

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/9213
IB/81429

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1988

PARASSEXUALIDADE E PRODUÇÃO DE DESTRUXINAS EM LINHAGENS DE
Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* (Metsch.) SOROKIN

JUVERLANDE LUGLI

Este trabalho corresponde a redação final -
da tese defendida pelo candidato Sr. Ju-
verlande Lugli e aprovada pela Comissão
 julgadora. Claudio
22/01/88

Prof. Dr. Claudio Luiz Messias

- Orientador -

Dissertação apresentada ao Ins-
tituto de Biologia da Universi-
dade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em
Biologia.

Campinas - SP

Janeiro/1988

Classif.	I
Autor	L967 p
V.	Ex.
Tombo BC/	9213
10	776

18/ 81429
by 9213



MP

Aos meus pais: Adelino e Dulcília

\ As minhas irmãs: Marilene, Marivani
e Valdirene

Aos meus sogros: Carlos e Virgínia

\ A minha esposa: Rosana

\ A minha filha: Bruna Carolina

dedico



AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho e, em especial:

- Ao Prof. Dr. Claudio Luiz Messias pela orientação e amizade.
- Ao Prof. Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho pela amizade, compreensão e facilidades concedidas durante a realização do trabalho.
- Ao Prof. Dr. Donald W. Roberts pela ajuda na elaboração de parte da tese.
- Aos Professores: Hebe Myrina Laghi de Souza, José Carlos da Silva e Aquiles Eugenio Piedrabuena pela leitura e valiosas sugestões dadas durante análise prévia desta tese.
- Ao Eng. José Eduardo de Hara Moreno pela presteza na colaboração com equipamentos para elaboração da parte principal da tese.
- Aos funcionários: Edna, Welson, Célia, Rita e Silvia pela amizade e auxílio.
- À minha esposa Rosana, que com grande dedicação, compreensão, estímulo e paciência me ajudou durante todo o trabalho.
- À minha irmã Marilene, pela boa vontade na ajuda da datilografia.



IMP

- Aos amigos: Airton, Nelva, Marcos, Dilaine, Ana, Regina, Cristina, Márcia, Breno, Drauzio e Ricardo, que de perto acompanharam e me ajudaram.

- Ainda àqueles como: Neto, Carlos, João, Ricardo Azevedo e Paulo que comigo conviveram e sempre juntos me estimularam para realização desse trabalho.



INDICE

	página
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1-Descrição do fungo	3
2.2-Patogenicidade	8
2.3-A parassexualidade em <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
2.3.1-A importância do ciclo parassexual.	15
2.4-Toxinas	17
2.4.1-Classificação das toxinas	18
2.4.2-Metabolismo das toxinas	19
2.4.3-Toxinas de fungos entomopatogênicos	20
2.4.3.1-Toxinas produzidas por <i>Aspergillus</i> spp	22
2.4.3.2-Toxinas produzidas por <i>Fusarium</i> <i>larvarum</i> e <i>Fusarium solani</i>	24
2.4.3.3-Toxinas produzidas por <i>Cordyceps militaris</i>	24
2.4.3.4-Toxinas produzidas por <i>Entomophthora</i> spp	25
2.4.3.5-Toxinas produzidas por <i>Nomuraea rileyi</i>	26
2.4.3.6-Toxinas produzidas por <i>Beauveria bassiana</i>	26
2.4.3.7-Toxinas produzidas por <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i>	27
2.4.3.8-Citocalasinas.	30
2.4.3.9-Propriedades das destruxinas A e B de <i>M.</i> <i>anisopliae</i>	31



	página
3- MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1- Linhagens do fungo utilizadas	33
3.2- Meios de cultura e soluções utilizadas	33
3.2.1- Meio mínimo (MM)	33
3.2.2- Meio completo (MC)	34
3.2.3- Meio mínimo mais 1% de meio completo	34
3.2.4- Meio mínimo e meio completo líquido para produção de toxinas	34
3.2.5- Solução de vitaminas	35
3.2.6- Hidrolisado de ácido nucléico de levedura	35
3.2.7- Solução salina	36
3.2.8- Solução de Tween 80 (0,1%)	36
3.2.9- Solução de Cloroneb	36
3.2.10- Solução de Benlate	36
3.2.11- Solução de extrato de levedura	37
3.2.12- Solução de caseína hidrolisada	37
3.2.13- Solução de peptona	37
3.2.14- Solução de benzeno	37
3.2.15- Solução de clorofórmio-metanol (19:1)	38
3.2.16- Solução de clorofórmio-metanol-acetato de etila	38
3.2.17- Suplementos adicionados ao meio mínimo	38
3.3- Esterilização e incubação	38
3.4- Métodos de estudos genéticos das linhagens utilizadas	39
3.4.1- Sobrevivência à luz ultra-violeta	39
3.4.2- Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos	39
3.4.3- Teste de reversão	41



	página
3.4.4- Teste de complementação	41
3.4.5- Obtenção do heterocário	41
3.4.6- Obtenção dos diplóides	42
3.4.7- Haploidização dos diplóides	42
3.5- Metodologia para produção de destruxinas.	43
3.5.1- Análise de espectrometria de massa	44
4- RESULTADOS	45
4.1- Sobrevivência à luz ultra-violeta	45
4.2- Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos	45
4.3- Teste de reversão	51
4.4- Teste de complementação	51
4.5- Obtenção do heterocário	52
4.6- Obtenção dos diplóides	53
4.7- Haploidização dos diplóides	53
4.8- Produção de destruxinas	56
5- DISCUSSÃO	77
5.1- Sobrevivência à luz ultra-violeta	77
5.2- Análise dos mutantes	79
5.3- Análise dos heterocários	81
5.4- Análise dos diplóides	83
5.5- Análise dos segregantes	86
5.6- Destruxinas	88



IIMP

6- CONCLUSO	91
7- RESUM	92
8- SUMMRY	94
9- LITERATURA CITADA	95

LISTA DE TABELAS

Tabela	página
I- Porcentagem de sobrevivência de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , linhagem E-9, após tratamento com luz ultravioleta	47
II- Porcentagem de sobrevivência de <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , linhagem F-84, após tratamento com luz ultravioleta	48
III- Frequência de reversão dos mutantes E-9 am-pir, F-84 violeta e F-84 vio-nic	51
IV- Teste de complementação de pigmento dos conídios dos mutantes F-84 violeta, F-84 vio-nic, E-9 am-pir e E-9 violeta	52
V- Crescimento de colônias que se desenvolveram em meio completo e em meio mínimo, oriundas de colônias heterocarióticas que cresceram em meio mínimo	54
VI- Constituição dos diplóides obtidos	54
VII- Setores analisados e genótipos dos segregantes dos diplóides F-84 violeta//E-9 am-pir e F-84 vio-nic//E-9 am-pir. .	56



VIII- Rf da destruxina A dos extratos das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes comparadas com o padrão E-9, cujo valor é 0,50.	63
--	----



LISTA DE FIGURAS

Figura	página
I- Curvas de sobrevivência das linhagens E-9 e F-84 de <i>M. anisopliae</i>	49
II- Passos seguidos para obtenção dos mutantes morfológicos e auxotróficos de <i>M. anisopliae</i> empregando-se a luz ultra-violeta (UV) como agente mutagênico	50
III- Setores irregulares obtido pela haploidização do diplóide D-3	55
IV- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos das linhagens selvagens E-9 e F-84 de <i>M. anisopliae</i> , mostrando o Rf da destruxina A	58
V- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos das linhagens mutantes E-9 am-pir, F-84 vio-tia e F-84 vio-nic de <i>M. anisopliae</i> , mostrando o Rf da destruxina A	59
VI- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos das linhagens diplóides D-3 e D-5 de <i>M. anisopliae</i> , mostrando o Rf da destruxina A	60
VII- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos dos setores S/B-2, S-3 e S-9 do diplóide D-3 de <i>M. anisopliae</i> ,	



	página
mostrando o Rf da destruxina A	61
VIII- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos dos setores S-1 do diplóide D-5, S/B-1a e S/B-1b do diplóide D-3 de <u>M. anisopliae</u> , mostrando o Rf da destruxina A	62
IX- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem selvagem E-9 de <u>Metarhizium anisopliae</u>	64
X- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem selvagem F-84 de <u>Metarhizium anisopliae</u>	65
XI- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593-6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem mutante E-9 am-pir de <u>Metarhizium anisopliae</u>	66
XII- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem mutante F-84 vio-tia de <u>Metarhizium snidiplise</u>	67



- XIII- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem mutante F-84 vio-nic de *Metarhizium anisopliae* 68
- XIV- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem diplóide D-3 de *Metarhizium anisopliae* 69
- XV- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem diplóide D-5 de *Metarhizium anisopliae* 70
- XVI- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S/B-1a do diplóide D-3 de *Metarhizium anisopliae* 71
- XVII- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S/B-1b do diplóide D-3 de *Metarhizium anisopliae* 72

- XVIII- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S-3 do diplóide D-3 de Metarhizium anisopliae 73
- XIX- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S/B-2 do diplóide D-3 de Metarhizium anisopliae 74
- XX- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S-9 do diplóide D-3 de Metarhizium anisopliae 75
- XXI- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S-1 do diplóide D-5 de Metarhizium anisopliae 76

1- INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos no controle micro-biológico, trouxe para os pesquisadores a necessidade de um estudo mais detalhado de alguns fungos como o *Metarhizium anisopliae*. Desde sua descoberta infectando insetos, vários autores têm utilizado este microrganismo para o combate a diversas espécies. Segundo VEEN (1968), o fungo *Metarhizium anisopliae* pode infectar mais de 200 espécies de insetos, sendo que a penetração deste microrganismo se dá através da cutícula do hospedeiro, por meio de estruturas apropriadas denominadas apressórios, e de enzimas como quitinase, protease e lipase. A partir da penetração, inicia-se o processo de colonização atingindo os órgãos internos do inseto pelo crescimento das hifas. A morte do inseto advém de uma série de fatores entre eles a produção de toxinas.

No Brasil, sua maior utilização é no combate às cigarrinhas da cana-de-açúcar e das pastagens (GUAGLIUMI, 1970-1972). Além disso, esse fungo vem sendo estudado para controle de vetores da doença de Chagas como: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*.

Sendo assim, estudos abrangendo eletroforese, virulência, serologia, cromatografia, enzimas extracelulares, produção de ácidos graxos e características morfológicas, vêm sendo conduzidos para caracterização de isolados desse fungo. Outros estudos como aspectos genéticos, são muito importantes para o melhoramento das linhagens desse patógeno. MESSIAS (1979), AL-AIDROOS (1980) e RIBA e col. (1980), puderam demonstrar o ciclo parassexual em *Metarhizium anisopliae*, por se tratar de um fungo imperfeito, cuja fase sexual não é conhecida.



No presente trabalho, procurou-se estudar duas linhagens deste patógeno: uma de origem norte-americana e a outra brasileira, visando-se a obtenção do ciclo parassexual entre linhagens diferentes.

Além disto, estudou-se a produção da destruxina A dos extratos das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes, desenvolvidas em cromatografia de camada delgada (CCD) e também em espectrometria de massa das duas destruxinas A e B.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Descrição do fungo

O fungo Metarhizium anisopliae, pertence à subdivisão Deuteromycotina, ordem Moniliales, família Moniliaceae.

Este fungo, segundo VEEN (1968), foi isolado pela primeira vez por METSCHNIKOFF em 1879, (apud TULLOCH, 1976) de um besouro Anisoplia austriaca, o qual deu o nome de Entomophthora anisopliae e mais tarde, em 1880 (apud PETCH, 1931) o mesmo autor o classificou como Isaria destructor. Após essa data, vários autores (DELA-CROIX, 1893; PETTIT, 1895; VUILLEMIN, 1904; apud PETCH, 1931); conferiram diferentes nomes a este fungo, mas permaneceu a descrição feita por SOROKIN (1883, apud PETCH, 1931) que o classificou como Metarhizium anisopliae.

Segundo BARON (1968), o fungo M. anisopliae, apresenta um corpo de frutificação associado a hifas entrelaçadas, contendo uma massa densa de conidióforos simples ou ramificados provenientes de células denominadas fiálides, das quais originam-se fialósporos que são septados, cilíndricos, hialinos ou levemente pigmentados.

BARNETT e HUNTER (1972), relataram que os conidióforos de M. anisopliae formam uma camada de esporulação onde os conídios são produzidos em cadeias basipetais, de formato ovóide a cilíndrico, unicelulares, hialinos e quando em massa surgem com uma coloração verde-oliva.

O tamanho dos conídios de *M. anisopliae*, foi descrito por vários autores, relatado inicialmente por METSCHNIKOFF (1879, apud TULLOCH, 1976), que o descreveu com dimensão de 4,8µm de comprimento, seguido por SOROKIN (1883, apud PETCH 1931), que descreveu o novo gênero de *M. anisopliae* dando as dimensões do esporo deste fungo como sendo 4,8 x 1,6µm. JOHNSTON (1915, apud TULLOCH, 1976), observou a existência de conídios longos e curtos de *M. anisopliae*, onde o autor descreveu a forma major com coloração verde brilhante e com esporos variando de 11,9 x 3,0µm, e a forma minor como verde claro e com esporos variando de 3,5 x 2,0 a 3,0µm.

TULLOCH (1976), observando 80 culturas de *Metarhizium anisopliae*, descreveu as dimensões dos conídios deste fungo sugerindo então duas separações varietais, a variedade minor (3,5 - 9,0µm) e variedade major (9,0 - 18,0µm).

AZEVEDO e MESSIAS (1981), utilizando 8 isolados diferentes de *M. anisopliae* dos quais 7 pertenciam à variedade minor (*anisopliae*) e o remanescente à variedade major, mediram os conídios destas linhagens, cujos valores encontrados para a variedade minor foi de 5,38 e 6,28µm de comprimento e largura entre 2,22 e 2,56µm; já na variedade major o comprimento foi de 10,98µm e a largura de 3,59µm. Uma análise estatística efetuada por MATOS (1983) de vários isolados, mostrou haver diferenças significativas entre os tamanhos dos conídios no comprimento e na largura destas linhagens, cujos valores concordam com os de AZEVEDO e MESSIAS (1981).

Outros autores como PETCH (1931), BALFOUR-BROWNE (1960) e BARON (1968), relataram as diferenças que ocorreram nas dimensões dos conídios major e minor de *M. anisopliae*.

FARGUES e col.(1975), trabalhando com imunoelektroforese, encontraram diferenças imunológicas importantes entre as variedades major e minor de M. anisopliae.

Com relação ao número de núcleos do conídio da variedade anisopliae, VEEN (1967) observou ao microscópio eletrônico a presença de somente um núcleo. Semelhante resultado foi obtido com outra linhagem da variedade major isolada de Oryctes nasicornis e observada com auxílio de microscópio de interferência.

ZACHARUK (1970 a,b), verificou que todos os conídios de M.anisopliae no estado de dormência ou recém-germinados eram uninucleados. Indicou também, que os conídios com dois núcleos eram devidos a um tempo necessário existente entre a duplicação do núcleo e a subsequente migração para o tubo germinativo; por isso o conídio deveria ter dois núcleos no processo de germinação. Uma confirmação deste estudo foi feita por TINLINE (1971), usando a coloração do núcleo com Giemsa e através de microscópio ótico, podendo verificar que os conídios continham somente um núcleo oriundo de conidióforos uninucleados. Quando em divisão durante o processo de germinação, o conídio pode conter dois núcleos.

Por outro lado MESSIAS e col.(1978), utilizando coloração de conídios com Giemsa em M. anisopliae verificaram a ocorrência de 95% de conídios uninucleados para 5% de binucleados. Semelhante resultado foi obtido por SILVEIRA (1982), que observou a baixa frequência de 2% e 4,75% de conídios binucleados, entre 2 linhagens de conídios haplóides parentais de Metarhizium anisopliae. MATOS (1983), também observou semelhantes resultados, analisando 7 linhagens haplóides, numa porcentagem que variou de 2,2 a 4,5% de conídios binucleados.



Quanto ao volume dos conídios, AZEVEDO e MESSIAS (1981), utilizaram "counter channelizer" para medir o volume dos conídios de *M. anisopliae*, sugerindo que possivelmente o tamanho de diferentes isolados, ou entre haplóides, seja relacionado com o número de núcleos contidos nos conídios. MATOS (1983), também calculou o volume dos conídios de 7 linhagens de *M. anisopliae* e este variou entre 15,61 e 23,86 μm^3 .

As variações de cores das colônias de vários isolados de *M. anisopliae* crescidos em dois meios de cultura: Batata Dextrose, Agar (BDA) e Difco Prune, Agar (DPA), foram observadas por LATCH (1965), à temperatura de 20°C. A cor do micélio variou de branco até amarelo claro, com branco na periferia da colônia, enquanto que a cor de esporos em massa, variou de verde claro, até marrom escuro.

Quanto à temperatura, LATCH (1965), indicou que 5 linhagens de *M. anisopliae* tiveram temperatura ótima de crescimento que variou de 25 - 30°C, sendo que um outro isolado deste mesmo fungo teve sua temperatura ótima com 20°C, mostrando somente um reduzido crescimento com temperatura de 30°C. A temperatura mais baixa observada, onde houve um crescimento bastante reduzido foi de 6°C, e a mais alta foi de 35°C. O autor cita ainda que numa das linhagens houve boa esporulação com temperatura entre 15 e 25°C, enquanto que nas demais linhagens, a esporulação foi boa entre 20 e 30°C. VILLACORTA (1978), demonstrou com várias linhagens de *M. anisopliae*, que a melhor temperatura para o crescimento deste fungo é de 28°C, sendo que acima de 30°C o desenvolvimento do fungo é afetado e abaixo de 7°C não há crescimento.



SANTOS (1978), observou também que a linhagem A de *M. anisopliae*, comporta-se diferentemente quando incubada à 28°C e à 37°C, notando crescimento apenas nas placas incubadas à 28°C. Verificou ainda que as placas reincubadas à 28°C, após terem permanecidas durante 24, 48 e 72 horas a 37°C, apresentaram um número menor e decrescente de colônias em relação as obtidas à 28°C, enquanto que as placas mantidas por 96 e 120 horas à 37°C, mesmo após 5 dias de reincubação à 28°C não apresentaram crescimento algum.

Segundo HUBER (1958), os extremos de pH para o crescimento do fungo são bastante amplos, situando-se entre 3,5 a 8,5, enquanto que LIHNELL (1944; apud VEEN, 1968) cita que estes extremos estariam em torno de 2,0 a 8,5, tendo um desenvolvimento ótimo em pH 6,9.

O fungo *M. anisopliae* é um microrganismo que requer poucos nutrientes para seu desenvolvimento, podendo desenvolver-se em meios de cultura com diferentes fontes de carbono como: amido, glicose, maltose, sacarose, quitina e outros; LIHNELL (1944, apud: VEEN 1968), e HUBER (1958). Vários outros autores descreveram meios de cultura onde esse fungo pudesse ter melhor desenvolvimento e esporulação. SANTOS (1978), verificou que o meio de arroz, foi o melhor substrato em permitir uma germinação mais rápida de seus esporos. Ademais, esse microrganismo apresenta ótimo desenvolvimento em meio mínimo e em meio completo de *Aspergillus nidulans*.

Vários métodos de conservação de fungos sem perda de viabilidade e patogenicidade, têm sido conduzidos por muitos autores. BASTOS e col (1976), verificaram, após o uso do método de CASTELLANI (1939) (conservação do fungo em água destilada) que a con-



MP

servação do fungo *M. anisopliae*, através deste método manteve sua viabilidade por 26 meses, e salientaram que em todos os testes aplicados, os aspectos morfológicos e fisiológicos do fungo não apresentaram diferenças quando comparados com a cultura original. Quanto à patogenicidade, observaram que no período de 9 dias registrou-se uma mortalidade de insetos de 75%, confirmando assim seu poder patogênico.

BELL e HAMALLE (1974), ensaiaram várias linhagens de fungos, entre elas 3 linhagens *M. anisopliae*, as quais tinham sido estocadas por longo período de tempo em sílica-gel à -20°C. Estas linhagens foram testadas contra insetos praga, constatando que *M. anisopliae* foi capaz de manter seu alto grau de patogenicidade em 3 anos de estocagem, embora somente uma das 3 linhagens tenha conseguido este grau de patogenicidade, enquanto que as restantes morreram, uma após 24 meses e a outra após 33 meses.

2.2- Patogenicidade

O fungo *M. anisopliae* desde sua descoberta infectando insetos, tem sido alvo de estudos sobre sua importância no controle biológico de uma série de insetos praga. VEEN (1968) cita que este fungo tem ação patogênica sobre 200 espécies de insetos, sendo que boa parte deles são habitantes do solo. FARGUES e col. (1975) citam que este fungo é um dos microrganismos mais conhecidos entre os fungos patogênicos de insetos e reafirmam sua ação patogênica sobre 204 espécies de hospedeiros, pertencendo à 43 famílias e 7 ordens: Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera.

No Brasil, o fungo M. anisopliae vem sendo utilizado no controle microbiológico de insetos conhecidos com o nome de cigarrinhas das pastagens (GUAGLIUMI 1970) e da cana-de-açúcar, (GUAGLIUMI (1972) pertencendo à ordem Homoptera, família Cercopidae. Também este microrganismo vem sendo estudado para controle de insetos vetores da doença de Chagas como: Triatoma infestans, Rhodnius prolixus e Panstrongylus megistus. Estudos sobre o efeito da umidade relativa na patogenicidade de diferentes linhagens desse fungo em R. prolixus foram conduzidos por MESSIAS e col. (1980). Os autores mostraram que 100% da mortalidade foi alcançada após 5 a 8 dias com umidade relativa de 97 a 100%.

SILVA e MESSIAS (1986), estudando duas linhagens de Metarhizium anisopliae, com relação a virulência em ninfas de 3º estágio de Rhodnius prolixus, verificaram atividade amilolítica, lipolítica e proteolítica de mutantes e revertentes deste fungo. Observaram que os mutantes com decréscimo na atividade amilolítica e lipolítica, mostraram baixa virulência em relação ao tipo selvagem, sendo que a reversão dos mesmos restabeleceu a virulência. Nos mutantes para protease houve redução da virulência em relação aos selvagens, mas esta redução não foi estatisticamente significativa.

MESSIAS e col. (1986), também estudaram a virulência de linhagens selvagens, mutantes auxotróficos e diplóides de Metarhizium anisopliae em Rhodnius prolixus, e verificaram que tanto os diplóides como os parentais atingiram 100% de mortalidade na dose de 1mg de conídios entre 8 e 9 dias. Nas linhagens mutantes essa mortalidade não foi alcançada até 12 a 15 dias após aplicação.



Observaram ainda, que a virulência da linhagem selvagem e do diplóide foi semelhante em todos os níveis das doses ensaiadas indicando que a virulência reduzida nos mutantes foi restabelecida na formação do diplóide. Apesar dos mutantes apresentarem baixa virulência, estes não perderam a capacidade de matar o hospedeiro.

RIBA e col. (1985), também verificaram a virulência entre linhagens selvagens, mutantes auxotróficos, diplóides e segregantes do cruzamento de mutantes morfológicos e auxotróficos de *M. anisopliae* em espécies de mosquitos de *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex pipiens*, bem como em *Ostrinia nubilalis*, e observaram que a virulência do diplóide foi comparável à das selvagens, enquanto que os segregantes exibiram virulência semelhante aos mutantes auxotróficos.

Com relação ao modo de ação do fungo BALFOUR-BROWNE (1960), relata que o mesmo penetra na cutícula do inseto através da secreção de enzimas tóxicas, e este por sua vez, morre em poucos dias pela invasão de hifas pelo corpo todo, dando um aspecto duro e quebradiço. Após ter-se desenvolvido no interior do inseto, as hifas se estendem para fora e dias após, ocorre a esporulação sobre o cadáver do hospedeiro. SILVEIRA e MESSIAS (1983), relatam que sob condições ambientais (temperatura de 28°C e umidade relativa de 90%), o tempo de penetração e colonização do fungo *M. anisopliae* em ninfas do 3º estágio de *Deois* sp com $8 \cdot 10^4$ conídios por hospedeiro, se deu entre 76 e 96 horas após inoculação, sendo que após 120 horas, a colonização é vista em grande desenvolvimento, iniciando na hemolinfa, seguida das glândulas salivares, musculatura e o tubo digestivo.

Devido a grande quantidade de isolados de *M. anisopliae*, houve necessidade de métodos de caracterização para a diferenciação dos mesmos, uma vez que aspectos morfológicos de colônia, variedade e tamanho de conídios, não são suficientes. Deste modo, técnicas como eletroforese, imunoeletroforese, serologia, virulência, enzimas extracelulares, cromatografia, produção de toxinas e aspectos genéticos, são importantes para a distinção destes isolados. Assim sendo, AL-AIDROOS e col. (1979), pode correlacionar a capacidade de degradar o amido com a virulência em linhagens de *M. anisopliae*. DE CONTI e col. (1980), analisaram por métodos eletroforéticos em gel de amido, a produção de esterase e fosfatase, observando 5 padrões para esterase em 11 isolados de diferentes regiões do Brasil, enquanto que para fosfatase somente um padrão eletroforético foi observado. ROSATO e col. (1981) analisaram a produção de enzimas extracelulares: amilase, protease, quitinase e lipase, também destes isolados, verificando que de uma maneira geral, os isolados da mesma região têm similar produção de enzimas. MESSIAS e col. (1983), utilizando a técnica de cromatografia gasosa, compararam conídios de 6 linhagens da variedade *anisopliae* e uma linhagem da variedade *major*, e observaram que a similaridade entre elas, era bem significativa, compreendendo entre 62 e 88%, sendo que duas delas pareceram ser bastante semelhantes em torno de 98%. Também tem sido utilizado a cromatografia gasosa para avaliação qualitativa de ácidos graxos em micélio e conídios e este método foi proposto pelos autores como uma técnica simples para identificação rotineira de linhagens de *M. anisopliae*. Os principais ácidos graxos encontrados foram: palmítico, oléico, linoléico e esteárico, sendo que a proporção relativa de cada ácido graxo difere na maioria das linhagens estudadas, (PUPIN e MESSIAS 1984).



Diversos autores têm relatado a cerca das características entomopatogênicas do *M. anisopliae*, em uma grande diversidade de espécies para as quais ele é patogênico. Dados adicionais a respeito disso, poderá ser encontrado na revisões feitas por SANTOS (1978) e SILVA (1985).

2.3- A parassexualidade em *M. anisopliae*

O fungo *M. anisopliae*, tem sua importância no controle biológico de insetos (VEEN 1968), e por isso vários autores vêm estudando este microrganismo sob diversos aspectos como: produção de toxinas (ROBERTS 1969), eletroforese (De CONTI e col. 1980) e técnicas de cromatografia gasosa (MESSIAS e col. (1983). A parassexualidade deste fungo, relatada por MESSIAS (1979), MESSIAS e AZEVEDO (1980) e AL-AIDROOS 1980), foi bastante importante para estudos de melhoramento genético nesse microrganismo, o que possibilitará mapeamento de genes e identificação de grupos de ligação, sendo muito difícil sem o ciclo parassexual.

TINLINE e NOVIELLO (1971), demonstraram um dos passos importante do ciclo parassexual, a heterocariose utilizando mutantes auxotróficos de *M. anisopliae*. Apesar de seus resultados indicarem a ocorrência deste evento neste microrganismo, os autores tiveram dificuldades na demonstração da heterocariose, sugerindo que estas foram devido a distribuição dos núcleos nas hifas e também o baixo grau de complementariedade entre alguns mutantes auxotróficos.

MESSIAS, (1979), MESSIAS e AZEVEDO (1980) e AL-AIDROOS, puderam pela primeira vez, demonstrar o fenômeno da parasse-

^{MP} xualidade neste fungo, trabalhando com mutantes morfológicos (coloração de conídios) e mutantes auxotróficos, utilizando como agente mutagênico a luz ultra-violeta, (UV) com uma dose que permitiu 5% de sobreviventes.

MESSIAS (1979), cita ainda que, o mutagênico físico usado (UV) foi eficiente na obtenção dos mutantes auxotróficos, e a frequência de aparecimento destes mutantes, foi em torno de 0,28%, frequência esta baixa quando comparada com aquelas obtidas por PONTECORVO e col. (1953) em *A. nidulans*. Em vista disto os autores sugeriram que sejam estudados outros mutagênicos que possam dar melhores resultados.

Com relação a heterocariose, os autores relataram que em todos os mutantes usados houve complementação em meio mínimo, as marcas auxotróficas comportaram-se como recessivas, e que o comportamento heterocariótico entre duas linhagens era não autônomo. Os diplóides obtidos possuíam coloração igual à do selvagem, e o tamanho dos conídios, tanto os haplóides quanto os diplóides não diferiram, mas no entanto o diâmetro do núcleo dos conídios diplóides foram maiores do que os dos haplóides. A frequência com que esses diplóides foram obtidos foi de 1,6 em 10^6 conídios em meio mínimo, frequência esta considerada baixa em relação aos fungos que possuem conídios multinucleados.

A utilização do Cloroneb pelos autores, para haploidização, foi bastante eficaz numa concentração de 100µg/ml, de maneira que puderam isolar 63 setores, sendo que a maior parte deles foi de combinações parentais. Contudo esse resultado foi explicado devido a uma série de fatores:

- 1- O fungo possui um pequeno número de grupos de ligação , sugerindo os autores, como sendo não mais que 4 cromossomos;
- 2- Seleção de combinações de marcas genéticas em detrimento de outras combinações;
- 3- Todos os diplóides analisados, eram provenientes de uma linhagem parental comum e segundo os autores a indução através da luz ultravioleta para a obtenção de mutantes auxotróficos, é possível, que surjam aberrações cromossômicas como translocação, justificando a predominância do tipo parental.

Do mesmo modo que MESSIAS e AZEVEDO (1979), AL-AIDROOS (1980), demonstrou o fenômeno da parassexualidade neste fungo, empregando mutantes resistentes à acriflavina, os quais na fase diplóide mostraram serem todos recessivos. Os diplóides conseguidos, diferiram fenotipicamente do selvagem haplóide na conídiação e micélio amarelado. Dos vários diplóides resistentes a acriflavina dois deles foram capazes de crescer com uma alta concentração da droga, mais do que os parentais. Segundo a autora, não foi possível conseguir uma totalidade na recombinação, mas alguns fenótipos novos foram obtidos.

BERGERON e AL-AIDROOS (1982), analisando a haploidização de vários diplóides indicaram que os conídios diplóides, foram significativamente maiores do que a linhagem haplóide. Analisaram também que o tamanho e a morfologia dos conídios foram usados para determinar a forma diplóide. Todos os diplóides obtidos foram prototróficos, indicando assim a recessividade das marcas auxotróficas envolvidas. Na haploidização, os autores obtiveram setores espontaneamente, mas com o uso de Benlate, esses setores aumentaram de 5 para 10 vezes.



Segundo estes autores, *M. anisopliae* possui 5 grupos de ligação e através de haploidização, puderam determinar 8 marcas nesses grupos de ligação.

2.3.1- A importância do ciclo parassexual

De todos os sistemas alternativos do sexo, estudados em microrganismos, somente o ciclo parassexual se destaca, por apresentar uma fase diplóide estável nas espécies de fungos em que o ciclo sexual inexistente, sem contar com aqueles que os dois ciclos coexistem, oferecendo a estas espécies, um modo alternativo de recombinação genética. Todavia, nos fungos imperfeitos a parassexualidade, é a única possibilidade para recombinação genética. A aplicação prática do ciclo parassexual na indústria, tem grande valia, porque a maior parte dos fungos de valor industrial, são imperfeitos, e seu melhoramento só poderia ser feito através de mutações. Deste modo, por exemplo, a produção de penicilina e de ácido cítrico foi aumentada utilizando a parassexualidade, a qual foi possível com a combinação de genes desejáveis em uma única linhagem. Do mesmo modo, em fungos fitopatogênicos, o ciclo parassexual parece ajudar no aparecimento de novas raças fisiológicas, sendo um importante meio de variação nestes fungos. Ademais, melhoramento em outros fungos puderam ser feitos com auxílio deste processo parassexual. MESSIAS (1977), trabalhando com *Aspergillus flavus*, tentou comparar a parassexualidade com a produção de aflatoxina, e verificou que esta correlação é complexa e possivelmente dependente de muitos genes.



Assim , o ciclo parassexual representa um papel de relevância, principalmente em fungos de importância econômica, abrindo novas perspectivas para o melhoramento destes microrganismos.



2.4- Toxinas

As toxinas produzidas por microrganismos foram descobertas a cerca de um século na história da bacteriologia de doenças infecciosas. Mais recentemente o papel das toxinas no processo de infecção por microrganismos em insetos vem sendo alvo de atenção de diversos autores. (TOUMANOFF, 1928; BURNSIDE, 1930; DRESNER, 1950 e KODAIRA, 1961a,b e 1962).

As toxinas são consideradas um dos mecanismos possíveis de patogenicidade, não sendo um fator exclusivo do microrganismo, mas sim a interação entre o microrganismo e o hospedeiro.

A maior parte das toxinas microbianas são produzidas por bactérias e fungos, sendo que algumas delas já vêm sendo utilizadas no controle de populações de insetos-pragas. Os diversos problemas causados pelo uso indiscriminado de inseticidas químicos despertou um interesse cada vez maior para o uso de produtos biológicos como agentes controladores de insetos.

As toxinas produzidas por microrganismos patogênicos não são os únicos elementos responsáveis pela mortalidade dos insetos afetados. Diferentes hospedeiros variam na susceptibilidade para uma determinada toxina, enquanto que algumas toxinas podem ter uma grande diversidade de hospedeiros susceptíveis (LYSENKO e KUČERA 1971).

2.4.1- Classificação das toxinas

As toxinas segundo LYSENKO e KUČERA (1971), são classificadas empregando-se diferentes critérios, de maneira que um mesmo composto pode ser adequado em várias classes distintas.

Assim, 3 principais critérios são utilizados: localização anatômica, local onde as toxinas são produzidas na célula, modo ou sítio de ação no hospedeiro e a estrutura de suas moléculas.

1- Localização anatômica: define o local onde são encontradas, produzidas e acumuladas, sendo denominadas endotoxinas quando produzidas e acumuladas no interior da célula, e exotoxinas quando são excretadas e carregadas para fora da célula durante a fase de crescimento.

2- Sítio de ação: define o local onde as toxinas atuam, exemplificando: as toxinas que afetam o sistema nervoso são chamadas neurotoxinas, aquelas que afetam o trato-gastrointestinal, são as enterotoxinas e, aquelas que causam lise nos eritrócitos são as hemolisinas. Este tipo de classificação é considerado um dos mais antigos e é baseado em evidências farmacológicas e clínicas.

2.1-Modo de ação: Este critério de classificação parece mais adequado, pois baseia-se na atividade bioquímica das toxinas sobre o substrato, contudo torna-se difícil o conhecimento do mecanismo bioquímico das toxinas a nível de hospedeiro.

3- Estrutura molecular: Baseia-se na estrutura molecular das toxinas. São distinguidos 3 tipos principais de moléculas de toxinas: as simples, as complexas e as mistas. BOVENTRE e col. (1967) sugerem que o efeito tóxico está estreitamente relacionado com a complexidade da molécula de toxina.

2.4.2- Metabolismo das toxinas

As toxinas têm sido intensivamente estudadas por vários autores dentro da microbiologia médica, e mais recentemente no aspecto bioquímico e imunológico, o que fez surgir novos métodos de estudos abrindo perspectivas e solucionando problemas antes insolúveis. No entanto pouco ainda se sabe sobre as toxinas produzidas por microrganismos entomopatogênicos e seu efeito como inseticida.

Poucos microrganismos tem sido estudados como produtores de toxinas. O modo de ação, bem como a natureza das substâncias produzidas por estes elementos não estão bem determinadas e algumas vezes, torna-se difícil a classificação de tais substâncias como toxinas.

Em fungos a produção de compostos tóxicos atuam conjuntamente para causar vários efeitos. Modernos métodos bioquímicos vêm sendo utilizados para separação e caracterização destes compostos, e além disso, é necessário que se conheça o metabolismo destas substâncias e seu valor como agente de mortalidade nos insetos.

PRASERTPHON e TANADA (1969), estudaram as quantidades de toxinas produzidas por *Entomophthora apiculata* e *E. coronata*, verificando que esta última foi a que mais produziu o composto tóxico em meio líquido em um mesmo período de tempo. As duas espécies produziram mais toxinas quando cultivadas sob agitação do que em cultivo estacionário. Segundo os autores, isto se deve à maior aeração e circulação do meio de cultura. Ainda, relatam que as toxinas produzidas parecem ser mais um produto de excreção do que da autólise do fun-



go, o que se justificaria pela quantidade detectável de compostos encontrados após 36 horas de cultivo enquanto que o processo de autólise só se iniciaria após 48 horas de cultivo.

2.4.3- Toxinas de fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos também são responsáveis pela produção de substâncias que exibem efeito tóxico sobre insetos hospedeiros, sendo assim estas substâncias podem ter ação sobre o hospedeiro em diferentes níveis, atuando sinergisticamente com outros fatores para levá-lo à morte.

ROBERTS (1981) relata em sua revisão que a produção de toxinas nos hospedeiros deve vir precedida de várias atividades do fungo e as dividiu em 9 passos:

- 1- Ligação da unidade infectiva (conídios) na epicutícula do inseto;
- 2- Germinação do conídio na cutícula;
- 3- Penetração na cutícula pelo tubo germinativo ou pelo apressório;
- 4- Multiplicação das hifas na hemocela;
- 5- Produção de substâncias tóxicas;
- 6- Morte do inseto;
- 7- Desenvolvimento micelial com invasão de todos os órgãos do inseto;
- 8- Migração das hifas do interior para o exterior do inseto;
- 9- Produção da unidade infectiva no exterior do inseto;

Salienta o autor que o fungo que não completa os passos de 1 a 4 tem baixa virulência, embora possa ter alta capacidade de biosíntese de toxinas.



NP

LYSENKO e KUČERA (1971), sugeriram que o uso de modernos métodos bioquímicos para isolamento e caracterização de substâncias tóxicas é muito importante. Quanto mais a toxina for purificada e definida mais precisamente o mecanismo de sua ação poderá ser elucidado, sem interferência de outros compostos biologicamente ativos que contribuem para o efeito tóxico. Segundo KODAIRA (1961a), isto seria importante porque alguns compostos, substâncias de alto peso molecular são liberados na quebra de compostos fontes de carbono e nitrogênio, estando portanto presentes no meio de cultivo e exercendo também uma ação tóxica.

Vários autores relatam a produção de substâncias tóxicas tanto "in vitro" como "in vivo" por fungos entomopatogênicos, a várias espécies de insetos hospedeiros. KODAIRA (1959), observou o efeito tóxico de 7 linhagens de fungos incluindo Beauveria bassiana, M. anisopliae e Nomuraea rileyi, sobre o bicho da seda, Bombyx mori, verificando o autor, que a espécie que apresentou maior efeito tóxico foi M. anisopliae. O mesmo autor mais tarde em 1962, extraiu e purificou substâncias tóxicas de filtrados de M. anisopliae as quais denominou de destruxina A e B. ROBERTS (1966 a,b) isolou compostos semelhantes a estas destruxinas de culturas da mesma espécie, e as injetou na hemocela de larvas de Galleria mellonella e de Bombyx mori, obtendo insetos que apresentaram paralisia tetânica.

Nos estudos das toxinas os insetos podem ser expostos aos metabólitos tóxicos de três maneiras:

- 1- Por ingestão (via oral);
- 2- Por contato cuticular;
- 3- Por injeção na hemocela;

As toxinas que apresentam efeito quando ensaiadas por via oral ou por contato podem ser vistas como inseticidas em potencial, enquanto que por injeção servem para elucidar o modo de ação das mesmas (ROBERTS e YENDOL, 1971).

LYSENKO e KUČERA (1971), classificaram as toxinas em substâncias de alto e baixo peso molecular e substâncias não definidas quimicamente. Os autores citam ainda em seu trabalho de revisão que várias enzimas (proteases, lipases, ureases, amilases, enzimas hidrolíticas e quitinases) produzidas por fungos entomopatogênicos podem agir como toxinas.

KUCERA e SAMŠIŇÁKOVÁ (1968), consideram ser possível que o complexo proteolítico de *Beauveria bassiana* possa estar incluído entre os fatores tóxicos responsáveis pela ação deste fungo em insetos. Alguns autores excluem enzimas produzidas por fungos entomopatogênicos como toxinas (BOVENTRE e col., 1967), uma vez que enzimas como quitinase e protease ajudariam na penetração da cutícula do inseto e não teriam efeito tóxico direto sobre eles.

2.4.3.1- Toxinas produzidas por *Aspergillus* spp

O gênero *Aspergillus* está entre os mais estudados quanto à produção de toxinas durante seu desenvolvimento saprofítico. A espécie *Aspergillus flavus* pode causar danos a diversos animais, inclusive ao homem que se alimentam de substratos onde o fungo tenha desenvolvido, devido a um grupo de toxinas exógenas designadas de aflatoxinas. Até 1968 pensava-se que apenas as espécies de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* produziam aflatoxinas. É co-



nhcido outras espécies com esta mesma propriedade como listaram DIENER e DAVIS (1969).

As aflatoxinas atualmente estão entre as toxinas mais bem estudadas, conforme relatado por DETROY e col. (1971), e RODRICKIS e col. (1977). Dezenas de tipos de aflatoxinas são conhecidas (STOLOFF, 1977), mas somente quatro delas B1, B2, G1 e G2 tem sido testadas em insetos. As aflatoxinas são moléculas hepatóxicas de baixo peso molecular, letais "per os" em altas doses para a maioria das espécies de animais, e causando alterações quando em pequenas doses (CARNAGHAN e col. 1963). Outros efeitos das aflatoxinas relatados por LEGATOR (1966), são: supressão na síntese de DNA; irregularidade na mitose e indução de bacteriófagos em bactérias lisogênicas.

A espécie *Aspergillus ochraceus* produz substâncias tóxicas a larvas do bicho da seda (KODAIRA, 1961b). O composto ativo inicialmente foi incorretamente identificado como ácido amino-anídrico. Mais tarde MYOKEY e col. (1969), isolaram uma substância a qual denominaram de aspocracina e também identificaram sua estrutura química. Esta substância mostrou-se tóxica a insetos e ratos nas doses de 100µg/g e maior que 165µg/g quando injetadas na hemolinfa e intravenosa, respectivamente.

Devido a estes e outros problemas causados a diversos animais e ao homem, estes microrganismos mostraram-se impróprios para a utilização no controle biológico de insetos.



2.4.3.2- Toxinas produzidas por *Fusarium larvarum* e *Fusarium solani*

CLAYDON e col. (1977), investigaram em duas linhagens de *Fusarium solani*, patógenos de besouros *Scolytus scolytus* e *Homarus americanus* a produção em meio de cultura de superfície de produtos inseticidas. Vários produtos foram detectados, mas o grande inconveniente na utilização destes fungos no controle biológico, seriam os efeitos fitotóxicos, anti-bacterianos e anti-fúngicos, já conhecidos de tais substâncias. Os mesmos autores em 1979, isolaram de duas linhagens de *Fusarium larvarum*, de diferentes localidades e hospedeiros, vários produtos metabólitos como a monocerina, meleina e os produtos naturais 7-O-dimetil-monocerina, 6-metil-eter-fusaretina e 6,7-dimetil-eter-fusaretina. Os metabólitos monocerinas e éteres fusaretinas encontrados em menor quantidade mostraram atividades inseticidas em bio-ensaio contra mosca *Calliphora erythrocephala*.

2.4.3.3- Toxinas produzidas por *Cordyceps militaris*

CUMNIGHAM e col. (1951) e KREDICH e GUARINO (1961 a,b) isolaram e identificaram uma substância de *Cordyceps militaris* e a denominaram de cordicepina, cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{13}O_3N_5$. Observaram que esta substância inibe o crescimento de várias linhagens de *Bacillus subtilis*. Em insetos, tal substância foi testada, sendo levemente tóxica para *G. mellonella* (ROBERTS 1981).

Segundo ROBERTS (1981), a LD-50 para larvas de último estágio de *G. mellonella*, por injeção intra-hemocélica foi de

30µg/g, sendo que doses subletais não afetaram a produção de ovos, mas altas doses causaram a formação de pupas defeituosas, as quais não se tornaram adultas. Filtrados de cultura deste fungo foram tóxicos para larvas de *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* e *Aedes spactius* (BELLONCIK e PARENT, 1976).

2.4.3.4- Toxinas produzidas por *Entomophthora* spp

YENDOL e col.(1968), utilizaram três espécies de *Entomophthora* e extraíram toxinas de filtrados de cultura, as quais se revelaram tóxicas à *G. mellonella* e *Musca autumnalis*. PRASERTPHON e TANADA (1969), estudaram quatro espécies de *Entomophthora* para a produção de toxinas, e somente duas espécies de *E. coronata* e *E. apiculata* produziram toxinas, tanto "in vitro" como "in vivo". Estas substâncias foram tóxicas para larvas de *G. mellonella*, não causando paralisia tetânica, mas provocando sinais de escurecimento nas larvas e também inibindo o crescimento bacteriano em larvas mortas. Diferentes espécies de insetos, mostraram diferentes respostas quando tais substâncias tóxicas foram injetadas, mas de maneira geral elas inibem a metamorfose, mudas e alimentação.

CLAYDON (1978), isolou e identificou duas toxinas de *E. virulenta* produzidas "in vitro" e, quando foram injetadas na mosca *Calliphora erythrocephala* foram letais, mas há dúvida quanto à sua produção durante o processo da doença no inseto.

2.4.3.5- Toxinas produzidas por Nomuraea rileyi

Substâncias tóxicas não definidas foram extraídas de micélio de N. rileyi produzidas em cultura submersa. A injeção em larvas de Lymantria dispar desses extratos, provocou 47% de mortalidade após 3 dias, 60% em 7 dias e 63% em 20 dias (WASTI e HARTMAN, 1978).

Segundo MIKUNI e KAWAKAMI (1975), aplicações tóxicas de extratos de micélio causaram mortalidade em Galleria sendo que, esta mortalidade em 20 dias atingiu 83%. A ação tóxica da aplicação tóxica não é comum entre as toxinas conhecidas em fungos entomopatogênicos. Os autores sugeriram ainda que os compostos ativos destes extratos, não seriam os mesmos que causaram a morte rápida de larvas de L. dispar infectadas por N. rileyi.

A injeção de filtrados de hemolinfa de Bombyx mori infectadas por N. rileyi em larvas sadias, causou precocidade na formação de pupas. Os compostos ativos não foram ainda identificados, mas sabe-se que é possível detoxificar os filtrados através do aquecimento a 50°C por minuto, uso de solventes não polares, e pH extremos.

2.4.3.6- Toxinas produzidas por Beauveria bassiana

VINING e col. (1962) isolaram uma substância de B. bassiana que denominaram de oosporeína. Esta mostrou-se tóxica a insetos. WEST e BRIGGS (1968), observaram que filtrados de cultura de B. bassiana quando injetados em larvas de G. mellonella, mostravam to-

xicidade. HAMILL e col. (1969), isolaram e identificaram uma destas substâncias e a denominaram bovericina. Esta mostrou-se tóxica para larvas de mosquitos e para um tipo de camarão Artemia salina. Mais tarde outros autores KANAOKA e col. (1978), verificaram que bovericina não era tóxica a larvas do bicho da seda por via oral, mesmo em doses maiores que 1000 ppm. CHAMPLIN e GRULA (1979), ensaiaram bovericina em larvas de Heliothis zea, e através da análise da hemolinfa dos insetos infectados, notaram que a bovericina não se encontrava na forma solúvel, durante o tempo em que a larva estava em contato com o microrganismo (4 dias). Injeções intra-hemolinfa de bovericina sintética (6µg), também falharam em induzir efeito danoso a estes insetos.

MURAKOSHI e col. (1978), isolaram de B. bassiana e Verticillium lecanii, uma substância que denominaram bassianolida, a qual havia sido identificada por SUZUKI e col. (1977), como um ciclo depsipeptídeo que era letal a larvas de Bombyx mori no 4º estágio quando administrado através da alimentação. Na dose de 4 ppm esta toxina causou sintomas de fraqueza no inseto e acima de 8 ppm foi letal. Assim sugeriram que os efeitos ocorridos em insetos atacados por este fungo parecem estar relacionados à toxina, tal qual bassianolida.

2.4.3.7- Toxinas produzidas por Metarhizium anisopliae

Em M. anisopliae variedade anisopliae foram identificadas duas substâncias tóxicas a insetos denominadas destruxinas A e B, as quais foram isoladas de filtrados de cultura deste fungo por KODAIRA (1962) e ROBERTS (1969). Suas fórmulas estruturais foram demonstradas por TAMURA e col. (1964) e SUZUKI e col. (1966) como



sendo um depsipeptídio cíclico contendo 5 aminoácidos e ácidos graxos em proporções equimolares. A diferença entre as duas destruxinas ocorre apenas nos ácidos graxos, sendo que o ácido graxo da destruxina A é composto de 2-D, hidroxí-4-ácido pentanóico e na destruxina B é de 2-D, hidroxí-4-ácido metil valérico.

SUZUKI e col. (1966), verificaram ainda que estas toxinas causavam paralisia tetânica em larvas de *G. mellonella* e *Bombyx mori*, quando injetadas na hemolinfa. As destruxinas mostravam-se tóxicas tanto a insetos como a mamíferos. No caso de mamíferos (ratos) a observação foi constatada quando injetaram intra-peritonealmente uma dose de 1,8 a 17,0mg/kg que os levou à morte (TAMURA e TAKAHASHI, 1971).

CRISAN, (1971), estudou o efeito da ingestão de esporos de *M. anisopliae* em larvas de mosquitos, e concluiu que as toxinas não identificadas como destruxinas foram liberadas no intestino e causaram intoxicação e morte. Mas é possível que a mortalidade tenha resultado do uso de alimento exaurido nutricionalmente. Foi sugerido que *M. anisopliae* seria mais promissor como patógeno do que como fonte de toxinas.

SUZUKI e col. (1970) e SUZUKI, e TAMURA (1972), relataram destruxinas com 6 ciclo de depsipeptídios com um esqueleto de 5 membros de aminoácidos: alalina, β alanina, valina, isoleucina e prolina, isolados de filtrado de cultura do fungo. Além das destruxinas A e B, novas destruxinas de *M. anisopliae* foram isoladas por SUZUKI e col. (1970), denominadas C e D e uma outra chamada desmetildestruxina B, cujas fórmulas estruturais foram determinadas por SUZUKI e col. (1971). Posteriormente PAIS e col. (1981) estabeleceram as



MP

estruturas de mais 9 destruxinas: E, A1, A2, B1, B2, C2, D1, D2, e E1, todas isoladas do meio de cultura de M. anisopliae.

A susceptibilidade à destruxinas varia consideravelmente nas várias espécies de insetos. Em larvas de B. mori, a injeção intra-hemocélica das destruxinas A e B, mostrou uma LD-50 de 0,15 a 0,30µg/g em 24 horas (KODAIRA, 1961 a, SUZUKI e col.1971); nas larvas de Galleria a susceptibilidade foi de 300 e 500 vezes menor para destruxina A e B respectivamente (Roberts não publicado), e em outras espécies de insetos, como larvas de lepidoptera, a administração de destruxina em altas doses causou tetania num período superior a 3 minutos, sendo que em dose baixa, a paralisia tetânica foi curta ou até ausente.

Segundo AL-AIDROOS e ROBERTS (1978), utilizando vários mutantes de M. anisopliae houve correlação direta entre o nível de produção "in vitro" de destruxina e a virulência em larvas de mosquitos.

SUZUKI e col. (1971), extraíram destruxina B e desmetildestruxina B de larvas de B. mori infectadas com M. anisopliae e estimaram a quantidade total de destruxina nas larvas pela análise de β alanina de frações positivas. As larvas foram infectadas pela aplicação tópica de conídios e após 4 dias, sinais de crescimento do fungo foram observados. A maioria das larvas morreu no 5º dia após a infecção, larvas vivas continham 0,0004µ moles de destruxina/larva no 4º dia, e 0,0006µ moles de destruxina/larva no 5º dia, quantidade semelhante a que a causou morte e paralisia em larvas do bicho da seda injetada com destruxina B pura (KODAIRA 1961a). As larvas mortas foram congeladas e analisadas, indicando uma quantidade 0,02µ moles de des-



.MP

truxina/larva, isto segundo ROBERTS (1966 b), foi suficiente para causar sua morte. Paralisia tetânica similar aquela induzida pela injeção de destruxina, ocorreu em *B. mori* imediatamente antes da morte pela infecção do fungo. Estes experimentos mostram destruxina como um provável causador de morte em *B. mori* infectado por pelo menos duas linhagens de *M. anisopliae*.

Estudos feitos com a variedade *major* de *M. anisopliae*, foram conduzidos por KAIJIANG e ROBERTS (1986), para verificar se a mesma produzia destruxinas da mesma maneira que a variedade *anisopliae*, e por isso utilizaram linhagens provenientes de vários países, e usaram como padrão uma mistura de purificado de destruxina A e B da linhagem F-84 variedade *anisopliae*, que apresentavam valores de Rf 0,52 e 0,61 para as destruxinas A e B respectivamente.

Através da cromatografia de camada delgada e espectrometria de massa, puderam verificar que de 5 isolados somente dois não produziram quantidade detectáveis de destruxinas, e também observaram que a maioria dos materiais extraídos de filtrados e micélios foi óleo, podendo constatar que este era tóxico para larvas de *G. mellonella*, e sugeriram que na ausência de destruxinas, o óleo toma papel importante para superar o hospedeiro.

2.4.3.8- Citocalasinas

Assim como as destruxinas, as citocalasinas também são metabólitos fúngicos que possuem fórmula estrutural de perhidro-indóis tendo um anel macrocíclico. Suas atividades biológicas incluem produção de células polinucleadas pela inibição de clivagem do



citoplasma de culturas de células de mamíferos, inibição de movimento celular e extrusão nuclear (STEYN, 1977). O conhecimento destas toxinas é de grande interesse para o uso como ferramentas na biologia celular e medicina. Dez citocalasinas são produzidas por uma grande variedade de fungos (NATORI 1977). ALDRIDGE e TURNER (1969), isolaram duas citocalasinas C e D de culturas de *M. anisopliae*. Estes compostos foram testados contra larvas de *Galleria* não se observando nenhum efeito. Não se conhece seu efeito sobre outros insetos.

2.4.3.9- Propriedade das destruxinas A e B de *Metarhizium anisopliae*

KODAIRA (1962), isolou e purificou destruxinas A e B de *M. anisopliae* e determinou algumas propriedades destes dois compostos. O autor verificou inicialmente que a destruxina A é solúvel em vários solventes como: metanol, etanol, acetato de etila, clorofórmio, dissulfeto de carbono e tetracloreto de carbono; solúvel em água a 25°C e em ligroina aquecida. Esta destruxina é instável em temperatura ambiente por longo tempo; não é decomposta em água fervente num período de 1 hora; não tem halogênio e enxofre; reação com ninhidrina é negativa possui duplo ponto de fusão, 125° e 188°C.

A análise elementar desta destruxina de ponto de fusão 125°C, resultou na fórmula de $C_{35}H_{53}O_7N_5$, e para o ponto de fusão de 188°C, a fórmula molecular foi de $C_{29}H_{45}O_7N_5$.

A destruxina B é facilmente solúvel em metanol, clorofórmio, etanol e benzeno; é mais insolúvel em água do que a destruxina A; em temperatura normal é insolúvel em ligroina e em éter de

petróleo; dissolve-se gradualmente quando aquecida; a reação com ninhidrina também é negativa; e a instabilidade quando aquecida é a mesma da destruxina A. Sua fórmula molecular é $C_{25}H_{42}O_6N_4$.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Linhagens do fungo utilizadas

Foram utilizadas as linhagens F-9, isolada de insetos adultos de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae) no Estado do Espírito Santo pelo Dr. José Aires Ventura (ENCAPA), e a F-84 de origem Norte-americana isolada de *Conoderus* sp (Coleoptera: Elateridae), cedida pelo Dr. Donald W. Roberts, do Boyce Thompson Institute for Plant Research, Cornell University - USA, todas da variedade *anisopliae*.

3.2- Meios de cultura e soluções utilizadas

3.2.1- Meio Mínimo (MM) (PONTECORVO e col. 1953)

NaNO ₃	6,00 g
KH ₂ PO ₄	1,52 g
KCl	0,52 g
MgSO ₄ 7.H ₂ O	0,52 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,00 g
Agar.	15,00 g
Água destilada	1.000 ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 8%, ou HCl 1N.

3.2.2- Meio completo (MC) (PONTECORVO e col.1953).

Acrescentou-se ao Meio Mínimo as seguintes substâncias:

Peptona	2,00 g
Extrato de levedura	0,50 g
Caseína hidrolisada	1,50 g
Solução de vitaminas	1,00 ml
Hidrol. ác. nucléico de levedura . .	2,50 ml

O pH foi ajustado para 6,5 com NaOH 8% ou HCl 1N.

3.2.3- Meio mínimo mais 1% de meio completo.

Meio mínimo adicionado de 1% de meio completo foi distribuído em tubos de ensaio (2,5 ml cada) e autoclavado em seguida a 120°C por 20 minutos.

3.2.4- Meio mínimo e meio completo líquido para produção de toxinas.

O meio mínimo e o meio completo líquidos foram preparados de acordo com os itens 3.2.1 e 3.2.2 descritos acima, sem adição de agar, sendo distribuídos 1,5 l em Erlenmeyer de 3 l

3.2.5- Solução de vitaminas.

Ácido nicotínico	.100,00 mg
Ácido p-aminobenzóico	10,00 mg
Piridoxina	50,00 mg
Tiamina	10,00 mg
Riboflavina	.100,00 mg
Biotina	0,20 mg
Água destilada esterilizada	.100,00 ml

A solução foi parcialmente esterilizada em banho-maria à 60°C por 15 minutos, e guardada em frasco escuro no refrigerador, adicionando-se à solução gotas de clorofórmio.

3.2.6- Hidrolisado de ácido nucleico de levedura.

Primeiramente foram adicionados 2,5g de ácido nucleico de levedura em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico. Em seguida a mesma quantidade de ácido nucleico de levedura (2,5g) foi adicionado em 15 ml de solução normal hidróxido de sódio. Ambas soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos, em seguida misturadas e o pH ajustado para 6,0. O volume foi então completado para 40,0 ml e a preparação foi conservada em refrigerador.

3.2.7- Solução salina.

Adicionou-se 8,5g de cloreto de sódio em 1 l de água destilada, distribuindo-se alíquotas de 9 ml em frascos de 20 ml. Os frascos foram autoclavados à 120°C por 20 minutos e conservados em temperatura ambiente.

3.2.8- Solução de Tween 80 (0,1%).

Adicionou-se 0,1 ml de tween 80 em 99,9 ml de água destilada distribuindo-se em seguida em quantidades iguais de 2,5 a 3,0 ml em tubos de ensaio que foram autoclavados a 120°C por 20 minutos.

3.2.9- Solução de Cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno)

A solução de Cloroneb foi obtida dissolvendo-se 300mg da substância em 20 ml de água destilada esterilizada, sendo a mesma mantida sob refrigeração.

3.2.10- Solução de Benlate (1-metil,2-butil,carbamoil, carbamato de benzimidazol).

A solução de Benlate foi preparada dissolvendo-se 60mg da substância em 1ml de acetona, seguido do acréscimo de 99 ml de água destilada esterilizada, sendo à mesma mantida a temperatura ambiente.

3.2.11- Solução de extrato de levedura.

Em 19 ml de água destilada esterilizada foram dissolvidos 100mg de extrato de levedura e a solução resultante foi parcialmente esterilizada em banho-maria à 60°C por 15 minutos e conservada sob refrigeração.

3.2.12- Solução de caseína hidrolisada

Preparou-se a solução dissolvendo-se 100 mg de caseína hidrolisada em 10 ml de água destilada esterilizada, realizando-se em seguida a esterilização parcial em banho-maria à 60°C por 15 minutos, e conservação sob refrigeração.

3.2.13- Solução de peptona.

Adicionou-se 100 mg de peptona em 10 ml de água destilada esterilizada, seguido da esterilização parcial em banho-maria à 60°C por 15 minutos, e conservação em refrigeração.

3.2.14- Solução de benzeno.

Foi preparada uma solução de benzeno com 95% da substância, adicionando 5 ml de acetato de etila. A solução foi guardada em temperatura ambiente.

3.2.15- Solução de clorofórmio-metanol (19:1).

Foi preparada uma solução de clorofórmio-metanol na proporção de 19:1 (v/v), a qual foi conservada em temperatura ambiente.

3.2.16- Solução de clorofórmio-metanol-acetato de etila.

Preparou-se uma solução de clorofórmio-metanol-acetato de etila na proporção de 8,5:0,5:1,0 ml respectivamente, a qual foi conservada em temperatura ambiente.

3.2.17- Suplementos adicionados ao meio mínimo.

Piridoxina	50 µg/ml
Tiamina	50 µg/ml
Ácido nicotínico	50 µg/ml

3.3- Esterilização e incubação.

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizadas como descritos nos itens anteriores, enquanto que as vidrarias foram esterilizadas em forno de Pasteur 180°C por 2 horas. A temperatura de incubação de todos os experimentos foi de 28°C.

3.4- Métodos de estudos genéticos das linhagens utilizadas.

3.4.1- Sobrevivência à luz ultra-violeta.

Com o propósito de determinar qual a dose de radiação ultra-violeta adequada para produzir de 1 a 5% de sobreviventes para posterior obtenção de mutantes, foram feitas as curvas de sobrevivência das linhagens E-9 e F-84 de *M. anisopliae*. Após terem estas linhagens sido desenvolvidas em meio completo durante 8 dias, conídios das mesmas foram suspensos em solução de tween 80, e o número de conídios foi estimado através de contagem em hematímetro. Em seguida esta suspensão foi diluída em solução salina (1:10) e colocada em placa de Petri esterilizada e irradiada a uma distância de 13 cm da fonte de ultra-violeta de 2537 Å (intensidade aferida de 300 uw/cm²), em ambiente claro com diferentes tempos.

Após cada tempo de irradiação, diluições apropriadas foram feitas, semeando-se 0,1 ml por placa em meio completo e incubada a 28°C por 8 dias. Após este período, procedeu-se a contagem do número de sobreviventes, comparando-se este ao número de colônias obtidas no controle tomado como 100% de sobrevivência. Com os dados obtidos pode-se traçar as curvas de sobrevivência para estas linhagens.

3.4.2- Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos

Para o isolamento dos mutantes morfológicos e auxotróficos foi utilizado o método de isolamento total, (PONTECORVO e col.1953). Uma suspensão de conídios foi feita nas mesmas condições do

item anterior (3.4.1) com aproximadamente 10^6 conídios por ml, a qual foi irradiada e diluída e em seguida semeado 0,1 ml por placa com meio completo e incubada a 28°C por 7 dias. Após este tempo os conídios das colônias foram transferidos para placas de Petri, contendo meio mínimo em distribuição de 5 x 5 mais 1 (AZEVEDO e col. 1976), e incubadas a 28°C. As colônias que não se desenvolveram neste meio (MM) foram consideradas mutantes, sendo mantidas em tubos de ensaio com MC para posterior análise.

Para caracterização destes mutantes fez-se uma suspensão de conídios em 3 ml de tween 80, sendo que 0,2 ml desta suspensão foi colocado em placas de Petri contendo 20 ml de meio mínimo ainda líquido com temperatura em torno de 45°C. Procurou-se misturar os conídios com o meio (MM) para que estes ficassem de maneira homogênea em toda placa, e esta foi incubada em seguida a 28°C. Decorridas 24 horas foram adicionadas gotas de solução de caseína hidrolisada, extrato de levedura, peptona e vitaminas, sendo distribuídas cuidadosamente em diferentes pontos da placa, a qual foi novamente incubada. No final de 7 dias, houve um crescimento ao redor de uma das substâncias, indicando o requisito nutricional do mutante. Outro ensaio foi feito com objetivo de elucidar qual destas substâncias presentes, foi a responsável pelo crescimento, caracterizando assim o requisito nutricional específico.

Os mutantes morfológicos foram obtidos, isolando-se aquelas colônias que mesmo crescidas em meio mínimo se diferenciavam da linhagem selvagem em características morfológicas, como por exemplo a cor dos conídios, e a forma das colônias.

3.4.3- Teste de reversão.

As linhagens mutantes conseguidas foram ensaiadas para a reversão de suas marcas nutricionais e para isso utilizou-se o MM, e o meio suplementado com os requisitos nutricionais de cada uma. Os conídios dos mutantes foram suspensos em solução tveem 80 numa concentração de 10^6 a 10^7 conídios por ml e semeados 0,1 ml por placa, incubado em seguida a 28°C. O crescimento nesse meio permitiu o cálculo da frequência de reversão das marcas.

3.4.4- Teste de complementação de coloração de conídios

Este teste teve como objetivo a verificação do desenvolvimento da cor dos conídios para posterior observação dos diplóides. A metodologia para tal foi a de CLUTTERBUCK (1972), para *A. nidulans*. Placas de Petri contendo MC foram utilizadas para inocular conídios de diferentes cores, observando-se após o crescimento, as áreas das colônias que se tocavam, procurando observar conídios de coloração selvagem.

3.4.5- Obtenção do heterocário.

Uma vez obtidos os mutantes que se diferenciavam quanto à morfologia e requisitos nutricionais, uma suspensão de conídios foi feita em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de MM suplementado com 1% de MC, o qual permite uma germinação inicial dos conídios. Estes tubos foram incubados por 15 dias a 28°C. As películas heteroca-

rióticas crescidas foram passadas para placas contendo papel filtro, cuja finalidade era retirar o excesso de meio (MC) trazido por elas. Com ajuda da alça de platina, as películas foram divididas em 4 partes e colocadas em placas com meio mínimo, e foram incubadas a 28°C durante 10 dias, para isolamento de possíveis setores heterocarióticos diplóides.

3.4.6- Obtenção dos diplóides.

Com o desenvolvimento dos setores heterocarióticos, uma suspensão de conídios foi feita em solução de tweem 80, e semeadas alíquotas desta em placas de Petri contendo meio mínimo. Conídios destas colônias foram transferidos novamente para uma solução de tweem 80, após contagem em hematómetro e diluições apropriadas semeados em placas com meio mínimo e meio completo. Após incubação a 28°C, por 8 dias, foi avaliado o número de colônias em ambos os meios.

3.4.7- Haploidização dos diplóides.

A haploidização foi feita utilizando meio mínimo suplementado com os requisitos nutricionais das linhagens que foram cruzadas, mais 150 µg/ml de Cloroneb. Esta substância segundo AZEVEDO e col. (1977), tem a propriedade de induzir a formação de setores. Os setores obtidos foram analisadas, procurando evidenciar a ocorrência de tipos parentais e recombinantes.

3.5- Metodologia para produção de destruxinas

Após estudos genéticos feitos com as linhagens E-9 e F-84, os mutantes, os diplóides, os segregantes e as linhagens selvagens foram analisadas quanto a produção de destruxinas. A técnica de isolamento é semelhante àquela descrita por KODAIRA (1962).

Inicialmente estas linhagens foram cultivadas em meio mínimo líquido para os diplóides e selvagens, e meio mínimo líquido suplementado para as demais, em frascos de Erlenmeyer de 3 litros contendo 1,5 litro de meio. Foram inoculados 10^7 a 10^8 conídios por ml com viabilidade conhecida. A viabilidade foi dada pela porcentagem de conídios germinados e não germinados em placas de Petri contendo meio completo e estimando-se a germinação após 24 horas, em microscópio. Estas culturas foram desenvolvidas em condições ambientais com temperatura de mais ou menos 28°C, em agitação recíproca durante 15 dias. Passado este tempo, o micélio destas culturas foi removido através de filtração em funil de Buchner à vácuo, seguido de nova filtração com filtro Seitz. O filtrado contendo mais ou menos 1 litro foi tratado com tetracloreto de carbono (CCl_4), utilizando-se 5 alíquotas de 100 ml cada vez do solvente e em seguida separado em funil de separação.

O solvente (CCl_4) foi evaporado com auxílio do evaporador rotativo, e o resíduo resultante foi eluído em metanol, seguido pela passagem por coluna de troca iônica Dowex 1 e Dowex 50 eluídos em água. As frações coletadas foram colocadas em frascos de 5 ml e novamente evaporadas em atmosfera de nitrogênio (N_2). Os resíduos foram eluídos em uma mistura de 5% de acetato de etila em benze-

no, e diferentes alíquotas (10 µl) foram desenvolvidas em cromatografia de camada delgada (CCD) de (0,2 mm) de sílica-gel 60F 254 MERCK, 4 x 10 cm. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de clorofórmio, metanol e acetato de etila na proporção de 8,5:0,5:1,0 ml respectivamente.

Após o solvente percorrer aproximadamente 8 cm do ponto de aplicação nas cromatoplaças, procedeu-se a secagem, sendo então estas transferidas para câmara saturada de vapor de iodo.

A presença da destruxina A foi visualizada pela formação de manchas escuras. Em todas as corridas foi utilizado um padrão obtido a partir da linhagem E-9 de *M. anisopliae*, cujo Rf é de 0,50. O Rf é determinado pelo quociente entre a distância (cm ou mm) percorrida pela amostra e a distância (cm ou mm) percorrida pela fase móvel até a frente.

3.5.1- Análise de espectrometria de massa.

Para análise em espectrômetro de massa, as amostras após terem sido evaporadas com evaporador rotativo, bem como purificadas, (item 3.5), foram eluídas em metanol e evaporadas com nitrogênio gasoso. As amostras foram então resuspendidas em acetona e uma alíquota de 1 a 5µl foi injetada em um cromatógrafo modelo 59885 GC/MS System da Hewlett Packard, com passagem simultânea para o espectrômetro de massa. A análise dos íons formados (m/e) e a presença das destruxinas A e B, foram confirmadas pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 respectivamente. Estas análises foram realizadas nos laboratórios do Boyce Thompson Institute at Cornell University - USA.

4-RESULTADOS

4.1-Sobrevivência à luz ultra-violeta (UV)

As linhagens E-9 e F-84 de *M. anisopliae* foram submetidas à ação de várias doses de radiação ultra-violeta, e os dados referentes à sobrevivência destas linhagens, estão expressos nas Tabelas I e II. Os valores obtidos permitiram construir curvas e traçar gráficos conforme Figura 1.

Considerando-se o número de colônias sobreviventes, utilizou-se da metodologia citada por BARACHO e ROSIM (1977), para determinação da LD-95, que foram de 12,9 minutos para linhagem E-9 e 7,8 minutos para linhagem F-84. Estes valores foram escolhidos posteriormente para a obtenção dos mutantes.

4.2- Obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos

Através das curvas de sobrevivência foi possível calcular o tempo necessário para inviabilizar 95% dos conídios dos fungos em estudo e obter mutantes numa frequência aproximada de 1 em 10^6 conídios. No passo seguinte, foram ensaiadas as linhagens de *M. anisopliae* E-9 e F-84 para isolamento de mutantes morfológicos e auxotróficos, segundo a metodologia apresentada no item 3.4.2. A figura II mostra os passos para obtenção dos mutantes.

Com respeito ao isolamento de mutantes morfológicos, levou-se em consideração aspectos como coloração de conídios e tamanho da colônia, diferenciadas das parentais através de observações vi-

suais. No caso dos mutantes auxotróficos, utilizou-se a técnica de isolamento total PONTECORVO e col. (1953), que permite a obtenção de mutantes com requisitos nutricionais para aminoácidos, vitaminas e ácidos nucleicos.

Foram obtidos vários mutantes morfológicos e auxotróficos, sendo que a maior parte proveio da linhagem F-84, sendo selecionados somente aqueles que se mostraram mais estáveis, descartando-se aqueles com crescimento residual.

Da linhagem E-9 foi possível a obtenção de mutantes morfológicos de conidiação amarela (am) e numa segunda irradiação, obteve-se um mutante auxotrófico com requisito nutricional para piridoxina (pir), o qual se mostrou bastante estável. A linhagem F-84 na primeira irradiação, apresentou mutantes com pigmentação amarela, e na irradiação seguinte, foram obtidos mutantes para cor violeta (vio). Uma outra irradiação do mutantes F-84 vio, resultou em 3 mutantes para tiamina (tia), ácido nicotínico (nic) e ácido p-aminobenzóico (pab), os quais se desenvolveram muito bem em meio completo e não apresentaram crescimento algum em meio mínimo.

Tabela 1- Porcentagem de sobrevivência de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, linhagem E-9, após tratamento com luz ultra-violeta.

TEMPO DE IRRADIAÇÃO (UV) EM MINUTOS	NÚMERO DE CONÍDIOS SOBREVIVENTES	PORCENTAGEM DE SOBREVIVENTES
0	220	100,00
3	140	63,63
6	59	26,82
9	17	7,72
12	13	5,90
15	1	0,45

Tabela 11- Porcentagem de sobrevivência de M. anisopliae var. anisopliae, linhagem F-84, após tratamento com luz ultra-violeta.

TEMPO DE IRRADIAÇÃO (UV) EM MINUTOS	NÚMERO DE CONÍDIOS SOBREVIVENTES	PORCENTAGEM DE SOBREVIVENTES
0	446	100,00
4	248	55,61
6	133	29,82
8	18	4,04
10	4	0,90

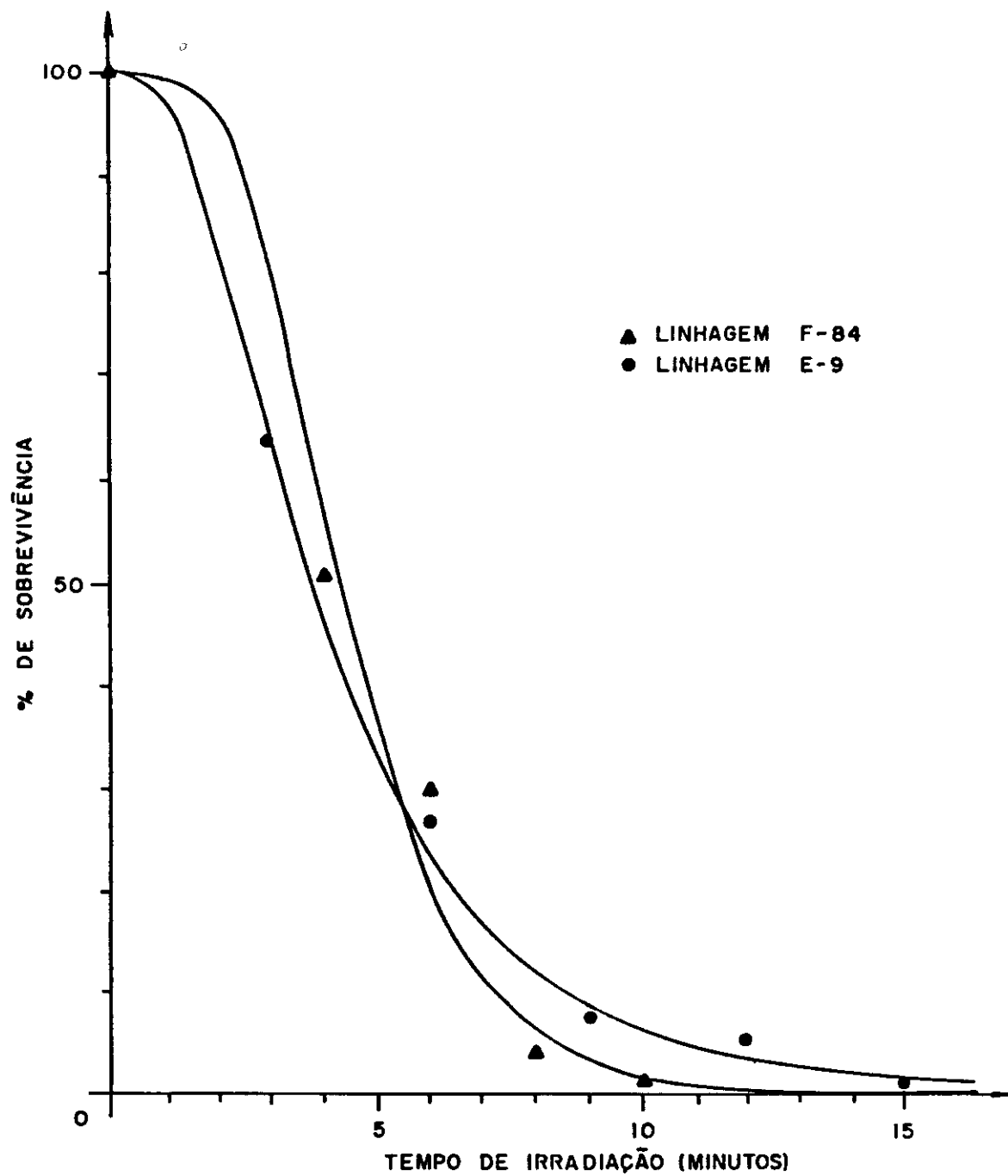


FIGURA I- Curvas de sobrevivência das linhagens E-9 e F-84 de Metarhizium anisopliae.

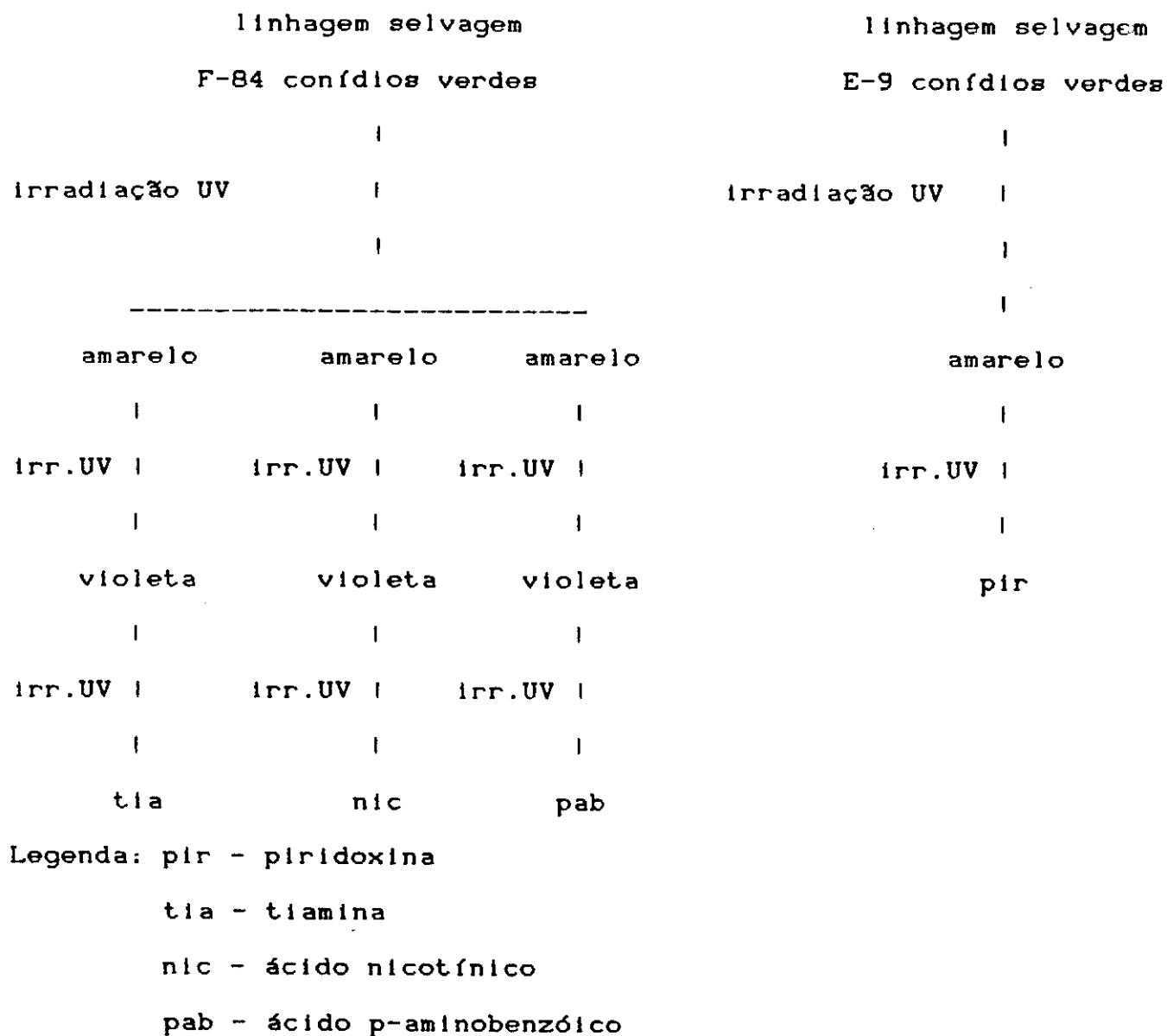


Figura II Passos seguidos para obtenção dos mutantes morfológicos e auxotróficos de *M. anisopliae*, empregando-se a luz ultra-violeta (UV) como agente mutagênico.

4.3- Teste de reversão.

Os mutantes obtidos descritos no item 4.2, foram ensaiados para verificação da estabilidade de suas marcas nutricionais e morfológicas, para que pudessem ser usados com segurança na sequência do trabalho. A frequência de reversão espontânea para as marcas, está na Tabela III.

Tabela III- Frequência de reversão dos mutantes E-9 am-pir, F-84 vio-tia e F-84 vio-nic.

MUTANTES	FREQUÊNCIA DE REVERSAO EM 10^6 CONÍDIOS
E-9 amarelo-pir	< 1
F-84 violeta-tia	< 1
F-84 violeta-nic	< 1

4.4- Teste de complementação.

Os resultados do teste de complementação para cor dos mutantes, F-84 vio-tia, F-84 vio-nic e E-9 am-pir, encontra-se na tabela IV. O mutante E-9 vio-tia foi utilizado como controle.



MP

Tabela IV- Teste de complementação de pigmento dos confídios dos
mutantes F-84 vio-tia, F-84 vio-nic, E-9 am-pir e
E-9 vio-tia.

LINHAGEM MUTANTES	COMPLEMENTAÇÃO	COMPLEMENTAÇÃO
	AUSENTE	PRESENTE
F-84 vio-tia x E-9 am-pir	X	
F-84 vio-nic x E-9 am-pir	X	
F-84 vio-nic x F-84 vio-tia	X	
E-9 am-pir x E-9 vio-tia		X

Legenda: vio- violeta

am - amarelo

4.5- Obtenção do heterocário

Os mutantes obtidos foram ensaiados para a formação do heterocário conforme descrito no item 3.4.5. As linhagens usadas para este evento foram E-9 am-pir x F-84 vio-tia e E-9 pir x F-84 vio nic. Após inoculação, a preparação foi incubada a 28°C. Transcorridos 10 dias, quando as películas heterocarióticas apresentavam-se bem desenvolvidas, foram transferidas para meio mínimo onde houve a formação de setores de coloração amarela e violeta.

4.6- Obtenção dos diplóides

Dos setores obtidos e das bordas das colônias que se desenvolviam das películas heterocarióticas, preparou-se uma suspensão de conídios com aproximadamente 10^7 a 10^8 conídios por ml. Alíquotas desta suspensão foram transferidas para placas de Petri com meio mínimo e após crescimento das colônias prototróficas com pigmentação de um dos parentais, seus conídios foram novamente suspensos em tween 80, diluídos apropriadamente e semeados em meio mínimo e meio completo para verificação da prototrofia dos possíveis diplóides. A Tabela V mostra os resultados obtidos.

4.7- Haploidização dos diplóides

Foram utilizadas duas substâncias para haploidização, Cloroneb (1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno) e Benlate (metil-1-butil, carbamoil-2-carbamato de benzimidazol) sendo que a primeira foi mais eficiente na formação dos setores haplóides.

Os setores obtidos com MC + Cloroneb, apresentaram morfologia diferente da encontrada em outros setores de outras linhagens, (Figura III).

O número de setores analisados, bem como o genótipo dos segregantes encontra-se na tabela VII.



Tabela V- Crescimento de colônias que se desenvolveram em meio completo e em meio mínimo, oriundas de colônias heterocarióticas que cresceram em meio mínimo.

POSSIVEL DIPLÓIDE	NÚMERO ESPERADO	NÚMERO DE COLÔNIAS	
	DE COLÔNIAS	DESENVOLVIDA EM:	
		MM	MC
F-84 vio-tia // E-9 am-pir	114	123	120
	114	131	137
F-84 vio-nic // E-9 am-pir	124	129	142
	113	119	126

A constituição dos diplóides das diferentes linhagens estão relacionados na tabela VI abaixo, sendo que o diplóide F-84 vio-tia//E-9 am-pir foi denominado de D-3 e o outro F-84 vio-nic//E-9 am-pir de D-5.

Tabela VI- Constituição dos diplóides obtidos.

CONSTITUIÇÃO DO HETEROCARIO	DIPLÓIDE HETEROZIGOTO
F-84 vio-tia + E-9 am-pir	F-84 vio-tia // E-9 am-pir
F-84 vio-nic + E-9 am-pir	F-84 vio-nic // E-9 am-pir



Figura III

Setores irregulares obtido pela haploidização do
diplóide D-3.



MP

Tabela VII- Setores analisados e genótipos dos segregantes dos diplóides F-84 vio-tia // E-9 am-pir e F-84 vio-nic // E-9 am-pir.

DIPLÓIDES	NÚMERO DE SETORES	GENÓTIPO	SEGREGANTES	
			AMARELO	VIOLETA
vio-tia//am-pir (D-3)	33	tia pir	-	-
		tia +	-	11
		+ pir	22	-
		+ +	-	-
vio-nic//am-pir (D-5)	61	nic pir	-	-
		nic +	-	38
		+ pir	23	-
		+ +	-	-

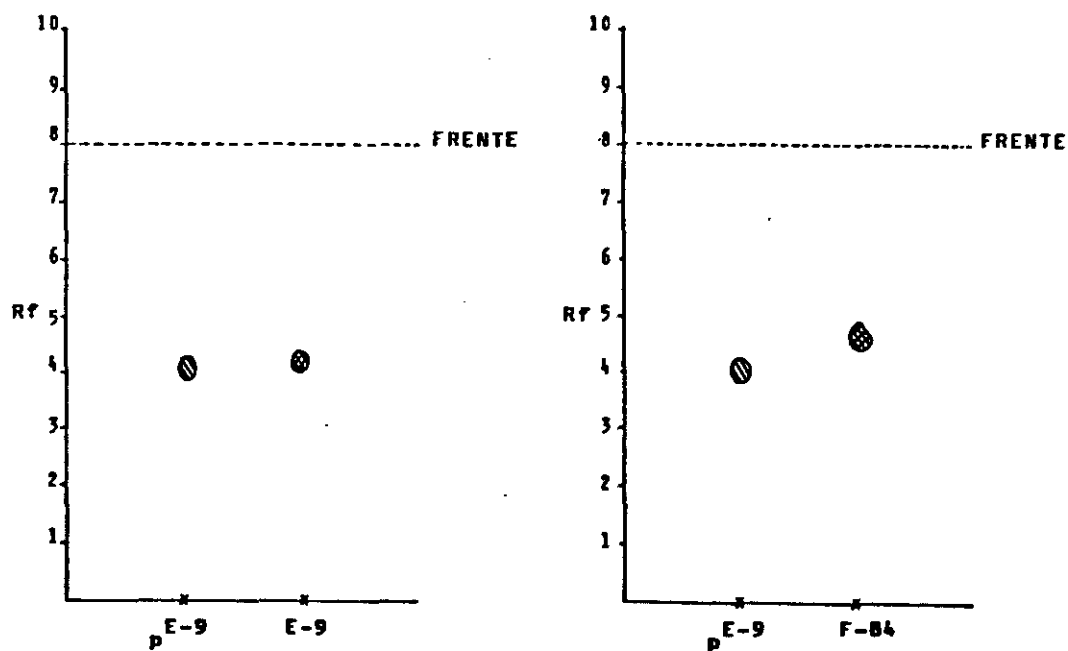
4.8- Produção de destruxinas

Para produção das destruxinas seguiu-se a metodologia citada nos itens 3.5 e 3.5.1, que consistiu na análise das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes em cromatografia de camada delgada (CCD), bem como em espectrometria de massa.

Dos segregantes foram escolhidos alguns setores para análise de cromatografia, cuja denominação é a seguinte: S/B-2, S-3, S-9, S/B-1a e S/B-1b; todos de cor amarela e originários da haploidi-

zação do diplóide D-3. Do diplóide D-5 foi escolhido o setor S-1 de cor violeta.

Pelos cromatogramas pode-se observar as manchas da destruxina A, obtidas das aplicações dos extratos das linhagens estudadas. Os Rf, foram dados pelo quociente entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pelo solvente. As manchas apresentaram vários tamanhos, quando comparadas com o padrão E-9, (figuras IV a VIII). A Tabela VIII mostra os Rf das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes, assim como as Figuras IX a XXI, apresentam os resultados da espectrometria de massa dos extratos das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes.



① MANCHA Padrão - p^{E-9}

② MANCHA dos extratos das linhagens E-9 e F-84

FIGURA IV- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos das linhagens selvagens: E-9 e F-84 de Metarhizium anisopliae, mostrando o RF da destruxina A.

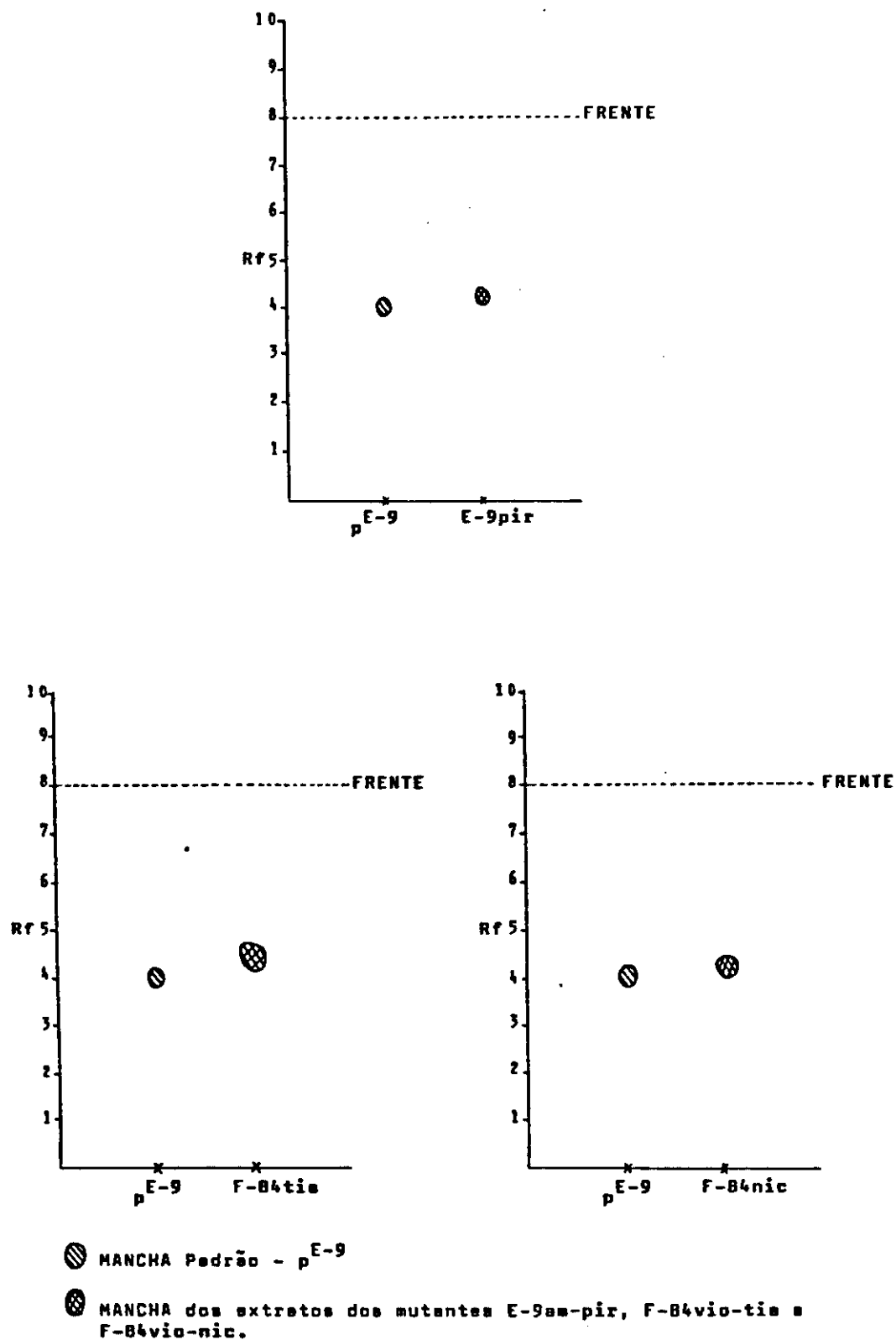


FIGURA V- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos das linhagens mutantes: $E-9sm-pir$, $F-84vio-tio$ e $F-84vio-nic$ de *Mutarhizium anisopliae*, mostrando o RF da destruxina A.

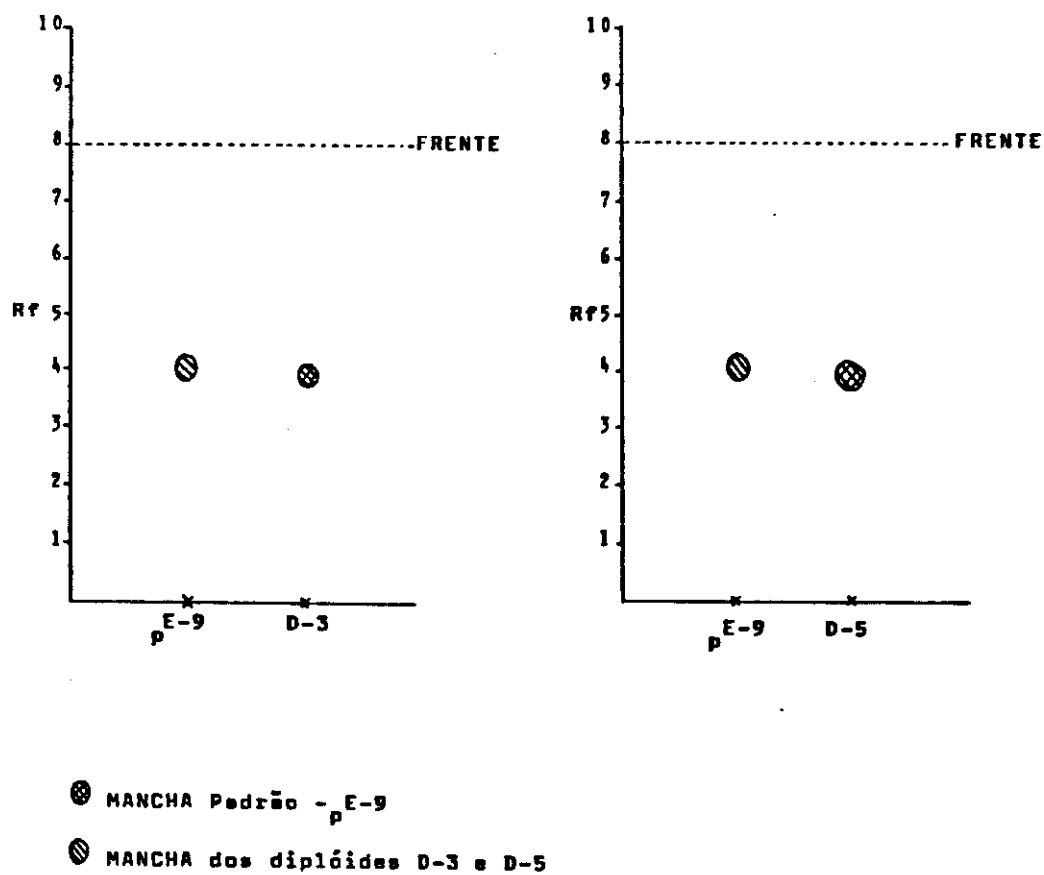
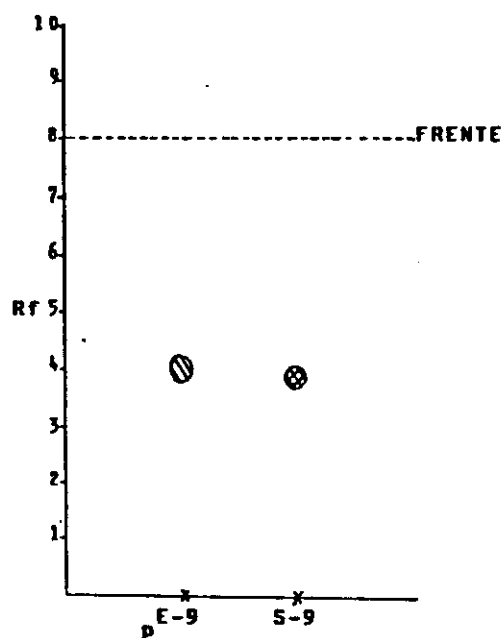
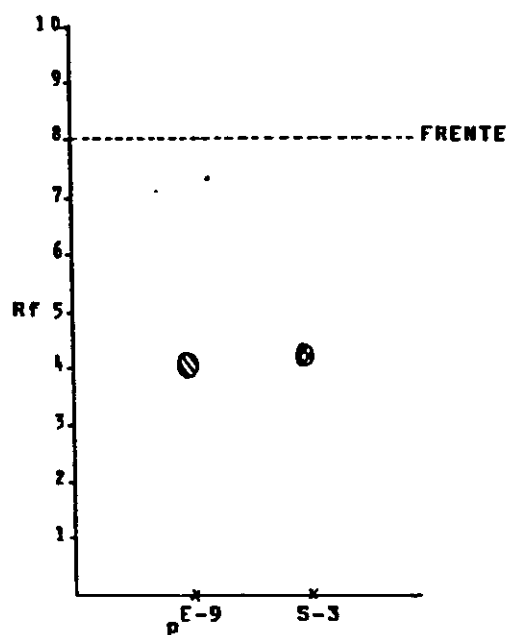
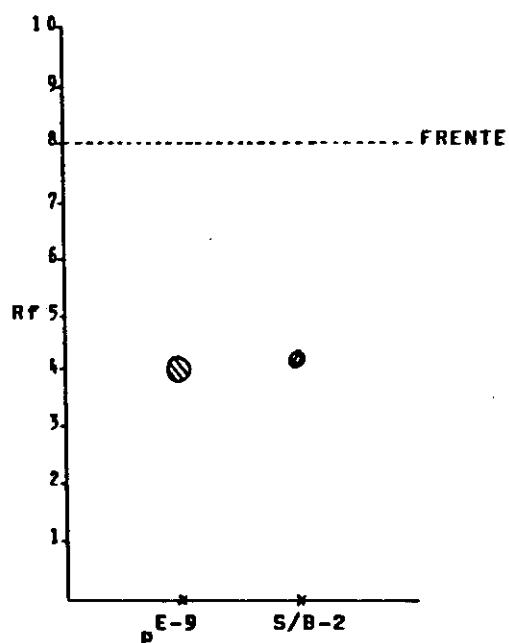


FIGURA VI- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos das linhagens Diplóides: D-3 e D-5 de Metarhizium anisopliae, mostrando o RF da destruxina A.



⊗ MANCHA Padrão p^{E-9}

⊗ MANCHA dos extratos dos setores S/B-2, S-3 e S-9 do diplóide D-3

FIGURA VII- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos dos setores: S/B-2, S-3 e S-9 do diplóide D-3 de Metarhizium anisopliae, mostrando o Rf da destruxina A.

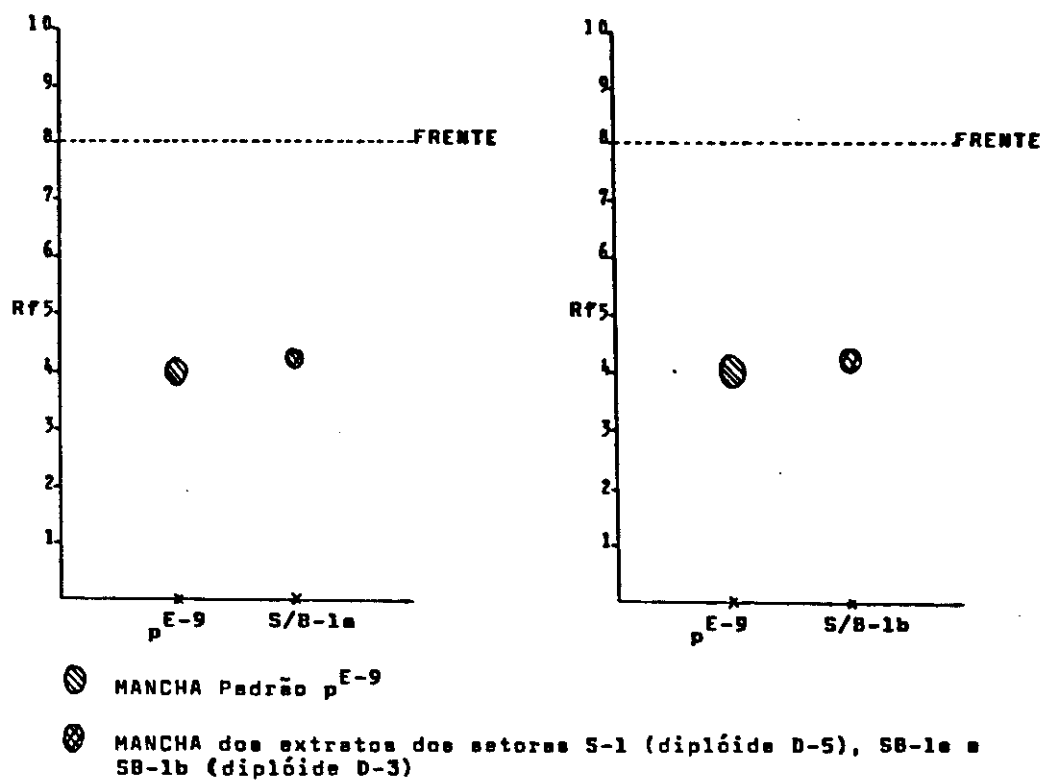
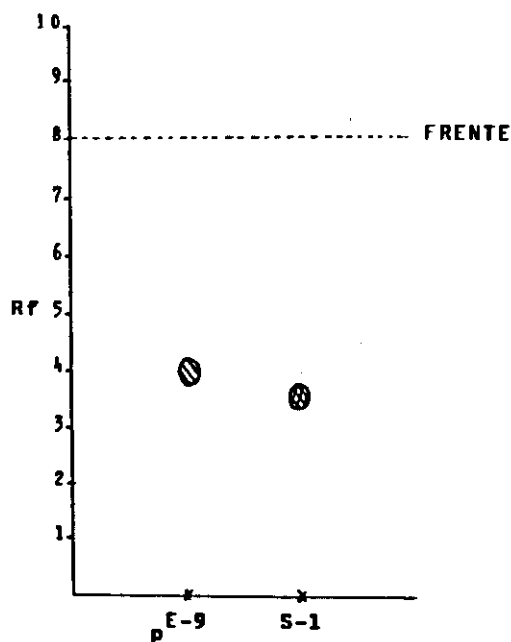


FIGURA VIII- Cromatograma em Camada Delgada (CCD) dos extratos dos setores: S-1 do diplóide D-5, S/B-1a e S/B-1b diplóide D-3 de Metarhizium anisopliae, mostrando o RF da destruxina A.

Tabela VIII- Rf da destruxina A dos extratos das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes comparadas com o padrão E-9, cujo valor é 0,50.

SELVAGENS		DIPLÓIDES	
	Rf		Rf
E-9	0,50	D-3	0,49
F-84	0,57	D-5	0,49
MUTANTES		SETOR (D-5)	
F-9 am-pir	0,52	S-1	0,44
F-84 vio-tia	0,56		
F-84 vio.nic	0,52		
SETORES (D-3)			
S/B-2	0,51		
S-3	0,51		
S-9	0,49		
S/B-1a	0,52		
S/B-1b	0,52		

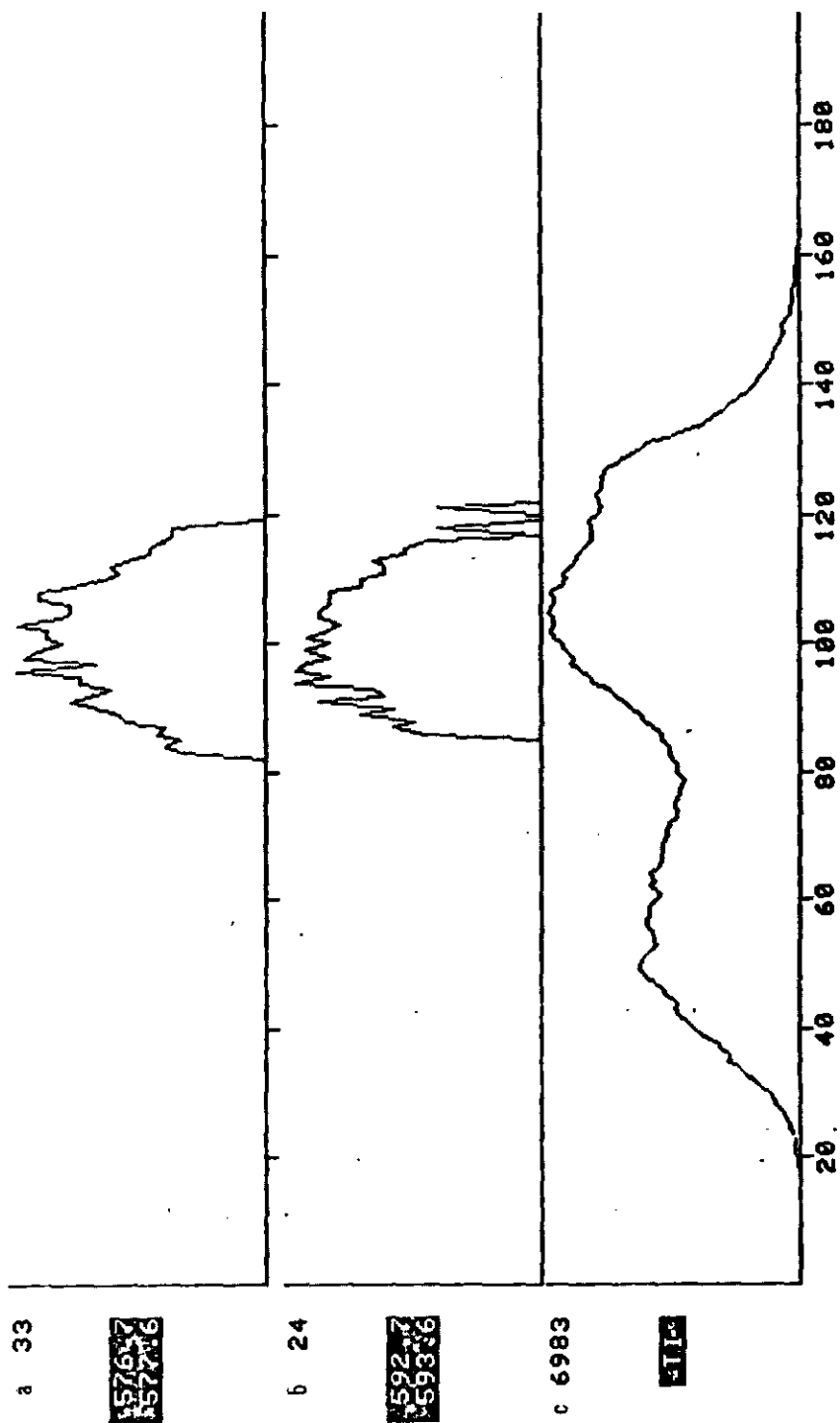


FIGURA IX- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e de amostra total do extrato da linhagem selvagem E-9 de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra da destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra da destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

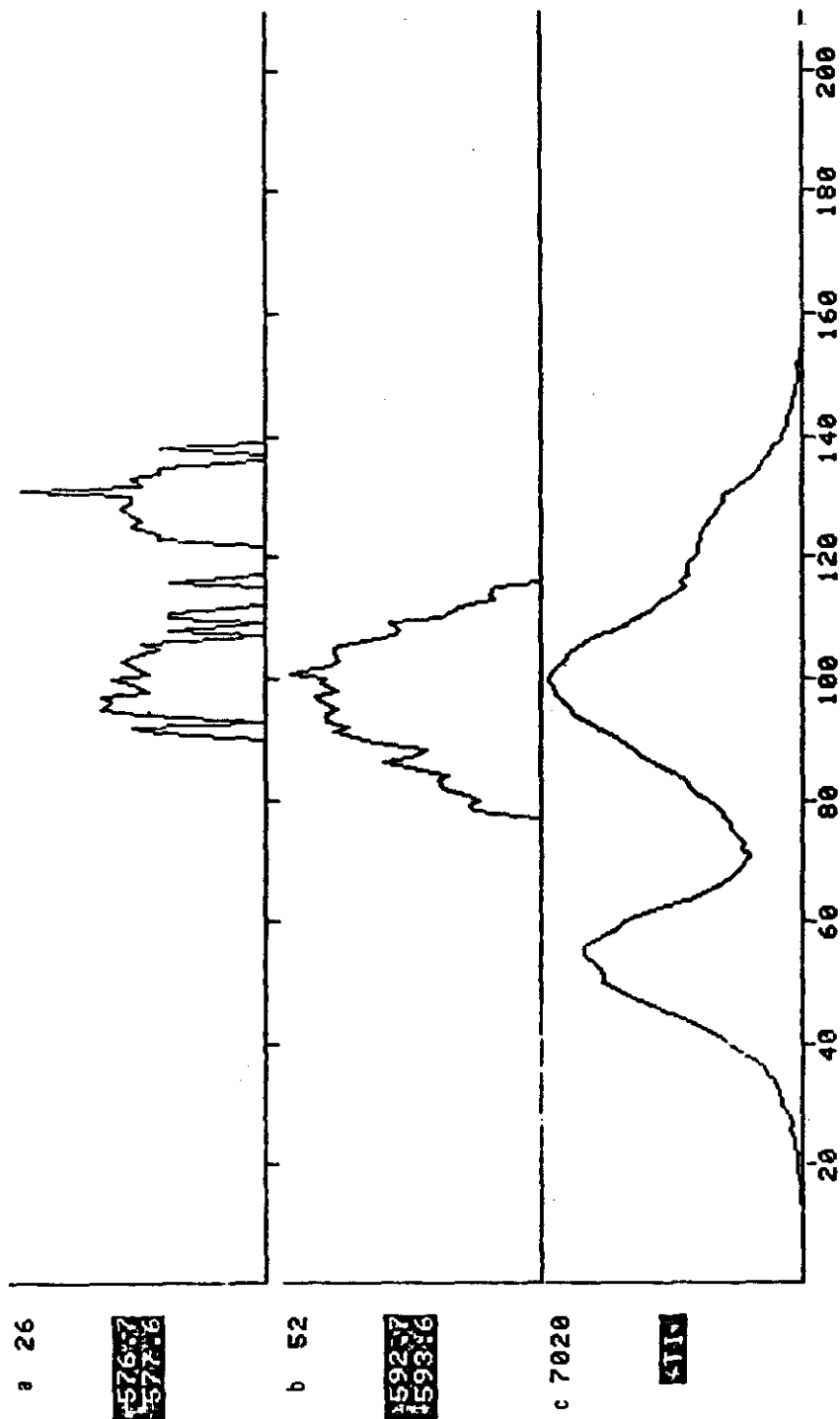


FIGURA X- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem selvagem F-84 de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra da destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra da destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

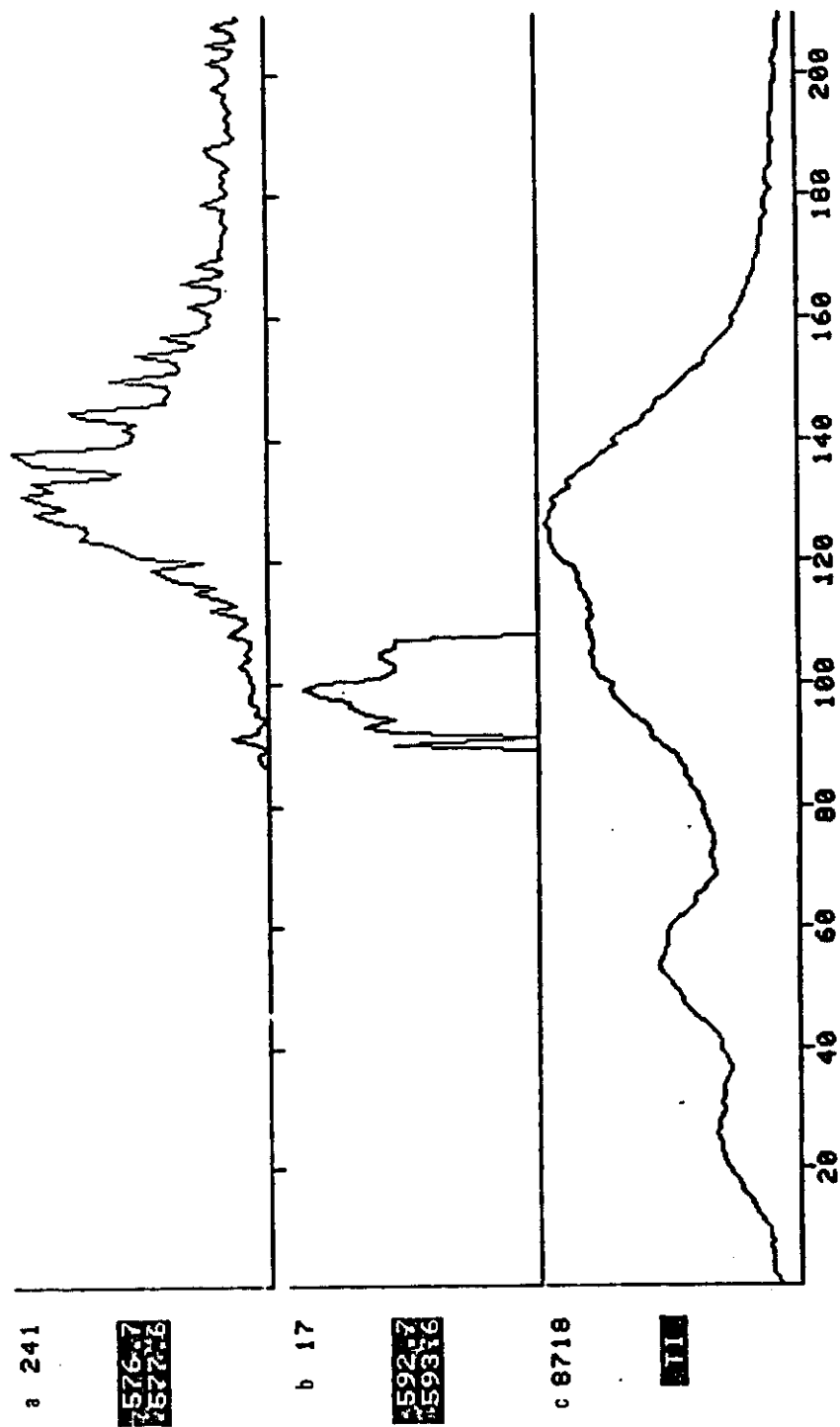


FIGURA XI- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem mutante E-9 em-pir de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra da destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra da destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

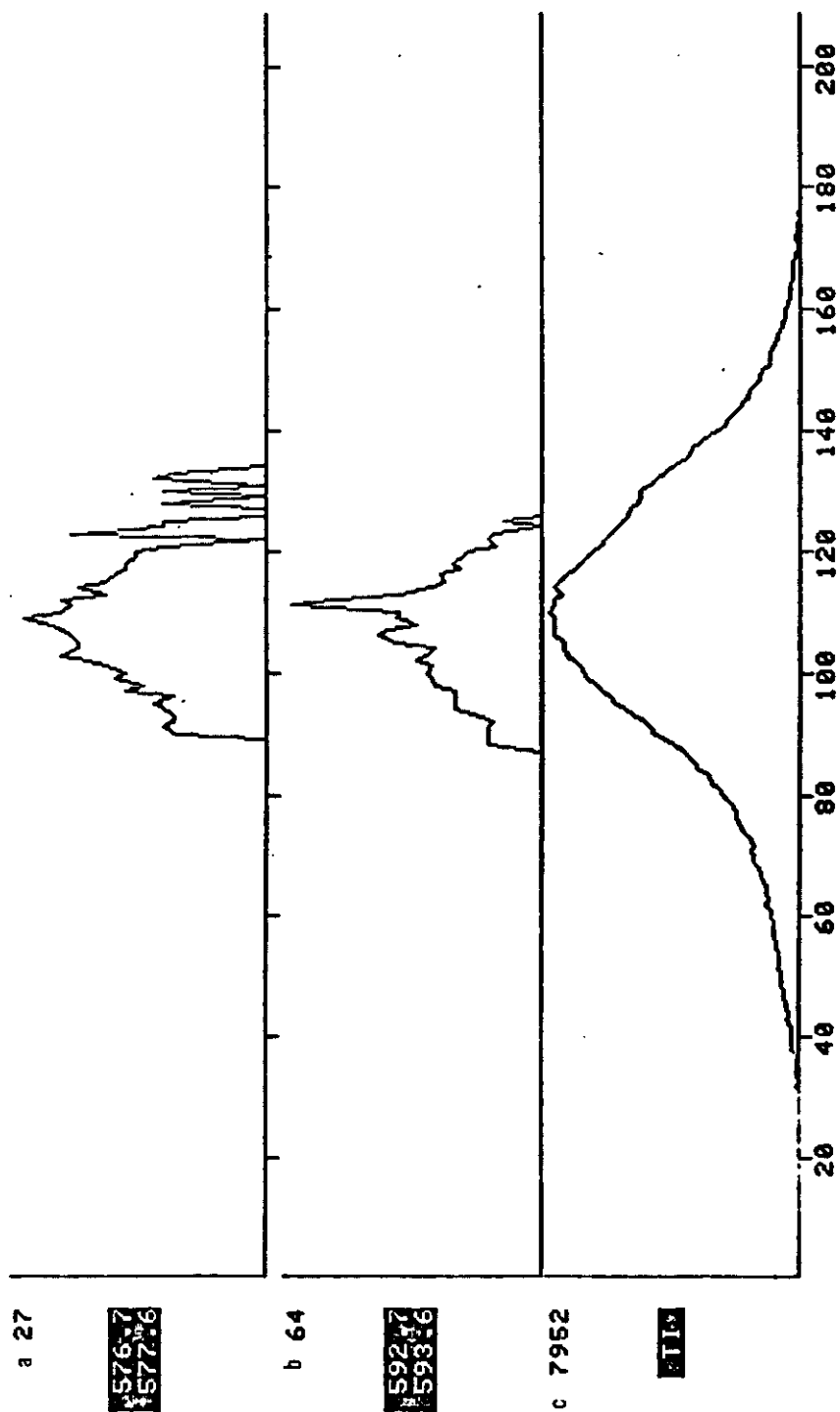


FIGURA XII- Cromatograma em espectrometria de massa dado pela frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem mutante F-84 via-tia de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra da destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra da destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

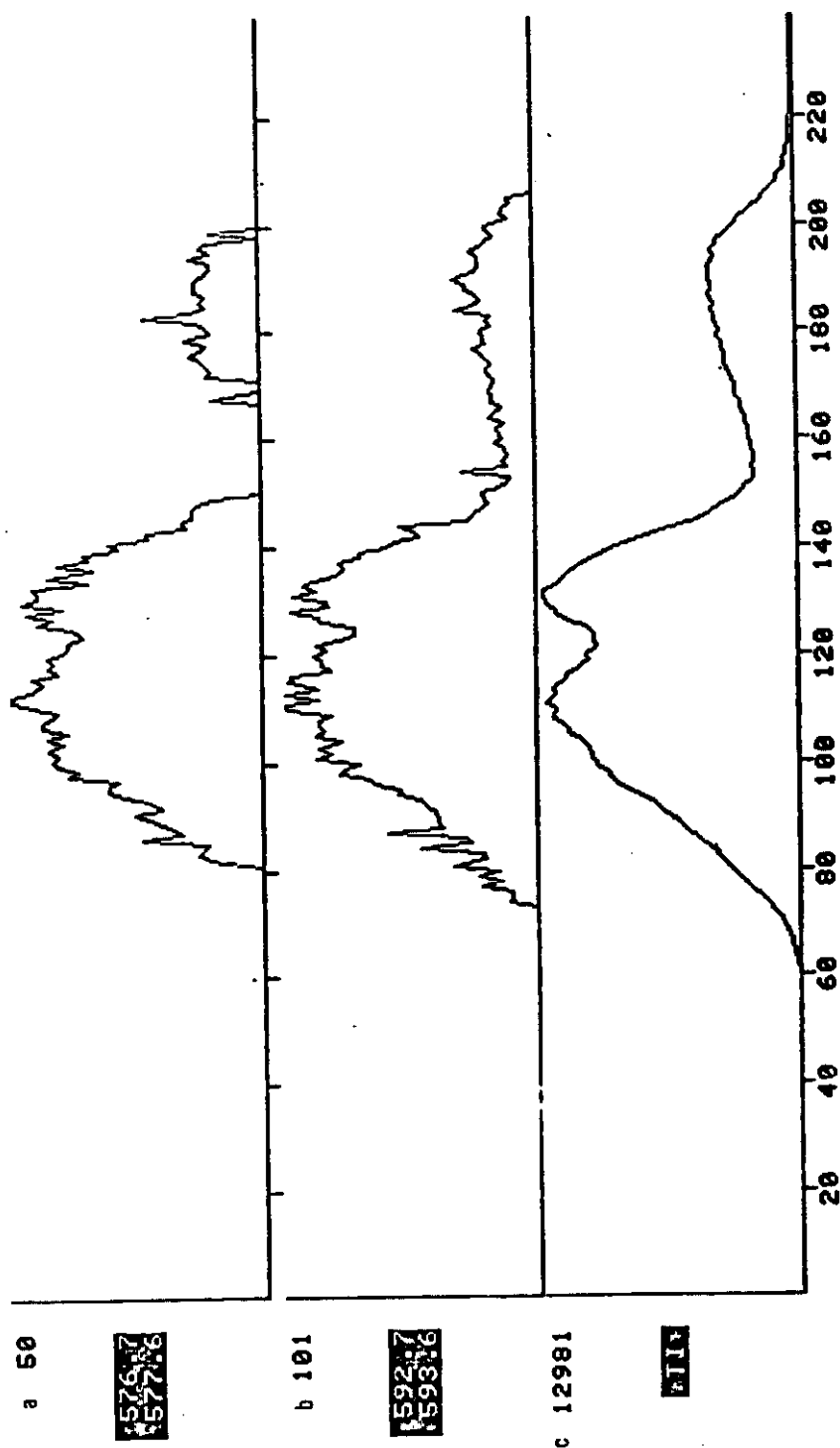


FIGURA XIII- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato da linhagem mutante F-84 viz-nic de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra da destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra da destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

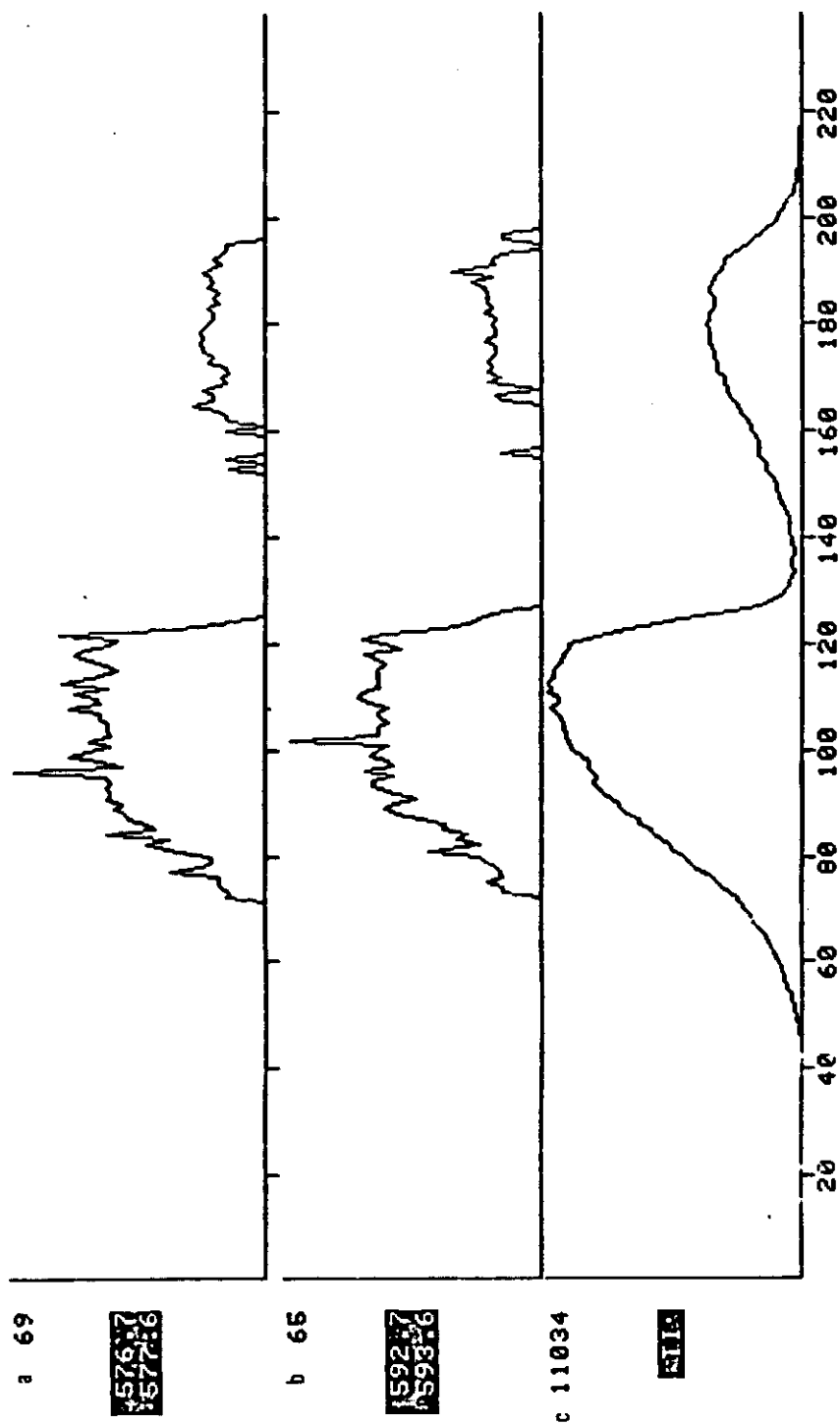


FIGURA XIV- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato de linhagem diplóide de D-3 de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra de destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra de destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

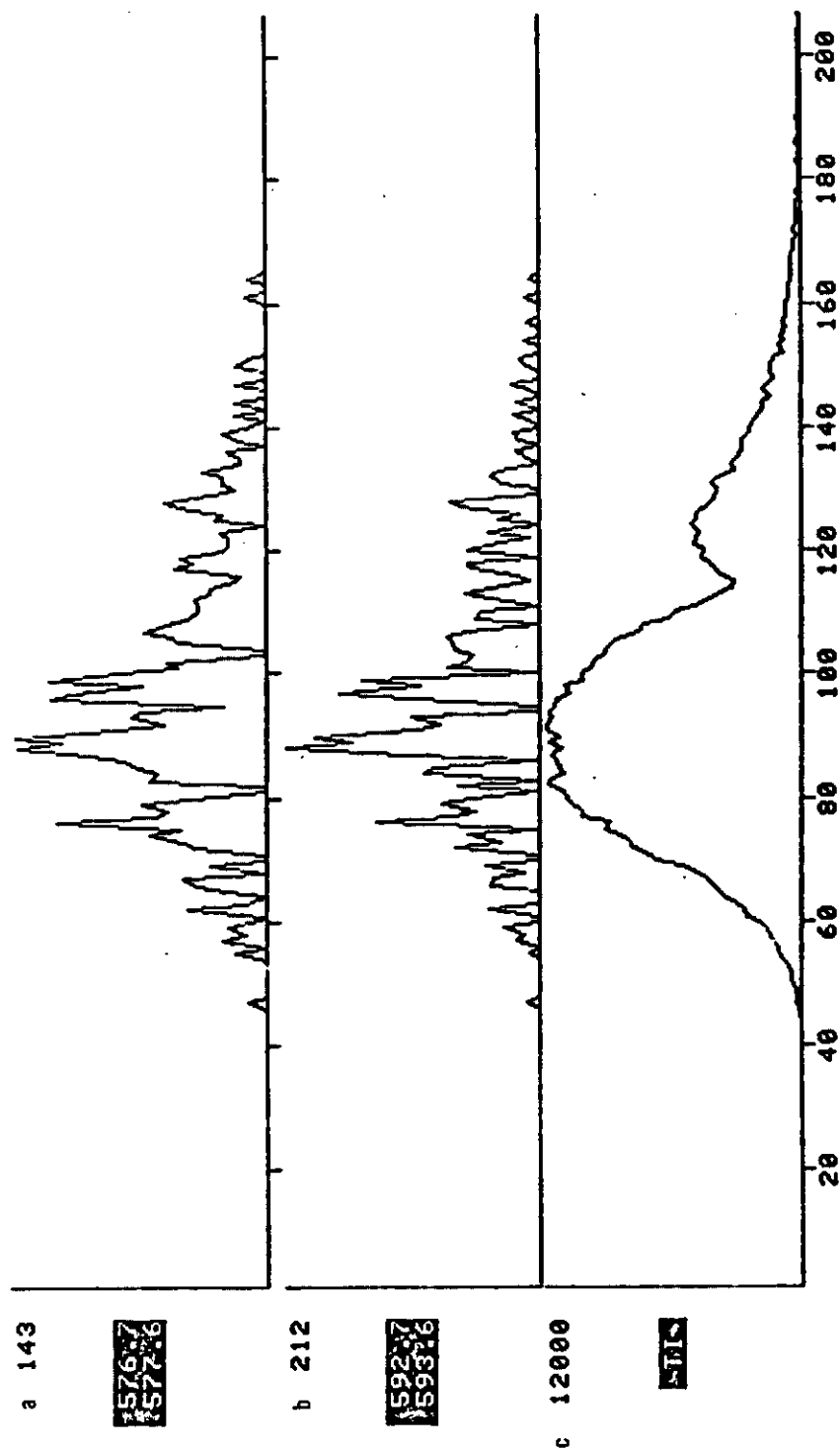


FIGURA XV- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato de linhagem diplóide D-5 de *Metarhizium anisopliae*. (a) Intensidade de de íons na amostra de destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra de destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

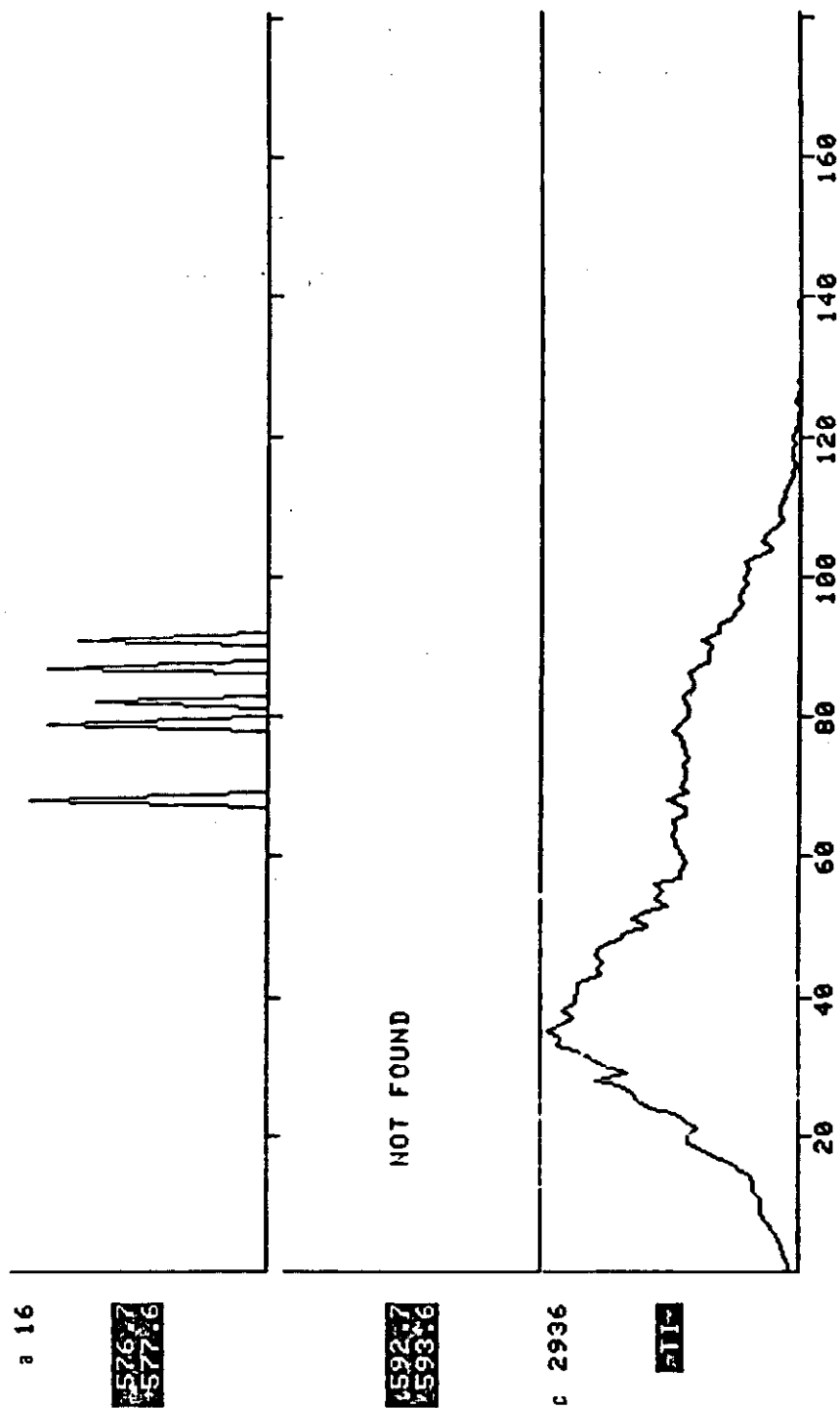


FIGURA XVI- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S/B-1a do diplóide D-3 de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra A e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

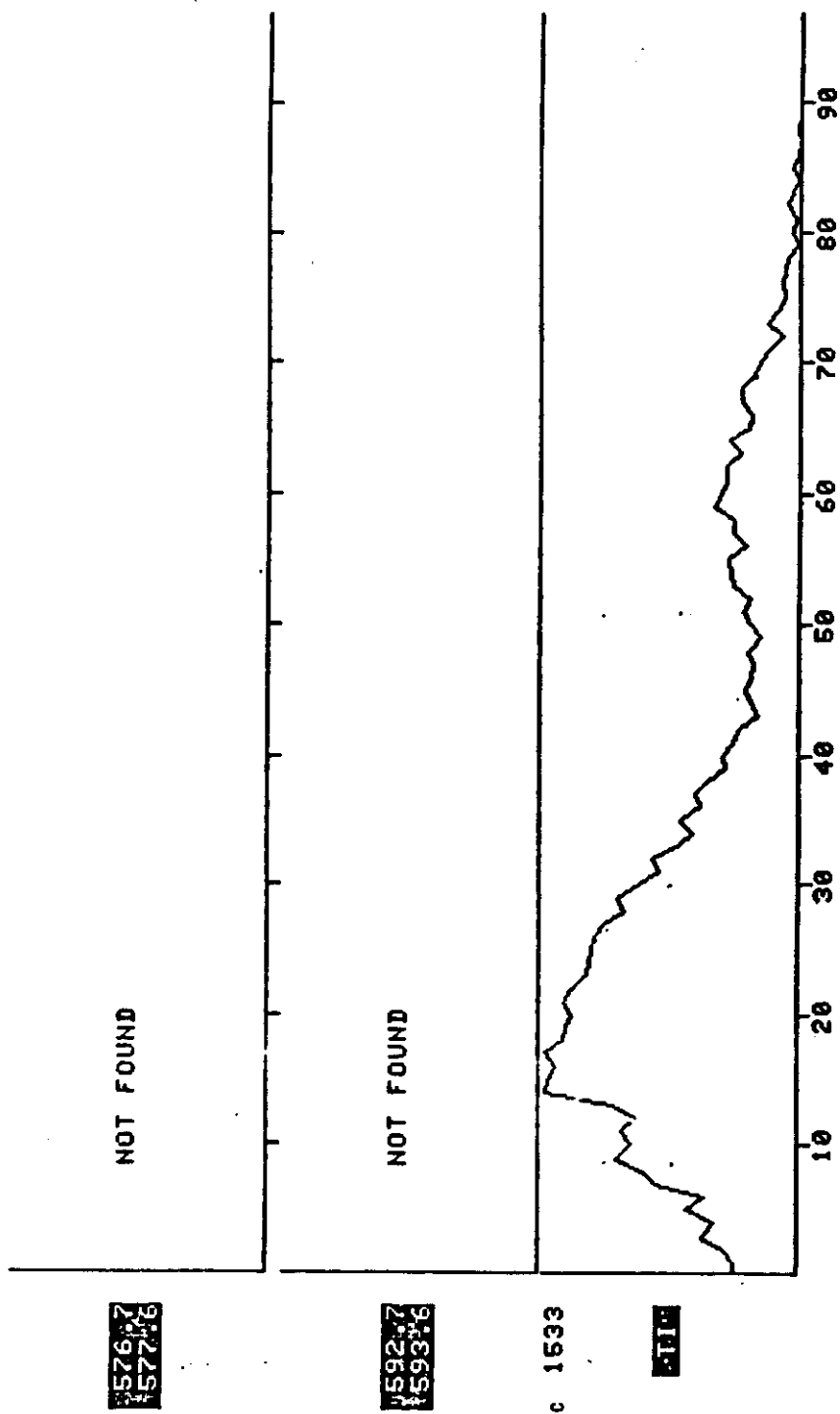


FIGURA XVII- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S/B-1b do diplóide D-3 de Metarhizium anisopliae. (c) Ion tensidade de íons totais (TI) na amostra.

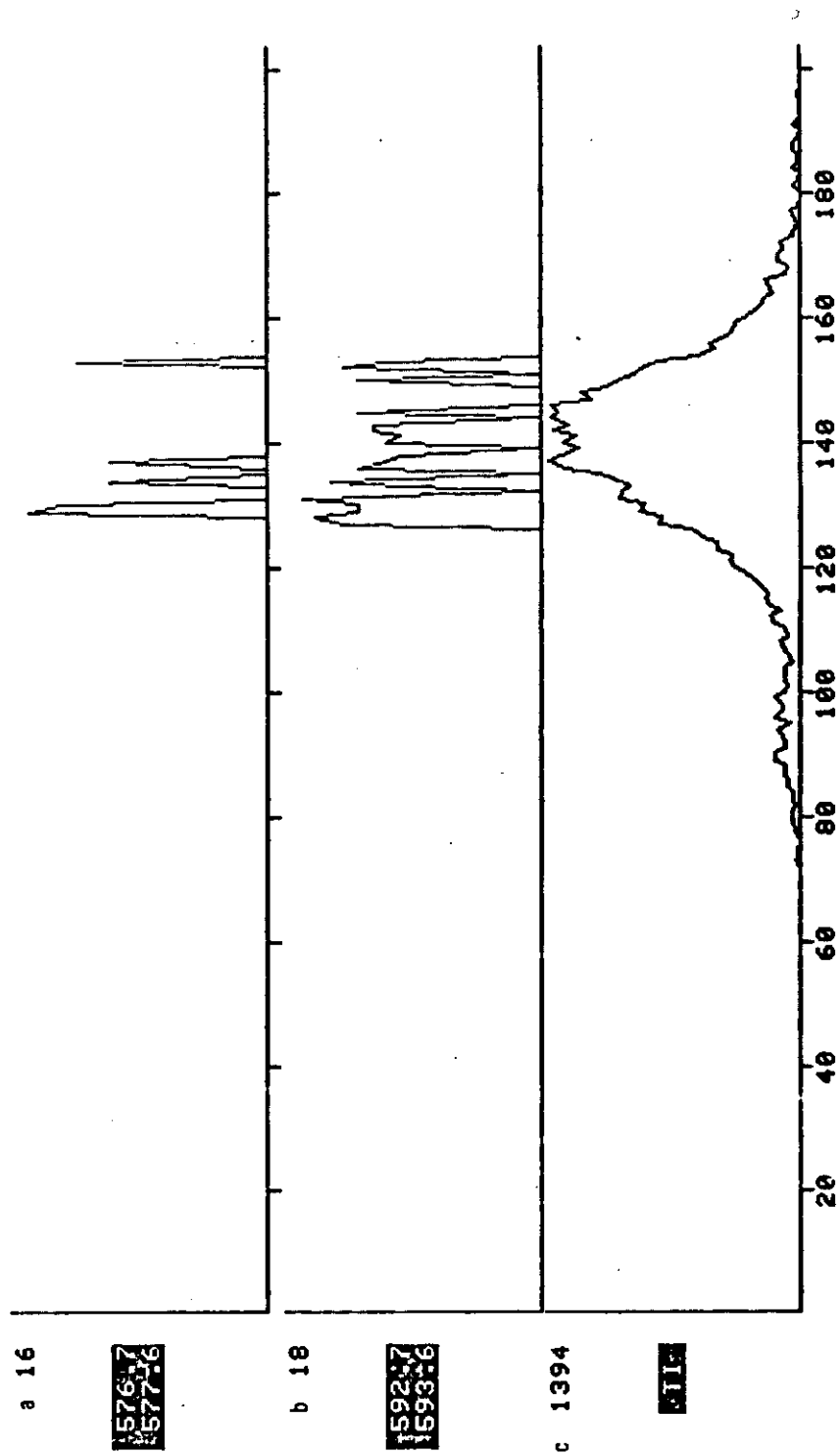


FIGURA XVIII- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S-3 do diplóide de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra da destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra da destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

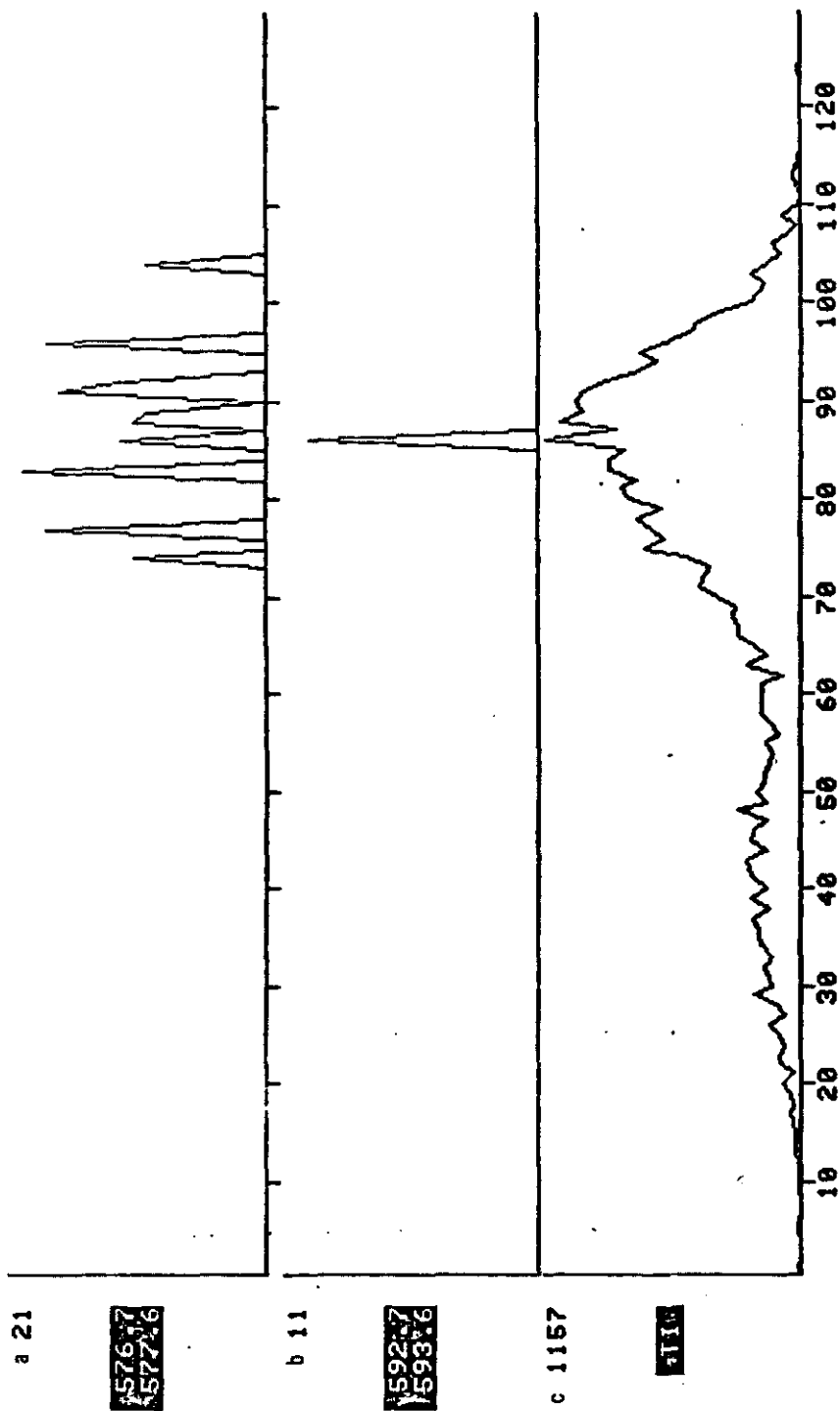


FIGURA XIX- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S/B-2 do diplóide D-3 de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra da destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra da destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (II) na amostra.

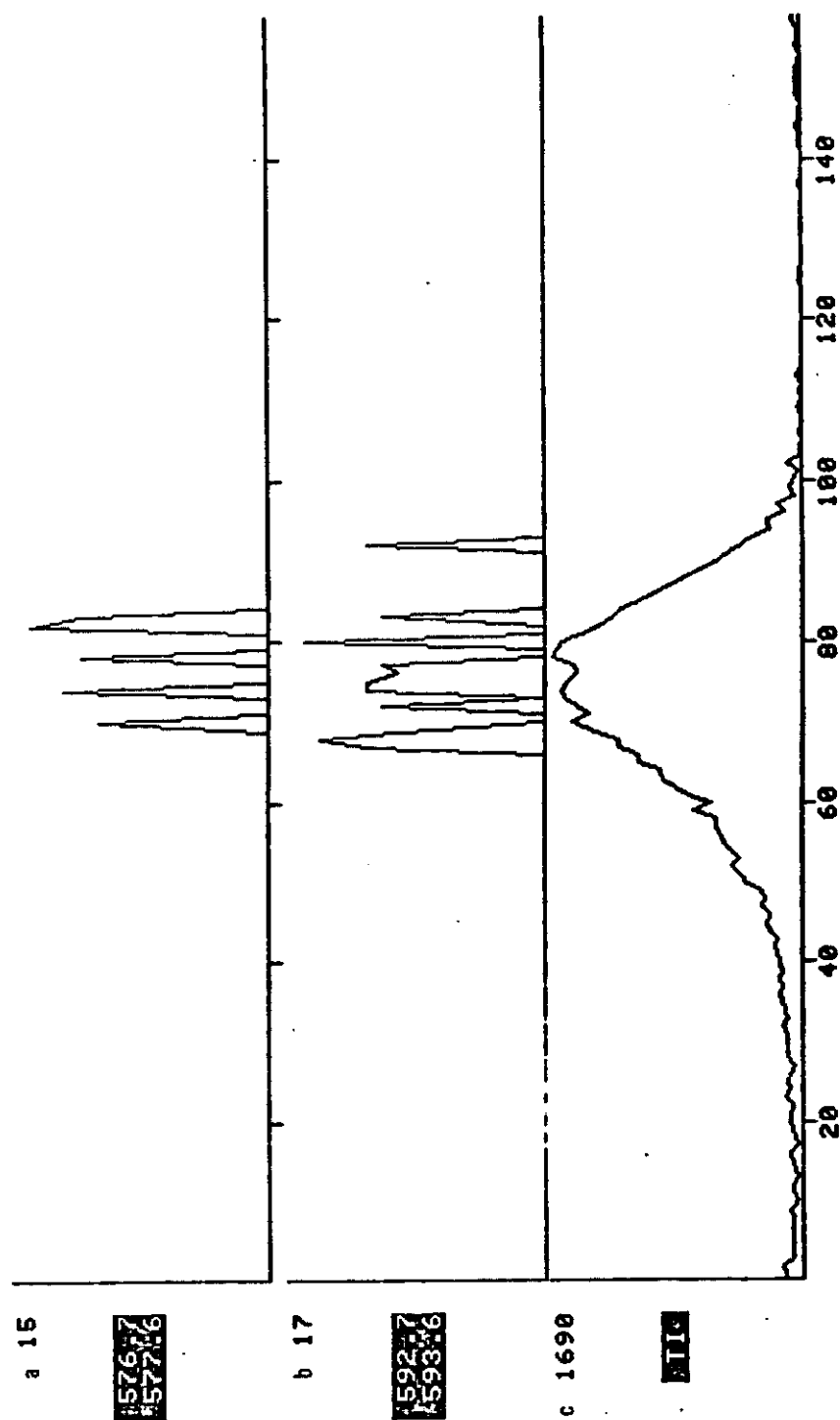


FIGURA XX- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576-7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S-9 do diplóide D-3 de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra da destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra da destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (TI) na amostra.

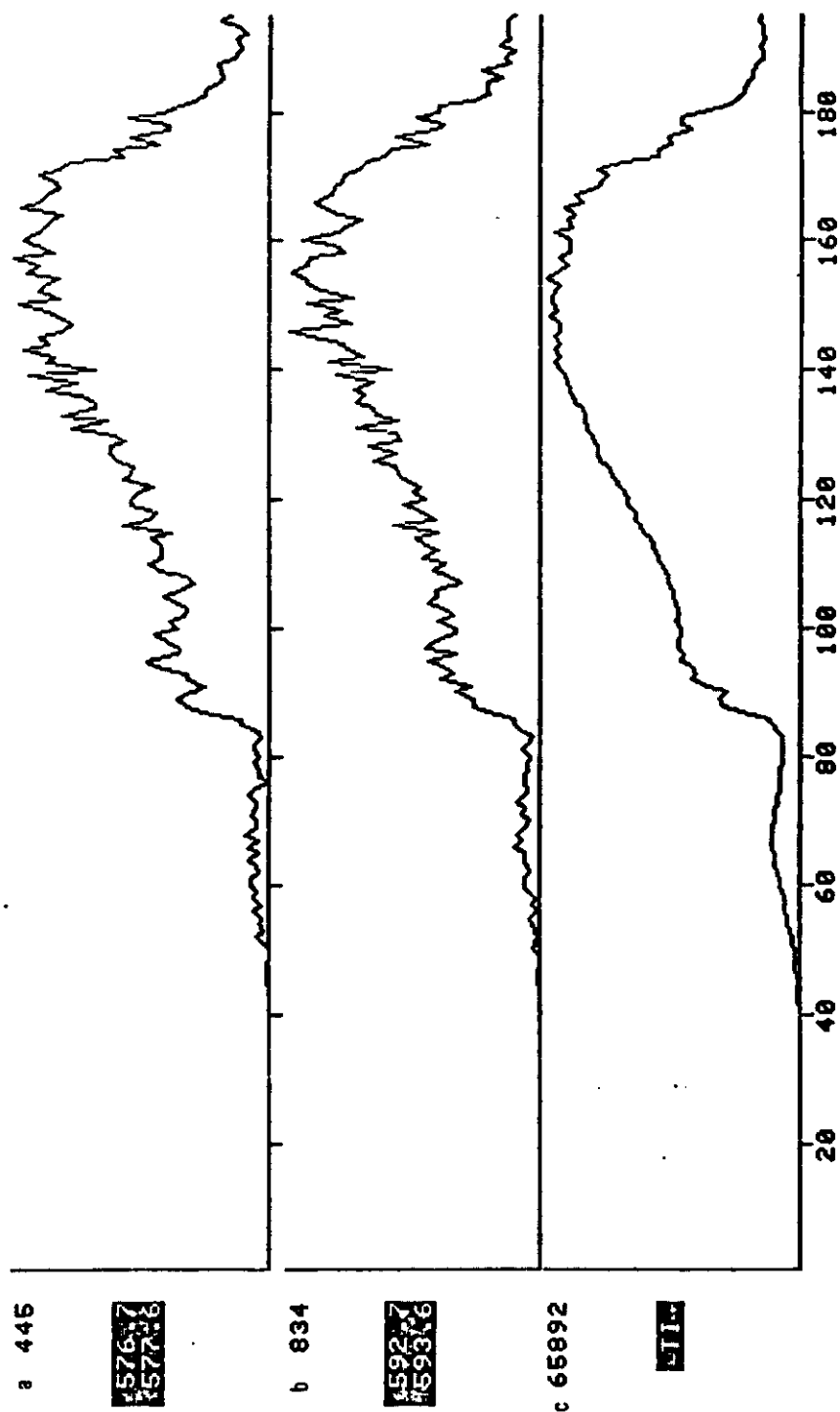


FIGURA XXI- Cromatograma em espectrometria de massa dado pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 das destruxinas A e B respectivamente, e da amostra total do extrato do setor S-1 do diplóide D-5 de Metarhizium anisopliae. (a) Intensidade de íons na amostra da destruxina A, (b) Intensidade de íons na amostra da destruxina B e (c) Intensidade de íons totais (II) na amostra.

5- DISCUSSÃO

5.1- Sobrevivência à luz ultra-violeta

A utilização da luz ultra-violeta para obtenção de mutantes em microrganismos é de grande valia, uma vez que este agente causa mutação gênica e não acarreta danos significativos nos cromossomos, como acontece com os outros mutagênicos físicos. Possui poder de penetração menor que o dos raios X e sua absorção pelo DNA ocorre no comprimento de onda de 2540Å. Em fungos, especialmente *M. anisopliae*, vários autores vêm utilizando a luz ultra-violeta com grande sucesso na obtenção de mutantes, (TINLINE, 1971; MESSIAS, 1977 e 1979; SILVEIRA, 1982 e SILVA, 1985).

No presente trabalho, duas linhagens de *Metarhizium anisopliae* E-9 e F-84 foram submetidas à ação da luz ultra-violeta. Os dados obtidos possibilitaram traçar curvas de sobrevivência que mostraram para a linhagem E-9, uma LD-95 de 12,9 minutos e para a F-84, uma LD-95 de 7,8 minutos, segundo metodologia proposta de BARACHO e ROSIM (1977).

Deste, modo verificou-se uma diferença na sensibilidade à ação da luz ultra-violeta da linhagem F-84 em relação a linhagem E-9, sendo que os resultados da linhagem F-84 diferem também dos resultados obtidos por MATOS (1983), que observou a LD-95 e a LD-50 de 7 isolados, dentre eles a linhagem F-84, obtendo uma LD-95 de 11,8 minutos.

Um outro aspecto com relação a sensibilidade das linhagens, refere-se a suas origens, sendo uma delas (F-84) originária

dos Estados Unidos enquanto que a outra (E-9) é proveniente do Estado do Espírito Santo, no Brasil.

CORREA (1983), testou vários isolados de *M. anisopliae*, quanto a resistência a luz ultra-violeta "solar" em diferentes solos de diferentes texturas e verificou também a existência de variabilidade entre elas.

Por outro lado, nos resultados obtidos por MATOS (1983), as LD-95 das linhagens E-9 e F-84 estão próximas: 12,3 e 11,8 minutos respectivamente, e ambas são oriundas de locais diferentes. A proporção de cópulos binucleados da linhagem E-9 (5%) pode ser uma das causas da resistência a luz ultra violeta.



5.2- Análise dos mutantes

Pode-se observar nos resultados apresentados no item 4.2, que os mutantes morfológicos obtidos foram de cor amarela e violeta. Estes mutantes foram os que se mostraram mais estáveis, enquanto que os demais eram miceliais e com pouca estabilidade na cor dos conídios. Outros ainda, quando irradiados numa segunda vez, revertiam suas marcas, e por isso os mutantes que apresentavam estes fatores foram descartados.

A frequência de mutantes morfológicos obtidos foi maior que a dos auxotróficos, (LUGLI, não publicado). Isto talvez seja devido à maior facilidade de isolamento, uma vez que a seleção é feita visualmente, enquanto que na obtenção dos auxotróficos, é necessário a análise de centenas de colônias.

A dificuldade na obtenção dos mutantes morfológicos foi maior na linhagem F-84, por que esta sempre mostrou comportamento "fluffy", mesmo no estado selvagem, e quando irradiada, o aparecimento de colônias "fluffy" foi ainda maior. Além disso, algumas delas mostraram alteração na pigmentação dos conídios quando passadas de um meio para outro. No entanto pode-se obter vários mutantes morfológicos.

Com relação aos mutantes auxotróficos obtidos com irradiação ultra-violeta, quase a totalidade deles mostrou requisitos nutricionais para vitaminas. Em contraste SILVEIRA (1982), utilizando o mesmo agente mutagênico e a técnica de enriquecimento por filtração (FRIES, 1947) para obtenção de mutantes auxotróficos das linhagens RJ e E-6 de *M. anisopliae*, obteve maior número de mutantes nutricionais para aminoácidos e ácidos nucleicos do que para vitaminas. Isto se deva



MP

talvez ao fato de que pode haver traços de vitaminas liberadas no meio (MM) pelo crescimento de prototróficos, os quais favorecem o crescimento dos mutantes auxotróficos para esse requisito nutricional, principalmente para biotina, ao passo que com a técnica de isolamento total a obtenção dos auxotróficos não sofre a influência da metodologia.

Na linhagem E-9 a obtenção tanto de mutantes morfológicos como de auxotróficos foi mais fácil, uma vez que as colônias se apresentavam bastante visíveis e de fácil isolamento, e esta linhagem já se mostrou apropriada para estudos genéticos anteriores (MESSIAS, 1979). Tendo em vista a estabilidade desta linhagem, outros pesquisadores procuraram utilizar tal cepa para trabalhos tais como: a determinação de ácidos graxos (PUPIN e col. 1984), utilização em bio-ensaios (MESSIAS e col. 1986) e a determinação de suas características eletroforéticas (DE CONTI e col. 1980).

Para linhagem F-84, a qual teve-se dificuldade na obtenção dos mutantes, sugere-se que sejam utilizados outros agentes mutagênicos como por exemplo os mutagênicos químicos dada a importância da mutação para estudos genéticos.

Uma vez obtidos os mutantes, estes foram ensaiados para verificação da reversão de suas marcas morfológicas e nutricionais. A frequência de reversão em 10^6 células analisadas foi menor que 1, este resultado foi satisfatório pois demonstrou a estabilidade dos mutantes.



5.3- Análise dos heterocários

A heterocariose é um evento estudado em muitas espécies de fungos, como demonstrou os trabalhos de PONTECORVO e col. (1953), com *A. nidulans*, BUXTON (1956), com *Fusarium oxysporum* e TINLINE e NOVIELLO (1971) com *M. anisopliae*. Ela possibilita a combinação de caracteres hereditários de duas linhagens auxotróficas, fazendo com que núcleos distintos permaneçam num mesmo citoplasma, através do processo de anastomose entre hifas ou entre esporos ou ainda entre tubos germinativos. A migração de núcleos de uma hifa para outra, pode resultar na fusão dos mesmos, tendo como consequência a formação de um diplóide.

Em *M. anisopliae*, o fenômeno de heterocariose já foi descrito por vários autores. MESSIAS (1979) e MESSIAS e AZEVEDO (1980), obtiveram heterocariose em todos os mutantes utilizados, os quais eram originários de uma mesma linhagem de *M. anisopliae* o que pode ter facilitado o processo heterocariótico.

SILVEIRA (1982), também obteve heterocários entre vários mutantes deste fungo, exceto no cruzamento E-6 x RJ. Contrário a este resultado LUNA (1985), obteve heterocários entre estas linhagens, além de outras diferentes entre si.

No presente trabalho, as duas linhagens envolvidas (F-84 e E-9), resultaram da formação de películas heterocarióticas, cuja coloração dos conídios foi igual a um dos parentais (E-9). Este resultado difere do obtido por MESSIAS e col (1979), onde a coloração dos conídios heterocarióticos obtida foi verde, devido a complementação das marcas para a cor amarela e branca dos mutantes utilizados.



O estado heterocariótico pode ter como consequência a formação de conídios diplóides, ou heterozigóticos e a segurança que se pode ter em relação a estes diploides, é dado pelos seguintes fatores:

- 1- Os conídios dos mutantes auxotróficos não se desenvolvem em meio mínimo;
- 2- Os conídios dos mutantes uninucleados no caso particular de M. anisopliae, não transmitem a condição heterocariótica;
- 3- A reversão para prototrofia pode ser eliminada uma vez que testes de reversão foi feito anteriormente e seriam necessárias várias reversões para seu desenvolvimento em meio mínimo.

5.4- Análise dos diplóides

A partir das películas heterocarióticas, foram feitas suspensões de conídios de 10^7 a 10^8 por ml e plaqueadas em MM. Decorrido o tempo necessário para o desenvolvimento apareceram colônias que apresentavam coloração de um dos parentais (amarela) e que possivelmente eram prototróficas. Destas colônias, novas suspensões de conídios foram feitas e quantidades conhecidas foram plaqueadas em MM e em MC para verificar a capacidade de germinação dos conídios nestes meios. Foram obtidas colônias prototróficas em MM o que permitiu a seleção dos diplóides heterozigóticos, não havendo o aparecimento de colônias do tipo parental, (Tabela V). Morfologicamente não foi possível observar a prototrofia, mas esta pode ser confirmada pela baixa frequência de reversão conforme Tabela III, apresentada pelos mutantes que entraram na síntese dos diplóides.

A falta de observação nos diplóides de pigmentação verde como comumente encontrado em outros fungos filamentosos, e mesmo em linhagens de *M. anisopliae* (MESSIAS, 1979; AL-AIDROOS, 1980), talvez seja devido à ausência da enzima p-difenol oxidase (lacase) a qual é produzida durante a esporulação, no cruzamento dos mutantes. CLUTTERBUCK (1972), estudou esta enzima em *A. nidulans*, cuja ausência foi observada nos mutantes de coloração amarela, e observou também, a ação desta enzima em vários substratos. Experimentos feitos pelo método de "cross-feeding", revelaram que a enzima pode migrar de uma colônia para outra. Segundo o autor uma explicação simples é possível: se o pigmento do conídio estiver situado fora da membrana celular, a enzima pode alcançar e atuar nos precursores do pigmento do outro conídio,

sem ter que atravessar nenhuma outra membrana, em outras palavras a enzima sob determinadas condições pode-se difundir da colônia de tipo selvagem para colônia mutante amarela e atuar para dar conídios verdes.

Testes deste tipo foram feitos com mutantes E-9 am-pir e F-84 vio-tia, F-84 vio-nic e E-9 vio-tia, tendo em vista a semelhança de investigação do mecanismo de produção de pigmento com o de *Aspergillus nidulans*. Os referidos mutantes quando submetidos ao teste de "cross-feeding" (Tabela IV), não mostraram complementação de pigmento. Apenas um deles E-9 vio-tia, mostrou complementação de pigmento com seu adjacente E-9 am-pir. Deste modo, estes mutantes quando cruzados apresentavam morfologia de um dos parentais (amarelo), não havendo a formação da cor verde no heterocáριο e nem nos diplóides. Assim pode-se sugerir que estes mutantes, com relação a enzima p-difenol oxidase ou lacase, com exceção do E-9 vio-tia, não a produzem, ou esta não tem afinidade para com estes mutantes, não havendo interação com os substratos produzido pela linhagem adjacente, ou talvez esta enzima não seja ativa devido a bloqueios em pontos diferentes na mesma via de síntese.

Os diplóides obtidos, listados na Tabela VI, apresentaram morfologia (cor) parecida com um dos parentais E-9 mutante amarelo. Tais diplóides comportaram-se em MM de maneira instável, com colônias bem compactas, possuindo coloração amarela levemente clara quando comparado com o parental E-9 am-pir.

MAGOON e AL-AIDROOS (1984), cruzaram duas linhagens (N-1A-3 e R-1D-1.1) de *M. anisopliae* com grande dificuldade, obtendo um diplóide cuja colônia eram morfologicamente diferente da maioria dos diplóides obtidos mostrando um padrão anormal de segregação.

O tamanho dos conídios não diferiu entre as linhagens haplóides e as diplóides, resultado semelhante encontrado por MESSIAS (1979) e AL-AIDROOS (1980), não havendo possibilidade de diferenciação entre os haplóides e os diplóides. PAPA (1973), observou também em *A. flavus*, que o tamanho dos conídios (diâmetro 4 μ) das colônias haplóide e diplóide, não serviu como critério para diferenciar a linhagem haplóide da diplóide. Por outro lado, BERGERON e AL-AIDROOS (1982), MAGOON e AL-AIDROOS (1984) puderam observar que o tamanho dos conídios serviu para confirmar a identificação do diplóide, de linhagem de *M. anisopliae*.

Ambos os diplóides obtidos no presente trabalho foram prototróficos, indicando assim a recessividade das marcas para auxotrofia.

5.5- Análise dos segregantes

Os dois diplóides obtidos produziram 94 setores. Destes, alguns surgiram espontaneamente em MC, sem a necessidade de um agente haploidizante. Foi utilizado o Cloroneb para induzir a formação de setores numa concentração de 150µg/ml o que foi suficiente para fornecer setores haploides e recombinantes em MC, suplementado com o fungicida.

Da totalidade dos setores, 33 originaram-se do cruzamento dos mutantes F-84 vio-tia e E-9 am-pir, sendo que 11/33 foram violetas, e 22/33 foram amarelos.

Do diplóide originário do cruzamento F-84 vio-nic e E-9 am-pir, foram isolados 61 setores, sendo 38/61 violetas e 23/61 amarelos, ambos parentais, não foi possível a obtenção de nenhum setor recombinante deste cruzamento. Esta ausência de setores recombinantes, poderia, segundo MESSIAS (1979), ser devida ao pequeno número de grupos de ligação que o fungo *M. anisopliae* possui, aparentemente não havendo mais que 4 cromossomos. BERGERON e AL-AIDROOS (1982), observaram 5 grupos de ligação para este fungo.

A morfologia dos setores nos diplóides (Figura 111) foi diferente dos comumente observados por diversos autores, principalmente quando as colônias eram crescidas com meio seletivo haploidizante (MC + Cloroneb).

Quando o diplóide amarelo é inoculado, ocorre inicialmente um crescimento amarelo no centro da colônia, surgindo a seguir setores violetas, que com o passar do tempo tomam toda a colônia e na periferia aparecem os setores amarelos de maneira irregular e es-

parços. Essa irregularidade na formação dos setores pode ser dada pela instabilidade dos diplóides. Um dos diplóides obtido por MAGOON e AL-AIDROOS (1984) produziu conídios pardos na periferia.

Outro agente haploidizante foi utilizado, o Benlate, mas melhor resultado foi obtido com Cloroneb. De maneira diferente, BERGERON e AL-AIDROOS (1982), utilizaram deste fungicida para isolar setores de seus diplóides, obtendo um aumento na haploidização de 5 a 10 vezes com seu uso.

AZEVEDO e col. (1977), verificaram a instabilidade mitótica e a resistência aos fungicidas Cloroneb e Vitavax, em linhagens de *A. nidulans*. Comentam os autores, que o Cloroneb produziu um aumento no número de setores principalmente haplóides, e sugerem que o Cloroneb por favorecer o pareamento, aumenta a frequência de não disjunção responsáveis pela haploidização. Citam ainda, que houve um pequeno aumento na frequência de "crossing over" somático nos diplóides tratados com este fungicida.

A não obtenção de recombinantes, pode ser devida ao uso do Cloroneb como agente haploidizante, uma vez que aparentemente este fungicida aumenta a frequência de setores parentais.

5.6- Destruixinas

As linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes foram ensaiadas para produção de destruxinas, conforme metodologia proposta por ROBERTS (1969), descrita nos itens 3.5 e 3.5.1, as amostras foram cromatografadas em cromatografia de camada delgada e gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS).

As corridas em CCD foram acompanhadas com o padrão da linhagem E-9 da destruxina A, (Rf 0,50), que foi comparado com todos os extratos das linhagens em estudo. A maioria dos extratos tiveram Rf próximo ao padrão 0,50, com exceção da linhagem selvagem F-84 e um dos mutantes F-84 tia, que tiveram Rf acima do padrão, 0,57 e 0,56 respectivamente. Este Rf mais alto talvez não seja correspondente a destruxina A e sim a destruxina B. KAIJIANG e ROBERTS (1986) utilizaram em seu trabalho uma mistura de destruxina A e B da linhagem F-84 como padrão, cujos Rf eram 0,52 para A e 0,61 para B.

Um dos setores S-1 do diplóide D-5 mostrou Rf bem abaixo do padrão. Talvez seja devido à dificuldade na purificação da amostra, o que poderia permitir a presença de impurezas dificultando o carregamento da substância.

ROBERTS (1969), extraiu destruxinas de *M. anisopliae* variedade *anisopliae*, e verificou que uma das frações coletadas de destruxina produziu 5 manchas, estas foram eluídas em 0,5 ml de água e injetadas em larvas de *G. mellonella*. Destas manchas 2 com Rf mais baixo não foram tóxicas, uma intermediária induziu espasmo muscular seguido de 5 minutos de paralisia tetânica, e as duas últimas induziram paralisia tetânica.

No caso do setor originário do diplóide D-5, sugere-se que seja injetado em insetos, para que se possa verificar o grau de patogenicidade da destruxina contida nele, se realmente é uma destruxina ou resultado de interação de outras substâncias.

KAIJIANG e ROBERTS (1986), observaram que a maioria do material extraídos do micélio e de filtrados de cultura de linhagens de M. anisopliae variedade major originadas de várias partes do mundo, era constituída de óleos, que se mostravam tóxicos para larvas de G. mellonella quando injetadas na hemocela, sendo que estes extratos continham no mínimo 5 diferentes substâncias detectáveis pela CCD. Os autores sugerem que na ausência da destruxina, o óleo tem um importante papel tóxico para superar o hospedeiro. Deste modo, sugere-se também que todas as linhagens estudadas sejam testadas em insetos, comparando-se assim o grau de patogenicidade quanto as destruxinas produzidas, bem como outras substâncias.

Além dos testes em placas de cromatografia planar as linhagens foram submetidas à espectrometria de massa. A presença das destruxinas A e B foi dada pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 respectivamente.

Pelos resultados obtidos, nos mutantes pode-se perceber que apesar das irradiações sofridas, não houve alteração na produção das destruxinas, permanecendo os mutantes iguais aos selvagens. Nos diplóides observou-se também a ocorrência dos dois tipos de destruxinas.

Nos segregantes, a ocorrência de destruxinas foi semelhante às linhagens parentais, exceto para os segregantes S/B-1a e S/B-1b originários do diplóide D-3, onde não foi possível a verifica-



ção da presença das destruxinas B e A e B respectivamente. Esta não ocorrência de destruxinas nestes setores talvez se deva a perda de cada uma das linhagens na capacidade de produção de destruxinas A e B, devido a haploidização.

6-CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e discutidos, as seguintes conclusões foram tiradas:

- 1- Os mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos através da luz ultra-violeta, não apresentaram alteração na produção das destruxinas.
- 2- Os mutantes derivados das linhagens estudadas não apresentaram produção de lacase, o que não permitiu a complementação e consequentemente o aparecimento da cor selvagem (verde) nos diplóides.
- 3- Foi possível a ocorrência de fusão de hifas, heterocariose e diploidia entre linhagens diferentes.
- 4- Os setores obtidos apresentaram morfologia diferente da comumente observada em outras linhagens.
- 5- Todas as linhagens selvagens, mutantes e segregantes demonstraram em cromatografia de camada delgada, Rf próximos do padrão 0,50 da linhagem E-9, demonstrando-se assim a produção das destruxinas.
- 6- Sugere-se ser de grande importância a análise de espectrometria de massa para a confirmação da ocorrência das destruxinas.

7- RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi reunir duas linhagens diferentes de *Metachizium anisopliae*, e através do ciclo parassexual obter diplóides e segregantes, os quais pudessem ser estudados quanto a produção de destruxinas, utilizando-se de cromatografia de camada delgada (CCD) e gasosa, sendo esta última acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS). Para isto foram utilizadas duas linhagens: uma de origem norte-americana (F-84) e a outra brasileira (E-9). Estas foram submetidas à ação da luz ultra-violeta, de maneira a obter-se mutantes morfológicos e auxotróficos.

Os mutantes obtidos foram: E-9 am-pir, F-84 vio-tia e F-84 vio-nic, os quais apresentaram-se bastante estáveis com uma frequência de reversão menor que 10^{-6} confdios.

Testes de complementação de pigmentos dos mutantes foram conduzidos e pode-se verificar que os mesmos não produzem a enzima lacase, que tem ação na formação do pigmento selvagem, e assim sendo os diplóides não apresentaram pigmentação verde. Os diplóides foram formados dos cruzamentos de E-9 am-pir x F-84 vio-tia e E-9 am-pir x F-84 vio-nic. Ambos apresentaram coloração de um dos parentais (amarelo); estes foram haploidizados com Cloroneb (150µg/ml), surgindo setores amarelos e violetas de formato irregular.

Para as destruxinas, foram utilizados os extratos das linhagens selvagens, mutantes, diplóides e segregantes, que foram cromatografados em CCD, apresentando um Rf próximo ao padrão 0,50. Um deles demonstrou Rf abaixo do padrão, (0,44). Na espectrometria de massa, os íons formados determinaram a presença das destruxinas A e B

dada pelas frações 576,7-577,6 e 592,7-593,6 respectivamente. Todos os extratos das linhagens analisadas produziram destruxinas, com exceção de dois segregantes S/B-1a e S/B-1b, em cujos extratos não foram encontradas as duas destruxinas B e A e B, respectivamente.

8- SUMMARY

In this work the main object was the study of destruxins production, by diploids and segregants obtained through parasexual cycle in *Metarhizium anisopliae*.

The two parental strains utilized were E-9 (Brazil) and F-84 (USA), which after induction with UV-radiation produced conidial color and auxotrophic mutants. The mutants E-9 am-pir, F-84 vio-tia and F-84 vio-nic were utilized because they showed a reversion frequency of auxotrophic markers lower than 10^{-6} conidia

The diploids isolated (E-9 am-pir x F-84 vio-tia and E-9 am-pir x F-84 vio-nic) were all yellow conidiating and showed yellow and violet irregular segregants on Chloroneb (150µg/ml). As only yellow conidia diploids were isolated it can be suggested that they are not able to produce laccase, which is the enzyme responsible for wild type (green) pigment formation. Additional tests for laccase production were made with color mutants growing together in a same Petri dish and it could be deduced that laccase was absent.

Destruxins were analyzed by Thin-layer chromatography (TLC), showing Rf close to the pattern 0,50 and gas chromatography combined with mass spectrography. The mass spectrography showed the the presence of destruxins A and B by ions formation in fractions 576,7-577,6 and 592,7-593,6 respectively.

One of them showed Rf below to the pattern (0,44). Mass spectrography showed the presence of the destruxin A and B by fractions 576,7-577,6 and 592,7-593,6 respectively. All the strains analysed produced destruxins, but the sectors S/B-1a and S/B-1b, which extracts didn't have destruxins B and A and B, respectively.

9- LITERATURA CITADA

- AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 22:309-14.
- AL-AIDROOS, K. & ROBERTS, D.W., 1978. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 20:211-19.
- AL-AIDROOS, K., SEIFERT, A.M., BERGERON, D. & CYR, M., 1979. Virulence and polysaccharide degradation by an entomopathogenic fungus. *Genetics* 91:s1-s2 (Abstract).
- ALDRIDGE, D.C. & TURNER, W.B., 1969. Structures of cytochalasins C and D. *Journal of the Chemical Society, London (C)*, 923-28.
- AZEVEDO, J.L., & MESSIAS, C.L., 1981. Tamanho de conídios em diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, 2:5-8.
- AZEVEDO, J.L., OLIVEIRA, A. & ROCHA CAMPOS, A.J., 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 237-41.

- AZEVEDO, J.L., SANTANA, E.P. & BONATELLI Jr., R., 1977. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1,4-oxanthin in Aspergillus nidulans. Mutation Research, 48:163-72.
- BALFOUR-BROWNE, F.L., 1960. The green muscardine diseases of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea. Proceedings of the Royal Entomological Society of London, serie A, 35:65-74.
- BARACHO, I.R. & ROSIM, R.T., 1977. Tabela por la kalkulado de MD-95, en fungoj. Scienca Revuo Jugoslavia, 28:223-26.
- BARNETT, H.L., & HUNTER, B.B., 1972. Illustrated genera of imperfecty fungi. Burges Publishing Company, Minneapolis, Minnesota. 225 p.
- BARON, G., 1968. The genera of hyphomycetes from soil. Baltimore , The Williams & Wilkins Company, 686 p.
- BASTOS, C.N., FIGUEIREDO, J.M. & MATTA, E.A.F., 1976. Utilização do método de Castellani para conservação do fungo Metarhizium anisopliae (Metsch.) SOROKIN. Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador, 15(1):12-13.
- BELL, J.V. & HAMALLE, R.J., 1974. Viability and pathogenicity of entomogenous fungi after prolonged storage on silica gel at 20°C. Canadian Journal of Microbiology, 20:639-42.

- BELLONCIK, S. & PARENT, N., 1976. Toxicité du champignon entomopathogène Cordyceps militaris pour des larves de culicidés. Entomophaga, 21(4):343-47.
- BERGERON, D. & AL-AIDROOS, K.M., 1982. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomogenous fungus Metarhizium anisopliae. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 24:643-51.
- BOVENTRE, P.F., LINCOLN, R.E. & LAMANNA, C., 1967. Status of bacterial toxins and their nomenclature: need for discipline and clarity of expression. Bacteriological Reviews, 31:95-109.
- BURNSIDE, C.E., 1930. Fungus diseases of the honeybee. U.S. Department Agriculture Technical. Bulletin n° 149, 42p.
- RUXTON, E.W., 1956. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of Fusarium oxysporum. Journal of General Microbiology, 15:133-39.
- CARNAGHAN, R.B.A., HARTLEY, R.D. & O'KELLY, J., 1963. Toxicity and fluorescence. Properties of the aflatoxins. Nature London, 200:1101.
- CASTELLANI, A., 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 24:226-70.

- CHAMPLIN, F.R., GRULA, E.A., 1979. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology, 37(6):1122-125.
- CLAYDON, N., 1978. Insecticidal secondary metabolites from Entomogenous fungi: *Entomophthora virulenta*. Journal of Invertebrate Pathology, 32:319-24.
- CLAYDON, N., GROVE, J.F. & POPLER, M., 1977. Insecticidal secondary metabolic products from the Entomogenous fungus *Fusarium solani*. Journal of Invertebrate Pathology, 30:216-23.
- CLAYDON, N., GROVE, J.F. & POPLER, M., 1979. Insecticidal secondary metabolic products from the Entomogenous fungus *Fusarium larvarum*. Journal of Invertebrate Pathology, 33:364-67.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. Journal of General Microbiology, 70:423-35.
- CORREA, G.S., 1983. Influência da radiação ultra-violeta e solar na viabilidade de conídios de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. Tese de Mestrado. 84p ESALQ-USP.
- CRISAN, E.V., 1971. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarrhizium* spores in mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 17:260-64.

- CHAMPLIN, F.R., GRULA, E.A., 1979. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of Beauveria bassiana. Applied and Environmental Microbiology, 37(6):1122-125.
- CLAYDON, N., 1978. Insecticidal secondary metabolites from Entomogenous fungi: Entomophthora virulenta. Journal of Invertebrate Pathology, 32:319-24.
- CLAYDON, N., GROVE, J.F. & POPLE, M., 1977. Insecticidal secondary metabolic products from the Entomogenous fungus Fusarium solani. Journal of Invertebrate Pathology, 30:216-23.
- CLAYDON, N., GROVE, J.F. & POPLE, M., 1979. Insecticidal secondary metabolic products from the Entomogenous fungus Fusarium larvarum. Journal of Invertebrate Pathology, 33:364-67.
- CLUTTERBUCK, A.J., 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of Aspergillus nidulans. Journal of General Microbiology, 70:423-35.
- CORREA, G.S., 1983. Influência da radiação ultra-violeta e solar na viabilidade de conídios de Metarrhizium anisopliae (Metsch) SOROKIN. Tese de Mestrado. 84p ESALQ-USP.
- CRISAN, E.V., 1971. Mechanism responsible for release of toxin by Metarrhizium anisopliae spores in mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 17:260-64.

- CUNNIGHAM, K.G., HUTCHINSON, S.A., MANSON, W. & SPRING, F.S., 1951.
Cordycepin, a metabolic product from cultures of Cordyceps
militaris (Linn.) LINK, Part I. Isolation and characterisation.
Journal of the Chemical Society, London 2299-302.
- DE CONTI, E., MESSIAS, C.L., SOUZA, H.M.L. & AZEVEDO, J.L., 1980.
Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven
wild-type strains of Metarhizium anisopliae. Experientia, 36:293-94.
- DELACROIX, M.G., 1893. Oospora destructor, champignon produisant sur
les insectes la muscardine verte. Bulletin Trimestriel de la Société
Mycologique de France, 9:260-64. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on
entomogenous fungi. Transactions of the British Mycological Society,
16:55-75.
- DETROY, R.W., LILLEHOJ, E.B. & CIEGLER, A., 1971. Aflatoxin and rela-
ted compounds, Vol. 6:4-178. In: Microbial Toxins-Fungal Toxins,
(CIEGLER, A., KADIS, S. & AJL, S.J. eds). Academic Press, New York and
London, 563 p.
- DIENER, L.V., & DAVIS, N.D., 1969. Aflatoxin formation by Aspergillus
flavus. In: Aflatoxin, (GOLDBLATT, A., eds.). Academic Press, N.Y. and
London, 630 p.
- DRESNER, E., 1950. The toxic effect of Beauveria bassiana (Bals.) VUIL. on
insects. Journal of the New York Entomological Society. 58:269-78

FARGUES, J., DURIEZ, T., ANDRIEU, J., POPEYE, R., & ROBERT, P., 1975.

Etude immunologique comparée des souches de Metarhizium anisopliae (Delacr.) SIEN champignon hyphomycète entomopathogène. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie Sciences, Série D 281:1781-84.

FRIES, N., 1947. Experiments with different methods of isolating physiological mutations of filamentous fungi. Nature, 159:199.

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

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

HAMILL, R.L., HIGGENS, C.E., BOAZ, H.E. & GORMAN, M., 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to Artemia salina. Tetrahedron Letters 49:4255-58.

HUBER, J., 1958. Untersuchungen zur physiologie insektentotender Pilze Archiv fuer Mikrobiologie, 29:257-76.

JOHNSTON, J.R., 1915. The entomogenous fungi of Puerto Rico. Puerto Rico Board of Commissioners of Agriculture Bulletin, 10:1-13. Apud: TULLOCH, M., 1976. The genus Metarhizium anisopliae. Transactions of the British Mycological Society, 66(3):407-11.

- MP KAIJIANG, L. & ROBERTS, D.W., 1986. The production of destruxins by the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *major*. Journal Invertebrate Pathology, 47(3):120-22.
- KANAOKA, M., ISOGAI, A., MURAKOSHI, S., ICHINOE, M., SUZUKI, A., & TAMURA, S., 1978. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. Agricultural and Biological Chemistry Journal 42(3):629-35.
- KODAIRA, Y., 1959. Studies on the toxic substances produced by muscardine fungi. II The productivity of toxic substances of various muscardine fungi in the culture media. Journal of the Faculty of Textile and Sericulture, série E. Shinshu-University, 4:79-82.
- KODAIRA, Y., 1961a. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of the Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu-University. n° 29, Serie E Agriculture and Sericulture, 5:1-68.
- KODAIRA, Y., 1961b. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. Agricultural and Biological Chemistry Journal, 25:261-62.
- KODAIRA, Y., 1962. Studies on the new toxic substance to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. Agricultural and Biological Chemistry Journal, 26:36-42.

- KREDICH, N.M. & GUARINO, A.J., 1961a. Homocitrullylaminoadenosine, a nucleoside isolated from *Cordyceps militaris*. Journal of Biological Chemistry, 236(12):3300-302.
- KREDICH, N.M. & GUARINO, A.J., 1961b. Studies on the biosynthesis of cordycepin. Biochimica and Biophysica Acta, 47(3):529-34.
- KUČERA, M. & SAMŠIŇÁKOVÁ, A., 1968. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, 12:316-20.
- LATCH, G.C.M., 1965. *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) SOROKIN, strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. New Zealand Journal of Agricultural Research, 8:384-96.
- LEGATOR, M., 1966. Biological effects of aflatoxin in cell culture. Bacteriological Reviews, 30(2):471-77.
- LIHNELL, D., 1944. Gronmykos förorsakad av *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROK. II Fysiologiska undersökningar över gronmykosens svamp. Stat. Vaxtskyodsanst. Stockholm. Meddel, 43:59-90. Apud: VEEN, K.H., 1968. Recherche sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. Mendeelingen, Nederland, 68:1-77.

LUNA, E.A., 1985. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diploides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. Tese de Mestrado. UFRJ-RJ, 260p.

LYSENKO, O. & KUČERA, M., 1971. Microorganisms of sources of new insecticidal chemicals, toxins. In Microbial Control of Insects and Mites. BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W., Eds.:205 London and New York Academic Press. cap. 9, p.205-27.

MATOS, A.J.A., 1983. Crescimento, germinação, conidiação e resistência à luz ultra-violeta de linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Tese de Mestrado, 78 p. UNICAMP.

MAGOON, J. & AL-AIDROOS, K.M., 1984. Determination of ploidy of sectors formed by mitotic recombination in *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society 82(1):95-98.

MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de Aflatoxina em *Aspergillus flavus*, LINK. Tese de Mestrado 75 p. ESALQ-USP.

MESSIAS, C.L., 1979, Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. Tese de doutorado 73 p. ESALQ-USP.

MESSIAS, C.L., AZEVEDO, J.L., 1980. Parasexuality the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society 75(3):473-77.

- MESSIAS, C.L., AZEVEDO, J.L., CONTI, E. & SOUZA, H.M.L., 1978. Aspectos biológicos e indução de Mutantes em *Metarhizium anisopliae*. Congresso Latinoamericano de Entomologia, III Bahia, Resumos. p. 69.
- MESSIAS, C.L., DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W., 1980. Effects of humidity and fungal strains on infection of *Rodnius prolixus*. In Annual meeting of Society of Invertebrate Pathology, XII. Seattle, Washington, USA, may-Abstract.
- MESSIAS, C.L., DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W., 1986. Virulence of a natural isolate, Auxotrophic mutants, and a diploid of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* to *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47:231-33.
- MESSIAS, C.L., ROBERTS, D.W. & GREFIG, A., 1983. Pyrolysis-gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*: An aid to strain identification. *Journal of Invertebrate Pathology*, 43:393-96.
- METSCHNIKOFF, E., 1879. Maladies des hannetons duble. *Zapisk imperatorskogo obshchestva sel'skago khozyaistva yuzhnoi rossii*, 17-50. Apud: TULLOCH, M., 1976. The genus *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66:407-11.
- METSCHNIKOFF, E., 1880. Zur lehre uber insektenkrankheiten *Zoologischer Anzeiger*, 3:44-47. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 16:55-75.

- MURAKOSHI, S., ICHINOE, M., SUZUKI, A., KANAOKA, M., ISOgai, A. & TAMURA, S., 1978. Presence of toxic substance in fungus bodies of the entomopathogenic fungi: Beauveria bassiana and Verticillium lecanii. Applied Entomology and Zoology, 13(2):97-102.
- MYKUNI, T. & KAWAKAMI, K. 1975. Toxins of the Nomuraea rileyi. In: Microbial Control of Pests and plant diseases. 1970-1980, BURGESS, H.D., 1981 ed. N.York, Academic press, p.450-51.
- MYOKEY, R., SAKURAI, A., CHANG, C.F., KODAIRA, Y., TAKAHASHI, N. & TAMURA, S., 1969. Aspochracin, a new insecticidal metabolite of Aspergillus ochraceus. Part I. Isolation, struture and biological activities. Agricultural and Biological Chemistry Journal, 33:1491-4
- NATORI, S., 1977. In Mycotoxins in human and healt. (RODRICKS, J.V., HESSELTINE, C.W. and MEHLMAN, M.A., eds). p. 559-81. Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois.
- PAIS, M., DAS, B.C. & FERRON, P., 1981. Dipsipeptides from Metarhizium anisopliae. Phytochemistry, 20:715-23.
- PAPA, K.E., 1973. The parasexual cycle in Aspergillus flavus. Mycologia, 68:1201-05.
- PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. Transactions of the British Mycological Society, 16:55-75.



- PETTIT, R.H., 1895. Studies in artificial cultures of entomogenous fungi. Cornell University Agricultural Experiment Station Bulletin 97. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi Transactions of the British Mycological Society, 16:5-75.
- PONTECORVO, G., ROPER, J.A., HEMMONS, L.M., MacDONALD, K.D. & BUFTON, W.J., 1953. The genetic of Aspergillus nidulans. Advances in Genetics, 5:141-238.
- PRASERTPHON, S. & TANADA, Y., 1969. Mycotoxins of entomophthoraceous fungi. Hilgardia, 39:581-600.
- PUPIN, A.M., & MESSIAS, C.L., 1984. Ácidos graxos em diferentes linhagens de Metarhizium anisopliae como ajuda para identificação. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, 5, p.12.
- PUPIN, A.M., MESSIAS, C.L. & ROBERTS, D.W., 1984. The use of fatty acids as an aid the identification of Metarhizium anisopliae strains. Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology. XVII Davis-USA.
- RIBA, G., GLANDARD, A., RAVELOJAONA, A.M. & FERRON, P., 1980. Isolement de recombiné mitotiques stables de type "intermédiaire" chez Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) par hybridation de biotypes sauvages. Compts Rendu de L'Academie de Science de Paris Série D, 291:657-660.

- RIRA, G., AZEVEDO, J.L., MESSIAS, C.L., SILVEIRA, W.D. & TUVESON, R., 1985. Studies of the inheritance of virulence in the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae, Journal of Invertebrate pathology, 46:20-25.
- ROBERTS, D.W., 1966(a). Toxin from the entomogenous fungus Metarhizium anisopliae. I Production in submerged and surface culture, and in inorganic and organic nitrogen media. Journal of Invertebrate Pathology, 8:212-21.
- ROBERTS, D.W., 1966(b). Toxin from the entomogenous fungus Metarhizium anisopliae. II Symptoms and Detection in moribund hosts. Journal of Invertebrate Pathology, 8:222-27.
- ROBERTS, D.W., 1969. Toxin from the entomogenous fungus Metarhizium anisopliae: Isolation of destruxins from submerged cultures. Journal of Invertebrate Pathology, 14:82-88.
- ROBERTS, D.W., 1981. Toxin of entomopathogenic fungi. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. BURGESS, H.D., ed. New York, Academic Press, p.441-64.
- ROBERTS, D.W. & YENDOL, W.G., 1971, Use of fungi for microbial control of insects. In: Microbial control of insects and mites. BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W., eds. London, Academic Press, 1971. cap.5 p.125-49.

RODRICKS, J.V., HESSELTINE, C.W. & MEHLMAN, M.A., eds. 1977. In:

Mycotoxins in human animal health publishers, Park Forest South.
Illinois.

ROSATO, Y.B., MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L., 1981. Production of extra-
cellular enzymes by isolates of Metarhizium anisopliae. Journal of
Invertebrate Pathology, 38:1-3.

SANTOS, A.L.L., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, ger-
minação e produção de conídios de Metarhizium anisopliae (Metsch.)
SOROKIN. Tese de Mestrado, 148 p. ESALQ-USP.

SILVA, J.C., 1985. Virulência de mutantes exoenzimáticos de Metarhizium
anisopliae var. anisopliae e seus revertentes a Rhodnius prolixus.
Tese de doutorado, 161 p. UNICAMP.

SILVA, J.C. & MESSIAS, C.L., 1986. Virulence of mutants and Revertants
of Metarhizium anisopliae var. anisopliae toward Rhodnius prolixus
Journal of Invertebrate Pathology, 48:368-74.

SILVEIRA, W.D., 1982. Obtenção e fusão de protoplastos em Metarhizium
anisopliae (Metsch.) SOROKIN. Tese de Mestrado, 153 p. ESALQ-USP.

- SILVEIRA, G.A. & MESSIAS, C.L., 1983. Infecção de Deois sp por Metarhizium anisopliae-penetração e colonização. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, 4, p.14.
- SOROKIN, N. 1883. Les parasites des plantes de l'homme et des animaux (em russo). Rastiel'nye parazity celonekaizivotnyh Band, 11:268-90. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. Transactions of the British Mycological Society, 16:55-75.
- STEYN, P.S., 1977. In mycotoxins in human and animal health, RODRICKS, J.V., HESSELTINE, C.W. & MELHMAN, M.A., eds. Pathotox Publishers, Park Forest South, Il. p.419-67
- STOLOFF, L., 1977. In Mycotoxins in human and animal health, RODRICKS, J.V., HESSELTINE, C.W. & MELHMAN, M.A., eds. Pathotox Publishers, Park Forest South, Il. p.7-28.
- 70 SUZUKI, A., KUYAMA, S., KODAIRA, Y. & TAMURA, S., 1966. Structural elucidation of destruxin A. Agricultural and Biological Chemistry Journal, 30(5):517-18.
- 71 SUZUKI, A., TAGUSHI, H. & TAMURA, S., 1970. Isolation and structure elucidation of three new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxins C and D desmethyldestruxins B, produced by Metarhizium anisopliae. Agricultural and Biological Chemistry Journal, 34:813-816.

- SUZUKI, A., KAWAKAMI, K. & TAMURA, S., 1971. Detection of destruxins in silkworm larvae infected with *Metarrhizium anisopliae*. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, 35(10):1641-43.
- SUZUKI, A. & TAMURA, S., 1972. Isolation and structure of proto-destruxin from *Metarrhizium anisopliae*. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, 36(5):896-98.
- SUZUKI, A., KANAOKA, M., ISOGAI, A., MURAKOSHI, S., ICHINOE, M. & TAMURA, S., 1977. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* *Tetrahedron Letter* 25-2167-70.
- 23 TAMURA, S., KUYAMA, S., KODAIRA., Y. & HIGASHIKAMA, S. 1964. The structure de destruxin B, a toxin metabolic of *Oospora destructor*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 28:137-38.
- TAMURA, S., TAKAHASHI, N., 1971. Destruxins and piericidins, In: *Naturally occurring insecticides* JACOBSON and GROSBY, D.G. ed. M. Dekker Inc., New York, 499-539.
- TINLINE, R.D., 1971. Nuclear distribution in *Metarrhizium anisopliae*. *Mycologia*, 63:713-21.

TINLINE, R.D. & NOVELLO, C., 1971. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, Metarrhizium anisopliae. Mycologia, 63:701-12.

TOUMANOFF, M. R., 1928. Au sujet d'aspergillomycose de abeilles. Compte Rendu Academie Science, 187(7):391-93.

TULLOCH, M., 1976. The genus Metarrhizium. Transactions of the British Mycological Society, 66:407-11.

VEEN, K.H., 1967. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus number in Metarrhizium anisopliae. Journal of Invertebrate Pathology, 9: 276-78.

14 VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie, due à Metar(r)hizium anisopliae chez le critiquet pelerin. Mededelingen van de Landbouwhogeschool Wageningen, 68:1-77.

VILLACORTA, A., 1978. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de Metarrhizium anisopliae SOROK. Resumos do Congresso Latinoamericano de Entomologia II e Congresso Brasileiro de Entomologia, V Bahia, resumos, p.70.

VINING, L.C., KELLEHER W.J. & SCHWARTING, A.E., 1962. Oosporein production by a sstrain of Beauveria bassiana originally identified as Amanita muscaria. Canadian Journal of Microbiology, 8:931-33.

- VUILLEMIN, P., 1904. Les isaria du genre Penicillium. Bulletin de la Société Mycologique de France. 20:214-21. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. Transactions of the British Mycological Society, 16:55-75
- WASTI, S.S. & HARTMANN, G.C., 1978. Host-parasite, Interactions between larvae of gypsy moth, Lymantria dispar(L.) (Lepdoptera:Lymantridae) and the entomogenous fungus, Nomuraea rileyi (farlow) SAMSON (Moniliales:moniliaceae). Applied and Entomological Zoology. 13: (1)23-28.
- WEST, E.J. & BRIGGS, J.D., 1968. "In vitro" toxin product by the fungus Beauveria bassiana and blossom in greater wax larval. Journal of Economic Entomology, 61:684-87.
- YENDOL, W.G., MILLER, E.M., BEHNKE, C.N., 1968. Toxic substance from entomophthoraceous fungi. Journal of Invertebrate Pathology, 10: 313-19.
- ZACHARUK, R.Y., 1970(a). Fine structure of the fungus Metarrhizium anisopliae infecting three species of larval Elateridae(Coleoptera) I-Dormant and germination conidia. Journal of Invertebrate Pathology 15:63-80.
- ZACHARUK, R.Y., 1970(b). Fine structure of the fungus Metarrhizium anisopliae infecting three species of larval Elateridae(Coleoptera) II-Conidial germ tubes and appressoria. Journal of Invertebrate Pathology. 15:81-91.