

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/8865
IB/81028

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1987

Art. nomeado Europeu para a Rede Nacional
BC/8865
IB/81028
dida pelo candidato Breno
vade pelo Conselho Federal
Unif, 2/10/87

Variabilidade de linhagens de *Metarhizium anisopliae*, quanto a
atividade enzimática, resistência à luz ultravioleta e virulência
ao vetor da doença de Chagas *Panstrongylus megistus*.

61028

Breno Leite
biólogo

orientador : Prof. Dr. Cláudio Luiz Messias

Tese apresentada ao
Instituto de Biologia
da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção
do título de mestre em
Biologia.

120

CAMPINAS
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

T/UNICAMP
L536_v

1987

UNICAMP

Classif.	T
Autor	L536V
V.	Ex.
Tombo BC/	8865
1B	751

1B/ 8 1028
BC/ 8865

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética de Microorganismos do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas.

As bolsas concedidas durante o período foram provenientes do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A manutenção dos Laboratórios foi possível graças ao auxílio do CNPq, Fapesp e Embrapa.

Aos meus pais

e irmã,

OFEREÇO

À Ana,

que acompanhou de
perto meu trabalho,

DEDICO

Talvez eu devesse ter isso sempre em mente:

E POR FALAR EM MUDANÇA...

Se eu tivesse a vida para viver novamente,
eu ousaria cometer mais erros da próxima vez.
Eu relaxaria, eu me tornaria mais flexível.
Eu seria mais bricalhona do que tenho sido,
levaria menos coisas a sério. Eu aproveitaria mais oportunidades,
escalaria mais montanhas e atravessaria mais rios.
Eu comeria mais sorvete e menos feijão.
Talvez eu tivesse mais problemas concretos,
mas teria menos problemas imaginários.
Como você vê, sou daquelas pessoas que vivem sensivelmente e
de forma sã hora após hora, dia após dia.
Ah! tive meus momentos e se os tivesse novamente, teria um número
maior deles, de fato, eu não tentaria ter nada mais do que isso.
Somente momentos, um após o outro, ao invés de viver tantos anos
na frente de cada dia.
Fui do tipo que jamais vai a algum lugar sem um termômetro,
uma garrafa de água quente, uma capa de chuva e para-quedas.
Se eu tivesse que ir novamente, iria com menos bagagem.
Se eu tivesse minha vida para viver novamente, eu entraria
descalça na primavera e assim permaneceria até o final do outono.
Eu iria mais a festas.
Eu andaria mais vezes de carrossel.
Eu colheria mais margaridas.

NADINE STAIR
85 anos
LUISVILLE, KENTUCKY
U.S.A.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Cláudio Luiz Messias, pela orientação e pelo empenho no sentido de oferecer excelentes condições para a realização do trabalho.
- Ao Prof. Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, pelo auxílio na parte estatística e pelas observações claras, pertinentes e constantes, contribuindo para o enriquecimento da tese.
- À Profa. Dra. Aline A. Pizzirani Kleiner, pelas sugestões e críticas valiosas para a redação final.
- Ao Prof. Dr. João Lucio de Azevedo, pelas sugestões bibliográficas e pelo estímulo e humildade demonstrados.
- Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pela paciência, prontidão e entusiasmo durante a análise estatística dos dados.
- Ao Prof. Dr. Renato Bonatelli Junior, pelas sugestões bibliográficas, críticas e bom humor constante.
- Ao Prof. Carlos Fernando Salgueirosa de Andrade, pela disponibilidade constante para papos e preocupações diversas, apesar da alta carga de ocupações.
- Ao Prof. Dr. Mohamed Ezz El-din Moustafa Habib a admiração pela dedicação à área de Controle Biológico.
- Ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues Oliveira, companheiro, incentivador e defensor incansável do espírito crítico e científico.
- Ao Prof. Dr. Rolf Dieter Illg, pela amizade, pelo estímulo e interesse demonstrados.

- Ao Prof. Dr. José Carlos da Silva, amizade sincera, pelas discussões e sugestões no delineamento das investigações.
- Ao Prof.Dr.Benedito Oliveira Filho, pelo exemplo de persistência e empreendimento.
- Ao Prof.Dr.Benedicto de Campos Vidal, por ter me ensinado o valor do "preço combinado"
- À Profa. Dra. Maria Luiza S.Mello, coordenadora da Pós-IB, pelas facilidades concedidas.
- À SUPERINTENDÊNCIA DO CONTROLE DE ENDEMIAS - SUCEN - Mogi-Guaçu, através de seu Coordenador, Sr. Antenor Nascimento Ferraz Filho, pelo fornecimento de ninfas de *Panstrongylus megitus* para a realização dos bioensaios.
- À Diretora da biblioteca do Instituto de Biologia, Sra. Ana Agagliardi, pela orientação durante a revisão bibliográfica.
- Aos meus pais e à Justa, pelo apoio incondicional durante toda minha vida "real" e acadêmica.
- À Ana, pelo companheirismo e estímulo indispensáveis.
- À D.Jacira, por ter me auxiliado na escolha de uma das trilhas.
- Ao Plínio, parceiro de toca, agradecimento especial pelo "Conselho Editorial", a censura benévola.
- À Silvia, da secretaria da Pós-Genética, pela eficiência e camaradagem sem igual.
- Ao Dráuzio, pela consideração e pelo fornecimento irrestrito de equipamento do INBIOTER (Instituto de Biotecnologia Rangel).
- Aos amigos e professores do Departamento de Genética e Evolução-UNICAMP.

Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1. Descrição sucinta do Patógeno	03
2.1.1. Classificação	03
2.1.2. Condições Gerais de Cultivo	04
2.1.3. Modo de infecção	05
2.2. A Caracterização das Linhagens e sua implicação	09
2.2.1. O Significado da Atividade Enzimática	09
2.2.2. O Tamanho de Conídios e Virulência	14
2.3. Considerações sobre o hospedeiro	16
2.4. Melhoramento Genético	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Microorganismos utilizados	22
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas	24
3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO et al, 1953).	24
3.2.2. Meio completo (PONTECORVO et al, 1953) modificado por AZEVEDO & COSTA (1973).....	25
3.2.3. Solução de Tween 80 (0,01% V/V)	25
3.2.4. Solução de Salina (0,85%)	26
3.2.5. Solução de Vitaminas	26

3.2.6.	Solução de NaOH 1N	27
3.2.7.	Solução de HCl 1N	27
3.2.8.	Solução Alcoólica de iodo (1%)	27
3.2.9.	Solução Aquosa Saturada de Sulfato de Amônia . . .	27
3.2.10.	Solução de Gelatina (8%)	28
3.3.	Esterilização do material	28
3.4.	Temperatura e tempo de Incubação	28
3.5.	Metodologia para avaliação de atividade enzimática . . .	29
3.5.1.	Atividade Amilolítica	29
3.5.2.	Atividade Proteolítica	30
3.5.3.	Atividade Lipolítica	31
3.5.4.	Atividade Quitinolítica	31
3.5.4.1.	Preparo da quitina coloidal	31
3.5.4.2.	Preparo do meio de cultura	34
3.5.5.	Atividade Enzimática em diferentes concentrações de substrato de amido solúvel . . .	35
3.5.6.	A diferença entre diâmetros de halo de degradação e da colônia, como forma de expressar a produção de enzimas	35
3.5.7.	Atividade Enzimática através da diferença de diâmetros do halo de degradação e da colônia E9	36
3.6.	Tamanho de conídios	36
3.7.	Crescimento radial	37
3.8.	Curvas de sobrevivência à luz ultravioleta	37

3.9.	Teste de viabilidade	38
3.10.	Padrão de germinação	39
3.11.	Número de esporos por colônia	39
3.12.	Bioensaios	40
3.12.1.	Insetos utilizados	40
3.12.2.	O método	41
4.	RESULTADOS	43
4.1.	Atividade Enzimática	43
4.1.1.	Comportamento enzimático da linhagem E9, utilizada como padrão nos experimentos	43
4.1.2.	Determinação do índice de atividade enzimática (diâmetro colônia/diâmetro da colônia+ halo de degradação) das linhagens utilizadas	50
4.1.3.	Atividade amilolítica em diferentes concentrações de amido solúvel	54
4.1.4.	Proposta de método para avaliação de atividade enzimática	60
4.2.	Sobrevivência ao Ultravioleta	67
4.3.	Comprimento e Largura de conídios	75
4.4.	Padrão de germinação, viabilidade, produção de esporos e crescimento radial	80
5.	DISCUSSÃO	95
5.1.	Atividade Enzimática	95
5.1.1.	Comportamento enzimático da linhagem E9	95

5.1.2.	Estabelecimento do índice de Atividade Enzimática	96
5.1.3.	Atividade amilolítica, proteolítica e quitinolítica em concentrações diferentes dos substratos	98
5.1.4.	Produção de enzimas amilolíticas em diferentes concentrações de amido solúvel	99
5.1.5.	A diferença de diâmetros como alternativa para avaliação de produção de enzimas	99
5.2.	Sobrevivência à luz ultravioleta.	100
5.3.	Tamano de conídios	102
5.4.	Padrão de germinação, viabilidade, produção de esporos e crescimento radial	104
5.4.1.	Crescimento radial e produção de esporos	104
5.4.2.	Viabilidade e padrão de germinação	105
5.5.	Bioensaios	107
5.5.1.	Tempo Letal (LT50) e virulência	107
6.	CONCLUSÕES	111
7.	RESUMO	112
8.	SUMMARY	113
9.	LITERATURA CONSULTADA	114

FIGURAS

1.	Aspecto morfológico das linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizadas no presente trabalho (7 dias de incubação)	23
2.	Aspecto da placa de atividade quitinolítica após 7 dias de incubação, mostrando diferenças na habilidade de 4 linhagens na exploração do substrato	32
3.	Quitina coloidal, aspecto após tratamento da quitina comercial (sigma) com HCl concentrado, segundo AMAGASE (1972)	35
4.	Ninfas de <i>Panstrongylus megistus</i> no terceiro ínstar observadas em frascos com umidade controlada durante os bioensaios	42
5.	Histograma da evolução da atividade amilolítica da linhagem E9	48
6.	Histograma da evolução da atividade proteolítica da linhagem E9	48
7.	Histograma da evolução da atividade lipolítica da linhagem E9	49
8.	Histograma da evolução da atividade quitinolítica da linhagem E9	49
9.	Comparação do fenótipo da colônia de linhagens com a mesma idade e respectivos índices de atividade enzimática ou valores de áreas de degradação	53

10. Conídios da linhagem E9 (minor) em processo de germinação, mostrando a formação polar do tubo germinativo	81
11. Conídios da linhagem 5 (major) em processo de germinação, mostrando a formação polar do tubo germinativo	82
12. Histograma do crescimento radial das colônias de M. anisopliae em meio mínimo (5, 7 e 9 dias)	90
13. Histograma do crescimento radial das colônias de M. anisopliae em meio completo (5, 7 e 9 dias)	91

TABELA

1. Comportamento de atividade amilolítica da linhagem E9	44
2. Comportamento da atividade proteolítica da linhagem E9	45
3. Comportamento da atividade lipolítica da linhagem E9	46
4. Atividade quitinolítica da linhagem E9	47
5. Valores dos índices de Atividade Enzimática (I.A.E)	51
5.a. Valores de diâmetros de degradação de quitina das linhagens estudadas	52
6. Diâmetro de ação enzimática em 3 concentrações diferentes de cada substrato utilizado	55
7. Média, desvio padrão e variância das leituras de diâmetro de área de atividade enzimática em concentrações de amido solúvel (curva 1)	56
(curva 2)	57

8.	Teste de KRUSKAL-WALLIS para os valores de produção de enzimas lipolíticas	61
9.	Teste de KRUSKAL-WALLIS para os valores de produção de enzimas amilolíticas	62
10.	Teste de KRUSKAL-WALLIS para os valores de produção de enzimas quitinolíticas	63
11.	Teste de KRUSKAL-WALLIS para os valores de produção de enzimas proteolíticas	64
12.	Comparação da produção de enzimas pelas quinze linhagens de <i>M. anisopliae</i> estudadas	65
13.	Valores de rs obtidos no teste de correlação de SPEARMAN	66
14.	Sobrevivência de <i>M. anisopliae</i> à luz ultravioleta	68
15.	valores de LD95 de linhagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> , em minutos, segundo metodologia de BARACHO & ROSIM (1977)	74
16.	Comparação da média, desvio padrão e variância de 15 linhagens de <i>M. anisopliae</i> , considerando-se o comprimento dos conídios	76
17.	Comparação da média, desvio padrão e variância de 15 linhagens de <i>M. anisopliae</i> , considerando-se a largura dos conídios	77
18.	Separação das linhagens de <i>M. anisopliae</i> nas duas variedades, minor e major	79
19.	Padrão de germinação das 15 linhagens de <i>M. anisopliae</i> , porcentagem de conídios com germinação polar, bipolar e não polar (Porcetagem)	83

20. Viabilidade das linhagens.	84
21. Produção de esporos das 15 linhagens analisadas.	85
22. Crescimento radial de <i>M. anisopliae</i> em meio mínimo (MM)	88
23. Crescimento radial de <i>M. anisopliae</i> em meio completo (MC)	89
24. Valores de LT50 dos bioensaios realizados, calculados pelo método de THOMPSON & WEIL	92
25. Valores de atividade enzimática, LT50 e crescimento radial para comparação	93

GRÁFICOS

1. Comportamento do diâmetro de atividade amilolítica em diferentes concentrações de amido solúvel	58
2. Comportamento do diâmetro de atividade amilolítica em diferentes concentrações de amido solúvel (repetição)	59
3. Curvas de sobrevivência de linhagens de <i>M. anisopliae</i> (23, 5, 64)	69
4. Curvas de sobrevivência de linhagens de <i>M. anisopliae</i> (40, 9, E9)	70
5. Curvas de sobrevivência de linhagens de <i>M. anisopliae</i> (1, 20, 58)	71

6.	Curvas de sobrevivência de linhagens de <i>M. anisopliae</i>	
	(B/vi, 14, 70)	72
7.	Curvas de sobrevivência de linhagens de <i>M. anisopliae</i>	
	(10, 5, Y5)	73
8.	Relação comprimento x largura de conídios de <i>M. anisopliae</i>	
	considerando os desvios respectivos	78

I. INTRODUÇÃO

O incremento na utilização do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN, como agente microbiológico de controle vem sendo equacionado mais intensamente nos últimos anos, devido principalmente, às perspectivas crescentes da possibilidade de eficiência de controle aliada a diminuição do impacto ambiental causado pelos inseticidas químicos. A dificuldade no estudo da relação patógeno-hospedeiro é agravada no caso dos fungos e insetos por apresentarem os fungos várias maneiras de infecção, ao contrário de bactérias e vírus que infectam quase que exclusivamente, através do trato digestivo.

A complexidade da relação envolve ainda uma série de fatores bióticos e abióticos que apresentam um grande número e dificuldades para a elaboração de planos de melhoramento.

Este trabalho teve por finalidade contribuir no sentido de esclarecer alguns pontos relacionados com esses problemas. Procuramos estudar a variabilidade natural de um grupo de 15 linhagens de *Metarhizium anisopliae*, investigando a susceptibilidade à radiação ultravioleta, importante para a seleção de linhagens mais resistentes às condições de campo, comparando a capacidade de produção das quatro enzimas mais importantes durante a colonização do

inseto hospedeiro e traçando o perfil biológico das mesmas. Ao final, a virulência das linhagens contra o vetor da doença de Chagas *Panstrongylus megistus* foi analisada.

Com certeza, além de contribuir para auxiliar no processo de seleção de linhagens, alguns caracteres determinados neste estudo poderão ser propostos para classificação, já que a taxonomia de fungos é, ainda, intensamente baseada em critérios morfológicos. Outro ponto importante a ser considerado, é a contribuição para o avanço da área de controle microbiológico de insetos, de grande interesse para agricultura e saúde pública, como é o caso do inseto alvo deste trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Descrição sucinta do Patógeno

2.1.1. Classificação

O Gênero *Metarhizium*, pertence à ordem Moniliales e a classe Deuteromycetes, é atualmente dividido em apenas duas espécies, *M. flavoviride* e *M. anisopliae*, sendo a segunda espécie composta por duas variedades, a variedade *anisopliae* ou minor que apresenta esporos com 3.5-9.0 μm (normalmente 5-8 μm), e a variedade major cujo comprimento de esporos varia entre 9-18 μm (normalmente 10-14 μm) (TULLOCH, 1976).

Foi descrito primeiramente por METSCHNIKOFF em 1879, que o isolou a partir do besouro *Anisopliae* austríaca, sendo finalmente classificado por SOROKIN (1983). Desde o isolamento, considerado um marco na Patologia de Insetos (STEINHAUS, 1963), uma ampla sinônimia foi gerada, principalmente devido a larga variação no tamanho e na coloração dos conídios (LATCH, 1965; DELACROIX, 1893; VUILLEMIM, 1904).

JOHNSTON (1915) já havia proposto a separação do gênero *Metarhizium* nas duas variedades descritas. Em alguns casos, é essencial a separação dentro destes padrões para auxiliar na interpretação dos dados obtidos (RADHA, NIRULA & MENON, 1956; MULLER-KOGLER, 1971; FERRON, HURPIN & ROBERT, 1972).

2.1.2. Condições Gerais de Cultivo

A temperatura ideal para a incubação de *M. anisopliae* situa-se entre 25° e 30°C (LATCH, 1965; BASTOS & MATTA, 1976; VILLACORTA, 1978; SANTOS, 1978).

Em termos de requerimentos nutricionais não há grandes exigências, entretanto, é evidente que alterações nas formulações dos meios utilizados para cultivo podem permitir aumentos significativos na esporulação, importante para a fase de produção industrial (SANTOS, 1978; DAOUST et al, 1982, 1983 a,b; CAMPBELL et al, 1983).

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

2.1.3. Modo de Infecção

As linhas gerais do processo de penetração do *M. anisopliae* foram quase esgotadas por uma série de trabalhos publicados por ZACHARUK (1970 a,b,c, 1971). O autor relata que o crescimento das hifas pressiona mecanicamente a epicutícula, e a ação concomitante de enzimas permite que o patógeno ganhe o interior do inseto. Em seguida, as hifas crescem comprometendo os órgãos internos do inseto, causando-lhe a morte, voltando ao exterior onde crescem até a formação de conidióforos seguida de esporulação. Apesar de razoavelmente organizado, o sistema de defesa dos insetos parece ser facilmente vencido pelo grande número de esporos (BARRACCO & MENEZES, 1984)

PEKRUL & GRULA (1979), acompanharam a infecção de *Heliothis zea* pelo fungo *Beauveria bassiana*, descreveram a sequência de eventos ocorridos, ressaltando a germinação rápida dos conídios e a ação sincronizada de enzimas provocando o aparecimento de poros na superfície cuticular, reportaram ainda a ocorrência de penetração através dos espiráculos. O trato digestivo parece não representar rota usual de infecção, mas alguns casos já mereceram menção em revisões (FERRON, 1978). AGUDELO-SILVA & WASSINK (1984) estudando a infectividade de uma linhagem venezuelana de *Metharhizium anisopliae* verificaram que tanto o contato quanto a ingestão foram capazes de originar infecções letais.

A cavidade oral de insetos como porta de entrada para os esporos, está na dependência do perfil microbiológico do trato digestivo, além de deficiência de nutrientes, oxigênio, pH, pressão osmótica; DILLON & CHARNLEY (1986) detectaram a existência de um fator antifúngico associado à flora bacteriana intestinal do gafanhoto *Schistocerca gregaria*.

Em busca da sequência do trabalho enzimático durante a infecção SMITH et al (1981) solubilizaram o conteúdo de larvas de *Heliothis zea* com Duodecil sulfato de sódio 1%, e obtiveram "esqueletos" intactos denominados GHOSTS na língua inglesa, quase exclusivamente compostos por quitina e proteína. A eletromicroscopia de

varredura mostrou que é necessária uma certa ação enzimática para vencer a barreira quitino-proteica, pois aberturas existentes não tem largura nem número suficiente para permitir a penetração de hifas. Constataram ainda, que a ingestão dos GHOSTS só era possível com a combinação de enzimas proteolíticas seguidas de quitinolíticas.

Além da atividade de enzimas que é requerida in vivo, já durante os primeiros estágios de formação do tubo germinativo (SODERHALL et al, 1978) outro fator importante durante o multifacetário processo de colonização é a produção de toxinas, proteases (KUCERA & SAMSINAKOVÁ, 1968), bauvericinas (HAMILL et al, 1969) e destruxinas em *M. anisopliae* (KODAIRA, 1962; ROBERTS, 1969); LUGLI & MESSIAS, 1984).

A ação das toxinas é limitada por alguns fatores, o que de certa forma dificultam o estabelecimento da relação direta entre toxinas e virulências. Estudando a atividade de destruxinas no desenvolvimento de micose causada por *M. anisopliae*, FARGUES et al (1985) concluíram que o papel das toxinas é, basicamente, dependente da capacidade de produção de toxinas pelas linhagens do fungo e da habilidade de desintoxicação das espécies hospedeiras.

KUCERA em 1982, reportou a inibição de proteases tóxicas produzidas por *M. anisopliae* por extratos de larvas de *Galleria mellonella* e, em 1984, o mesmo autor isolou e purificou parcialmente inibidores proteolíticos também de *G. mellonella*. O autor comenta que a função fisiológica dos inibidores é muito pouco entendida. Em insetos, estes inibidores, aparentemente, atuam na diferenciação e como parte dos mecanismos de defesa, aumentando consideravelmente durante uma infecção.

Ainda estudando inibidores de proteases, KUCERA & WEISER (1984) mostraram que larvas de *G. mellonella* quando infectadas por dois microsporidas *Vairimorpha heterosporum* e *Nosema algerae*, que o aumento de atividade inibitória na hemolinfa foi substancial e coincidiu com o desenvolvimento da doença, além disso, o curso da atividade proteolítica apresentou um padrão inverso da atividade inibitória elevada.

A cutícula apresenta também compostos com funções anti-fungo (KOIDSUMI, 1957), representando mais uma barreira a ser vencida pelas hifas do entomopatógeno.

Em recente revisão, TERRIERE (1984) descreveu alguns sistemas de desintoxicação em insetos, especialmente os envolvidos com a inativação de inseticidas e hormônios de insetos. Basicamente, estes sistemas envolvem uma etapa de reconhecimento de substâncias

químicas exógenas seguida por uma fase de produção de enzimas para degradá-las. O autor assinala a viabilidade da utilização destes conhecimentos, ainda incipientes em um manejo integrado de pragas mais sofisticado.

2.2. A Caracterização das Linhagens e sua Implicação

2.2.1. O significado da atividade Enzimática

O comprometimento da atividade de enzimas com a patogenicidade e virulência de fungos entomopatogênicos já está claro para inúmeros autores (BALFOUR-BROWNE, 1960; GABRIEL, 1968 ; FERRON, 1978), bem como o fato de que a ação enzimática parece agir em consonância com forças mecânicas contra a carapaça do inseto (ROBINSON, 1966).

As quatro enzimas mais comumente estudadas são amilolíticas, proteolíticas, lipolíticas e quitinolíticas. Do ponto de vista funcional as proteases e quitinases parecem ter ação conjuntas sincronizadas, já que a maior parte da estrutura do tegumento do inseto é formada por um complexo quitino-protéico (SMITH et al, 1981; HADLEY, 1986).

GABRIEL (1968) após a realização de testes *in vitro*, com quatro espécies de *Entomophthora*, concluiu que a produção de enzimas quitinolíticas é adaptativa, ou seja, quando a quitina era misturada com outras fontes de carbono e nitrogênio permanecia não digerida.

LEOPOLD & SAMSINAKOVA (1970) trabalharam com enzimas de *Beauveria bassiana* e discordaram da classificação das quitinases como sendo adaptativas sendo que HUBER (1958) classificou-as de constitutivas. Os autores crêem que a divergência observada se deve à especificidade de cada linhagem.

Objetivando contribuir para a melhoria das técnicas de comparações da produção de enzimas por fungo, essencial para o entendimento das infecções, deterioração de alimentos e quebra da matéria orgânica, HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) formularam uma série de meios sólidos para o estudo da produção de enzimas extracelulares como : Amilases, lipases, DNases, RNases, pectinases, protease, ureases e quitinases. O potencial da linhagem foi avaliado através dos halos de degradação de substratos em cada teste.

A produção de enzimas em meios sólidos foi comparada com a produção em meios líquidos, durante uma análise da produção extracelular de proteases em *Saccharomycopsis lipolytica* por OGRYD-ZIAK & MORTIMER (1977). Concluíram que o tamanho da zona de degradação é um bom indicador potencial de produção de proteases, visto que expressa os valores obtidos em testes quantitativos, salvo raras exceções.

Apesar de haver divergências entre os autores, incluindo trabalhos que não encaram a produção de enzimas como sendo determinante significativo da virulência (PEKRUL & GRULA, 1979; CHAMPLIN et al, 1979; SOSA GOMEZ & ALVES, 1983; SMITH et al, 1981), há aqueles que consideram as atividades amilolíticas e lipolíticas como as que expressam de modo mais estreito a possibilidade de sucesso durante a infecção.

PEKRUL & GRULA (1979) ensaiaram a produção de enzimas proteolíticas, lipolíticas e quitinolíticas de *Beauveria bassiana*, através do estabelecimento de um índice a partir da relação entre área de degradação de substrato e diâmetro da colônia analisada e não conseguiram estabelecer a implicação da produção enzimática com a facilidade na penetração apesar de reconhecerem a provável e decisiva atuação das mesmas no processo. Posteriormente, CHEUNG & GRULA, 1982, perceberam que quando conídios de *B. bassiana* eram in-

jetados na homocela de *Heliothis zea*, uma correlação positiva entre atividade proteolítica extracelular e o avanço da micose era detectada.

AL-AIDROOS & SEIFERT (1980) que trabalharam com mutantes de *Metarhizium anisopliae* que apresentavam diferentes habilidades de degradação de amido, gelatina e leite, correlacionaram alterações na virulência com a maior ou menor produção de enzimas amilolíticas, sendo que a mesma relação não foi estabelecida para a produção de proteases.

SOSA GOMEZ & ALVES (1983) caracterizaram onze isolados de *Metarhizium anisopliae* quanto a produção de enzimas amilolíticas, proteolíticas e lipolíticas, e não conseguiram estabelecer correlação entre virulência e atividade enzimática, entretanto, notaram que as linhagens mais virulentas apresentavam alta atividade lipolítica. A maior ou menor produção de enzimas foi expressa com base em um índice de atividade enzimática.

O estabelecimento de um índice resultante da relação diâmetro halo de degradação+colônia/diâmetro da colônia ou o contrário, é amplamente utilizado. LEITE & MESSIAS (1984) chamaram a atenção para o fato de que muitas vezes, dois valores de índice iguais podem representar comportamentos totalmente distintos, o que dificulta a avaliação.

Também trabalhando com enzimas extracelulares, SILVA (1985) verificou que mutantes lipase e amilase diminuam significativamente a virulência contra o hemíptero *Rhodnius prolixus*, sendo que mutantes de protease não mostravam o mesmo quando comparados com o selvagem.

ST.LERGER (1986) constatou que as enzimas extracelulares de *M. anisopliae* mostraram uma afinidade bastante evidente pela cutícula de insetos, observaram ainda, que detergentes aniônicos aumentaram a solubilização da capa cuticular enquanto detergentes catiônicos inibiram a degradação, indicando que existe a formação de pontes entre grupos negativos da cutícula e grupos carregados positivamente das proteases.

As investigações nesta área tem evoluído muito, a ponto de alguns pesquisadores chegarem até a um certo grau de refinamento em seus experimentos, com base em informações de que complexos de proteína/proteína e proteína/quitina são importantes barreiras a serem vencidas pelos patógenos. PERSSON et al (1984) testaram a atividade de peptidases de alguns fungos patogênicos para artrópodes e entre eles o *M. anisopliae*.

Os substratos utilizados foram alguns peptídeos sintéticos ricos em tirosina e prolina, aminoácidos que foram considerados pelos autores, chaves durante o avanço das hifas em direção ao interior do artrópode. Assim, alta atividade de peptidases efetivas contra estes peptídeos poderiam indicar uma maior virulência. Mostraram que o patógeno *Aphanomyces astaci* apresentou alta atividade contra peptídeos contendo arginina, sendo que o hospedeiro *A. astatus* tem grande quantidade de resíduos deste aminoácido na constituição da carapaça.

2.2.2. O Tamanho de Conídios e Virulência

Importante e anterior ao estabelecimento de qualquer programa de melhoramento está a caracterização das linhagens e, sem dúvidas, no caso de *M. anisopliae* as dificuldades se multiplicam devido à pluralidade de fatores a serem considerados somados à especificidade requerida (FERRON, 1978).

A seguir, aspectos de algumas publicações serão relatados por estarem estreitamente relacionadas com o objetivo deste trabalho.

FERRON et al (1972), trabalharam com oito linhagens de *M. anisopliae* contra nove espécies de coleoptera; detectaram que os besouros do gênero *Oryctes* susceptíveis ao fungo, eram somente atacados por linhagens de *M. anisopliae* isoladas de insetos atacados, pertencentes ao mesmo gênero e, coincidentemente, todas eram da variedade major. Verificaram também, que linhagens major isoladas de outros insetos não produziam o mesmo efeito em *Oryctes*.

Este experimento deixa clara a importância da determinação do tamanho dos conídios, e aponta a existência de implicações fisiológicas importantes durante a patogênese. Entretanto, PRIOR & ARUDA (1985) trabalhando com isolados de *M. anisopliae* var. minor provenientes de *Scapones australia*, *Oryctes rhinocerus* e de uma praga de palmeira *Rhynchophorus bilineatus*, concluíram que o isolado a partir de *Rhynchophorus* era tão patogênico quanto isolados de *Scapones*. Atribuíram ao fato um provável "pré-condicionamento" dos isolados sem relação com o tamanho do esporo.

RIBA et al (1985) também discutem virulência em função do tamanho de conídios em publicação sobre herança da virulência em entomopatógenos.

2.3. Considerações sobre o hospedeiro

O *Panstrongylus megistus* utilizado nos bioensaios deste trabalho é um dos representantes do grupo de hemípteros hematófagos, popularmente conhecidos como "barbeiros".

O *Trypanossoma cruzi*, o protozoário causador da doença de CHAGAS no homem é transmitido através das fezes destes insetos, que defecam logo após sugarem o sangue de suas vítimas, picam seres humanos, ratos, morcegos e outros mamíferos e podem suportar jejum prolongado, o que de certa forma assegura a sobrevivência desse vetor (REY, 1973).

Segundo CHAIA (1975) existem algumas características facilmente observáveis que permitem a identificação de um provável hematófago transmissor, distinguindo-o de um fitófago inofensivo. Além dos hábitos alimentares já descritos, o estudo do rostro (aparelho bucal picador e sugador) é essencial.

Através da extensa revisão sobre triatomídeos LENT & WIGODZINSKY (1979) relatam a existência de 14 espécies descritas para o gênero *Panstrongylus*. Afirmam que o *P. megistus*, um dos que apresentam ampla distribuição no Brasil, preocupa as autoridades sanitárias por apresentar hábitos peridomésticos como : galinheiros, esconderijos de ratos, fissuras de rochas, etc., o que facilita enormemente o contato com seres humanos.

Segundo SILVA (1985) em recente revisão, até agora o controle dos vetores da doença de Chagas vem sendo feito, principalmente, através do emprego de inseticidas químicos (FREITAS, 1950) , sendo que alguns métodos de controle biológico foram empregados sem sucesso (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & CORREIA, 1972; FELICIANGELI & RABINOVICH, 1977; DIAS & LEÃO, 1967).

SHERLOCK & GUITTON (1982) mostraram que existe possibilidade de controle de triatomídeos por meio de fungos. Nestes casos foi utilizado o *M. anisopliae*, sendo verificado um aumento da mortalidade com o aumento da umidade e, ainda, a possibilidade de insetos mortos pelo patógeno dissimilarem a micose entre outros sa-
dios.

SILVA (1985) e SILVA & MESSIAS (1986) verificaram a virulência de mutantes e revertentes exoenzimáticos para amilases, lipases e proteases, contra o vetor *Rhodnius prolixus*. Notaram que os revertentes, de maneira geral, restabeleceram a virulência em níveis semelhantes aos tipos selvagens, exceto no caso de proteases cujas reduções não foram significativas.

RANGEL et al (1986) realizaram bioensaios com uma linhagem melhorada de *M. anisopliae*, denominada 157p, e obtiveram os seguintes tempos letais : 7.26 dias para a *Triatoma infestas*, 7.98 para *Triatoma sordida* e 5.46 dias para *Panstrongylus megistus*.

2.4. Melhoramento genético e perspectivas

O programa de melhoramento genético do *M. anisopliae* tem encontrado problemas no processo de implantação, principalmente devido ao pouco conhecimento a respeito dos determinantes genéticos na relação patógeno-hospedeiro implicados com a virulência, neste caso com um problema extra, ou seja, o fato deste fungo não apresentar ciclo sexual.

Uma alternativa de recombinação, primeiramente reportada por PONTECORVO & ROPER (1952), o ciclo parassexual, foi descrita para o *M. anisopliae* (MESSIAS, 1979; MESSIAS & AZEVEDO, 1980; AL-AIDROOS, 1980), partindo do princípio de que a anastomose das hifas, a heterocariose, era possível nesse fungo (TINLINE & NOVIELLO, 1971), os autores reportaram a obtenção de recombinantes haplóides, a partir de diplóides. A análise das marcas dos segregantes levou à suposição de que existem cinco grupos de ligação (BERGERON & AL-AIDROOS, 1982).

As investigações caminham no sentido de tentar estabelecer o domínio de técnicas rápidas e eficientes de recombinação e transformação, visando o equacionamento de um melhoramento.

SILVEIRA (1983) e SILVEIRA & AZEVEDO (1984) relatam a realização de cruzamento entre duas linhagens de *M. anisopliae* bastante diferenciadas geneticamente, através do método clássico e por meio de fusão de protoplastos e ainda descreveram técnica de enriquecimento por filtração para a obtenção de mutantes auxotróficos, que resultou em rendimento 613 vezes melhor.

A fusão de protoplastos provou ser a alternativa ideal para o caso das linhagens que não sofrem recombinação por meio da metodologia clássica. Técnicas de obtenção de protoplastos aplicáveis a fungos filamentosos tem sido descritas em número razoável, aumentando as perspectivas da concretização de transformação por meio desta alternativa (KAWULA & LINGG, 1984).

RIBA et al (1985) estudaram os segregantes de um híbrido estabelecido entre mutantes para auxotrofia e coloração de comídios originados de uma linhagem prototrófica, e cada segregante foi testado com relação à virulência contra 3 espécies de mosquitos. Observou-se que a variação contínua de agressividade observada deve-se ao grande número de genes envolvidas no processo, e que os mutantes auxotróficos mostraram reduções na virulência em relação a linhagem parental, e os diplóides foram avirulentos para as espécies de insetos para os quais as linhagens parentais exibiam virulência. O autor explica, baseado também em observações contidas em

outras publicações (FEDERICI, 1979, 1982), que hibridizações inter-específicas tem-se mostrado avirulentas, ou seja, incompatibilidades recíprocas oriundas da hibridização de linhagens diferentes da mesma espécie podem comprometer a patogênese.

Para que uma linhagem seja escolhida e submetida a um programa de melhoramento é necessário que a mesma apresente: boas condições de cultura e estocagem, fácil manipulação do ciclo sexual ou parassexual, crescimento vegetativo rápido e hospedeiros adaptados a estas condições. Isto se faz necessário porque linhagens selvagens são muito variáveis e imprevisíveis (YODER & TURGEON, 1985). A maior parte dos trabalhos com *M. anisopliae*, atualmente, parecem estar relacionados com este processo de "domesticação".

DEMAIN & SOLOMON (1981) apontam a década de 80 como sendo a época de grandes impactos na microbiologia industrial, causada pelos grandes avanços no campo da recombinação artificial, particularmente no que se relaciona à aplicação da tecnologia do DNA recombinante.

Hoje é possível o planejamento e a execução de um plano de melhoramento com maior eficiência, desde que se conheça o mínimo a respeito da relação do microrganismo com o sistema onde esta inserido, bem como os genes ativados no processo de interação. Por exemplo, muitos microrganismos, entre eles a *Pseudomonas putida*,

são capazes de metabolizar componentes do petróleo, sendo que os genes responsáveis pela produção das enzimas envolvidas por estas degradações podem ser isolados, inseridos e amplificados no genoma da bactéria, intensificando o caráter desejado.

No que diz respeito aos entomopatógenos, é necessária ainda, a determinação dos pontos-chave, alvos de um possível melhoramento no não totalmente esclarecido processo de penetração.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microorganismos utilizados

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* que foram ensaiadas neste trabalho são pertencentes a um banco de germoplasma do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas, abaixo relacionadas (Figura 1):

- E9 - Conídios verdes, variedade minor, isolada no Espírito Santo.
- 1 - Conídios verdes escuros, variedade major, isolada na Polônia.
- 5 - Conídios verdes escuros, variedade major, isolada na Polônia.
- 9 - Conídios verdes, variedade minor, isolada no Rio de Janeiro.
- 10 - Conídios verdes claros, variedade minor, isolada no Rio de Janeiro
- 14 - Conídios verdes escuros variedade minor, isolada na Austrália.
- 20 - Conídios verdes, variedade minor, isolada na Bahia.
- 23 - Conídios verdes, variedade minor, isolada na Polônia.
- 40 - Conídios verdes escuros, variedade minor, isolada na Bahia.
- 54 - Conídios verdes claros, variedade minor, isolada na Bahia.
- 58 - Conídios verdes, variedade minor, isolada na Bahia.
- 64 - Conídios verdes, variedade minor, isolada no Espírito Santo.
- 70 - Conídios amarelos, variedade minor, isolada na França.

Y5 - Conídios amarelos, variedade minor, mutante da linhagem E9 deficiente na produção de piridoxina.

B/vi- Conídios brancos, variedade minor, mutante da linhagem E9 deficiente na produção de tiamina.

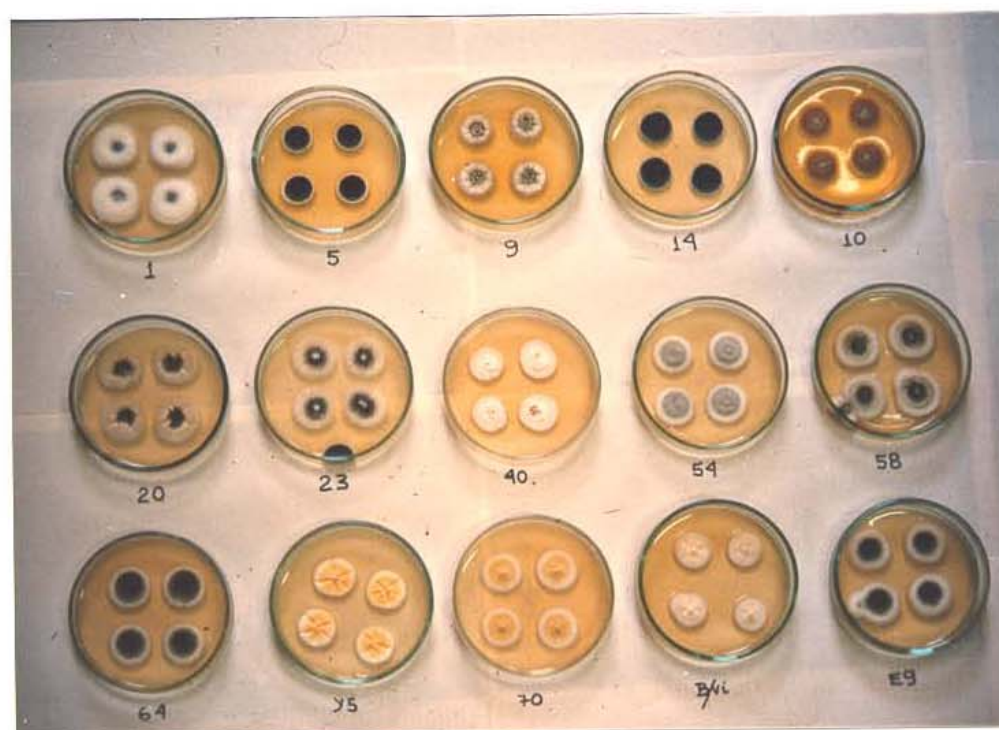


Figura 1 - Aspecto morfológico das 15 linhagens de *Metarhizium anisopliae* utilizadas no presente trabalho (7 dias de incubação em MC).

3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO et al, 1953) (MM)

NaNO_3	6,0 g
KCl	0,52 g
KH_2PO_4	1,52 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,52 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	traços
ZnSO_4	traços
Glicose	10,0 g
Água destilada	1.000 ml
Agar em pó	15,0 g

O pH foi ajustado para 6,5 antes da esterilização com NaOH ou HCl. Foi autoclavado a 120°C por 15 minutos

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

Foi acrescentado ao meio mínimo:

Peptona	2,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Solução de vitaminas	1 ml
Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras	2,5 ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH ou HCl.

3.2.3. Solução de Tween 80

Foram adicionados 0,1 ml de Tween 80 em 99,9 ml de água destilada. Após a agitação, a solução foi distribuída em tubos de ensaio na quantidade de 2,5 ml. A seguir os tubos foram autoclavados.

3.2.4. Solução de salina (0,85%)

NaCl	8,5 g
Água destilada	1000 ml

Em 1000 ml de água destilada foram dissolvidas 8,5 g de NaCl, após o que, 9 ml da solução foram distribuídos em frascos com tampa de rosca e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

3.2.5. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico	100 mg
Ácido p-aminobenzóico	10 mg
Aneurina (tiamina)	10 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50 mg
Riboflavina	100 mg
Água destilada	100 ml

Esterilizada em banho-maria por 15 minutos e guardada em frasco ambar na geladeira, em presença de gotas de clorofórmio.

3.2.6. Solução de NaOH 1 N

NaOH	40 g
Água destilada	1000 ml

3.2.7. Solução de HCl 1 N

HCl	95 ml
Água destilada	1000 ml

3.2.8. Solução alcoólica de iodo (1%)

Iodo Ressublimado	1,0 g
Alcool absoluto	100,0 ml

3.2.9. Solução aquosa saturada de sulfato de amônia

Um becker com volume variável de água é aquecido sobre uma placa de amianto enquanto o sulfato de amônia é adicionado aos poucos, sob agitação, até atingir o ponto de saturação.

3.2.10. Solução de gelatina (8%)

Gelatina comercial Otcker 8 g
Água destilada 100 ml
Autoclavada 20 minutos a 120°C.

3.3. Esterilização do Material Utilizado

As placas de Petri e pipetas foram lavadas e esterilizadas em forno a 180°C, por duas horas, sendo que os meios de cultura e demais materiais foram submetidos a autoclavagem a 1 atmosfera de pressão 120°C, em tempos que variaram com a necessidade.

3.4. A temperatura e tempo de incubação

A temperatura de incubação das linhagens foi mantida em todos os experimentos à 28°C, considerada ótima para o crescimento do *M. anisopliae* (VILLACORTA, 1978; BALFOUR-BROWNE, 1979).

O tempo de incubação variou de acordo com cada experimento.

3.5. Metodologia para avaliação de atividade enzimática

3.5.1. Atividade amilolítica

Na determinação desta atividade usa-se o seguinte meio (Extrato de carne, 3 g; Peptona, 5 g; Cloreto de Sódio, 1 g; Agar, 15 g; 1000 ml de água destilada) acrescentando-se o equivalente a 0,2% de amido solúvel.

Após a inoculação da linhagem em estudo em quatro pontos de uma placa de petri, contendo 20 ml do meio citado acima, um período de 5 dias a 28°C é necessário para a incubação.

Ao final do tempo de incubação a placa é inundada com solução alcoólica de iodo (item 3.2.8) para a revelação das áreas de atividade das enzimas.

Primeiramente foi estabelecido o índice de Atividade Enzimática (I.A.E) que foi determinado através da medida do diâmetro da colônia, do diâmetro da colônia+halo de degradação e o estabelecimento da seguinte relação: $I.A.E = \text{diâmetro da colônia} / \text{diâmetro da colônia+halo de degradação}$, onde o I.A.E é o índice de atividade enzimática. O I.A.E foi utilizado para a avaliação das atividades : proteolítica, amilolítica e lipolítica.

Posteriormente o I.A.E. deixou de ser usado e calculou-se a diferença de diâmetros (diâmetro do halo - diâmetro da colônia) para melhor expressar a capacidade de produção de enzimas, no caso das atividades citadas acima.

3.5.2. Atividade proteolítica

Meio mínimo com 8% de gelatina de origem animal (Otker) com pH 6, foi utilizada para os testes de atividade proteolítica. Após 5 dias de incubação, as placas de Petri foram removidas da estufa e a atividade enzimática foi revelada, cobrindo-se as colônias com solução aquosa saturada de sulfato de amônia (item 3.2.9).

O precipitado formado com o substrato proteico evidenciou halos claros em torno de colônias, que demonstraram a atividade enzimática, permitindo assim a avaliação.

3.5.3. Atividade lipolítica

Como substrato para testar a habilidade lipolítica foi utilizado Tween 80 na proporção de 1 ml de Tween 80 para 100 ml de meio básico (Peptona, 10 g; Cloreto de sódio, 5 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g; Agar, 20 g em 1 litro) com pH ajustado para 6. Após 7 dias de incubação pode-se ver uma precipitação em torno de colônia, originados da formação de cristais de laurato de cálcio.

3.5.4. Atividade quitinolítica

3.5.4.1. Preparo da quitina coloidal

Através de metodologia proposta por AMAGASE et al (1972) que consiste no tratamento da quitina comercial (SIGMA) com ácido clorídico concentrado onde é solubilizada, sendo em seguida precipitada em meio aquoso onde permanece em estado coloidal até ser utilizada para compor o meio de cultura (Figura 3).

Ao contrário dos outros testes de atividade enzimática, a atividade quitinolítica é estimada através do diâmetro da área de degradação e não por meio do I.A.E. ou diferença de diâmetros como nos outros testes.

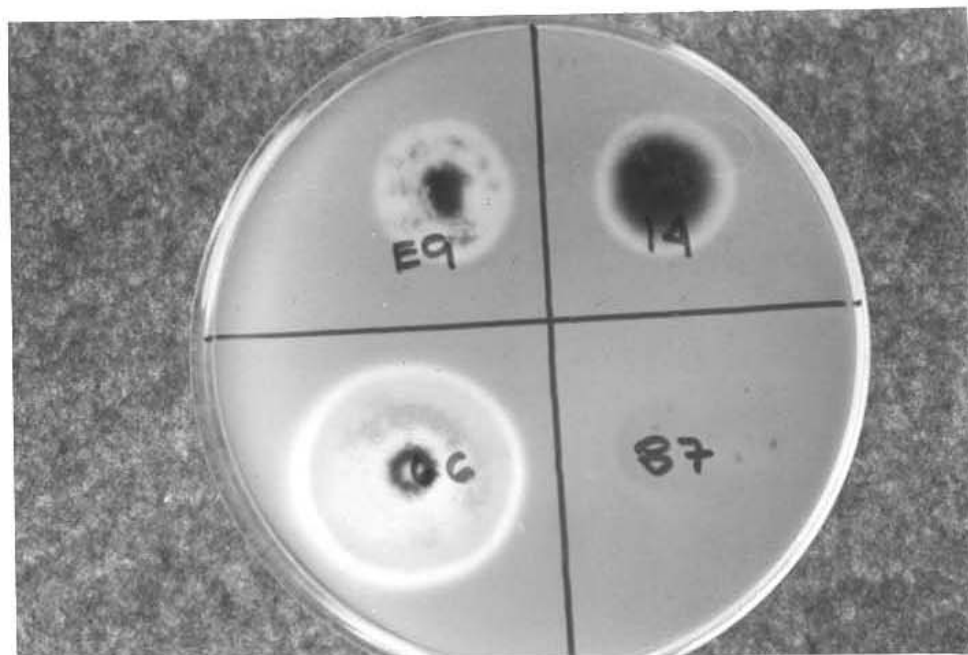


Figura 2 – Aspecto da placa de atividade quitinolítica após 7 dias de incubação, mostrando as diferenças na habilidade de 4 linhagens na exploração do substrato quitinoso.



Figura 3 - Quitina coloidal, aspecto após tratamento da quitina de caranguejo (comercial) (sigma) com HCl concentrado, segundo AMAGASE, 1972.

3.5.4.2. Preparo do meio de cultura

Nesta etapa, o meio foi preparado de maneira a formar duas camadas, a inferior composta por meio mínimo e a superior por meio básico (0,02% de extrato de levedura, 15 g de agar, 500 ml de água destilada, 2,4% de quitina coloidal mais 500 ml de solução mineral que contém por litro: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2g; KH_2PO_4 , 4g; Na_2HPO_4 , 6g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g; CaCl_2 , 1 mg; H_3BO_3 , 10 microgramas; MnSO_4 , 10 microgramas; MoO_3 , 10 microgramas pH7, o pH ajustado para 6.

As linhagens foram inoculadas em pontos equidistantes, e as placas incubadas durante 7, dias quando então foram realizadas as leituras, observando-se a área de degradação na região de crescimento da colônia.

Neste caso, o índice enzimático foi determinado pelo tamanho da colônia, pois o halo de degradação foi restrito a área de crescimento da mesma.

3.5.5. Atividade enzimática em diferentes concentrações de substrato para enzimas estudadas.

Foram preparados meios de atividade enzimática conforme itens: 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3 e 2.5.4) nas seguintes concentrações: Amido solúvel: 0,1%, 0,2%, 0,4%; Gelatina OTKER: 4%, 8%, 12%; Tween 80: 0,5%, 1%, 2% e Quitina: 1,2%, 2,4%, 48%.

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* foram inoculadas, incubadas durante tempo especificado por cada teste, e tiveram os diâmetros das áreas de ação enzimática anotados.

3.5.6. Atividade amilolítica em diferentes concentrações de amido solúvel.

O meio de atividade amilolítica foi preparado segundo o item 2.5.1, nas seguintes concentrações de amido solúvel: 0,05%, 0,17%, 0,2%, 0,4%, 1,2%, 2,4%; placas com 20 ml do referido meio foram preparadas e inoculadas com conídios da linhagem E9 em quatro pontos equidistantes na placa. Após 5 dias as placas foram reveladas com solução alcoólica de iodo, o diâmetro do halo de atividade enzimática foi anotado. Neste caso o tamanho da colônia não foi levado em consideração.

3.5.7. Atividade enzimática através da diferença de diâmetros entre colônia+halo de degradação e colônia.

As dificuldades para expressar o potencial de produção de enzimas de cada linhagem através do índice obtido na relação diâmetro colônia/diâmetro da colônia+halo de degradação, levaram à procura de uma maneira alternativa para comparação. Ao final, foi escolhida a diferença de diâmetros que se mostrou viável, já que coloca em evidência somente a área de ação das enzimas avaliadas.

3.6. Tamanho de conídios

As 15 linhagens de *M. anisopliae* cresceram durante 7 dias em MC, sendo os conídios retirados e suspensos em solução Tween 80 (item 3.2.3) e colocados entre lâmina e lamínula. O comprimento e largura de cada conídio foi tomado com o auxílio de microscópio óptico e ocular micrométrica previamente calibrada.

Um total de 500 conídios de cada linhagem foi avaliado em diferentes campos microscópicos, entretanto apenas 200 valores de cada linhagem foram necessários para a avaliação estatística.

3.7. Crescimento radial

Com o objetivo de verificar o comportamento das linhagens quanto ao crescimento das colônias em MM e MC, foram preparadas placas contendo os meios citados em volume padronizado (20 ml por placa).

As linhagens foram inoculadas e cresceram em estufa a 28°C por 10 dias, durante esse tempo, medidas do diâmetro das colônias foram anotadas.

3.8. Curvas de sobrevivência à luz ultravioleta

As curvas de sobrevivência foram obtidas após a incubação de cada linhagem em estudo, durante 7 dias. Os conídios foram então transferidos para solução de Tween 80, agitados, e tiveram seu número estimado através de contagem em hematómetro. Em seguida, a suspensão de conídios foi diluída em solução salina e colocada em placa esterilizada para ser submetida à luz ultravioleta.

A irradiação foi efetuada, mantendo-se a suspensão de conídios a uma distância de 15 cm da luz ultravioleta (intensidade aferida de $80 \mu\text{w}/\text{cm}^2$) no interior do fluxo laminar com a luz apagada. O volume de 0,1 ml foi semeado por placa, após as diluições apropriadas.

Após 5 dias, a 28°C, as placas foram observadas e a porcentagem de sobreviventes foi calculada com base no número de colônias crescidas nas placas não irradiadas.

3.9. Teste de viabilidade

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* tiveram a viabilidade avaliada segundo metodologia proposta por ARRAIS DE MATOS, 1983. Os conídios de culturas de 7 dias foram suspensos em Tween 80 0,01% e plaqueados em meio completo, sendo que após 14 horas e 24 horas de incubação a 28°C, aproximadamente 250 conídios eram contados e separados em germinados e não germinados, estabelecendo-se assim a viabilidade de cada linhagem.

3.10. Padrão de germinação

As linhagens tiveram o padrão de germinação de seus conídios avaliados, segundo padrões já descritos por TINLINE, 1971 e LUNA, 1983. As linhagens foram separadas em 3 grupos, basicamente, aquelas que formam 1 tubo germinativo polar, as que formam tubo lateral e aquelas que apresentam 2 tubos germinativos polares opostos.

A avaliação foi realizada após 14 horas de germinação, com auxílio de microscópio óptico.

3.11. Número de esporos por colônia

Com o auxílio de um "cortador de colônia", descrito por ARRAIS DE MATOS (1983), a produção de conídios por colônia após 7 dias de incubação em MC foi analisada. O cortador consiste de duas lâminas dispostas paralelamente, a uma distância de 1mm uma da outra, que cortam uma faixa de meio de altura de dimensões conhecidas.

Após a retirada das faixas, as mesmas foram colocadas em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de Tween 80 0,01%, sendo que o número de esporos por mm² foi determinado com base nestes valores e a área da faixa calculada a partir da tomada do diâmetro da colônia.

3.12. Bioensaios

3.12.1. Insetos utilizados

Foram utilizadas durante os bioensaios um total de 2.855 ninfas de *Panstrongylus megistus* de terceiro instar em regime de "Starvation". As ninfas foram cedidas pela Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN, através do Sr. Antenor Ferraz Nascimento, Coordenador do laboratório de Mogi-Guaçu.

3.12.2. O Método

Cada linhagem foi incubada em arroz parboilizado cozido e esterilizado durante 10 dias. Após esse tempo, os esporos foram retirados com auxílio de peneiras, e 330 mg de esporos foram suspensas em 9 ml de solução salina 0,85% + 2,5 ml de Tween 80 0,01%, sendo esta considerada então, a primeira dose ou "sem diluição", a partir da qual, as demais doses foram preparadas: 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} .

Os insetos foram separados em grupos de 25 exemplares, sendo obrigados a caminhar por 30 minutos sobre um papel de filtro, previamente colocado dentro de uma placa de petri, embebido com 2,5 ml da dose a ser testada.

Em seguida os insetos foram acondicionados em frascos de vidro, que por sua vez foram colocados no interior de frascos maiores com umidade relativa de 80%, controlada com solução saturada de Sulfato de Potássio, sendo mantidos em estufa a 28°C. A mortalidade foi observada por um período padrão de 30 dias (Figura 3), sendo a LT50 calculada pelo método de THOMPSON & WEIL (PIEDRABUENA, 1975).

Figura 4 - Ninfas de *Panstrongylus megistus* de terceiro instar em frascos com umidade controlada durante os bioensaios.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade Enzimática

4.1.1. Comportamento enzimático da linhagem E9, utilizada como padrão nos experimentos

Os gráficos 1, 2, 3 e 4 mostram respectivamente a evolução do diâmetro da colônia e diâmetro do halo de degradação para atividade amilolítica, proteolítica, lipolítica e, finalmente, quitinolítica. Nessa última, só foi analisada a evolução do halo de degradação já que não há formação de halo.

TABELA 1 - Comportamento da atividade amilolítica da linhagem E9.

Idade da colônia (horas)	Média do diâmetro colônia (mm)	Média do diâmetro halo+colônia (mm)	índice Atividade Enzimática
24	2,8	5,0	0,560
48	5,1	8,4	0,607
72	8,2	12,3	0,666
96	14,1	20,3	0,689
120	20,1	27,0	0,744
144	26,3	32,2	0,801

- valores dos diâmetros representam a média aritmética de 8 valores.

TABELA 2 - Comportamento da atividade proteolítica da linhagem E9.

Idade das colônias (horas)	Média do diâmetro colônia (mm)	Média do diâmetro halo+colônia (mm)	índice Atividade Enzimática
24	2,18	2,18	1
48	4,12	10,62	0,387
78	7,16	15,4	0,464
96	9,9	21,5	0,460
120	12,2	25,0	0,488
150	16,0	31,5	0,507
174	17,1	32,8	0,521

- valores dos diâmetros representam a média aritmética de 8 valores.

TABELA 3 - Comportamento da atividade lipolítica da linhagem E9.

Idade da colônia (horas)	diâmetro colônia (mm)	diâmetro halo+colônia (mm)	índice Atividade Enzimática
96	4,1	6,1	0,672
120	9,1	13,2	0,689
144	15,4	21,3	0,719
168	20,2	27,2	0,742
192	24,9	30,1	0,827

- valores dos diâmetros representam a média aritmética de 8 valores.

TABELA 4 - Atividade quitinolítica da linhagem E9.

Idade das colônias (horas)	diâmetro da área de degradação (mm)
0	0
24	0
48	0
52	2,62
96	6,25
120	8,70
143	10,80
168	14,94
191	16,62
263	25,00
287	28,12
311	31,32
359	35,02

- valores dos diâmetros representam a média aritmética de 8 valores.

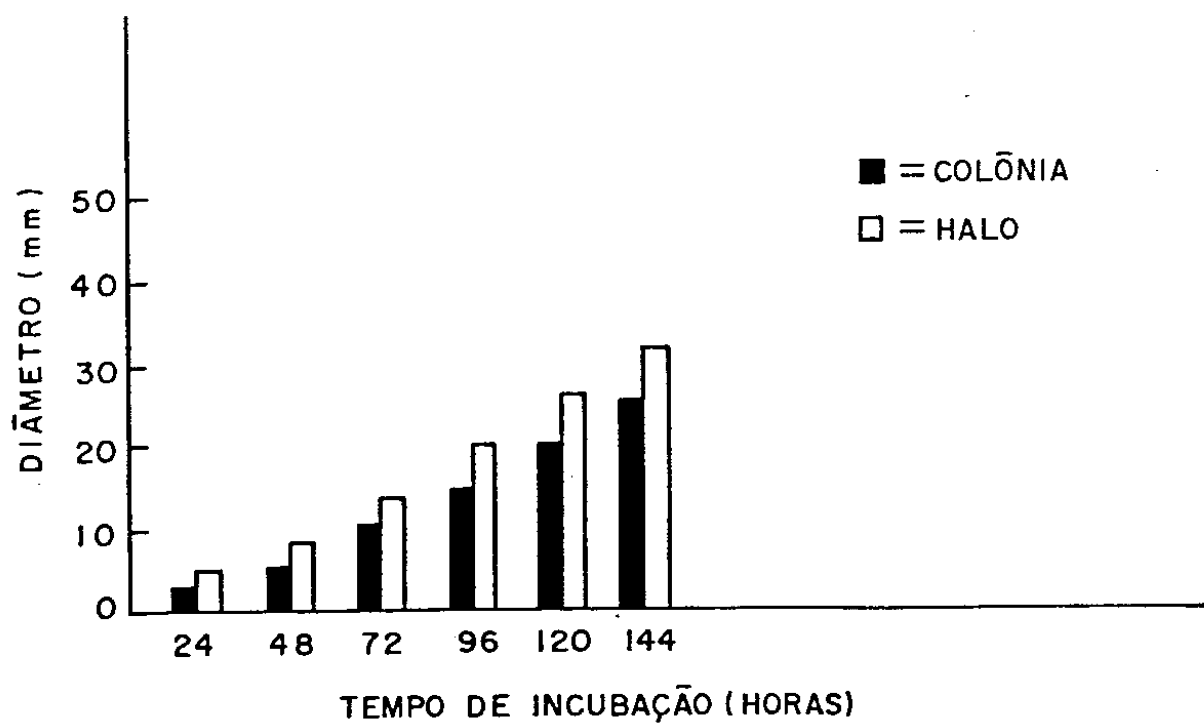


Figura 5 - Histograma da atividade amilolítica da linhagem E9.

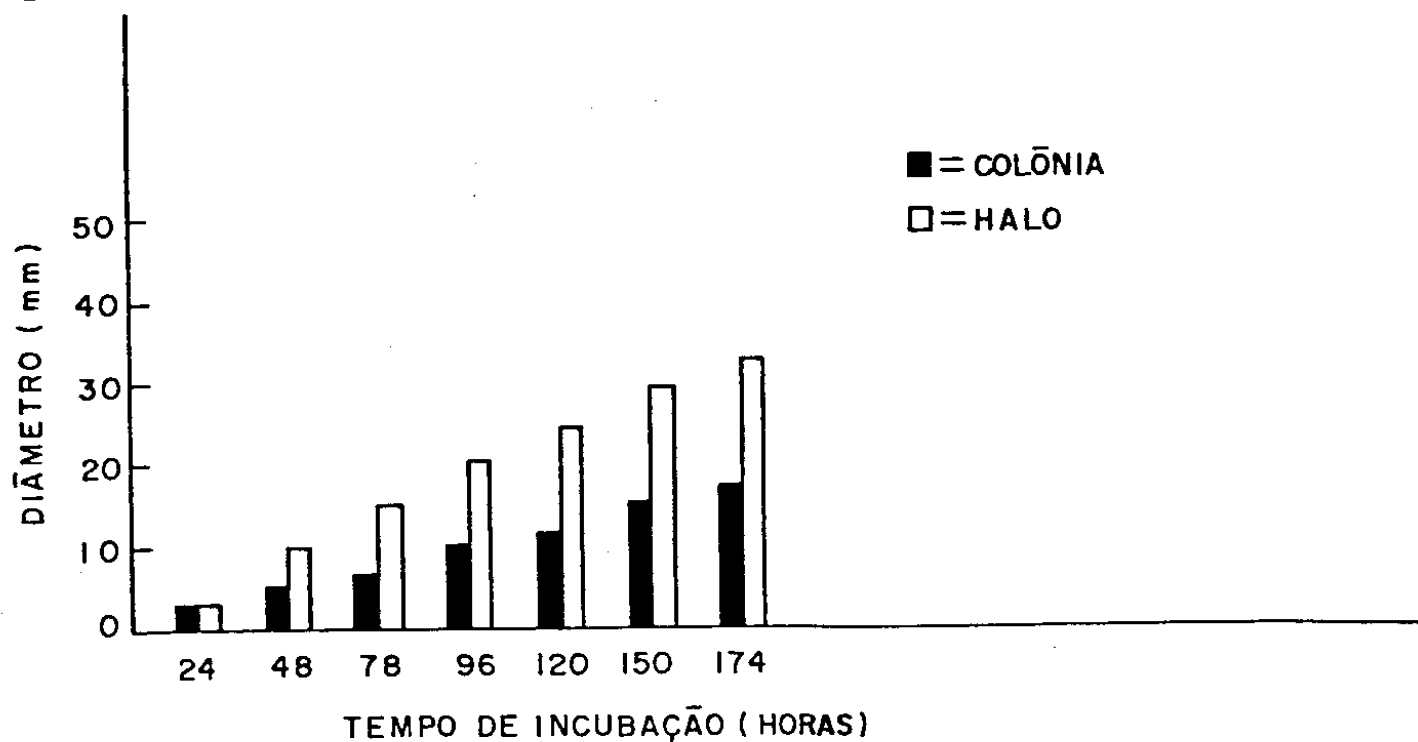


Figura 6 - Histograma da atividade proteolítica da linhagem E9.

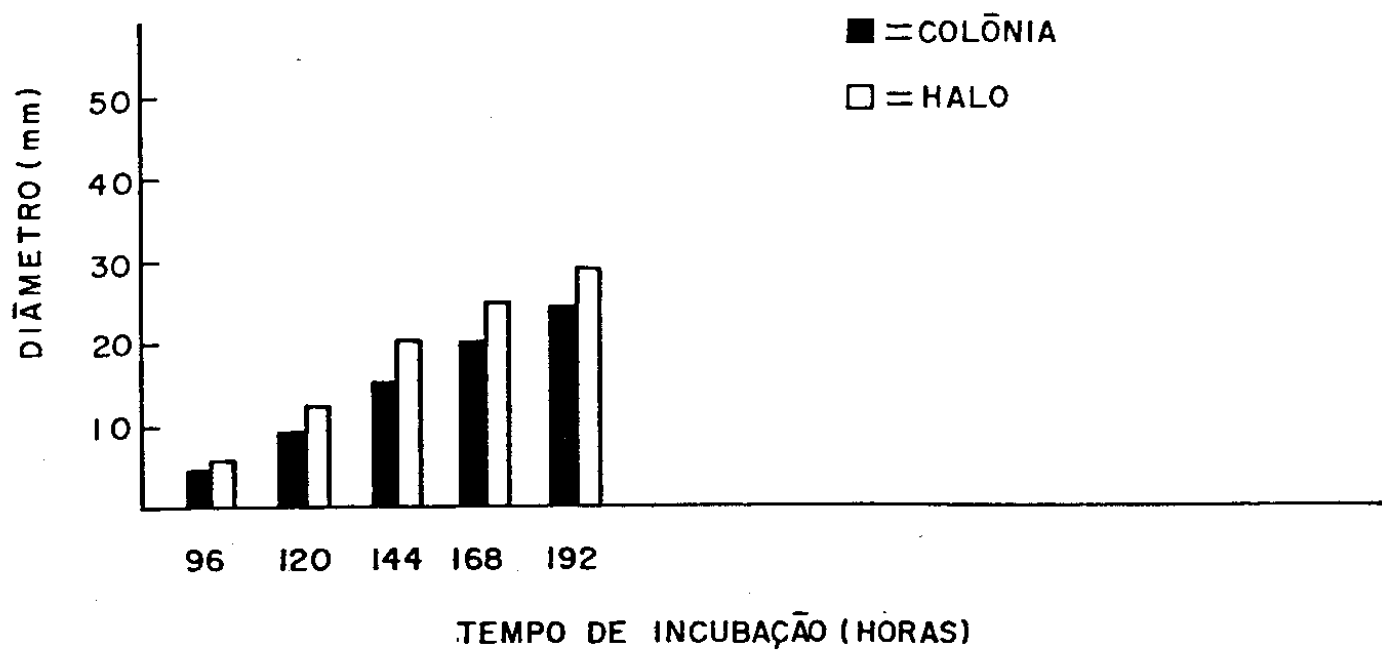


Figura 7 - Histograma da atividade lipolítica da linhagem E9.

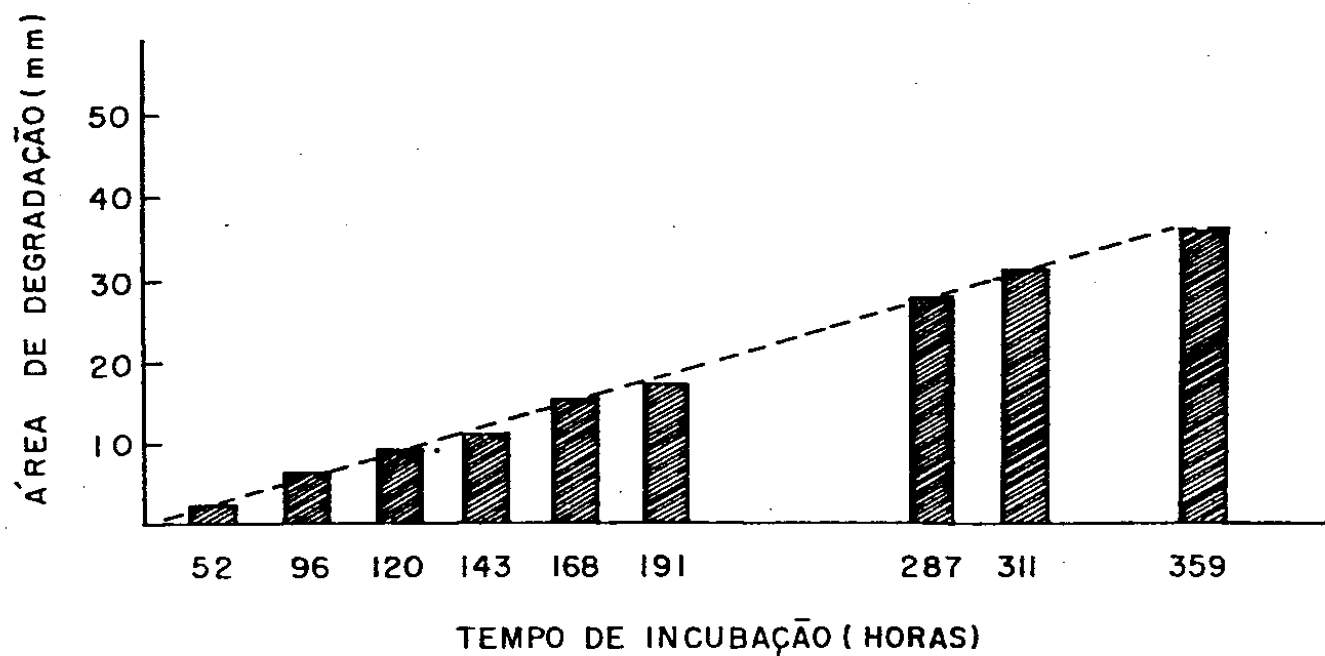


Figura 8 - Histograma da degradação de quitina pela linhagem E9.

4.1.2. Determinação do índice de Atividade Enzimática I.A.E (diâmetro colônia/diâmetro halo) das linhagens utilizadas.

A tabela 1 mostra a primeira tomada de dados sobre enzimas utilizando-se o I.A.E., e a figura 9 apresenta os problemas encontrados com o emprego deste índice.

TABELA 5 - Valores dos índices de atividade enzimática

Linhagem	Origem	Atividade amilolítica índice/diâmetros col/halo (mm)	Atividade lipolítica índice/diâmetros col/halo (mm)	Atividade proteolítica índice/diâmetros col/halo (mm)
E9	ES	0,744 (20.1/27.0)	0,74 (20.2/27.2)	0,507 (16/31,5)
1		1,00 (16/16)	1,00 (22/22)	0,710 (13,5/19)
5	Polônia	0,888 (16/18)	1,00 (23/23)	0,780 (16/20.5)
9	PA	0,852 (20/23.5)	0,781 (25/32)**	0,535 (15/28)
10	RJ	0,888 (16/18)	1,00 (18/18)	0,553 (18/32,5)
14		1,00 (12/12)	1,00 (15/15)	0,363 (8/22)
20	BA	0,716 (12/16,75)	0,476 (10/21)	0,476 (10/21)
23	MG	1,00 (19/19)	1,00 (33/33)	0,611 (18,1/29.6)
40	BA	0,863 (19/22)	0,50 (11,5,23)**	0,566 (17/30)
54	BA	0,571 (8/14)	1,00 (22/22)	0,571 (8/14)
58	BA	0,777 (21/27)	0,705 (24/34)	0,574 (15.5/27)
64	ES	0,795 (19.5/24.5)	0,750 (21/28)	0,355 (16/45)
70	França	0,700 (14/20)	0,666 (20/30)	0,476 (10/21)
B/vi	Mutante de E9	0,560 (7/12.5)	0,575 (11.5/20)	0,333 (2/6)
Y5	Mutante de E9	0,647 (11/17)	0,628 (11/17,5)	0,391 (14.5/37)

Cada valor desta tabela representa a média aritmética de valores obtidos em placas onde a linhagem padrão, E9, atingiu o índice esperado. Os valores entre parênteses, expressos em mm, representam as leituras dos diâmetros das colônias e halos de degradação, respectivamente.

TABELA 5a - Valores de diâmetros de degradação de quitina das linhag estudadas

Linhagem	Diâmetros de degradação de Quitina (mm) X
23	22.00
64	15.33
58	15.08
70	15.00
E9	14.91
9	14.00
14	14.00
Y5	13.00
20	10.41
40	10.50
1	10.00
5	8.83
54	8.58
10	7.33
B/vi	atividade não detectada

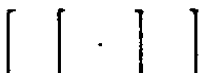
	
14 - a - 100 (12/12) - dd = 0	23 - a - 100 (19/19) - dd = 0
	
23 - q - 22 mm	05 - q - 8.5 mm
	
54 - p - 0,571 (8/14) - dd = 6	58 - p - 0,574 (155/27) - dd = 11,5
	
B/vi - p - 0,333 (2/6) - dd = 4	Y5 - p - 0,391 (145/37) - dd = 22,5

FIGURA 9 - Comparação do fenótipo da colônia de linhagens da mesma idade e respectivos índices de Atividade Enzimática e ou valores de áreas de degradação.

Obs.: Na linha de identificação, abaixo das colônias temos, respectivamente: número da linhagem; tipo de teste onde "p" = proteolítico, "a" = amilolítico e "q" = quitinolítico; índice de Atividade Enzimática ou diâmetro de degradação; dd = diferença de diâmetros.

4.1.3. Atividade amilolítica em diferentes concentrações de amido solúvel.

Primeiramente temos o teste das 15 linhagens para 3 enzimas diferentes, sendo cada uma em 3 concentrações diferentes. Os resultados não foram satisfatórios, pois não se observou linearidade na distribuição dos pontos (Tabela 6).

A partir disso, e supondo-se uma oscilação na faixa de concentração estudada, tentou-se um número maior de concentrações para verificar o comportamento da linhagem E9. As enzimas ensaiadas foram as amilolíticas (Tabela 7).

Os gráficos 1 e 2 evidenciam a oscilação, detectada nas concentrações entre 0 e 0,2%.

TABELA 6 - Diâmetro de áreas de ação enzimática em 3 concentrações diferentes de cada substrato utilizado (mm).

Linhagem	Atividade amilolítica			Atividade proteolítica			Atividade quitinolítica		
	0,1%	0,2%	0,4%	4%	8%	12%	1.2%	2.4%	4.8%
1	15.75	16.68	15.06	26.43	16.75	19.875	12.00	11.68	5.62
5	13.50	11.00	12.75	20.94	13.25	14.87	10.12	10.00	0
9	20.50	24.50	19.25	30.62	23.75	-	15.00	14.62	12.00
10	15.50	23.75	13.87	37.00	31.00	28.12	11.37	9.12	0
14	10.00	10.00	11.00	33.81	26.75	26.06	11.12	11.13	8.81
20	20.37	17.75	15.87	30.62	23.0	20.00	11.00	7.00	7.00
23	23.50	21.75	20.25	28.37	22.75	28.25	12.00	15.00	7.00
40	17.00	18.62	15.06	32.25	24.00	19.75	9.06	9.18	6.43
54	24.75	23.25	22.00	34.62	25.00	27.93	13.00	12.75	10.81
58	24.87	26.68	25.93	34.00	26.75	26.75	14.00	15.00	12.00
64	27.75	24.62	24.25	27.00	27.00	27.75	14.00	14.94	11.00
70	25.25	20.25	21.56	35.00	29.62	26.50	14.68	15.75	12.00
Y5	21.94	20.25	19.75	52.00	51.62	53.00	-	6.5	0
B/vi	22.00	24.75	17.94	21.31	26.50	19.00	0	0	0
E9	24.68	25.00	22.06	30.25	24.00	21.66	15.00	14.94	13.00

Obs.: Cada valor desta tabela corresponde à média aritmética de 8 valores.

TABELA 7 - Média, desvio padrão e variância das leituras de diâmetro de área de atividade enzimática em concentrações diferentes de amido solúvel.(linhagem E9).

CURVA 1

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA (mm)	DESVIO PADRÃO	VARIÂNCIA
0	13.75	0,3371	0.1136363
0.05	18.50	2.5406	6.4545454
0.1	15.71	2.4299	5.9047666
0.2	20.04	1.1057	1.2225724
0.4	12.04	2.1047	4.4299272
1.2	13.50	1.1650	1.3571428
2.4	11.50	1.3540	1.8333363

CURVA II

(REPETIÇÃO)

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA (mm)	DESVIO PADRÃO	VARIÂNCIA
0	13.20	0.4501	0.2026545
0.05	20.91	1.5642	2.4469727
0.1	19.63	3.9057	15.25455
0.2	21.20	1.1957	1.4299272
0.4	15.90	1.4459	2.09091
1.2	13.95	1.6577	2.748109
2.4	13.04	0.8106	0.65720

Obs.: Cada valor representa a média do diâmetro do halo de 8 colônias avaliadas.

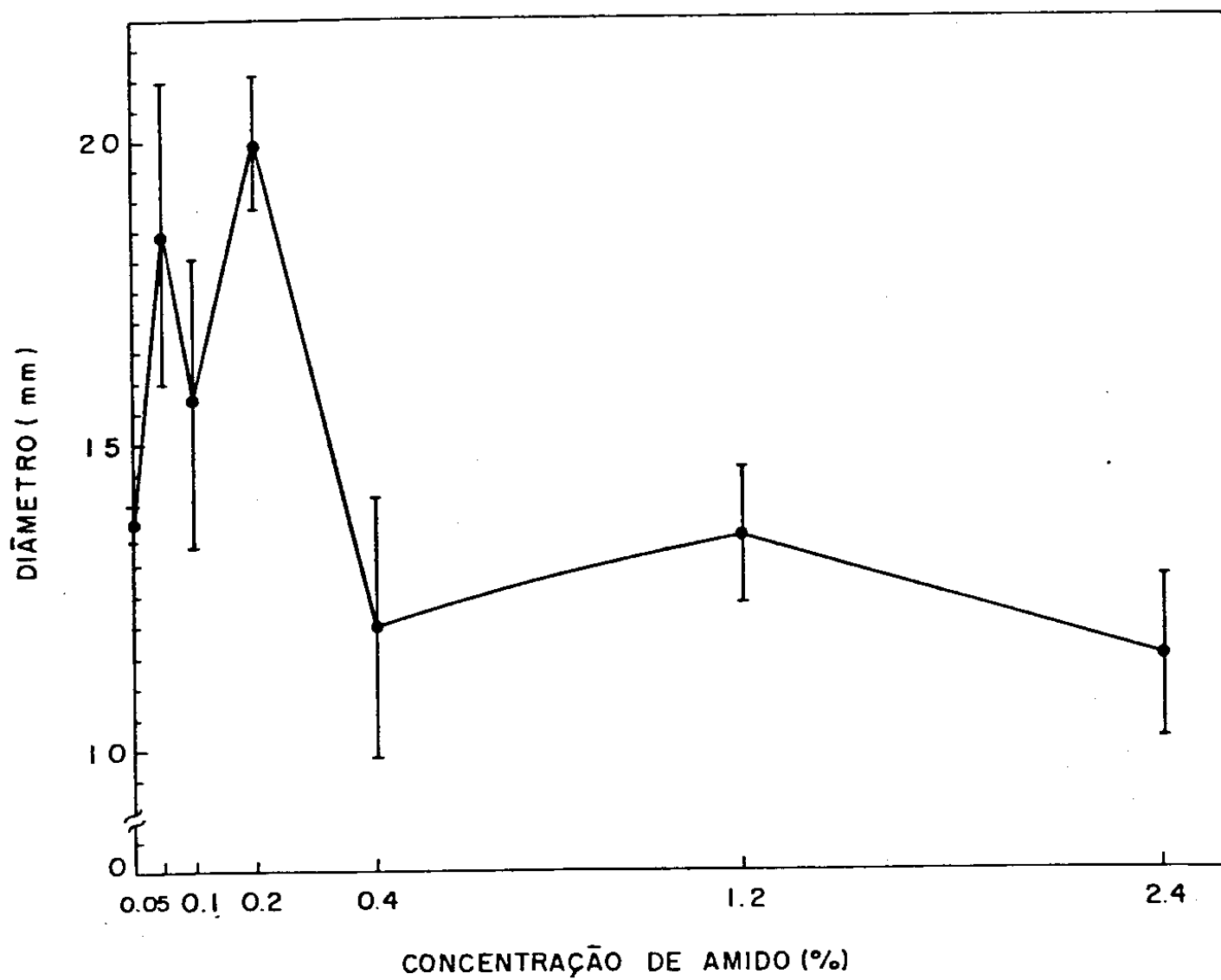


GRÁFICO 1 - Comportamento do diâmetro de atividade amilolítica em diferentes concentrações de amido solúvel.

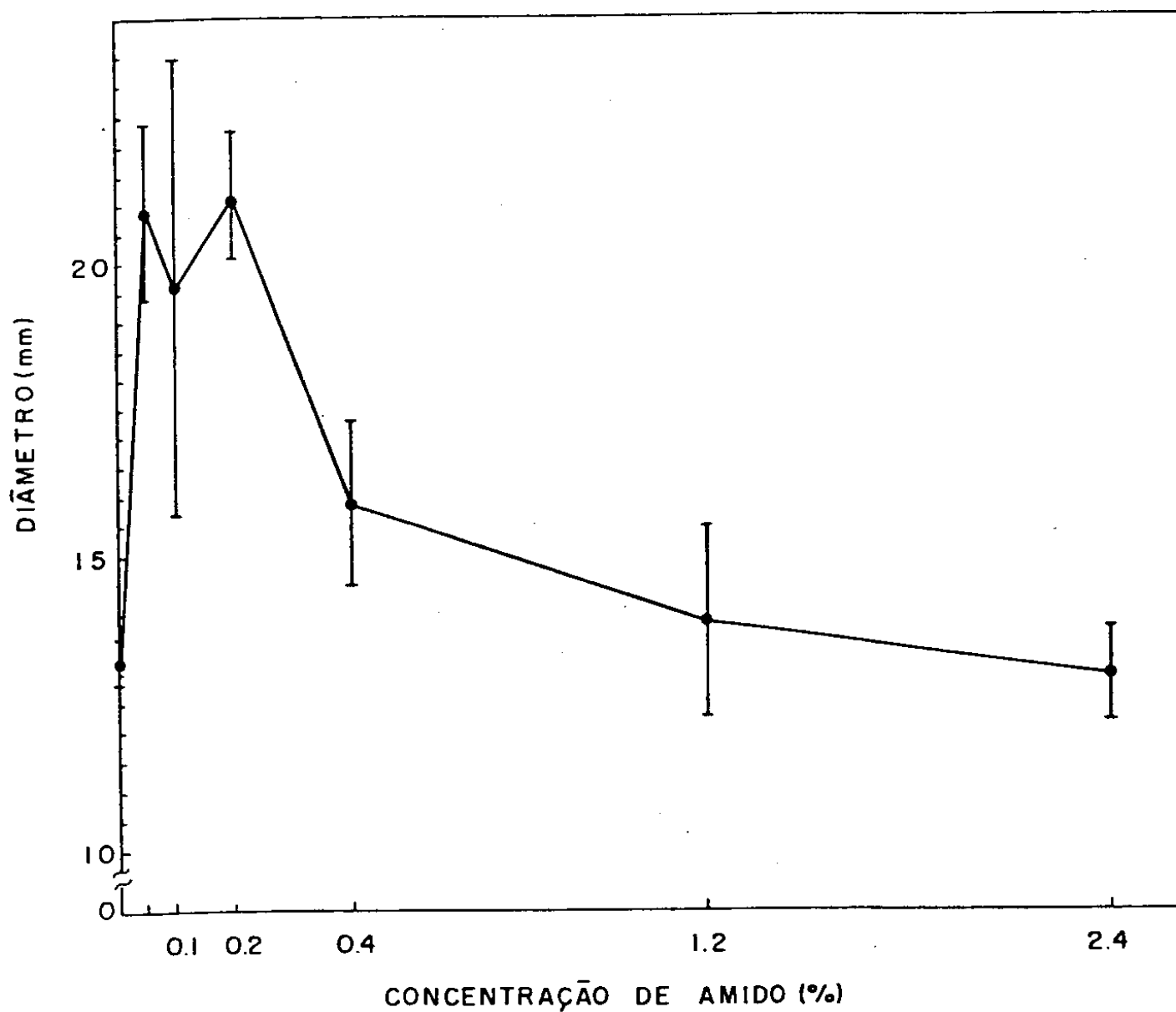


GRÁFICO 2 - Comportamento do diâmetro de atividade amilolítica em diferentes concentrações de amido solúvel (repetição).

4.1.4. Proposta de método para avaliação de Atividade Enzimática

As tabelas 8, 9, 10 e 11 apresentam separação das 15 linhagens utilizadas neste trabalho, quanto a produção de enzimas proteolíticas, quitinolíticas, amilolíticas e lipolíticas, respectivamente.

A análise da produção de enzimas foi feita tomando-se por base a diferença entre o diâmetro da colônia+halo de degradação do substrato e o diâmetro da colônia, com posterior tratamento estatístico através dos testes não-paramétricos de KRUSKAL-WALIS e SPEARMAN (NEGRILLO, 1985).

Na Tabela 12, todas as 15 linhagens são comparadas com relação à produção das quatro enzimas estudadas. Notar que em nenhum caso verificou-se o destaque de alguma linhagem como sendo boa produtora de todos os tipos enzimáticos ou o contrário.

TABELA 8 - Teste de KRUSKAL-WALLIS para os valores da produção de enzimas lipolíticas.

LINHAGENS		GRAU DE SIMILARIDADE (TUKEY 5%)			COMPARAÇÃO
20		a			+++
9		a			+++
64		a	b		++-
40		a	b		++-
70		a	b		++-
E9			b		+--
58			b		+--
Y5			b		+--
B/vi			b		+--
1			c		---
5			c		---
10			c		---
14			c		---
23			c		---
54			c		---

Produção: ótima (+++), Boa (++-), Regular (+--) e Fraca (---).

TABELA 9 - Teste de KRUSKAL-WALLIS para os valores da produção de enzimas amilolíticas.

LINHAGENS		GRAU DE SIMILARIDADE (TUKEY 5%)				COMPARAÇÃO
58		a				++++
70		a				++++
54		a				++++
Y5		a	b			+++-
B/vi		a	b			+++-
E9		a	b			+++-
64		a	b	c		++--
20		a	b	c		++--
9		a	b	c		++--
40			b	c		+---
10				c		----
5				c		----
14				d		----
23				d		----
1				d		----

Produção: Excelente (++++), Boa (+++), Regular (++), Fraca (+) e Muito Fraca (----).

TABELA 10 - Teste de KRUSKAL-WALLIS para os valores da produção de enzimas quitinolíticas.

LINHAGENS		GRAU DE SIMILARIDADE (TUKEY 5%)				COMPARAÇÃO
23		a				++++
64		a				++++
58		a	b			+++-
70		a	b			+++-
E9		a	b			+++-
9		a	b	c		++--
14		a	b	c		++--
Y5		a	b	c		++--
40			b	c		+---
20			b	c		+---
1			b	c		+---
5				c		----
54				c		----
10				c		----
B/vi				d		----

Produção: Excelente (++++), Boa (+++), Regular (++), Fraca (+) e Muito Fraca (----).

TABELA 11 - Teste de KRUSKAL-WALLIS para os valores da produção de enzimas proteolíticas.

LINHAGENS		GRAU DE SIMILARIDADE (TUKEY 5%)				COMPARAÇÃO
64		a				++++
Y5		a				++++
E9		a				++++
10		a	b			+++-
14		a	b			+++-
40		a	b			+++-
9		a	b			+++-
23		a	b	c		++--
58		a	b	c		++--
20			b	c		+---
70			b	c		+---
54			b	c		+---
1				c		----
5				c		----
B/vi				c		----

Produção: Excelente (++++), Boa (+++), Regular (++), Fraca (+) e Muito Fraca (----).

TABELA 12 - Comparação da produção de enzimas pelas quinze linhagens de *M. anisopliae* estudadas.

PRODUÇÃO DE ENZIMAS

LINHAGENS	AMILOLÍTICAS	QUITINOLÍTICAS	PROTEOLÍTICAS	LIPOLÍTICAS
E9	++++	+++	++++	++
1	----	++	----	----
5	----	----	+++	----
9	+++	++	+++	+++
10	----	----	+++	----
14	----	+++	+++	----
20	+++	++	++	+++
23	----	++++	+++	----
40	++	++	+++	++
54	++++	----	++	----
58	++++	+++	++	++
64	+++	++++	++++	++
70	++++	+++	++	++
B/vi	+++	----	----	++
Y5	+++	++	++++	++

Obs.: Quando todas as linhagens foram analisadas quanto a produção de todas as enzimas ao mesmo tempo, nenhuma mostrou-se significativamente diferente ao nível de 5% no teste de KRUSKAL-WALIS.

TABELA 13 - Valores de rs obtidos no teste de correlação de Spearman.

	PROTEOLÍTICA	LIPOLÍTICA	QUITINOLÍTICA
AMILOLÍTICA	-0,23 N.S.	0,064 N.S.	0,062 N.S.
	PROTEOLÍTICA	-0,64 **	+0,46 **
		LIPOLÍTICA	-0,39 N.S.
			QUITINOLÍTICA

** = Valores significativos ao nível de 5% de probabilidade

4.2. Sobrevivência ao Ultravioleta

Na tabela 14 podem ser encontradas, expressas em porcentagem, a sobrevivência das 15 linhagens de *M. anisopliae* à luz ultravioleta. Graficamente os resultados estão apresentados nos gráficos 3, 4, 5, 6 e 7, sendo que o LD95 de cada uma estão na tabela 15.

Tabela 14 - Sobrevivência de *M. anisopliae* à luz ultravioleta

Linhagem	Tempo (minutos)									
	0	30"	4	8	9	12	15	16	17	19
1	100	88.8	55.5	33.7	-	22.0	-	4.2	-	-
5	100	75.4	6.2	3.05	-	1.31	0.42	-	-	-
9	100	84.0	58.0	23.0	-	11.6	-	-	-	2.26
10	100	-	58.2	31.6	-	11.6	8.3	-	-	-
14	100	93.5	49.3	42.4	-	11.9	-	-	2.05	0
20	100	-	97.5	40.6	-	-	3.12	2.06	0.62	-
23	100	-	86.6	44.8	-	3.4	-	1.70	-	-
40	100	-	21.5	3.13	1.2	0	0	0	0	-
54	100	97.5	69.8	19.0	-	6.3	-	1.23	1.03	-
58	100	77.4	59.5	29.2	-	4.8	2.6	1.05	-	-
64	100	-	69	30	-	15.1	2.4	0.86	-	-
70	100	87	56	21.3	-	-	-	1.3	-	0.37
B/vi	100	83.3	72.9	24.9	-	9.5	-	1.07	-	0
Y5	100	-	70.9	33.0	-	9.6	-	2.7	1.5	-
E9	100	90.2	67.4	29.0	-	13.3	3.12	0	0	0

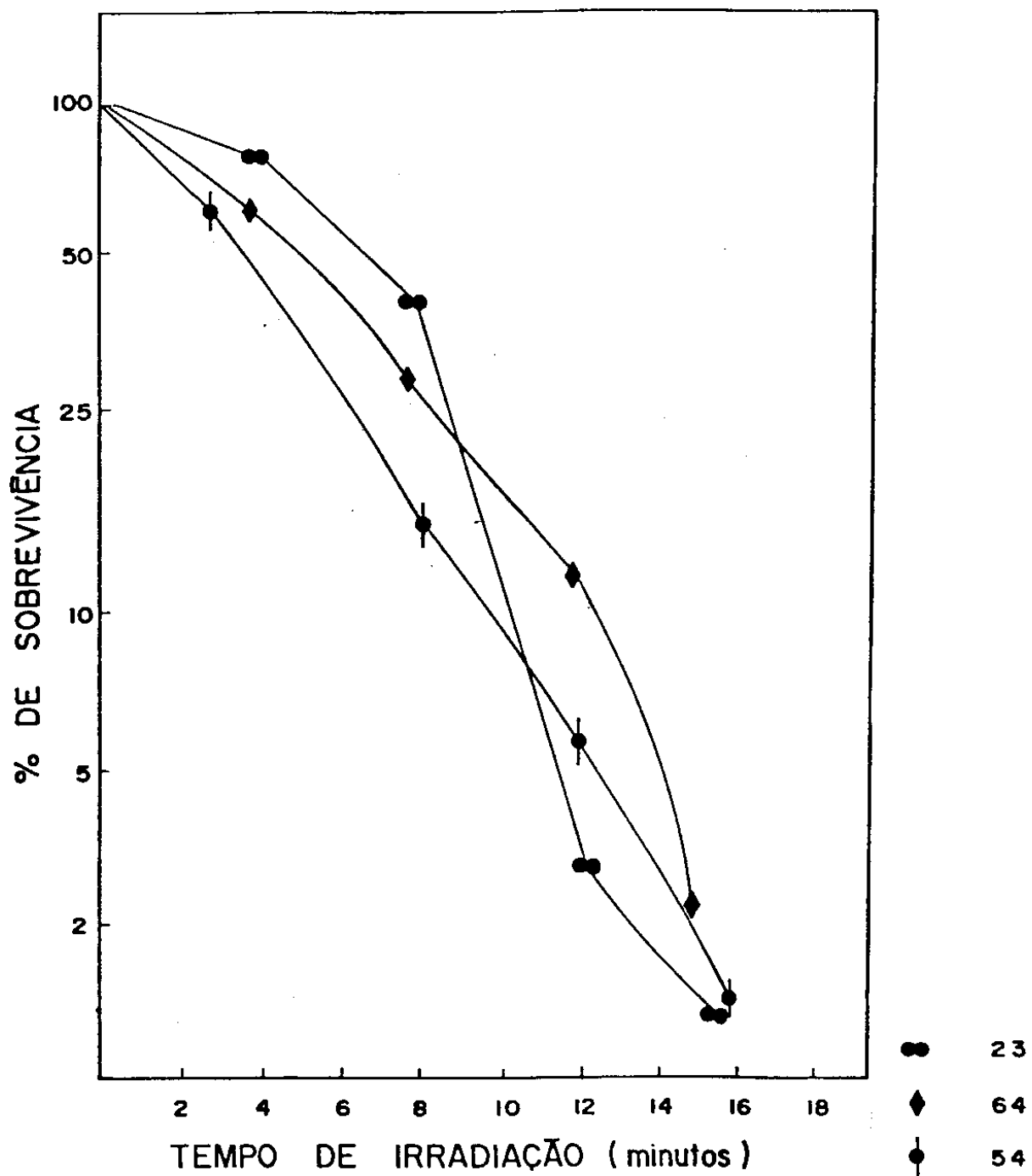


Gráfico 3 - Curvas de sobrevivência de linhagens de *M. anisopliae* (23, 54, 64)

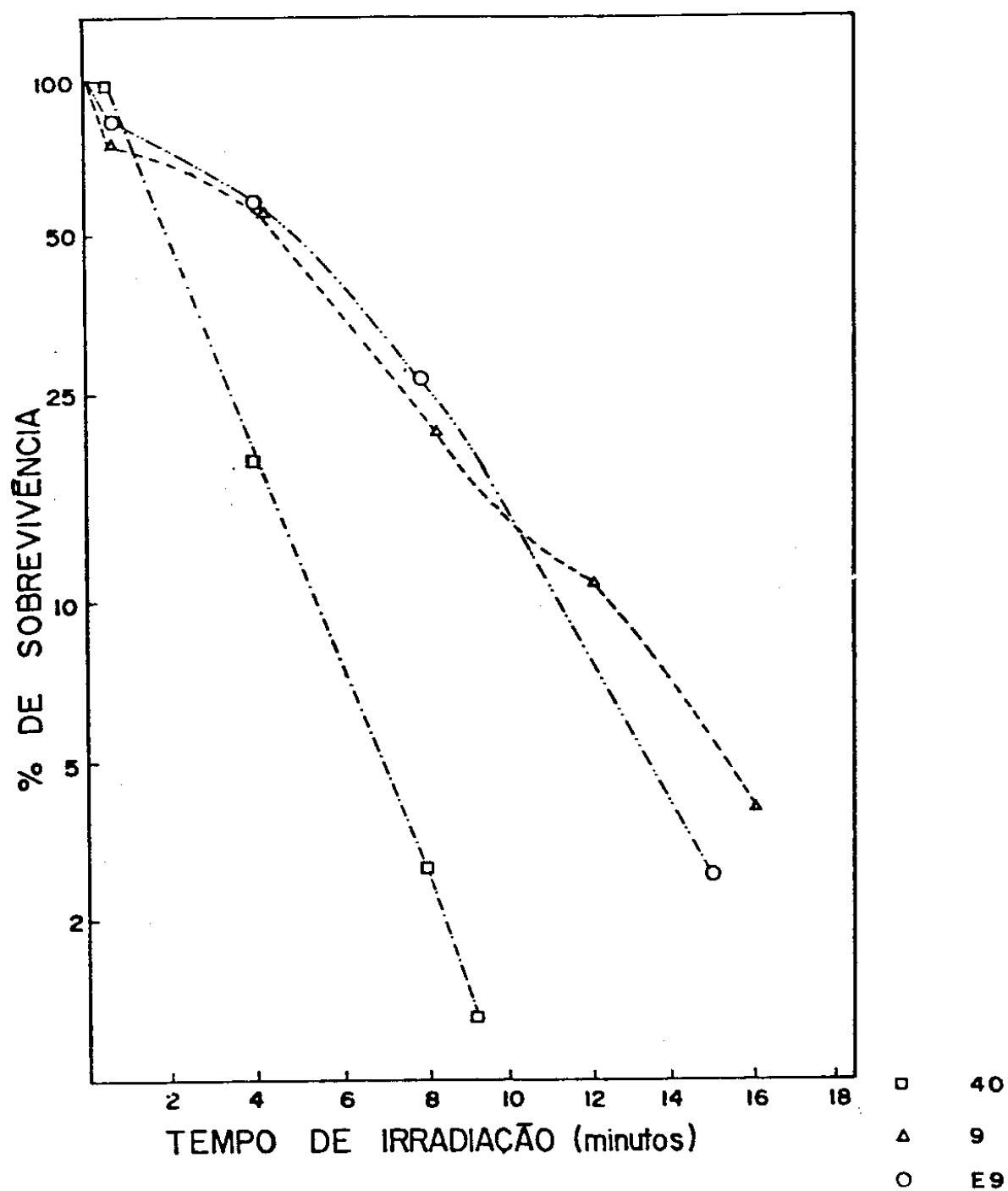


Gráfico 4 - Curvas de sobrevivência de linhagens de *M. anisopliae* (40, 9, E9).

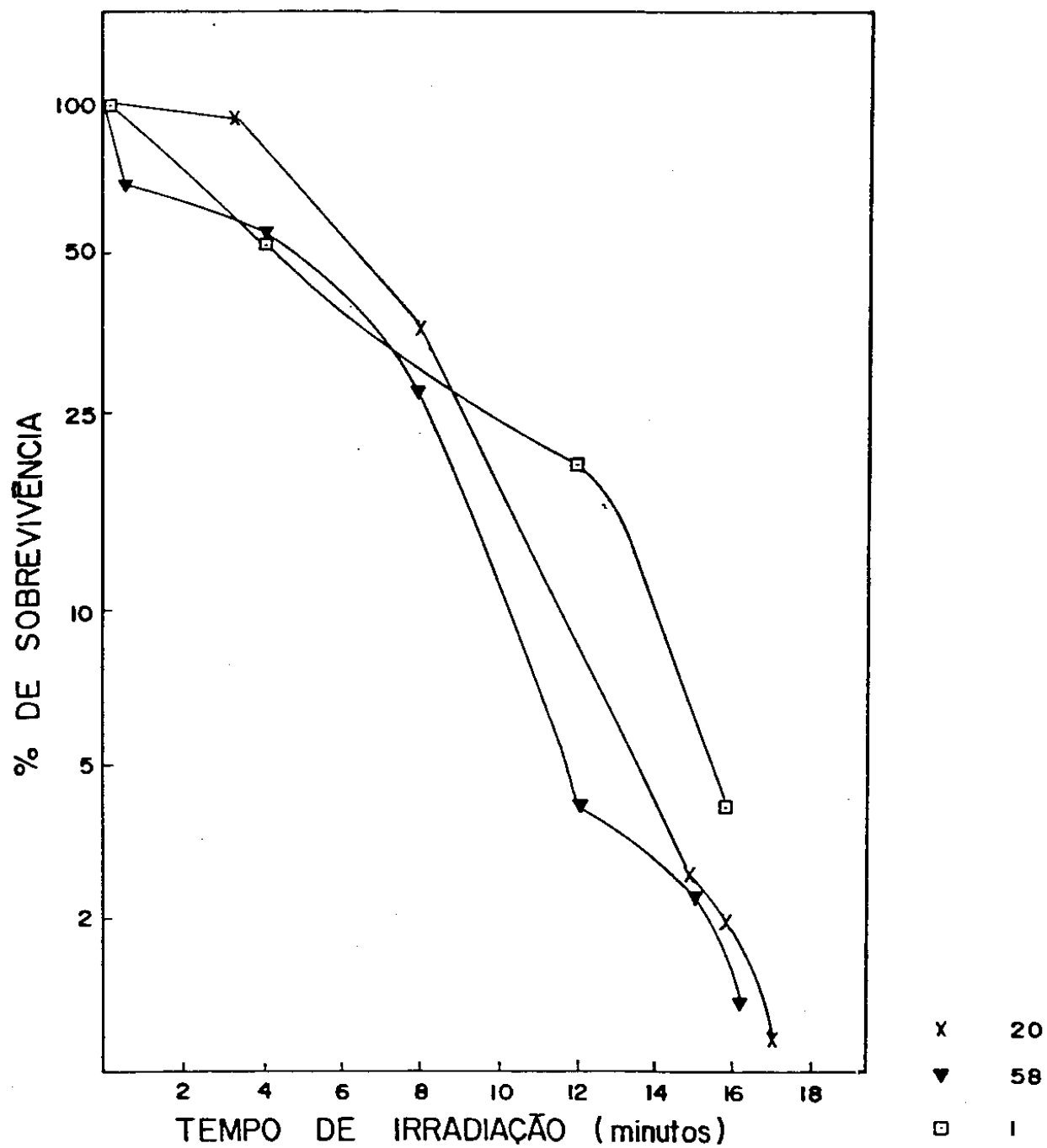


Gráfico 5 - Curvas de sobrevivência de linhagens de *M. anisopliae* (1, 20, 58)

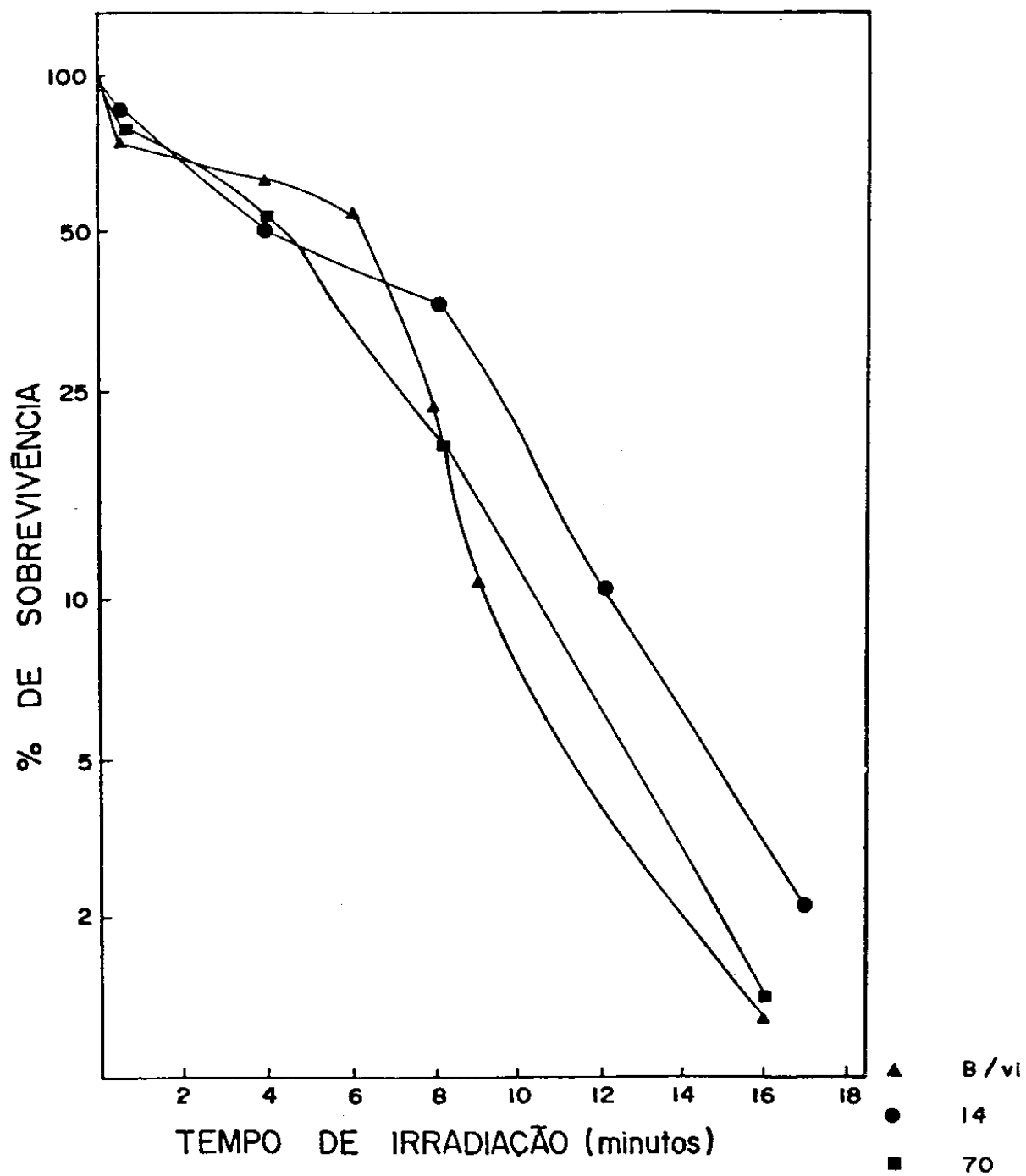


Gráfico 6 - Curvas de sobrevivência de linhagens de *M. anisopliae* (B/vi, 14, 70)

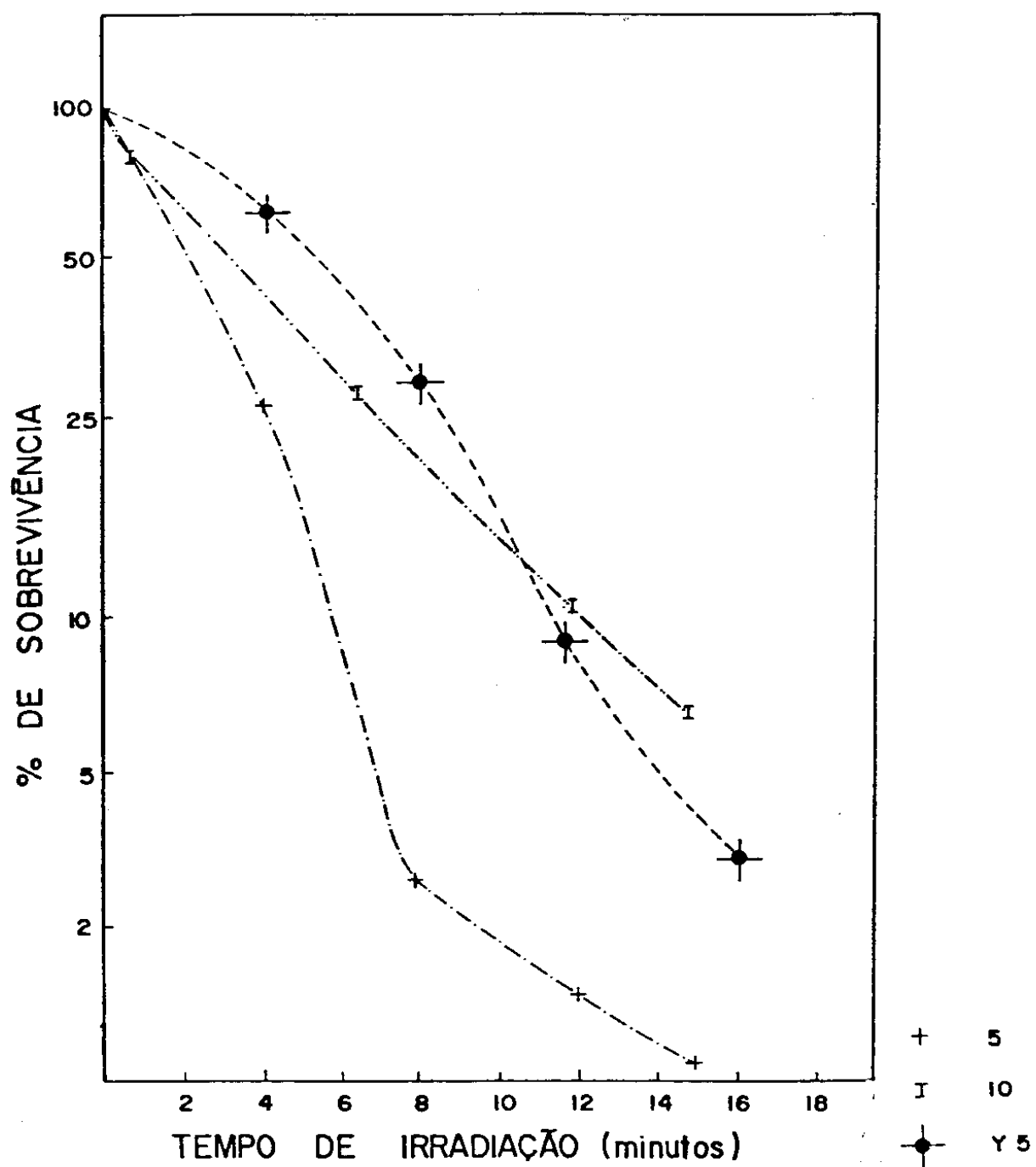


Gráfico 7 - Curvas de sobrevivência de linhagens de *M. anisopliae* (10, 5, Y5)

Tabela 15 - Valores de LD95 de linhagens de *Metarhizium anisopliae*, em minutos, calculados segundo metodologia de BARACHO e ROSIM (1977).

Linhagens		LD95 (minutos)		Procedência
10		17.52		RJ
9		16.86		RJ
1		15.48		Polônia
B/vi		15.35		Mutante E9-ES
14		15.12		Austrália
E9		13.86		ES
20		13.74		Bahia
64		13.62		ES
Y5		13.60		Mutante E9-ES
54		13.20		Bahia
70		11.81		França
58		10.67		Bahia
23		9.28		Polônia
40		7.44		Bahia
5		7.36		Polônia

4.3. Comprimento e largura de conídios

As Tabelas 16 e 17 mostram os valores das médias, desvio padrão e variância de 15 linhagens de *M. anisopliae* com relação ao comprimento e largura, a partir do processamento de 200 leituras de cada uma.

O Gráfico 8 representa a distribuição das mesmas, quando é estabelecida a relação comprimento x largura de conídios, que permite facilmente a separação nas variedades major e minor, como mostra a tabela 12.

Tabela 16 - Comparação da média, desvio padrão e variância de 15 linhagens de *M. anisopliae*, considerando-se o comprimento dos conídios (μm).

Linhagem	Média Corrigida (μm)	Média	Desvio Padrão	Variância
E9	5.70171	4.287	0.5185	0.26888
1	14.43010	10.8595	1.3796	0.35986
5	14.55552	10.9440	0.9569	0.91574
9	7.7486	5.8260	0.5111	0.26130
10	8.52264	6.4080	1.0824	1.17159
14	8.66295	6.5135	0.8193	0.67132
20	6.84684	5.1480	0.4906	0.24070
23	7.95140	5.9785	0.4976	0.24763
40	7.09880	5.3375	0.5661	0.32045
54	9.17234	6.8965	1.2662	1.60325
58	8.83612	6.6437	0.8487	0.72025
64	6.71805	5.7165	0.7168	0.51385
70	7.36620	5.5385	0.8101	0.65625
Y5	7.02758	5.2839	0.6326	0.40025
B/vi	8.08985	6.0826	0.7349	0.54005

Valores obtidos a partir de 200 valores de cada uma das linhagens.

Tabela 17 - Comparação da média, desvio padrão e variância de 15 linhagens de *M. anisopliae*, considerando-se a largura dos conídios (μm).

Linhagem	Média Corrigida (μm)	Média	Desvio Padrão	Variância
E9	2.05418	1.5445	0.1496	0.02238
1	3.90887	2.9390	0.1917	0.03676
5	3.79449	2.8530	0.2532	0.06411
9	2.82425	2.1235	0.2015	0.04060
10	3.12550	2.3500	0.3167	0.10029
14	3.92483	2.9510	0.1972	0.03889
20	2.64138	1.9860	0.1130	0.01277
23	3.10954	2.3380	0.2812	0.07905
40	2.78435	2.0935	0.1693	0.02865
54	3.17205	2.3850	0.2721	0.07068
58	2.69471	2.0261	0.1188	0.01396
64	2.71652	2.0425	0.1561	0.02437
70	2.63406	1.9805	0.0624	0.00389
Y5	2.64736	1.9905	0.0648	0.00420
B/vi	2.68713	2.0204	0.0874	0.00763

Valores obtidos a partir de 200 valores de cada uma das linhagens.

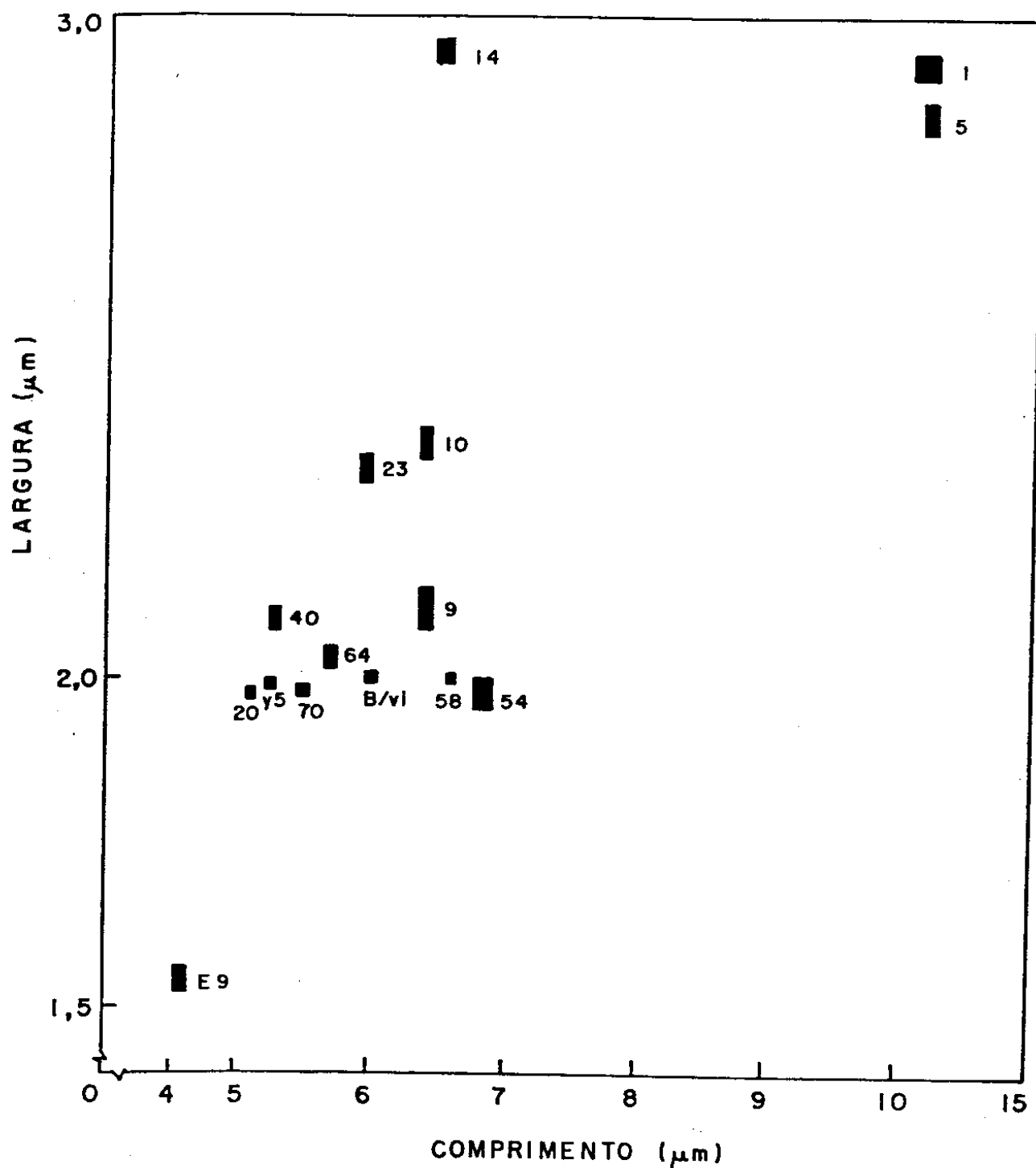


Gráfico 8 - Relação comprimento x largura de conídios de *M. anisopliae*, considerando os desvios respectivos.

Tabela 18 - Separação das linhagens de *M. anisopliae* nas duas variedades, minor e a major.

Linhagem	Variedade	
	Minor*	Major**
E9	X	
1		X
5		X
9	X	
10	X	
14	X	
20	X	
23	X	
40	X	
54	X	
58	X	
64	X	
70	X	
Y5	X	
B/vi	X	

Obs.: A variedade minor também é chamada *anisopliae*

4.4. Padrão de germinação, viabilidade e produção de esporos e crescimento Radial.

Durante o período de experimentação, foram observadas as diferenças com relação ao padrão de germinação das linhagens estudadas, retratados nas figuras 10 e 11.

A germinação do tipo não polar só foi observada nas linhagens major (tabela 19).

A viabilidade também se apresenta de maneira diferenciada, quando as variedades major e minor são comparadas (tabela 20).

A produção de esporos é vista na tabela 21, bem como o crescimento radial (tabelas 23 e 24 e figuras 12 e 13).

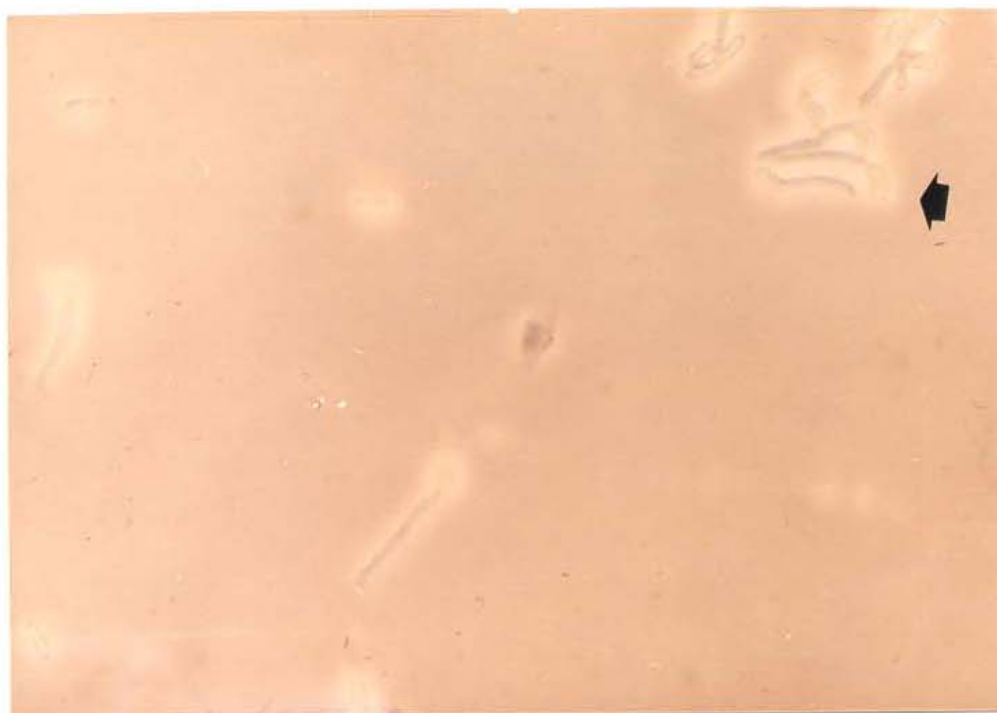


Figura 10 - Conídios da linhagem E9 (minor) em processo de germinação, mostrando a formação polar do tubo germinativo.



Figura 11 - Conídios da linhagem 5 (major) em processo de germinação, mostrando a formação não polar do tubo germinativo.

Tabela 19 - Padrão e germinação das 15 linhagens de *M. anisopliae*, porcentagem de conídios com germinação polar, bipolar e não polar (Porcentagem).

Linhagem	POLAR (%)	BIPOLAR (%)	NÃO POLAR (%)
1	63.15	21.05	15.78
5	88.37	1.16	10.46
9	100.00	-	-
10	57.70	42.30	-
14	96.60	3.40	-
20	62.50	37.50	-
23	68.22	31.77	-
40	51.52	48.47	-
54	97.70	2.30	-
58	60.58	37.64	-
64	72.00	28.00	-
70	36.76	63.24	-
B/vi	96.10	3.85	-
Y5	75.35	24.65	-
E9	98.70	1.30	-

Tabela 20 - Viabilidade das linhagens

Linhagens Major	Germinação mais lenta, não ultrapassando, em média, 30% de conídios germinados, nas primeiras 14 horas analisadas, atingindo valores superiores a 90% após 48 horas.
Linhagens Minor	Germinação rápida, oscilando entre 90 e 100% nas primeiras 14 horas analisadas.

Tabela 21 - Produção de esporos das 15 linhagens analisadas.

Linhagem	Número de esporos/mm ²
1	0.53×10^6
5	1.59×10^6
9	3.99×10^6
10	0.58×10^6
14	1.23×10^6
20	2.73×10^6
23	0.12×10^6
40	0.84×10^6
54	1.91×10^6
58	3.13×10^6
64	3.91×10^6

Tabela 21 - Produção de esporos das 15 linhagens analisadas.
(Continuação)

Linhagem	Número de esporos/mm ²
70	3.86×10^6
Y5	2.06×10^6
B/vi	1.45×10^6
E9	3.72×10^6

Obs.: Cada valor desta tabela representa uma estimativa do número de conídios por mm², a partir dos valores obtidos com o auxílio do "cortador de colônia" de ARRAIS DE MATOS (1983).

Tabela 22 - Crescimento radial de *M. anisopliae* em meio mínimo (MM)
(mm)

Linhagem	Dias									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	4.43	8.00	12.80	14.87	21.25	24.50	28.25	33.00	38.20	
5	-	7.37	10.12	15.00	17.38	20.12	20.50	21.87	22.75	
9	3.93	6.81	8.24	12.31	15.81	19.00	24.31	30.00	34.00	
10	-	-	8.00	10.25	13.12	14.62	16.00	17.62	21.75	
14	-	-	3.12	4.00	5.00	5.62	6.20	7.62	8.87	
20	-	3.87	6.0	7.75	10.00	12.30	14.20	15.00	19.75	
23	-	-	10.00	12.87	16.62	19.00	24.5	28.55	32.75	
40	-	4.00	7.12	9.00	11.56	13.40	16.62	18.00	20.00	
54	6.87	9.12	13.75	17.25	22.25	23.50	27.00	29.12	33.06	
58	9.0	12.87	15.00	17.00	22.87	23.00	26.06	27.12	30.25	
64	7.0	10.00	13.75	15.87	21.62	21.75	24.12	26.20	29.00	
70	3.06	4.43	7.75	9.12	11.68	13.93	16.45	18.10	19.00	
B/vi	2.0	2.25	2.25	2.5	2.25	2.5	2.5	2.5	2.5	
Y5	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	
E9	6.0	9.87	12.06	14.75	20.00	20.87	23.06	24.00	27.87	

Tabela 23 - Crescimento radial de *M. anisopliae* em meio completo (MC)
(mm)

Linhagem	Dias										
	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
1	10.12	14.87	22.06	25.33	32.00	36.12	41.00	44.00	49.25		
5	6.5	8.87	11.25	15.00	19.62	23.12	26.00	28.62	31.75		
9	8.87	15.81	18.12	23.25	27.43	31.37	34.00	38.12	44.25		
10	-	-	14.00	18.00	21.12	23.00	27.25	32.62	36.00		
14	-	-	6.75	8.12	11.00	14.62	17.12	21.75	23.75		
20	-	-	12.62	16.12	17.25	21.87	25.75	30.87	36.37		
23	-	16.35	18.75	23.00	27.00	32.25	37.12	41.75	48.12		
40	-	-	15.00	19.00	21.25	23.00	25.12	27.5	31.12		
54	9.68	15.00	18.00	23.12	27.87	34.75	36.87	40.75	44.00		
58	12.00	14.12	20.00	26.00	30.75	36.12	40.25	44.00	49.25		
64	-	15.87	20.12	24.87	31.62	36.87	40.00	44.00	50.12		
70	7.56	12.87	18.00	21.18	27.31	32.50	36.25	40.87	44.87		
B/vi	-	6.75	12.37	17.12	21.25	25.00	30.06	36.12	40.25		
Y5	5.71	9.42	12.37	17.78	21.00	23.14	28.06	32.00	35.12		
E9	10.00	14.00	18.25	24.00	28.75	34.25	38.00	42.87	44.30		

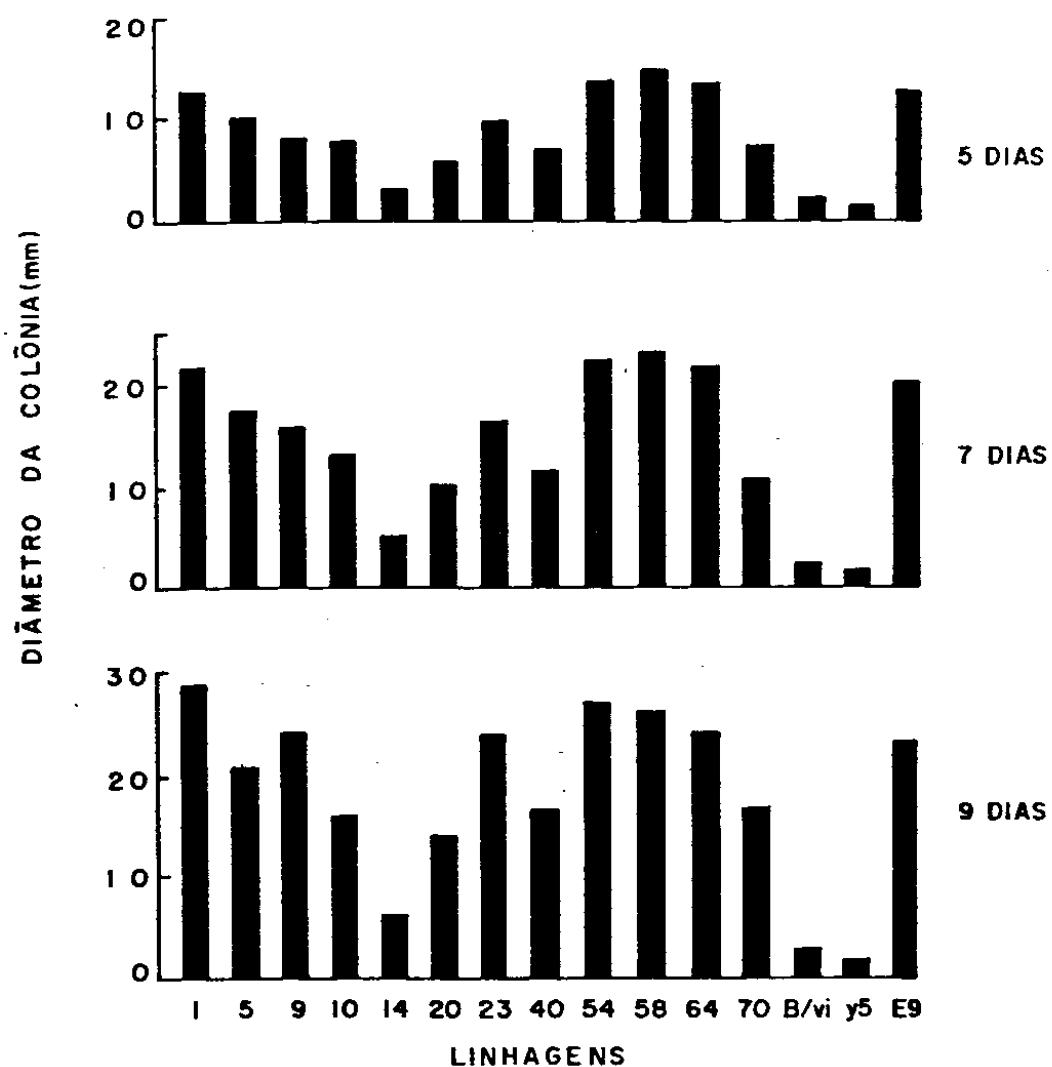


Figura 12 - Histograma do crescimento radial das colônias de *M. anisopliae* em meio mínimo (5, 7 e 9 dias)

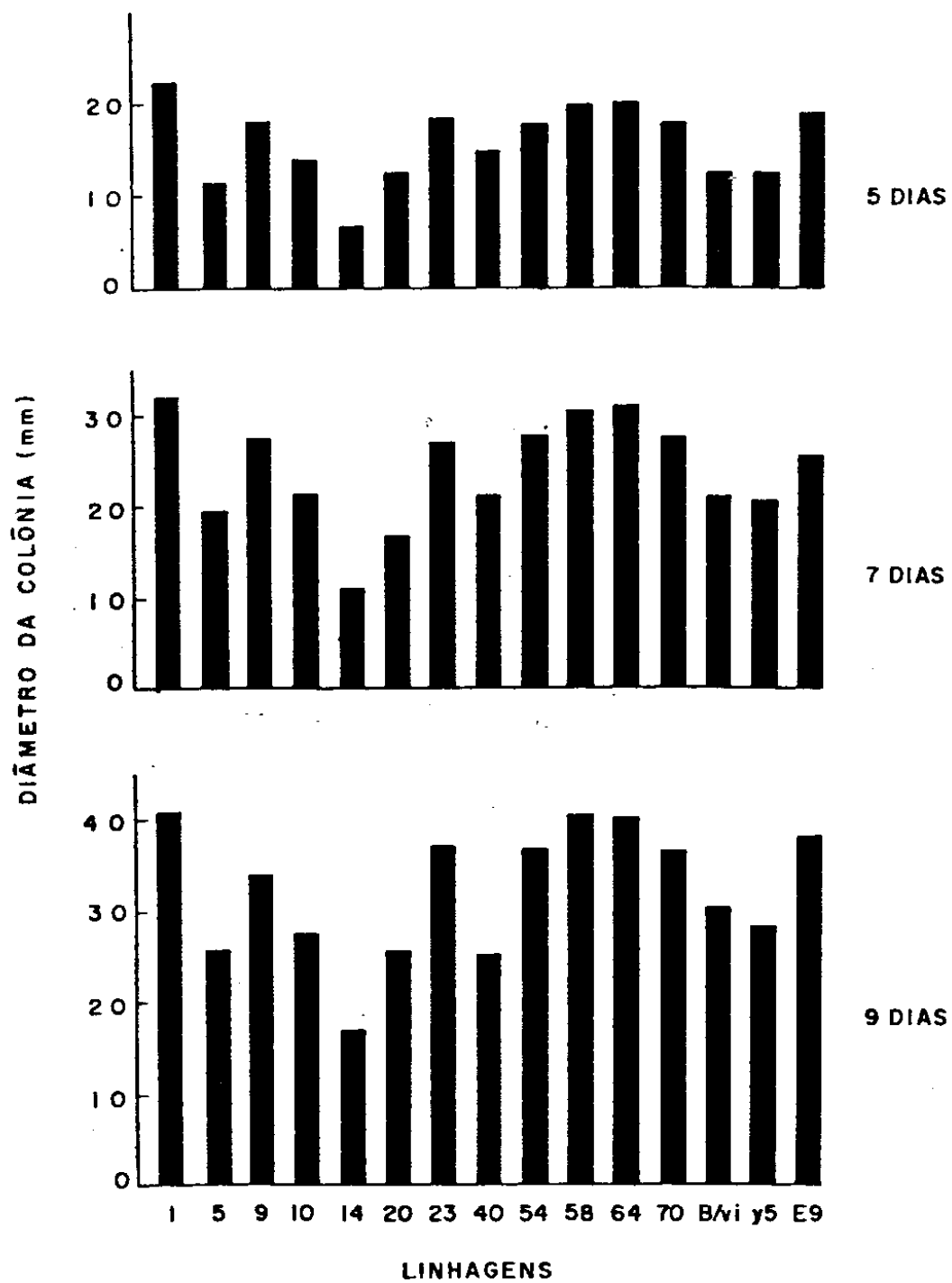


Figura 13 - Histograma do crescimento radial as colônias de *M. anisopliae* em meio completo (5, 7 e 9 dias).

Tabela 24 - Valores de LT50 dos bioensaios realizados, calculados pelo método de THOMPSON & WEIL.

DOSE "sem diluição"		DOSE 10 ⁻⁴ (diluída)	
LINHAGEM	LT50	LINHAGEM	LT50
09	1.7714	10	6.8672
E9	1.9686	09	9.5776
10	2.1637	E9	9.6071
20	3.7316	20	10.1237
70	4.2864	70	10.1237
64	4.5308	54	12.5054
Y5	4.7891	14	13.0337
5	5.4272	5	14.2672
B/vi	5.9257	64	14.5440
40	6.9347	B/vi	14.9080
14	7.8537	Y5	14.9080
01	8.4213	40	15.5775
54	8.8365	1	17.977
23	não realizado	23	não realizado

Obs.: A dose "sem diluição" corresponde a 30 mg de esporos/ml equivalente à concentração normalmente utilizada em aplicações de campo.

Tabela 25 - Valores de atividade enzimática, LT50 e crescimento radial para comparação.

		Atividade Enzimática				LT50 dias	Cresc. radial (mm)
		Lipo- lítica	Amilo- lítica	Proteg lítica	Quitinq lítica		
VAR. minor							
E9		6.83	5.58	15.58	14.91	1.97	28.75
09		7.08	3.33	12.75	14.00	1.77	27.43
10		0	2.0	14.58	7.33	2.16	21.12
14		0	0	14.16	14.0	7.85	11.00
20		11.00	4.58	11.25	10.41	3.73	17.25
23		0	0	0	22.00	N.R.	27.00
40		11.5	3.0	13.08	10.5	6.93	21.25
54		0	6.0	6.08	8.58	8.84	27.87
58		10.00	6.0	11.50	15.08	4.41	30.75
64		7.00	5.0	28.75	15.33	4.53	31.62
70		10.00	6.0	11.00	15.00	4.29	27.31

Tabela 25¹ - Valores de atividade enzimática, LT50 e crescimento radial para comparação.

VAR. major														
1				0		0		5.58		10.00		8.42		32.00
5				0		1.91		4.5		8.83		5.43		19.62
MUTANTES														
Y5				8.5		5.66		22.66		13.0		4.79		21.00
B/vi				6.5		5.66		4.16		0		4.92		21.25

Obs.: Os valores das atividades enzimáticas (Lipolítica, Amilolítica e proteolítica) representam a média de 6 valores de diferença de diâmetros (diâmetro halo - diâmetro de colônia).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Atividade Enzimática

5.1.1. Comportamento enzimático da linhagem E9

O estudo da evolução de produção de enzimas pela linhagem E9 permitiu a observação de certas peculiaridades do processo. A avaliação de produção de enzimas amilolíticas, proteolíticas e lipolíticas revelou que nos três casos os índices de atividade enzimática (I.A.E) apresentam valores baixos inicialmente e tendem a aumentar com o avanço do tempo, o que na verdade revela, proporcionalmente, alta atividade inicial com diminuição posterior (tabelas 1, 2 e 3). O mesmo não foi observado no comportamento da produção quitinolítica, pois a relação halo/colônia não foi avaliada (tabela 4).

Graficamente é fácil observar que a colônia e o halo nas primeiras horas são proporcionalmente equivalentes, confirmando a alta produção de exoenzimas na fase que corresponde à germinação e a penetração no inseto (figuras 5, 6, 7 e 8).

5.1.2. O Estabelecimento do índice de Atividade Enzimática

As tabelas 5 e 5a mostram uma evidente variabilidade quanto aos índices de atividade enzimática obtidos para as 15 linhagens estudadas. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por ROSATO et al (1981) e SOSA GOMEZ e ALVES (1983).

Baseado no exame das tabelas, conclui-se que a produção de enzimas proteolíticas ocorre de maneira relativamente uniforme, e os valores tem faixa mais estreita de variação (no caso de 0.333 a 0.710) em relação aos outros testes, sendo que não foi registrado nenhum valor de índice igual a 1.00, ou seja, onde a ação das enzimas está restrita à área de crescimento da colônia. A uniformidade pode significar que a produção de enzimas proteolíticas não representa um bom parâmetro comparativo no que diz respeito a virulência diferencial das linhagens. AL-AIDROOS e SEIFERT (1980) afirmaram que a degradação de gelatina ou leite como substrato em meio de cultura, parecem não estar sistematicamente relacionados com a virulência; estes mesmos autores consideram a atividade amilolítica um bom caráter diferencial.

O índice, como forma de expressar o potencial de produção enzimática, foi abandonado neste trabalho, pois alguns problemas detectados quando da utilização dos mesmos, pois 2 valores de índice enzimático exatamente iguais, podem significar situações totalmente distintas.

Um exemplo elucidativo é o das linhagens B/vi e Y5, cujos valores são semelhantes para atividade proteolítica, 0,333 e 0,391, respectivamente, entretanto a linhagem Y5 explora área 56 vezes maior (figura 8), representando significativa diferença. Na tabela 5 os índices apresentados são seguidos dos valores que os produziram, para que se tenha uma idéia da importância dos mesmos.

Nota-se ainda que as linhagens 9 e 10 apresentam, curiosamente, um padrão de precipitação de laurato de cálcio nos testes de atividade lipolítica, muito diferente das demais. Observou-se a formação de uma fina zona de precipitação ao redor destas colônias, em contraste com a precipitação de granulação grossa comumente observada neste teste. O significado genético bioquímico ainda não tem explicação, mas este caráter poderia ser usado como diagnóstico para identificação das linhagens.

A produção de enzimas quitinolíticas é facilmente comparável por se apresentar de forma direta, pois não foi possível o estabelecimento de índice. A importância desta atividade será discutida em outro item.

5.1.3. Atividade amilolítica, proteolítica e quitinolítica em concentrações diferentes

Conforme item 3.5.5 as linhagens-alvo do trabalho tiveram os diâmetros das áreas de degradação enzimática avaliadas em 3 concentrações diferentes. O objetivo inicial era o de se estabelecer seis pontos de referência (três da amostra e três de um padrão) para que se pudesse comparar as linhagens em termos de potencial.

Entretanto, a tabela 6 mostra que pontos obtidos na maioria dos casos não permite que seja traçada uma reta ligando-os e, quando isto é possível, as retas apresentam declividade bem diferente umas em relação às outras, não permitindo que sejam comparadas, logo, a utilização desta metodologia foi descartada de imediato.

É interessante notar neste experimento que a concentração de 4,8% de quitina na forma coloidal, duas vezes menor que a concentração proposta por HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975), foi suficiente para inibir o crescimento de 4 linhagens das 15 submetidas ao teste.

5.1.4. Produção de enzimas amilolíticas em diferentes concentrações de amido solúvel.

Não foi detectada correlação linear entre variações nas concentrações de amido e diâmetro de área de atividade enzimática para enzimas amilolíticas (gráficos 1 e 2 e tab 6).O que tornou inviável a avaliação da produção com base em dados obtidos em 3 concentrações diferentes, ou seja, 0,1%; 0,2%; 0,3%; testadas anteriormente.

5.1.5. A diferença de diâmetros como alternativa para avaliação de produção de enzimas

Como forma de evitar os problemas gerados pelo estabelecimento do índice de Atividade Enzimática, discutido no item 5.1.2, estabeleceu-se a diferença de diâmetros (diâmetro do halo-diâmetro da colônia). O método se mostrou plenamente satisfatório, distri-

buindo as linhagens de acordo com a capacidade real de promoção de ação enzimática por área. A tabela 11, por exemplo, mostra que as linhagens Y5 e B/vi foram separadas drasticamente quanto a produção de enzimas proteolíticas, a primeira sendo encarada como "excelente" produtora, e a segunda "muito fraca". O I.A.E. colocava estas linhagens estatisticamente muito próximas (tabela 5 e figura 9).

Além disso, o método sugere um sistema de compensação na biossíntese das enzimas estudadas, pois quando todas as linhagens analisadas, quanto a produção de todas as enzimas ao mesmo tempo, estatisticamente não se mostraram significativamente diferentes ao nível de 5% no teste de KRUSKAL-WALLIS (NEGRILLO, 1985), ou seja, nenhuma linhagem se destacou por produzir em grande proporção todos os quatro grupos de enzimas analisados. Este sistema de compensação já foi relatado por SOSA GOMES & ALVES que constaram em linhagens de *M. anisopliae*, correlação positiva entre atividades amilolítica e proteolítica ao mesmo tempo que verificaram correlação negativa entre atividade lipolítica e atividades amilolítica e proteolítica.

5.2. Sobrevivência ao Ultravioleta

Os efeitos da luz ultravioleta quanto a capacidade mutagênica e ação germicida já foram razoavelmente explorados (HOLLIDAY, 1965), e foram bem sucedidas as tentativas de utilização do

U.V. para produção de mutantes e na determinação da sensibilidade das linhagens de *M. anisopliae* (AZEVEDO et al, 1981; CORRÊA, 1983; ARRAIS DE MATOS, 1983; LUNA, 1985).

As curvas determinadas neste trabalho apresentaram o mesmo padrão exponencial anteriormente verificado. Não foi possível estabelecer relação entre variedade x resposta como fez LUNA (1985) inclusive sugerindo poliploidia para a linhagem M (major) que apresentou curva de perfil descontínuo.

A análise dos dados que estão contidos nos gráficos 3, 4, 5, 6 e 7 e tabela 15, permitem concluir que as curvas de sobrevivência à luz ultravioleta apresentam variabilidade, contudo, ocorre a formação de uma faixa onde estão contidas a maioria delas.

Não foi possível o estabelecimento de nenhum tipo de correlação entre linhagens e elementos utilizados, para caracterização, entretanto, duas linhagens que mostraram-se bastante sensíveis ao U.V., a 23 e a 40, apresentaram dificuldades de esporulação durante os experimentos, sendo que a linhagem 23 entrou em estado de senilidade irreversível, não sendo possível a realização de bioensaio com a mesma.

Notou-se também que as duas linhagens mais resistentes foram isoladas no Rio de Janeiro e que entre as mais sensíveis, encontram-se duas linhagens polonesas. Porém, o número de linhagens estudadas foi considerada pequeno para o estabelecimento deste tipo de paralelo.

Os valores de LD95 calculados para a linhagem E9 estão ligeiramente diferentes daqueles obtidos por SILVA (1985) e ARRAIS DE MATOS (1983). Estas pequenas diferenças podem ser atribuídas à intensidade de emissão de radiação, ou a distância entre a suspensão de conídios, a fonte de luz ultravioleta e o método de determinação. Não foi detectada qualquer correlação entre virulência e resistência ao ultravioleta ao final deste trabalho.

5.3. Tamanho de conídio

Com base nos dados contidos nas tabelas 16 e 17 em relação ao comprimento e largura de conídios de cada linhagem analisada, pode-se concluir que os resultados estão de acordo com os obtidos por JOHNSTON, 1915; TINLINE et al, 1971; AZEVEDO & MESSIAS, 1981 e ARRAIS DE MATOS, 1983. A verificação do tamanho dos conídios

destas linhagens é importantíssima na avaliação geral do desempenho destas 15 linhagens, visto que, já foi sugerida e discutida a relação entre tamanho de conídios e a patogenicidade à insetos (RIBA et al, 1985; FARGUES et al, 1976; FERRON et al, 1972; ROSATO et al, 1981; SILVA et al, 1982)

FERRON et al (1972) acredita existirem implicações fisiológicas bastante importantes na relação patógeno hospedeiro, que determinam respostas diferentes dependendo da variedade de *M. anisopliae* envolvida. Talvez, ainda, aconteça simplesmente um "precondicionamento" de uma determinada linhagem (minor ou major) contra um determinado hospedeiro LATCH (1976).

De qualquer forma, as duas linhagens major (5 e 1) utilizadas neste trabalho, mostraram uma menor virulência em relação a um grande número das linhagens estudadas (tabela 26).

As diferenças entre as linhagens em relação ao comprimento e largura podem ser melhor visualizadas através do gráfico 8, onde os retângulos estão centrados nos pontos das médias obtidas, sendo os lados equivalentes aos desvios padrões de 200 medidas.

A distribuição das linhagens mostra, ainda, a factibilidade do método na separação das linhagens, bem como o enquadramento das mesmas nas variedades minor e major (TINLINE, 1971).

5.4. Padrão de germinação, viabilidade, produção de esporos e crescimento radial

5.4.1. Crescimento Radial e produção de esporos.

É possível notar, através das tabelas 23 e 24 e figuras 12 e 13, a existência de diferentes padrões de evolução de crescimento radial das linhagens, que revelam também, diferenças na habilidade de exploração dos meios mínimo e completo, ressaltando-se a dificuldade de crescimento em meio mínimo apresentada pelos mutantes Y5 e B/vi, confirmando a auxotrofia das duas linhagens.

O crescimento radial apresenta um importante parâmetro, utilizado na avaliação de efeitos de drogas e outros fatores que afetam o crescimento de fungos (CAMARGO, 1980; SHERLOCK & GUITTON, 1982). Quando os valores de evolução dos diâmetros em diferentes meios (tabelas 23 e 24) foram analisados conjuntamente com os valores de produção de esporos (tabela 21), não foi verificada correlação entre diâmetro de colônia e número de esporos.

A linhagem 23, por exemplo, que figura entre os que apresentam maior diâmetro durante toda a análise de evolução é, seguramente, a pior produtora de esporos do grupo avaliado (tabela 21).

5.4.2. Viabilidade e Padrão de germinação

Como era esperado (ARRAIS DE MATOS, 1983), a grande maioria das linhagens apresentou germinação superior a 90%, após 14 horas de incubação, sendo os 100% atingidos a partir deste tempo, até 24 horas. Entretanto, as linhagens 1 e 5 mostraram taxas de germinação bastante inferiores as observadas para as outras, somente atingindo valores próximos a 100%, após 48 horas de incubação. A germinação rápida já foi descrita como sendo característica de linhagens hipervirulentas (AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978) sendo confirmada pelos dados aqui apresentados.

É interessante notar que essas duas últimas linhagens citadas são da variedade major e mais uma vez apresentaram características bastante especiais. Estes resultados parecem indicar uma maior dependência dessas duas linhagens à certas condições.

Reconhecidamente, o tempo de germinação entre as linhagens varia (LUNA, 1985) e isto vem em decorrência de alguns determinantes. PEKRUL et al (1979) sugerem relação de aspectos físicos e químicos que interagem diretamente com o processo de germinação do inseto envolvendo fatores estimulantes e inibitórios.

Alguns destes fatores já estão razoavelmente estudados, como: luz ultravioleta (CORRÊA, 1982), toxinas antifúngicas (DILLON & CHARNLEY, 1986), componentes do meio (SANTOS, 1978).

Analogamente ao que tem sido desenvolvido para fitopatógenos (YODER & TURGEON, 1985), o caminho percorrido pela hifa sobre o inseto, os mecanismos de orientação, os fatores que determinam a continuidade ou o bloqueio da infecção precisam ser melhor explorados no caso de entomopatógenos.

Quanto ao padrão de germinação, os dados citológicos das linhagens por LUNA (1985) e TINLINE (1971) confirmam os resultados obtidos durante este trabalho.

LUNA (1985) observou que apenas uma das oito linhagens utilizadas por ela apresentava, entre outros padrões, a emissão de tubo germinativo não polar, caracterizada pela germinação na região mediana da célula. Coincidentemente, esta linhagem pertencia a variedade major, e as duas apontadas neste trabalho como possuidoras de padrão semelhante também pertencem à variedade major (tabela 19).

As diferenças no comportamento germinativo necessitam de estudos mais apurados e, poderão fornecer dados importantes para explicar diferenças de patogenicidade e virulência verificadas entre linhagens major e minor, discutidas por vários autores (FERRON et al, 1972; LATCH, 1976; RIBA et al, 1985).

5.5. Bioensaios

5.5.1. Tempo Letal (LT50) e atividade enzimática

Quando foi verificada a ocorrência de correlação entre os valores de LT50 com cada uma das atividades enzimáticas estudadas, nenhum valor significativo foi encontrado. Estes resultados apontam para um possível mascaramento de diferenças quando um grupo heterogêneo de linhagens é analisado, no caso deste trabalho composto por variedades diferentes, mutantes com deficiências nutricionais e linhagens com diferenças na produção de esporos.

Segundo YODER (1985), patógenos devem ser suficientemente "domesticados" para permitir uma manipulação eficiente a nível de laboratório já que linhagens, tal e qual são isoladas da natureza, apresentam-se muito variáveis e imprevisíveis para cuidadosos trabalhos experimentais.

Desta maneira, a heterogeneidade acaba colocando a atividade enzimática na condição de mais um indicador de virulência entre outros tantos envolvidos no processo de reconhecimento e colonização do hospedeiro.

SOSA GOMEZ & ALVES (1983) não conseguiram encontrar correlação entre atividade enzimática e virulência, trabalhando com 12 isolados de *M. anisopliae* de diferentes localidades brasileiras. A impossibilidade do estabelecimento de correlação também é relatada por outros trabalhos (PEKRUL & GRULA, 1979; CHAMPLIN et al, 1981). A correlação positiva entre produção de algumas enzimas e virulência, tem sido encontrada em grupos de linhagens mais homogêneas. PARIS & FERRON (1979) mostraram que 10 mutantes de *Beauveria bassiana* lipase-negativos oriundos de linhagens lipase-positiva virulentas eram avirulentos, igualmente observado para linhagens lipase-negativas isoladas da natureza. Foi observado também que 2 mutantes morfológicos e 4 mutantes auxotróficas lipase-positivos apresentavam-se avirulentos. Os autores indicam a provável ligação entre virulência e o caráter lipase-negativo previamente determinado.

A hipótese mais razoável para esse caso é os mutantes possuírem a habilidade de passar através da cutícula, mas serem deficientes em um ou mais dos processos que subsequentemente permitem a multiplicação no hospedeiro. AL-AIDROOS & SEIFERT (1980) selecionaram mutantes de uma linhagem selvagem de *M. anisopliae*, os quais foram alterados quanto a habilidade de degradação de amido, gelatina ou leite. Os mutantes foram testados quanto à virulência ao mosquito *Culex pipiens*; ao final, os autores verificaram ligação entre degradação de polissacarídeos e virulência. SILVA & MESSIAS (1985), trabalhando com mutantes exoenzimáticos e seus revertentes, encontraram correlação positiva entre as atividades enzimáticas lipolíticas e amilolíticas e virulência.

Separando as linhagens utilizadas neste trabalho em 3 grupos, temos : variedades *anisopliae*, variedades *major* e mutantes.

- no grupo de linhagens da variedade *anisopliae*, composto por 10 linhagens, não foi encontrada correlação entre virulência e atividade de produção de enzimas.
- As duas linhagens *major*, em geral, foram consideradas de não boa virulência apresentando fraca produção de enzimas, quando comparadas às outras linhagens.
- Entre os mutantes, a linhagem B/vi, para a qual não foi detectada atividade quitinolítica "in vitro", apresentou LT50 mais alto que o da linhagem Y5, onde foi demonstrada atividade normal das quatro enzimas estudadas.

Outra observação digna de nota é o estado de senescência que apresentou a linhagem 23 ao final do trabalho, com produção não detectável das enzimas amilolíticas, lipolíticas e proteolíticas.

Em verdade, este trabalho mostra que tanto as publicações onde não foi possível verificar correlação entre atividade enzimática e virulência, quanto aqueles onde foi observada parecem não representar antagonismo ou excludência, pois podem estar expressando simplesmente uma maior ou menor homogeneidade na amostra analisada.

6. CONCLUSÕES

- O índice de atividade enzimática (I.A.E), calculado a partir da relação: $\text{diâmetro da colônia} + \text{halo de degradação} / \text{diâmetro colônia}$, não foi considerado um meio seguro para a análise do potencial das linhagens estudadas neste trabalho. Optou-se pela diferença de diâmetros ($\text{diâmetro da colônia} + \text{halo de degradação} - \text{diâmetro colônia}$) como meio alternativo.
- Não foi possível a comparação das linhagens com relação a produção de enzimas em concentrações diferentes de substrato, devido à ausência de correlação linear de resposta.
- Foi detectada durante os testes enzimáticos, correlação negativa para produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas e positiva para proteolíticas e quitinolíticas.
- Não se verificou correlação entre resistência à luz ultravioleta e virulência, nem entre diâmetro de colônia e esporulação.
- Constatou-se que as 2 linhagens major apresentam tempo e padrão de germinação de esporos diferenciados.
- Não foi verificada correlação entre atividade de enzimas e virulência quando foram analisadas todas as linhagens submetidas aos bioensaios.

7. RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de traçar o perfil de um grupo de linhagens de *Metarhizium anisopliae* oriundas do banco de germoplasma pertencente ao Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, e comparar com dados obtidos em bioensaios realizados com ninfas do vetor da doença de Chagas *Panstrongylus megistus*.

Os estudos revelaram que 11 linhagens do grupo pertenciam à variedade minor, 2 à variedade major e as duas restantes, já se sabia, eram mutantes auxotróficos obtidos a partir da linhagem E9; nenhuma correlação com virulência foi encontrada quando analisou-se os resultados de LT50 com relação a resistência à luz ultravioleta, atividade enzimática (amilolítica, lipolítica e proteolítica) e crescimento radial. Notou-se, entretanto, que as linhagens com deficiência na produção de uma ou mais enzimas apresentaram baixa virulência em relação às outras. Detectou-se ainda, diferenças no tempo e forma de germinação das linhagens da variedade major.

A ausência de correlação entre atividade enzimática e virulência foi encarada como sendo um indicador da heterogeneidade do grupo estudado.

8. SUMMARY

15 strains of *Metarhizium anisopliae* from a germoplasm bank of the Genetics and Evolution Department, UNICAMP, were characterized on ultraviolet resistance, enzymatic activity, radial growth and some other biological aspects.

The results obtained during the characterization were compared with the data obtained in bioassays, which each strain was utilized against nymphs of *Panstrongylus megistus*.

The experiments pointed out 11 strains belonging to minor variety, 2 strains to major variety and the remained, previously determined, were autotrophic mutants.

No correlation was founded between LT50 to each characteristics determined, however, strains showing difficult to produce one or more enzymes presented low virulence.

Some differences were detected on the way of germination in major varieties.

The lack of correlation between enzymatic activity and virulence was thought to be an indicator of the heterogeneity on the group analysed.

9. LITERATURA CONSULTADA

9. LITERATURA CONSULTADA

- AGUIAR, N.T.O.; LEITE, B.; MESSIAS, C.L. & PIEDRABUENA, A.E.
"Influência de Saturn Yellow e Negrosina, traçantes de aplicação, na germinação e desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae*". Bolm. Grp. Pesq. Cont.Biol. 6: 17, 1986.
- AGUDELO-SILVA, F. & H. WASSINK "Infectivity of a Venezuelan strain of *Metarhizium anisopliae* to *Aedes aegypti* larvae". J. Inv. Pathol. 43: 435-436, 1984.
- AIZAWA, K. "Strain Improvement and preservation of virulence of pathogens. IN: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W. Microbial Control of insects and Mites". London, Academic Press, p. 655-672, 1971.
- AL-AIDROOS, K. & ROBERTS, W.D. "Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquitos larvae" Can. J. Genet. Cytol. 20: 211-219, 1978.
- AL-AIDROOS, K. "Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*" Can. J. Genet. Citol. 22: 309-314, 1980.

- AL-AIDROOS, K. and SEIFERT, A.M. "Polysaccharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitos in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*". J. Inv. Pathol. 36: 29-34, 1980.

- ALVES, S.B. "Caracterização, padronização e produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. "Piracicaba Tese de Livre-Docência - ESALQ/USP 95 p. 1982.

- ALVES, S.B.; CHAVES, J.W.N; MACEDO, N. & SILVEIRA NETO, S. "Patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Isolado PL-27 sobre lagartas de *Diatraea saccharalis* em diferentes temperaturas. Resumo. XI Congresso Brasileiro de Entomologia. Londrina, 1984.

- AMAGASE, S.; MOTE, M. & NAKAYAMA, S. "Enzymatic digestion of insects by *Nepenthes* secretion and *Drosera peltata* extract: proteolytic and chitino-lytic activities". Biochem. 72: 765-767, 1972.

- ANDERSEN, S.O. "Biochemistry of insect cuticle". Ann. Rev. Entomol 24: 20-61, 1979.

- ARRAIS DE MATOS, A.J. "Crescimento, germinação, conidiação e resistência a luz ultravioleta de linhagens de *Metarhizium anisopliae*". Campinas - UNICAMP. Tese de Mestrado 78 p., 1983.
- AZEVEDO J. L. & COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de Genética ed USP 288p , 1973.
- AZEVEDO, J.L. & MESSIAS, C.L. "Tamanho de conídios em diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*". Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, 2: 5-8, 1981.
- AZEVEDO, J.L. "Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética". Piracicaba - FEALQ, 173, 1985.
- BALFOUR-BROWNE, F.L. "The green muscardine diseases of insects with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea". Proceedings of Royal Entomological Society of London 12: 1298-1301, 1960.
- BARACHO, I.R. & ROSIM, R.T. "Tabelo por la Kalkulado de MD95, en Fungojs". Scienca Revuo, 28: 223-226, 1977.
- BARRACCO, M.A. & MENEZES, H. "Mecanismos celulares de defesa em insetos". Ciência e Cultura 37 (2): 237-250, 1984.

- BASTOS, C. N. & MATTA, E.A. F. Influência da temperatura e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin .Bolm. Inst. Biol. Bahia. Salvador 15:5-8, 1976.

- BERGERON. D. & AL-AIDROOS, K. M. Haploidization analysis of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Genet. Cytol. 24:643-51, 1982.

- BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W. "Strain improvement and preservation of virulence of insects. In: Microbiol control of insects and mites". London Academic Press, 801 p. 1971.

- BASTOS C.N. & E.A.F. MATTA. Influência da temperatura e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch). SOROKIN. BOL. Inst. Biol. Bahia, Salvador, 15: 12-13 1976.

- CAMARGO, L.M.P.C.A. e GABRIEL, D. "Efeito de alguns herbicidas sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* - (Metsch). Sorokin "IN Resumos do VI Congresso Brasileiro de Entomologia. Campinas, p. 348-349, 1980.

- CAMPBELL, R.K.; BARNES G.L.; CARTWRIGHT, B.O. and R.D. EIKENBARY. "Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate sources". J. Inv. Pathol. 41, 117-121, 1983.

- CARNEIRO, J.S.; SILVA, L.A.T. e ALVES, S.B. "Efeito de alguns defensivos in vitro" sobre *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) vuill". In Resumos do VI Congresso Brasileiro de Entomologia (1980).

- CHAIA, G. "Atlas de Parasitologia" Ed. JOHNSON & JOHNSON S.A. São Paulo, Brasil. 93 p., 1975.

- CHAMPLIN F.R., GRULA, E. A. No involvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol., 37:1122-5, 1979.

- CHAMPLIN F.R., CHEUNG, P.Y.K, PEKRUL, S. SMITH, R.J., BURTON, R.L. & E.A. GRULA. Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for pecan weevil. J. Econ. Entomol., 74 : 617-621, 1981.

- CHEUNG, Y.K. & E.A. GRULA. "In vivo events associated with entomopathology of *Beauveria bassiana* for the corn earworm (*Heliothis zea*)". J. Inv. Pathol. 39: 303-313, 1982.

- CORREA, G.S. "Influência da radiação ultravioleta e solar na viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP". Tese de Mestrado 83 p., 1983

- DAOUST, R.A.; MICHAEL, G.W. & ROBERTS, D.W. "Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. J. Inv. Pathol. 41: 151-160, 1982.
- DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. "Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. J. Inv. Pathol. 41: 143-150, 1983a.
- DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. "Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes". J. Inv. Pathol. 41: 161-170, 1983b.
- DE CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; DE SOUZA, H.M.L. & AZEVEDO, J.L. "Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*". Experimentia, 36: 293-294, 1980.
- DELACROIX, M.G. "*Oospora destructor*, champignon produisant sur les insectes la muscardine verte. Bulletin de la Société Mycologique de France, 9: 260-264, 1893. Apud: PETCH, T. Notes on entomogenous fungi". Trans. Br. Mycol. Soc. 16: 55-75, 1931.

- DEMAİN, A. L. & SOLOMON, N. A. Industrial Microbiology. Scientific American 245:67-74, 1981.
- DEPLOEY, J.J.; FORTMANN, B. & PERVA, L. "Daily measurements of *Mucor miehi* lipase activity" Mycologia, 73: 953-958, 1981.
- DIAS, J. C.P. & LEÃO, A. E. de A. Parasitismo de fungos (*Beauveria bassiana*) sobre triatomídeos brasileiros criados em laboratório. Atas Soc. Biol.(RJ) 11:85-87, 1967.
- DIEHL-FLEIG, E. & SILVA, M.E. "Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a formiga saúva. *Atta sexdens Pririventris*. Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol. 6: 15, 1986.
- DILLON, R.J. and CHARNLEY, A.K. "Inhibition of *Metarhizium anisopliae* by the gut flora of the desert locust, *Schistocerca gregaria*: Evidence for an antifungal toxin. J. Inv. Pathol., 47: 350-360, 1986.
- FARGUES, J.F. & ROBERT, P.H. "Effects of passaging through scarabaeid hosts on virulence and host specificity of two strains of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Can. J. Microbiol. 29 (5): 576-583, 1983.

- FARGUES, P.; ROBERT, P.H. & A. VEY "Effect des destruxines A, B. et C dans la pathogénese de *Metarhizium anisopliae* chez les larves de coleopteres Scarabeidae". *Entomophaga*, 30 (4): 353-364, 1985.

- FEDERICI, B.A. "Experimental hybridization of *Coelomomyces dodgei* and *Coelomomyces punctatus* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4425-4428, 1979.

- FEDERICI, B.A. "Inviability of interspecific hybrids in the *Coelomomyces dodgei* complex. *Mycologia* 79: 555-562, 1982.

- FELICIANGELI, D. & RABINOVICH, J. E. Efecto de la densidad en *Coecyrtus trinidadensis*, un parasito endofago de los huevos de *Rhodnius prolixus*, vector da enfermedad de Chagas en Venezuela. *Rev. inst. Med. Trop.*, 19:21-34, 1977.

- FERRON, P.; HURPIN, B. & P.H. ROBERT. "Sur la specificité de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, *Entomophaga*, 17: 165-78, 1972.

- FERRON, P. "Biological control of insect pests by entomogenous fungi: *Ann. Rev. Entomol.* 23: 409-442, 1978.

- FORATTINI, O.P.; FERREIRA, O.A.; ROCHA E SILVA, E.O.; RABELO E.X. "Aspectos ecológicos da tripanossomase americana." Persistência e potencial de domiciliação de populações triatomínicas silvestres em região de intensa atividade agropecuária. *Revista de Saúde Pública, São Paulo* 13: 123-146, 1979.

- FREITAS, J. L. P. Resultados de aplicação do Rhodiatox e Gammaxane contra triatomídeos. Observações sobre o poder residual. *Rev. Paul. Med.* 36:235-44, 1950.

- GABRIEL, B.P. "Enzymatic activities of some Entomophthorous Fungi. *J. Inv. Pathol.* 11: 70-81, 1968.

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

- GARCIA, A.S.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L. & PIEDRABUENA, A.E. "Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a *Bras. Ent.*, 28: 421-24, 1985.

- GOMES, D.R.S. & ALVES, S.B. "Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Sorok. 1. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. "Rev. Invest. 1: 83-102, 1983.

- HACKMAN, R.H. "Structure and Function in tick cuticle. "Ann. Rev. Entomol. 27: 75-95, 1982.

- HADLEY, N.F. The Artropod Cuticle. Scientific American. 255: 98-106, 1986.

- HAMILL, R.L.; HIGGENS, C.E.; BOAZ, H.E. & GORMAN, M. The structure of beauvericin, a new antibiotic toxic to *Artenia salina*. Teatrahendron Lett. 49:4255-8, 1969.

- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS "The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. "Micologia 67: 597-606, 1975.

- HOLLIDAY, R. Radiation sensitive mutants of *ustilago maydis*. Mutation Research 2: 557-559, 1965.

- HUBER, J. Untersuchungen zur physiologie insektentotender pilze Arch. Mikrobbiol. 29:257-265, 1958.

- IGNOFFO, C.M. "Entomopathogens as insecticides" IN M. Insecticides of the future: "Ed. MARCEL DEKKER, INC. New York. 93p., 1975.

- JOHNSTON, J.R. "The entomogenous fungi of Porto Rico. "Puerto Rico Board of Commissioners of Agriculture Bulletin, 10: 1-13, 1915.
- JUNIOR, A.R.; MESSIAS, C.L. & OLIVEIRA, A.R. "Testes sorológicos aplicados na caracterização e diagnósticos do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin". Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol. 6:14, 1986.
- KAWULA, T.H. & LINGG, A.J. Production of protoplast from *Beauveria bassiana* Blastopores. J. Inv. Pathol. 43:282-284, 1984.
- KODAIRA, Y. "Studies on the new toxic substances to insects, destruxin A and B, produced by *Dospora destructor*. Part. I. Isolation and purification of destruxin A and B. "Agricultural and Biological Chemistry, 26:36-42, 1962.
- KOIDSUMI, K., "Antifungal action of cuticular lipids in insects". J. Insect Physiol. 1:40-41, 1957.
- KUCERA, M. & SANSINAKOVA, A. "Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. J. Inv. Pathol. 12: 316-320, 1968.
- KUCERA, M. "Protease from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae. J. Inv. Pathol. 35: 304-310, 1980.

- KUCERA, M. "Inhibition of the proteases from *Metarhizium anisopliae* by extracts of *Galleria mellonella* larvae". J. Inv. Pathol. 40: 299-300, 1982.

- KUCERA, M. "Partial purification and properties of *Galleria mellonella* larvae proteolytic inhibitors acting on *Metarhizium anisopliae* toxic protease". Journal of Invertebrate Pathology, 43: 190-196, 1984.

- KUCERA, M. & WEISER, J. Different course of proteolytic inhibitory activity and proteolytic activity in *Galleria mellonella* larvae infected by *Nosema algarae* and *Varimorpha heterosporum*. J. Inv. Pathol. 45:41-46, 1985.

- KUNITZ, M. "crystalline soybean trypsin inhibitor "J. Gen. Physiol. 30: 291-310, 1947.

- LATCH, G. C. M. *Metar(r)hizium anisopliae* (Metsch) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. New Zealand J. Agr. Res. 8:384-396, 1965.

- LATCH, G.C.M. "Studies on the susceptibility of *Oryctes rhinoceros* to some entomogenous fungi. Entomophaga, 21: 31-38, 1976.

- LEITE, B. & MESSIAS, C.L. "Atividade quitinolítica em linhagens de *Metarhizium anisopliae*". *Ciência e Cultura*, 35: 703, 1983.
- LEITE, B. & MESSIAS, C.L. "Atividade Enzimática para linhagens de *Metarhizium anisopliae*". *Ciência e Cultura*, 36: 814, 1984.
- LEITE, B. & MESSIAS, C.L. "Atividade Enzimática para linhagens de *Metarhizium anisopliae*. *Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol.* 5:13, 1984.
- LENT, H. & WYGODZINSKI "Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectores of Chagas disease. *Bol. Amer. Mus. Nat. Hist.* 163 (3): 127-520, 1979.
- LEOPOLD, J. & SAMSINÁKOVÁ "Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *J. Inv. Pathol.* 15: 34-42, 1970.
- LUGLI, J. & MESSIAS, C.L. "Obtenção de mutantes de *Metarhizium anisopliae*. Resumo: SBG - 8ª Reunião de Genética de Microrganismos, Belo Horizonte, p.14, 1981.
- LUGLI, J. & MESSIAS, C.L. "Parassexualidade em diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae*. *Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol.* 3: 15-16, 1982.

- LUGLI, J. & MESSIAS, C.L. "Produção de dextruxina A por linhagens e mutantes de *Metarhizium anisopliae*. Resumo: SBG 11ª Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Londrina. p. 21, 1984.

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

- MADELIN, M.F. 1968. Fungal parasites of invertebrates. I. Entomogeneous fungi. IN: The fungi. AINSWORTH, G.C. e SUSSMAN, A.S. Eds., 3: 227-238. New York, Academic Press.

- MARRINK, J. & M. GRUBBER "Use of casein in assays for proteolytic activity in tissue extracts: a warning" *Biochem. Biophys. Acta.* 118: 433-9.

- MESSIAS, C.L. "Parasexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba ESALQ/USP. Tese de Doutorado. 73.p. 1979.

- MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. "Parasexuality in deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 75: 1-5. 1980.

- MESSIAS, C.L.; ROBERTS, D.W. & GREFIG, A. T. "Pirolisis gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*: an aid to stain identification. J. Invert. Pathol. 42:393-396, 1983.

- METSCHNIKOFF, E. Zur Lehre Uber Insektenkraukheiten zoologisher Anzeiger, 3: 44-47, 1879 Apud : Petch, T., Notes on entomogenous fungi. Trans. Br. Mycol. Soc.16: 55-75, 1931.

- MOHAMED, A.K.A.; JACKSON, S.D. & NELSON, F.R.S. "Proteolytic activity of two isolates of *Metarhyzium anisopliae*". J. Georgia Entomol. Soc. 19: 271-275, 1984.

- MULLER-KOGLER, E. Captanzur Hemmung einer Mykose durch *Metarhizium anisopliae* bei larven von *Oryctes rhinoceros* .Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 23,12, 1971.

- NEGRILLO, B. G. Métodos não-paramétricos uni e multivariados . 30 Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria . Piracicaba. 81p, 1985.

- OGRYDZIAK, D.M. & MORTIMRE, R.K. "Genetics of extracellular protease production in *Saccharomycopsis lipolytica*". Genetics 87: 621-632, 1977.

- PARIS, S. & SEGRETAIN, G. Caracteres physiologiques de *Beauveria tenella* en rapport avec la virulence de souches de ce champignon pour la larve du Hanneton commun, *Melolontha melontha* Entomophaga, 20 : 135-138, 1975.

- PARIS, S. & FERRON, P. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria bronniartti* (= *Beauveria tenella*) J. Inv. Pathol. 34: 71-77, 1979.

- PEKRUL, S. & GRULA, A. "Mode of the corn Earworm (*Heliothis zea* by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning Electron Microscopy". J. Inv. Pathol. 34: 238-247, 1979.

- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & CORREIA, M.A. Induction of male sterility through manipulation of genetic mechanisms present in vector species of Chagas disease (remarks on integrating sterile-male release with insecticidal control measures against vectors of Chagas disease) Rev. Inst. Trop. 14: 360-371, 1972.

- PERSSON, M.; HALL, L. and K. SODERHALL "Comparison of peptidase activities in some fungi pathogenic to arthropods. J. Inv. Pathol. 44: 342-348, 1984.

- PIMENTEL GOMES, F. Curso de Estatística Experimental ed USP 466p 1985.

- PONTECORVO, G. & ROPER, J.A. "Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploid in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbio. b: vii, 1952.

- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HERMOUS, L.M.; MACDONALD, K.D. & W.J. BUFTON "The genetic of *Aspergillus nidulans*. "Advances in Genetics, 5: 141-238, 1953.

- PIEDRABUENA, A.E. Contribuição ao Estudo das doses letais. Campinas - UNICAMP. Tese de doutoramento 96 p., 1975.

- PRIOR, C. & M. ARUDA. "The infectivity of *Metarhizium anisopliae* to two insect pests of coconuts. J. Inv. Pathol. 45: 187-194, 1985.

- PUPIN, A.M.; MESSIAS, C.L. & D.W. ROBERTS "The use of fatty acids as an aid in the identification of *Metarhizium anisopliae*." Society for Invertebrate Pathology. XVII Annual Meeting, 66 p., 1984.

- RAMOSKA, W.A.; WATTS, S. & WATTS, H.A. "Effects of sand formulated *Metarhizium anisopliae* spores on larvae of three mosquito species. Mosquitoes news. 41(4) 725-728, 1981.

- RADHA, K.; NIRULA, K.K. & MENON, K.P.V. The green muscardine disease of *Dryctes rhinocerus* the causal organism. Indian Coconut Journal 9:83-89, 1956.
- RANGEL, D.E.N. & MESSIAS, C.L. "XI Reunião Anual de Genética de microrganismos". Londrina, 1984.
- RANGEL, D.E.N.; MESSIAS, C.L. & PIEDRABUENA, A. "Virulência de *Metarhizium anisopliae* a insetos vetores da Doença de Chagas. Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol. 6:18, 1986.
- REES, H.H. "Insect biochemistry ed JOHN WILEY & SONS. Inc. New York. 64 p. 1977.
- REY, L. "Parasitologia" ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro. 695 p. 1973.
- RIBA, G.; AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L.; SILVEIRA, W.D. & TUVESON, R. "Studies of the inheritance of virulence in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Inv. Pathol. 46: 20-25, 1985.
- ROBERT, A. & MESSING-AL-AIDROOS. K. "Acid production by *Metarhizium anisopliae*: Effects on virulence against mosquitoes and on detection of in vitro amylase, protease and lipase activity, J. Inv. Pathol. 45: 9-15, 1985.

- ROBINSON, R.K. "Studies on penetration of insect integument by fungi. Pest Articles and New Summaries, Sect. B. 12: 131-142, 1966.

- ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. "Production of Extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*". J. Inv. Pathol. 38: 1-3, 1981.

- ROBERTS, D.W., Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*: isolation of destruxins from submerged cultures. J. Inv. Pathol. 14: 82-88, 1969.

- ROBERTS, D.W. & HANSTER, R.A. "Entomogenous Fungi - In: Biology of conidial Fungi. vol.2 - Ed. Gary T. Cole and Bryce Kendrick 201-229, 1981.

- SANSINAKOVA, A.; MISIKOVA, S. & LEOPOLD, J. "Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on cuticle of greater wax moth larvae (*Galleria melonella*)". J. Inv. Pathol., 18: 322-330, 1971.

- SANTOS, A.L.L. Influência de alguns fatores do crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorotkin. Tese de Mestrado. Piracicaba ESALQ/USP, 148p. 1978.

- SHERLOCK, I.A. & GUITTON, N. "Observações sobre a ação do fungo *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff sobre algumas espécies de triatominae (Hemiptera: reduviidae)". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 24: 234-239, 1982.

- SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L. & BARACHO, I.R. "Conídios e produção de algumas enzimas extracelulares de *Metarhizium anisopliae* proveniente de insetos e meio de cultura". *Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol.* 3: 14-15, 1982.

- SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L. & PIEDRABUENA, A.E. "Virulência de alguns mutantes de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*". *Ciênc. Cult.* 35: 703, 1983.

- SILVA, J.C. "Virulência de mutantes exoenzimáticos de *Metarhizium anisopliae* e seus revertentes e *Rhodnius prolixus*. Campinas, UNICAMP, Tese de Doutorado. 161p. 1985.

- SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L. Virulence of mutants and revertants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48:: 368-374, 1986.

- SILVEIRA, NETO, S.; ALVES, S.B.; HADDAD, M.L. and SOSA GOMES, D.
 "Uso da análise de agrupamento na separação de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. Resumo XI Congresso Brasileiro de Entomologia, Londrina, 1984.

- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. "Obtenção de mutantes pela técnica de enriquecimento em *Metarhizium anisopliae*. Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol. 3: 14-15, 1982.

- SILVEIRA, W.D. "Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN". Tese de Mestrado. Piracicaba - ESALQ/USP, 153p. 1983.

- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. "Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by enrichment technique. "Rev. Brasil. Genet. 7: 1.8m, 1984.

- SILVEIRA, W. D. & AZEVEDO J.L. Protoplast fusion and genetic recombination in *Metarhizium anisopliae*. Enzyme Microb. Technol 9:149-152, 1987.

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

- SODERHALL, K.; SVENSSON, E. & UNESTAN T. "Chitinase and protease activities in germinating spores of *Aphanomyces astaci*, oomycetes". *Mycopathologia*. 64: 9-11, 1978.

- SOROKIN, N. Les parasites des plantes, de l'Homme et des animaux (en russe). Rasstieli nye parazyty celonekaizivot nyh Band 11: 268-290, 1983 apud : PETCH, T. Notes on entomogenous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 16:55-75, 1931.

- SOSA GOMEZ, D.R. & ALVES, S.B. "Caracterizacion de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. Estandizacion, virulência y actividad enzimática. "CIRPON REV. INVEST. 1(3): 83-102, 1983.

- STAPLES, R.C.; YODER, O.C. & HOCH, H.C. Gene "Expression During Infection Structure Development by Germlings of the rust fungus. In: *Biology and molecular biology of Plant-pathogen interactions*". Ed. Bailey - Springer-Verlag - Berlin Heidelberg, 1986.

- STEINHAUS, E.A. "Insect Pathology" Academic Press. New York 661 p., 1963.

- STIRLING, J.L.; COOK, G.A. & POPE, A.M.S. "Chitin and its degradation" in BUNARETT, J.H. & TRINCI, A.P.J. "Fungal walls hyp-
hal growth symposium of the British mycological Society hold
at Queen Elisabeth College, Cambridge Univ. Press, London.
New York, 1978.

- ST. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K. and COOPER, R.M. "Cuticle-degra-
ding enzymes of entomopathogenic Fungi: Mechanisms of Inter-
raction between pathogen enzymes and insect cuticle. J.
Inv. Pathol. 47: 245-302, 1986.

- TERRIERE, L.C. "Induction of detoxication enzymes in insects".
Ann. Rev. Entomol. 29: 71-88, 1984.

- TINLINE, R.D. & NOVIELLO, C. "Heterokaryosis in the Entomogenous
fungus, *Metarhizium anisopliae*. "Mycologia, 63:701-712, 1971.

- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium* . Trans. Br. Mycol. Soc.66:
407-411, 1976.

- TURGEON, B.C.; GARBER, R.C. & YODER, O.C. "Transformation of the
fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* using the
Aspergillus nidulans amdS gene". Molec. Gen. Genet., 201:
450-453, 1985.

- TURGEON, B.G.; MACRAE, W.D.; GARBER, R.C.; FINK, G.R. & YODER, O.C. A Cloned tryptophan-synthesis gene from the Ascomycete *Cochliobolus heterostrophus* functions in *Escherichia coli*, yeast and *Aspergillus nidulans*. *Gene* 42: 79-88, 1986.

- UNESTAN, T. "Chitinolytic, cellulolytic and pectinolytic activity in vitro of some parasitic and saprophytic comycetes. *Physiol. Plant.* 19: 15-30, 1966.

- VALADARES, M.C.C.; NAVES, M.A. & SCHMIDT, F.G.V. "Dietas com inibidor afetando a patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN em *Spodoptera frugiperda*. *Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol.* 6: 22, 1986.

- VESSEY, J.C. & PEGG, G.F. "Autolysis and chitinase production in cultures of *Verticillium albo-atrum*" *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 60: 133-143, 1973.

- VILLACORTA, A. "Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. "Resumos do III Congresso Latino Americano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia, 70p., 1978.

- VUILLEMIM, P. Les Isaria du genre *penicillium*. *Bulletin de la Société Micologique de France* 20:214-212, 1904.

- YODER, O.C. & TURGEON, B.G. "Molecular bases of fungal pathogenicity to plants. IN: Gene manipulations in Fungi". J.W. BENNETT and L.L. LASUNE. eds., Academic Press, N.Y., p. 417-443, 1985.

- ZACHARUK, R.Y. "Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. J. Inv. Pathol. 15: 63-80, 1970a.

- ZACHARUK, R.Y. "Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (coleoptera). II. Conidial germ tubes and apressoria". J. Inv. Pathol. 15: 81-91, 1970b.

- ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (coleoptera). III penetration of the host integument. J. Inv. Pathol. 15 : 372-396, 1970 c.

- ZACHARUK, R.Y. Fine structure of fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae. IV Development within the host. Canadian. Journal microbiol. 17: 525-529, 1971.

- ZYYAGINFSEVA, I.S. & MELIKHOVSKII, V.A. "Lipolytic activity of microorganisms from was coatings on plants". Institute Microbiology. Academic of Sciences of the R.R.S.S. translated from *Mikrobiologiya*, 51: 5, 1982.