado pela linhagem B/vi. Portanto, ainda que

podendo medir isoladamente determinado parâmetro (pH, osmolalidade, peso da massa seca, etc.) sua influência no desenvolvimento de uma linhagem precisa ser feito sob um conjunto (Szabo, 1999).

Tamerler et al. (1998) mostraram que requerimentos ótimos podem ser diferentes para cada estágio de desenvolvimento de uma linhagem de *Metarhizium anisopliae* em que mudanças repentinas no pH podem causar tanto perturbações permanentes como temporárias associadas ao metabolismo. Os resultados apontam para uma necessidade intrínseca de análise do inteiro processo de desenvolvimento em que o aparato genético e o epigenético estão envolvidos. Deste modo, podemos dizer que um dos aspectos específicos de ação do dióxido de carbono gasoso foi a modificação da evolução do pH do meio de cultivo, mas que dependeu da linhagem utilizada.

Tabela 5.7 – Influência do CO₂: diferenças comparativas entre os valores médios de pH e peso da massa micelial seca das linhagens em 72 horas de desenvolvimento em dois diferentes meios de cultivo líquidos, provenientes de três repetições

Linhagem	Δ pH		Δ Peso Seco (mg)	
	MM - MMCO ₂ *	CS - CSCO ₂	MM - MMCO ₂ *	CS - CSCO ₂
E9	1,950	1,943	64,10	439,93
Y5	1,560	1,320	59,09	310,80
B/vi	1,673	0,914	57,43	226,40
X/vi	1,060	1,610	30,20	303,90

* ou MM⁺ - MM⁺CO₂

Visando ainda verificar a influência do dióxido de carbono gasoso no pH foram também elaborados experimentos com a linhagem E9 em meios de cultivo, compostos à base de milho com diferentes viscosidade e concentrações de glicose.

De acordo com a figura 5.20, podemos perceber que o dióxido de carbono contribuiu mais para a queda de pH em meio MM que em meio com maior concentração de glicose, visto que maiores diferenças entre os valores médios de pH se encontram entre os meios MM e MMCO₂ do que em Gli e GliCO₂.

O gás permitiu um aparente tamponamento eficaz no meio com maior concentração de glicose.

O dióxido de carbono gasoso, pôde atuar no crescimento alterando-o (conforme item 5.6.1), conduzindo à necessidade de um determinado intervalo de tempo para a adaptação da linhagem; isto permitiria que a interação com o gás dissolvido fosse limitada pelo desenvolvimento das células fúngicas. A morfologia também se mostrou influenciada pelo gás como descrito no quadro 5.3. Como mostrado na tabela 5.5 a linhagem E9 germinou melhor em meio líquido quando a concentração de glicose foi maior, o que pode apontar para um efeito sinérgico da glicose ao dióxido de carbono gasoso no desenvolvimento da linhagem.

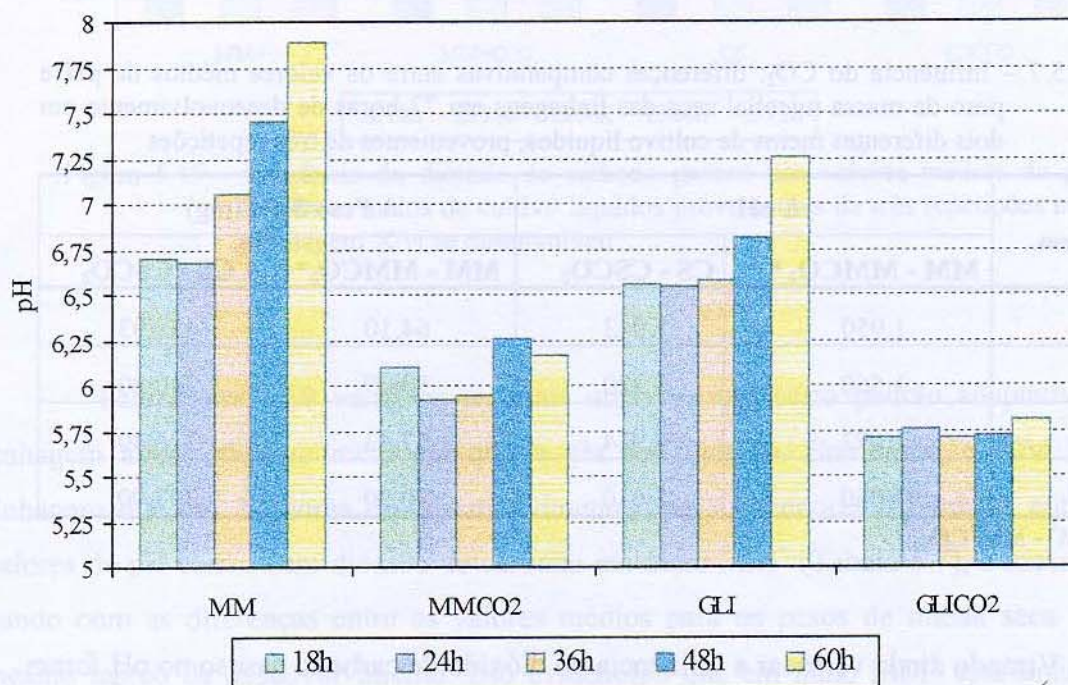


Figura 5.20 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios de pH em meios de cultivo líquidos provenientes de três repetições com duas diferentes concentrações de glicose (10g/l e 35g/l) em que a linhagem E9 se desenvolveu

Pela figura 5.21, observou-se um padrão de resposta à ação do dióxido de carbono em meios de cultivo compostos à base milho: houve um decréscimo gradual dos valores de pH, enquanto que o inverso ocorreu em meios onde não houve a injeção do

gás. Comparativamente, as diferenças entre valores médios de pH foram maiores entre os meios FM e FMCO₂.

Além do enriquecimento do meio de cultivo em função do milho, a viscosidade pode ter permitido um aprisionamento específico do dióxido de carbono gasoso de forma mais eficiente, modificando o tempo de contato das células fúngicas com o gás e induzindo a resposta específica em termos morfológicos, como descrito no quadro 5.3.

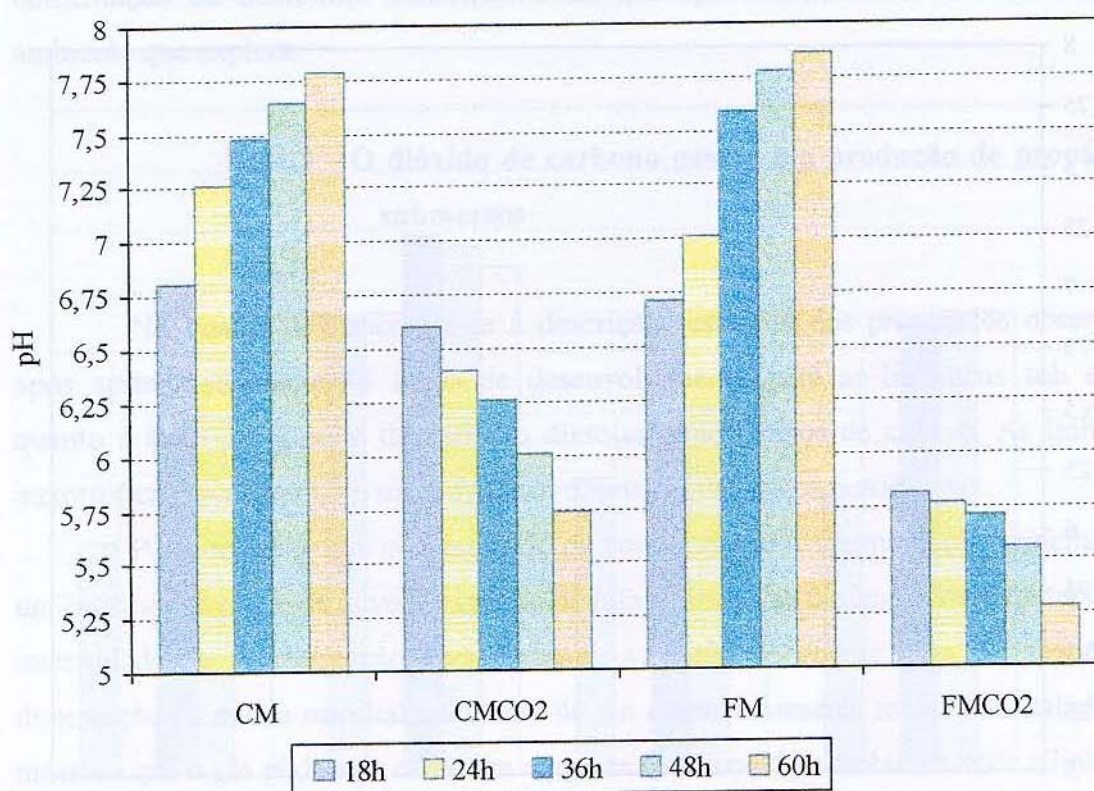


Figura 5.21 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios de pH de diferentes meios de cultivo líquidos compostos à base de milho provenientes de três repetições em que a linhagem E9 se desenvolveu

A ação do gás, apesar de se refletir na modificação da evolução do pH do meio, não modificou a cor do tapete micelial em determinados meios (quadro 5.3) mostrando que processos aí envolvidos provavelmente não dependeram diretamente do pH do meio de cultivo gerado pela injeção do gás. Mecanismos alternativos de produção de pigmentos (que muitas vezes se acham associados na respiração celular, metabolismo e

reprodução fúngica) podem ter sido favorecidos por intermédio da viscosidade do meio de cultivo.

Pela figura 5.22, novamente se observou um padrão de resposta à ação do dióxido de carbono em meios de cultivo compostos à base de glicose e milho: houve um decréscimo gradual dos valores de pH. No entanto o inverso não ocorreu em meios onde não houve a injeção do gás, como quando apenas os meios Gli ou CM ou FM foram utilizados isoladamente (figuras 5.20 e 5.21).

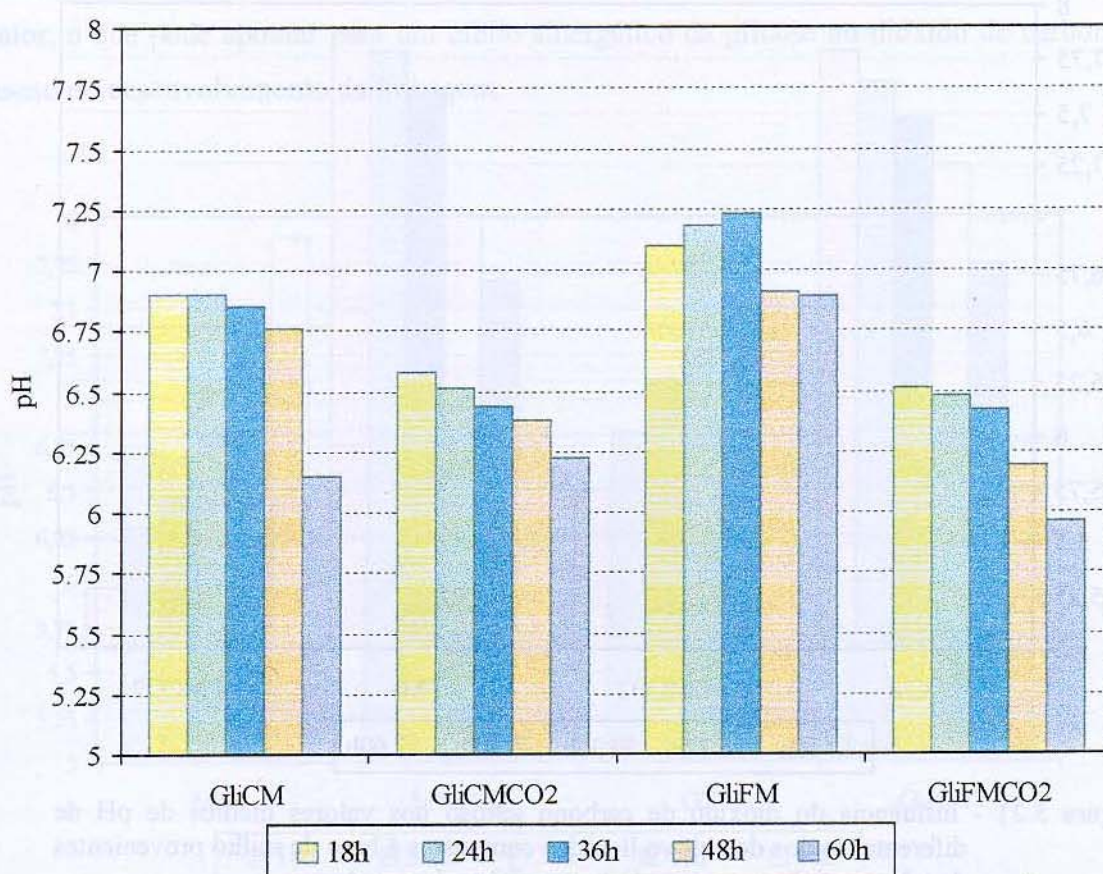


Figura 5.22 - Influência do dióxido de carbono gasoso nos valores médios do pH de diferentes meios de cultivo líquidos compostos à base de glicose e milho provenientes de três repetições em que a linhagem E9 se desenvolveu

A ação tamponante do gás em meio Gli cedeu parcialmente à riqueza e à variação da viscosidade dos meios compostos à base de milho. A resposta morfológica pode ser encontrada em parte no quadro 5.3. Verificou-se que após 60 horas de desenvolvimento o acréscimo de compostos à base de milho no meio com glicose (meios GliCM e GliFM) modificou a evolução do pH do meio no decorrer do desenvolvimento

da linhagem E9, mas não foi suficiente para induzir uma alteração na pigmentação micelial, o mesmo se dando com a injeção do gás. A ação da glicose na evolução do pH (figura 5.20) foi modificada pelo acréscimo dos compostos a base de milho mas permitiu, como agente regulador de desenvolvimento em fungos (Ronne, 1995), a manutenção da pigmentação micelial.

Estes resultados deverão corroborar com pesquisas que visem a análise da continuidade do processo infectivo iniciada pelo fungo *in vivo* e que estejam baseadas na constituição da hemolinfa conseqüente da interação do inseto de interesse com o ambiente que explora.

5.7.1.3 - O dióxido de carbono gasoso e a produção de propágulos submersos

No quadro 5.4 encontra-se a descrição resumida dos propágulos observados após aproximadamente 48 horas de desenvolvimento para as linhagens sob estudo quanto à ação do dióxido de carbono dissolvido nos meios de cultivo. As linhagens auxotróficas receberam, no meio de cultivo, seus suplementos nutricionais.

Pôde-se notar que o dióxido de carbono induziu à fragmentação semelhante a um processo precoce de envelhecimento de hifas, ainda que o número de fragmentos e a intensidade de fragmentação apresentassem variação de acordo com a linhagem. A diminuição da massa micelial resultante de um desenvolvimento mais lento (tabela 5.6) mostrou que o gás pôde agir como um reagente hostilizando o ambiente onde a linhagem esteve presente.

A fragmentação de hifas muitas vezes está associada com a exaustão de nutrientes e os efeitos da injeção de dióxido de carbono gasoso na morfologia de fungos filamentosos podem variar sendo deletério ou estimulante (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000; McIntyre; McNeil, 1998). Mecanismos diversos têm sido propostos para a ação do dióxido de carbono visto que por poder alterar o pH extracelular também é capaz de afetar reações enzimáticas intracelulares ou penetrar no compartimento mitocondrial do citoplasma celular (McIntyre; McNeil, 1997a, b). Assim, não é difícil concluir que o

fungo derivará de seu potencial genético a adaptação necessária a um modo de sobrevivência para vencer a adversidade do meio.

Quadro 5.4 – Influência de diferentes meios de cultivo líquidos com e sem dióxido de carbono no tipo de propágulos submersos das linhagens em aproximadamente 48 horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições

Linhagem	Meio de cultivo			
	MM*	MMCO ₂ #	CS	CSCO ₂
E9	(Fialoconídios)	Fragmentos de hifas	Conídios submersos	Fragmentos de hifas
Y5	(Hifas)	Fragmentos de hifas	Conídios submersos	Fragmentos de hifas; conídios submersos
B/vi	(Hifas)	Início de fragmentação de hifas	Conídios submersos	Fragmentos de hifas
X/vi	(Hifas)	Início de fragmentação de hifas	Conídios submersos	Fragmentos de hifas

* ou MM⁺

ou MM⁺CO₂

Fragmentos de hifas podem ser encontrados dentro de insetos (corpos hifais) e são capazes de dar continuidade ao processo infectivo (Zacharuk, 1971). As linhagens E9 e Y5 em meio MM com dióxido de carbono foram as que primeiro apresentaram fragmentos de hifas visíveis. Este resultado, associado aos dados da tabela 5.5 em que ambas as linhagens germinaram melhor em meio líquido quando a glicose esteve presente em maior concentração, aponta para um possível envolvimento do dióxido de carbono na ação da glicose sobre o desenvolvimento das linhagens, visto que a exaustão de glicose (no caso, um possível impedimento de acesso a este reagente causado pelo gás) muitas vezes está associada à fragmentação de hifas (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000).

Em conjunto, portanto, dióxido de carbono e glicose podem ter definido o processo de fragmentação. A constituição da hemolinfa, portanto, poderá influir na produção de propágulos dependendo da linhagem.

O quadro 5.5 resume a ação do dióxido de carbono gasoso na morfologia microscópica apenas da linhagem E9 em diferentes meios de cultivo à base de glicose e milho.

A alteração nos valores medidos para o pH provocada pela injeção do dióxido de carbono isoladamente não justificaria o aparecimento das diferentes estruturas morfológicas, visto que em meios com evolução de pH muito parecidos (MM e CM, por exemplo) houve preferência pela produção de propágulos específicos, enquanto que em meios com evolução de pH diferentes (MMCO₂ e FM CO₂, por exemplo) pôde-se apreciar o aparecimento de estruturas semelhantes. O efeito preciso do pH no fungo é difícil de ser avaliado em virtude da complexidade de outros fatores envolvidos; no entanto, sabe-se que a habilidade de adaptação pode estar relacionada à manutenção de um balanço iônico e de um pH interno desejáveis (Cooke; Whipps, 1993d).

O efeito do pH em quantidades de CO₂ dissolvido e suas formas iônicas associadas são relevantes. Entretanto o pH também afeta a disponibilidade de nutrientes na forma iônica, alterando dramaticamente a solubilidade de muitos ions de metal pesado (McIntyre; McNeil, 1998).

A alteração da permeabilidade celular pode ocorrer em função do pH do meio de cultivo e vale observar que a natureza do composto responsável por esta alteração é de fundamental importância para a resposta adaptativa do fungo, como pode ser notado pelos valores de pH expostos nas figuras 5.20 a 5.22 e pelo quadro 5.5. O dióxido de carbono, independente de seu modo de ação, induziu à fragmentação de hifas. Clamidosporos, tipo celular que frequentemente está associado a situações de baixa atividade metabólica, é eficiente em armazenamento de nutrientes e parece estar envolvido primariamente na manutenção da viabilidade do fungo em períodos de condições ambientais desfavoráveis, como durante o processo de morte do inseto hospedeiro, antes da produção de conídios (Zacharuk, 1971).

Quadro 5.5 – Ação do dióxido de carbono gasoso na morfologia microscópica da linhagem E9 em diferentes meios de cultivo líquidos à base de glicose e milho provenientes de três repetições

Meio de Cultivo	Morfologia e propágulos submersos predominantes (em horas de desenvolvimento)
MM	[Fialoconídios] (36h)
MMCO ₂	Fragmentos de hifas (48-60h)
GLI	Brotamento lateral de hifas (18h); fragmentos de hifas (48h); esferoplastos, [fialoconídios] (60h)
GLI CO ₂	[Esferas refringentes nas extremidades de hifas] (36h)
CM	[Esferas refringentes] (36h); clamidosporos (36h); conídios submersos (48h)
CM CO ₂	PR (36h); brotamento lateral de hifas (36h); clamidosporos (36h); fragmentos de hifas (48h)
FM	Clamidosporos intercalares (48h); clamidosporos livres, [fialoconídios] (60h)
FM CO ₂	[Esferas refringentes livres] (24h); fragmentos de hifas (36h)
GLI CM	Clamidosporos (36h); [fialoconídios] (60h)
GLI CM CO ₂	[Esferas refringentes nas extremidades de hifas] (36h); brotamento lateral (72h)
GLI FM	[Esferas refringentes livres] (36h); clamidosporos intercalares (60h); brotamento lateral (60h)
GLI FM CO ₂	Esferoplastos (48h), [fialoconídios] (60h)

Os clamidosporos foram observados *in vitro* em meios onde milho foi acrescentado na forma dos meios de cultivo CM e FM (com e sem glicose) e só foram vistos onde o gás foi injetado no meio CMCO₂. Os processos envolvidos na produção específica de propágulos podem retratar características desejáveis em fase distintas de

colonização pelo fungo *in vivo*. Apesar de este nem sempre ser o caso, atividade enzimática, produção de proteínas de estresse e metabólitos podem ser indicativos da preferência de proliferação por intermédio de um certo tipo celular de propágulo, o que pode auxiliar no melhoramento direcionado das linhagens (Finney; Langtimm; Soll, 1985; Swoboda et al., 1994).

5.7.2 – O desenvolvimento da linhagem E9 em pH baixo

Foram elaborados três diferentes meios de cultivo e procedeu-se como descrito nos itens 4.17.2, 4.17.3 e 4.17.4. Em um destes meios ofereceu-se diferentes concentrações de milhocina; em outro, diferentes concentrações de ácido láctico, e no último meio de cultivo foi fornecido ácido clorídrico como fator de estímulo para a variação do pH.

Considerando que alguns fungos como *Candida albicans* e *Mucor rouxii* (Larone, 1995) podem alcançar o dimorfismo morfológico por intermédio da alteração do pH do meio de cultivo, um breve estudo com a linhagem E9 foi feito visando a obtenção de propágulos específicos em meios de cultivo com valores de pH abaixo tanto daquele em que as linhagens são mantidas em laboratório como do pH médio avaliado para a hemolinfa de *Anastrepha fraterculus*. Os experimentos se justificaram, no entanto, visto que apesar do tamponamento da hemolinfa ser eficaz, seu pH pode ser regulado e modificado de acordo com a dieta alimentar e em determinadas fases de desenvolvimento do inseto (por exemplo, durante o vôo), de acordo com Woodring (1985).

Um ambiente pode ser considerado extremo para muitos fungos quando a produção de biomassa é restringida por uma imposição contínua de estresse. Isto pode ser devido ao modo de ação de um fator de estresse simples como por exemplo carência ou excesso de nutrientes, temperatura ou pH extremos, ou baixa disponibilidade de água. Em muitas situações o crescimento pode ser preservado, mas estresses severos somente podem ser tolerados pelo fungo se este possui características fisiológicas apropriadas ou se adapta por uma alteração temporária no seu padrão de desenvolvimento (Cooke; Whipps, 1993d).

5.7.2.1 - O pH baixo em meio com diferentes concentrações de milhocina

Conforme mostrado no item 5.4, a quantidade de milhocina influenciou a osmolalidade do meio de cultivo de modo positivo. Quanto à dinâmica do pH do meio de cultivo, a figura 5.23 resume as médias de um conjunto de valores obtidos durante o desenvolvimento da linhagem E9.

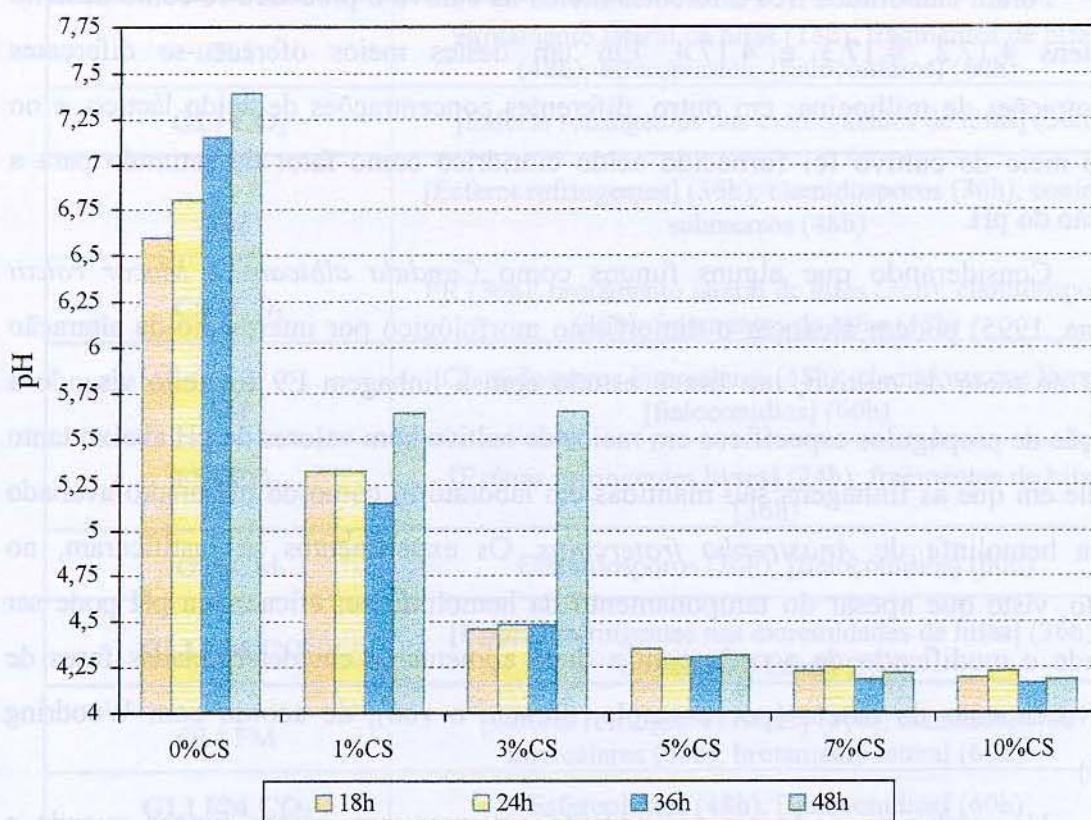


Figura 5.23 – Influência da concentração de milhocina no pH do meio de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que se desenvolveu a linhagem E9

A fim de avaliar o grau de dispersão dos valores medidos, foi feita análise de variância para dois fatores, seguida pelo Teste F (nível 5%) e pelo Teste Bilateral de Dunnett (nível 5%). Com um valor de 0,00124 para o quadrado médio do resíduo (QMR), Coeficiente de Variação de 0,665% e pelo Teste de Dunnett para as médias dos valores pôde-se verificar a necessidade de uma diferença mínima de 0,077 em relação à

referência. Assim, entre as horas de desenvolvimento dentro de cada tratamento específico (0%, 1%, 3%, 5%, 7% e 10%CS) em 0% CS todos os valores diferem entre si; em 1%CS e 3%CS apenas o valor em 48 horas de desenvolvimento difere dos demais; e em 5%, em 7% e em 10%CS não há diferença entre os valores. Comparação entre os tratamentos dentro de cada hora de desenvolvimento apontou para diferença não significativa entre 7% e 10% CS, bem como para 3% e 5% CS exceto em 48 horas.

O aparecimento de propágulos no decorrer do desenvolvimento da linhagem E9 em meios com diferentes concentrações de milhocina pode ser visto no quadro 5.6.

Quadro 5.6 – Influência da concentração de milhocina no pH do meio de cultivo MM e na produção de propágulos da linhagem E9 em 48 horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições

% CS	pH	Propágulos
0	7,39	Fialoconídios
1	5,64	Brotamento lateral de hifas; conídios submersos
3	5,65	Conídios submersos; Fragmentação de hifas
5	4,31	Fragmentos de hifas; germinação de fragmentos
7	4,23	Filamentos
10	4,19	PR

Pôde-se observar que, apesar de as diferenças entre determinados valores de pH não terem sido estatisticamente significativas, a variação nos tipos de propágulos foi evidente. Tanto a osmolalidade do meio, possivelmente refletindo o aumento de nutrientes, como a disponibilidade e aquisição destes para o fungo (Cooke; Whipps, 1993c) podem ter sido auxiliadas pela alteração do pH proporcionando esta variedade de propágulos. Portanto, a obtenção de propágulos, neste caso, parece indicar um controle

ambiental associado a respostas morfológicas específicas determinadas por características fisiológicas da linhagem. A milhocina contém componentes que podem atuar como fatores epigenéticos que induziriam às respostas observadas. Vale lembrar que numa concentração de 5% a milhocina induziu uma resposta morfológica em fragmentos de hifas semelhante àquela ao dióxido de carbono gasoso, que como os filamentos, têm sido relacionados com a produção de metabólitos em fungos filamentosos (Gibbs; Seviour; Schmid, 2000).

5.7.2.2 - O pH baixo em meio com diferentes concentrações de ácido láctico

Com base na concentração de ácido láctico existente na milhocina, foram confeccionados os diferentes meios de cultivo. A figura 5.24 resume as médias de um conjunto de valores obtidos durante o desenvolvimento da linhagem E9 em diferentes concentrações de ácido láctico. A fim de avaliar o grau de dispersão dos valores medidos, foi feita análise de variância para dois fatores, seguida pelo Teste F (nível 5%) e pelo Teste Bilateral de Dunnett (nível 5%). Com um valor de 0,00043129 para o quadrado médio do resíduo (QMR), Coeficiente de Variação de 0,53% e pelo Teste de Dunnett para as médias dos valores pôde-se verificar a necessidade de uma diferença mínima de 0,04527 em relação à referência.

Assim, todos os valores médios de pH nos tratamentos com diferentes concentrações de ácido láctico foram significativamente diferentes entre si para todas as horas de desenvolvimento; comparando a evolução do pH dentro de cada tratamento, apenas os valores para 36 e 48 horas em 0,1% de ácido láctico e em 36 horas para 0,3% de ácido láctico foram significativamente diferentes dos demais.

Os propágulos que surgiram no decorrer do desenvolvimento da linhagem E9 em meios com diferentes concentrações de ácido láctico pode ser visto no quadro 5.7.

Diferentemente do observado para as diversas concentrações de milhocina, o quadro 5.7 apresenta um momento no desenvolvimento da linhagem E9 em que as diferenças entre determinados valores de pH foram estatisticamente significativas; no entanto, a variação nos tipos de propágulos não foi evidente.

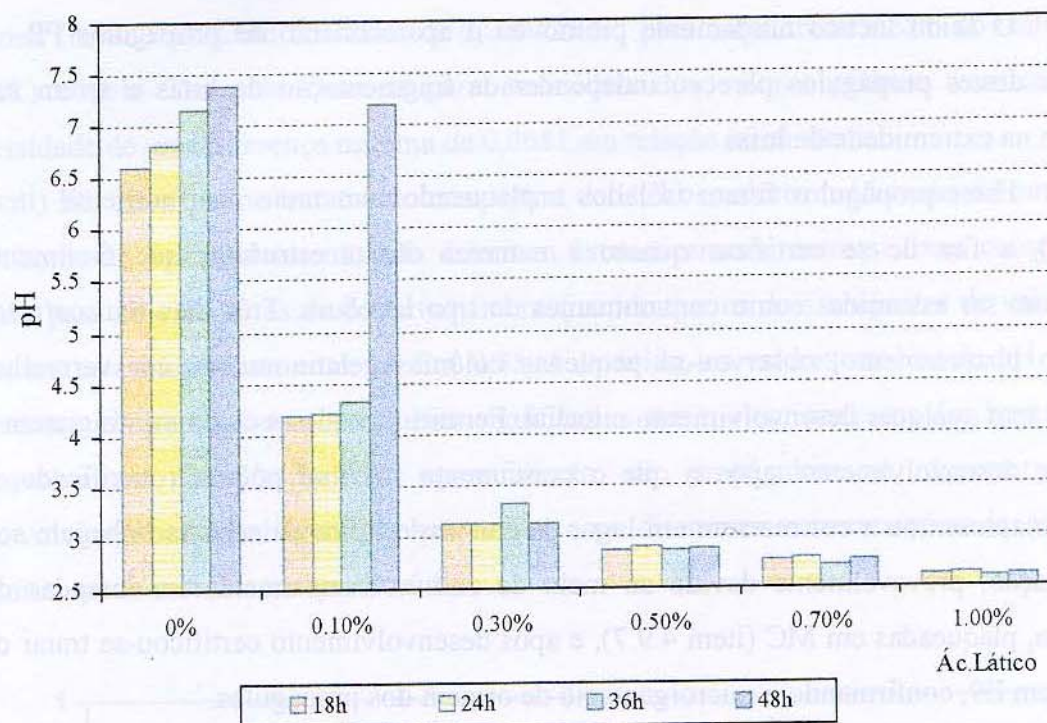


Figura 5.24 – Influência da concentração de ácido láctico no pH do meio de cultivo líquidos provenientes de três repetições em que se desenvolveu a linhagem E9

Quadro 5.7 – Influência da concentração de ácido láctico no pH do meio de cultivo e na produção de propágulos da linhagem E9 em 36 horas de desenvolvimento

% Ác. Láctico	pH	Propágulos
0	7,15	Fialoconídios
0,1	4,32	PR; (Inchamento da extremidade de hifas)
0,3	3,33	PR; (áreas escuras dentro das hifas)
0,5	2,86	PR; (áreas escuras dentro das hifas)
0,7	2,71	(Desenvolvimento paralisado na germinação)
1,0	2,60	(Desenvolvimento paralisado na germinação)

O ácido láctico nitidamente promoveu o aparecimento de propágulos PR. A origem destes propágulos pareceu independe da fragmentação de hifas e terem sua origem na extremidade de hifas

Estes propágulos foram isolados e plaqueados em meio ágar-nutriente (item 4.9.13), a fim de se certificar quanto à natureza destas estruturas que facilmente poderiam ser assumidas como contaminantes do tipo levedura. Três dias transcorridos após o plaqueamento, observou-se pequenas colônias gelatinosas de cor vermelho-escuro sem qualquer desenvolvimento micelial. Permitiu-se que as colônias atingissem 9 dias de desenvolvimento, após o que o crescimento micelial pôde ser verificado; o micélio apresentou a cor marrom em lugar da cor verde típica da suposta linhagem sob observação, provavelmente devido ao meio de cultivo. Amostras foram tomadas do micélio, plaqueadas em MC (item 4.9.7), e após desenvolvimento certificou-se tratar da linhagem E9, confirmando o microrganismo de origem dos propágulos.

Este resultado pode nos conduzir a algumas conclusões: existe um limite de valor para o pH que incorpora um espectro de propágulos, no caso, PR; o aparecimento de propágulos do tipo PR independe do pH, mas depende da concentração do ácido láctico; e finalmente, a variação do pH com a concentração de ácido láctico é significativa mas não suficiente para o aparecimento dos propágulos. Estes propágulos PR também foram vistos tanto livres como dentro de hifas em desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*.

5.7.2.3 – O pH baixo em meio de cultivo com diferentes concentrações de ácido clorídrico

Foram confeccionados meios de cultivo com duas concentrações diferentes de HCl. Na titulação do HCl foram obtidos valores que permitiram a escolha de duas concentrações do ácido para se obter um pH inicial próximo àquele dado por 4% de milhocina. Na figura 5.25 apresentou-se os valores médios de pH do meio de cultivo onde a linhagem E9 se desenvolveu. Surpreendentemente, o pH decresceu bastante após 18 horas de desenvolvimento (cerca de 6 horas após a introdução do ácido).

A fim de avaliar o grau de dispersão dos valores medidos, foi feita análise de variância para dois fatores, seguida pelo Teste F (nível 5%) e pelo Teste Bilateral de

Dunnett (nível 5%). Com um valor de 0,000125795 para o quadrado médio do resíduo (QMR) e pelo Teste de Dunnett para as médias dos valores pôde-se verificar a necessidade de uma diferença mínima de 0,0681 em relação à referência.

Foi visto que no tratamento com 0,4ml de HCl os valores médios de pH em 18 e 24 horas de desenvolvimento não diferiram estatisticamente entre si, bem como os valores para 36 e 48 horas de desenvolvimento, sendo que os dois conjuntos de valores diferiram estatisticamente entre si. Em 0,55ml de ácido, os valores médios de pH não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si em nenhuma das horas de desenvolvimento analisadas. O aparecimento de propágulos no decorrer do desenvolvimento da linhagem E9 em meios com diferentes concentrações de ácido clorídrico pode ser visto no quadro 5.8.

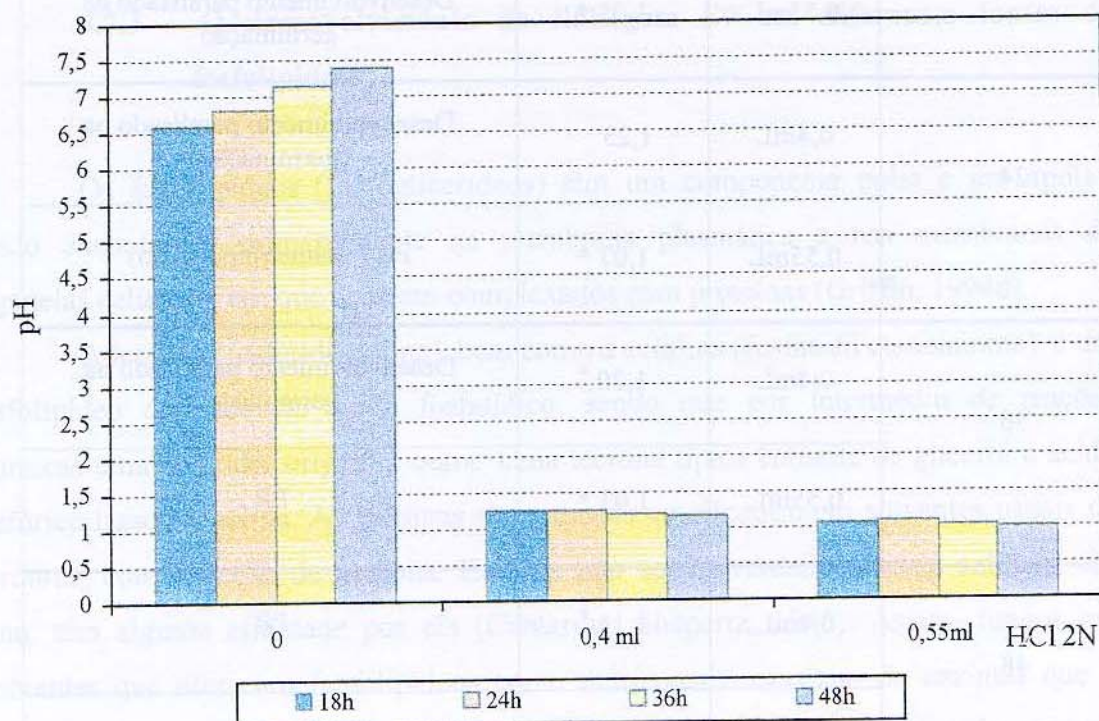


Figura 5.25 – Influência da concentração de ácido clorídrico no pH do meio de cultivo líquido provenientes de três repetições em que se desenvolveu a linhagem E9

Pôde-se verificar que a linhagem seguiu um curso de desenvolvimento em 0,4 mL de HCL ligeiramente diferente que em 0,55mL, visto que em menor concentração de

ácido os propágulos PR apareceram mais tardiamente que em maior concentração. Notou-se que o pH do meio de cultivo baixou até um valor estatisticamente menor para que os propágulos aparecessem em 0,4 mL de HCL.

Quadro 5.8 – Influência da concentração de ácido clorídrico no pH do meio de cultivo líquido e na produção de propágulos da linhagem E9 em diferentes horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições

Horas de desenvolvimento	HCl (mL)	pH	Propágulos e morfologia microscópica
18	0,4mL	1,25	Desenvolvimento paralisado na germinação
	0,55mL	1,05 *	Desenvolvimento paralisado na germinação
24	0,4mL	1,25	Desenvolvimento paralisado na germinação
	0,55mL	1,07 *	PR (diâmetro pequeno)
36	0,4mL	1,20 #	Desenvolvimento paralisado na germinação
	0,55mL	1,03 *	PR
48	0,4mL	1,15 #	PR
	0,55mL	1,00 *	PR

* Valores com diferenças não significativas estatisticamente

Valores com diferenças não significativas estatisticamente

Considerando que a decomposição do HCL pode gerar íons e que materiais inorgânicos podem formar componentes importantes da atividade osmótica em fungos

(Griffin, 1994b), um sistema de transporte em nível de parede celular pode ser necessário e variar com a morfologia celular. Verificou-se que o aparecimento de propágulos do tipo PR parece não depender diretamente apenas dos baixos valores de pH em HCL mas também de fatores fisiológicos da linhagem que, interagindo com o meio de cultivo e com seus nutrientes, responderia por meio da específica alteração morfológica de suas células.

Visto que a composição de íons inorgânicos no plasma de insetos difere com as ordens e com espécies, e que aí a concentração de íons H^+ pode ser controlada inclusive por hormônios (Woodring, 1985), deve-se perceber a importância do pH traduzido por estes íons no desenvolvimento e melhoramento das linhagens que poderiam servir como agentes biocontroladores de pragas *in vivo*.

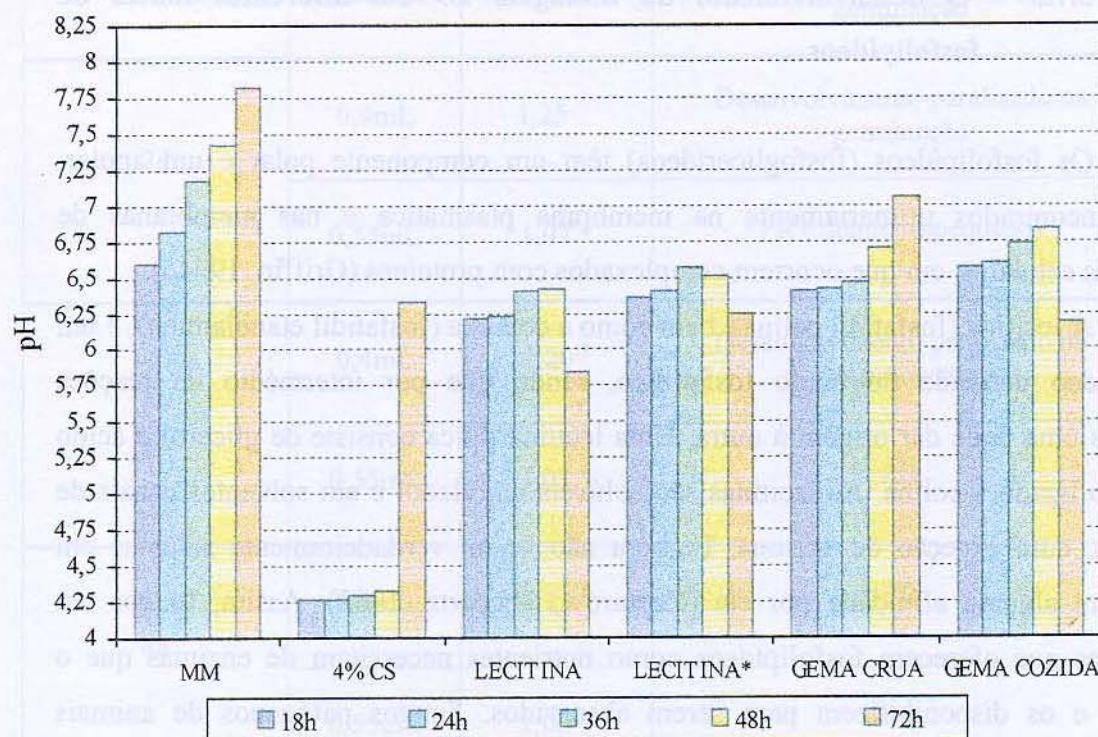
5.7.3 – O desenvolvimento da linhagem E9 em diferentes fontes de fosfolipídeos

Os fosfolipídeos (fosfoglicerídeos) têm um componente polar e um apolar, sendo encontrados primariamente na membrana plasmática e nas membranas de organelas celulares, em que ocorrem complexados com proteínas (Griffin, 1994d).

A lecitina (fosfatidil colina), bem como a cefalina (fosfatidil etanolamina), é um fosfolipídeo derivado do ácido fosfatídico, sendo que por intermédio de reações químicas uma pode dar origem à outra. Uma lecitina típica consiste de glicerol e ácido fosfórico ligado à colina. As lecitinas são solúveis em álcool e em solventes usuais de gorduras, com exceção de acetona. Embora não sejam verdadeiramente solúveis em água, têm alguma afinidade por ela (Cantarow; Shepartz, 1963). Assim, fungos em ambientes que oferecem fosfolipídeos como nutrientes necessitam de enzimas que o digiram e os disponibilizem para serem absorvidos. Fungos patógenos de animais produzem muitas exoenzimas que podem estar envolvidas na potogenicidade incluindo proteases, lipases, fosfatases alcalina e ácida, plasmacoagulase, e neuraminidase. Algumas destas exoenzimas podem estar envolvidas apenas na aquisição de nutrientes, podendo ter suas atividades induzidas ou reprimidas por glicose, sacarose ou galactose.

Assim, a correlação entre a patogenicidade e estas exoenzimas requer demonstração experimental eficaz de seus envolvimento na patogênese (Griffin, 1994b).

Em fungos, fosfolipases são geralmente ligadas à parede e reprimidas pela presença de monossacarídeos, dissacarídeos ou glicerol, e são induzidas por triglicerídeos, ácidos graxos e lecitina. A utilização de lipídeos pode ser de particular importância para alguns fungos entomopatogênicos uma vez que, junto com quitina e proteína são os maiores constituintes da cutícula de insetos (Cooke; Whipps, 1993c). Considerando que as mudanças na dieta de insetos podem conduzir à variação na constituição da hemolinfa quanto à composição de fosfolipídios (Dwivedy; Bridges, 1973) os resultados apresentados deverão ser de contribuição em estudos sobre o controle de pragas de insetos.



* Autoclavada

Figura 5.26 – Valores médios de pH em meios de cultivo líquidos MM, CS e em meios acrescidos com fosfolipídeos onde a linhagem E9 se desenvolveu, provenientes de três repetições

Considerando que a gema de ovo contém uma quantidade apreciável de fosfatidil colina (Cantarow; Shepartz, 1963) foram elaborados meios de cultivo com lecitina (autoclavada ou filtrada) e com gema de ovo (cozida ou crua), visando verificar a influência de fosfolipídeos na morfologia de células fúngicas.

Quadro 5.9 – Desenvolvimento da linhagem E9 em meios de cultivo líquidos acrescidos com fosfolipídeos, provenientes de três repetições

Horas de desenvolvimento	Meio de cultivo			
	Lecitina	Lecit. autoclav.	Gema crua	Gema cozida
18	Em desenvolvimento	Em desenvolvimento	Em desenvolvimento	Em desenvolvimento
24	Hifas finas	Hifas finas	Hifas em espessamento	Hifas grossas
36	Hifas finas e longas	Hifas finas e longas contendo pequenas esferas refringentes	Hifas grossas	Hifas grossas
48	Regiões escuras dentro das hifas	Regiões escuras dentro das hifas *	Células oidiais; <u>brotamento lateral</u>	Hifas contendo pequenas esferas refringentes
72	<u>Fragmentos de hifas</u> contendo pequenas esferas refringentes	Pequenas esferas refringentes livres no meio; sem fragmentos	<u>Fragmentos de hifas</u>	Pequenas esferas refringentes livres no meio; sem fragmentos

* Regiões formadas pelo ajuntamento das pequenas esferas refringentes
Elementos sublinhados referem-se a estruturas consideradas propágulos

Na figura 5.26 encontram-se os representados os valores médios de pH em meios de cultivo MM, CS e em meios acrescidos com fosfolipídeos onde a linhagem E9 se desenvolveu e no quadro 5.9 encontra-se a avaliação morfológica feita para a linhagem E9 nos meios de cultivo acrescidos com fosfolipídeos.

Pôde-se observar que o aparecimento de propágulos do tipo fragmento de hifas só foi evidente nos meios onde não houve aquecimento prévio da fonte de fosfolipídeos, provavelmente indicando certa especificidade quanto à aquisição de nutrientes sob determinada configuração estrutural, uma vez que as variações entre os valores médios de pH não devem justificar este resultado. Deve-se observar, no entanto, que os fragmentos de hifas em meio com gema crua não mostraram conter as pequenas esferas refringentes observadas em meio com lecitina não autoclavada. Quando o aquecimento foi previamente utilizado na fonte de fosfolipídeos, houve preferencialmente a produção e liberação de pequenas esferas refringentes no meio de cultivo que necessitam ser submetidas a ensaios posteriores a fim de se certificar de sua capacidade de reprodução e diferenciação.

As regiões escuras que se formaram nos meios com lecitina compararam-se às aquelas observadas no processo dimórfico do patógeno humano *Blastomyces dermatitidis*. Neste fungo, fragmentos de hifas originários de oidias e contendo um citoplasma granular, foram denominados de blastosporos por certos autores, e tidos como responsáveis pelo parasitismo celular daquele microrganismo (Howard; Herndon, 1960).

Este resultado deve contribuir em estudos da indução de produção de enzimas lipolíticas envolvidas no processo de infecção de insetos por *Metarhizium anisopliae* associadas com alterações morfológicas que surgem em resposta ao ambiente onde o fungo se desenvolve. Estes resultados permitem inferir que a morfologia, neste caso, foi alterada em resposta à disponibilização de nutrientes no meio de cultivo, possivelmente empregando mecanismos de adaptação distintos.

5.7.4 – Desenvolvimento da linhagem E9 em diferentes fontes de nitrogênio: Aminoácidos e Sulfato de amônio

Uma fonte de nitrogênio é indispensável para o crescimento e desenvolvimento de fungos que o requerem para a síntese de uma variedade de constituintes celulares criticamente importantes, incluindo aminoácidos e proteínas; pirimidinas, purinas e ácidos nucleicos; várias vitaminas; glucosamina e quitina. Muitos fungos são capazes de

utilizar fontes inorgânicas de nitrogênio tais como amônio, bem como fontes orgânicas tais como aminoácidos (Szabo, 1999).

Foram elaborados meios de cultivo com diferentes fontes de nitrogênio a fim de se verificar a influência destas no aparecimento de propágulos fúngicos, tendo os meios MM e CS (contendo 4% de milhocina) como referências de desenvolvimento. O meio de cultivo com aminoácidos teve como base aquele descrito por Grace para cultura de células de insetos (Grace, 1962), sabendo que certos aminoácidos se acham envolvidos na transição dimórfica de diversos fungos patogênicos (Griffin, 1994a). Os dois meios de cultivo líquidos com duas diferentes concentrações molares de sulfato de amônio foram elaborados considerando que esta fonte de nitrogênio pode existir em uma alta concentração no plasma de alguns insetos (Woodring, 1985) e pode estar envolvida no dimorfismo de patógenos como *Yarrowia lipolitica* (Szabo, 1999).

A tabela 5.8 apresenta valores médios de pH dos meios de cultivo após 48 horas de desenvolvimento da linhagem E9.

Tabela 5.8 – Valores médios de pH após 48 horas de desenvolvimento da linhagem E9 em meios líquidos com diferentes fontes de nitrogênio, provenientes de três repetições

Meio de cultivo	pH
MM	7,3
CS (4%)	4,89
Aminoácidos	8,08
Sulfato de Amônio 5mM	7,23
Sulfato de Amônio 25mM	6,47

Pôde-se notar que o maior valor médio de pH foi aquele apresentado no meio de cultivo com adição de aminoácidos (Tabela 5.8). Considerando que o pH do meio influencia a absorção de aminoácidos por determinar sua carga e a carga da proteína que serve como sua transportadora, permitindo ou não a ligação entre as duas moléculas

(Garraway; Evans, 1984; Voet, D.; Voet, J.G., 1995), uma concentração adequada de íons hidrogênio geralmente é requerida para uma melhor absorção de aminoácidos do meio de cultivo. De interesse é lembrar que uma das características mais distintivas do plasma de insetos é a alta concentração de aminoácidos livres, chegando a ser 20 vezes maior que a concentração típica do plasma de vertebrados (Woodring, 1985). As fontes de nitrogênio provenientes de aminoácidos presentes na hemolinfa geram efeitos diferenciais na produção de corpos hifais de entomopatógenos (Campbell et al., 1978). O padrão de aminoácidos livres na hemolinfa pode ser modificado por diversos fatores, mas estas moléculas desempenham seu papel mais importante como osmoreguladores por um processo ativo e regulado (McFarlane, 1985), sendo que o pH normal do plasma de insetos varia de 6,2-7,8. Analisando a evolução do pH do meio de cultivo com aminoácidos, foi interessante verificar que o fungo apresentou propágulos semelhantes àqueles na hemolinfa, como posteriormente relatado.

Pela tabela 5.8 pôde-se ainda verificar uma variação nos valores médios do pH após 48 horas de desenvolvimento entre os tratamentos com sulfato de amônio, sendo que uma maior concentração do reagente conduziu a um pH menor do meio de cultivo. Este resultado parece indicar uma melhor utilização do íon amônio visto que em muitos fungos isto se dá exatamente acompanhado por uma queda no pH quando determinados compostos à base de amônio são introduzidos no meio de cultivo (Garraway; Evans, 1985c; Voet, D.; Voet, J.G., 1995).

Quadro 5.10 – Pigmentação do tapete micelial da linhagem E9 em meios líquidos acrescidos com diferentes fontes de nitrogênio, provenientes de três repetições

Meio de Cultivo	Horas de desenvolvimento	
	48 horas	72 horas
MM	v*	V
CS (4%)	B	v
Aminoácidos	B	X
Sulfato de Amônio 5mM	B	V
Sulfato de Amônio 25mM	B	V

*v= verde claro V= verde escuro B= branco X= bege

O quadro 5.10 expressa as variações morfológicas provenientes das diferentes fontes de nitrogênio referentes à cor do tapete micelial, sendo que 48 horas bem como 72 horas de desenvolvimento mostraram-se convenientes para as considerações pertinentes a este parâmetro. Como mencionado anteriormente, pigmentos de fungos não são essenciais para o crescimento mas alterações associadas com carência de cor ou tendo composição de pigmento modificada (mutantes para cor de esporo) estão geralmente associadas com a reprodução visto que certos pigmentos podem agir como precursores de moléculas envolvidas no desenvolvimento (Ross, 1979a).

Pôde-se verificar que a pigmentação verde-escuro típica dos propágulos aéreos da linhagem E9 não foi alcançada no meio com aminoácidos, o que, juntamente com os resultados referentes ao aparecimento de propágulos específicos (quadro 5.11) parece confirmar a interferência do meio com o desenvolvimento da linhagem quanto à produção de propágulos logo nas primeiras horas de desenvolvimento. Assim, o meio elaborado com aminoácidos deverá merecer atenção quando propágulos tipo PR forem requisitados. Estes propágulos foram encontrados dentro de hifas bem como livres na hemolinfa de *Anastrepha fraterculus* após infecção com a linhagem E9.

Quadro 5.11 – Influência da fonte de nitrogênio na produção de propágulos da linhagem E9 em diferentes horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições

Meio de cultivo	Propágulos (em horas de desenvolvimento)
MM	Fialoconídios (48h)
CS (4%)	Conídios submersos (48h)
Aminoácidos	PR (24 h); brotamento lateral (48h)
Sulfato de Amônio 5mM	Fragmentos de hifas (48h)
Sulfato de Amônio 25mM	Fragmentos de hifas (36h); fragmentos inchados (36h); PR pequenas (36h)

Pelos quadros 5.10 e 5.11 percebe-se que a influência do sulfato de amônio no desenvolvimento da linhagem E9 mostrou-se mais evidente na produção de propágulos do que na pigmentação de futuras estruturas aéreas, sendo que numa maior concentração o sulfato de amônio favoreceu ao aparecimento de uma maior variedade de propágulos.

Visto que nem todas as células fúngicas em desenvolvimento se encontravam em um mesmo estado de aptidão às respostas ao meio ambiente e nem estavam igualmente distribuídas no espaço no meio de cultivo de tal forma a se exporem de maneira equitativa aos nutrientes, o efeito no desenvolvimento em meios com sulfato de amônio pode ser tanto devido a estas considerações quanto pode ser devido à concentração do composto em si.

Segundo Cooke; Whipps (1993c), o íon amônio além do seu efeito no crescimento pode estar envolvido como o regulador de sistemas em desenvolvimento em fungos podendo causar desde síntese e degradação de DNA até a inibição da síntese e da degradação de proteínas, sendo que o íon entra no metabolismo através da incorporação da glutamina (via enzima glutamina sintetase) ou do glutamato (via enzima glutamato desidrogenase). Portanto, pode ser exigida do fungo uma adequação da morfologia e/ou do conjunto enzimático em resposta específica ao estímulo do meio de cultivo, ou ainda um modo alternativo de sobrevivência por intermédio da produção de propágulos.

Os fragmentos de hifas conseqüentes do tratamento com sulfato de amônio também foram observados na hemolinfa de *Anastrepha fraterculus* após a infecção com *Metarhizium anisopliae*. O resultado apresentado corrobora a asserção de que apesar de o nitrogênio ser muito necessário ao desenvolvimento de fungos, a utilização de aminoácidos e amônio varia com o microrganismo; fatores como mecanismos de transporte, pH, temperatura, concentração, razão carbono/nitrogênio, requerimentos de energia, outros nutrientes, e o acúmulo intracelular podem afetar a utilização de aminoácidos e amônio (Jackson et al., 1997).

Considerando que na célula os aminoácidos usualmente servem como doadores de nitrogênio para a síntese de moléculas mais complexas e que uma fonte de nitrogênio particular em um meio de cultivo deve freqüentemente ser convertida intracelularmente a um aminoácido antes de ser utilizada (Garraway; Evans, 1984; Voet, D.; Voet, J.G., 1995), mecanismos específicos para a utilização de diferentes fontes de nitrogênio e suas

dependências da morfologia da célula fúngica necessitam, portanto, ser futuramente pesquisadas.

5.7.5 – Influência do inositol no desenvolvimento da linhagem E9 em meio de cultivo

O inositol, um fator de crescimento e de desenvolvimento para muitos fungos, foi testado quanto à sua capacidade de conduzir a linhagem selvagem E9 do fungo *Metarhizium anisopliae* à uma resposta ambiental relacionada com o aparecimento de propágulos e influência na morfologia do fungo. No quadro 5.12 pode-se encontrar os resultados relativos ao ensaio com inositol.

Quadro 5.12 - Influência do inositol na produção de propágulos da linhagem E9 em diferentes horas de desenvolvimento, provenientes de três repetições

Horas de desenvolvimento	Morfologia/Propágulos
18	Em desenvolvimento
24	Hifas com extremidades inchadas, redondas e refringentes
36	PR; estruturas elipsóides róseas semelhantes a conídios
48	PR; elipsóides róseos encapsulados; esporo em cor bege *
72	PR; elipsóides róseos encapsulados; esporo em cor amarela

*Valor médio do pH do meio de cultivo em 48 horas de desenvolvimento igual a 8,09

Como mostrado, o inositol favoreceu o aparecimento exclusivo de propágulos do tipo PR, conduzindo a uma alteração na cor do tapete micelial da linhagem E9. O inositol é um fator de crescimento de importante papel bioquímico visto que pode ser incorporado primeiramente na membrana interna e posteriormente conduzido à membrana plasmática via enzimas sensíveis que aí podem estar ligadas, sendo que a membrana pode ser estruturalmente modificada devido às diferenças na composição de fosfolipídeos. O inositol pode ainda interferir em fenômenos de modificação da

membrana que definem a morfologia e polaridade de crescimento em microrganismos, sendo que mutantes com a biossíntese de inositol modificada podem ter a composição da membrana alterada e um micélio altamente ramificado (Griffin, 1994c).

O aparecimento exclusivo de propágulos do tipo PR, que antes de aparecerem livres no meio de cultivo sempre são vistos no interior das hifas, pode ter sua explicação no fato de que certas concentrações de inositol geram um enfraquecimento da parede celular, o que pode ser importante nas extremidades de hifas onde os lipídeos da membrana podem ser alterados (Garraway; Evans, 1984), facilitando a liberação destes propágulos no meio de cultivo. Um outro efeito do inositol é o seu envolvimento no dimorfismo de diversos fungos, em que a conversão entre o modo de desenvolvimento micelial e o modo leveduriforme pode ser estimulada ou reprimida pela concentração deste fator de crescimento (Garraway; Evans, 1984).

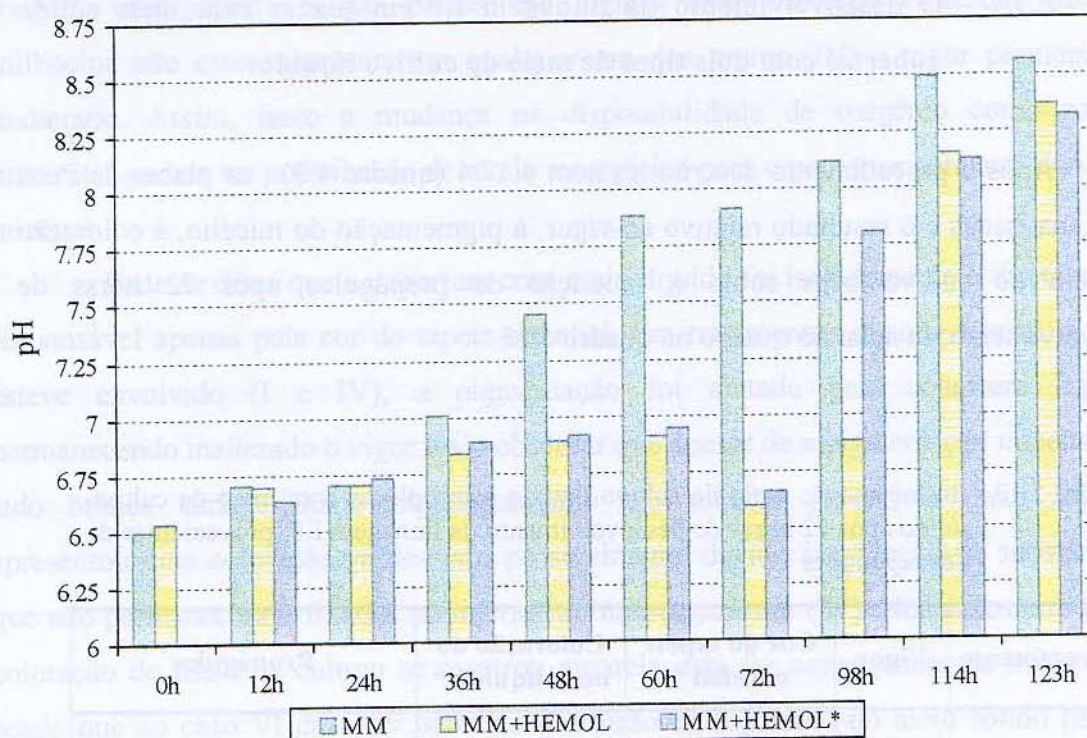
Provavelmente o aparecimento de propágulos PR esteve associado a um mecanismo de reprodução do microrganismo lembrando que enzimas das membranas mitocondriais interna e externa são sensíveis ao inositol e estimulando inclusive a polarização do crescimento celular em resposta a este composto (Ross, 1979a; Garraway; Evans, 1984; Voet, D.; Voet, J.G., 1995).

5.7.6 - Influência da hemolinfa no desenvolvimento da linhagem E9 em meio de cultivo

Foi avaliada, em meio de cultivo, a resposta ao acréscimo de hemolinfa de larvas de *Anastrepha fraterculus* em dois diferentes momentos do desenvolvimento do fungo, a saber no momento do inóculo da linhagem E9 bem como em 12 horas após este. Na figura 5.27 encontram-se os valores médios de pH em diferentes tempos de desenvolvimento.

Com exceção do tempo de 98 horas de desenvolvimento, a evolução do pH nos meios onde se acrescentou hemolinfa seguiu um padrão de similaridade. Pôde-se constatar que propágulos do tipo PR, fragmentos de hifas e conídios submersos bem como ramificação de hifas acelerada foram encontrados no meio MM+HEMOL*,

enquanto no meio MM+HEMOL o arredondamento proeminente da extremidade de hifas e células oidiais foram predominantes.



* Hemolinfa acrescentada após 12 horas de desenvolvimento

Figura 5.27 – Valores médios de pH dos meios líquidos acrescidos com hemolinfa onde a linhagem E9 se desenvolveu, provenientes de três repetições

A influência da hemolinfa na produção de propágulos é de relevância, visto que o sucesso do processo infectivo depende de o fungo ultrapassar as barreiras fisiológicas e biológicas que aí passa a encontrar após a penetração na cutícula. Apesar do resultado estabelecido, a hemolinfa parece não ser a única responsável pelo aparecimento de propágulos de infecção *in vivo*, uma vez que componentes da cutícula podem representar a primeira barreira à infecção (Clarkson; Charnley, 1996) estimulando desde aí respostas que se tornam evidentes somente no posterior contato com a hemolinfa. Os resultados ligeiramente diferentes em resposta aos dois tratamentos esclarece que o estado de desenvolvimento propício para a indução à diferenciação é dependente da competência

da célula fúngica variando com a sua morfologia no momento da introdução do fator estimulante, o que é corroborado por alguns autores (Moore, 1998).

5.7.7 – O desenvolvimento da linhagem E9 em placas com meio sólido cobertas com dois tipos de meio de cultivo líquidos

Após o procedimento descrito no item 4.17.4 (quadro 4.3) , as placas de Petri foram analisadas e o resultado relativo ao vigor, à pigmentação do micélio, à coloração do meio de cultivo bem como à produção de propágulos após 72 horas de desenvolvimento, se acha no quadro no quadro 5.13.

Quadro 5.13 – Influência do meio de cultivo líquido sobre placas com meio de cultivo sólido após 72 horas de desenvolvimento da linhagem E9, provenientes de três repetições

Tratamento	Vigor	Cor do tapete micelial *	Coloração do meio líquido *	Propágulos
I	+	A	–	Fialoconídios
II	++	V	–	Fialoconídios
III	+++	Aa	–	Fialoconídios
IV	+	B	v	–
V	++++	B	A	Alta concentração de PR
VI	++++	B	A	Alta porcentagem de fragmentação de hifas
VII	++++	B	A	Alta concentração de PR

* A= amarelo escuro a= amarelo claro Aa= amarelo médio V= verde escuro v= verde claro B= branco

O vigor na produção micelial das culturas foi modificado com a introdução da cobertura com meio líquido quando milhocina esteve presente ou no meio sólido (VI), ou no meio líquido (V) ou em ambos (VII); apenas a mudança na disponibilidade de oxigênio nas superfícies das placas não explica este resultado visto que quando milhocina não esteve presente em qualquer um dos meios (IV) o vigor permaneceu inalterado. Assim, tanto a mudança na disponibilidade de oxigênio como na de nutrientes podem ter contribuído de modo sinérgico para o posterior aumento do vigor micelial.

Pode-se dizer que a cobertura com meio líquido foi isoladamente e diretamente responsável apenas pela cor do tapete micelial. Em tratamentos quando apenas o MM esteve envolvido (I e IV), a pigmentação foi afetada pela cobertura líquida permanecendo inalterado o vigor; vale observar que apesar de a pigmentação micelial ter sido branca caracterizando hipoteticamente um micélio jovem, o meio líquido apresentou uma coloração verde-claro possivelmente devido à excreção de substâncias que não permaneceram fixadas no interior do microrganismo (IV). Nos casos em que a coloração do meio de cultivo se mostrou amarela esta foi conseqüente da milhocina, sendo que no caso VI deve ter ocorrido a difusão de pigmento do meio sólido para o meio líquido.

Pôde-se verificar que a produção de estruturas aéreas como fialoconídios somente ocorreu quando as placas não tiveram qualquer cobertura com meio líquido (I, II, III), o que possivelmente foi favorecido pela disponibilidade de oxigênio.

Foi interessante verificar que embora se observasse a produção de micélio nas placas que receberam uma cobertura com meio líquido (IV, V, VI, VII), a produção de propágulos ficou restrita a PR e a fragmentos de hifa, sendo que estes apenas apareceram quando de algum modo milhocina esteve envolvida (V, VI, VII). Observou-se também que independente do meio sólido, quando milhocina esteve presente no meio líquido (V e VII) a produção de PR foi extremamente favorecida, o que poderia indicar a existência de um tempo crítico necessário para a linhagem atingir um estado de competência possibilitando a resposta ao estímulo que foi dado apenas após 16 horas de desenvolvimento em meio sólido.

Como descrito no item 5.7.2, no quadro 5.6, a milhocina numa concentração entre 3-5% favorece à fragmentação de hifas como ocorreu quando a milhocina esteve presente apenas no meio sólido (VI). No mesmo quadro 5.6 pôde-se observar que a milhocina induz à produção de propágulos PR apenas na concentração de 10% como ocorreu nos casos V e VII em que a milhocina esteve presente no meio líquido, independente da composição do meio sólido. Vale lembrar que a disponibilidade de oxigênio nos frascos sob rotação difere daquela nas placas.

Assim, se houvesse uma total independência do meio líquido, deveríamos ter $IV = V$ e $VI = VII$, com respeito às respostas; se houvesse uma total independência do meio sólido (onde ocorreu o suposto tempo crítico), deveríamos ter $IV = VI$ e $V = VII$, com respeito às respostas. Somente a última igualdade ocorreu, indicando portanto, que possivelmente no tempo crítico já mencionado para a competência das células fúngicas à indução específica, o estado fisiológico a ser alcançado parece guardar certa rigidez epigenética que impede uma resposta ao estímulo ambiental antes deste tempo crítico.

Situação similar deve ser encontrada pelo fungo quando este atravessa a cutícula do inseto e chega até à hemolinfa, um ambiente que apesar de preparado com células de defesa contra infecção e absorver pouco oxigênio e muito dióxido de carbono, também é rico em nutrientes que se tornam disponíveis ao invasor (Thomas, 1977). Sendo este o caso, pode-se ressaltar que atenção deve ser dada à constituição da cutícula de insetos quanto ao seu real papel no sucesso da infecção pela linhagem E9 de *Metarhizium anisopliae*, e também à constituição da hemolinfa que poderá definir inclusive a propagação aérea do fungo.

5.7.8 – Desenvolvimento da linhagem E9 em meios de cultivo com diferentes razões extrato de levedura:glicose

Além do pH e da osmolalidade do meio de cultivo, atividade de água pode afetar o desenvolvimento de muitos microrganismos (Larone, 1995). A razão nitrogênio:carbono também tem sido colocada por alguns autores como importante parâmetro a ser considerado no desenvolvimento de fungos para produção de propágulos (Jackson et al.; 1997). Sabe-se, ainda que a razão de crescimento exponencial é

fortemente afetada pelo suprimento de nutrientes, incluindo as fontes de carbono e de nitrogênio, em que extrato de levedura acrescida à glicose pode aumentar a razão de crescimento específico em cerca de 53% (Engelkes; Nucló; Fravel, 1997). Assim, considerando que apesar de na hemolinfa de muitos insetos a trealose ser o açúcar predominante e em larvas de dipteros a glicose ser o açúcar típico e único numa concentração 1g/L, meios de cultivo com diferentes proporções de glicose (fonte de carbono) e extrato de levedura (fonte de nitrogênio) foram elaborados a fim de se verificar a produção de propágulos pela linhagem E9. No quadro 5.14 podem ser encontrados os resultados obtidos.

Quadro 5.14- Desenvolvimento da linhagem E9 após 48 horas de desenvolvimento em meios de cultivo líquidos com diferentes razões extrato de levedura:glicose, provenientes de três repetições

Meio de cultivo	Y (%)	G (%)	a_w *	Desenvolvimento e/ou Propágulos
I (YG)	2	1	0,986	Fragmentos de hifas; brotamento de fragmentos
II	2	2	0,985	(Boa produção de massa micelial)
III	2	4	0,983	(Boa produção de massa micelial)
IV	2	6	0,981	(Boa produção de massa micelial)
V	2	8	0,980	Clamidosporos; brotamento lateral
VI	2	10	0,979	Clamidosporos; (Granulação intensa no interior das hifas)

* (Humphreys; Matewele; Trinci; 1989)

O meio de cultivo I dispôs da mesma concentração de glicose que o meio de referência MM em que a linhagem foi mantida em laboratório; entretanto, o acréscimo do extrato de levedura afetou o desenrolar do desenvolvimento, produzindo estruturas fúngicas de propagação semelhantes àquelas da hemolinfa.

A glicose que, em concentrações ideais pode atuar como indutor ou inibidor de alterações morfológicas (Ronne, 1995), nas concentrações acima de 8% induziu ao aparecimento de clamidosporos. Percebeu-se que meios com estas condições se apresentaram como hostis à linhagem, visto que de acordo com a figura 5.1 uma concentração de 80g/l de glicose gera uma osmolalidade de 657mOsm/kg em meio MM, que somada à ação do extrato de levedura conduzem à E9 a produzir este tipo de propágulos como modo alternativo de desenvolvimento.

Assim, apesar uma concentração maior de glicose favorecer a germinação da linhagem em meio líquido (tabela 5.5), um excesso do reagente impeliu ao fungo a produzir propágulos típicos de quando os nutrientes foram exauridos (Zacharuk, 1971).

Outras combinações com glicose, extrato de levedura, sacarose, sais e vitaminas foram feitas com o mesmo objetivo de verificar a interação com a morfologia.

Quadro 5.15 – Influência de nutrientes no papel do extrato de leveduras e/ou da glicose no desenvolvimento da linhagem E9, provenientes de três repetições

Meio de cultivo	Morfologia/Propágulos em horas de desenvolvimento
I (MM)	Fialoconídios (48h)
II (YG)	Brotamento lateral (36h); fragmentos de hifas (48h)
III (YGSal)	PR livres e no interior de hifas (36h); PR inexistentes e fragmentos de hifas (48h)
IV (YSal)	Conídios submersos (36h); PR no interior de hifas (48h)
V (VitGSal)	Hifas curtas e com diâmetro aumentado (36h; 48h)
VI (YSacarose)	Clamidosporos (36h); conídios submersos (48h)

Pelo quadro 5.15 podemos notar que associados um a um ao extrato de levedura, a glicose e o conjunto de sais induziram à fragmentação e à produção de PR, respectivamente (II e IV); já no meio com os dois componentes (III) ambos os tipos de propágulos apareceram, mas não havendo o brotamento lateral (II) que conduziria aos conídios submersos (IV). Nestes meios de cultivo zinco e ferro não foram diretamente

adicionados sendo estes importantes para o desempenho de proteínas e enzimas envolvidas no desenvolvimento (Garraway; Evans, 1984).

Quando o extrato de leveduras foi trocado por vitaminas (III e V), pôde-se perceber um nítido encurtamento da hifas que, em alguns fungos dimórficos, é conseqüente da carência de algum nutriente inorgânico como o manganês (Garraway; Evans, 1984); este resultado pode ser explicado pela possível presença deste nutriente no extrato de leveduras ou pela presença de algum componente vitamínico que ou estimulou ao aparecimento de hifas curtas ou que impediu o aparecimento de propágulos.

Aspectos como a necessidade de experimentos refinados, o pouco esclarecimento do papel dos micronutrientes para alguns fungos dificultado pela presença de contaminantes nos reagentes ou à complexidade da rede de processos fisiológicos assimilatórios dificultam uma análise satisfatória. A associação dos resultados com o fenômeno de infecção *in vivo* pode ainda ser dificultada devido ao fato de que em insetos, por exemplo, vitaminas se acham atuantes como coenzimas e não se encontram geralmente livres na hemolinfa em determinados períodos do desenvolvimento, o mesmo podendo ocorrer com alguns cátions e ânions (McFarlane, 1985).

Ainda que estas dificuldades se apresentem, podemos dizer que, apesar da similaridade com o meio MC, o meio de cultivo YGSal (meio III) se aproxima mais das condições da hemolinfa em termos de produção de propágulos do que o meio VitGSal (meio V).

O acréscimo da sacarose ao extrato de leveduras (VI) numa mesma concentração que a glicose (II), impeliu à linhagem a se desenvolver em um meio de cultivo aparentemente tão hostil quanto em altas concentrações de glicose. Uma possível mudança na aquisição de nutrientes pode explicar este resultado com base no papel regulador que a glicose tem em muitos microrganismos (Engelkes; Nuclo; Fravel, 1997). Isto posto, ressalta-se a importância de conhecer os pormenores dos mecanismos envolvidos na aquisição e na assimilação de nutrientes empregados tanto pelo inseto como pelo entomopatógeno para que os resultados *in vitro* sirvam de embasamento seguro para aplicações *in vivo*.

A concentração de glicose associada com a presença ou ausência de agitação também mostrou interferir no desenvolvimento da linhagem E9. Em uma concentração de 80g/l de glicose (meio líquido) e com agitação, após 48 horas de desenvolvimento hifas com diâmetro aumentado e com extremidades proeminentes, germinação de conídios apresentando brotamento na extremidade do tubo germinativo (semelhante a um microciclo de conidiação) e brotamento de conídios puderam ser vistos; o mesmo não ocorreu quando cultura em fase estacionária foi estabelecida, sendo que brotamento lateral de hifas foi o mais observado. A interface ar-meio de cultivo bem como a aeração típica proveniente da agitação dos frascos provavelmente contribuíram para estas diferenças. Comparado ao resultado apresentado no quadro 5.14, a interferência do extrato de leveduras foi nítida (V).

5.7.9 – Desenvolvimento das linhagens selvagens E9 e 3609 em meio com cloreto de sódio e em meio com glicose e peptona

A fim de testar a influência de peptona como fonte de nitrogênio juntamente com a glicose como fonte de carbono, elaborou-se meios de cultivo com dois diferentes pH e observou-se o desenvolvimento das linhagens selvagens E9 e 3609. Também para testar o aparecimento de propágulos das linhagens, cloreto de sódio foi utilizado para gerar uma pressão osmótica tão alta quanto aquela produzida por uma concentração de 45g/l de glicose.

Quadro 5.16 – Desenvolvimento das linhagens E9 e 3609 em meios líquidos com 2% de glicose e 1% de peptona, provenientes de três repetições

Linhagem	Desenvolvimento/propágulos em horas de desenvolvimento	
	pH inicial=4,5	pH inicial=6,8
E9	Brotamento lateral (48h); esferoplastos e fragmentação (72h)	Brotamento lateral (48h); brotamento em extremidade de hifas (60h); conídios submersos (72h)
3609	Brotamento lateral (48h); fragmentação (72h)	Conídios submersos (72h)

No quadro 5.16 temos os resultados quanto ao aparecimento de propágulos e no quadro 5.17 encontra-se o resultado obtido quando a concentração da glicose e da peptona foi aumentada, alterando a osmolalidade do meio de cultivo.

Quadro 5.17 – Desenvolvimento das linhagens E9 e 3609 em meios com 6% de glicose e 3% de peptona, provenientes de três repetições

Linhagem	Desenvolvimento/propágulos em horas de desenvolvimento	
	pH inicial=4,5	pH inicial=6,8
E9	Conídios submersos (36h); brotamento de conídios submersos (60h)	Brotamento lateral (36h); conídios submersos (48h); brotamento em extremidade de hifas (60h)
3609	Brotamento lateral (48h); fragmentação (60h)	Conídios submersos (72h)

Comparando os quadros 5.16 e 5.17 percebemos que tanto o pH inicial como a concentração dos reagentes influenciaram no desenvolvimento e no aparecimento de propágulos. Os resultados diferiram daqueles apresentados no quadro 5.14 para o desenvolvimento da linhagem E9 em extrato de levedura e glicose, mostrando que as fontes de peptona podem definir o tipo de propagação no meio de cultivo.

Referente a *Metarhizium anisopliae* é sabido que o crescimento e a esporulação podem ser alterados pelas fontes de peptona do meio, sendo que extrato de levedura favorece e peptona desfavorece a esporulação (Barnes et al., 1975; Butt; Goettel, 2000).

Assim, visto que o tipo de propágulos foi influenciado pela fonte de nitrogênio, pela concentração de glicose e pelo pH inicial, bem como pela linhagem utilizada, espera-se que estes resultados contribuam para a elaboração de meios de cultivo adequados para o estudo de melhoramento de linhagens que possam ser utilizadas em biocontroles.

O cloreto de sódio permitiu o surgimento de propágulos da linhagem E9 (brotamento lateral em 60h em pH inicial de 4,5 e fragmentação de hifas em 60 horas em

pH inicial de 6,8) e da linhagem 3609 (brotamento lateral em 60h em pH inicial de 4,5) provavelmente por gerar íons que influenciaram o equilíbrio celular bem como pela osmolalidade alterada (Cooke; Whipps, 1993c). O tipo de propágulos foi influenciado pelo meio de cultivo com o sal, pelo pH inicial e pela linhagem utilizada. Este resultado enfatiza que íons livres na hemolinfa do inseto podem determinar o desenvolvimento do fungo que ali se desenvolve.

5.7.10 –Influência do colágeno e da gelatina no pH dos meios de cultivo e na produção de propágulos

No quadro 5.18 encontram-se os dados referentes à produção de propágulos em meios acrescidos com colágeno e com gelatina.

De acordo com o item 5.6.2, a linhagem E9 produziu massa micelial de modo diretamente proporcional à quantidade de colágeno acrescida, e, com exceção entre 1% e 0,5%, o mesmo ocorreu quando a gelatina foi adicionada ao meio.

A linhagem Y5 produziu um acréscimo de massa micelial diretamente proporcional à quantidade de colágeno acrescida, sendo que o mesmo ocorreu quando a gelatina foi adicionada ao meio exceto para a concentração de 0,5% que manteve a massa micelial entre os valores obtidos quando 3% e 2% de gelatina foi adicionada.

Em colágeno a produção de massa micelial da linhagem B/vi seguiu o ritmo da E9, e quando gelatina foi adicionada ao meio de cultivo, a produção de massa micelial foi diretamente proporcional ao acréscimo de gelatina.

A linhagem X/vi teve em colágeno a produção de massa micelial semelhante à da linhagem Y5, sendo que em gelatina menores concentrações favoreceram o crescimento.

Quadro 5.18 – Influência da concentração de colágeno e de gelatina na produção de propágulos das linhagens E9, Y5, B/vi e X/vi, provenientes de três repetições

Aditivo (%)	Linhagem			
	E9	Y5	B/vi	X/vi
Colágeno				
0,5	Fialoconídios (6,1) *	(Hifas) (6,17)	Fialoconídios (6,1)	Fialoconídios (6,08)
1,0	Fragmentos de hifas; artrosporos (5,99)	Fragmentos de hifas; artrosporos (6,13)	Fragmentos de hifas; artrosporos (5,96)	(Hifas) (6,01)
2,0	Fragmentos de hifas; artrosporos (5,74)	Fragmentos de hifas; artrosporos (6,03)	Fragmentos de hifas; artrosporos (5,86)	(Hifas) (5,96)
3,0	PR (5,98)	PR (5,96)	PR (5,97)	(Hifas) (5,96)
Gelatina				
0,5	Fialoconídios (6,07)	(Hifas) (6,12)	Fialoconídios (6,03)	Fialoconídios (6,12)
1,0	Fialoconídios (5,72)	(Hifas) (5,89)	(Hifas) (5,86)	(Hifas) (5,84)
2,0	Brotamento em extrem. de hifa (6,72)	(Hifas) (6,93)	(Hifas) (6,84)	(Hifas) (6,84)
3,0	Brotamento lateral (6,89)	(Hifas) (6,91)	(Hifas) (6,91)	(Hifas) (6,86)

* pH do meio de cultivo após 48 horas de desenvolvimento

A produção de propágulos foi dependente tanto da linhagem como da organização estrutural do colágeno, modificada após o aquecimento gerando a estrutura da gelatina. A dependência da linhagem pode mostrar que variações morfológicas e fisiológicas estiveram envolvidas na resposta ao estímulo ambiental.

Quadro 5.19 – Produção de propágulos em função da concentração do colágeno bem como da gelatina adicionados

Colágeno (%)	Propágulos típicos
0,5	Fialoconídios
1	Fragmentos
2	Fragmentos; artrosporos
3	PR
Gelatina (%)	Propágulos típicos
0,5	Fialoconídios
1	(Hifas)
2	(Hifas)
3	(Hifas)

No entanto, como foi inferido no item 5.6.2, a disponibilidade dos nutrientes no meio de cultivo influenciou também a produção de massa micelial; possivelmente a osmolalidade do meio de cultivo bem como a especificidade requerida para a absorção destes nutrientes provocou respostas típicas para o colágeno e para a gelatina como mostrado no quadro 5.19.

5.8 – Caracterização eletroforética da enzima Sulfito Redutase (NADPH).1.8.1.2 em extrato cru utilizando gel de poliacrilamida

Submeteu-se amostras do micélio bem como do meio de cultivo com milhocina onde ocorreu a fragmentação da linhagem E9 aos moldes da hemolinfa à avaliação inespecífica de proteínas. O material proveniente do meio de cultivo apresentou bandas detectáveis (contendo peptídeos com peso molecular maiores que 132kDa) apenas em 48 horas de desenvolvimento. O material proveniente do micélio de 36 horas de desenvolvimento apresentou 3 bandas específicas entre 66kDa e 132kDa e 2 específicas com peso molecular menores que 20kDa, e o proveniente de 48 horas de desenvolvimento apresentou 1 banda específica maior que 132kDa e 2 específicas menores que 20kDa.

A coloração com nitrato de prata foi mais eficiente permitindo verificar o aparecimento e/ou o desaparecimento de bandas específicas.

Apesar deste resultado se mostrar repetitivo, asserções conclusivas só poderão ser tomadas com o refinamento do método de análise a fim de seguramente afirmar se estas bandas eletroforéticas são características da resposta dimórfica ou se são apenas características de adaptação às condições de cultivo (Swoboda et al., 1994), uma vez que nem sempre a morfogênese bem como a diferenciação estão associadas à síntese de proteínas (Soll; Sonneborn, 1971; Harold, 1995; Wessels, 1993).

Visto que a assimilação de enxôfre pode estar associada a diversos casos de resposta dimórfica em fungos patogênicos (Larone, 1995), submeteu-se amostras do micélio bem como do meio de cultivo onde ocorreu a fragmentação da linhagem E9 aos moldes da hemolinfa também à análise específica quanto à produção da enzima sulfito redutase. Nenhuma banda eletroforética detectável foi observada com o método empregado. Visto que fontes de nitrogênio contendo enxôfre são muito pobremente utilizadas para a produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* (Campbell et al., 1978), uma avaliação dos mecanismos empregados nos processos de assimilação de compostos contendo enxôfre por *Metarhizium anisopliae* necessita ser feita a fim de se certificar do não-envolvimento da enzima nas respostas morfológicas às condições de cultivo empregadas.

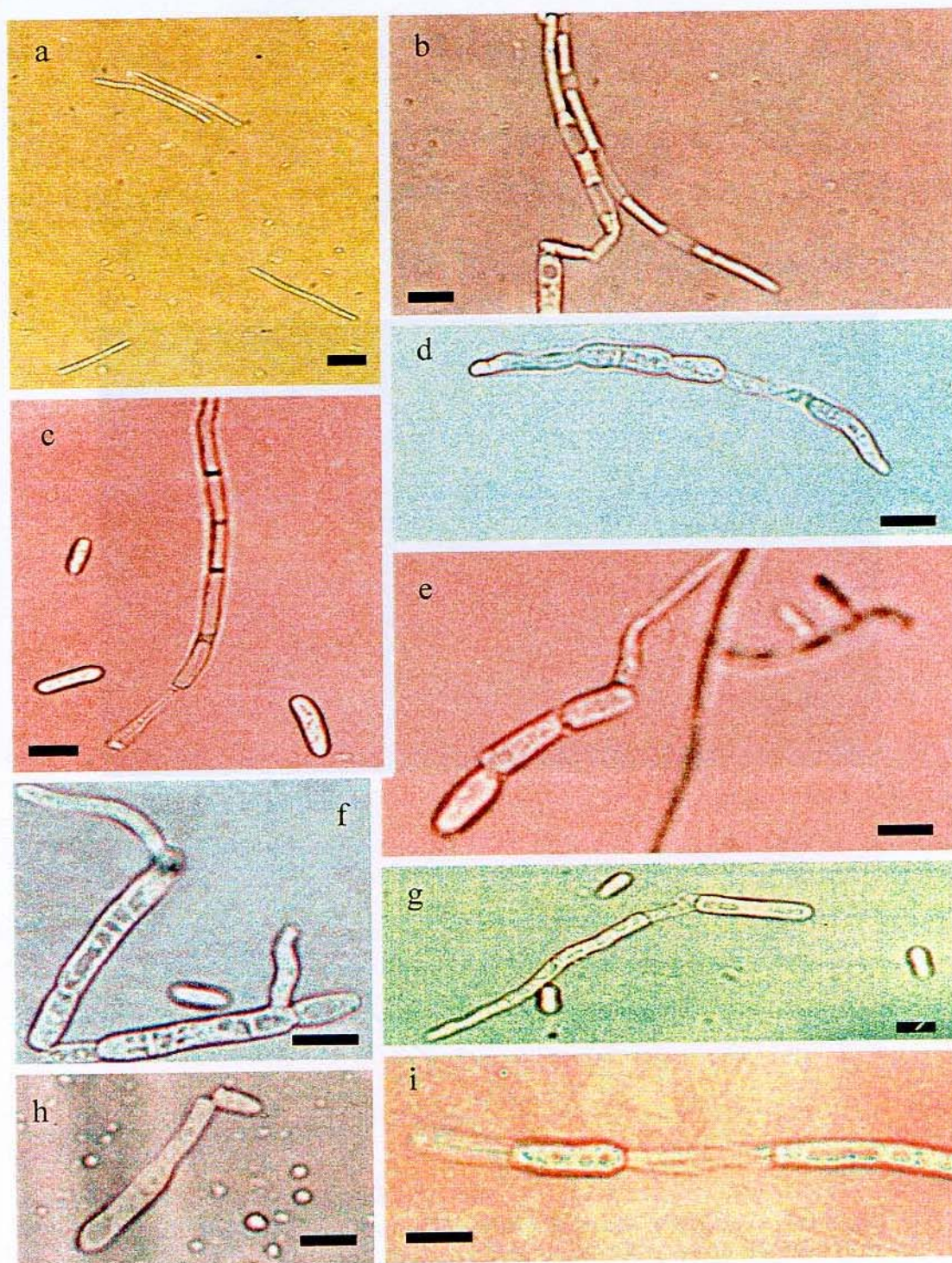


Figura 5.28 – Propágulos: filamentos livres no meio de cultivo (a) e dentro de hifas (b); fragmentação (d, g, i); artrosporos (c, e); germinação de fragmentos (f); quebra de corpo hifal (h) – Barra: 10μm



Figura 5.29 – Propágulos róseos (PR): dentro de hifa na hemolinfa de *Anastrepha fraterculus* (a); livres no meio de cultivo e dentro de hifas (b,c); brotamento de extremidade de hifa (c) – Barra: 10 μ m

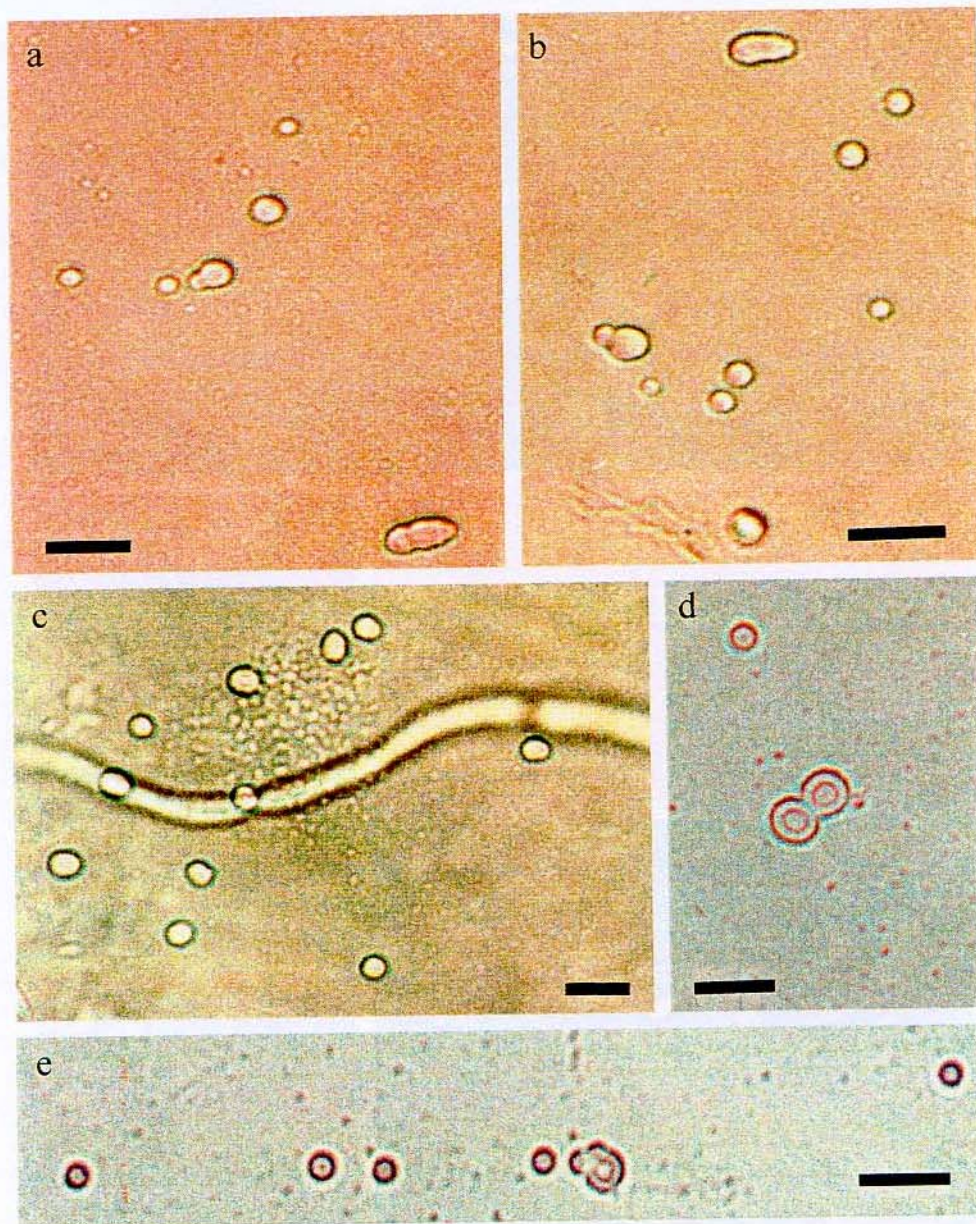


Figura 5.30 – Propágulos: brotamento de PR (a, b); PR livre no meio de cultivo (c); pequenas esferas semelhantes a esferoplastos (d, e) – Barra: 10μm

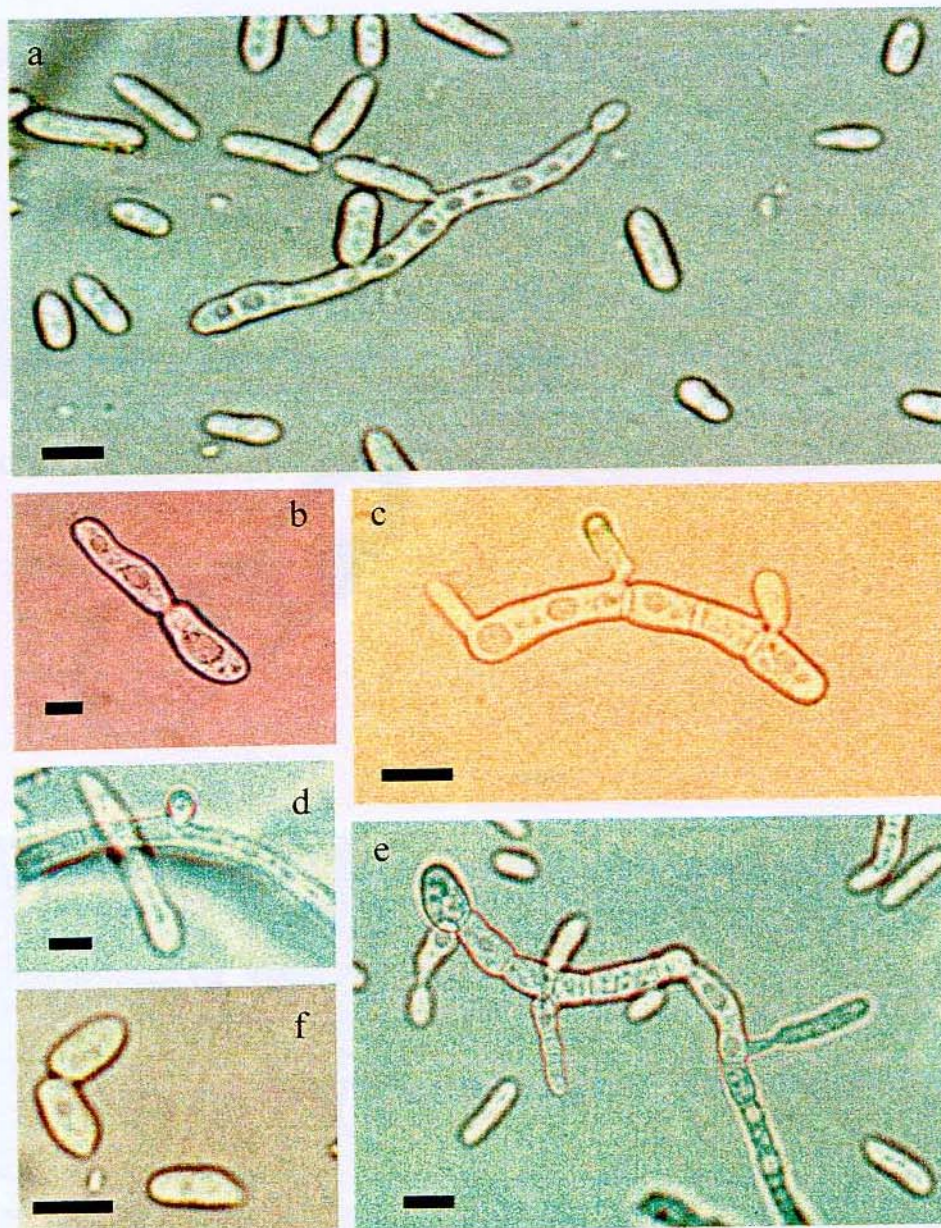


Figura 5.31 – Propágulos: brotamento lateral (a, c, d, e); fissão (b, f) – Barra: 10µm

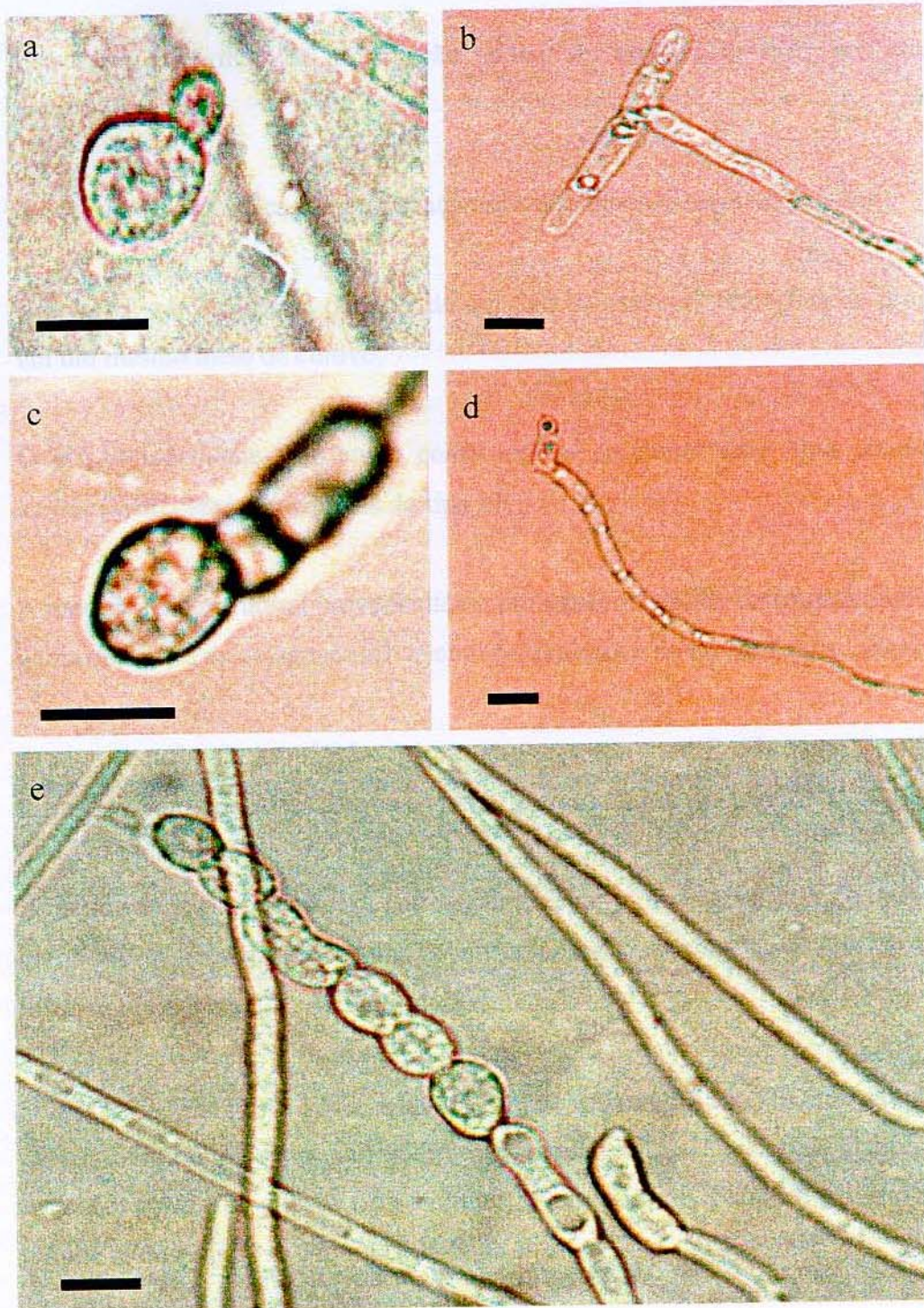


Figura 5.32 – Propágulos: clamidosporo livre e em brotamento (a); clamidosporo terminal (c) e intercalar formando pseudomicélio (e); pequenas esferas refringentes dentro de hifas (b, d) – Barra: 10 μ m

6 – CONCLUSÕES

1. Estruturas dimórficas de propagação podem ser obtidas, *in vitro*, aos moldes da hemolinfa;
2. As estruturas dimórficas de propagação são suscetíveis à reversão *in vitro*;
3. É possível a coexistência de mais de um tipo de estrutura dimórfica de propagação em um mesmo meio de cultivo;
4. O pH, isoladamente, não atuou como indutor ao dimorfismo, mas condições de acidez favoreceram propágulos do tipo PR;
5. A modificação estrutural proveniente de pré-aquecimento de fosfolipídeos (lecitina e gema de ovo) e de colágeno influenciou na natureza e na produção dos propágulos;
6. A pigmentação de propágulos aéreos mostrou ser modificada tanto por fonte de nitrogênio (aminoácidos) como por fator de crescimento (inositol);
7. A natureza e a produção de propágulos foram influenciadas por condições de aerobiose, e também pareceram depender da concentração e do tipo da fonte de nitrogênio (aminoácidos ou sulfato de amônio);
8. O tipo de açúcar utilizado (glicose ou sacarose) influenciou na natureza dos propágulos obtidos, sendo que sacarose estimulou o aparecimento de clamidosporos, e a concentração de glicose também interferiu na germinação das linhagens frente ao tipo de meio de cultivo (líquido ou sólido);

9. Os sais presentes no meio de cultivo MM (item 4.9.1) pareceram influenciar no tipo e na produção de propágulos, sendo que a presença de glicose pôde alterar esta influência;
10. Nas condições de cultivo testadas, coenzimas do tipo vitaminas (ácido nicotínico, ácido *para*-aminobenzóico, tiamina, biotina, cloridrato de piridixina e riboflavina, em conjunto) foram insuficientes para induzir a produção de qualquer tipo de propágulo;
11. Qualitativamente, a ação do dióxido de carbono gasoso injetado não dependeu da linhagem utilizada, sendo que a massa micelial produzida, a fragmentação de hifas, a produção de estruturas aéreas de propagação e a pigmentação do tapete micelial foram associadas com a presença do gás;
12. O dióxido de carbono gasoso injetado pôde tanto impedir completamente como dificultar o aparecimento de estruturas aéreas de propagação, dependendo da composição do meio de cultura;
13. Quantitativamente, a ação do dióxido de carbono gasoso injetado dependeu da linhagem utilizada, o que foi traduzido por específica sensibilidade ao gás;
14. A osmolalidade, isoladamente, não foi suficiente para induzir respostas adaptativas associadas com a produção de propágulos. A natureza do indutor e gerador de osmolalidade também esteve associada com este evento.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIDI, F.E.; ROH, H.; KEATH, E.J. Identification and characterization of a phase-specific, nuclear DNA binding protein from the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Infection and Immunity**, v.66, n.8, p.3867-3873, 1998.
- ADÁMEK, L. Submerge cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). **Folia Microbiology**, v.10, n.4, p.255-257, 1965.
- AL-AIDROOS, K.; SEIFERT, A.M. Polysaccharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.**, v.36, p.29-34, 1980.
- ALEXOPOULOS, C.A. . The fungi. In: ALEXOPOULOS, C.A. **Introductory mycology**. New York: John Willey & Sons, Inc., 1962. p.15-21, 203-249, 411-547-562.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, 1998. p.289-382.
- ALVES, S.B.; MOINO Jr., A.; ALMEIDA, J.E.M. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, 1998. p.1143-1163.
- ARAMAYO, R.; TIMBERLAKE, W.E. The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. **The EMBO Journal**, v.12, n.5, p.2039-2048, 1993.
- BAILEY, D.A. et al. The *Candida albicans* *hyr1* gene, which is activated in response to hyphal development, belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.18, p.5353-5368, 1996.
- BANUETT, F. Signaling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, n.2, p.249-274, 1998.
- BARNES, G.L. et al. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.25, p.301-305, 1975.
- BARNES, S.E.; MOORE, D. The effect of fatty, organic or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Mycological Research**, v.101, n.6, p.662-666, 1997.
- BARRACCO, M.A.; MENEZES, H. Mecanismos celulares de defesa de insetos. **Ciência e Cultura**, v.37, n.2, p.237-250, 1985.

BARTINICKI-GARCIA, S.; LIPPMAN, E. The bursting tendency of hyphal tips of fungi: presumptive evidence for a delicate balance between wall synthesis and wall lysis in apical growth. **Journal of General Microbiology**, v.73, p.487-500, 1972.

BARTINICKI-GARCIA, S.; NICKERSON W.J. Induction of yeastlike development in *Mucor* by carbon dioxide. **J. Bacteriol.**, v.84, p.829-840.

BEAUVAIS, A. et al. The role of surface components of the entomopathogenic fungus *Entomophaga aulicae* in the cellular immune response of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). **Journal of General Microbiology**, v.135, p.489-498, 1989.

BERTL, A.; SLAYMAN, C.L. Complex modulation of cation channels in the tonoplast and plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: single-channel studies. **J. Exp. Biol.**, v.172, p.271-287, 1992.

BIDOCHKA, M.J.; St.LEGER, R.J.; ROBERTS, D.W. Induction of novel proteins in *Manduca sexta* and *Blaberus giganteus* as a response to fungal challenge. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.70, p.184-189, 1997.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Adv. Microbiology Physiol.**, v.33, p.145-212, 1993.

BOSSCHE, H. et al. Molecular determinants of fungal dimorphism. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.30, n.1, p.73-76, 1992.

BOTTIN, A.; KÄMPER, J.; KAHMANN, R. Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. **Mol. Gen. Genet.**, v.243, p.342-352, 1996.

BOUCIAS, D.G.; PENLAND, J. C.; LATGÉ, J.P. Nonspecific factors in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Appl. Envir. Microbiology**, v.54, n.7, p.1795-1805, 1988.

BRAGA, G.U. et al. Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. **Photochem. Photobiol.**, v.73, n.2, p.140-146, 2001.

BRAGA, G.U.L.; DESTÉFANO, R.H.R.; MESSIAS, C.L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. **Reviews in Microbiology**, v.30, p.107-113, 1999.

BRÜNING, A.R.N.E. et al. Physiological and genetic characterization of osmosensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiology**, v.170, p.99-105, 1998.

BUTT, T.M. et al. The germination behavior of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. **Mycological Research**, v.99, n.8, p.945-950, 1995.

BUTT, T.M.; GOETTEL, M.S. Bioassays of entomopathogenic fungi. In: NAVON, A.; ASCHER, K.R.S. **Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes**. New York: CABI Publishing, 2000. p.141-191.

CADDICK, M.X.; TURNER, S. The control of gene expression in filamentous fungi.. In: PAUL BRODA et al. **The eucariotic genome: organization and regulation**. New York, 1993p.241-273.

CAMPBELL, R.K. et al. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on media containing various amino acids. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.31, p.289-295, 1978.

CANNON, R.D. et al. Molecular biological and biochemical aspects of fungal dimorphism **J. Med. Vet. Mycol.**, v.32, n.1, p.53-64, 1994.

CANTAROW, A.; SCHEPARTZ, B. **Biochemistry**. London: W. B. Saunders Company, 1973. 938p.

CHARLANG, G.W.; HOROWITZ, N.H. Germination and growth of *Neurospora* at low water activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** , v.68, n.2, p.260-262, 1971.

CHICUREL, M.E.; CHEN, C.S.; INGBER, D.E. Cellular control lies in the balance of forces. **Current Opinion in the Cell Biology**, v.10, p.232-239, 1998.

CHIU, S.W.; MOORE, D.; CHANG, S. Basidiome polymorphism in *Volvariella bombycina*. **Mycological Research**, v.92, n.1, p.69-77, 1989.

CHIU, S.W.; MOORE, D. Cell form, function and lineage in the hymenia of *Coprinus cinereus* and *Volvariella bombycina*. **Mycological Research**, v.97, n.2, p.221-226, 1993.

CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v.4, n.5, p.197-203, 1996.

CLUTTERBUCK, A.J. The genetics of conidiophore pigmentation of *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.1731-1738, 1990.

CLUTTERBUCK, J. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v.63, p. 317-327, 1969.

COLE, G.C.; NOZAWA, Y. Dimorphism. In: COLE, G.T.; KENDRICK, B. **Biology of conidial fungi**. New York: Academic Press, 1981. Vol.1, pp.97-133.

COLE, G.T. Models of cell differentiation in conidial fungi. **Microbiological Reviews**, v.50, n.2, p.95-132, 1986.

COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. Constraints, limitations and extreme environments. In: COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. **Ecophysiology of Fungi**. USA: Blackwell Scientific Publications, 1993. p.85-112. 1993d.

COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. Growth dynamics and transformations. In: COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. **Ecophysiology of Fungi**. USA: Blackwell Scientific Publications, 1993. p.59-84. 1993a.

COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. Induction and control of reproduction. In: COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. **Ecophysiology of Fungi**. USA: Blackwell Scientific Publications, 1993. p.113-142. 1993b.

COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. Resource acquisition and utilization. In: COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. **Ecophysiology of Fungi**. USA: Blackwell Scientific Publications, 1993. p.23-58. 1993c.

DILLON, R.J. ; CHARNLEY, A.K. Invasion of the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* through the guts of germ-free locusts, *Schistocerca gregaria*. **Mycopathologia**, v.96, p.59-66, 1986.

DILLON, R.J.; CHARNLEY, A.K. The fate of fungal spores in the insect gut. In: COLE, G.T. ; HOCH, H.C. **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. Chap.VI, p. 129-156.

DIXON, N.M.; KELL, D.B. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v.67, p.109-136, 1989.

DWIVEDY, A.K.; BRIDGES, R.G. The effect of dietary changes on the phospholipid composition of the haemolymph lipoproteins of larvae of the housefly *Musca domestica*. **J. Insect Physiol.**, v.19, p.559-576, 1973.

EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M.; GUPTA, S.C. Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Mycopathologia**, v.122, p.79-87, 1993.

ELSON, M.M.; SCHISLER, D.A., JACKSON, M.A. Carbon-to-nitrogen ratio, carbon concentration, and amino acid composition of growth media influence conidiation of *Helminthosporium solani*. **Mycologia**, v.90, n.3, p.406-413, 1998.

ENGELKES, C.A.; NUCLO, R.L.; FRAVEL, D.R. Effect of carbon, nitrogen, and C:N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Taloromyces flavus*. **Phytopathology**, v.87, p.500-505, 1997.

FENG, M.G. et al. Spherical hyphal bodies of *Pandora neophidis* (Remaudière & Hennebert) Humber (Zygomycetes: Entomophorales) on *Acyrtosiphon pisum* (Harris): a potencial overwintering form. **Pan-Pacific Entomol.**, v.68, n.2, p.100-104, 1992.

FIELDER, M.A.; AMYOT, L.M. Evaluating the potential of using 5-azacytidine as an epimutagen. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.1617-1622, 1999.

FINNEY, R.; LANGTIMM, C.J.; SOLL, D.R. The programs of protein synthesis accompanying the establishment of alternative phenotypes in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v.95, p.3-15, 1985.

FÖSTER, C. et al. Adaptation of the filamentous fungi *Ashbya gossypii* to hyperosmotic stress: different osmoresponse to NaCl and mannitol stress. **Appl. Microbiology Biotechnol.**, v.50, p.219-226, 1998.

FRACELLA, F. et al. Differential HSC70 expression during asexual development of *Neurospora crassa*. **Microbiology**, v.143, p.3615-3624, 1997.

GARCÍA, M.C.C. et al. Fungal keratitis caused by *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **J. Med. Veter. Mycol.**, v.35, p.361-363, 1997.

GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. Metabolism. In: GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. **Fungal nutrition and physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1984. p.293-314. 1984c.

GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. Nutrition as a basis for the study of fungi. In: GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. **Fungal nutrition and physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1984. p.1-21. 1984a.

GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. Vitamins and growth factors. In: GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. **Fungal nutrition and physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1984: p.171-211. 1984b.

GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.20, n.1, p.17-48, 2000.

GLOER, J.B. The chemistry of fungal antagonism and defense. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl. 1, p. S1265-S1274, 1995.

GOODAY, G.W.; SCHOFIELD, D.A. Regulation of chitin synthesis during growth of fungal hyphae: the possible participation of membrane stress. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl. 1: S114-S121, 1995.

GRACE, T.D.C. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. **Nature**, v.195, p.788-789, 1962.

GRIESCH, J.; VILCINSKAS, A. Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Biocontrol Science Technology**, v.8, n.4, p.517-531, 1998.

GRIFFIN, D.H. Chemical Requirements for growth. In: **Fungal Physiology**. New York: Willey-Liss, 1994. p.130-158. 1994c.

GRIFFIN, D.H. Growth. In: **Fungal Physiology**. New York: Willey-Liss, 1994. p.102-129. 1994a.

GRIFFIN, D.H. Molecular architecture. In: **Fungal Physiology**. New York: Willey-Liss, 1994. p.63-101. 1994d.

GRIFFIN, D.H. Nutrient Acquisition: digestion and transport. In: **Fungal Physiology**. New York: Willey-Liss, 1994. p.158-194. 1994b.

GUNNARSSON, S.G.S. Infection of *Schistocerca gregaria* by the fungus *Metarhizium anisopliae*: cellular reactions in the integument studied by scanning electron and light microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.9-17, 1988.

HAGEMANN, A.T.; SELKER, E.U. In: RUSSO, V.E.; MARTIENSSEN, R.A.; RIGGS, A.D. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1996. p.335-344.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. **Microbiology**, v.141, Pt.5, p. 1109-1115, 1995.

HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. **Journal Invertebrate Pathology**, v.74, n.3, p.261-266, 1999.

HAMMIL, T.M. Electron microscopy of phialoconidiogenesis in *Metarhizium anisopliae*. **Amererican Journal of Botany**, v.59, n.3, p.317-326, 1972.

HAROLD, F.M. From morphogenes to morphogenesis. **Microbiology**, v.141, p.2765-2778, 1995.

HARRIS, S.D. et al. Identification and characterization of genes required for hyphal morphogenesis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v.151, p.1015-1025, 1999.

HARTMAN, R.E.; KEEN, N.T.; LONG, M. Carbon dioxide fixation by *Verticillium albo-atrum*. **Journal of General Microbiology**, v.73, p.29-34, 1972.

HARWOOD, A. J. Signal transduction: Life, the universe and...development. **Current Biology**, v.10, n.3, p. R116-R119, 2000.

HEATH, I.B. Integration and regulation of hyphal tip growth. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl. 1, p. S131-S139, 1995.

HEERMANN, R.; ALTENDORF, K.; JUNG, K. The turgor sensor KdpD of *Escherichia coli* is a homodimer. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1415, n.1, p.114-124, 1998.

HEGEDUS, D.D. et al. A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Appl. Microbiology Biotechnol.**, v.36, p.785-789, 1992.

HENIKOFF, S.; MARJORI, A.M. Exploring and explaining epigenetic effects. **Trends in Genetics**, v.13, n.8, p.293-295, 1997.

HIATT, W.R. et al. Methylation of elongation factor 1alpha from the fungus *Mucor*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.79, p. 3433-3437, 1982.

HOFFMANN, J.A. . Innate immunity of insects. **Current Opinion in Immunology.**, v.7, p.4-10, 1995.

HOFFMANN, J.A. ; REICHHART, J.M. ; HETRU, C. Innate immunity in higher insects. **Current Opinion in Immunology**, v.8, p.8-13, 1996.

HOLLIDAY, R. DNA methylation in eucaryotes: 20 years on. In: In: RUSSO, V.E.; MARTIENSSSEN, R.A.; RIGGS, A.D. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1996. p.5-28.

HOLLIDAY, R. Mechanisms for the control of gene activity during development. **Biological Reviews**, v.65, p.431-471, 1990.

HOWARD, D.H. Dimorphism of *Sporotrichum schenkii*. **Journal of Bacteriology** , v.81, p.464-469, 1961.

HOWARD, D.H.; HERNDON, R.L. Tissue culture of mouse peritoneal exudates inoculated with *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Bacteriology**, v.80, p.522-527, 1960.

HULTMARK, D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. **Trends in Genetics**, v.9, n.5, p.178-183, 1993.

HUMPHREYS, A .M.; MATEWELE, P.; TRINCI, P.J. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. **Mycological Research**, v.92, n.3, p.257-264, 1989.

HUNG, S.Y. ; BOUCIAS, D.G. Influence of *Beauveria bassiana* on the cellular defense response of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.60, p.152-158, 1992.

INCH, J.M.M. et al. Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v.87, n.2, p.215-222, 1986.

INGBER, D.E. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. **Journal of Cell Science**, v.104, p.613-627, 1993.

JABLONKA, E.; LACHMANN, M.; LAMB, M.J. Evidence, mechanisms and models for the inheritance of acquired characters. **J. Theor. Biology**, v.158, p.245-268, 1992.

JACKSON, M.A. et al. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycol. Res.**, v.101, n.1, p.35-41, 1997.

JACKSON, S.L.; HEATH, I.B. Roles of calcium ions in hyphal tip growth. **Microbiology Rev.**, v.57, n.2, p.367-382, 1993.

JARDIM, W.F.; GUIMARÃES, J.R.; FARIA, L.C. Short-term toxicity test using *Escherichia coli*: monitoring CO₂ production by flow injection analysis. **Wat. Res.**, v.24, n.3, p.351-354, 1990.

JENKINS, N.J.; PRIOR, C. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. **Mycological Research**, v.97, n.12, p.1489-1494, 1993.

JONG et al. Glycerol generates turgor in rice blast. **Nature**, v.389, p. 244-245, 1997.

JOSHI, L.; St. LEGER, R.J. Cloning, expression, and substrate specificity of MeCPA, a zinc carboxypeptidase that is secreted into infected tissues by the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.14, p.9803-9811, 1999.

KAAYA, G.P. *Glossina morsitans morsitans*: mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. **Acta Tropica**, v.46, p.107-114, 1989.

KANG, S.C.; PARK, S.; LEE, D.G. Isolation and characterization of a chitinase cDNA from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.165, p.267-271, 1998.

KATZ, D.; ROSENBERGER, R.F. Hyphal wall synthesis in *Aspergillus nidulans*: effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. **Journal of Bacteriology**, v.108, n.1, p.184-190, 1971.

KERSHAW, M.K.; WAKLEY, G.; TALBOT, N. Complementation of the Mpg1 mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. **The EMBO Journal**, v.17, n.14, p. 3838-3849, 1998.

KESTER, A.S.; GARRET, D.C. Morphometry and stereology of the conversion of thin-walled yeasts to phase I yeast cells of *Wangliella dermatitidis*. **Mycologia**, v.87, n.2, p.153-160, 1995.

KLEESPIES, R.R.; ZIMMERMANN, G. Effect of additives on the production, viability and virulence of blastospores of *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.8, p.207-214, 1998.

KLEESPIES, R.R.; ZIMMERMANN, G. Production of blastospore by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture. **Biocontrol Science and Technology**, v.2, p.127-135, 1992.

KOBAYASHI, I. DNA modification and restriction: Selfish behavior of an epigenetic system. In: RUSSO, V.E.; MARTIENSSSEN, R.A.; RIGGS, A.D. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1996. p.155-172.

KOCH, A .L.; HIGGINS, M.L.; DOYLE, R.J. The role of surface stress in the morphology of microbes. **Journal of Microbiology**, v.132, p.927-945, 1982.

KOLATTUKUDY, P.E. et al. Host signals in fungal gene expression involved in penetration into the host. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl. 1, p. S1160-S1168, 1995.

KROPF, D.L.; MONEY, N.P.; GIBBON, B.C. Role of cytosolic pH in axis establishment and tip growth. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, Suppl. 1, p. S126-S130, 1995.

LACEY, C.M.; LACEY, L.A.; ROBERTS, D.R. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p.108-118, 1988.

LARONE, D.H. Guides. In: LARONE, D.H. **Medically important fungi**. Washington, D.C.: ASM Press, 1995. p.7-50.

LATGÉ, J.P. Biotechnology. In: SAMSON, R.A .; EVANS, H.C. ; LATGÉ, J.P. **Atlas of entomopathogenic fungi**. New York: Springer-Verlag, 1988. p.152-164.

LEE, K.L.; BUCKEY, H.R.; CAMPBELL, C.C. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.13, p.148-153, 1975.

LEIJA, A.; RUIZ-HERRERA, J.; MORA, J. Effect of L-amino acids on *Mucor rouxii* dimorphism. **Journal of Bacteriology**, v.168, n.2, p.843-850, 1986.

LEMAITRE, B.; REICHHART, J.M. ; HOFFMANN, J.A. . *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** , v.94, p.14614-14619, 1997.

LEVASHINA, E.A et al. Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. **Eur. J. Biochem.**, v.233, p.694-700, 1995.

LINGAPPA, B.T.; LINGAPPA, Y. Role of auto-inhibitors on mycelial growth and dimorphism of *Glomerella cingulata*. **Journal of General Microbiology**, v.56, p.35-45, 1969.

LOPES-LASTRA, C.; BOUCIAS, D.G. Studies on the cellular reactions of *Spodoptera exigua* larvae infected with the fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.63, p.101-102, 1994.

LOROS, J.; DUNLAP, J.C. *Neurospora crassa* clock-controlled genes are regulated at the level of transcription. **Molecular and Cellular Biology**, v.11, n.1, p.558-563, 1991.

LOWRY, C.V.; ZITOMER, R.S. Oxygen regulation of anaerobic and aerobic genes mediated by a common factor in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 81, p.6129-6133, 1984.

MACCHERONI, W. et al. The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 194, p.163-167, 1997.

MADHANI, H.D.; FINK, G.R. The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. **Trends Cell Biol.**, v.8, n.9, p.348-353, 1998.

MAGALHÃES, B.P.; GOETTEL, M.S.; FRAZÃO, H.S. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Beauveria bassiana* on *Rhammatocerus schistocercoides* under humid and dry conditions. **Braz. J. Microbiology**, v.31, p. 162-164, 2000.

MAHESHWARI, R. Microcycle conidiation and its genetic basis in *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.2103-2115, 1991.

MALLI, R.; EPSTEIN, W. Expression of the Kdp ATPase is consistent with regulation by turgor pressure. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.19, p.5102-5108, 1998.

MARMARAS, V.J. et al. Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonself-recognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.23, p.181-197, 1993.

MARMARAS, V.J.; CHARALAMBIDIS, N. Certain hemocyte proteins of the medfly, *Ceratitis capitata*, are responsible for nonself recognition and immobilization of

Escherichia coli In Vitro. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.21, p.281-288, 1992.

MARVIDOU, A.; CANNONE, J.; TYPAS, M.A. Identification of group-I introns at three different positions within the 28S rDNA gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Fungal Genet. Biol.**, v.31, n.2, p.79-90, 2000.

MATEWELE, P.; TRINCI, A.P.J.; GILLESPIE, A.T. Mutants of entomopathogenic fungi that germinate and grow at reduced water activities and reduced relative humidities are more virulent to *Nephotettix virescens* (green leaphopper) than parental strains. **Mycological Research**, v.98, n.11, p.1329-1333, 1994.

MATTEWS, R.C. et al. Stress proteins in fungal diseases. **Medical Mycology**, v.36, n.1, p.45-51, 1998.

MAYSER, P. et al. Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*. **Arch. Dermatol. Res.**, v.290, n.5, p.277-282, 1998.

McFARLANE, J.E. Nutrition and digestive organs. In: Blum, M. **Fundamentals of insects physiology**. New York: J. Willey Inc., 1985. p.5-57.

McINTYRE, M.; McNEIL, B. Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. **Appl. Microbiology Biotechnol.**, v. 50, p. 291-298, 1998.

McINTYRE, M.; McNEIL, B. Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in *Aspergillus niger* A60. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, p.135-142, 1997a.

McINTYRE, M.; McNEIL, B. Effect of carbon dioxide on morphology and product synthesis in chemostat cultures of *Aspergillus niger* A60. **Enzyme and Microbiol Technology**, v.21, p.479-483, 1997b.

MEINS Jr., F. Epigenetic modifications and gene silencing in plants. In: RUSSO, V.E.; MARTIENSSEN, R.A.; RIGGS, A.D. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1996. p.415-442.

MESSIAS, C.L. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de pragas agrícolas. In: II Ciclo de Palestras sobre controle biológico de pragas, Campinas, São Paulo, 1991. **Anais da Fundação Cargill**, 1991. p.111-125.

MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.75, p.473-477, 1980.

MIRANPURI, G.S.; BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOUTIANS, G.G. Morphology and cytochemistry of hemocytes and analysis of hemolymph from *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Economic Entomology**, v.84, n.2, p.371-378, 1991.

MISCHKE, M.D.; CHANT, J. The shape of things to come: morphogenesis in yeast and related patterns in others systems. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl. 1, p. S234-S121242, 1995.

MITCHELL, D.J.; ZENTMYER, G.A. Effects of oxygen and carbon dioxide tensions on growth of several species of *Phytophthora*. **Phytopathology**, v.61, p.787-791, 1971.

MOMANY, M. et al. Septum formation in *Aspergillus nidulans*. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl. 1, p. S396-S399, 1995.

MONOD, M. et al. The secreted proteases of pathogenic species of *Aspergillus* and their possible role in virulence. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl. 1, p.S1081-S1086, 1995.

MONEY, N.P. Turgor pressure and the mechanisms of fungal penetration. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl. 1, p. S96-S102, 1995.

MOORE, D. Mushrooms upright, sideways and inside-out. **Mycological Research**, v.102, n.6, p.641-657, 1998.

MUÑOZ, G.A. et al. Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.125, p. 63-70, 1995.

NIELSEN, J.; KRABBEN, P. Hyphal growth and fermentation of *Penicillium crysogenum* in submerged cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.46, p.588-598, 1995.

NIKAWA, H. et al. A novel method to study the hyphal phase of *Candida albicans* and to evaluate its hydrophobicity. **Oral Microbiology Immunol.**, v.10, p.110-114, 1995.

ORLOWSKI, M. Gene expression in *Mucor* dimorphism. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl. 1, p. S326-334, 1995.

ORLOWSKI, M. *Mucor* dimorphism. **Microbiological Reviews**, v. june, p.234-258, 1991.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M.; KRISTIANSEN, B. Hyphal vacuolation and fragmentation in batch and fed-batch culture of *Aspergillus niger* and its relation to citric acid production. **Process Biochemistry**, v.35, p.359-366, 1999.

PATERSON, I.C. et al. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v.140, p.3153-3159, 1994.

PATERSON, I.C. et al. Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Microbiology**, v.140, p.185-189, 1994.

PENDLAND, J.C.; BOUCIAS, D.G. Characterization of monoclonal antibodies against cell wall epitopes of the insect pathogenic fungus *Nomuraea rileyi*: differential binding to fungal surfaces and cross-reactivity with host hemocytes and basement membrane components. **Eur. J. Cell Biol.**, v.75, n.2, p.118-127, 1998.

PENLAND, J.C.; BOUCIAS, D.G. Physicochemical properties of cell surfaces from the different developmental stages of the entomopathogenic hyphomycete *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, v.83, n.3, p.264-272, 1991.

PEREIRA Jr., H.A. et al. At least three genes are responsible for benomyl-resistance in *Metarhizium anisopliae*. **New Microbiology**, v.17, n.1, p.45-50, 1994.

PIEDRABUENA, A.E. **Elementos de Bioestatística**. Campinas, 1996. 161p.

PIETRO, R.C.L.R.; JORGE, J.A. ; TERENZI, H.T. Effects of the cell wall deficiency in 'slime' strains of *Neurospora crassa*: a study on mycelial and wall-less phenotypic derivatives of a single *fz*; *sg*; *os-1* ('slime'-like) segregant. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.121-129, 1990.

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidullans*. **Advances in Genetics**, v. 5, p.141-148, 1953.

PRASERTPHON, S.; TANADA, Y. The formation and circulation, in *Galleria*, of hyphal bodies of entomophthoraceous fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.11, p.260-280, 1968.

PROSSER, J.I.; TOUGH, A. J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.10, n.4, p.253-274, 1991.

RATH, A.C.; GUY, P.L. ; WEBB, W.R. *Metarhizium* spore surface antigens are correlated with pathogenicity. **Mycological Research**, v.100, n.1, p.57-62, 1995.

REIS, P.R. Fungos entomopatogênicos. **Informat. Agropec.**, Belo Horizonte, v. 15, n.167, p.5-20, 1991.

RENSING, L.; MONNERJAHN, C.; MEIER, U. Differential stress gene expression during the development of *Neurospora crassa* and other fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v.168, p.159-166, 1998.

REYNA-LÓPEZ, G.E.; SIMPSON, J.; RUIZ-HERRERA, J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. **Mol. Gen. Genet.**, v.253, p. 703-710, 1997.

RIBA, G. et al. Comparative studies of *Metarhizium anisopliae* and *Tolypocladium cylindrosporum* as pathogens of mosquito larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.2, n.4, p.469-473, 1986.

RICHMAN, A. ; KAFATOS, F. Immunity to eukariotic parasites in vector insects. **Current Opinion in Immunology**, v.8, p.14-19, 1996.

RIGGS, A.D.; MARTIENSSEN, R.A.; RUSSO, V.E. Introduction. In: RUSSO, V.E.; MARTIENSSEN, R.A.; RIGGS, A.D. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1996. p.1-5.

RIGGS, A.D.; PORTER, T.N. Overview of epigenetic mechanisms. In: RUSSO, V.E.; MARTIENSSEN, R.A.; RIGGS, A.D. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1996. p.29-46.

RIPPON, J.W. Dimorphism in pathogenic fungi. **Critical Reviews in Microbiology**, v. September, p.49-97, 1980.

RONNE, H. Glucose repression in fungi. **Trends in Genetics**, v.11, n.1, p.12-17, 1995.

ROSS, I.K. Fungal associations: animal predator and parasite. In: ROSS, I.K. **Biology of the Fungi**. New York: McGraw-Hill, 1979. p.437-450. 1979b.

ROSS, I.K.. Fungal associations: plant parasite and pathogen. In: ROSS, I.K. **Biology of the Fungi**. New York: McGraw-Hill, 1979. p.423-436. 1979c.

ROSS, I.K. Vegetative behavior and mutiplication. In: ROSS, I.K. **Biology of the Fungi**. New York: McGraw-Hill, 1979. p.256-299. 1979a.

RUSSEL, P.J. et al. Different levels of DNA methylation in yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.9, p.4393-4395, 1987.

RUSSO, V.E.A.; LEE, Y.S.; CODÓN, A.C. Silencing of the gene *hph* in *Neurospora crassa*. In: RUSSO, V.E.; MARTIENSSEN, R.A.; RIGGS, A.D. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1996. p.345-360.

SACHS, M.S.; YANOFSKY, C. Developmental expression of genes involved in conidiation and amino acid biosynthesis in *Neurospora crassa*. **Developmental Biology**, v.148, p.117-128, 1991.

SACKIN, H. Mechanosensitive channels. **Ann. Rev. Physiol.**, v.57, p.333-353, 1995.

SANCHEZ-MARTINEZ, C.; PEREZ-MARTIN, J. Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* – similar inputs, different outputs. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, N.2, P. 214-221, 2001.

SAPORITO-IRWIN, S.M. et al. *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, v.15, n.2, p.601-613, 1995.

SCHABEL, H.G. Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.27, p.377-383, 1976.

SCOTT, W.A. Biochemical genetics of morphogenesis in *Neurospora*. **Ann. Reviews in Microbiology**, v.30, p.88-104, 1976.

SCREEN, S. et al. Isolation of nitrogen response regulator gene (*nnr1*) from *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v.221, n.1, p.17-24, 1998.

SELKER, E.U. Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induced confusion?. **Trends in Genetics**, v.13, n.8, p.296-301, 1997.

SHERMAN, J.C.; PILLUS, L. No uncertain silence. **Trends in Genetics**, v.13, n.8, p.308-313, 1997.

SHIOZAKI, K.; RUSSEL, P. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. **Nature**, v.378, n.6558, p.739-743, 1995.

SHULMAN, J.M.; St. JOHNSTON, D. Pattern formation in single cells. **Trends in Genetics**, v.15, n.11, p.M60-M64, 1999.

SIGLER, L. Problems in application of the terms 'blastic' and 'thalic' to modes of conidiogenesis in some onygenalean fungi. **Mycopathologia**, v.106, p.155-161, 1989.

SKYRING, G.W.; TRUDINGER, P.A. A method for the electrophoretic characterization of Sulfite Reductases in crude preparations from sulfate-reducing bacteria using polyacrylamide gels. **Canadian Journal of Biochemistry**, v.50, p.1145-1148, 1972.

SIMS, W. Effect of carbon dioxide on the growth and form of *Candida albicans*. **J. Med. Microbiology**, v.22, p.203-208, 1986.

SMITH, J.M. Models of a dual inheritance system. **J. Theor. Biol.**, v.143, p.41-53, 1991.

SMITHSON, S.L. et al. Cloning and characterization of a gene encoding a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v.166, n.1, p.161-165, 1995.

SOLL, D.R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.5, n.2, p.183-203, 1992.

SOLL, D.R.; SONNEBORN, D.R. Zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*: cell differentiation without protein synthesis?. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.68, n.2, p.459-463, 1971.

SOSA-GOMES, D.R.; BOUCIAS, D.G. ; NATION, J.L. Mechanisms for the control of gene activity during development. **Biol. Rev.**, v.65, p.431-471, 1990.

SOSA-GOMES, D.R.; BOUCIAS, D.G.; NATION, J.L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.69, p.31-39, 1997.

St. LEGER et al. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, v.136, n.9, p.1779-1789, 1990.

St. LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Characterization of a novel carboxypeptidase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.314, n.2, p.392-398, 1994.

St. LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Germination triggers *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. **Microbiology**, v.140, p.1651-1660, 1994.

St. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D.W. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. **Microbiology**, v.143, p.1983-1992, 1997.

St. LEGER, R.J.; NELSON, J.O.; SCREEN, S.E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. **Microbiology**, v.145, Pt.10, p.2691-2699, 1999.

SUBERKROPP, K. The influence of nutrients on fungal growth, productivity, and sporulation during leaf breakdown in streams. **Canadian Journal of Botany**, v.73, Suppl.1, p. S1361-1369, 1995.

SWOBODA, R.K. et al. Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism. **Mol. Microbiology**, v.13, n.4, p.663-672, 1994.

SZABO, R. Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. **Folia Microbiology**, v.44, n.1, p.19-24, 1999.

TALBOT, N.J. Fungal Biology: growing in the air. **Current Biology**, v.7, p. R78-R81, 1997.

TAMERLER, C. et al. Effect of pH on physiology of *Metarhizium anisopliae* for production of swainsonine. **FEMS Microbiology Letters**, v.168, p.17-23, 1998.

TANAME, M. et al. High frequency conversion to a 'fluffy' developmental phenotype in *Aspergillus* spp. By 5-Azacytidine treatment: evidence for involvement of a single nuclear gene. **Molecular and Cellular Biology**, v.3, p.2287-2297, 1983.

THOMAS, C.C. Haemolymph volume, circulatory pathway, and pressure. In: JONES, J.C. **The circulatory system of insects**. New York: Springfield, 1977. p. 74-94.

THOMAS, M.B.; JENKINS, N.E. Effects of temperature on growth of *Metarhizium flavoviride* and virulence to the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. **Mycological Research**, v.101, n.12, p.1469-1474, 1997.

TIMBERLAKE, W.E. Translational triggering and feedback fixation in the control of fungal development. **The Plant Cell**, v.5, p.1453-1460, 1993.

TIMBERLAKE, W.E.; BARNARD, E.C. Organization of a gene cluster expressed specifically in the asexual spores of *Aspergillus nidulans*. **Cell**, v.26, p.29-37, 1981.

TULLOCH, N. The genus *Metarhizium*. **The Transaction of the British Mycological Society**, v.66, p.107-411, 1976.

TORRES-GUZMAN, J.C. et al. Genetic evidence for independence between fermentative metabolism (ethanol accumulation) and yeast-cell development in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. **Curr. Genet.**, v.26, p.166-171, 1994.

TRINCI, A .P.J. Influence of the width of peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. **Journal of General Microbiology**, v.67, p.325-344, 1971.

TRIPP, M.L.; PAZNOKAS, J.L. Role of amino acids and endogenous protein in the germination of *Mucor racemosus* sporangiospores. **Journal of General Microbiology**, v.128, p.485-495, 1982.

TUBAKI, K. Sporulating structures in fungi imperfect. In: AINSWORTH, G.C.; SUSSMAN, A.S. **The fungi: an advanced treatise**. New York, 1966. p.113-131.

VEEN K.H. Isolement, développement et crissance in vitro, conservation. In: VEEN, K.H. **Recherches sur la maladie, due a Metarhizium anisopliae chez le criquet pèlerin**. Wageningen: H. Veenman & N.V. Zonen., 1968. p.12-35, 68-72.

VEGA, F.E. et al. *In vitro* effects of secondary plant compounds on germination of blastopores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.70, p.209-213, 1997 .

VILCINSKAS, A.; MATHA, V. Antimycotic activity of lysozyme and its contribution to antifungal humoral defence reactions in *Galleria mellonella*. **Anim. Biol.**, v.6, p.19-29, 1997.

VIVIER, M.A.; LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Coregulation of starch degradation and dimorphism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, n.5, p.405-435, 1997.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. New York: J. Wiley, 1995. 1360p.

WADDINGTON, C.H. **The strategy of the genes: a discussion of some aspects of Theoretical Biology**. 1st ed. London: George & Unwin LTD., 1957. 262p.

WANG, Y.; AINSEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanisms of action. **Infection and Immunity**, v.63, n.8, p.3131-3136.

WARD, M.D. et al. Allergen triggered airway hyperresponsiveness and lung pathology in mice sensitized with the biopesticide *Metarhizium anisopliae*. **Toxicology**, v.143, n.2, p.141-154, 2000 a.

WARD, M.D. et al. Comparison of respiratory responses to *Metarhizium anisopliae* extract using two different sensitization protocols. **Toxicology**, v.147, n.2, p.133-145, 2000 b.

WATTERS, M.K. et al. Branch initiation in *Neurospora* is influenced by events at the previous branch. **Mycological Research**, v.104, n.7, p.805-809, 2000.

WESSELS, J.G.H. Wall, growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. **New Physiol.**, v.123, p.397-413, 1993.

WOODRING, J.P. Circulatory systems. In: Blum, M. **Fundamentals of insects physiology**. New York: J. Willey Inc., 1985. p.5-57.

XAVIER, I.J.; KHACHATOURIANS, G.G.; OVSENEK, N. Constitutive and heat-inducible heat shock element binding activities of heat shock factor in a group of filamentous fungi. **Cell Stress Chaperones**, v.4, n.4, p.211-222, 1999.

XIA, Y.; CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A. K. Acid phosphatases of *Metarhizium anisopliae* during infection of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Arch. Microbiology**, v.176, n.6, p.427-434, 2001.

YOKOYAMA, K. et al. The role of microfilaments and microtubules during pH-regulated morphological transition in *Candida albicans*. **Microbiology**, v.140, p.281-287, 1994.

ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval elateridae (Coleoptera): II. Conidial germ tubes and appressoria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.15, p.81-91, 1970.

ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval elateridae (Coleoptera): I. Dormant and germinating conidia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.15, p.63-80, 1970.

ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). IV. Development within the host. **Canadian Journal of Microbiology**, v.17, p.525-529, 1971.

ZITOMER, R.S. ; LOWRY, C.V. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v.56, n.1, p.1-11, 1992.