

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE
LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae***

BC/31319

IB/81222

GILBERTO ÚBIDA LEITE BRAGA

Tese submetida ao Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas, na
área de Genética.

CAMPINAS

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 1997

T/UNICAMP

B731_C

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae*

GILBERTO ÚBIDA LEITE BRAGA

Tese submetida ao Instituto de
Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do título de Doutor
em Ciências Biológicas, na
área de Genética.

Este exemplar corresponde à redação final

da tese defendida pelo(a) candidato(a)

Gilberto Ubida Leite
Braga

e aprovada pela Comissão Julgadora

06/06/97 (100%)

CAMPINAS

Estado de São Paulo - Brasil

Abril - 1997

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE
LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae***

GILBERTO ÚBIDA LEITE BRAGA

Orientador: Prof. Dr. CLAUDIO LUIZ MESSIAS

CAMPINAS
Estado de São Paulo - Brasil
Abril - 1997

UNIDADE	I B
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	B731c
V.	E.
TOMBO BC/	31319
PROC.	282137
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/02/97
N.º CPD	100019089-6

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

Braga, Gilberto Úbida Leite

B731c Caracterização fisiológica e molecular de linhagens de *Metarhizium anisopliae* / Gilberto Úbida Leite Braga. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.
128f: ilus.

Orientador: Claudio Luiz Messias

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

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

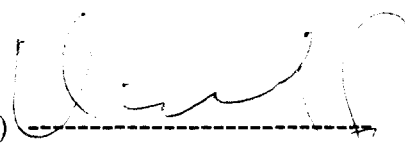
Campinas, 6 de junho de 1997

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Claudio Luiz Messias

(Orientador)



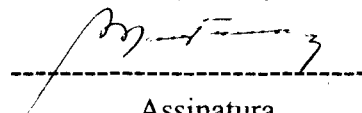
Assinatura

Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner



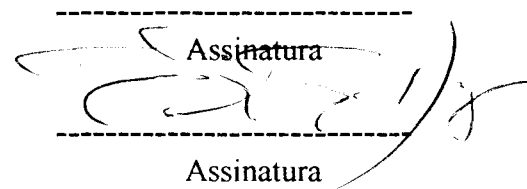
Assinatura

Prof. Dr. Roland Vencovsky



Assinatura

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo



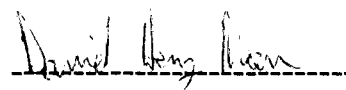
Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Guimarães Pereira

Assinatura

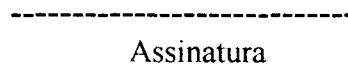
SUPLENTES:

Prof. Dr. David Henry Moon



Assinatura

Prof. Dra. Yoko Bomura Rosato



Assinatura

Aos meus pais,

Célia e Gilberto,

*e aos meus avós, pela formação moral, espiritual e cultural que têm me
dado,*

DEDICO.

*À minha querida Ana Rachel,
pelo apoio irrestrito e companhia*

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial, às seguintes pessoas e instituições:

Ao Prof. Dr. Claudio Luiz Messias (Dept. de Genética e Evolução/Unicamp), pela orientação, pelas discussões construtivas e pelo empenho em propiciar todas as condições materiais necessárias à realização deste trabalho;

Ao amigo Ricardo Henri Rodrigues Destéfano (Dept. de Genética e Evolução/Unicamp) pelos (não poucos) dias e noites despendidos na realização dos experimentos de respirometria, pelas discussões, pela leitura crítica do trabalho e pela estimulante amizade;

Ao Prof. Dr. Roland Vencovsky (Dept. de Genética/ESALQ-USP) pela valiosa orientação, pela ajuda indispensável na realização das análises biométricas e pela leitura crítica do trabalho;

Ao Prof. Dr. David Henry Moon (Laboratório de Microbiologia/CENA/USP) pela inestimável ajuda na obtenção e análise dos marcadores RAPD e pela leitura crítica do trabalho;

Aos professores do Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP, Dra. Yoko Bomura Rosato, Dr. Ivanhoé R. Baracho, Dra. Anete Pereira de Souza e Dra. Cristine Rackel, pela ajuda irrestrita, pelo incentivo e por grande parte de minha formação na área de Genética;

À Profa. Dra. Maria Lúcia Cavalieri de Araujo (Dept. de Microbiologia da Unesp de Jaboticabal) pelos valiosos conselhos, pelo incentivo constante e pela leitura do trabalho;

Ao Prof. Dr. Wanderlei Dias da Silveira (Dept. de Microbiologia da UNICAMP) pela estimulante amizade e pela leitura do trabalho;

Ao Prof. Dr. João Frederico C. A. Meyer (IMECC/Unicamp) pelo tempo despendido nos estudos visando à elaboração de modelos matemáticos de crescimento para o fungo *Metarhizium anisopliae*;

Aos amigos do Departamento, Juverlandi Lugli, Welbe, Silas e Vanessa, pelo agradável ambiente de trabalho;

Às amigas Edna e Ernestina, pelo valioso apoio técnico;

Às secretárias do Dept. de Genética e Evolução da UNICAMP, Célia, Ana Rita e Tereza, pela ajuda constante;

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Estudo;

À FINEP/PADCT.

	Página
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Marcadores moleculares de DNA	5
3.2. Dormência e germinação de esporos fúngicos	11
3.3. O crescimento de fungos filamentosos	25
3.4. Requerimentos químicos para o crescimento de fungos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. Linhagens utilizadas	45
4.2. Material e metodologia utilizada na obtenção e análise dos marcadores moleculares	46
4.2.1. Meios de cultura e soluções de rotina	46
4.2.2. Reagentes e soluções utilizadas nas extrações de DNA	47
4.2.3. Obtenção e caracterização dos marcadores RAPD	47
4.3. Estimativa de parâmetros genéticos da produção de quitinases por <i>M. anisopliae</i>	53
4.3.1. Linhagens utilizadas e obtenção dos esporos	53
4.3.2. Obtenção do filtrado para avaliação de suas atividades enzimáticas	53
4.3.3. Determinação da atividade quitinolítica dos filtrados	54
4.3.4. Planejamento experimental e análise estatístico-genética	54
4.3.5. Estimativa de parâmetros adicionais	57
4.3.6. Coeficiente de correlação de Spearman	57
4.4. Avaliação da produção de proteases durante o desenvolvimento e a autólise de culturas submersas de <i>M. anisopliae</i>	58
4.4.1. Origem e manutenção das linhagens	58
4.4.2. Obtenção dos filtrados de culturas e determinação de suas atividades enzimáticas	58
4.4.3. Determinação da atividade proteolítica contra caseína	59
4.4.4. Determinação da atividade proteolítica contra elastina	59
4.4.5. Determinação da glicose residual	60
4.4.6. Determinação da massa seca e da autólise	60
4.4.7. Eficiência do crescimento	61
4.5. Determinação do consumo de oxigênio por <i>M. anisopliae</i> durante a germinação e o crescimento	61
4.5.1. Linhagem de <i>M. anisopliae</i> utilizada e preparação do inóculo	61
4.5.2. Substratos avaliados	62
4.5.3. Avaliação do consumo de oxigênio	63
4.5.4. Obtenção dos filtrados de culturas e determinação da massa seca	64
4.5.5. Determinação da germinação	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. Marcadores moleculares	66
5.1.1. Análise do DNA de <i>M. anisopliae</i> através de RAPD	66

5.1.2. Análise dos dados de RAPD	68
5.2. Estimativa de parâmetros genéticos da produção de quitinases	70
5.2.1. Cinética da produção de quitinases	70
5.2.2. Médias e dispersão dos caracteres avaliados	71
5.2.3. Análise da variância	74
5.3. Avaliação da produção de proteases durante o desenvolvimento e a autólise de culturas submersas de <i>M. anisopliae</i>	77
5.3.1. Crescimento e autólise	77
5.3.2. Produção de proteases	82
5.4. Determinação do consumo de oxigênio por <i>M. anisopliae</i> durante a germinação e o crescimento	86
5.4.1. Correlações entre o consumo de oxigênio, o consumo de glicose e a produção de biomassa	86
5.4.2. A respiração endógena dos conídios	91
5.4.3. O metabolismo oxidativo nas diversas fontes de carbono	93
6. CONCLUSÕES	100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DE LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae*

Autor: Gilberto Úbida Leite Braga

Orientador: Prof. Dr. Claudio Luiz Messias

RESUMO

O estudo de características fisiológicas, como a germinação, a produção de exoenzimas hidrolíticas e o crescimento em substratos específicos tem ajudado no entendimento de aspectos básicos da biologia e da entomopatogenicidade do deuteromiceto *Metarhizium anisopliae*. Foram estudadas as produções de quitinases e de proteases pelo fungo, com o objetivo de se estimar parâmetros fisiológicos, como a cinética da produção destas enzimas, e genéticos, como a variabilidade, a herdabilidade e o progresso esperado no melhoramento genético. Os resultados mostraram que existe uma grande variabilidade genotípica entre as atividades quitinolíticas apresentadas pelas 16 linhagens avaliadas. Os altos coeficientes de herdabilidade indicam que um progresso significativo pode ser obtido através da seleção fenotípica clonal para a produção de quitinases. A cinética da produção de proteases foi estudada em duas linhagens. Uma das linhagens apresentou a máxima atividade proteolítica durante a fase de crescimento exponencial, enquanto a outra apresentou-a no início da fase autolítica. Em todas as condições de cultura, as duas linhagens de *M. anisopliae* apresentaram uma autólise intensa, que se iniciou logo após o esgotamento da fonte exógena de carbono. A respirometria foi utilizada para acompanhar a germinação e o crescimento em

meios contendo fontes de carbono de diversas naturezas (monossacarídeos, polissacarídeos, aminoácidos e proteínas). Pôde-se constatar que a germinação de *M. anisopliae*, como a de diversas espécies de fungos, foi marcada por um aumento significativo no consumo de O₂. O consumo exponencial da fonte de carbono e o de O₂ coincidiram com a fase de crescimento exponencial das culturas. O QO₂ atingiu seu maior valor durante a fase de crescimento exponencial, diminuindo drasticamente após o esgotamento da fonte exógena de carbono. Tomando-se a glicose como referência, observou-se que a caseína, a caseína hidrolizada e a N-acetilglicosamina aceleraram a germinação, diminuíram a duração da fase lag e aumentaram a taxa de crescimento. Este fato demonstrou que o fungo pode utilizar prontamente os monômeros dos principais constituintes da cutícula do inseto, o que representa uma adaptação fisiológica à entomopatogenicidade. A variabilidade genética na espécie também foi acessada através do uso de marcadores RAPD. Os "fingerprints" genômicos obtidos permitiram a identificação de linhagens e de variedades de *M. anisopliae*. A variação nas distâncias genéticas entre as linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* (0,0370 - 0,4839) demonstrou a existência de uma grande diversidade entre os genótipos do grupo, indo ao encontro da hipótese que considera *M. anisopliae* uma espécie críptica.

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Metarhizium anisopliae* STRAINS

Author: Gilberto Úbida leite Braga

Adviser: Prof. Dr. Claudio Luiz Messias

SUMMARY

The study of physiological characteristics such as germination, production of hydrolytic enzymes and growth on specific substrates has led to a better understanding of the basic aspects of the biology and entomopathogenicity of the deuteromycete *M. anisopliae*. Chitinase and protease production by the fungus was studied in order to estimate physiological parameters such as the kinetics of the production of these enzymes and genetic parameters such as variability, heritability and expected progress through genetic improvement. The results showed that there is wide genotypic variability in the chitinolytic activities of the strains. The high heritability estimates indicate that great progress can be expected in clonal phenotypic selection for chitinase production. The kinetics of the protease production of two strains was studied. One of the strains showed the highest protease production during the exponential growth phase and the other showed its peak at the beginning of the autolytic phase. Under all culture conditions, the *M. anisopliae* strains presented intense autolysis which started soon after the depletion of the exogenous carbon source. Respirometry was used to monitor germination and growth in media containing carbon sources of different origins (monosaccharides, polysaccharides, amino acids and proteins). The germination of *M. anisopliae*, as that of various species of fungi,

was marked by a significant increase in O₂ consumption. The exponential consumption of the carbon source and of O₂ coincided with the phase of exponential growth in culture. QO₂ reached its highest value during the exponential growth phase and was drastically reduced after the depletion of the exogenous carbon source. Taking glucose as reference, casein, hydrolyzed casein and N-acetylglucosamine were found to accelerate germination, to decrease the duration of the lag phase and to increase the growth rate. This demonstrates that the fungus can readily utilize the monomers of the major constituents of the insect's cuticle, a fact representing a physiological adaptation to entomopathogenicity. The genetic variability of the species was also estimated using RAPD markers. The genomic fingerprints obtained permitted the identification of *M. anisopliae* strains and varieties. The variation in the genetic distance between *M. anisopliae* var. *anisopliae* strains (0.0370 - 0.4839) demonstrated the existence of great diversity among the genotypes in the group, supporting the hypothesis that *M. anisopliae* is a cryptic species.

1 - INTRODUÇÃO

É de extremo interesse a utilização de um sistema preciso de identificação individual em programas de melhoramento genético de microrganismos. Isso permite que os organismos envolvidos sejam sistematicamente monitorados, principalmente em ensaios que envolvem suas liberações no meio ambiente. Diversos trabalhos têm destacado a importância desse acompanhamento ser realizado através do uso de marcadores genéticos confiáveis, particularmente no caso de microrganismos que são melhorados geneticamente com a finalidade de atuarem como agentes controladores de insetos-praga (Michelmore & Hulbert, 1987; Bidochka *et alii*, 1994; Tigano-Milani *et alii*, 1995).

A identificação rápida e precisa de isolados do deuteromiceto entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, usado no controle de insetos-praga e de vetores de doenças, teria, portanto, uma série de aplicações dentro de um programa de melhoramento genético que, muitas vezes, possui etapas que são realizadas em ensaios de campo. Nesses casos, um sistema que permita a distinção entre os isolados ensaiados e a discriminação desses isolados de linhagens pertencentes à população autóctone tornaria mais fácil e segura a condução do experimento. Os benefícios da caracterização precisa também podem ser estendidos a estudos de persistência ambiental, de dinâmica de populações, de competição de linhagens, ou mesmo à verificação periódica da estabilidade genética ou da presença de contaminantes em linhagens mantidas em laboratórios ou bancos de germoplasmas, por longo período de tempo (ver Kohn, 1992 e Foster *et alii*, 1993 para uma revisão específica).

Os processos utilizados na identificação de microrganismos vêm sendo continuamente aperfeiçoados. Até o início da década de 80, baseavam-se quase que exclusivamente em características fenotípicas, muitas vezes de natureza multifatorial, como, por exemplo, em aspectos morfológicos, produção de enzimas, resistência a drogas, requerimentos nutricionais e composição bioquímica (Messias *et alii*, 1983; Sosa Gómez & Alves, 1983; Adaskaveg *et alii*, 1988; St. Leger *et alii*, 1992a,b). Entretanto, sendo o meio ambiente o responsável por uma fração da variabilidade fenotípica, tais metodologias podem ter sua confiabilidade afetada.

No início da década de 80, com o surgimento dos marcadores genéticos baseados em análise direta do DNA, como o "RFLP", minimizou-se o efeito ambiental inerente ao uso de caracteres fenotípicos. No entanto, a obtenção de marcadores de "RFLP" ainda apresenta dificuldades que limitam a sua utilização, dentre as quais podem-se destacar a complexidade metodológica e a necessidade de conhecimento prévio das seqüências analisadas (ao menos em alguns casos). Isso torna difícil e onerosa a obtenção de um grande número de marcadores, dificultando a construção de mapas genéticos suficientemente densos. (Williams *et alii*, 1990; Caetano-Anollés *et alii*, 1991; Waugh & Powell, 1992).

No início dos anos 90, um novo grupo de marcadores moleculares baseados na tecnologia do PCR, denominado RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), permitiu que a obtenção de marcadores de DNA se tornasse um processo relativamente simples e rápido. (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et alii*, 1990). Atualmente, os marcadores de RAPD têm sido utilizados na identificação de genótipos (Welsh & McClelland, 1990; Caetano-Anollés *et alii*, 1991; Bidochka *et alii*, 1994), na construção de mapas genéticos (Williams *et alii*, 1990; Williams *et alii*, 1993; Reiter *et alii*, 1992),

como auxiliar em programas de melhoramento genético de diversas espécies (Martin *et alii*, 1991; Paran *et alii*, 1991; Waugh & Powell, 1992; Tigano-Milani *et alii*, 1995), em estudos de genética de populações (Megnegneau *et alii*, 1993; Crowhurst *et alii*, 1991; Strongman & Mackay, 1993; Ducan *et alii*, 1993) e no estabelecimento de relações filogenéticas (Fegan *et alii*, 1993; Tigano-Milani *et alii*, 1995).

Apesar da crescente utilização, as análises baseadas exclusivamente em marcadores RAPD para a obtenção de "fingerprints" e para o estabelecimento de relações filogenéticas vêm tendo sua validade questionada (Hadrys *et alii*, 1992). A complexidade do genoma eucariótico, problemas associados à repetibilidade e à interpretação dos resultados, somados à própria casualidade intrínseca à técnica, têm sido colocados como pontos que poderão, no futuro, limitar a utilização desse tipo de marcador genético (Davin-Regli *et alii*, 1995). Por outro lado, trabalhos recentes têm obtido sucesso na caracterização de isolados de *M. anisopliae* e na determinação de relações filogenéticas no gênero através da utilização de parâmetros associados à germinação, à produção de enzimas e à capacidade de crescimento em condições específicas (Yip *et alii*, 1992; Rath *et alii*, 1995).

O estudo sistemático de algumas características fisiológicas de interesse em fungos entomopatogênicos como a germinação, a produção de enzimas hidrolíticas envolvidas na penetração e/ou no estabelecimento do vínculo nutricional entre o patógeno e o hospedeiro, e o desenvolvimento em substratos específicos, além de poder ser utilizado como subsídio para a caracterização de linhagens, tem servido para o melhor entendimento de aspectos básicos da biologia do fungo e de suas relações com os insetos hospedeiros.

2 - OBJETIVOS

Através do estudo da produção de exoenzimas hidrolíticas, como proteases e quitinases, de análises respirométricas e da utilização de marcadores RAPD, este trabalho teve por objetivos :

- 1º - A identificação, ao nível de DNA de linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e de *Metarhizium anisopliae* var. *majus*;
- 2º - O estabelecimento das relações filogenéticas entre os isolados analisados;
- 3º - A obtenção e caracterização de um número expressivo de marcadores genéticos para as linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e de *M. anisopliae* var. *majus*;
- 4º - A estimativa de parâmetros genéticos associados à produção de quitinases por *M. anisopliae*;
- 5º - O estudo da cinética da produção de proteases por culturas de *M. anisopliae* durante o crescimento e a autólise;
- 6º - A estimativa de parâmetros fisiológicos (particularmente o consumo de oxigênio) associados à germinação e ao crescimento em diversos substratos orgânicos como glicose, N-acetilglicosamina, caseína, caseína hidrolizada, gelatina, elastina, quitina, D e L-prolina, L-cistina, DL-serina, L-tirosina, L-alanina e L-ácido glutâmico.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - Marcadores moleculares de DNA

Desde que foi descrita, a tecnologia da Reação de Polimerase em Cadeia ("PCR") (Saiki *et alii*, 1985; Mullis *et alii*, 1986; Mullis & Faloona, 1987) provocou uma revolução em diversas áreas da biologia. Milhares de trabalhos que se utilizaram da PCR, diretamente ou de tecnologias dela derivadas, têm sido publicados desde a sua descrição. Estes trabalhos têm permitido avanços significativos tanto em áreas básicas, como aquelas que buscam o entendimento de processos biológicos fundamentais, como em áreas aplicadas, dentre as quais a identificação de genótipos, o diagnóstico de doenças, estudos filogenéticos e melhoramento genético de plantas, animais e microrganismos (Anderson & Stasovski, 1992; Ouellet & Seifert, 1993). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR tornaram-na uma poderosa ferramenta em estudos genéticos que envolvem um grande número de organismos vivos (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A PCR consiste na síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA através da ação de uma DNA polimerase termoestável em reações cíclicas de amplificação. A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores ("primers") que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla que será amplificada. Um ciclo de PCR envolve 3 etapas: denaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é denaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95° C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60° C, dependendo do tamanho e seqüência do

primer utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada primer, com as seqüências complementares que flanqueiam a região-alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72° C, para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos primers. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, após 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de cópias da seqüência-alvo. (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A simplicidade da PCR fez com que, pouco tempo após sua descrição, diversos pesquisadores estivessem aptos a introduzir modificações no princípio original, de maneira a expandir consideravelmente a aplicação da metodologia (Foster *et alii*, 1993). Uma das áreas que foi especialmente beneficiada pela PCR foi a de marcadores moleculares. O grande avanço nesta área ocorreu no início da década de 90, com a publicação praticamente simultânea de dois trabalhos que utilizaram "primers" curtos e de seqüências arbitrárias para dirigir a reação de amplificação. Welsh & McClelland (1990) realizaram a PCR com "primers" de seqüências arbitrárias para obter "fingerprintings" genômicos. No trabalho foram gerados "fingerprints" simples e reproduzíveis de genomas de 24 linhagens pertencentes a cinco espécies de *Staphylococcus*, onze linhagens de *Streptococcus pyogenes* e três variedades de *Oryza sativa*. Os autores demonstraram que as linhagens podiam ser distinguidas através da comparação do polimorfismo nos "fingerprints" genômicos. A técnica foi denominada de AP-PCR ("Arbitrarily primed PCR"). Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida e visualizados através de autoradiografia. Williams *et alii* (1990) descreveram um tipo de marcador

genético denominado RAPD ("Random Amplified Polymorphyc DNA"). Estes marcadores são gerados pela amplificação de segmentos anônimos de DNA por "primers" únicos, com uma seqüência arbitrária de nucleotídeos. Esta metodologia não utiliza elementos radiativos, requer apenas nanogramas de DNA molde, separa os fragmentos amplificados em gel de agarose e pode ser aplicada a um grande número de espécies. Para se obter marcadores RAPD, um único oligonucleotídeo, com uma seqüência arbitrária de DNA, é misturado com o DNA genômico na presença de uma DNA polimerase termoestável e um tampão apropriado. A seguir, a mistura é submetida a condições cíclicas de temperatura típicas da PCR. Os produtos da reação dependem tanto da seqüência e do comprimento do oligonucleotídeo como das condições da reação. Na temperatura apropriada para o anelamento, durante o ciclo térmico, os "primers" ligam-se a sítios nas fitas opostas do DNA genômico, localizados, um do outro, a uma distância capaz de ser amplificada (poucos milhares de nucleotídeos) e um discreto segmento de DNA é produzido. A presença ou ausência deste produto específico, embora amplificado com um "primer" arbitrário, irá ser o diagnóstico da presença de sítios de ligação para o oligonucleotídeo no DNA genômico. Na prática, a reação de amplificação do DNA é repetida com diversos "primers" diferentes. O resultado são diversas bandas amplificadas por cada "primer". Às vezes, um único "primer" pode ser utilizado para identificar diversos polimorfismos, cada um mapeando um locus diferente (Willians *et alii*, 1993).

Independentemente do nome utilizado e das pequenas variações metodológicas, a realização da PCR, com "primers" de seqüência arbitrária abriu uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e de populações. Diversos trabalhos realizados com fungos filamentosos têm utilizado estes marcadores genéticos para estudos de mapeamento, taxonomia,

"fingerprints" genômicos de indivíduos, linhagens e populações e estabelecimento de relações filogenéticas.

Crowhurst *et alii* (1991) utilizaram marcadores RAPD para acessar a variabilidade genômica entre 21 isolados de duas raças de *Fusarium solani*. Baseados nos padrões de RAPD, os isolados foram divididos em duas "mating populations". Quatro isolados, que não podiam ser caracterizados até então por metodologias tradicionais, foram perfeitamente separados pelo RAPD. No mesmo trabalho, os autores usaram 7 produtos polimórficos de RAPD como probes em Southern blots de DNA genômico das duas populações. Os resultados mostraram que, além do RAPD ter sido uma ferramenta para a determinação do "mating type" de fungos, também facilitou muito a obtenção de probes espécie ou raça específicos. Goodwin & Annis (1991) foram capazes de separar isolados virulentos e avirulentos do fungo *Leptosphaeria maculans* usando RAPD. Guthrie *et alii*, 1992 utilizaram o RAPD para estudar a natureza e a extensão da variabilidade genética em *Colletotrichum graminicola* (agente causal da antracnose em sorgo). O estudo também permitiu a identificação individual de isolados. Ouellet & Seifert (1993) caracterizaram linhagens de *Fusarium graminearum* usando RAPD. Foi verificado que os padrões de amplificações obtidos eram específicos para *F. graminearum*, não ocorrendo em outras espécies de *Fusarium*. Linhagens de *F. graminearum*, provenientes de um mesmo local, geralmente apresentavam o mesmo padrão de amplificação, possuindo, portanto, o mesmo genótipo. Entretanto, também foram encontradas linhagens com a mesma origem geográfica, apresentando diferentes padrões de amplificação. No trabalho, não foi possível agrupar as linhagens de acordo com o hospedeiro ou com a origem geográfica. MacCutcheon *et alii* (1993) estudaram a diversidade genotípica em populações naturais do fungo endofítico *Rhizoctonia parkeri* usando RAPD. Duncan *et*

alii (1993) analisaram a variação genética em isolados australianos de *Rhizoctonia solani*. Foram utilizados isolados de diferentes regiões geográficas e pertencentes a diferentes grupos de anastomose e pécnicos. Todos os grupos testados puderam ser distinguidos. Foi encontrada uma variação considerável entre os "fingerprints" dos isolados pertencentes ao mesmo grupo. Esta variação foi mais marcante entre isolados com diferentes origens geográficas. Grajal-Martín *et alii* (1993) avaliaram a variabilidade genética em *Fusarium oxysporium* através do uso do RAPD. Muitos "primers" utilizados foram capazes de distinguir claramente os isolados pertencentes a diferentes raças. Manulis *et alii* (1993) usaram o RAPD para distinguir isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium oxysporum*. Yoon & Glawe (1993) associaram marcadores RAPD com o "stromatal type" em *Hypoxylon truncatum*. Este trabalho abriu a perspectiva da seleção indireta para características fisiológicas ou morfológicas em fungos através dos marcadores RAPD. Meijer *et alii* (1994) testaram três classes de marcadores genéticos (isoenzimas, compatibilidade vegetativa e RAPD) para verificar suas capacidades de revelar polimorfismo entre isolados originados de 27 regiões da Nova Zelândia e de sete países da Europa. Enquanto o estudo de enzimas não foi capaz de detectar qualquer variação no fungo, os testes de VC e de RAPDs revelaram uma variação substancial. Esses resultados confirmaram a adequação do RAPD para a identificação de isolados em populações onde a variabilidade genética é restrita. Megnegneau *et alii* (1993) aplicaram quatro técnicas (isoenzimas, cariótipo eletroforético, RFLP e análise de RAPD) para acessar a extensão da variabilidade genética existente entre e dentro de diversas coleções de culturas de *Aspergillus*. A "performance" do RAPD, segundo os autores, foi comparável à obtida com RFLP e com isoenzimas, além de possuir diversas vantagens metodológicas. Smith & Stanosz (1995) confirmaram a existência de

duas populações distintas do fungo *Sphaeropsis sapinea* (patógeno de *Cedrus*) na região centro-norte dos Estados Unidos, confirmando a suposição pré-existente, que se baseava em diferenças morfológicas. Voigt *et alii* (1995) estudaram a variabilidade genética em *Giberella fujikuroi* através do RAPD.

Diversos estudos utilizando marcadores RAPD têm sido realizados com fungos entomopatogênicos, incluindo os do gênero *Metarhizium*. Strongman & MacKay (1993) conseguiram a discriminação entre isolados de *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* e *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* usando RAPD. Fegan *et alii* (1993) examinaram a diversidade genética em linhagens de *M. anisopliae* isoladas de diversos insetos hospedeiros e provenientes de diversas regiões da Austrália através do RAPD. Trinta isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e um isolado de *M. anisopliae* var. *majus* foram examinados. Seis dos isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* exibiram maior similaridade com o isolado de *M. anisopliae* var. *majus* do que com as outras linhagens *anisopliae* testadas. Esse resultado reafirma a existência de grande diversidade genética dentro do grupo *anisopliae* já detectada em trabalhos anteriores. Os isolados exibindo similaridade nos padrões de amplificação (>80% de similaridade) tenderam a apresentar a mesma origem geográfica, evidenciando a persistência de um genótipo particular do fungo em uma região geográfica específica. Bidochka *et alii* (1994) utilizaram RAPD para acessar a variabilidade genômica entre 24 isolados de *M. anisopliae*, *M. flavoviride* e linhagens não identificadas de *Metarhizium* e *Beauveria bassiana*. *M. flavoviride* mostrou uma pequena variabilidade intraespecífica quando comparado com *M. anisopliae*. O alto grau de variabilidade nos padrões de amplificação encontrado dentro do grupo *M. anisopliae* foi similar à variabilidade total entre *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *M. flavoviride*, sugerindo que *M. anisopliae* pode incluir um grupo de espécies crípticas. Os marcadores

RAPDs mostraram pouca evidência da ocorrência de uma seleção para insetos hospedeiros. A origem geográfica também não foi critério para a semelhança nos padrões de RAPD. Tigano-Milani *et alii* (1995) estudaram a variabilidade genética entre isolados brasileiros de *M. anisopliae* através da utilização do RAPD. Foi possível a separação das linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus* e *M. flavoviride* em grupos fenéticos diferentes. Os genótipos, de maneira geral, mostraram-se mais relacionados às espécies hospedeiras do que com a origem geográfica.

3.2 - Dormência e germinação de esporos fúngicos

O estudo do processo germinativo de esporos fúngicos é importante tanto por razões básicas como práticas. Do ponto de vista básico, os estudos sobre a dormência e a germinação podem agregar novos conhecimentos a processos fundamentais, como a regulação do desenvolvimento celular. Do ponto de vista prático, a maioria dos fungos causadores de doenças em plantas ou animais é disseminada por esporos e o ciclo da doença inicia-se com a germinação dos mesmos. (Van Etten *et alii*, 1983). Os deuteromicetos entomopatogênicos infectam insetos através de conídios (esporos) que entram passivamente em contato com os insetos, com a ajuda de agentes, como o vento e a água (St. Leger, 1993a). Os esporos de fungos são estruturas unicelulares que não estão crescendo e servem não só para dispersão como para a sobrevivência em condições extremas (Griffin, 1994a).

A germinação dos esporos é um processo morfollogicamente simples, no qual células que não estão crescendo e que são metabolicamente quiescentes respondem a mudanças nas condições ambientais, reativando processos

fisiológicos e funções genéticas para rapidamente produzir células em crescimento (Van Etten *et alii*, 1983). Em muitos casos, os esporos não são capazes de germinar imediatamente após a sua produção ou até que determinadas condições sejam satisfeitas, permanecendo em estado de dormência. Sussman & Douthit (1973) definiram dormência como sendo qualquer período de repouso ou interrupção reversível do desenvolvimento fenotípico de um organismo. Os mesmos autores classificaram a dormência em três tipos: constitutiva, exógena ou indutiva. A dormência constitutiva foi definida como sendo uma condição onde o desenvolvimento é retardado devido a uma propriedade inata do esporo dormente. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a dormência constitutiva em esporos de fungos: a existência de barreiras de permeabilidade, a inibição da síntese *de novo* de enzimas ou mudanças conformacionais em enzimas preexistentes, a separação espacial de substratos e enzimas por compartimentalização e a produção de auto-inibidores de germinação (Van Etten *et alii*, 1983). Na dormência exógena, o desenvolvimento é retardado devido a condições químicas ou físicas desfavoráveis ao ambiente. A dormência induzida é aquela onde esporos não dormentes ou com dormência exógena são transformados em constitutivamente dormentes. A dormência exógena pode ser mantida tanto pela falta de um nutriente requerido para a germinação como por propriedades inibitórias do substrato (Griffin, 1994a). Alguns trabalhos têm mostrado que a dormência apresentada por conídios de *M. anisopliae* é do tipo exógena (Dillon & Charnley, 1985; Hassan *et alii*, 1989; Dillon & Charnley, 1990; St. Leger *et alii*, 1994). Dillon & Charnley (1985; 1990) verificaram que conídios de *M. anisopliae* não apresentavam crescimento esférico e formação de tubo germinativo em água destilada, necessitando de uma fonte exógena de nutrientes para iniciar a germinação. A ausência de germinação em água é uma

característica comum a muitos esporos fúngicos, incluindo outros entomopatógenos como *Nomuraea rileyi* (El-Sayed *et alii*, 1993c) e *Beauveria bassiana* (Smith & Grula, 1981; Woods & Grula, 1984). Entretanto, a necessidade de uma fonte exógena de substratos pode ou não se manifestar entre os conídios de uma mesma linhagem. Marchant & White (1966) verificaram que esporos de *Fusarium calmonum* apresentaram cerca de 14% de germinação em água destilada. Os valores máximos de germinação foram conseguidos somente na presença de fontes exógenas de carbono e de nitrogênio

Van Etten (1983) enfatizou o fato de que a adição de um nutriente específico tanto pode reparar um bloqueio metabólico de um esporo com dormência constitutiva como servir de substrato para um esporo com dormência exógena. Sendo assim, o fato de um nutriente induzir a germinação não serviria, por si só, para classificar o tipo de dormência de um esporo.

A possível presença de inibidores no substrato natural de fungos tem sido investigada, principalmente em casos que envolvem o efeito fungistático de solos. A atividade de microrganismos no solo pode ser relacionada à fungistasia tanto pela competição por nutrientes como pela produção de substâncias inibitórias. Walstad *et alii* (1970) verificaram que esporos de *B. bassiana* e de *M. anisopliae* não germinaram sobre solo não esterilizado, permanecendo viáveis, entretanto, por até um mês. Como o efeito inibitório desapareceu após a autoclavagem do substrato, a inibição foi aparentemente causada pela presença de outros microrganismos, não tendo sido determinada a sua causa exata. Materiais de origem vegetal que são substratos para a maioria dos fungos, tanto patógenos como saprófitas, também podem conter substâncias inibitórias ao crescimento fúngico, muitas das quais fenólicas e semelhantes a alguns auto-inibidores produzidos por esporos fúngicos. St.

Leger *et alii* (1991b) verificaram a incapacidade de *M. anisopliae* germinar sobre a cutícula vegetal.

Os esporos dormentes apresentam uma série de características ultra-estruturais químicas e fisiológicas que os diferenciam das células vegetativas. Dute *et alii* (1989), ao observarem as características ultra-estruturais de esporos dormentes e germinantes de *Aspergillus ochraceus*, verificaram a presença de um número reduzido de mitocôndrias e de grandes reservas de lipídios localizadas em vácuolos membranosos que não mais estavam presentes no momento da emergência do tubo germinativo. Outras características ultra-estruturais têm sido comumente associadas a esporos dormentes, como por exemplo a presença, na maioria dos casos, de uma parede celular mais espessa do que a presente em células vegetativas e uma escassez de retículo endoplasmático. A presença de vacúolos membranosos dentro dos esporos contendo fosfolipídios, polissacarídeos como o glicogênio ou outros materiais de reserva dentro é característica de muitos fungos. Provavelmente, embora com diferenças qualitativas e quantitativas, todos os esporos dormentes contêm carboidratos ou lipídios, presumidamente como reserva de energia para ser usada durante a germinação e os estágios iniciais de desenvolvimento. O dissacarídeo trealose é freqüentemente encontrado em esporos dormentes e, em alguns casos, pode representar até 30% do peso seco (Van Etten, 1983; Thevelein, 1984). Alguns esporos possuem uma grande quantidade de aminoácidos livres em seus citoplasmas. Geralmente, os esporos dormentes têm um conteúdo de água reduzido quando comparado ao de células vegetativas (Sussman & Douthit, 1973; Van Etten *et alii*, 1983).

Talvez a característica fisiológica mais marcante dos esporos dormentes, em comparação com as células vegetativas, seja o baixo consumo de oxigênio (Cochrane *et alii*, 1963). Geralmente, essa redução no consumo de oxigênio

não se deve a uma deficiência das enzimas respiratórias ou de outros componentes da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias. Alguns trabalhos têm associado a inatividade temporária das enzimas envolvidas na respiração ao alto grau de desidratação dos esporos dormentes (Martín & Nicolás, 1970).

A germinação foi definida por Sussman & Douthit (1973) como sendo o primeiro estágio irreversível que é reconhecidamente diferente do organismo dormente através de investigações morfológicas, citológicas, fisiológicas ou bioquímicas. Segundo Griffin (1994a), apesar de a germinação ser definida de acordo com a irreversibilidade dos eventos, poucos trabalhos teriam testado esse aspecto do processo. As técnicas bioquímicas, cada vez mais sensíveis, têm sido capazes de detectar alterações em processos bioquímicos que ocorrem alguns minutos após a colocação dos esporos em condições de germinação (Smith & Grula, 1981; St Leger *et alii*, 1989a; Dillon & Charnley, 1990; St Leger *et alii*, 1994). Se a definição de germinação colocada anteriormente fosse estritamente seguida, em alguns casos os esporos poderiam ser considerados germinados horas, ou até mesmo dias antes do aparecimento do tubo germinativo.

A germinação de esporos dormentes da maioria dos fungos é caracterizada pelo rápido aumento da atividade metabólica, incluindo um agudo aumento na respiração aeróbica (Goddard & Smith, 1938; Emerson, 1954; Mandels *et alii*, 1956). Mandels *et alii* (1956) observaram as mudanças na atividade respiratória durante a germinação de esporos de *Myrothecium verrucaria*. Foi verificado que a taxa respiratória aumentou linearmente com o tempo durante o crescimento esférico, a protusão do tubo germinativo e os primeiros estágios do crescimento vegetativo. Os autores não observaram nenhuma "quebra" na curva que pudesse coincidir com a emergência do tubo

germinativo. A taxa respiratória nessa fase do desenvolvimento foi expressa pela seguinte equação:

$$R = dy/dt = kt + b$$

sendo R a taxa respiratória, y o consumo de oxigênio, t o tempo, K a inclinação da reta e b o intercepto. As constantes b e k têm uma significância fisiológica definida. K , a aceleração no consumo de oxigênio, deve ser diretamente proporcional à quantidade de esporos e, quando isso ocorrer, deve ser uma medida de suas atividades fisiológicas ou capacidades metabólicas. O intercepto b também é proporcional à quantidade de esporos e deve representar a taxa de respiração no tempo zero, nas condições experimentais.

Hill *et alii* (1992) verificaram que ocorre uma aceleração na respiração sensível à cianina cinco minutos após a ativação dos ascósporos de *Neurospora tetrasperma*, seguida de um segundo aumento mais acentuado no consumo de oxigênio depois de 90 minutos. Aos 90 minutos, os ascósporos desenvolvem bolhas germinativas, das quais emergem os tubos germinativos. No mesmo trabalho, os autores verificaram que a presença de cianina no meio inibe todo o consumo de oxigênio e bloqueia a emergência do tubo germinativo, demonstrando que oxidases alternativas não contribuem para a respiração inicial. O consumo de oxigênio, durante a primeira fase, foi insensível aos inibidores de síntese proteica cicloeximida e clorofenicol (inibidores citoplasmático e mitocondrial, respectivamente). Após 90 minutos, esses inibidores reduziram tanto a respiração como a emergência do tubo germinativo, sugerindo que a síntese de proteínas citoplasmáticas e mitocondriais é necessária apenas para a ocorrência da segunda etapa da germinação. Martín & Nicolás (1970) verificaram que a azida sódica (um inibidor específico da respiração e da fosforilação oxidativa) inibiu o

crescimento esférico e a germinação em *Trichoderma lignorum* e em *Penicillium notatum*, o que , segundo os autores, demonstra claramente que a germinação em fungos é um processo que requer energia. Também foi verificado que a síntese ativa de proteínas é necessária para a germinação.

Pela praticidade analítica, a maior parte dos experimentos que quantificam a germinação baseia-se em aspectos morfológicos, ou seja, os esporos têm sido considerados germinados quando apresentam um tubo germinativo visível (St. Leger *et alii*, 1989a; Dillon & Charnley, 1990; McCammon & Rath, 1994; St Leger *et alii*, 1994).

Em termos morfológicos, a germinação de diversos fungos, inclusive *M. anisopliae*, normalmente se inicia com o crescimento esférico dos esporos que, na maioria dos casos, envolve o consumo de água do ambiente. Ekundayo & Carlile (1964) encontraram evidências de que o consumo de água pelos esporos germinantes de *Rhizopus arrhizus* é um processo ativo, requerendo energia. É comum, durante essa etapa, a ocorrência de um grande aumento no tamanho do esporo. Dute *et alii* (1989) verificaram que, durante essa fase, os conídios de *Aspergillus ochraceus* apresentaram um aumento de 1,5 vez em relação aos seus diâmetros originais. Posteriormente ao crescimento esférico, ocorre, em muitos casos, a emissão de um tubo germinativo. A formação do tubo germinativo não é somente um processo de rearranjo do material pré-existente, requerendo também a síntese *de novo* de muitos componentes celulares como proteínas, RNA, polissacarídeos e lipídios, usados na síntese e montagem da parede celular, membranas e organelas (Van Etten *et alii*, 1983). Como a síntese desses novos compostos requer energia, torna-se essencial aos esporos germinantes desenvolver rapidamente um mecanismo de geração da energia necessária. Muitos esporos germinam apenas em água. Nesses casos, é obvio que as reservas energéticas e nutricionais dos conídios são suficientes para

suportar o processo, ao menos em seus estágios iniciais (Jahnke & Chapman, 1975). Esporos de muitas espécies, entretanto, só irão germinar quando providos de uma fonte de carbono e/ou nitrogênio ou sais e/ou vitaminas apropriados. Os nutrientes necessários para a germinação variam consideravelmente. Muitos esporos de fungos que são parasitas obrigatórios, como os urediósporos de fungos causadores de ferrugem, requerem apenas oxigênio e água. A maioria dos fungos saprófitas requer substâncias adicionais além do oxigênio e da água. Entretanto, a água parece ser o único requerimento universal para esse grupo. O dióxido de carbono tem sido demonstrado como sendo um requerimento para a germinação de muitos fungos, particularmente para os aeróbicos facultativos (Held, 1970). Sais inorgânicos, nutrientes orgânicos como uma fonte de carbono, aminoácidos específicos ou vitaminas são materiais adicionais necessários à germinação de diversos fungos. Muitas vezes, os requisitos nutricionais necessários à germinação podem variar em função de outras variáveis ambientais. Martínez-Cadena *et alii* (1995) verificaram que conídios de *Phycomyces blakesleeanus* são capazes de germinar em muitas fontes diferentes de carbono em meios ácidos; porém, próximo de um pH neutro, a glicose é requerida para a germinação. Segundo os autores, a germinação no fungo parece ser influenciada por uma complexa interação entre o método de ativação (o fungo possui dormência constitutiva), a fonte de carbono e o pH do meio. Embora a maioria dos trabalhos tenha verificado que a germinação e o desenvolvimento inicial sejam acelerados pelo aumento na concentração de nutrientes disponíveis no meio, esse não é um fenômeno universal. Daniels & Graham (1976) verificaram que a germinação de esporos do fungo fitopatígeno *Glomus mosseae* é fortemente inibida pelos níveis de nutrientes existentes em meios de cultura convencionais.

Muitos trabalhos realizados *in vitro*, com a utilização de meios semi-sintéticos ou sintéticos de constituição definida, têm servido para revelar novos dados a respeito das necessidades específicas de diversas espécies de fungos entomopatogênicos durante o processo de germinação. Smith & Grula (1981a) realizaram um extenso trabalho sobre os requerimentos nutricionais para a germinação de conídios de *B. bassiana*. No trabalho, verificou-se que, para a ocorrência da germinação, foi necessária a presença de uma fonte de carbono utilizável; entretanto, a presença de uma fonte de nitrogênio foi essencial para a continuidade do crescimento hifal. Os compostos capazes de serem utilizados como fonte de carbono/energia durante a germinação incluíram glicose, N-acetilglicosamina, glicosamina, quitina, amido, lanolina, e ácidos graxos de cadeia longa. Tanto fontes inorgânicas como orgânicas de nitrogênio foram prontamente utilizadas. No mesmo trabalho, foi testada a capacidade dos diversos aminoácidos servirem como fonte de carbono, nitrogênio e energia. Foi constatado que nenhum aminoácido sozinho ou em combinação com outro aminoácido possibilitou uma germinação ou crescimento satisfatório, embora alguma germinação tenha sido observada em alanina, histidina e fenilalanina. Ácidos graxos de cadeias curtas inibiram a germinação no fungo, enquanto ácidos graxos de cadeias longas suportaram a germinação, mas não o crescimento. El-Sayed *et alii* (1993c), trabalhando com *N. rileyi*, observaram que o aumento da concentração de extrato de levedura, sozinho ou na presença de cutícula, no meio de cultura, aumentou a porcentagem de conídios germinados. St. Leger *et alii* (1988) testaram a capacidade de *M. anisopliae* e *N. rileyi* de utilizarem alcanos (a classe de lipídios mais comum na epicutícula de insetos) como única fonte de carbono. Pôde-se constatar que tanto *M. anisopliae* como *N. rileyi* cresceram, após uma fase lag que variou de 2 a 24 dias, em meios contendo n-alcanos ($C > 8$) como única fonte de carbono. Os

resultados desse trabalho chamam a atenção pela duração excessiva da fase adaptativa, mostrando a dificuldade que os organismos têm em utilizar prontamente esse grupo de substâncias, ao menos nas condições do experimento. St. Leger *et alii* (1994) verificaram que linhagens de *M. anisopliae* isoladas de homópteros eram capazes de germinar e produzir apressório em meio contendo glicose, enquanto linhagens isoladas de coleópteros apresentavam baixa germinação e não eram capazes de produzir apressório na presença de glicose. Deve-se destacar que não é raro a presença de secreções ricas em açúcares sobre a cutícula de homópteros. Essas observações vão ao encontro da hipótese de que os mecanismos de reconhecimento do hospedeiro estão ligados aos níveis de nutrientes existentes sobre a cutícula dos hospedeiros apropriados. Como outros entomopatógenos, *M. anisopliae* apresenta pouca exigência quanto à natureza da fonte de carbono necessária à germinação, sendo capaz de germinar em uma variedade muito grande de substratos (St Leger *et alii*, 1989a; St. Leger *et alii*, 1994). Entretanto, a germinação só ocorreu a partir de uma concentração mínima de substrato no meio (St. Leger *et alii*, 1989a). Alguns trabalhos têm testado a capacidade de linhagens de *M. anisopliae* de germinar utilizando aminoácidos como única fonte de carbono. St Leger *et alii* (1989a) e St. Leger *et alii* (1994) verificaram que linhagens de *M. anisopliae* foram capazes de germinar em alanina, glutamato, tirosina e em leucina em concentrações que variavam entre 0,05 e 0,5% (p/v). Embora as exigências nutricionais para a germinação sejam pequenas em *M. anisopliae*, a produção de apressório *in vitro* requereu o contato do tubo germinativo com uma superfície dura, preferencialmente hidrofóbica, e foi induzida por uma baixa concentração de substâncias nitrogenadas complexas no meio. A análise da germinação e da diferenciação em meios com diferentes constituições sugere que os aminoácidos e os lipídios

componentes da epicutícula agem em combinação com a superfície hidrofóbica da cutícula para estimularem a diferenciação durante a patogênese.

A germinação em *M. anisopliae* também é afetada por fatores físicos, como a umidade relativa e a temperatura (Walstad *et alii*, 1970; MacCammon & Rath, 1994).

No caso particular de fungos entomopatogênicos, os mesmos devem estar adaptados a dois tipos de situações muito diferentes: tanto devem ser capazes de utilizar diversos tipos de substratos orgânicos como fonte de energia e de nutrientes durante a vida saprofítica, como de estabelecerem ligação e germinarem sobre a cutícula do inseto hospedeiro, dando início ao processo infectivo. As particularidades referentes às situações encontradas pelos conídios de fungos entomopatogênicos sobre o hospedeiro vêm sendo elucidadas por diversos pesquisadores. Para que o ciclo patôgeno inicie-se, o conídio deve manter um contato com a superfície do integumento longo o bastante para que a germinação e a subsequente penetração possa ocorrer (St. Leger, 1993a). O reconhecimento e a adesão à cutícula de um determinado inseto hospedeiro devem-se a complexas adaptações constitucionais e fisiológicas dos conídios e dos germinantes e têm sido intensamente estudados. Forças hidrofóbicas não-específicas são provavelmente de importância primária na adesão, embora sistemas de reconhecimento mais específicos, envolvendo enzimas e/ou glicoproteínas existentes sobre a superfície do conídio também estejam envolvidos (St. Leger, 1993a). O aumento na adesão dos esporos de *M. anisopliae* ocorre concomitantemente com a produção de uma camada mucilaginosa durante a hidratação dos conídios (Zacharuk, 1970, 1973; St Leger *et alii*, 1989a; Butt *et alii*, 1995). A produção de mucilagem por conídios de fungos durante os estágios iniciais de germinação também ocorre *in vitro*, provocando agregação dos germinantes em culturas líquidas de

Aspergillus ochraceus (Dute *et alii*, 1989). O envolvimento inicial de enzimas degradadoras de cutícula na infecção foi sugerido pela presença da protease Pr1, de esterases e de N-acetilglicosaminidase sobre a superfície de esporos não germinados de *M. anisopliae* (St. Leger *et alii*, 1991b). No trabalho, também foi verificada a degradação dos substratos dessas enzimas por conídios intactos, demonstrando a importância das mesmas tanto na liberação de substâncias que poderão ser utilizadas como nutrientes, como na alteração das condições iniciais da cutícula. Um fato interessante, que também pôde ser verificado foi que os níveis de enzimas sobre conídios produzidos em *Manduca sexta* infectadas foram maiores do que sobre os colhidos de colônias crescidas em meio sintético, indicando que as condições ambientais nas quais os conídios se desenvolvem podem pré-adaptá-los ao ciclo de vida patogênico. A produção de exoenzimas por fungos entomopatogênicos e o papel desempenhado pelas mesmas em diversos processos fisiológicos têm sido discutidos em diversos trabalhos e revisões específicas (Kucera, 1980 e 1981; Rosato *et alii*, 1981; Leite, 1987; El-Sayed *et alii*, 1989; Samuels *et alii*, 1989; Goettel *et alii*, 1989; St. Leger *et alii*, 1986a,b,c; St. Leger *et alii*, 1991a,d; St. Leger, 1993a,b; Gupta *et alii*, 1994; Braga *et alii*, 1994). Alguns trabalhos têm mostrado que os mecanismos de reconhecimento do hospedeiro estão, ao menos em parte, ligados ao nível de nutrientes disponíveis sobre a sua cutícula. Boucias & Latgé (1988) verificaram que extratos de cutículas de insetos foram capazes de induzir a germinação nos fungos entomopatogênicos *Conidiobolus obscurus* e *Nomuraea rileyi*. Woods & Grula (1984) verificaram que aminoácidos e glucosamina estão presentes sobre a superfície de *Heliothis zea* em quantidades suficientes para suportar a germinação e um crescimento limitado de *B. bassiana*. St Leger *et alii* (1992b) puderam observar diferenças marcantes nos requisitos nutricionais para a germinação entre linhagens de *M.*

anisopliae var *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus* isoladas de diferentes hospedeiros. Samuels *et alii* (1989) atribuíram à alta especificidade de diversas linhagens de *M. anisopliae* contra *Oryctes rhinoceros* a presença de nutrientes indeterminados sobre ou na cutícula do hospedeiro. Butt *et alii* (1995) verificaram que a grande disponibilidade de nutrientes sobre a cutícula de afídeos estimulou a rápida germinação de conídios de *M. anisopliae*. Hassan *et alii* (1989) observaram que a taxa de germinação de *M. anisopliae* *in vivo* sobre a cutícula de *M. sexta* foi muito menor do que a observada *in vitro* sobre meio sintético. Segundo os autores, essa diferença poderia ser consequência da reduzida disponibilidade de água e nutrientes sobre a cutícula, da presença de substâncias inibitórias, ou da presença de microrganismos competidores. Além da disponibilidade de nutrientes, alguns trabalhos têm mostrado que a superfície topográfica da cutícula também é capaz de influenciar todos os estágios do processo infectivo: a adesão, a germinação e a diferenciação dos apressórios. (St. Leger *et alii*, 1991b; Butt *et alii*, 1995).

Alguns estudos têm sido realizados visando a um entendimento dos eventos moleculares envolvidos na germinação e na diferenciação de estruturas infectivas em *M. anisopliae* (St. Leger *et alii*, 1989b; St. Leger *et alii*, 1990a,b,c; St. Leger *et alii*, 1991c; St. Leger *et alii*, 1994).

A virulência de deuteromicetos é freqüentemente co-relacionada à rápida germinação e a uma alta taxa de crescimento. Al-Aidroos & Seifert (1980) observaram que mutantes hipervirulentos de *M. anisopliae* apresentavam uma germinação precoce em meio de cultura, enquanto mutantes hipovirulentos apresentavam uma menor porcentagem de germinação. Samuels *et alii* (1989) verificaram que a rápida germinação, o rápido crescimento e o pequeno volume do esporo estavam relacionados a uma alta patogenicidade de *M. anisopliae*. A importância da velocidade de germinação pode ser atribuída a

diversos fatores. Durante o período de exposição do conídio sobre a cutícula do inseto anterior à penetração, o fungo pode sofrer dissecação, antibiose de microrganismos saprófitas, inibição por lipídios cuticulares ou remoção junto com a cutícula durante as mudas. Segundo Hassan *et alii* (1989), qualquer método que reduza o tempo de germinação sobre a cutícula do hospedeiro poderia incrementar a eficiência de um micoinseticida, particularmente por reduzir a dependência de uma alta umidade relativa do ambiente. Hassan *et alii* (1989) observaram que conídios de *M. anisopliae* previamente embebidos em água germinaram e formaram apressórios muito mais rápido *in vivo* sobre a cutícula de *M. sexta* do que conídios não embebidos. No mesmo trabalho, foi verificado que o aumento na velocidade de germinação e na formação de apressórios incrementou significativamente a mortalidade do hospedeiro. Dillon & Charnley (1990) acrescentaram novas informações a respeito das transformações metabólicas sofridas por conídios de *M. anisopliae* durante a embebição em água destilada. A embebição reduziu o tempo necessário para o início do crescimento esférico e da emergência do tubo germinativo. Os conídios previamente embebidos apresentaram uma maior incorporação de nutrientes quando transferidos para meios adequados à germinação. Após a transferência, houve um significativo aumento do número de mitocôndrias nos conídios embebidos, que também apresentaram um maior número de elementos do retículo endoplasmático. O volume dos conídios, após a embebição, não sofreu alteração e não foram obtidas evidências da perda de auto-inibidores ou de substâncias estimulantes durante a embebição. Os autores dividiram o processo de germinação de *M. anisopliae* em duas fases. Durante a primeira fase, iniciada pela água, certas vias metabólicas seriam ligadas e ocorreria a mobilização de nutrientes. Durante a segunda fase, iniciada por uma fonte de carbono exógena, ocorreria o crescimento esférico e a formação do tubo

germinativo. A embebição em água não foi capaz de provocar uma aceleração na germinação de *B. bassiana* ou *V. lecanii* (Dillon & Charnley, 1990). Taber & Taber (1982) verificaram que a embebição de conídios de *Pisolithus tinctorius*, antes da adição de glicose ao meio, não resultou em aumento da respiração. Portanto, fica evidente que os efeitos da embebição em água não podem ser generalizados para todas as espécies de fungos filamentosos.

3.3 - O crescimento de fungos filamentosos

Os fungos filamentosos têm sido utilizados extensivamente como reagentes biológicos para a produção comercial de várias substâncias como enzimas, antibióticos, esteróides e toxinas. São também utilizados como ferramenta analítica em bioensaios com fatores de crescimento, fertilizantes, fungicidas e antibióticos. Muitas vezes, no caso de entomopatógenos, o produto que se deseja obter é o próprio micélio fúngico a ser usado em formulações comerciais (Li & Holdom, 1995). O uso racional de fungos para estas propostas é dependente do entendimento básico do fenômeno de seu crescimento e da cinética através da qual ele ocorre (Mandels, 1965).

O crescimento é um processo complexo com diversos componentes diferentes, acompanhado em maior ou menor extensão pelo desenvolvimento e diferenciação (Griffin, 1994b), que pode envolver aumento do número de células, do número de núcleos, do tamanho das células ou da quantidade de substâncias estruturais não vivas (Mandels, 1965).

Durante o crescimento, os fungos miceliais cenocíticos aumentam o seu volume, o número de núcleos e a quantidade de citoplasma; entretanto, por não serem celulares, não ocorre um aumento do número de células (Griffin, 1994b).

Segundo Gooday (1995), a hifa é a forma característica de crescimento das células fúngicas que permite ao organismo explorar e aproveitar novos ambientes e substratos. As hifas respondem a uma grande variedade de estímulos ambientais através do crescimento orientado e da diferenciação. Provavelmente, todas as hifas respondem a substâncias voláteis, a substâncias solúveis, à natureza física da superfície e a gradientes de temperatura (Gooday, 1995).

Trinci, 1970 verificou que, quando um esporo de fungo é inoculado sobre um meio nutritivo gelificado, em condições favoráveis, irá formar um tubo germinativo que, por um curto período, crescerá exponencialmente. Subseqüentemente, uma taxa de expansão linear constante é observada e ramificações dicotômicas ou laterais podem ser formadas. Durante a fase inicial de crescimento, as hifas laterais se comportam da mesma maneira que a hifa parental, extendendo-se primeiro a uma taxa exponencial antes de atingirem a taxa de expansão linear constante da hifa parental. Quando medido em termos do comprimento total do micélio, o crescimento é exponencial em consequência da formação exponencial de ramificações. Tanto o crescimento total do micélio como as pontas de crescimento ou ramificações aumentam exponencialmente na mesma taxa específica. Esta taxa é equivalente à taxa específica de crescimento do organismo, nas mesmas condições de crescimento em meio líquido, onde a biomassa pode ser medida diretamente através da massa seca (Trinci, 1970; Trinci, 1974; Prosser, 1993).

Normalmente, o crescimento ocorre de maneira balanceada, através do aumento ordenado de todos os componentes do organismo, de maneira que sua constituição química permaneça aproximadamente constante (Griffin *et alii*, 1974). Entretanto, o crescimento não é sempre balanceado e é interessante saber quando isso ocorre, pois, nessas situações, pode-se estudar os

mecanismos que controlam a síntese diferencial de substâncias. O desbalanceamento no crescimento também pode comprometer o acompanhamento do crescimento de um microrganismo, se as técnicas de avaliação não forem criteriosamente escolhidas (Griffin, 1994b).

Diversos parâmetros têm sido utilizados para a avaliação do crescimento. O crescimento pode ser medido em termos de mudanças do número de células, do crescimento linear, do volume, da massa fresca, da massa seca, da atividade total de qualquer processo metabólico ou em termos da quantidade de algum constituinte celular (Mandels, 1965). A medida de massa seca tem sido o método mais utilizado para o estudo do crescimento de fungos. É a maneira mais direta de se representar a quantidade do organismo produzido. Qualquer outro método deve se referir à massa seca para a interpretação do significado fisiológico do parâmetro que está sendo utilizado (Mandels, 1965). Existem algumas limitações e desvantagens na utilização da massa seca. É um método destrutivo e, conseqüentemente, exige um grande número de culturas para a obtenção de valores significativos no curso do crescimento. Muitas vezes podem surgir problemas na separação da massa micelial quando substratos insolúveis são utilizados. Essa última situação tem sido verificada com freqüência no caso de fungos entomopatogênicos que, por diversos motivos, têm sido crescidos em substratos insolúveis como quitina, elastina, ou cutícula de insetos (St. Leger *et alii*, 1986b; El-Sayed *et alii*, 1993a; El-Sayed *et alii*, 1993b; El-Sayed *et alii*, 1993c). Griffin (1994b) ainda destaca o fato de a secagem em estufa ser sensível a alterações na parede e na quantidade de material de reserva. Algumas vezes pode ser interessante mostrar o crescimento através de mudanças na quantidade de constituintes celulares específicos, como lipídios, proteínas, enzimas ou ácidos nucleicos (Dorn & Rivera, 1966; Chesters & Peberdy, 1965), ou através do total de matéria orgânica. Griffin

(1994b) destaca que, quando constituintes celulares são utilizados para avaliação do crescimento, deve-se avaliar preferencialmente constituintes gerais como C, N ou proteínas. Diversos trabalhos têm utilizado o ergosterol (um esteróide característico de fungos) como estimador da biomassa e, conseqüentemente, do crescimento em fungos (Van Etten, 1965; Seitz *et alii*, 1979; Newell *et alii*, 1987; Bermingham *et alii*, 1995).

Em certos casos, o crescimento pode ser medido de maneira indireta, através de atividades metabólicas, como a atividade respiratória (consumo de O₂ ou liberação de CO₂), formação de produtos (ácidos, pigmentos), consumo de substrato ou atividades enzimáticas específicas (Dorn & Rivera, 1966).

A respirometria tem sido amplamente utilizada para o acompanhamento do desenvolvimento de colônias, bem como para a avaliação da utilização de substratos específicos por fungos. Darby & Goddard (1950) realizaram um extenso estudo sobre a respiração do micélio do fungo celulolítico *Myrothecium verrucaria*. Os autores constataram que a taxa respiratória do micélio é fortemente dependente da fase de crescimento, sendo que a maior taxa respiratória coincidiu com o período de maior crescimento da cultura. No mesmo experimento, foi verificado que a adição de açúcares ao meio causou um aumento de até 8 vezes no consumo de oxigênio, sendo a intensidade do consumo marcadamente influenciada pela concentração do substrato. Johnson & Dixon (1959), estudando o efeito de ácidos graxos sobre o crescimento e a respiração do fungo *Spicaria violaceae*, verificaram que os ácidos graxos que estimularam o consumo de oxigênio foram os mesmos que se mostraram bons substratos para o crescimento. Marchant & White (1966) estudaram a utilização de diversos açúcares por germinantes de *Fusarium culmorum* através do consumo de oxigênio. Taber & Taber (1987) verificaram inesperadamente que a atividade respiratória não é necessariamente acompanhada de

crecimento, já que o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* é capaz de respirar rapidamente frutose livre a CO_2 , sem apresentar crescimento nesse substrato. Muitos trabalhos têm relatado uma alta respiração endógena em fungos miceliais, que muitas vezes contribui de maneira significativa para a respiração total. Janda *et alii* (1993) observaram que a adição dos açúcares não metabolizáveis 6-deoxi-D-glicose, L-ramnose e L-xilose estimularam de maneira significativa a respiração celular em *Rhodotorula glutinis* (levedura aeróbica e produtora de lipídeos). Segundo os autores, a respiração endógena refletiu o gasto energético imposto pelo transporte das substâncias não metabolizáveis e pela síntese *de novo* de proteínas. Lyda (1976) verificou que o fitopatógeno *Phymatotrichum omnivorum* não respondeu a substratos exógenos, a menos que o micélio fosse submetido a um período de privação de nutrientes de pelo menos 72 horas. Durante a ausência de nutrientes externos, os primeiros substratos endógenos a serem respirados foram substâncias reduzidas, provavelmente lipídios. Micélios que sofreram um período de privação entre 48 e 72 horas aparentemente passaram a utilizar carboidratos, já que o RQ apresentou-se próximo da unidade. Após esse período de privação nutricional, o autor verificou uma autólise significativa e o RQ excedeu 1, indicando a metabolização de proteínas e/ou ácidos orgânicos. Em fungos, os produtos finais do metabolismo de proteínas são o CO_2 , o NH_3 e a H_2O e o RQ pode exceder a unidade. Li & Siehr (1980) verificaram que a taxa de respiração endógena está relacionada à idade do micélio no fitopatógeno *Polyporus sulphureus*. McClung *et alii* (1960) observaram que a idade do inóculo exerceu um efeito marcante sobre a respiração e que esse efeito variou bastante em função do substrato respirado.

Alguns trabalhos têm utilizado a radiorespirometria em estudos fisiológicos de fungos (Li & Siehr, 1980; Taber & Taber, 1982; Taber &

Taber, 1987; Janda *et alii*, 1993). Norris & Ribbons (1972) discutiram as vantagens que o uso da radiorespirometria teria sobre as técnicas manométricas convencionais em determinadas situações: 1ª - é possível a determinação da produção de CO₂ pelo microrganismo, utilizando-se um substrato marcado com ¹⁴C, em um meio complexo, contendo todos os requerimentos nutricionais necessários; 2ª - através do uso de substratos específicos, marcados com o ¹⁴C, pode-se determinar a taxa e a extensão da conversão de átomos individuais de carbono do substrato a CO₂ (essa informação é de vital importância para o entendimento das vias responsáveis pelo catabolismo do substrato) e 3ª - pode-se determinar a incorporação de ¹⁴C em constituintes celulares ou produtos de fermentação através da análise do meio de incubação.

A vantagem das avaliações indiretas do crescimento, através da atividade metabólica, é que na maioria das vezes são simples, não destrutivas e permitem a realização de avaliações contínuas.

Alguns trabalhos com fungos filamentosos necessitam da análise do crescimento individual. Nesse caso, enquadra-se o acompanhamento do alongamento do tubo germinativo a partir de conídios (Trinci, 1974) e o estudo do crescimento e diferenciação de hifas individuais (Zalokar, 1959). Porém, na maioria das vezes, o que é avaliado é o crescimento de colônias em meio de cultura líquido ou sobre meio gelificado. Quando o crescimento é avaliado sobre meio gelificado, o diâmetro da colônia pode servir de medida para a taxa de alongamento das hifas. Entretanto, tal procedimento não considera a formação das ramificações que ocorre durante o crescimento hifal (Griffin, 1994b).

A maioria dos estudos quantitativos requer um meio de cultura líquido; nesse caso, as culturas podem tanto crescer na superfície (culturas estacionárias) como submersas (culturas sob agitação ou aeração). É bem

sabido que, para fungos, as condições de cultura podem afetar de forma marcante o crescimento e a produção de metabólitos secundários. Em culturas estacionárias, normalmente ocorre o crescimento de uma massa micelial muito heterogênea na superfície. A parte superior do micélio é aeróbica, mas apresenta pouco contato com o meio de cultura. A parte inferior é anaeróbica, embora tenha um maior contato com o meio. Essa situação pode resultar numa inibição do crescimento e em uma produção excessiva de metabólitos secundários, mas, em alguns casos, é a única maneira de se obter crescimento do micélio em meio líquido (Burkholder & Sinnott, 1945; Woodhead & Walker, 1975; Lyda, 1976; Griffin, 1994b).

A agitação, além de proporcionar condições mais homogêneas de crescimento, também favorece a aeração, aumentando a disponibilidade de oxigênio no meio. A concentração de oxigênio no meio de cultura influencia fortemente o metabolismo e o crescimento da maioria dos fungos filamentosos. Woodhead & Walker (1975) verificaram que, em *Penicillium expansum*, as vias do catabolismo da glicose e o metabolismo secundário eram dependentes do grau de aeração do meio. Griffin *et alii* (1974) verificaram que a condição de agitação influenciou a taxa de crescimento de *Achlya bisexualis*, em diversos substratos nitrogenados.

As colônias de fungos, em culturas líquidas, sob agitação, crescem exponencialmente, de maneira que o logaritmo da quantidade do fungo aumenta linearmente com o tempo (Griffin *et alii*, 1974). Essa forma exponencial de crescimento, característica de microrganismos unicelulares, também ocorre em fungos filamentosos devido à produção de ramificações pelas hifas, que aumentam exponencialmente o número dos pontos de crescimento (Griffin, 1994b).

Uma curva típica de crescimento tem sido dividida em diversas fases, chamadas de fase lag, fase log, fase de declínio, fase estacionária e fase de morte da cultura. (Cochrane, 1958; Mandels, 1965; Griffin, 1994b). Durante a fase lag não ocorre crescimento mensurável. A fase lag é seguida por um período de aceleração na taxa de crescimento, na qual o logaritmo do peso seco mostra um aumento linear com o tempo. Essa fase é chamada de exponencial ou logarítmica. Em seguida, ocorre um período onde a taxa de crescimento é constante, ou apresenta declínio em relação à fase anterior, chamado de período de declínio. Após o período de declínio, pode-se observar um período onde não ocorre crescimento, chamado de fase estacionária. Diversos parâmetros podem ser calculados a partir da curva de crescimento, que, além de permitirem um estudo criterioso do evento, facilitam as comparações do crescimento de fungos em diferentes condições. Griffin (1994b) apresentou uma série de equações utilizadas na obtenção dos parâmetros de crescimento de culturas de fungos filamentosos que serão apresentadas a seguir. A taxa de crescimento é a mudança na quantidade do fungo presente por unidade de tempo. No caso da avaliação do crescimento de colônias sobre meio gelificado, a taxa do aumento no comprimento de hifas (l) com o tempo (t) pode ser expressa como:

$$\frac{dl}{dt} = K_r \quad (1)$$

sendo que K_r é a inclinação da reta e especifica a taxa de crescimento. Com o rearranjo e a integração da Equação 1, pode-se obter a equação de crescimento linear:

$$l = K_r t + c \quad (2)$$

A Equação 2 mostra que o comprimento do micélio, ou o raio da colônia, aumenta linearmente com o tempo. A constante c leva em consideração o

inóculo e a duração da fase lag anterior ao início do crescimento. Durante a fase log do crescimento, tanto em placas como em meio líquido, a curva de produção de massa seca mostra uma pronunciada inclinação ascendente, na qual a taxa de crescimento (a inclinação da curva) aumenta com o tempo, na proporção da quantidade de micélio. Como a taxa de crescimento, dM/dt , é proporcional à quantidade do fungo, tem-se:

$$\frac{dM}{dt} = \mu M \quad (3)$$

sendo M a quantidade do fungo (peso seco, por exemplo) e μ a taxa de crescimento específica (a taxa de crescimento por unidade de quantidade do fungo). Com o rearranjo da equação 3, obtém-se:

$$\ln M = \mu t + b \quad (4)$$

ou na sua forma exponencial:

$$M = e^{\mu t + b} \quad (5)$$

A Equação 5 mostra que o logaritmo de M pode ser plotado linearmente em função do tempo e a reta apresentará uma inclinação μ . O intercepto b leva em consideração a quantidade de inóculo e a duração da fase lag. A integração da Equação 3, em um intervalo de t_1 a t_2 , permite uma avaliação gráfica de μ e a derivação de uma expressão para a estimativa do tempo de duplicação:

$$\ln \frac{M_2}{M_1} = \mu (t_2 - t_1) \quad (6)$$

ou em sua forma exponencial:

$$\frac{M_2}{M_1} = e^{\mu(t_2 - t_1)}. (7)$$

A Equação 6 mostra que, quando a massa seca M_2 no tempo t_2 é o dobro do valor da massa seca M_1 em um tempo inicial t_1 , a Equação 6 torna-se:

$$\ln 2 = \mu t_d (8)$$

sendo t_d o tempo de duplicação, que é o intervalo $t_1 - t_2$, no qual a quantidade do fungo dobra. A taxa de crescimento específica μ é a inclinação da reta no gráfico semi-log, na porção exponencial da curva de crescimento e é o parâmetro de maior utilidade para a comparação da taxa de crescimento de culturas fúngicas em meio líquido.

Segundo Griffin (1994b), esta equação funciona bem para fungos unicelulares, quando todas as células se dividem continuamente e para fungos miceliais, quando todas as hifas continuam a se ramificar. A divisão e a ramificação irrestrita geralmente ocorrem no início do crescimento de uma cultura e para alguns fungos pode-se conseguir condições que propiciem a ramificação irrestrita por um considerável período de tempo. Nesses casos, o micélio permanece frouxo e os nutrientes podem fluir livremente ao redor das hifas. Entretanto, em alguns fungos, a agregação do micélio conduz à formação de "pellets" que crescem como bolas esféricas. Nessas condições, o movimento de nutrientes e de oxigênio pode-se restringir à superfície do "pellet", alterando a cinética de seu crescimento. Embora existam equações que descrevam o crescimento quando ocorre a formação de "pellets", a heterogeneidade dos "pellets" e as restrições devidas às limitações na disponibilidade de nutrientes no seu interior tornam essa forma de crescimento indesejável para muitos

estudos fisiológicos (Griffin, 1994b). Segundo Prosser (1993), os "pellets" podem se originar da agregação dos esporos, do entrelaçamento dos esporos pelos seus tubos germinativos ou, o que é menos comum, da agregação de micélios jovens.

As equações apresentadas anteriormente descrevem o crescimento de culturas não contínuas, nas quais um determinado volume de meio é inoculado e o fungo cresce até que as condições se tornem inibitórias. Durante o crescimento, muitas mudanças ocorrem. A quantidade de nutrientes diminui ou se esgota e ocorre acúmulo do fungo e de substâncias rejeitadas. Mudanças no pH e na disponibilidade de O_2 também perturbam freqüentemente esse tipo de experimento, interferindo na análise dos resultados, ou mesmo impedindo completamente a sua interpretação (Griffin, 1994b).

Quando um meio é inoculado e o crescimento é medido durante um certo período de tempo, tem-se como resultado uma típica curva sigmoideal que pode ser dividida em diversas fases, com diferentes características fisiológicas. As fases já mencionadas anteriormente são: 1ª - fase lag, que pode apresentar um pequeno crescimento ou não apresentar crescimento detectável; 2ª - fase exponencial com crescimento autocatalítico; 3ª - fase de declínio da taxa de crescimento específico, em alguns casos vista como uma fase de crescimento linear; 4ª - uma fase estacionária de duração variada, às vezes tão curta que nem é observada, e 5ª - fase de morte da cultura, usualmente acompanhada por autólise.

A duração da fase lag depende de diversos fatores, especialmente da natureza do inóculo e dos tipos de nutrientes presentes no meio (Nicolás & Villanueva, 1965; Nolan, 1971). A fase lag é uma preparação fisiológica para a fase exponencial. A fase lag, para fungos filamentosos, não envolve passos preparatórios para a divisão celular, mas envolve a preparação para o

alongamento da hifa e para a emissão de ramificações. As culturas fúngicas são inoculadas com esporos ou com fragmentos de hifas, obtidos pela maceração do micélio em pequenos fragmentos, sendo que nem todos são viáveis. Em ambos os casos não estão presentes extremidades de hifas em crescimento ativo e a fase lag durará até a germinação dos esporos ou até que ocorra a formação de novos pontos de crescimento nos fragmentos de hifa do inóculo (Griffin, 1994b).

Fatores nutricionais também podem afetar a duração da fase lag. Baixas concentrações de aminoácidos relacionados ao ciclo da uréia, como por exemplo o ácido glutâmico, estimulam o crescimento. Entretanto, o efeito primário do aminoácido manifesta-se na redução da duração da fase lag e não no estímulo da taxa de crescimento (Griffin, 1994b). A indução de enzimas adaptativas e a natureza do substrato também afetam de maneira marcante a duração da fase lag (St. Leger *et alii* 1988; Janda *et alii*, 1993).

Os mecanismos que controlam a taxa específica de crescimento de um organismo, durante a fase exponencial, ainda não estão claros, mas, segundo Griffin (1994b), os dados disponíveis sugerem duas hipóteses: 1ª - os diferentes nutrientes podem ser metabolizados em taxas diferentes, controlando a taxa na qual eles se tornam disponíveis para a síntese de macromoléculas e 2ª - esses compostos ou seus produtos podem interagir com os mecanismos de controle da síntese de macromoléculas.

A taxa de crescimento exponencial é fortemente influenciada pelos nutrientes fornecidos; tanto as fontes de carbono como as de nitrogênio têm influência marcante sobre o crescimento (Griffin *et alii*, 1974). A formação de ramificações é um evento crítico para a manutenção da fase exponencial de crescimento e por sua implicação na regulação da taxa específica de crescimento (Trinci, 1974). Alguns trabalhos têm relatado uma diminuição da

concentração de aminoácidos livres no micélio ao final da fase exponencial de crescimento (Lahoz & Ibeas, 1968). Muitas vezes, a fase exponencial pode ser acompanhada por alterações significativas no pH do meio. Campbell *et alii* (1978) verificaram em *M. anisopliae* que a fase de maior crescimento do fungo era antecedida pela diminuição do pH do meio .

O declínio da taxa de crescimento de uma cultura é causado pela exaustão de algum nutriente do meio, que passa a ser um fator limitante ao crescimento, e/ou pelo acúmulo de substâncias produzidas pelo fungo (Lahoz & Ibeas, 1968; Santamaria & Reyes, 1988; Griffin, 1994b).

A fase autolítica de culturas tem sido extensivamente estudada em diversos gêneros de fungos. Constituintes do meio de cultura (incluindo as fontes de carbono e nitrogênio, além de outros minerais) afetam os eventos desse estágio da cultura. O aumento do pH do meio de culturas em autólise tem sido freqüentemente verificado. Lahoz *et alii* (1979) demonstraram que o grau de autólise de culturas de *Aspergillus niger* é influenciado pelo pH do meio. O aumento do pH do meio favoreceu a autólise no fungo. Lahoz & Ibeas (1968) verificaram um grau de autólise de até 85% em culturas aeradas de *Aspergillus flavus*. A perda total de nitrogênio no micélio autolisado atingiu 82%, enquanto a perda de fósforo atingiu 90% a partir do início da autólise. Os carboidratos foram reduzidos em 77% e a concentração de aminoácidos livres no micélio foi reduzida em 78%. O início da autólise coincidiu com a exaustão da glicose utilizada como fonte de carbono. Foi também verificado um aumento do pH do meio durante a fase autolítica. Lahoz & Miralles (1970) verificaram que a concentração inicial da fonte de carbono influenciou a autólise em *A. niger*. O grau de autólise das culturas de *A. niger* crescidas e autolisadas em meio contendo inicialmente 2,5, 5, 10, 20 e 40g/l foi, respectivamente, de 64, 60, 43, 43 e 43%. A maior perda de nitrogênio micelial (73%) ocorreu quando a menor

concentração de glicose foi utilizada. Diversos trabalhos têm destacado o papel exercido pelas exoenzimas produzidas durante o processo autolítico. Santamaria & Reyes (1988) estudaram a produção de proteases durante a autólise de diversos fungos. Foi verificado que o início da autólise coincidia com a redução da fonte de carbono (no caso, glicose) a valores menores do que $0,3 \mu\text{moles ml}^{-1}$. Segundo os autores, a redução da glicose poderia desreprimir a produção de proteases extracelulares pelo fungo. De maneira geral, a atividade proteolítica geralmente aumentou durante a autólise. A autólise normalmente coincidiu com um aumento do pH dos meios. Reyes *et alii* (1981) detectaram a síntese *de novo* de proteínas, particularmente 1,3- β -Glucanase e β -N-acetilglicosaminidase durante a autólise de *Neurospora crassa*. Reyes & Martínez (1988) observaram um aumento na atividade quitinolítica no filtrado de *A. nidulans* durante a autólise e a síntese de β -N-acetilglicosaminidase e de endoquitinases. Alfonso *et alii* (1991) sugeriram que a quitosana presente na parede celular de *Mucor* pode ser degradada pela quitosanase produzida durante a autólise, e que a degradação da quitina presente na parede pode ser devida à ação de uma endoquitinase produzida durante a autólise.

3.4 - Requerimentos químicos para o crescimento de fungos

O entendimento da nutrição de fungos apresenta importância prática e teórica. É evidente que a elaboração de meios sintéticos apropriados ao crescimento ou a avaliação de atividades fisiológicas específicas dependem de conhecimentos básicos a respeito dos requisitos nutricionais da espécie que está sendo estudada (Papavizas, 1970; Li & Holdom, 1995). Menos evidente é o fato de que até a especificidade apresentada por determinados patógenos

pode estar associada a uma disponibilidade específica de nutrientes no hospedeiro (Lyda, 1976). Taber & Taber (1987) observaram que o fungo ectomicorrízico *P. tinctorius* não causa o apodrecimento de raízes por ser incapaz de utilizar como fonte de carbono substratos como a sacarose, a frutose, a celulose e a pectina presentes nos tecidos vegetais. Li & Siehr (1980) verificaram, através do estudo do metabolismo do carbono, que o fungo decompositor de madeira *Polyporus sulphureus* utiliza substâncias associadas à degradação da lignina mais prontamente do que a glicose como fonte de carbono e energia.

Segundo Campbell *et alii* (1978), o conhecimento da utilização de nutrientes para o crescimento e a esporulação de fungos entomopatôgenicos possuem duas possíveis aplicações para o desenvolvimento de metodologias de controle. A primeira seria o desenvolvimento de meios para uma eficiente produção de biomassa. A preservação da virulência e a seleção apropriada de isolados virulentos seria a segunda possível aplicação dos dados nutricionais.

Griffin (1994c) divide o requerimento nutricional de elementos para o crescimento em duas classes: os macronutrientes, que são substâncias requeridas em concentrações ao redor de 10^{-3} M e os micronutrientes, requeridos em concentrações ao redor de 10^{-6} M ou menos.

De maneira geral, os fungos são organismos pouco exigentes quanto à natureza química da fonte de carbono, podendo utilizar um grande número de compostos como fonte de carbono e/ou energia para o seu crescimento (Nicolás & Villanueva, 1965; Chesters & Peberdy, 1965; Marchant & White, 1966; Papavizas, 1970; Faro, 1971; Rath *et alii*, 1995; Li & Holdom, 1995). Algumas exceções têm sido descritas. Held (1970) verificou que o fungo aquático *Aqualinderella fermentans* possui requerimentos nutricionais relativamente complexos. Este fato foi considerado uma adaptação a uma

existência anaeróbica e fermentativa em ambientes ricos em matéria orgânica. Os estudos de nutrição carbônica têm enfatizado a utilização de carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, hidrocarbonetos e lipídios. A glicose é a fonte de carbono mais largamente utilizada. O transporte e o sistema enzimático para a utilização da glicose são constitutivos em fungos, não sendo requerido um período de adaptação para o início do crescimento. O crescimento em dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos requerem a síntese de enzimas digestivas que, freqüentemente, são extracelulares. Essas enzimas normalmente não são constitutivas e um período de indução é requerido antes que o crescimento possa se iniciar (Griffin, 1994c).

O crescimento em fontes de carbono insolúveis como quitina, elastina, celulose e lignina é difícil de ser medido por duas razões: 1ª - a difícil separação do fungo do substrato utilizado e 2ª - a obtenção de substratos puros e não modificados (Hackman & Goldberg, 1964).

Ao contrário de muitas bactérias, diversas espécies de fungos geralmente crescem melhor quando açúcares são utilizados como fonte de carbono. Paradoxalmente, a taxa respiratória e de crescimento de muitos fungos decrescem com o aumento na concentração de glicose no meio ("Crabtree Effect") (Taber & Taber, 1987). Normalmente, verifica-se que o aumento na concentração da fonte de carbono é acompanhado pelo aumento no crescimento, embora as respostas ao aumento possam variar grandemente, mesmo entre isolados de uma mesma espécie (Papavizas, 1970; Latgé *et alii*, 1978). Li & Holdom (1995) avaliaram o efeito de diversas fontes de carbono sobre o crescimento e a esporulação de *M. anisopliae*. Os resultados mostraram que diversos carboidratos, especialmente o amido solúvel e a manose, suportaram o crescimento e a esporulação. A sorbose provocou anormalidades no crescimento e inibiu a esporulação do fungo.

A utilização diferencial de fontes de carbono tem auxiliado os estudos de filogenia e caracterização de linhagens no gênero *Metarhizium*. Rath *et alii* (1995) mostraram que os dados de utilização de carboidratos gerados pelo sistema API50CH (Biomérieus SA) podem ser utilizados para a distinção entre 4 espécies de fungos entomopatogênicos : *M. anisopliae*, *M. flavoviride*, *M. oncoperae* e *B. bassiana*. Nesse sistema é avaliada a utilização individual de 49 carboidratos diferentes. Segundo os autores, o sistema também permitiu a separação de linhagens dentro da espécie *M. anisopliae*.

Como o crescimento de um entomopatógeno, particularmente durante a fase de vida que passa no hospedeiro, ocorre em substratos compostos (por exemplo cutícula, tecidos internos, e hemolinfa), o entendimento desse tipo de situação pode mostrar-se bastante útil em estudos de fisiologia e genética. Quando misturas de substratos contendo glicose são utilizadas, pode-se verificar que a glicose normalmente tem um efeito repressivo e inibitório sobre a utilização da outra fonte de carbono. Normalmente, também ocorre que compostos que não são utilizados ou que são pouco utilizados, quando estão presentes como única fonte de carbono, podem ser bem utilizados em misturas. MacClung *et alii* (1960) verificaram que a presença de glicose no meio aumentou drasticamente a utilização de diversos açúcares que não eram utilizados como única fonte de carbono por *Nocardia rubra*. Taber & Taber (1987) verificaram que a suplementação do meio com uma pequena quantidade de glicose permitiu o crescimento de *P. tinctorius* em sacarose, frutose e celulose.

O nitrato, que é a forma de nitrogênio mais comumente disponível no solo, pode ser amplamente utilizado por fungos (Griffin, 1994c). Compostos nitrogenados orgânicos, como a uréia, proteínas e aminoácidos são utilizados em maior ou menor extensão, dependendo do fungo e do composto fornecido

(Nicolás & Villanueva, 1965). Barnes *et alii* (1975) estudaram o crescimento de *M. anisopliae* em 16 fontes de peptona e verificaram que o maior crescimento ocorreu em triptona (1,8101 g/frasco) e o menor em gelatina (0,3303g/frasco). Alguns fungos são capazes de utilizar proteínas como fonte de carbono com a mesma eficiência que utilizam glicose. Moore & Wood (1986) verificaram que três espécies de basidiomicetos comestíveis (*Agaricus bisporus*, *Coprinus cinereus* e *Volvariella volvacea*) utilizavam proteína como única fonte de carbono tão bem como a glicose. Em meios contendo proteína e glicose, ambos os substratos eram utilizados simultaneamente e o crescimento era maior do que o obtido com a utilização dos substratos, individualmente.

Uma mistura de aminoácidos, como a presente na caseína hidrolizada, geralmente provoca um crescimento maior ou mais rápido do que o obtido com qualquer aminoácido utilizado individualmente, sendo desconhecida a base deste fenômeno (Papavizas, 1970; Griffin, 1994c; Li & Holdom, 1995). Papavizas (1970), estudando a utilização de aminoácidos pelo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum*, verificou que alguns aminoácidos (valina, lisina, serina, glicina, histidina e treonina) não eram utilizados como fonte de nitrogênio. Pelletier & Keitt (1954), citados por Campbell *et alii* (1978), sugeriram que a variabilidade intraespecífica para a utilização de aminoácidos pode ser importante em relação à patogenicidade e à especificidade do fungo *Venturia inaequalis*. Nicolás & Villanueva (1965) verificaram que o crescimento do fungo fitopatogênico *Darluca filum* iniciava-se após 3 dias, quando asparagina, caseína hidrolizada ou peptona eram utilizadas como fonte de nitrogênio, mas, para a maioria dos aminoácidos, o crescimento demorou cinco dias ou mais para começar. Campbell *et alii* (1978) estudaram o crescimento e a esporulação de *Metarhizium anisopliae* e de *Beauveria bassiana* em meios contendo 24 aminoácidos como fonte de nitrogênio. Os resultados mostraram que o

crescimento (medido através da massa seca produzida) pode apresentar grande variação, dependendo do tipo de aminoácido utilizado como fonte de nitrogênio. No caso de *M. anisopliae*, a maior produção de massa seca (256,8 mg/frasco) ocorreu quando L-triptofano foi utilizado e a menor produção (7,8 mg/frasco) ocorreu quando o ácido L-cisteico foi utilizado. Li & Holdom (1995) estudaram a utilização de peptona de soja e de diversos aminoácidos individuais por *M. anisopliae*. A peptona foi uma fonte de nitrogênio muito melhor do que todos os outros compostos, tanto para o crescimento, como para a esporulação. Os aminoácidos L-glutamina, L-serina, L-asparagina e L-alanina foram os melhores para o crescimento, enquanto L-cisteína, L-ácido aspártico e L-treonina foram os piores. Segundo os autores, os aminoácidos provavelmente estimulam estágios particulares do crescimento ou da esporulação; sendo assim, uma fonte complexa de nitrogênio é requerida para a otimização de todos os processos.

Alguns trabalhos têm mostrado que a relação carbono/nitrogênio pode influenciar o crescimento e a esporulação. Chesters e Peaberdy (1965) verificaram que o balanço entre a fonte de carbono e de nitrogênio influenciou tanto o crescimento como a síntese de lipídios em *Mortierella vinacea*. Latgé *et alii* (1978) observaram que a produção de micélio pelo fungo *Entomophthora virulenta* decresceu proporcionalmente com o aumento da razão C/N. A produção de micélio por mg de glicose decresceu constantemente com o aumento da razão C/N de 1 até 32, enquanto a produção de micélio por mg de proteína hidrolizada aumentou continuamente nesse mesmo intervalo.

Muitas vezes é interessante saber a eficiência de conversão de um substrato específico em micélio. A eficiência sintética é o quociente entre o peso seco do micélio dividido pelo peso seco da fonte de carbono consumida, expresso em porcentagem. O substrato consumido, segundo Griffin (1994c),

pode ser convertido em micélio, dióxido de carbono e diversos produtos metabólicos como álcool, ácidos orgânicos, polissacarídeos extracelulares e metabólitos secundários.

De uma maneira geral, os ambientes nutricionais naturais dos fungos são espacialmente desuniformes, embora a maioria dos estudos nutricionais e de crescimento não leve este importante dado em consideração. Ritz, (1995) estudou as respostas de crescimento de diversos fungos de solo em meios com nutrientes heterogeneamente distribuídos. Foi verificado que *Tricoderma viride* e *Rhizoctonia solani* tendem a formar estruturas reprodutivas apenas em sítios com baixas concentrações de nutrientes, enquanto *Alternaria alternata* tende a formar estruturas reprodutivas em sítios com altas concentrações de nutrientes.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Linhagens utilizadas

As linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e de *M. anisopliae* var. *majus* utilizadas em todos os experimentos foram obtidas junto ao "Agricultural Reserch Service Collection of Entomopathogenic Fungi" (ARSEF) e ao Banco de Germoplasma de Fungos Entomopatogênicos do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas. As origens geográficas, os hospedeiros dos quais foram originalmente isoladas, bem como as identificações nas coleções das quais foram obtidas são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Origem e hospedeiros dos quais as linhagens de *Metarhizium anisopliae* foram originalmente isoladas

Espécie e Identificação	Hospedeiro original	Local onde foi isolada
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>		
58 ^b	<i>Deois flavopicta</i>	Bahia/Brasil
70 ^b	NC	França
73 ^b	NC	França
Ca	<i>Mahanarva posticata</i>	NC
BM ^a	<i>Mahanarva posticata</i>	Alagoas/Brasil
63 ^{a,b}	<i>Mahanarva posticata</i>	Alagoas/Brasil
02 ^{a,b}	<i>Deois flavopicta</i>	Pará/Brasil
SMC ^{a,b}	<i>Mahanarva posticata</i>	Alagoas/Brasil
20 ^b	<i>Deois flavopicta</i>	Bahia/Brasil
22 ^{b,c}	NC	Espírito Santo/Brasil

29 ^b	<i>Mahanarva posticata</i>	Alagoas/Brasil
47 ^b	<i>Deois flavopicta</i>	Bahia/Brasil
35 ^{a,b}	<i>Mahanarva posticata</i>	Alagoas/Brasil
P ^b	<i>Deois flavopicta</i>	Minas Gerais/Brasil
CLII ^{b,c,d}	<i>Mahanarva posticata</i>	Alagoas/Brasil
E ₆ ^b	<i>Deois flavopicta</i>	Espírito Santo/Brasil
E ₉ ^{a,b}	<i>Deois flavopicta</i>	Espírito Santo/Brasil
38 ^b	<i>Mahanarva posticata</i>	Alagoas/Brasil
157p ^{*,a,b}		
<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>		
1 ^a	NC	NC
7 ^a	NC	NC

^a Linhagens utilizadas para obtenção e dos marcadores RAPD.

^b Linhagens utilizadas para a estimativa de parâmetros genéticos da produção de quitinases.

^c Linhagens utilizadas para a avaliação da produção de proteases durante o desenvolvimento e a autólise.

^d Linhagem utilizada nas análises respirométricas.

* Mutante obtido a partir da linhagem E₉ (Messias & Azevedo, 1980).

4.2 - Material e metodologia utilizada na obtenção e análise dos marcadores moleculares

4.2.1 - Meios de cultura e soluções de rotina

Os meios de cultura básicos utilizados para a manutenção e crescimento das linhagens e as soluções de rotina foram preparados e esterilizados como descrito anteriormente por Braga, 1992.

4.2.2 - Reagentes e soluções utilizadas nas extrações de DNA

Os reagentes e as soluções utilizadas nas extrações de DNA em larga escala foram preparadas como descrito por Goodwin *et alii* (1992), enquanto os reagentes e as soluções utilizadas nas miniextrações de DNA foram preparadas como descrito por Lee & Taylor (1990).

4.2.3 - Obtenção e caracterização dos marcadores RAPD

a) Obtenção de conídios para inoculação em meio líquido.

A partir de culturas estoques, prepararam-se, em Tween 0,01% (v/v), suspensões de conídios que foram utilizadas para inoculação de placas de Petri, contendo Meio Completo (MC). Estas placas foram, dependendo da linhagem, incubadas a 28°C por períodos variáveis de tempo, até que as mesmas se apresentassem esporuladas. O período de incubação utilizado foi de 10-14 dias para as linhagens de *M. anisopliae var. anisopliae* e de *M. anisopliae var. majus*.

b) Obtenção do micélio utilizado nas extrações do DNA.

Para obtenção de micélio dos diferentes isolados, procedeu-se da maneira descrita a seguir. Os esporos de duas placas de Petri foram transferidos para 20ml de solução {0,05% Tween 20 (v/v), 0,85%(p/v) NaCl}. Após agitação em vortex, a suspensão de conídios foi inoculada em

Erlenmeyers de 1 litro, contendo 400ml de Meio Mínimo Líquido (MML) + 10% (v/v) de Meio Completo Líquido (MCL). Os frascos foram incubados a 28°C, sob agitação (150 rpm).

O conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel de filtro (Inlab Tipo 10) e lavado com água destilada estéril. O micélio obtido foi liofilizado e mantido a -70°C, até o momento do uso.

c) Extração do DNA em larga escala

A metodologia de extração que foi utilizada é uma modificação feita por Goodwin *et alii* (1992) da técnica descrita por Garber & Yoder (1983). O micélio liofilizado foi pulverizado em almofariz, com adições constantes de nitrogênio líquido.

A seguir, transferiu-se o micélio pulverizado para tubo de centrífuga com capacidade para 50ml ao qual foram previamente adicionados 15ml de tampão de extração (TEx) pré-aquecido a 65°C. A mistura foi agitada em vortex por, no máximo, 30 segundos. O tubo foi colocado em banho-maria a 65°C, por 20 minutos, tendo-se o cuidado de realizar, ocasionalmente, misturas por inversão. A seguir, foram adicionados 15ml de uma solução 5M de acetato de amônio e o conteúdo foi misturado, delicadamente, por inversão. Em seguida, o tubo foi colocado em gelo por 20 minutos (esta etapa serviu para precipitar algumas proteínas e RNAs de alto peso molecular). A seguir, o tubo foi centrifugado (6.500rpm, Rotor JA 20 Beckman), por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo, no qual foi adicionado 2/3 do volume inicial de isopropanol, a fim de se precipitar o DNA. Misturou-se o conteúdo através de delicados movimentos circulares. O DNA foi coletado

através de centrifugação e lavado com etanol a 70% (v/v). Posteriormente, foi seco e dissolvido em 3ml de TE (10mM tris, 1mM EDTA, pH 8,0).

d) Separação do DNA total em seus componentes: DNA genômico, DNA ribossômico e DNA mitocondrial

A obtenção das frações purificadas de DNA foi realizada como descrito a seguir. Adicionou-se TE à solução de DNA, obtida no item anterior, até um volume final de 9,1ml. Em seguida, adicionaram-se 9,48g de CsCl (Sigma, reagente para biologia molecular) e misturou-se o conteúdo por inversões do tubo até a dissolução do CsCl. A solução foi, então, transferida para tubo de centrifuga (Beckman nº326814), ao qual foram adicionados 300µl de solução-estoque de bisbenzimidazila (10mg/ml). O tubo, após a colocação da solução, teve seu volume completamente preenchido com óleo mineral (Sigma, reagentes para biologia molecular) e foi centrifugado (53.000rpm; Rotor Ti 80, Beckman) por, no mínimo, 14 horas. Após a centrifugação, os tubos foram examinados sob luz ultravioleta (ondas longas). As bandas superior (DNA mitocondrial), intermediária (DNA ribossomal) e inferior (DNA genômico) foram retiradas com auxílio de seringa (2ml) e agulha (20g).

A bisbenzimidazila foi retirada através de 3 ou mais extrações, com solução de SSC-saturada com isopropanol. A seguir, as soluções foram diluídas com 3 volumes de TE. Adicionou-se, então, 1/10 do volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) à solução contendo o DNA mitocondrial. Todos os DNAs foram precipitados pela adição de 2 volumes de etanol absoluto e resfriamento a -20°C, por 12 horas. Após a precipitação, os DNAs foram coletados por

centrifugação (Rotor JA 20, 15.000rpm) por 15 minutos. A seguir, o DNA foi resuspendido em TE de acordo com o tamanho do "pellet".

e) Análise quantitativa e qualitativa dos DNAs

As análises foram realizadas em espectrofotômetro, seguindo os parâmetros descritos por Maniatis *et alii* (1982).

f) Miniextrações de DNA

As extrações de DNA em pequena escala foram realizadas segundo a metodologia descrita por Lee & Taylor, (1990).

A um Eppendorf de 1,5ml foi adicionado micélio liofilizado e pulverizado em almofariz, como o descrito anteriormente. A quantidade de micélio variou, dependendo da linhagem, nunca sendo, entretanto, superior a 60mg. A seguir, adicionaram-se 600µl de tampão de lise (TL), previamente aquecido, e incubou-se a mistura a 65°C, por 1 hora. Terminado o período de incubação, adicionaram-se 600µl de clorofórmio:fenol equilibrado (1:1). Posteriormente, a mistura foi submetida à centrifugação 10.000g por 15 minutos. Removeram-se 300µl da fase aquosa, contendo o DNA, para um tubo novo. A remoção foi feita com extremo cuidado, de modo a não serem pegos "debris" celulares presentes na interfase. Repetiu-se a extração fenólica por mais duas vezes. Foram adicionados 10µl de acetato de sódio à fase aquosa, seguido da adição de 0,54 volumes de isopropanol. Após a precipitação do DNA, (normalmente os DNAs foram armazenados a -20°C nas condições

anteriormente descritas) procedeu-se uma centrifugação a 10.000g, por 2 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) a -20°C e os tubos foram invertidos sobre papel absorvente e deixados secar. O DNA foi resuspenso em TE (10mM tris-HCl, 0,1mM EDTA).

g) Obtenção dos marcadores RAPD

As condições de amplificação utilizadas foram as descritas por Williams *et alii* (1990). As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 25 µl, contendo: 10mM Tris-Cl, pH 8,3; 50mM de KCl; 2mM de MgCl₂; 0,01% de gelatina (Sigma); 100mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Pharmacia); 0,2mM do "Primer" ("Kit OP-M obtido junto à Operon Technology, descritos na Tabela 2); 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Pharmacia) e 25 ng do DNA molde (foi utilizada a fração genômica obtida após ultra-centrifugação do DNA total em gradiente de CsCl). Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em géis TAE-agarose (1,5%) e visualizados através da utilização de brometo de etídio (Maniatis *et alii*, 1982).

Tabela 2. Código e sequência dos "primers" utilizados

Código	Seqüência (5'-3')
OPM-03	GGGGGATGAG
OPM-04	GGCGGTTGTC
OPM-05	GGGAACGTGT
OPM-06	CTGGGCAACT
OPM-07	CCGTGACTCA
OPM-08	TCTGTTCCCC
OPM-09	GTCTTGCGGA
OPM-15	GACCTACCAC

h) Análise genética dos padrões de RAPD

Os fragmentos amplificados de DNA (bandas) foram analisados em todas as linhagens, baseando-se em dois estados possíveis: 0 (fragmento ausente) e 1 (fragmento presente). As estimativas das relações genéticas entre todos os pares de isolados foram calculadas usando-se valores de distância (**D**), gerados pela fórmula $D = 1 - 2C_{X,Y} / (U_X + U_Y + 2C_{X,Y})$ (Nei & Li, 1979), na qual $C_{X,Y}$ é igual ao número de fragmentos comuns às linhagens X e Y, e U_X e U_Y representam o número de bandas únicas. Os valores de **D** variam entre 0 e 1. Quando o valor de **D** para uma comparação de linhagens está próximo de 0, um alto grau de similaridade genética é indicado. Valores de **D** próximo de 1 indicam baixo grau de similaridade genética (Yoon & Glave, 1993).

Os marcadores RAPD também foram analisados pelo programa NTSYS-pc, versão 1.70 (Rohlf, 1993). Foi criada uma matriz de similaridade, usando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973), que não considera a ausência simultânea do marcador como um indicativo de similaridade entre duas linhagens. A construção do dendograma foi feita através do método (UPGMA) "unweighted pair group method, arithmetic mean" (Sneath & Sokal, 1973).

4.3 - Estimativas de parâmetros genéticos da produção de quitinases por *M. anisopliae*

4.3.1 - Linhagens utilizadas e obtenção dos esporos

As 17 linhagens de *M. anisopliae* utilizadas neste experimento foram caracterizadas anteriormente (Tabela 1). Para a obtenção de esporos, os isolados foram crescidos sobre Meio Mínimo Sólido (MMS) a 28°C, por 12 dias.

A viabilidade dos conídios foi obtida pela inoculação de suspensão contendo 10^6 conídios por ml em placas com MMS. Após 14 horas de incubação a 28°C, observou-se a porcentagem de conídios germinados e não germinados em uma amostra, ao acaso, de 500 conídios.

4.3.2 - Obtenção do filtrado para avaliação de suas atividades enzimáticas

Erlenmeyers de 50 ml, contendo 17 ml de MML, com 1% (p/v) de quitina, em substituição à glicose, autoclavados a 121°C, por 20 minutos, foram inoculados com 3ml de suspensões, contendo 3×10^6 conídios ml⁻¹ e incubados a 28°C, com agitação (150 rpm), por períodos variáveis de tempo. A quitina utilizada ("From Crab Shells, Practical Grade, Sigma") foi peneirada, aproveitando-se somente a fração que passou através de malhas com 0,149mm.

Após o período de crescimento, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel (Inlab, tipo 10), previamente tarado, a fim de se reter a massa micelial produzida. O filtrado recolhido foi distribuído em alíquotas de 1ml e mantido

congelado a -70°C , até o momento do uso. Para um dos isolados (58), recolheu-se o filtrado e determinou-se a atividade enzimática em intervalo compreendido entre o 2° e o 8° dia de crescimento. Para comparação das atividades enzimáticas, utilizou-se o filtrado de todos os isolados com 7 dias de crescimento.

4.3.3 - Determinação da atividade quitinolítica dos filtrados

Para determinação da atividade quitinolítica dos filtrados, procedeu-se da seguinte maneira: a cada tubo, contendo 1ml do filtrado, descongelado em banho de água a 37°C , foi adicionado 1ml de uma suspensão de "chitin azure" (Sigma) 2mg/ml, em tampão McIlvaine's (ácido cítrico-fosfato, pH 5,2). A mistura foi incubada a 37°C com agitação de 200 rpm. Após 10h, o conteúdo do tubo foi centrifugado a 3000g ($r_{av} = 7,0$), por 10 minutos, e uma alíquota de 100 μl do sobrenadante teve sua absorbância determinada a 575nm. O precipitado foi resuspendido e continuou-se a incubação por mais 12 horas, no fim das quais o procedimento anterior foi repetido. A absorbância foi determinada em "Micro Cell 8mm high" (Beckman), com espectrofotômetro Beckman DU 70.

A atividade enzimática é expressa pela variação ocorrida na absorbância do sobrenadante durante os períodos de incubação (10 e 22h).

4.3.4 - Planejamento experimental e análise estatístico-genética

Para um melhor controle ambiental, as 17 linhagens foram avaliadas em dois experimentos separados, contendo respectivamente 8 e 9 tratamentos. O

delineamento utilizado foi o de grupos (s) de experimentos inteiramente casualizados, tendo a linhagem 58 como testemunha comum. O número de repetições (r) foi três. Em um dos grupos, a testemunha foi considerada como uma das linhagens ensaiadas, a fim de que pudesse contribuir para a variabilidade total. O esquema da análise de variância combinada dos dois grupos é mostrado na Tabela 3. A análise dos dados e o ajuste das médias foram realizadas conforme o método proposto por Pimentel Gomes (1968).

Tabela 3. Esquema das análises de variância e covariância combinadas, com as esperanças dos quadrados médios (QM) e dos produtos médios (PM)

FV	GL	QM	E(QM)	PM	E(PM)
Entre Experimentos	1	QM _B	...	PM _B	...
Linhagens vs test./Exp 1	1	QM _C	...	PM _C	...
Entre linhagens / Exps	15	QM _S	V _E + 3V _G	PM _S	COV _E +3COV _G
Erro / Experimentos	36	QM _E	V _E	PM _E	COV _E
Total	53				

Os componentes da variância foram estimados dentro dos grupos do seguinte modo:

a) variância genética ($\hat{V}_G$) = (QM_S - QM_E) / r;

b) variância devida ao erro experimental ($\hat{V}_E$) = QM_E;

c) variância fenotípica entre as médias, dentro de grupos ($\hat{V}_P$) = QM_S / r.

Para avaliar a correlação entre os caracteres, os seguintes coeficientes foram obtidos:

a) correlação genotípica entre as linhagens:

$$(\hat{r}_G) = \text{CÔV}_{G(x,y)} / [\hat{V}_{G(x)} \hat{V}_{G(y)}]^{1/2};$$

b) correlação ambiental:

$$(\hat{r}_E) = \text{CÔV}_{E(x,y)} / [\hat{V}_{E(x)} \hat{V}_{E(y)}]^{1/2};$$

c) correlação fenotípica:

$$(\hat{r}_P) = [\text{CÔV}_{G(x,y)} + \text{CÔV}_{E(x,y)}] / \{[\hat{V}_{G(x)} + \hat{V}_{E(x)}][\hat{V}_{G(y)} + \hat{V}_{E(y)}]\}^{1/2}$$

As covariâncias foram obtidas da análise da variância da soma das variáveis ($z = x + y$) (Kempthorne, 1966).

Estimativas da variância do erro da média ajustada de qualquer tratamento, com "c" tratamentos comuns por grupo e "s" grupos com "r" repetições:

$$\hat{V}_{(Y)} = (\text{QM}_E / r) / [1 + (1/c) \cdot (1 - 1/s)]$$

com $c = 1$, no presente caso.

Para a comparação entre médias ajustadas de tratamentos, as seguintes variâncias foram estimadas:

a) do contraste entre duas médias de tratamentos regulares dentro de grupos:

$$(\hat{V}_W) = 2\text{QM}_E / r$$

b) do contraste entre dois tratamentos regulares de grupos diferentes:

$$(\hat{V}_D) = (2QM_E / r) \cdot (1 + 1/c)$$

4.3.5 - Estimativa de parâmetros adicionais

Os seguintes parâmetros adicionais foram estimados:

- a) herdabilidade ao nível individual: $(\hat{h}^2) = \hat{V}_G / (\hat{V}_G + \hat{V}_E)$ e ao nível de médias: $(\hat{h}_m^2) = \hat{V}_G / \hat{V}_P$
- b) Ganho esperado pela seleção direta: $(\hat{G}_S) = K (\hat{V}_G / \hat{V}_P^{1/2})$ para um K médio de 0,96 {com amostras pequenas, $K = 0,91$, para seleção de 3 em 8 linhagens (3/8) e 1,00 para seleção de 3 entre 9 linhagens (3/9)} (Fisher & Yates, 1966).
- c) Ganho porcentual esperado pela seleção em relação à média do caráter:
 $(\hat{G}_S\%) = (\hat{G}_S / Y_0) 100$, sendo Y_0 a média inicial do caráter.

4.3.6 - Coeficiente de correlação de Spearman

Como foi feita a determinação da atividade quitinolítica apresentada pelos isolados, utilizando-se dois períodos de incubação com o substrato, calculou-se o coeficiente de correlação de Spearman (Steel & Torrie, 1960) para verificação da coincidência dos dados obtidos.

4.4 - Avaliação da produção de proteases durante o desenvolvimento e a autólise de culturas submersas de *M. anisopliae*

4.4.1 - Origem e manutenção das linhagens

As duas linhagens de *M. anisopliae* utilizadas neste experimento (CLII e 22) foram caracterizadas anteriormente (Tabela 1). Os esporos foram obtidos crescendo-se os isolados sobre MCS (Pontecorvo *et alii*, 1953) a 28°C, por 12 dias.

4.4.2 - Obtenção dos filtrados de cultura e determinação de suas atividades enzimáticas

Erlenmeyers de 50ml, contendo 30ml de meio de cultura, foram inoculados com 3ml de uma suspensão, contendo 3×10^7 conídios por ml, em uma solução aquosa contendo 0,85% (p/v) de NaCl e 0,002% (v/v) de Tween-20. A seguir, os mesmos foram incubados a 28°C, com agitação de 150rpm, por períodos variáveis de tempo (1 a 16 dias). Depois de cada período de incubação, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel Inlab tipo 10, previamente tarado, a fim de se reter a massa micelial produzida. O filtrado coletado foi dividido em alíquotas de 1ml e armazenado a -70°C. A presença de possíveis contaminantes ao longo de todo o experimento foi monitorada através da observação microscópica do filtrado e do plaqueamento em MCS de alíquotas do meio. Controles, contendo apenas o meio de cultura, foram utilizados para a verificação das alterações nos volumes dos meios ao longo dos 16 dias de incubação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Foram utilizados dois meios de cultura: 1 - Meio repressor {MML, com a concentração de glicose reduzida a 0,5% (p/v)} e 2 - Meio indutor {MML, sem NaNO_3 e com caseína a 0,5% (p/v), em substituição à glicose}.

4.4.3 - Determinação da atividade proteolítica contra caseína

A atividade caseinolítica foi determinada da seguinte maneira: ao filtrado descongelado a 30°C adicionou-se 1ml de uma solução de caseína (Hammarsten, livre de vitaminas) a 2% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0. A mistura foi incubada a 30°C, por 15 minutos, sem agitação. A reação foi paralisada pela adição de 5ml de uma solução de ácido tricloroacético a 10% (p/v) e as amostras foram deixadas em repouso a 25°C por 1 hora. Após centrifugação a 3000g ($r_{av} = 7,0$ cm), por 15 minutos, o sobrenadante foi filtrado em papel Inlab tipo 10 e teve sua absorbância determinada a 280nm. Controles, nos quais o ácido tricloroacético foi adicionado ao filtrado de cultura antes da adição do substrato, foram feitos em paralelo para todos os tratamentos.

Como branco, foi usada uma mistura, contendo 1ml de tampão, em substituição ao filtrado, tratada da mesma maneira. A atividade enzimática é dada pela variação ocorrida na absorbância do sobrenadante, durante o período de incubação x 10.

4.4.4 - Determinação da atividade proteolítica contra elastina

A atividade elastolítica do filtrado foi determinada da seguinte maneira: ao filtrado de cultura descongelado a 30°C foram adicionados 4ml de tampão

Tris-HCl 0,05M pH 8 e 6mg de elastina Congo red (Sigma). A mistura foi agitada vigorosamente por 10 segundos e incubada a 30°C, por 30 minutos. A seguir, foi centrifugado a 5000 g ($r_{av} = 7,0\text{cm}$), por 10 minutos.

O sobrenadante foi filtrado em papel Inlab tipo 10 e teve sua absorbância determinada a 450nm. Controles, nos quais o substrato foi suprimido da mistura de reação, foram feitos em paralelo para todos os tratamentos. Como branco utilizou-se o tampão. A atividade enzimática é dada pela variação ocorrida na absorbância do sobrenadante, durante o período de incubação x 100.

4.4.5 - Determinação da glicose residual

O total de açúcares redutores (glicose residual) presentes no meio repressor, ao longo do crescimento, foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Nelson (1944).

4.4.6 - Determinação da massa seca e da autólise

A massa seca, produzida em 30ml de meio de cultura, foi obtida pela secagem do micélio em estufa a 70°C, por 72 horas.

A autólise foi determinada como descrito por Reyes & Lahoz (1977b). O grau de autólise foi definido como sendo a porcentagem da perda de massa seca micelial entre o dia do máximo crescimento (usado como ponto inicial da autólise) e o dia no qual a amostra foi avaliada.

4.4.7 - Eficiência do crescimento

A eficiência do crescimento nas duas fontes de carbono foi estimada pelo coeficiente econômico (CE), que é dado pela fórmula:

$$CE = \frac{\text{Peso seco micelial (mg)}}{\text{Quantidade da fonte de carbono consumida (mg)}}$$

4.5 - Determinação do consumo de oxigênio por *M. anisopliae* durante a germinação e o desenvolvimento

4.5.1 - Linhagem de *M. anisopliae* utilizada e preparação do inóculo

A linhagem utilizada nas avaliações respirométricas foi a CLII (Tabela 1). Os esporos foram recolhidos de colônias com 12 dias, as quais foram crescidas em placas sobre MCS, a 28° C. Os esporos foram suspensos em uma solução contendo 0,85% (p/v) de NaCl e 0,002% (p/v) de tween 80. A seguir, a suspensão foi filtrada em camadas múltiplas de gase, a fim de se reterem possíveis fragmentos de micélio. Posteriormente, os conídios foram lavados duas vezes e resuspensos em solução de mesma composição. A concentração de conídios foi ajustada para 3×10^6 conídios por ml de suspensão com ajuda de hematímetro.

4.5.2 - Substratos avaliados

O consumo de oxigênio, durante a germinação e as fases subseqüentes do desenvolvimento das culturas, foi avaliado em meios contendo diversos substratos orgânicos, que serviram como única fonte de carbono e energia.

Nos experimentos respirométricos foram utilizados os substratos descritos a seguir:

- a) Açúcares: glicose; N-acetilglicosamina (Sigma) e quitina ("purified powder from Crab shells", Sigma, preparada como descrito no item 4.3.2).
- b) Proteínas: caseína (seg. Hammarstem, livre de vitaminas); caseína hidrolizada (Bacto casamino acids, Difco); gelatina ("type A: from porcine skin", Sigma); elastina ("from bovine neck ligament, powder", Sigma, preparada como descrito no item 4.3.2).
- c) Aminoácidos: L-cistina; DL-serina; L-prolina; D-prolina; L-alanina e L-ácido glutâmico. Utilizaram-se apenas aminoácidos da marca Sigma.

Os substratos foram adicionados individualmente ao MML, sem glicose, na concentração de 0,25% (p/v). O pH do meio foi ajustado, em todos os casos, para 6,5, com solução de NaOH 2 N. Os meios foram autoclavados em balões volumétricos de 50ml (121° C, 20 minutos). O volume foi reajustado, após a autoclavagem, com água destilada estéril.

4.5.3 - Avaliação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi determinado em respirômetro diferencial Gilson. Os procedimentos básicos adotados nos experimentos de respirometria foram descritos por Destéfano (1993). A fim de se reter o CO₂ liberado durante a respiração, foram utilizados 400µl de solução de KOH a 30% (p/v), distribuídos da seguinte maneira: 200µl foram colocados no vaso central do frasco de reação e 200µl foram colocados no braço lateral. Com o propósito de aumentar a superfície de retenção, foram colocados pedaços retangulares de papéis de filtro no vaso central (3 x 2 cm) e no braço lateral (2 x 1 cm). Em cada frasco de reação, foram colocados 4,5 ml de meio de cultura e 0,5 ml de inóculo, de modo que a concentração final da fonte de carbono ficou sendo 0,225% (p/v) e a concentração de conídios 3×10^6 conídios por ml de meio.

O respirômetro foi preparado e ligado 1 hora antes do início do experimento, para que todo o sistema pudesse entrar em equilíbrio térmico. Durante os experimentos, todo o sistema foi mantido em banho a $28^\circ \pm 0,1^\circ \text{C}$, sob agitação de 50 oscilações por minuto. As leituras foram feitas diretamente em µl de oxigênio consumido, em intervalos médios de 2 horas.

Nos experimentos de respirometria, foram utilizados dois tipos de controles. Em um dos controles (controle 1), a fim de se estimar a respiração endógena, a suspensão de conídios, preparada como descrito no item 4.5.1, foi inoculada em meio sem a fonte exógena de carbono. No segundo (controle 2), com o objetivo de se detectarem possíveis efeitos de resíduos do tween 80, provenientes do inóculo, no meio de cultura, a suspensão de conídios foi preparada usando-se apenas solução de NaCl a 0,85% (p/v) e inoculada em meio sem fonte exógena de carbono.

4.5.4 - Obtenção dos filtrados de culturas e determinação da massa seca

Quando necessário, a massa seca produzida nos experimentos respirométricos foi determinada como descrito a seguir. Os frascos de reação foram desconectados do aparelho e o meio de cultura foi retirado e filtrado em papel previamente lavado e tarado (Inlab tipo 10). A seguir, com o auxílio de micropipeta, retirou-se cuidadosamente a solução de KOH e os papéis de filtro. O vaso central e o braço lateral foram, então, lavados com água destilada e secos com papel absorvente. Posteriormente, com o auxílio de espátula e de lavagens sucessivas do frasco de reação, foi retirado o restante do micélio, que, após lavagens com água destilada estéril, foi seco em estufa como descrito no item 4.3.6. O pH do meio foi medido com o auxílio de papel indicador. A presença de possíveis contaminantes foi checada tanto por observações ao microscópio, como por plaqueamento de alíquotas do meio em placas contendo MCS.

A concentração de açúcares redutores totais (glicose residual), presentes no meio contendo glicose como fonte de carbono, foi determinada ao longo do período de crescimento e autólise como descrito no item 4.4.5.

4.5.5 - Determinação da germinação

Foram feitos experimentos específicos, em respirômetro, para o acompanhamento da germinação dos conídios nos meios contendo as diversas fontes de carbono e nos dois controles (descritos no item 4.5.3). Cada experimento foi montado como descrito em 4.5.3 e, após períodos de

incubação, que variaram de 6 a 14 horas, os frascos de reação foram desconectados para que alíquotas do meio pudessem ser retiradas. Três amostras aleatórias de pelo menos 100 conídios foram observadas para a determinação da porcentagem de conídios germinados. Os conídios foram considerados germinados quando apresentavam um tubo germinativo discernível.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Marcadores moleculares

5.1.1 - Análise do DNA de *M. anisopliae* através de RAPD

Foram determinados os padrões de amplificação de 8 linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e duas linhagens de *M. anisopliae* var. *majus* para 8 diferentes "primers". Todos os "primers" (Tabela 2) usados foram capazes de amplificar bandas polimórficas em todas as linhagens de *M. anisopliae* e produziram diferentes padrões de amplificação (Figura 1). Foram observados alguns casos de linhagens que apresentaram os mesmos padrões de amplificação para alguns dos "primers", mas não se observaram duas linhagens apresentando os mesmos padrões de amplificação para todos os "primers". Por exemplo: as linhagens E₉ e 157p apresentaram os mesmos padrões de amplificação para os primers OPM-4, OPM-5, OPM-6, OPM-9 e OPM-15, mas diferentes padrões para os primers OPM-7 e OPM-8. Estes resultados reafirmaram a possibilidade da utilização do RAPD para a obtenção de "fingerprints" genômicos no gênero *Metarhizium* (Fegan *et alii*, 1993; Bidochka *et alii*, 1994; Tigano-Milani *et alii*, 1995). O maior número de fragmentos amplificados foi obtido com o "primer" OPM-3 (12 bandas) e o menor com o primer OPM-4 (2 bandas). Em média, foram geradas 6,5 bandas polimórficas por "primer". Embora tenha sido demonstrado que, em alguns casos, a variação na concentração de DNA afeta de maneira significativa a reprodutibilidade das reações de amplificação (Davin-Regli *et alii*, 1995), não foram verificadas alterações nos padrões de amplificação quando foi usado Ing

ou 0,5 ng de DNA molde por µl de reação. O grande número de marcadores moleculares possíveis de serem obtidos através do RAPD abre a perspectiva de se encontrarem marcadores que apresentem ligação com as complexas características fisiológicas (de natureza multifatorial) relacionadas à virulência e à especificidade do fungo. Isso tornaria possível a seleção indireta através dos marcadores moleculares, com grandes benefícios para os programas de melhoramento genético da espécie. A associação de marcadores de DNA com características fisiológicas complexas, como a virulência, tem sido realizada com sucesso em algumas espécies de fungos fitopatogênicos (Chen *et alii*, 1993).

A identificação individual de linhagens através da utilização dos "fingerprintings" genômicos apresenta uma série de aplicações práticas para os programas de melhoramento genético de fungos entomopatogênicos. Ela torna possível o acompanhamento individual de linhagens utilizadas em ensaios de competição no campo e a distinção entre as linhagens ensaiadas e as autóctones. Ensaios de persistência ambiental também poderão ser conduzidos de maneira mais precisa e segura. A identificação através de marcadores RAPD também contribuirá para a verificação da estabilidade genética das linhagens de *M. anisopliae* mantidas em bancos de germoplasma por longos períodos de tempo.

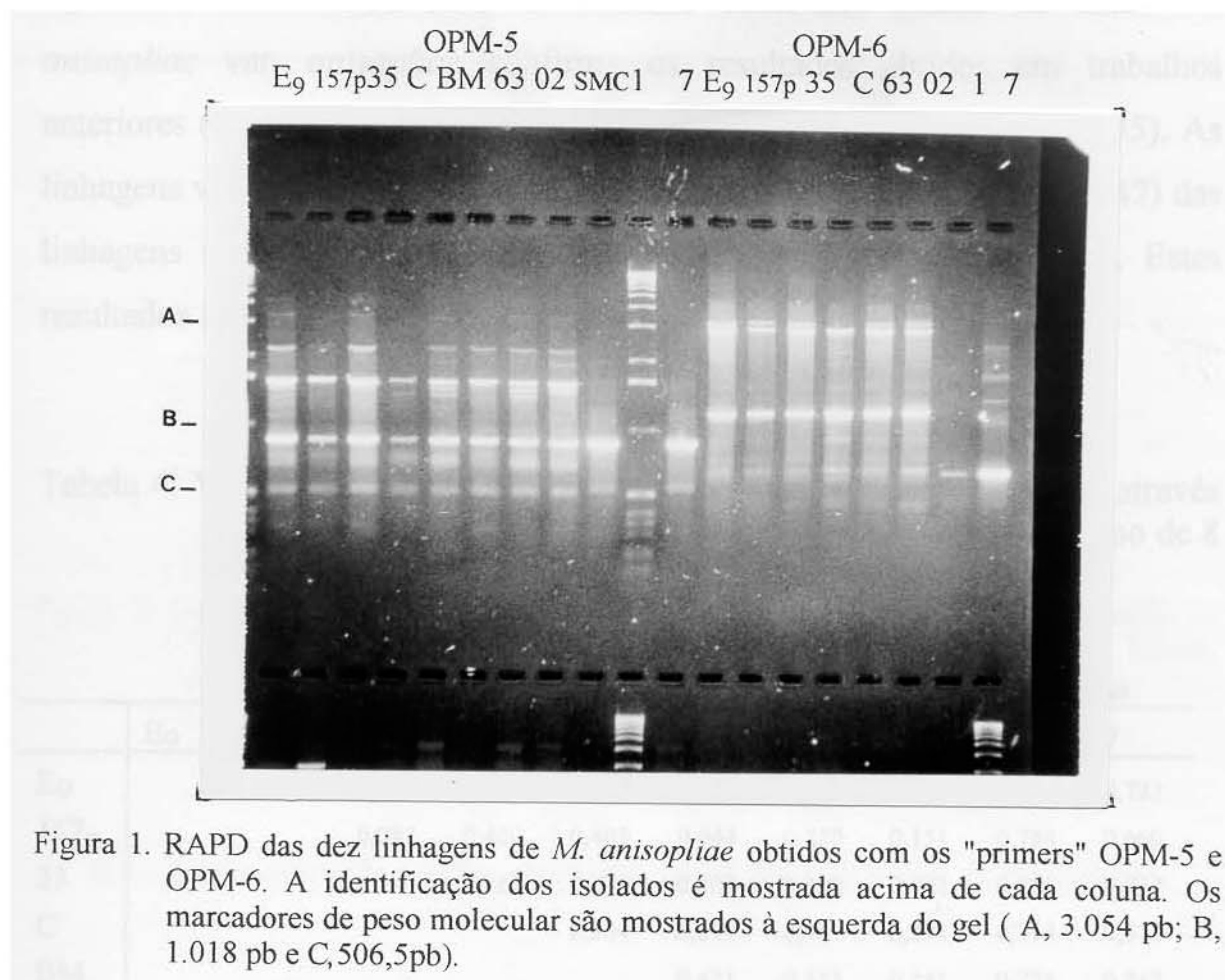


Figura 1. RAPD das dez linhagens de *M. anisopliae* obtidos com os "primers" OPM-5 e OPM-6. A identificação dos isolados é mostrada acima de cada coluna. Os marcadores de peso molecular são mostrados à esquerda do gel (A, 3.054 pb; B, 1.018 pb e C, 506,5pb).

5.1.2 - Análise dos dados de RAPD

Uma matriz foi construída com os valores de distância genéticas entre todas as linhagens avaliadas (Tabela 4). Para a construção da matriz de distâncias, foram analisadas 52 bandas polimórficas. As linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* mostraram uma distância genética média de 0,2416 (dp 0,1416). A maior distância entre duas linhagens var. *anisopliae* (0,4839)

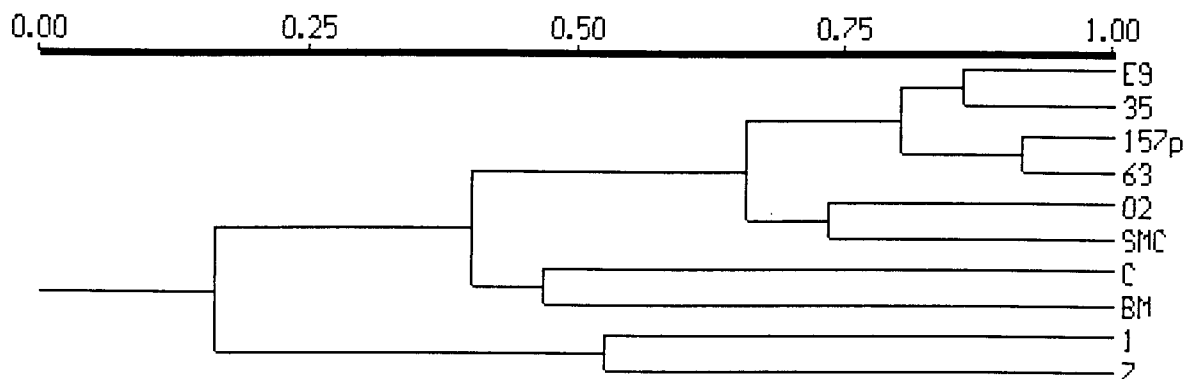


Figura 2. Dendrograma gerado pelo UPGMA usando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard, no programa NTSYS-pc. A análise foi baseada em 52 bandas polimórficas.

5.2 - Estimativa de parâmetros genéticos da produção de quitinases

5.2.1 - Cinética da produção de quitinases

A Figura 3 mostra a variação na atividade quitinolítica apresentada pelo filtrado de cultura da linhagem 58, em função do tempo de crescimento. O aumento na atividade foi crescente até o 8º e último dia avaliado. Em experimentos semelhantes, St. Leger *et alli* (1986c) obtiveram resultados parecidos para as enzimas β -N-acetilglucosaminidase e quitinase.

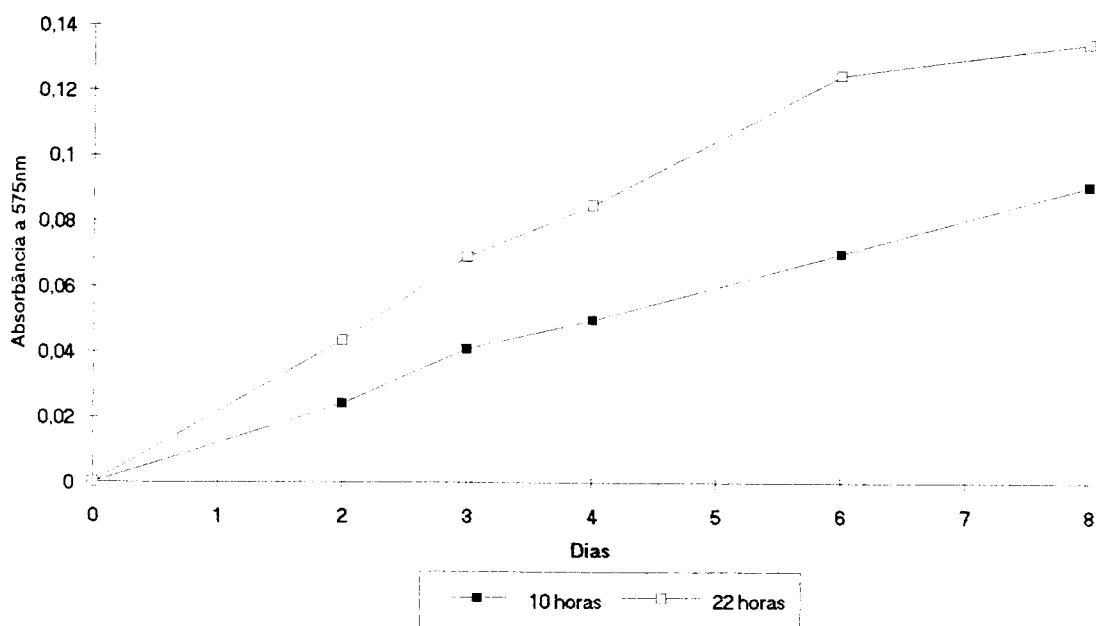


Figura 3. Atividade quitinolítica presente nos filtrados de culturas da linhagem 58. A atividade é dada pela variação na absorbância do sobrenadante determinada após 10 e 22 horas de incubação com o substrato.

5.2.2 - Médias e dispersão dos caracteres avaliados

Os isolados ensaiados apresentaram alta viabilidade, que variou entre 96,0 e 98,0%.

Na Tabela 5, são mostradas as médias ajustadas de três repetições referentes aos caracteres avaliados nas 17 linhagens. Os resultados mostraram a presença de grande variabilidade intra-específica para a produção de quitinases, sendo que a maior atividade determinada mostrou-se aproximadamente 5 vezes superior à menor quando a avaliação foi feita após 12 horas de incubação com o substrato e 6,5 vezes superior quando a avaliação foi feita após 22 horas. Da mesma maneira, a estimativa da variância genética, como pode ser observado na Tabela 6, foi 3,7 vezes maior quando a avaliação

da atividade foi feita após 22h de incubação. O coeficiente de correlação de Spearman entre as duas avaliações foi de 0.958 (para um t de 12,94**).

Tabela 5. Médias ajustadas das 17 linhagens de *M. anisopliae* para atividade quitinolítica. Erro de médias ajustadas $\sqrt{\bar{v}_{(Y)}}$ e erro da diferença entre as médias de dois tratamentos: $\sqrt{\bar{v}_w}$ (do mesmo grupo); $\sqrt{\bar{v}_D}$ (de grupos diferentes)

Linhagem	Experimento	Atividade quitinolítica ^a	
		A	B
(58) ^b	1	0.0828	0.1600
63	1	0.0712 (7°) ^c	0.1278 (8°) ^c
E ₆	1	0.0453 (14°)	0.0935 (13°)
70	1	0.1190 (2°)	0.1834 (2°)
38	1	0.0294 (16°)	0.0442 (16°)
E ₆	1	0.0961 (3°)	0.1631 (4°)
SMC	1	0.0740 (6°)	0.1535 (6°)
02	1	0.0553 (10°)	0.1025 (10°)
29	1	0.0522 (11°)	0.0795 (14°)
(58)	2	0.0925 (4°)	0.1695 (3°)
47	2	0.0458 (13°)	0.0998 (11°)
P	2	0.0309 (15°)	0.0695 (15°)
157 _p	2	0.0688 (8°)	0.1437 (7°)
CLII	2	0.1340 (1°)	0.2812 (1°)
73	2	0.0785 (5°)	0.1543 (5°)
20	2	0.0505 (12°)	0.0962 (12°)
22	2	0.0261 (17°)	0.0430 (17°)
35	2	0,0622 (9°)	0,1230 (9°)
Média geral			
Dos experimentos		0.0675	0.1271
Das 17 linhagens (Y ₀) ^d		0.0663	0.1249

$\sqrt{\hat{V}_{(Y)}}$		0.0056	0.0056
$\sqrt{\hat{V}_W}$		0.0065	0.0065
$\sqrt{\hat{V}_D}$		0.0091	0.0091

- a Variação na absorbância a 575nm, após 10h e 22h de incubação com o substrato.
b Média não ajustada da linhagem controle.
c "Ranking" das médias das linhagens.
d Inclui a média ajustada da linhagem 58 no experimento 2.

Tabela 6. Quadrados médios das análises de variância da atividade quitinolítica. Significância pelo teste F e coeficientes de variação

FV	Atividade quitinolítica ^a	
	A	B
Linhagens / Experimentos	0.00292**	0.01072**
Linhagens vs Test / Exps	0.00105**	0.00571**
Erro / Experimentos	0.00006	0.00006
Coeficientes de variação (%)	11.9	6.3

- a Variação na absorbância a 575nm após 10h (A) e 22h (B) de incubação com o substrato.

** Significativo ao nível de 1%.

5.2.3 - Análise da variância

Os resultados da análise da variância a que foram submetidos os dados com os valores dos quadrados médios, coeficientes de variação e significância relativa ao teste F são apresentados na Tabela 6. Os resultados indicaram a presença de uma variação genética significativa entre as linhagens para os caracteres avaliados.

As estimativas das variâncias fenotípicas e de seus componentes são mostrados na Tabela 7. A Tabela 8 mostra as estimativas da herdabilidade ($\hat{h}^2$ e $\hat{h}_m^2$) e as estimativas dos ganhos esperados na seleção ($\hat{G}_S$ e $\hat{G}_S\%$). Estes valores mostram que a atividade quitinolítica tem uma forte determinação genética. Portanto, a seleção entre os isolados deve promover um considerável melhoramento. De fato, com base no período de 12 horas de incubação, a expectativa é de que as linhagens selecionadas sejam 44,19% superiores à média dos 17 isolados iniciais. Após 22 horas de incubação, a seleção mostrou-se mais eficiente, com um ganho esperado de 45,68%.

Tabela 7. Estimativas das variâncias fenotípicas entre médias de linhagens ($\hat{V}_P$), variâncias genotípicas ($\hat{V}_G$) e variâncias devidas ao erro experimental ($\hat{V}_E/r$)

Caracteres	($\hat{V}_P$)	($\hat{V}_G$)	($\hat{V}_E/r$)
Atividade quitinolítica ^a	0.00097	0.00095	0.00002
Atividade quitinolítica ^b	0.00357	0.00355	0.00002

^a Variação na absorbância a 575nm, após 10h de incubação com o substrato.

^b Variação na absorbância a 575nm, após 22h de incubação com o substrato.

Tabela 8. Estimativas dos ganhos esperados na seleção e das herdabilidades

	Atividade quitinolítica ^a	
	A	B
$\hat{G}_S$	0.0293	0.0571
$\hat{G}_S\%$	44.19	45.68
$\hat{h}^2$	0.938	0.983
$\hat{h}_m^2$	0.978	0.994

^a Variação na absorbância a 575nm depois de 10h (A) e 22h (B) de incubação com o substrato.

O estudo da regulação de enzimas quitinolíticas em *M. anisopliae*, realizado por St. Leger *et alii* (1986c), mostrou que os indutores mais eficientes para quitinase e quitosanase são a N-acetilglucosamina e a glucosamina. Estes dois monômeros são liberados quando meios de cultura contendo quitina são autoclavados; tais monômeros já haviam sido identificados por Smith & Grula (1983) como indutores da síntese de quitinases em *Beauveria bassiana*.

O meio de cultura utilizado, contendo 1% (p/v) de quitina e esterilizado por autoclavagem, visou, portanto, à indução da atividade quitinolítica, sendo os resultados obtidos válidos, a princípio, para estas condições e por esse período de crescimento. Estas condições são, evidentemente, diferentes das encontradas *in vivo*, nos estágios iniciais de infecção, onde a produção de quitinases poderia trazer benefícios à virulência dos isolados.

O estudo quantitativo da atividade proteolítica (Braga *et alii* 1994) e quitinolítica realizado neste trabalho, acompanhado da estimativa de seus parâmetros genéticos, fornece subsídios a programas que visem ao melhoramento destes caracteres, bem como a programas de identificação individual de isolados. Deve-se lembrar, entretanto, que os mesmos são apenas

componentes de uma característica fenotípica complexa, que é a virulência apresentada por um determinado isolado contra uma população hospedeira, em condições ambientais específicas. É importante ressaltar que, no caso de fungos entomopatogênicos, o objetivo final do programa de melhoramento pode ser o aumento da virulência. Uma das formas de se conseguir isso é através do melhoramento de caracteres a ela correlacionados.

A metodologia utilizada na determinação da atividade quitinolítica, através do uso de quitina "azure" como substrato e posterior determinação da absorbância do sobrenadante, não permite a análise individual de todas as enzimas envolvidas no processo hidrolítico da quitina. As atividades determinadas dessa maneira avaliam, portanto, a ação conjunta das enzimas do complexo quitinolítico produzidas por cada isolado. A vantagem da utilização desse substrato, segundo Hackman & Goldberg (1964), seria o fato de o mesmo não se apresentar parcialmente degradado. Substratos como as quitinas coloidais, por sofrerem degradação parcial durante a preparação, poderiam ser hidrolizados por enzimas, sem a capacidade de hidrolizar o substrato nas suas formas de ocorrência natural.

A alta variabilidade encontrada pode ser atribuída à grande heterogeneidade genética existente entre os isolados, já que os mesmos não sofreram previamente nenhum processo de seleção para a característica. As estimativas das variâncias genotípicas foram as maiores componentes das estimativas das variâncias fenotípicas, fazendo com que os coeficientes de herdabilidade estimados fossem bastante altos. O alto valor do ($\hat{h}_m^2$) para a atividade quitinolítica indica que a população pode ser facilmente melhorada para a característica, com a obtenção de progressos significativos, através da seleção fenotípica simples. Apesar de o coeficiente de correlação de Spearman ter sido bastante alto, o menor CV e o maior $\hat{G}_S\%$ obtidos, quando

a atividade quitinolítica dos filtrados foi avaliada, após 22h de incubação com o substrato, indicam que a seleção de linhagens pode ser realizada utilizando-se esse período de incubação.

Espera-se que este tipo de análise genética de caracteres envolvidos nos processos de infecção e colonização do hospedeiro possa auxiliar o desenvolvimento de programas que visem à obtenção de linhagens mais eficientes no controle biológico. Esse tipo de análise pode ser realizada facilmente em outros fungos entomopatogênicos nos quais os determinantes de patogenicidade e as interações patógeno-hospedeiro sejam semelhantes aos apresentados por *M. anisopliae*.

5.3 - Análise da produção de proteases durante o desenvolvimento e a autólise de culturas submersas de *M. anisopliae*

5.3.1. Crescimento e autólise

Os fungos têm sido usados extensivamente como produtores de diversas substâncias como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides. Em muitos casos, alguns desses metabólitos produzidos em cultura podem desempenhar papel importante em processos fisiológicos apresentados pelo microrganismo no meio ambiente. Esse é o caso das enzimas e toxinas produzidas em cultura pelo deuteromiceto entomopatogênico *M. anisopliae*, que se mostram importantes durante os processos de penetração e morte do hospedeiro. Entretanto, a avaliação da produção dessas substâncias e o uso desses parâmetros em programas de seleção e melhoramento genético de

linhagens dependem do conhecimento de aspectos básicos relacionados à cinética de seu desenvolvimento em cultura.

Diversos trabalhos têm associado a produção de proteases (mais especificamente quimoelastases com ação sobre cutículas de insetos, ou proteases com ação tóxica) à virulência apresentada por *M. anisopliae* (Kucera, 1980, 1981, 1984; St. Leger *et alii*, 1987; Goettel *et alii*, 1989). A existência de uma grande variabilidade genética para a produção dessas enzimas também tem sido verificada (Braga *et alii*, 1994). Por motivos práticos, a maioria dos trabalhos que estudam a produção de enzimas limitam-se a uma única avaliação realizada após um determinado período de crescimento. Nesses casos, pode-se supor que fatores como as diferenças entre as curvas de crescimento dos isolados, bem como outras variações fisiológicas, podem prejudicar as comparações e a seleção para a característica de interesse.

A Tabela 9 mostra a produção de massa seca pelas linhagens 22 e CLII, crescendo em meio contendo 0,5% (p/v) de glicose como única fonte de carbono. A máxima produção de massa seca ocorreu no 5º dia de incubação para ambas as linhagens. A produção máxima de massa seca pela linhagem CLII (71,0 mg/frasco) foi menor, representando 81,7% da produção máxima alcançada pela linhagem 22 (87,3 mg/frasco).

A Figura 4 mostra que o esgotamento da glicose exógena ocorreu por volta do 5º dia de crescimento ; no 7º dia já foi possível verificar a ocorrência de autólise nas duas linhagens. O início da autólise, após o esgotamento da fonte exógena de carbono, tem sido observado, em maior ou menor extensão, em diversas espécies de fungos filamentosos (Lahoz & Ibeas, 1968; Lahoz *et alii*, 1977; Alfonso *et alii*, 1991).

Tabela 9. Variações no pH, na glicose disponível no meio e grau de autólise durante a incubação das linhagens 22 e CLII, em meio contendo 0,5% (p/v) de glicose como única fonte de carbono. Cada dado corresponde à média de três repetições

Linhagem 22				
Tempo de Inc. (dias)	Massa seca (mg)	Grau de autólise (%) ^a	Glicose no meio (mg/ml)	pH do meio
0	-	-	5,193	6,5
1	20,5 (5,1)	-	3,661	6,6
2	31,5 (6,1)	-	3,083	6,7
3	45,3 (7,4)	-	1,719	6,9
5	87,5 (8,7)	-	0,041	7,8
7	82,6 (4,2)	5,6	0,035	7,9
9	63,9 (0,5)	27,0	0,032	8,1
13	51,8 (4,1)	40,8	0,026	8,2
16	41,6 (2,5)	52,4	0,023	8,4
Linhagem CLII				
0	-	-	5,193	6,5
1	18,6 (3,1)	-	3,773	6,6
2	36,3 (2,0)	-	2,750	6,7
3	61,5 (12,0)	-	1,568	7,8
5	71,5 (8,5)	-	0,027	8,0
7	66,2 (11,8)	7,4	0,026	8,2
9	37,2 (1,0)	50,0	0,023	8,3
13	26,7 (0,6)	62,7	0,025	8,6
16	27,6 (1,7)	61,4	0,017	8,7

^a A autólise foi calculada em relação à maior produção de massa seca.

^b Desvio padrão.

Após 16 dias de crescimento (11 dias de autólise), a linhagem 22 apresentou um grau de autólise de 52,4% e a linhagem CLII uma autólise de 61,4%. Autólises nessas proporções são verificadas apenas quando ocorre a

degradação do citoplasma e das paredes celulares (Reyes & Lahoz, 1977). A Tabela 10 mostra a eficiência da utilização do substrato a partir do cálculo do coeficiente econômico. Pode-se observar que o coeficiente econômico variou consideravelmente em função do tempo de desenvolvimento das culturas. Para as duas linhagens, o maior coeficiente econômico foi observado no 5º dia de crescimento, onde ocorreu a maior produção de biomassa e a utilização total do substrato exógeno pelas culturas.

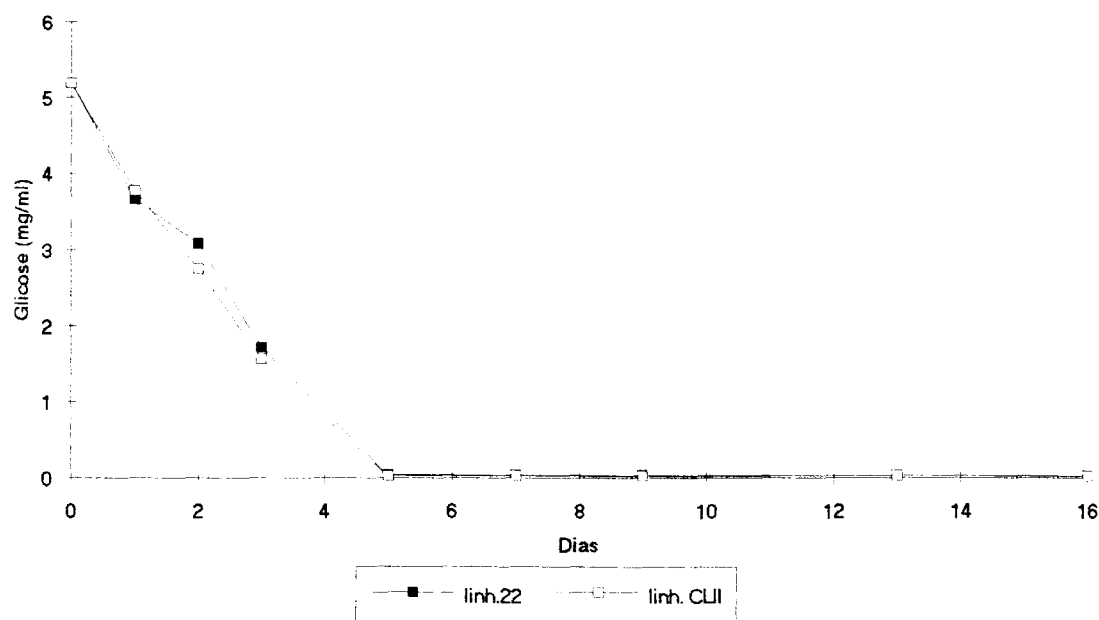


Figura 4. Variação nas concentrações de glicose disponíveis nos meios de cultura das linhagens 22 e CLII crescendo em meios contendo inicialmente glicose a 0,5% (p/v) como única fonte de carbono. Cada ponto representa a média de três repetições.

Segundo Reyes & Lahoz (1977), durante o crescimento ocorre um balanço entre a síntese e a lise dos polímeros que constituem as paredes. A falta

de nutrientes acarretaria o cessamento da síntese, provocando um deslocamento desse balanço em direção à lise das paredes das hifas, cuja consequência seria o início da autólise. Embora a glicose, enquanto presente no meio, reprima a síntese de exoenzimas hidrolíticas, tem sido mostrado que, após o início da autólise, a produção de enzimas hidrolíticas é induzida pela presença de oligômeros e monômeros solúveis presentes no meio. Estas substâncias são provenientes da degradação da parede celular e são encontradas em baixas concentrações no fluido de cultura, devido ao "turnover" de substâncias que ocorre durante a autólise (Reyes *et alii*, 1988). Outras variáveis externas, como a concentração inicial da fonte de carbono, natureza da fonte de nitrogênio, as condições da cultura, a temperatura, a razão entre o carbono e o nitrogênio presentes no meio e o pH também têm sido apontadas como capazes de influenciar a autólise (Lahoz & Miralles, 1970; Lahoz *et alii*, 1979).

A Tabela 11 mostra a produção de massa seca pelas linhagens 22 e CLII, crescendo em meio contendo 0,5% (p/v) de caseína como única fonte de carbono e nitrogênio. Novamente, a produção máxima apresentada pela linhagem 22 (102,9 mg/frasco) superou a produção da linhagem CLII (91,7 mg/frasco). Ambas apresentaram o pico de produção no 5º dia de crescimento. Os resultados de produção de massa seca apresentados na Figura 5 mostram que a caseína é uma fonte de carbono que pode ser utilizada de maneira mais eficiente por *M. anisopliae* do que a glicose, propiciando um crescimento mais rápido e uma maior produção de biomassa. Resultados similares têm sido descritos para outras espécies de fungos filamentosos (Kalisz *et alii*, 1986).

Tabela 10. Utilização de glicose pelas linhagens 22 e CLII em cultura submersa. Cada dado representa a média de três repetições

	Linhagem 22			Linhagem CLII		
Período de incubação (dias)	Glicose utilizada (mg)	Micélio formado (mg)	Coefficiente econômico	Glicose utilizada (mg)	Micélio formado (mg)	Coefficiente econômico
1	50,5 (6,3) ^a	20,5 (5,1)	40,2 (6,2)	46,8 (6,4)	18,6 (3,1)	40,0 (2,0)
2	69,6 (5,0)	31,5 (6,1)	44,9 (5,4)	80,6 (4,0)	36,3 (2,0)	45,5 (4,5)
3	114,6 (7,7)	45,3 (7,4)	39,5 (6,3)	119,6 (18,5)	61,5 (12,0)	51,0 (4,9)
5	170,0 (0,1)	87,5 (8,7)	51,5 (5,1)	170,5 (0,0)	71,5 (8,5)	41,9 (5,0)
7	170,2 (0,1)	82,6 (4,6)	48,5 (2,7)	170,5 (0,1)	66,2 (11,8)	38,8 (6,9)
9	170,3 (0,1)	63,9 (0,5)	37,5 (0,3)	170,6 (0,0)	37,2 (1,0)	21,8 (0,6)
13	170,5 (0,0)	51,8 (4,1)	30,4 (2,4)	170,6 (0,1)	26,7 (0,6)	15,6 (0,7)
16	170,5 (0,6)	41,6 (2,5)	24,4 (1,5)	170,8 (0,1)	27,6 (1,7)	16,1 (1,0)

^a Desvio padrão.

5.3.2 - Produção de proteases

A Tabela 11 e a Figura 6 mostram as variações nas atividades proteolíticas, presentes nos filtrados de cultura das duas linhagens, crescendo em meio contendo caseína a 0,5% (p/v) como única fonte de carbono e nitrogênio. Até o 2º dia, as linhagens apresentaram atividades proteolíticas semelhantes; a partir daí, a linhagem CLII teve suas atividades proteolíticas rapidamente aumentadas, com o máximo sendo atingido por volta do 5º dia. A seguir, ocorreu uma diminuição progressiva das atividades proteolíticas. A produção de proteases pela linhagem 22 aumentou de uma maneira muito mais

discreta, atingindo seu pico por volta do 9º dia de crescimento e decrescendo lentamente até o final do experimento. Estudos em outras espécies de fungos (Santamaria & Reyes, 1988) têm mostrado que, na maioria dos casos, a atividade proteolítica aumenta com a autólise. Entretanto, pode manter-se constante ou diminuir, como o ocorrido aqui, para as duas linhagens estudadas. A maior atividade caseinolítica alcançada pela linhagem CLII foi, em média, 6,7 vezes superior à alcançada pela linhagem 22. No caso da atividade elastolítica, a maior atividade verificada na linhagem CLII foi, em média, 2,8 vezes maior do que a alcançada pela linhagem 22. Resultados anteriores já haviam mostrado uma maior produção de proteases pela linhagem CLII em relação à linhagem 22 (Braga *et alii*, 1994). Comparando-se a Figura 5 com a Figura 6, pode-se verificar que a máxima atividade proteolítica presente no filtrado de cultura da linhagem CLII coincidiu com a maior produção de biomassa. No caso da linhagem 22, a máxima atividade proteolítica foi verificada após o início da autólise. A Figura 6 mostra também que as razões entre as atividades proteolíticas das duas linhagens variaram consideravelmente durante os estágios fisiológicos das culturas. A razão entre as atividades caseinolíticas apresentadas pelas linhagens CLII e 22 no 5º dia foi 19,78, decrescendo até o valor de 1,55, observado no 16º dia.

As Tabelas 9 e 11 mostram que, nos dois meios de cultura utilizados, houve um aumento progressivo no pH tanto durante a fase de crescimento como durante a autólise das duas linhagens. Santamaria & Reyes (1988), ao estudarem a produção de proteases durante a autólise de diversas espécies de fungos filamentosos, verificaram que a autólise ocorria em valores de pH entre 6.5 e 8. Segundo os autores, o fato de a autólise, nesses fungos, ocorrer em pH ligeiramente alcalino pode ser relacionado à produção de proteases neutras e alcalinas por fungos dos maiores grupos taxonômicos.

Tabela 11. Variações no pH, na atividade proteolítica do filtrado e grau de autólise durante a incubação das linhagens 22 e CLII em meio contendo 0,5% (p/v) de caseína como única fonte de carbono e nitrogênio. Cada dado representa a média de três repetições

Linhagem 22					
Tempo de incubação (dias)	Massa seca (mg)	Grau de autólise (%) ^a	Atividade proteol. vs. caseína ^b	Atividade proteol. vs. elastina ^c	pH do meio
1	27,2 (0,5) ^d	-	0,141	0,20	6,45
3	72,6 (0,3)	-	0,346	0,40	-
5	103,4 (0,6)	-	0,508	0,34	7,78
7	102,9 (7,2)	0,4	1,330	1,03	8,41
9	90,5 (3,2)	12,5	1,500	1,40	8,43
13	70,3 (4,4)	32,0	1,174	1,14	8,53
16	58,4 (1,5)	43,5	1,147	1,22	8,57
Linhagem CLII					
1	32,0 (1,8)	-	0,049	0,19	6,46
3	78,9 (4,2)	-	0,383	0,22	-
5	91,7 (4,2)	-	10,050	3,93	8,14
7	58,7 (1,5)	36,0	7,208	3,25	8,32
9	45,2 (4,6)	50,7	5,483	2,79	8,59
13	43,7 (1,6)	52,3	3,221	2,12	8,77
16	39,0 (1,7)	57,5	2,330	1,84	8,67

^a A autólise foi calculada em relação à maior produção de massa seca.

^b Atividade dada pela variação ocorrida na absorbância a 280nm, durante o período de incubação (15 minutos).

^c Atividade dada pela variação ocorrida na absorbância a 450nm, durante o período de incubação (30 minutos).

^d Desvio padrão.

Campbel *et alii* (1978) acompanharam o crescimento e a autólise de culturas de *M. anisopliae* em meio contendo asparagina como fonte de

nitrogênio e glicose como fonte de carbono. O pH do meio abaixou durante a fase de crescimento, atingindo o valor mínimo durante a fase de crescimento exponencial. Entretanto, do início ao final da autólise, o pH sofreu um aumento contínuo.

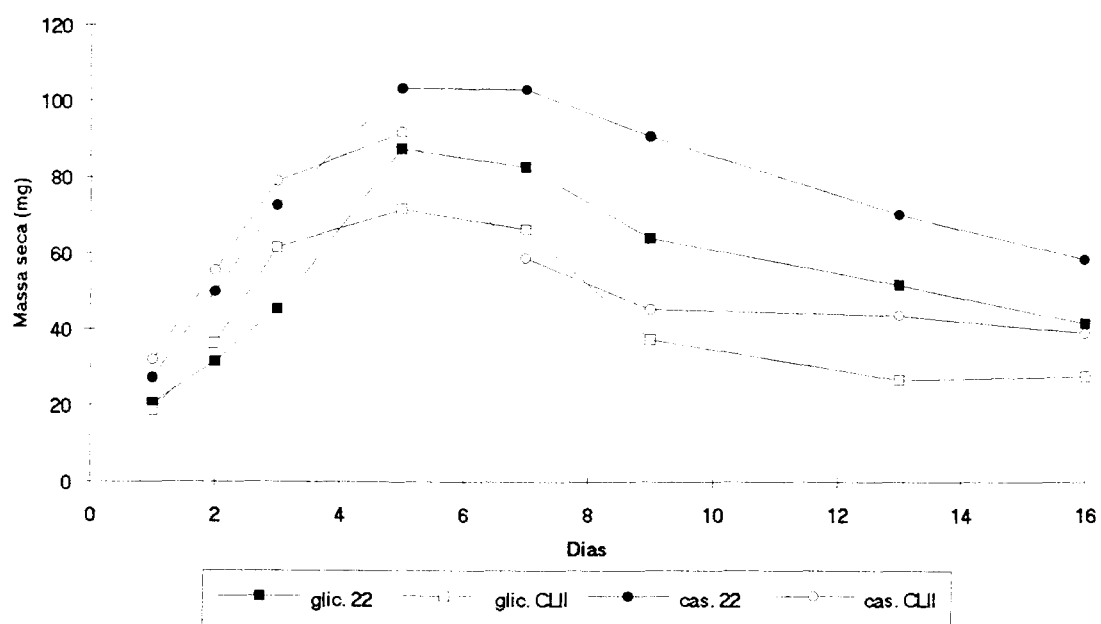


Figura 5. Curvas de crescimento das linhagens 22 e CLII em meios contendo glicose ou caseína a 0,5 % (p/v). Cada ponto representa a média de três repetições.

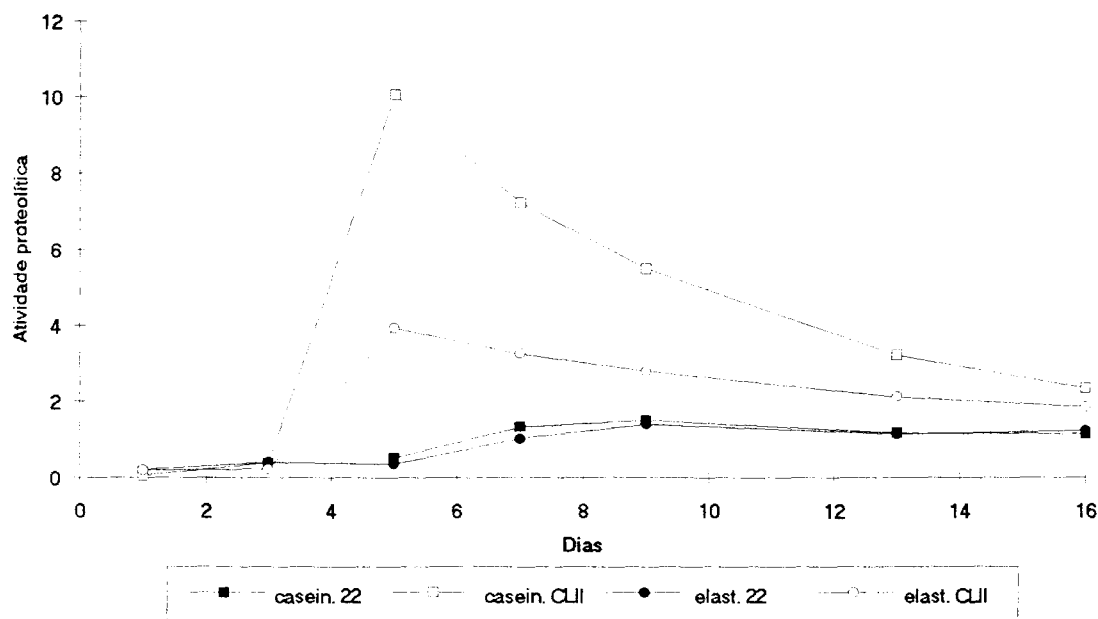


Figura 6. Atividades caseinolítica e elastolítica presentes nos filtrados de cultura das linhagens 22 e CLII, crescidas em meio contendo caseína a 0,5 % (p/v) como única fonte de carbono. Cada ponto representa a média de três repetições.

5.4 - Determinação do consumo de oxigênio por *M. anisopliae* durante a germinação e o crescimento

5.4.1. Correlações entre o consumo de oxigênio, o consumo de glicose e a produção de biomassa

A Figura 7 mostra a produção de massa seca e o consumo de glicose pela linhagem CLII, crescendo em meio contendo inicialmente 2,25 mg de glicose/ml. A maior produção de biomassa foi alcançada no 4º dia de crescimento (96h) e coincidiu com a exaustão da fonte de carbono, repetindo o

observado no item 5.3. A partir do 4º dia pode-se observar o início do processo de autólise.

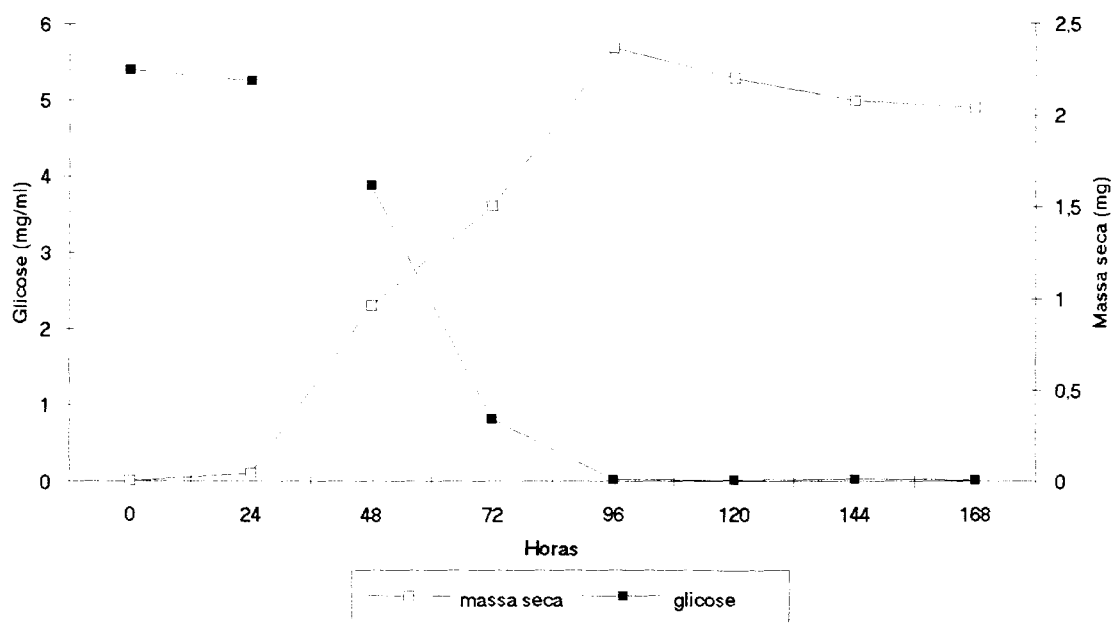


Figura 7. Produção de massa seca e consumo de glicose pela linhagem CLII, em respirômetro, crescendo em meio contendo glicose a 0,225 % (p/v) como única fonte de carbono. Cada ponto representa a média de duas repetições.

A Figura 8 mostra o consumo de oxigênio pela linhagem CLII nas mesmas condições de crescimento e o consumo de oxigênio pelos conídios, na ausência da fonte exógena de carbono. Pode-se observar que, após uma fase de aceleração, com duração de aproximadamente 40 horas, o consumo de oxigênio aumentou exponencialmente até por volta da 90ª hora e, em seguida, ocorreu uma fase de desaceleração brusca no consumo. Comparando-se a Figura 7 com a Figura 8, pode-se verificar uma coincidência entre as fases de consumo exponencial de glicose e oxigênio e a fase de produção exponencial de biomassa. A exaustão da fonte exógena de carbono coincidiu com a brusca

queda no consumo de oxigênio. O consumo de oxigênio para a oxidação das reservas endógenas dos conídios correspondeu a cerca de 4,6% do consumo total.

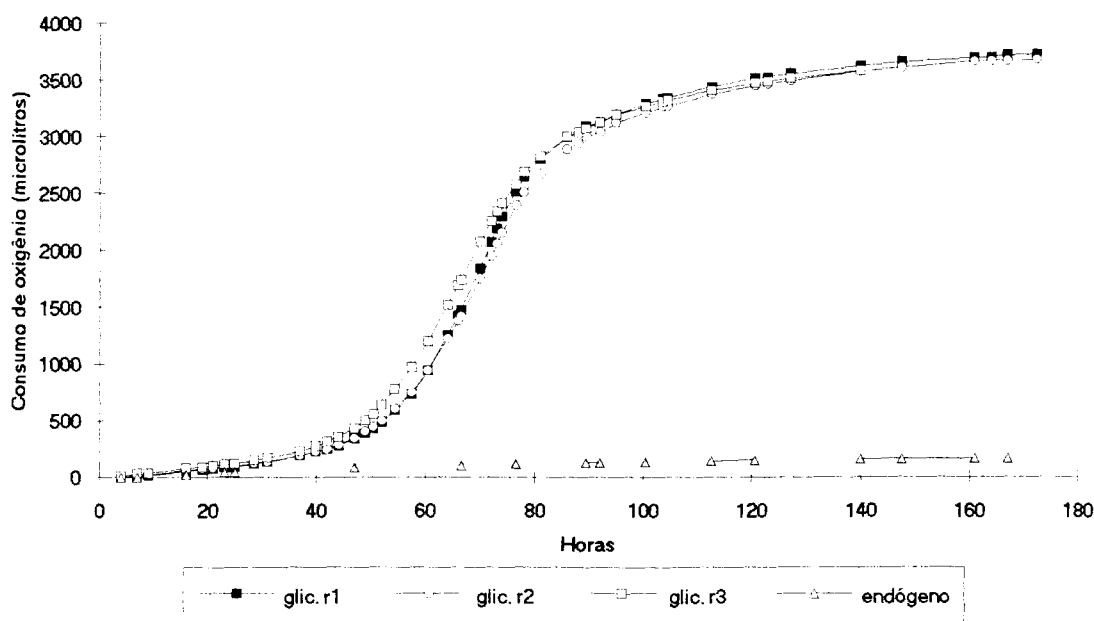


Figura 8. Consumo de oxigênio pela linhagem CLII, crescendo em meio contendo glicose a 0,225 % (p/v) como única fonte de carbono. São mostrados os resultados de três repetições de um mesmo experimento e a respiração na ausência da fonte exógena.

A Figura 9 mostra, com mais detalhes, o efeito da glicose sobre a atividade respiratória dos conídios. Pode-se observar que, 5 horas após a incubação, ocorreu um aumento significativo na respiração dos conídios em meio contendo glicose. A Tabela 12 mostra que, após 14 horas, aproximadamente 3,9% dos conídios incubados em meio contendo glicose já desenvolveram o tubo germinativo. Diversos trabalhos têm mostrado que uma das alterações fisiológicas mais marcantes que ocorre durante a germinação de esporos fungicos é o aumento da taxa respiratória dos conídios (Goddard &

Smith, 1938; Emerson, 1954; Mandels *et alii*, 1956; Martín & Nicolás, 1972; Hill *et alii*, 1992). Comparando-se a Figura 9 com a Tabela 12, pode-se constatar que o aumento na taxa respiratória, na presença de substrato exógeno, ocorreu algumas horas antes da formação do tubo germinativo. A germinação não pôde ser acompanhada por um período maior devido à grande agregação dos conídios germinantes ocorrida durante o desenvolvimento em meio líquido sob agitação. A agregação de germinantes deve-se principalmente à produção de uma camada mucilaginosa durante a fase de crescimento esférico dos conídios (Dute *et alii*, 1989; St. Leger *et alii*, 1989a; Butt *et alii*, 1995).

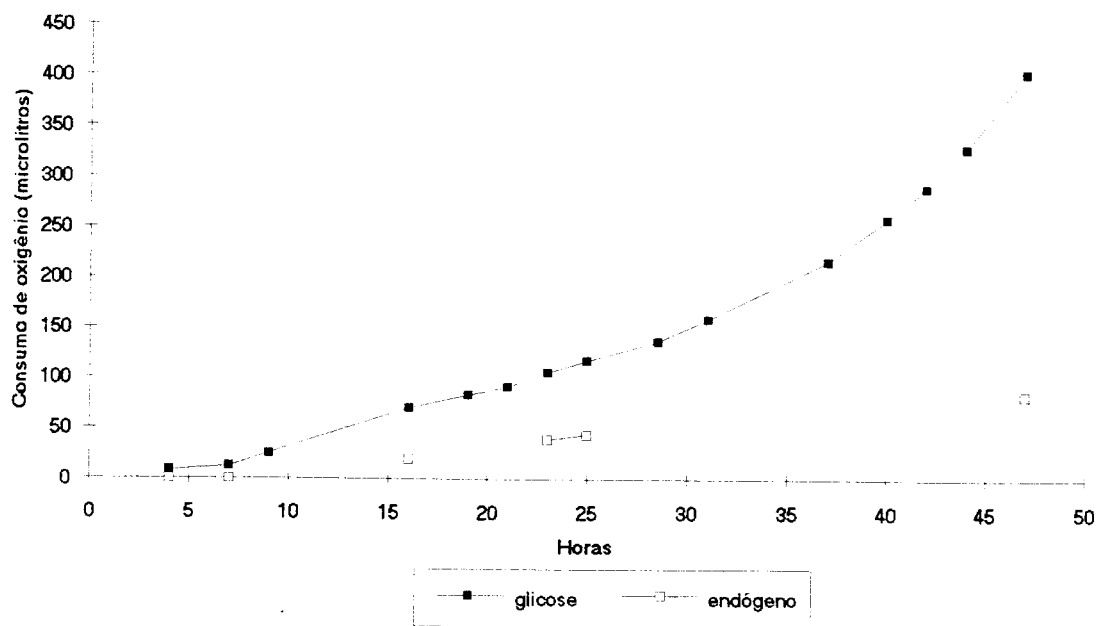


Figura 9. Efeito da adição de glicose a 0,225% (p/v), sobre a respiração da linhagem CLII. Cada ponto representa a média de três repetições.

Tabela 12. Germinação dos conídios da linhagem CLII em meio contendo 0,225% (p/v) dos substratos indicados como única fonte de carbono

	Basal	Glicose	Caseína	Gelatina	Cas hidr.	N-acetil.	Quitina
8 horas	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	8,8 (2,0)	0,3 (0,5)	4,0 (1,1)	2,1 (1,9)	0,3 (0,5)
14 horas	0,3 (0,5)	3,9 (0,9)	47,5(0,6)	3,1 (2,0)	28,6(0,8)	8,8 (1,1)	4,6 (1,3)

A Tabela 13 mostra o consumo de oxigênio pelas culturas em diversas fases do crescimento e da autólise. Pode-se observar um aumento linear no consumo de oxigênio até a 36ª hora; a partir daí o consumo aumentou de maneira exponencial até a 72ª hora. A seguir ocorreu um decréscimo gradual até o final das avaliações. Como foi mostrado na Figura 7, com 96 horas de crescimento já havia ocorrido o esgotamento da glicose exógena. Sendo assim, pode-se supor que, a partir daí, a respiração do micélio ocorreu às custas de suas reservas endógenas acumuladas durante a fase de crescimento. Na Tabela 13 também podem ser vistos as estimativas do QO_2 durante as diversas etapas do desenvolvimento das culturas. As avaliações realizadas na 31ª hora de crescimento ($9,1 \mu lO_2/mg \text{ h}$) e na 51ª ($9,7 \mu lO_2/mg \text{ h}$) mostraram que o QO_2 manteve-se aparentemente constante neste período. Durante a 73ª hora, em plena fase exponencial de crescimento, verificou-se o maior valor do QO_2 ($30,9 \mu lO_2/mg \text{ h}$). Os valores do QO_2 estimados após o esgotamento da fonte exógena de carbono mostraram-se sensivelmente menores e decresceram até o final das avaliações, indicando claramente um esgotamento progressivo das reservas endógenas.

Tabela 13. Consumo de oxigênio total e QO_2 durante diversos períodos do crescimento e da autólise da linhagem CLII, em meio contendo glicose a 0,225% (p/v) como fonte de carbono. Cada valor representa a média de três repetições

Período (horas)	Consumo de O_2 (μ l/h)	QO_2 (μ l/mg h) ^{a,b}
0 - 12	3,8 (1,1) ^c	
12 - 24	5,4 (1,8)	
24 - 36	9,5 (1,7)	(30 - 31) 9,1
36 - 48	17,35 (3,2)	
48 - 60	55,2 (8,5)	(50 - 51) 9,7
60 - 72	89,3 (4,6)	
72 - 84	61,6 (11,4)	(72 - 73) 30,9
84 - 96	24,17 (3,7)	
96 - 108	12,3 (1,6)	(102 - 103) 2,0
108 - 120	9,8 (1,4)	
120 - 132	6,2 (0,3)	
132 - 144	4,4 (0,8)	(139 - 140) 0,9
144 - 156	3,5 (0,7)	
156 - 168	2,3 (0,9)	(171 - 172) 0,2

^a Utilizou-se o consumo de oxigênio da última hora imediatamente anterior à determinação da massa seca. A indicação da hora aparece entre parênteses.

^b Cada valor representa a média de duas repetições.

^c Desvio padrão.

5.4.2. A respiração endógena dos conídios

A Tabela 14 mostra o consumo de oxigênio e a germinação de conídios inoculados em meio sem fonte de carbono e energia. No primeiro caso, que recebeu a denominação de controle 1, a suspensão de conídios foi preparada em uma solução contendo 0,002% (v/v) de tween80 e 0,85 (p/v) de NaCl. No segundo caso (controle 2), a suspensão de conídios foi preparada em uma

solução contendo apenas 0,85% (p/v) de NaCl. Pode-se verificar que o resíduo de tween presente no meio (0,0002% v/v) não provocou aumento significativo na taxa respiratória e na porcentagem de conídios germinados após 7 dias de incubação. A quebra da dormência e o início das alterações fisiológicas que precedem a emissão do tubo germinativo parecem depender não apenas da presença de uma fonte exógena de carbono, mas também da natureza e da concentração na qual esta fonte está disponível.

Tabela 14. Consumo de oxigênio e germinação da linhagem CLII na ausência de substrato exógeno

Horas	Consumo de oxigênio (μl)		Germinação (%)	
	Controle 1 ^a	Controle 2 ^b	Controle 1 ^a	Controle 2 ^b
3	0	0		
4	0	0		
7	0	0		
16	27 (7) ^c	20 (7)		
23	48 (8)	39 (8)		
25	54 (9)	45 (8)		
47	86 (12)	82 (10)		
66	105 (12)	101 (12)		
77	123 (12)	117 (10)		
89	131 (12)	126 (10)		
92	138 (13)	131 (10)		
101	140 (12)	137 (10)		
113	146 (13)	145 (10)		
121	152 (14)	151 (10)		
137	157 (14)	158 (10)		
145	161 (15)	163 (10)		
162	164 (14)	167 (10)		
168	168 (14)	171 (11)	0,67 (0,79)	0,71 (0,29)

^a Inóculo preparado em solução contendo NaCl a 0,85% (p/v) e tween 80 a 0,005% (p/v).

^b Inóculo preparado em solução contendo apenas NaCl a 0,85% (p/v).

^c Desvio padrão.

5.4.3. O metabolismo oxidativo nas diversas fontes de carbono

A Figura 10 mostra o consumo de oxigênio pela linhagem CLII, durante a germinação e o desenvolvimento nas diversas fontes de carbono. A princípio, o que mais chamou a atenção foi o fato de a caseína ter provocado uma redução na fase lag, um aumento na taxa de crescimento e um discreto aumento no total de oxigênio consumido, em comparação com a curva de crescimento em meio contendo glicose. Este tipo de resposta caracteriza a presença de um fator ou de uma combinação de fatores de crescimento dispensáveis, mas com ações promotoras (Fries, 1965). A natureza deste promotor ainda não foi estabelecida, podendo ser um peptídio, um aminoácido ou um conjunto apropriado de aminoácidos, inicialmente presentes no meio ou liberados durante a hidrólise da caseína. Estudos do metabolismo de aminoácidos em fungos têm mostrado que alguns aminoácidos podem servir como precursores para a síntese de uma família de aminoácidos. Sendo assim, é plausível supor que, nos meios em que estes ou em que uma combinação apropriada de aminoácidos estiverem presentes, o trabalho de biossíntese de proteínas será consideravelmente reduzido (Lilly, 1965). Isso poderia explicar a redução na duração das fases lag e de aceleração e o aumento na taxa de crescimento, em meio contendo caseína. Essas idéias recebem suporte da observação de que misturas de aminoácidos são freqüentemente melhores fontes de nitrogênio do que um único aminoácido isoladamente. Alguns trabalhos têm associado a alta virulência apresentada por determinadas linhagens de *M. anisopliae* à rapidez na germinação e a uma alta taxa de crescimento (Al-Aidroos & Seifert, 1986; Samuels *et alii*, 1989; Hassam *et alii*, 1989. O fato de a caseína ter estimulado a germinação e o desenvolvimento inicial do fungo abre a perspectiva de se utilizar esta

substância para a obtenção de formulações comerciais mais eficientes de esporos de *M. anisopliae*. Os outros substratos proteicos avaliados (gelatina e elastina) não produziram os mesmos efeitos. Ambos demandaram uma fase de aceleração maior do que a verificada em glicose e, no caso da gelatina, houve também uma redução significativa na taxa de crescimento. O consumo total de oxigênio para os dois substratos, tal como aconteceu com a caseína, foi ligeiramente maior do que o observado em glicose. Estes resultados mostram que a natureza da proteína utilizada como fonte de carbono influencia diretamente a duração das fases lag e de aceleração e a taxa de crescimento. A diferença na constituição de aminoácidos, bem como as diferenças de solubilidade, podem explicar parte das variações nas curvas de crescimento nos três substratos proteicos. Ainda na figura 10 pode-se observar que o crescimento em quitina caracterizou-se pela longa duração da fase de aceleração. Até o 7º dia, quando o experimento foi encerrado, as culturas que tinham quitina como única fonte de carbono ainda não tinham entrado na fase de crescimento exponencial. Entretanto, pôde-se verificar que os conídios, em meio contendo quitina, aumentaram sua taxa respiratória, característica principal da quebra da dormência, mais rápido do que na presença de glicose. O consumo total de oxigênio, em meio contendo quitina, manteve-se superior ao observado em glicose por várias horas. A quitina, quando autoclavada em meio líquido, sofre uma pequena hidrólise com a liberação do monômero N-acetilglicosamina, que foi o responsável pela ativação metabólica dos conídios. Por estar presente em baixa concentração no meio, seu esgotamento ocorreu rapidamente e os conídios tiveram sua germinação e/ou seu desenvolvimento interrompidos. A germinação e o desenvolvimento só reiniciariam após a produção de quitinases pelos germinantes e a adaptação a esta situação foi provavelmente a responsável pela longa duração da fase de aceleração.

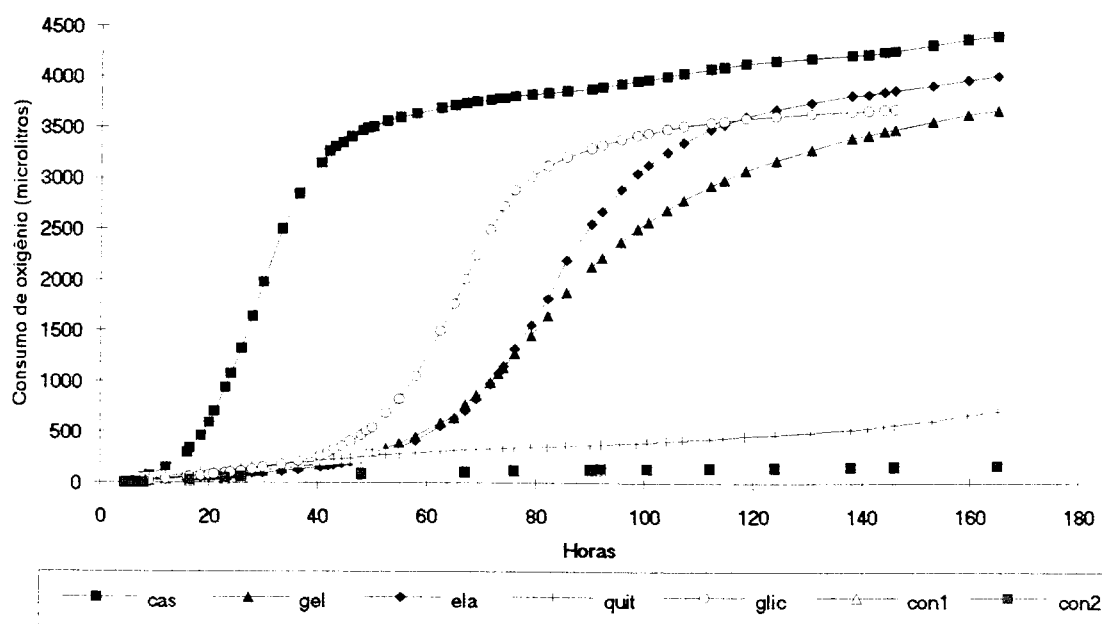


Figura 10. Consumo de oxigênio pela linhagem CLII, crescendo em meios contendo os substratos indicados na concentração de 0,225 % (p/v) e nos controles (endógeno). Cada ponto representa a média de três repetições.

A Figura 11 mostra o consumo de oxigênio pela linhagem CLII em meios contendo caseína e caseína hidrolizada. Como parâmetro de comparação, é mostrada a curva do consumo em meio contendo glicose. Apesar de a caseína e a caseína hidrolizada terem acelerado a germinação e o desenvolvimento, esses efeitos mostraram-se inesperadamente mais pronunciados quando a caseína foi utilizada como fonte de carbono.

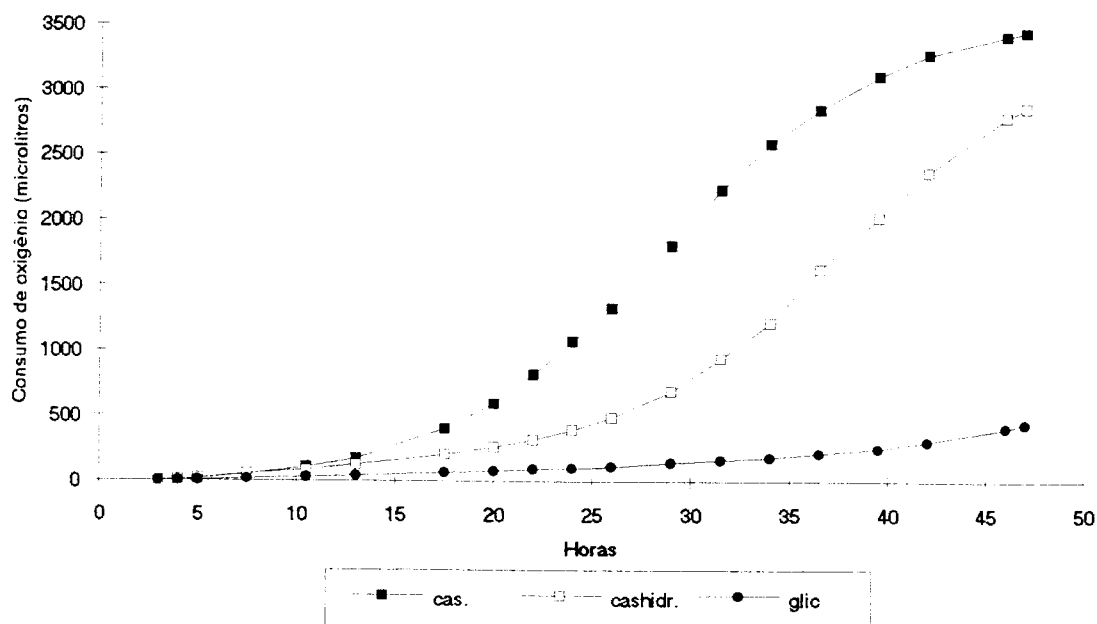


Figura 11. Consumo de oxigênio pela linhagem CLII, crescendo em meios contendo os substratos indicados na concentração de 0,225 % (p/v). Cada ponto representa a média de três repetições.

As Figuras 12 e 13 mostram o consumo de oxigênio em meios contendo quitina e N-acetilglicosamina como fontes de carbono. Pode-se observar que a N-acetilglicosamina acelerou a germinação e reduziu a duração das fases lag e de aceleração. Na Figura 13 pode-se ver com clareza que o consumo de oxigênio em quitina foi superior ao consumo de oxigênio em meio contendo glicose nas primeiras horas de desenvolvimento. Esse fato, como foi discutido anteriormente, deveu-se à liberação de N-acetilglicosamina durante a autoclavagem da quitina.

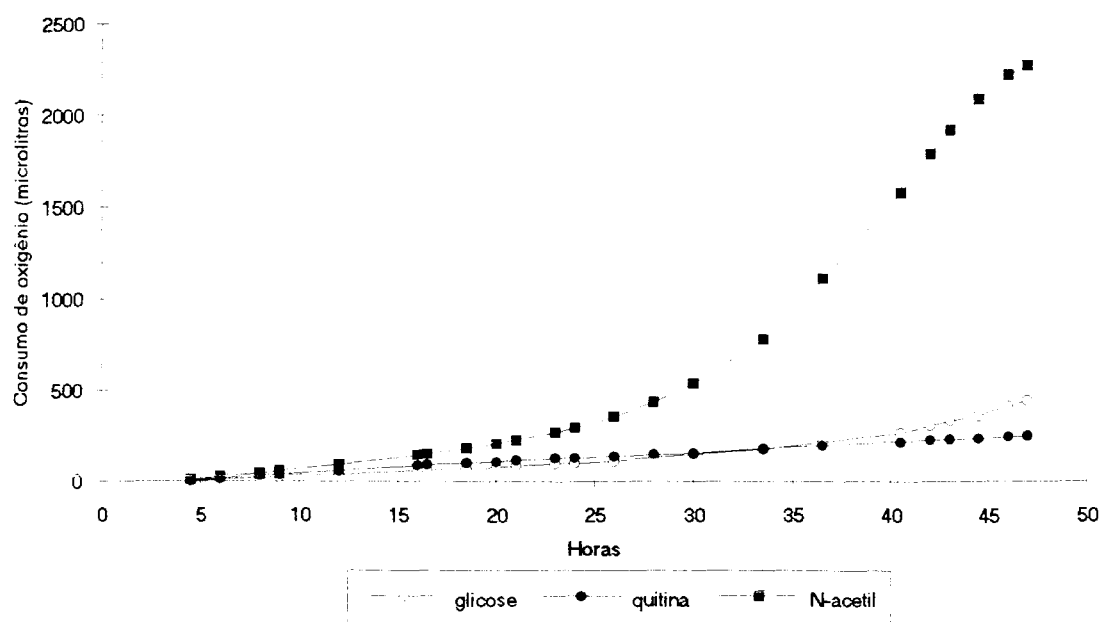


Figura 12. Consumo de oxigênio pela linhagem CLII, crescendo em meios contendo os substratos indicados na concentração de 0,225 % (p/v). Cada ponto representa a média de três repetições.

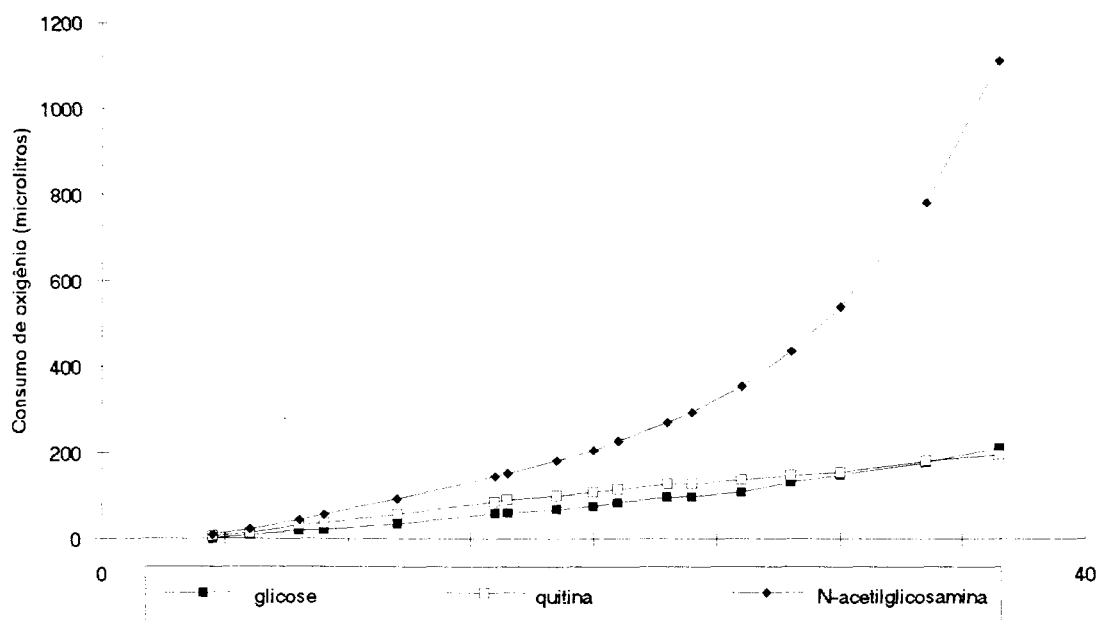


Figura 13. Consumo de oxigênio pela linhagem CLII, crescendo em meios contendo os substratos indicados na concentração de 0,225 % (p/v). Cada ponto representa a média de três repetições.

A Figura 14 mostra o consumo de oxigênio em meios contendo os aminoácidos L-ácido glutâmico, L-alanina e D-prolina. A curva mostrando o consumo em caseína é apresentada como parâmetro de comparação. Na figura 15 pode-se ver o consumo em meios contendo os aminoácidos L-cistina, L-tirosina, DL-serina e L-prolina. Nenhum dos aminoácidos usados individualmente como fonte e carbono foi capaz de reproduzir os efeitos da caseína ou da caseína hidrolizada sobre a germinação e o crescimento.

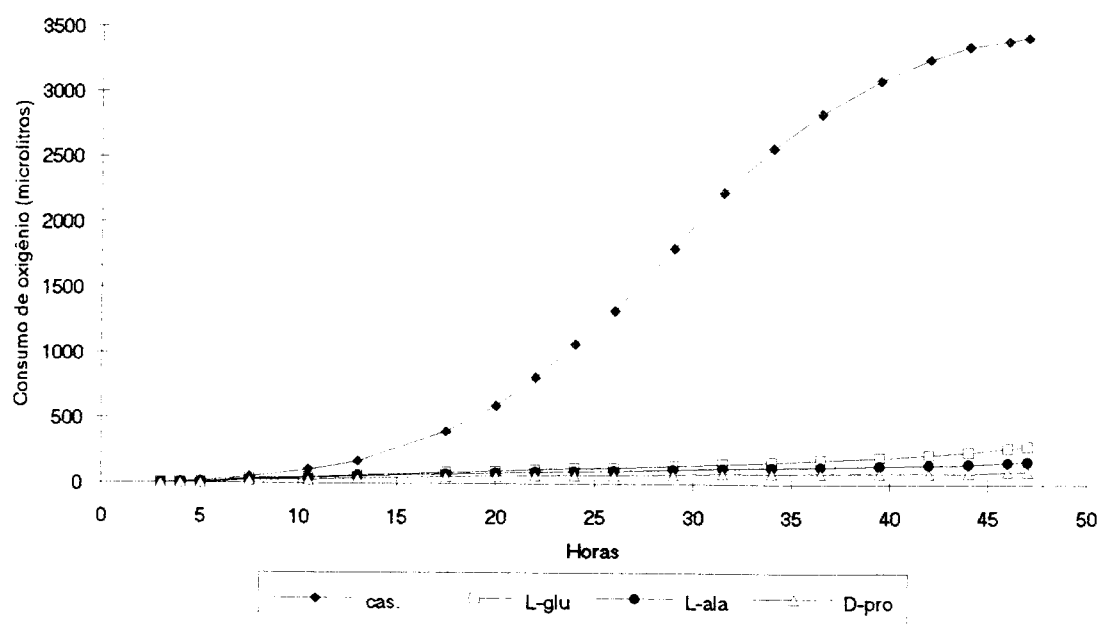


Figura 14. Consumo de oxigênio pela linhagem CLII, crescendo em meios contendo os substratos indicados na concentração de 0,225 % (p/v). Cada ponto representa a média de três repetições.

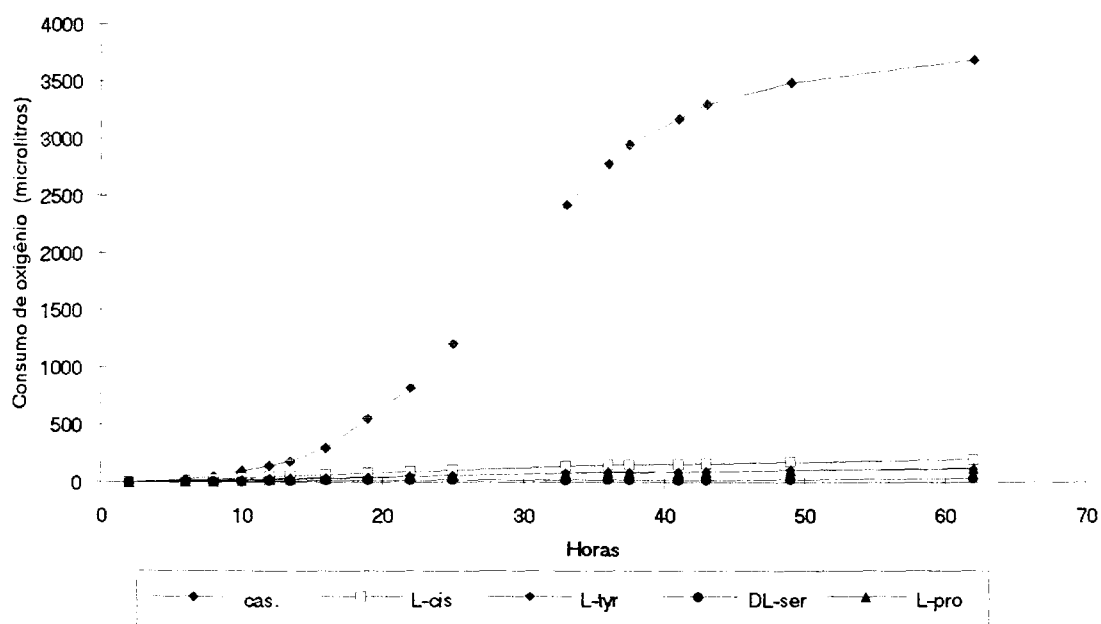


Figura 15. Consumo de oxigênio pela linhagem CLII, crescendo em meios contendo os substratos indicados na concentração de 0,225 % (p/v). Cada ponto representa a média de três repetições.

O grande volume de dados gerados pelos experimentos de respirometria torna possível a elaboração de modelos matemáticos mais completos e precisos, capazes de melhor representar todas as fases do crescimento de *M. anisopliae* em meio de cultura líquido.

6 - CONCLUSÕES

Dentro das condições nas quais foram realizados os experimentos, os resultados apresentados e discutidos permitiram que as seguintes conclusões fossem tiradas:

- Os "fingerprints" genômicos obtidos através do RAPD permitem a identificação de linhagens e de variedades de *M. anisopliae*;

- Os valores das distâncias genéticas entre isolados, além de mostrarem a existência de uma grande diversidade entre as linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, também permitiram a separação das variedades *anisopliae* e *majus* em grupos distintos;

- Existe uma grande variabilidade genotípica na atividade quitinolítica apresentada pelas linhagens de *M. anisopliae*;

- Os altos coeficientes de herdabilidade indicam que se podem esperar grandes progressos na seleção fenotípica clonal para a produção de enzimas quitinolíticas;

- As linhagens de *M. anisopliae* apresentaram uma autólise intensa que se inicia logo após o esgotamento da fonte de carbono presente no meio de cultura;

- Dependendo da linhagem, a máxima atividade proteolítica observada no meio ocorreu na fase exponencial de crescimento ou no início da fase autolítica;
- A germinação em *M. anisopliae* foi marcada por um aumento significativo do consumo de oxigênio;
- Durante o crescimento de *M. anisopliae*, pôde-se verificar uma coincidência entre as fases de consumo exponencial da fonte de carbono e oxigênio e a fase de produção de biomassa;
- O QO_2 atingiu o seu maior valor durante a fase exponencial de crescimento, diminuindo drasticamente após o esgotamento da fonte exógena de carbono;
- Tomada a glicose como referência, pôde-se observar que a caseína, a caseína hidrolisada e a N-acetilglicosamina aceleraram a germinação e o crescimento de *M. anisopliae*, demonstrando a capacidade do fungo de utilizar prontamente os monômeros dos principais constituintes da cutícula do inseto, que são proteínas e quitina;
- Os aminoácidos, quando usados individualmente como única fonte de carbono, mostraram-se inadequados à germinação e ao crescimento, fazendo com que as culturas permanecessem diversos dias na fase de aceleração.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaskaveg, J. E.; Stanghellini, M. E. & Gilbertson, R. L. Comparative protein studies of several *Pythium* species using isoelectric focusing. **Mycologia**, **80**(5): 665-672, 1988.
- Al-Aidroos, K. & Seifert, A. M. Polysaccharide and protein degradation, germination, and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **36**: 29-34, 1980.
- Alfonso, C.; Martinez, M. J. & Reyes, F. Degradation of chitosan in the autolysis of mucorales. **Mycological Research**, **95**(2): 217-219, 1991.
- Anderson, J. B. & Stasovski, E. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. **Mycologia**, **84**(4): 505-516, 1992.
- Barnes, G. L.; Boethel, D. J.; Eikenbary, R. D.; Criswell, J. T. & Gentry, C. R. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, **25**: 301-305, 1975.
- Bermingham, S.; Maltby, L. & Cooke, R. C. A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. **Mycological Research**, **99**(4): 479-484, 1995.

- Bidochka, M. J.; McDonald, M. A.; St. Leger, R. J. & Roberts, D. W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, **25**: 107-113, 1994.
- Boucias, D. G. & Latgé, J. P. Nonspecific induction of germination of *Conidiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* with host and non-host cuticle extracts. **Journal of Invertebrate Pathology**, **51**: 168-171, 1988.
- Braga, G. U. L. Variabilidade e estimativas de parâmetros genéticos da produção de proteases em *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, 1992. 84p. (Mestrado - ESALQ/USP).
- Braga, G. U. L., Messias, C. L., & Vencovsky, R. Estimates of genetic parameters related to protease production by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **64**: 6-12, 1994.
- Burkholder, P. R. & Sinnott, E. W. Morphogenesis of fungus colonies in submerged shaken cultures. **American Journal of Botany**, **32**: 424-431, 1945.
- Butt, T. M.; Ibrahim, L.; Clark, S. J. & Beckett, A. The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. **Mycological Research**, **99**(8): 945-950, 1995.

- Caetano-Anollés, G.; Bassam, B. J. & Gresshoff, P. M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Bio/Technology**, **9**: 553-557, 1991.
- Campbell, R. K.; Perring, T. M.; Barnes, G. L.; Eikenbary, R. D. & Gentry, C. R. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae* on media containing various amino acids. **Journal of Invertebrate Pathology**, **31**: 289-295, 1978.
- Chen, X.; Line, R. F. & Leung, H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. **Phytopathology**, **83**(10): 1489-1497, 1993.
- Chesters, C. G. C. & Peberdy, J. F. Nutritional Factors in relation to growth and fat synthesis in *Mortierella vinacea*. **Journal of General Microbiology**, **41**: 127-134, 1965.
- Cochrane, V. W. *Physiology of fungi*. New York, John Wiley & Sons, 1958. 522p.
- Cochrane, V. W.; Cochrane, J. C.; Collins, C. B. & Serafin, F. G. Spore germination and carbon metabolism in *Fusarium solani*. II. endogenous respiration in relation to germination. **American Journal of Botany**, **50**: 806-814, 1963.

- Crowhurst, R. N.; Hawthorne, B. T.; Rikkerink, E. H. A.; Templeton, M. D. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, **20**: 391-396, 1991.
- Daniels, B. A. & Graham, S. O. Effects of nutrition and soil extracts on germination of *Glomus mosseae* spores. **Mycologia**, **68**: 108-116, 1976.
- Darby, R. T. & Goddard, D. Studies of the respiration of the mycelium of the fungus *Myrothecium verrucaria*. **American Journal of Botany**, **87**: 379-387, 1950.
- Davin-Regli, A.; Abed, Y.; Charrel, R. N.; Bollet, C. & Micco, P. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. **Res. Microbiol.** :**146**: 561-568. 1995.
- Destéfano, R. H. R. Evolução de O₂, viabilidade e virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, durante armazenamento. Campinas, 1993. 85p. (Mestrado - ESALQ/USP).
- Dillon, R. J. & Charnley, A. K. A technique for accelerating and synchronising germination of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Microbiology**, **142**: 204-206, 1985.
- Dillon, R. J. & Charnley, A. K. Initiation of germination in conidia of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, **94**(3): 299-304, 1990.

- Dorn, G. & Rivera, W. Kinetics of fungal growth and phosphatase formation in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, **92**(2): 1618-1622, 1966.
- Duncan, S.; Barton, J. E. & O'Brien, P. A. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. **Mycological Research**, **97**(9): 1075-1082, 1993.
- Dute, R. R.; Weete, J. D. & Rushing, A. E. Ultrastructure of dormant and germinating conidia of *Aspergillus ochraceus*. **Mycologia**, **81**(5): 772-782, 1989.
- Ekundayo, J. A. & Carlile, M. J. The germination of sporangiospores of *Rhizopus arrhizus*; spore swelling and germ-tube emergence. **Journal of General Microbiology**, **35**: 261-269, 1964.
- El-Sayed, G. N., Coudron, T. A., Ignoffo, C. M., & Riba, G. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **54**: 394-403, 1989.
- El-Sayed, G. N., Ignoffo, C. M., Leathers, T. D., & Gupta, S. C. Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Mycopathologia**, **122**: 79-87, 1993a.

- El-Sayed, G. N., Ignoffo, C. M., Leathers, T. D. & Gupta, S. C. Effects of cuticle source and concentration on expression of hydrolytic enzymes by an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Mycopathologia**, **122**: 149-152, 1993b.
- El-Sayed, G. N.; Ignoffo, C. M.; Leathers, T. D. & Gupta, S. C. Insect cuticle and yeast extract effects on germination, growth, and production of hydrolytic enzymes by *Nomuraea rileyi*. **Mycopathologia**, **122**: 143-147, 1993c.
- Emerson, M. R. Some physiological characteristics of ascospore activation in *Neurospora crassa*. **Plant Physiology**, **29**: 418-428, 1954.
- Faro, S. Utilization of certain amino acids and carbohydrates as carbon sources by *Achlya heterosexualis*. **Mycologia**, **63**: 1234-1237, 1971.
- Fegan, M.; Manners, J. M.; Maclean, D. J.; Irwin, J. A. G.; Samuels, K. D. Z.; Holdom, D. G. & Li, D. P. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, **139**: 2075-2081, 1993.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. In: Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2 ed.. Brasília. Embrapa-Cenargen, 1996. p. 13-68.

- Fisher, R. A. and Yates, F. A. *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*. Oliver and Boyd, Edinburgh, 1966.
- Foster, L. M.; Kozak, K. R.; Loftus, M. G.; Stevens, J. J. & Ross, I. K. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. **Mycological Research**, **97**(7): 769-781, 1993.
- Fries, N. The chemical environment for fungal growth. In: Ainsworth, G. C. & Sussman, A. S. eds. *The fungi*. New York: Academic Press, 1965. Volume I, 746p, p. 491-524.
- Garber, R. C.; Yoder, O. C. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal and plasmid components. **Analytical Biochemistry**, **1935**: 416-422, 1983.
- Goddard, R. D. & Smith, P. E. Respiratory block in the dormant spores of *Neurospora tetrasperma*. **Plant Physiology**, **113**: 241-265, 1938.
- Goettel, M. S.; St. Leger, R. J.; Rizzo, N. W.; Staples, R. C. & Roberts, D. W. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Journal of General Microbiology**, **135**: 2233-2239, 1989.
- Gooday, G. W. The dynamics of hyphal growth. **Mycological Research**, **99**(4): 385-394, 1995.

- Goodwin, P. H. & Annis, S. L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by Random Amplified Polymorphic DNA assay. **Applied and Environmental Microbiology**, **57**(9): 2482-2486, 1991.
- Goodwin, S. B.; Drenth, A.; Fry, W. E. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. **Current Genetics**, **22**: 107-115, 1992.
- Grajal-Martín, M. J.; Simon, C. J. & Muehlbauer, F. J. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi*. **Phytopathology**, **83**(6): 612-614, 1993.
- Griffin, D. H. Spore dormancy and germination. In: Griffin, D. H. *Fungal physiology*. Second edition. New York, Wiley-Liss, 1994a. p. 375-398.
- Griffin, D. H. Growth. In: Griffin, D. H. *Fungal physiology*. Second edition. New York, Wiley-Liss, 1994b. p. 102-129.
- Griffin, D. H. Chemical requirements for growth. In: Griffin, D. H. *Fungal physiology*. Second edition. New York, Wiley-Liss, 1994c. p. 130-157.
- Griffin, D. H.; Timberlake, W. E. & Cheney, J. C. Regulation of macromolecular synthesis, colony development, and specific growth rate of *Achlya bisexualis* during balanced growth. **Journal of General Microbiology**, **80**: 381-388, 1974.

- Gupta, S. C.; Leathers, T. D., El-Sayed, G. N., and Ignoffo, C. M. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **64**: 13-17, 1994.
- Guthrie, P. A. I.; Magill, C. W.; Frederiksen, R. A. & Odvody, G. N. Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, **82**(8): 832-835, 1992.
- Hackman, R. H. & Goldberg, M. New substrates for use with chitinases. **Analytical Biochemistry**, **8**: 397-401, 1964.
- Hadrys, H.; Balick, M. & Schierwater, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, **1**: 55-63, 1992.
- Hassan, A. E. M.; Dillon, R. J.; & Charnley, A. K. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **54**: 277-279, 1989.
- Held, A. A. Nutritional and fermentative energy metabolism of the water mold *Aqualinderella fermentans*. **Mycologia**, **62**: 339-358, 1970.
- Hill, E. P.; Plesofsky-Vig, N.; Paulson, A. & Brambl, R. Respiration and gene expression in germinating ascospores of *Neurospora tetrasperma*. **FEMS Microbiology Letters**, **90**: 111-116, 1992.

- Jahnke, S. E.; Chapman, E. S. Germination of conidiospores of *Talaromyces thermophilus*. **Mycologia**, **67**: 1223-1228, 1975.
- Janda, S.; Sigler, K. & Höfer, M. Endogenous respiration reflects the energy load imposed by transport of nonmetabolizable substrates and by induced de novo protein synthesis in *Rhodotorula glutinis*. **Archives of Microbiology**, **159**: 541-544, 1993.
- Johnson, G. T. & Dixon, G. J. Oxygen-uptake studies on glucose-grown and fatty-acid-exposed fungus cells. **Mycologia**, **51**: 647-655, 1959.
- Kalisz, H. M. & Moore, D. Protein utilization by basidiomycete fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, **86**(4): 519-525, 1985.
- Kempthorne, O. *Introduction to Genetic Statistics*. New York. Wiley, 1966.
- Kohn, L. M. Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution. **Mycologia**, **84**(2): 139-153, 1992.
- Kucera, M. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, **35**: 304-310, 1980.
- Kucera, M. The production of toxic protease by the entomopathogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, **38**: 33-38, 1981.

- 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.
- Lahoz, R. & Ibeas, J. G. The autolysis of *Aspergillus flavus* in an alkaline medium. **Journal of General Microbiology**, **53**: 101-108, 1968.
- Lahoz, R. & Miralles, M. Influence of the level of the carbon source on the autolysis of *Aspergillus niger*. **Journal of General Microbiology**, **60**: 271-276, 1970.
- Lahoz, R.; Reyes, F.; Martinez, M. J. & Jimeno, L. Effect of the pH on the degree of autolysis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Botanic**, **57**: 1901-1903, 1979.
- Latgé, J.-P.; Remaudière, G.; Soper, R. S.; Madore, C. D. & Diaquin, M. Growth and sporulation of *Entomophthora virulenta* on semidefined media in liquid culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, **31**: 225-233, 1978.
- Lee, S. B. & Taylor, J. W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In " *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. eds. New York. Academic Press, 1990.

- Leite, B. Variabilidade natural de linhagens de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, quanto à resistência ao ultravioleta ao vetor da doença de chagas *Panstrongylus megistus*. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 1987. 139p.
- Li, D. P. & Holdom, D. G. Effects of nutrients on colony formation , growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, **65**: 253-260, 1995.
- Lilly, V. G. The chemical environment for fungal growth. In: Ainsworth, G. C. & Sussman, A. S. eds. *The fungi*. New York, Academic Press, 1965. Volume I, 746p, p. 465-478.
- Li, S. W. & Siehr, D. J. Endogenous respiration of *Polyporus sulphureus*. **Mycologia**, **72**: 64-72, 1980.
- Lyda, S. D. Optimizing mycelial respiration of *Phymatotrichum omnivorum*. **Mycologia**, **68**: 1011-1019, 1976.
- MacCammon & Rath, A. C. Separation of *Metarhizium anisopliae* strains by temperature dependent germination rates. **Mycological Research**, **98**(11): 1253-1257, 1994.
- MacClung, N. M.; Salser, J. S. & Santoro, T. Growth studies of *Nocardia* species. I. Respiration of carbohydrates by *Nocardia rubra*. **Mycologia**, **52**: 845-855, 1960.

- Mandels, G. R. Kinetics of fungal growth. In: Ainsworth, G. C. & Sussman, A. S. *The fungi. An advanced Treatise*. Volume I. New York, Academic Press, 1965. p. 599-612.
- Mandels, G. R.; Levinson, H. S. & Hyatt, M. T. Analysis of respiration during germination and enlargement of spores of *Bacillus megaterium* and of the fungus *Myrothecium verrucaria*. **Journal of General Physiology**, **39**: 301-309, 1956.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. & Sambrook, J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Colg Spring Harbor, 1982.
- Manulis, S.; Kogan, N.; Reuven, M. & Ben-Yephet, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. **Phytopathology**, **84**(1): 98-101, 1993.
- Marchant, R. & White, M. Spore swelling and germination in *Fusarium culmorum*. **Journal of General Microbiology**, **42**: 237-244, 1966.
- Martin, G. B.; Williams, J. G. K. & Tanksley, S. D. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **88**: 2336-2340, 1991.
- Martín, J. F. & Nicolás, G. Physiology of spore germination in *Penicillium notatum* and *Trichoderma lignorum*. **Transactions of the British Mycological Society**, **55**(I): 141-148, 1970.

- Martínez-Cadena, G.; Saavedra-Calixto, J.; Messina-Valencia, G.; Domínguez-Gutiérrez & Novoa-Martínez, G. Effect of carbon source and pH of the growth medium on spore germination in *Phycomyces blakesleeanus*. **Archives of Microbiology**, **164**: 231-234, 1995.
- McCutcheon, T. L.; Carroll, G. C. & Schwab, S. Genotypic diversity in populations of a fungal endophyte from Douglas fir. **Mycologia**, **85**(2): 180-186, 1993.
- Megnégneau, B.; Debets, F. & Hoekstra, R. F. Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, **23**: 323-329, 1993.
- Meijer, G.; Megnégneau, B. & Linders, E. G. A. Variability for isozyme, vegetative compatibility and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinata*. **Mycological Research**, **98**(3): 267-276, 1994.
- Messias, C. L.; Roberts, D. & Grefig, A. T. Pyrolysis-gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*: An aid to strain identification. **Journal of Invertebrate Pathology**, **42**: 393-396, 1983.
- Messias, C. L. & Azevedo, J. L. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, **75**: 473-477, 1980.

- Michelmores, R. W. & Hulbert, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phythology**, **25**: 383-404, 1987.
- Mullis, K. B.; Faloona, F.; Scharf, S. F.; Saiki, R. K.; Horn, G. T. & Erlich, H. A. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology** **51**: 263-273, 1986.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polimerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, **155**: 335-351, 1987.
- Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, **153**: 375-380, 1944.
- Newell, S. Y.; Miller, J. D. & Fallon, R. D. Ergosterol content of salt-marsh fungi: effect of growth conditions and mycelial age. **Mycologia**, **79**(5): 688-695, 1987.
- Ney, M. & Li, W-H. Mathematical modes for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **76**(10): 5269-5273, 1979.

- Nicolás, G. & Villanueva, J. R. Physiological studies on the rust hyperparasite *Darluca filum*. I. Carbon and nitrogen nutrition. **Mycologia**, **57**: 782-788, 1965.
- Nolan, R. A. Amino acids and growth factors in vitamin-free casamino acids. **Mycologia**, **63**: 1231-1234, 1971.
- Norris, J. R. & Ribbons, D. W. Radiorespirometric methods. In Norris, J. R. & Ribbons, D. W. *Methods in microbiology*. Vol. 6B. London, Academic Press. 1972.
- Ouellet, T. & Seifert, K. A. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. **Phytopathology**, **83**(9): 1003-1007, 1993.
- Papavizas, G. C. Carbon and nitrogen nutrition of *Sclerotium cepivorum*. **Mycologia**, **62**: 1195-1203, 1970.
- Paran, I.; Kesseli, R. & Michelmore, R. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphism DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. **Genome**, **34**: 1021-1027, 1991.
- Pelletier, R. L. & Keitt, G. W. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. VI. Amino acids as sources of nitrogen. **American Journal of Botanic**, **41**: 362-371, 1954.

- Pimentel Gomes, F. & Guimarães, R. F. Joint analysis of experiments in complete randomised blocks with some common treatments. **Biometrics**, **14**: 521-526, 1968.
- Pipe, N. D.; Chandler, D.; Bainbridge, B. W. & Heale, J. B. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, **99**(4): 485-491, 1995.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., McDonald, K. F. & Bufton, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, **5**: 141-148, 1953.
- Prosser, J. I. Growth kinetics of mycelial colonies and aggregates of ascomycetes. **Mycological Research**, **97**(5): 513-528, 1993.
- Rath, A. C.; Carr, C. J. & Graham, B. R. Characterization of *Metarhizium anisopliae* strains by carbohydrate utilization (API50CH). **Journal of Invertebrate Pathology**, **65**: 152-161, 1995.
- Reiter, R. S.; Williams, J. G. K.; Feldmann, K. A.; Rafalsky, J. A.; Tingey, S. V. & Scolnik, P. A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **89**: 1477-1481, 1992.

- Reyes, F.; Calatayud, J. & Martínez, M. J. Chitinolytic activity in the autolysis of *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, **49**: 239-243, 1988.
- Reyes, F.; Lahoz, R. Variation in lysis of walls of *Sclerotinia fructigena* with age of culture. **Journal of General Microbiology**, **98**: 607-610, 1977.
- Reyes, F.; Lahoz, R. & Cornago P. Autolysis of *Neurospora crassa* in different culture conditions and release of β -N-Acetyl-Glucosaminidase and chitinase. **Transactions of the British Mycological Society**, **68**(3): 357-361, 1977.
- Reyes, F.; Lahoz, R. & Moreno, A. V. Synthesis of 1,3- β -glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during autolysis of *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, **126**: 347-353, 1981.
- Ritz, K. Growth responses of some soil fungi to spatially heterogeneous nutrients. **FEMS Microbiology Ecology**, **16**: 269-280, 1995.
- Rohlf, F. J. NTSYS-pc v. 1.70. Numerical taxonomy and multi-variate analysis system. New York, Applied Biostatistics Inc., 1993.
- Rossato, Y. B., Messias, C. L. & Azevedo, J. L. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae* **Journal of Invertebrate Pathology**, **38**: 1-3, 1981.

- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F. & Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A. & Arnheim, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, **230**: 1350-1354, 1985.
- Samuels, K. D. Z.; Heale, J. B. & Llewellyn, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **53**: 25-31, 1989.
- Santamaria, F. & Reyes, F. Proteases produced during autolysis of filamentous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, **91**(2): 217-220, 1988.
- Seitz, L. M.; Sauer, D. B.; Burroughs, R.; Mohr, H. E. & Hubbard, J. D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, **69**(11): 1202-1203, 1979.
- Smith, D. R. & Stanosz, G. R. Confirmation of two distinct populations of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States using RAPDs. **Phytopathology**, **85**(6): 699-704, 1995.
- Smith, R. J. & Grula, E. A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **37**: 222-230, 1981.
- Smith, R. J. & Grula, E. A. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **42**: 319-326, 1983.

- Smith, R. J., Pehrul, S. & Grula, E. A. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). **Journal of Invertebrate Pathology**, **38**: 335-344, 1981.
- Sneath, P. H. A. & Lokal, R. R. *Numerical Taxonomy*. San Francisco, Freeman, 1973.
- Sosa Gómez, D. R. & Alves, S. B. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. 1. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. **CIRPON, Rev. Invest.**, **1**(3): 83-102, 1983.
- Steel, R. G. D. & Torrie, J. H. *Principles and Procedures of Statistics*. New York, McGraw-Hill Book Company, 1960.
- St. Leger, R. J. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. In: *Parasites and pathogens of insects Volume 2: Pathogens*. Los Angeles, Academic Press, 1993a. p. 211-229.
- St Leger, R. J.; Allee, L. L.; May, B.; Staples, R. C. & Roberts, D. W. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. **Mycological Research**, **96**(12): 1007-1015, 1992a.
- St Leger, R. J.; Bidochka, M. J. & Roberts, D. W. Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. **Microbiology**, **140**: 1651-1660, 1994.

- St. Leger, R. J.; Butt, T. M.; Staples, R. C. & Roberts, D. W. Second messenger involvement in differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, **136**: 1779-1789, 1990a.
- St. Leger, R. J.; Butt, T. M.; Goettel, M. S.; Staples, R. C. & Roberts, D. W. Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology** **13**: 274-288, 1989a.
- St. Leger, R. J.; Charnley, A. K. & Cooper, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, **47**: 295-302, 1986a
- St. Leger, R. J., Charnley, A. K. & Cooper, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, **48**: 85-95, 1986b.
- St. Leger, R. J., Cooper, R. M. & Charnley, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **Journal of General Microbiology**, **132**: 1509-1517, 1986c.
- St. Leger, R. J.; Cooper, R. M. & Charnley, A. K. Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, **52**: 356-359, 1988.

- St. Leger, R. J.; Cooper, R. M. & Charnley, A. K. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Colliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. **Journal of General Microbiology**, **133**: 1371-1382, 1987.
- St. Leger, R. J.; Cooper, R. M. & Charnley, A. K. Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **58**: 415-426, 1991a.
- St. Leger, R. J.; Goettel, M.; Roberts, D. W. & Staples, R. C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **58**: 168-179, 1991b.
- St. Leger, R. J.; Laccetti, L. B.; Staples, R. C. & Roberts, D. W. Protein Kinases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, **136**: 1401-1411, 1990b.
- St. Leger, R. J.; May, B.; Allee, L. L.; Frank, D. C.; Staples, R. C. & Roberts, D. W. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **60**: 89-101, 1992b.
- St. Leger, R. J.; Roberts, D. W. & Staples, R. C. Calcium and calmodulin-mediated protein synthesis and protein phosphorylation during germination, growth and protease production by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, **135**: 2141-2154, 1989b.

- St Leger, R. J.; Roberts, D. W. & Staples, R. C. Electrophoretic detection of multiple protein kinases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Microbiology**, **154**: 518-520, 1990c.
- St. Leger, R. J.; Roberts, D. W.; & Staples, R. C. A model to explain differentiation of apressoria by germilings of *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology** **57**: 299-310, 1991c.
- St. Leger, R. J.; Staples, R. C. & Roberts, D. W. Changes in translatable mRNA species associated with nutrient deprivation and protease synthesis in *Metarhizium anisopliae*. **Journal of General Microbiology**, **137**: 807-815, 1991d.
- St. Leger, R. J.; Staples, R. C. & Roberts, D. W. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. **Journal of Invertebrate Pathology**, **61**: 81-84, 1993b.
- Strongman, D. B. & Mackay, R. M. Discrimination between *Hirsutella longicolla* var. *longicolla* and *Hirsutella longicolla* var. *cornuta* using Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting. **Mycologia**, **85**(1): 65-70, 1993c.
- Sussman, A. S. & Douthit, H. A. Dormancy in microbial spores. **Annual Review of Plant Physiology**, **24**: 311-352, 1973.

- Taber, W. A. & Taber, R. A. Nutrition and respiration of basidiospores and Mycelium of *Pisolithus tinctorius*. **Phytopathology**, **72**(3): 316-322, 1982.
- Taber, W. A. & Taber, R. A. Carbon nutrition and respiration of *Pisolithus tinctorius*. **Transactions of the British Mycological Society**, **89**(1): 13-26, 1987.
- Thevelein, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiological Reviews**, **48**(1): 42-59, 1984.
- Tigano-Milani, M. S.; Gomes, A. C. M. M. & Sobral, B. W. S. Genetic variability among brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **65**: 206-210, 1995.
- Trinci, A. P. J. Kinetics of apical and lateral branching in *Aspergillus nidulans* and *Geotrichum lactis*. **Transactions of the British Mycological Society**, **55**(1): 17-28, 1970.
- Trinci, A. P. J. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. **Journal of General Microbiology**, **81**: 225-236, 1974.
- Van Etten, J. L. & Gottlieb, D. Biochemical changes during the growth of fungi. **Journal of Bacteriology**, **88**(2): 409-414, 1965.

- Van Etten, J. L.; Dahlberg, K. R. & Russo, G. M. Fungal spore germination. In: Smith, J. E. ed. *Fungal differentiation: a contemporary synthesis*. New York, Marcel Dekker, 1983. p. 235-266.
- Voigt, K.; Schleier, S.; & Brückner, B. Genetic variability in *Giberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, **27**: 528-535, 1995.
- Walstad, J. D.; Anderson, R. F. & Stambaugh, W. J. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, **16**: 221-226, 1970.
- Waugh, R. & Powell, W. Using RAPD markers for crop improvement. **Tibtech**, **10**: 186-191, 1992.
- Welsh, J. & McClelland, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18**(24): 7213-7218, 1990.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. & Tingey, S. C. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18**(22): 6531-6535, 1990.
- Williams, J. G. K.; Hanafey, M. K.; Rafalsky, J. A. & Tingey, S. V. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, **218**: 704-740, 1993.

- Woodhead, S. & Walker, J. R. L. The effects of aeration on glucose catabolism in *Penicillium expansum*. **Journal of General Microbiology**, **89**: 327-336, 1975.
- Woods, S. P. & Grula, E. A. Utilizable surface nutrients on *Heliothis zea* available for growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, **43**: 259-269, 1984.
- Yip, H. Y.; Rath, A. C. & Koen, T. B. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). **Mycological Research**, **96**(2): 92-96, 1992.
- Yoon, C. S. & Glawe, D. A. Association of Random Amplified Polymorphic DNA markers with stromatal type in *Hypoxylon truncatum sensu* Miller. **Mycologia**, **85**(3): 369-380, 1993.
- Zacharuk, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larval elateridae (Coleoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, **15**: 81-91, 1970.
- Zacharuk, R. Y. Penetration of the cuticular layers of elaterid larvae (coleoptera) by the fungus *Metarrhizium anisopliae*, and notes on a bacterial invasion. **Journal of Invertebrate Pathology**, **21**: 101-106, 1973.

Zalokar, M. Growth and differentiation of *Neurospora* hyphae. **American Journal of Botany**, **46**: 602-619, 1959.