

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/6158
IB/80246

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1985

Este trabalho foi encaminhado a Reitoria,
Ministro da Instr. de J. da Silva pelo
candidato Dr. José Carlos da Silva
e aprovado pelo Conselho Superior
de J. da Silva.

Campinas, 6 de Maio 1985

Prof. Dr. C. L. Mendes

VIRULÊNCIA DE MUTANTES EXOENZIMÁTICOS DE
Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* E
SEUS REVERTENTES A *Rhodnius prolixus*

JOSÉ CARLOS DA SILVA

JOSÉ CARLOS DA SILVA

VIRULÊNCIA DE MUTANTES EXOENZIMÁTICOS DE *Metarhizium anisopliae*
VAR. *anisopliae* E SEUS REVERTENTES A *Rhodnius prolixus*

Orientador: Dr. CLAUDIO LUIZ MESSIAS

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

CAMPINAS - SP

- 1985 -

UNICAMP
BIBLIOTECA

Classif. 7
ator Si38
Ex.
ombo BC/ 6158/IB
617

14 30246
24 6158

Aos meus pais,

José e Celeste,

dedico

À Maria José e Ana Paula,

ofereço.

AGRADECIMENTOS

Na realização deste trabalho, contei com a espontânea e inestimável colaboração de várias pessoas, às quais deixo expresso os meus profundos agradecimentos, e em especial:

- Ao Dr. Claudio Luiz Messias, pela orientação, apoio, amizade e constante estímulo na realização deste trabalho.

- Ao Dr. Ivanhoé Rodrigues Baracho, pelas sugestões e criticismo, que enriqueceram este trabalho e contribuíram particularmente na minha formação científica e pessoal, devido a sua honesta, sincera e sábia personalidade.

- Ao Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, autoridade máxima em dosagem biológica, pelo auxílio e sugestões na análise estatística dos resultados de bioensaios.

- Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, ilustre pesquisador e pessoa humana, que me iniciou na pesquisa científica através de sua orientação no Mestrado, agradeço as sugestões apresentadas.

- Aos Drs. Renato Bonatelli Jr., Octavio Henrique O. Pavan, Hebe Myrina L. de Souza e Aline A. Pizzinari-Kleiner, pela atenção que dispensaram à leitura do manuscrito desta tese e as valiosas modificações sugeridas.

- À Dra. Hebe Myrina L. de Souza, pela concessão do material eletroforético, à Profª Eliana De Conti e Sra. Wilma Nascimento de Souza, pela eficiência com que me auxiliaram na metodologia eletroforética.

- Ao Prof. Áureo T. Yamada pelas fotografias tiradas com esmero e boa vontade.

- Ao Dr. Luis Alberto Magna, pelo emprego do computador e espontaneidade em nos auxiliar sobre problemas estatísticos decorrentes deste trabalho.

- Ao Dr. Mohamed E.M. Habib pelas sugestões, estímulo e amizade, elementos de fundamental importância para nosso êxito neste trabalho.

- Um agradecimento especial à esposa Maria José Lima da Silva, companheira, amiga e solidária em todos os momentos.

- Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Biologia da UNICAMP, que localizaram de boa vontade inúmeras referências utilizadas neste texto.

- À SUCEN, Superintendência de Controle de Endemias, de Moji-Guaçu, SP, na pessoa do Sr. Antenor Nascimento Ferraz Filho, pela doação dos barbeiros.

- Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos, durante nossa participação no Curso de Pós-Graduação em Genética.

- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA pelo auxílio financeiro ao Projeto de Seleção Genética de Fungos Entomopatogênicos - FUNCAMP/EMBRAPA - Programa Nacional de Controle Biológico de Pragas.

- Ao Programa Integrado de Genética - PIG IV - CNPq pelo apoio financeiro ao projeto de Genética de Microorganismos.

- Ao Depto. de Genética e Evolução, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, onde o

presente trabalho foi realizado.

- À Universidade Federal da Paraíba, pelo afastamento concedido, que nos permitiu a realização deste Doutorado.

- Aos que me premiam com amizade e amor, a minha mais profunda gratidão.

- A ausência de citação nominal não significa esquecimento da colaboração prestada. A todo esse pessoal nossos mais sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos biológicos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	3
2.1.1. Classificação, descrição e caracterização....	3
2.1.2. O ciclo parassexual.....	7
2.2. Importância de exoenzimas e toxinas em fungos entomopatogênicos.....	8
2.3. Fatores físicos que afetam a patogênese.....	15
2.4. Alguns aspectos biológicos de <i>Rhodnius prolixus</i> Stal, 1859.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Linhagens utilizadas do fungo.....	21
3.2. Inseto usado nos bioensaios.....	21
3.3. Meios de cultura e soluções usadas.....	22
3.3.1. Meio mínimo sólido (MM).....	22
3.3.2. Meio completo (MC).....	22
3.3.3. Meio mínimo líquido.....	23
3.3.4. Meio para atividade amilolítica.....	23
3.3.5. Meio para atividade lipolítica.....	23
3.3.6. Meio para atividade proteolítica.....	24
3.3.7. Solução de vitaminas.....	24
3.3.8. Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras...	24
3.3.9. Solução de gelatina (8%).....	25
3.3.10. Solução saturada de sulfato de amônio.....	25

3.3.11. Solução saturada de sulfato de potássio.....	25
3.3.12. Solução de iodo (1%).....	26
3.3.13. Solução de hipoclorito de sódio (2, 5%).....	26
3.3.14. Solução salina (0, 85%).....	26
3.3.15. Solução de tween 80 (0, 1%).....	26
3.3.16. Solução de albumina (5%).....	27
3.3.17. Soluções de álcool etílico.....	27
3.3.18. Solução fixadora.....	27
3.3.19. Solução de Giemsa.....	27
3.3.20. Tampão fosfato pH 6,9.....	28
3.3.21. Tampão fosfato pH 6,0.....	28
3.3.22. Tampão tris-citrato pH 8,6.....	29
3.3.23. Tampão borato pH 8,0.....	29
3.3.24. Gel de amido.....	29
3.3.25. Corante Fast-Garnet.....	29
3.3.26. Corante α -naftilacetato.....	30
3.3.27. Solução de coloração de esterases.....	30
3.4. Esterilização e temperatura de incubação.....	30
3.5. Curvas de sobrevivência à luz ultravioleta.....	31
3.6. Avaliação da produção de exoenzimas.....	31
3.6.1. Atividade amilolítica.....	32
3.6.2. Atividade lipolítica.....	33
3.6.3. Atividade proteolítica.....	33
3.7. Obtenção de mutantes exoenzimáticos.....	34
3.8. Obtenção de revertentes.....	34
3.9. Caracterização dos padrões eletroforéticos de α -esterases das linhagens de <i>M. anisopliae</i>	35
3.9.1. Preparação do gel.....	35
3.9.2. Preparo e aplicação das amostras.....	36
3.9.3. Condições da eletroforese.....	36

3.9.4. Corte, incubação, coloração e fixação	
do gel.....	37
3.10. Caracterização citológica dos conídios.....	37
3.11. Germinação de conídios.....	38
3.12. Bioensaio.....	38
3.12.1. Produção de conídios.....	39
3.12.2. Preparação das ninfas de <i>Rhodnius</i>	
<i>prolixus</i> e inóculo do fungo.....	39
3.12.3. Reisolamento do fungo.....	41
3.12.4. Análise estatística da virulência dos	
isolados.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Sobrevivência à luz ultravioleta (UV).....	43
4.2. Produção de enzimas extracelulares nas linhagens	
E ₉ e V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i>	46
4.3. Obtenção de mutantes para não produção de	
exoenzimas.....	48
4.4. Obtenção de revertentes.....	51
4.5. Caracterização isoenzimática para α -esterase	
das linhagens selvagens E ₉ e V ₁₄ de <i>M.</i>	
<i>anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	58
4.6. Caracterização citológica das linhagens E ₉ e	
V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e	
revertentes.....	60
4.6.1. Número de núcleos por conídio.....	60
4.6.2. Comprimento de conídios.....	63
4.7. Germinação de conídios.....	64
4.8. Bioensaio.....	66
4.8.1. Reisolamento dos isolados a partir das	
ninfas.....	66

4.8.2. Análise estatística da virulência dos	
isolados.....	68
4.8.2.1. LC_{50}	68
4.8.2.2. LT_{50}	75
4.8.2.3. Hipótese de paralelismo.....	81
4.8.2.4. Potência Relativa.....	86
5. DISCUSSÃO.....	95
5.1. Luz ultravioleta como agente mutagênico para	
<i>M. anisopliae</i>	95
5.2. Enzimas extracelulares de <i>M. anisopliae</i>	96
5.3. Obtenção de mutantes e revertentes exoenzimáticos...	97
5.4. Padrões eletroforéticos para α -esterase.....	98
5.5. Aspectos citológicos dos mutantes e revertentes.....	100
5.6. Taxa de germinação dos conídios.....	102
5.7. Infecção das ninfas por isolados de <i>M. anisopliae</i> ...	103
5.8. Virulência dos isolados.....	104
5.8.1. Virulência dos mutantes amilase ⁻ e	
revertentes amilase ⁺	106
5.8.2. Virulência dos mutantes lipase ⁻ e	
revertentes lipase ⁺	107
5.8.3. Virulência dos mutantes protease ⁻ e	
revertentes protease ⁺	108
6. CONCLUSÕES.....	110
7. RESUMO.....	112
8. SUMMARY.....	113

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
10. APÊNDICE.....	147

LISTA DE TABELAS

TABELA

PÁGINA

- 1- Porcentagem de sobrevivência de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, linhagem E₉ após tratamentos com luz ultravioleta. (Média de 3 experimentos)... 44
- 2- Porcentagem de sobrevivência de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, linhagem V₁₄ após tratamentos com luz ultravioleta. (Média de 3 experimentos)... 44
- 3- Número de mutantes das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*, selecionados para não produção de exoenzimas amilase, lipase e protease..... 49
- 4- Revertentes das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* selecionados para produção de exoenzimas amilase, lipase e protease..... 51
- 5- Simbologia dos mutantes e revertentes para exoenzimas de *M. anisopliae* obtidos por irradiação à luz ultravioleta..... 55
- 6- Análise de variância dos dados apresentados para efeito do tratamento com raios ultravioleta sobre o índice Enzimático para protease..... 56
- 7- Comparação do índice enzimático para protease entre mutantes, revertentes e as linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*..... 57

8- Porcentagem de conídios binucleados na linhagem E_9 de <i>M. anisopliae</i> e em seus mutantes e revertentes.....	61
9- Porcentagem de conídios binucleados na linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e em seus mutantes e revertentes.....	61
10- Análise de variância para os dados da Tabela 8, transformados em ângulo =arco-seno $\sqrt{\text{proporção}}$	62
11- Análise de variância para os dados da Tabela 9, transformados em ângulo =arco-seno $\sqrt{\text{proporção}}$	62
12- Análise de variância dos comprimentos de conídios da linhagem E_9 de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	63
13- Análise de variância dos comprimentos de conídios da linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	64
14- Análise de variância da taxa de germinação da linhagem E_9 de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	65
15- Análise de variância da taxa de germinação da linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	65

16- Concentração Letal 50% (LC_{50}), Intervalos de Confiança (I.C.) das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes expressos em 10^2 conídios/ml.....	69
17- Concentração Letal 50% (LC_{50}), Intervalos de Confiança (I.C.) das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus revertentes, expressos em 10^2 conídios/ml.....	70
18- Tempo letal (LT_{50}), Intervalos de Confiança (I.C.) das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes.....	75
19- Tempo letal (LT_{50}), Intervalos de Confiança (I.C.) das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus revertentes.....	76
20- Teste de x^2 para comparação dos LC_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes.....	82
21- Teste de x^2 para comparação dos LC_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus revertentes.....	83
22- Teste de x^2 para comparação dos LT_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes.....	84

23- Teste de χ^2 para comparação dos LT_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus revertentes.....	85
24- Potência Relativa (R) e seus Intervalos de Confiança para os LC_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e seus mutantes.....	86
25- Potência Relativa (R) e seus Intervalos de Confiança para os LC_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e seus revertentes.....	87
26- Potência Relativa (R) e seus Intervalos de Confiança para os LT_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e seus mutantes.....	88
27- Potência Relativa (R) e seus Intervalos de Confiança para os LT_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e seus revertentes.....	89

LISTA DAS FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1- Modelo usado para bioensaio de <i>M. anisopliae</i> em ninfas de <i>R. prolixus</i>	41
2- Curvas de sobrevivência das linhagens E_9 e V_{14} de <i>M. anisopliae</i> , sob ação de luz ultra- violeta.....	45
2A- Atividade amilolítica da linhagem E_9 de <i>M.</i> <i>anisopliae</i> detectada em meio contendo amido.....	46
3- Atividade lipolítica da linhagem E_9 de <i>M.</i> <i>anisopliae</i> detectada em meio contendo tween 20.....	47
4- Atividade proteolítica da linhagem E_9 de <i>M.</i> <i>anisopliae</i> detectada em meio contendo gelatina.....	47
5- Mutante (seta) da linhagem E_9 de <i>M. anisopliae</i> para exoenzima amilase.....	49
6- Mutante (seta) da linhagem E_9 de <i>M.</i> <i>anisopliae</i> para exoenzima lipase.....	50
7- Mutante (seta) da linhagem E_9 de <i>M.</i> <i>anisopliae</i> para exoenzima protease.....	50
8- Revertente (seta) da linhagem E_9 de <i>M.</i> <i>anisopliae</i> para amilase.....	52

9- Revertente (seta) da linhagem E ₉ de <i>M. anisopliae</i> para lipase.....	52
10- Revertente (seta) da linhagem E ₉ de <i>M. anisopliae</i> para protease.....	53
11- Esquema para obtenção de mutantes e revertentes exoenzimáticos das linhagens E ₉ e V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i>	54
12- Representação esquemática dos padrões de α -esterases do micélio das linhagens E ₉ e V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	59
13- Ninfas de <i>R. prolixus</i> mortas pela infecção por <i>M. anisopliae</i>	67
14- Curvas de dosagem mortalidade para ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i> após 7 dias de exposição à linhagem E ₉ de <i>M. anisopliae</i> e seus mutantes.....	71
15- Curvas de dosagem mortalidade para ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i> após 7 dias de exposição à linhagem V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i> e seus mutantes.....	72
16- Curvas de dosagem mortalidade para ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i> após 7 dias de exposição à linhagem E ₉ de <i>M. anisopliae</i> e seus revertentes.....	73

17- Curvas de dosagem mortalidade para ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i> após 7 dias de exposição à linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e seus revertentes.....	74
18- Curvas de tempo mortalidade para ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i> após exposição à linhagem E_9 de <i>M. anisopliae</i> e seus mutantes.....	77
19- Curvas de tempo mortalidade para ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i> após exposição à linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e seus mutantes.....	78
20- Curvas de tempo mortalidade para ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i> após exposição à linhagem E_9 de <i>M. anisopliae</i> e seus revertentes.....	79
21- Curvas de tempo mortalidade para ninfas de <i>Rhodnius prolixus</i> após exposição à linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e seus revertentes.....	80
22 e 23- Intervalos de Confiança da Potência Relativa dos LC_{50} das linhagens E_9 (Fig. 22) e V_{14} (Fig. 23) de <i>Metarhizium anisopliae</i> e seus mutantes.....	90
24 e 25- Intervalos de Confiança da Potência Relativa dos LC_{50} das linhagens E_9 (Fig. 24) e V_{14} (Fig. 25) de <i>M. anisopliae</i> e seus revertentes.....	91

26 e 27- Intervalos de Confiança da Potência Relativa dos LT_{50} das linhagens E_9 (Fig. 26) e V_{14} (Fig. 27) de <i>Metharhizium</i> <i>anisopliae</i> e seus mutantes.....	92
28 e 29- Intervalos de Confiança da Potência Relativa dos LT_{50} das linhagens E_9 (Fig. 28) e V_{14} (Fig. 29) de <i>M.</i> <i>anisopliae</i> e seus revertentes.....	93

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

TABELA	PÁGINA
A.1.- Valores de índices enzimáticos para amilase, lipase e protease das linhagens E ₉ e V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i>	148
A.2.- Valores de índices enzimáticos para amilase das linhagens E ₉ e V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	149
A.3.- Valores de índices enzimáticos para lipase das linhagens E ₉ e V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	150
A.4.- Valores de índices enzimáticos para protease das linhagens E ₉ e V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	151
A.5.- Proporção de conídios binucleados da linhagem E ₉ de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	152
A.6.- Proporção de conídios binucleados da linhagem V ₁₄ de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	152
A.7.- Medidas do comprimento dos conídios da linhagem E ₉ de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	153

A.8.- Medidas do comprimento dos conídios da linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes.....	154
A.9.- Taxa de germinação da linhagem E_9 de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes em MC.....	155
A.10.- Taxa de germinação da linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e de seus mutantes e revertentes em MC.....	155
A.11.- Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de <i>R. prolixus</i> após 7 dias de exposição à linhagem E_9 de <i>M. anisopliae</i> e seus mutantes.....	156
A.12.- Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de <i>R. prolixus</i> após 7 dias de exposição à linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e seus mutantes.....	157
A.13.- Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de <i>R. prolixus</i> após 7 dias de exposição à linhagem E_9 de <i>M. anisopliae</i> e seus revertentes.....	158
A.14.- Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de <i>R. prolixus</i> após 7 dias de exposição à linhagem V_{14} de <i>M. anisopliae</i> e seus revertentes.....	159

A.15.- Porcentagem acumulada de *R. prolixus* após diferentes dias de exposição a conídios das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e seus mutantes..... 160

A.16.- Porcentagem acumulada de *R. prolixus* após diferentes dias de exposição a conídios das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e seus revertentes..... 161

1. INTRODUÇÃO

A crescente resistência dos insetos aos inseticidas químicos, os efeitos residuais e a poluição ambiental que os mesmos provocam, permitiram que o controle biológico de pragas assumisse atualmente uma importância relevante. Dentro deste tipo de controle estão incluídos os entomopatógenos e, estes são representados por vírus, bactérias, fungos, protozoários e nematóides.

Microorganismos entomopatogênicos formam um importante grupo de agentes que tem sido utilizados como inseticidas microbianos e, nos últimos anos, vários deles alcançaram sucesso no controle de populações de insetos pragas. Dentre os entomopatógenos, o emprego do fungo *Metarhizium anisopliae* surge como mais uma alternativa promissora para ser utilizada neste tipo de controle.

O fungo *M. anisopliae* é considerado entomopatogênico para um largo espectro de hospedeiros, pois segundo VEEN (1968) e FARGUES et alii (1975) pode infectar cerca de 204 espécies de insetos. No Brasil, ele vem sendo usado no controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar (GUAGLIUMI, 1970), especialmente no Nordeste e, mais recentemente, tem sido utilizado no combate a cigarrinhas de pastagens (ALVES, 1982). Esse microorganismo também possui grande potencial no controle de insetos hematófagos como mosquitos *Aedes* sp, *Anopheles* sp e *Culex* sp (DAOUST & ROBERTS, 1982) e triatomíneos *Tria-*

toma sp, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (MOURA COSTA, 1975 e 1978; MESSIAS et alii, 1980 e SHERLOCK & GUITTON, 1982), assim como para moscas-de-frutas *Ceratitis capitata* (GARCIA et alii, 1984, 1985).

Os fungos entomopatogênicos conseguem infectar os insetos por penetração através da cutícula do hospedeiro, num processo mecânico-enzimático, como salientam vários autores, havendo raras exceções em que a infecção ocorre por ingestão (SCHABEL, 1976). A produção de enzimas extracelulares por esses fungos, tais como lipase, protease e quitinase, deve ser importante no processo de patogênese, principalmente no que se refere à penetração e invasão do corpo do hospedeiro pelo fungo. Apesar do reconhecimento da importância dessas exoenzimas, os trabalhos referentes a virulência e atividade enzimática em diferentes fungos entomopatogênicos tem-se revelado controvertidos, talvez em função da grande diversidade dos hospedeiros e/ou linhagens de patógenos empregadas.

Em vista dos exposto, procurou-se estudar duas linhagens selvagens de *M. anisopliae* variedade *anisopliae*, com os seguintes objetivos: 1) verificar a ocorrência das enzimas extracelulares amilase, lipase e protease; 2) utilizar a radiação ultravioleta na obtenção de mutantes que não produzam estas exoenzimas e isolar, em seguida reversões dos mutantes; 3) caracterizar os isolados do ponto de vista citológico e eletroforético das isoenzimas para α -esterase; 4) realizar bioensaios destas linhagens selvagens, assim como de seus mutantes e revertentes à ninfas de 3º estadio de *Rhodnius prolixus* em regime de fome.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos biológicos de *Metarhizium anisopliae*

2.1.1. Classificação, descrição e caracterização

O fungo *Metarhizium anisopliae* pertence à classe Deuteromycetes, ordem Moniliales, família Moniliaceae e conforme cita VEEN (1968), foi isolado pela primeira vez por METSCHNIKOFF em 1879 a partir de um besouro *Anisoplia austriaca*, dando-lhe o nome de *Entomophthora anisopliae*, e posteriormente, em 1880, o mesmo autor o denominou de *Isaria destructor*. VEEN (1968), também relata que SOROKIN (1883), o classificou como *Metarhizium anisopliae* e, embora vários autores atribuíssem diferentes nomes a ele, provavelmente representavam o mesmo fungo.

Foi descrito por BARON (1968) como apresentando um corpo de frutificação semelhante a um esporodóquio, assim denominado por LATCH (1965), agregado a hifas entrelaçadas, contendo uma massa compacta de conidióforos que se apresentam simples ou ramificados, resultando células denominadas de fiálides e, dessas, originam os fialósporos, de forma cilíndrica, que não são septados, hialinos ou pigmentados produzidos em cadeias.

A maior parte dos autores concorda que a temperatura para o crescimento de *M. anisopliae* se situa entre 25° e

30°C, sendo os pontos mínimo e máximo para o crescimento de 7° e 35°C, respectivamente (LATCH, 1965).

Os extremos de pH para o desenvolvimento desse fungo são bastante amplos, situando-se segundo HÜBER (1958) entre 3,5 e 8,5 unidades e, conforme LIHNELL (1944), estariam em torno de 2,0 - 8,5, com um ótimo em pH 6,9.

Dados adicionais sobre outros fatores que interferem no crescimento deste fungo como luz, umidade, meio de cultura e outros estão bem detalhados nas revisões de SANTOS (1978) e ALVES (1982).

Um dos aspectos bastante discutidos em *M. anisopliae* é o tamanho dos conídios. Assim, JOHNSTON (1915) verificou a existência de conídios de forma longa e curta de *M. anisopliae* e descreveu a forma *major*, cujos comprimentos de esporos variavam de 3,0 a 11,9 µm e, a forma *minor*, com comprimento variando de 2 - 3,0 µm a 3,5 µm e que o meio de cultura pode alterar essas dimensões, devido a diferentes condições fisiológicas, fato esse confirmado por KAMAT et alii (1952). Essa variabilidade no tamanho de conídios em *M. anisopliae*, foi confirmada por diversos autores (FRIEDERICH, 1930 (apud TULLOCH, 1976); PETCH, 1931; BALFOUR-BROWNE, 1960; VEEN, 1968). Ainda em relação ao tamanho de conídios, TULLOCH (1976) mediu esporos de 80 culturas de *M. anisopliae*, encontrando comprimentos de 3,5 - 9,0 µm (usualmente 5,0 - 8,0 µm) e 9,0 - 18,0 µm (usualmente 10,0 - 14,0 µm) e justificou uma separação varietal nesse fungo, propondo a variedade *minor* ou *anisopliae* aplicável à forma de conídios curtos, e variedade *major*, à forma longa de conídios. Esses valores compreendem aos assinalados por AZEVEDO & MESSIAS (1981) e ARRAIS DE MATOS (1983) para os comprimentos de conídios analisados de

vários isolados de *M. anisopliae*.

Em relação ao número de núcleos por conídio, VEEN (1967), verificou ao microscópio eletrônico a presença de conídios uninucleados em uma linhagem de *M. anisopliae* var. *minor* e ao microscópio de interferência observou o mesmo resultado com uma linhagem da forma *major*. Essa informação foi confirmada por ZACHARUK (1970a, b), embora constataste conídios binucleados, que seriam resultantes da germinação e migração de um núcleo para o tubo de germinação, fato também confirmado por TINLINE (1971) utilizando microscópio ótico e coloração de GIEMSA. Entretanto, em diferentes linhagens de *M. anisopliae* (MESSIAS et alii, 1978; ARRAIS DE MATOS, 1983; SILVEIRA, 1983) encontraram uma pequena variação na porcentagem de conídios binucleados (2 - 5%), mas nenhuma apresentou 100% de uninucleados.

O grande número de isolados obtidos de *M. anisopliae* requer métodos de caracterização para a diferenciação dos mesmos. As principais técnicas para tal incluem: eletroforese, imunoeletroforese, serologia, virulência, cromatografia, produção de enzimas extracelulares e características morfológicas e culturais. Através de eletroforese e imunoeletroforese de extratos somáticos e metabólicos, 3 isolados de *M. anisopliae* var. *major* e 1 de forma *minor* foram comparados por FARGUES et alii (1975), que não detectaram diferenças imunológicas importantes entre as variedades. Utilizando essas técnicas, FARGUES et alii (1981); DURIEZ-VAUCELLE et alii (1981) caracterizaram *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* e *M. anisopliae*. Nessa mesma linha de estudos, De CONTI et alii (1980) analisaram 11 isolados de *M. anisopliae* em eletroforese de gel amido, para isoenzimas fosfatase e

esterase, mostrando que o padrão eletroforético para fosfatase foi homogêneo para todos os isolados e cinco padrões foram verificados para esterase.

HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) formularam meios de culturas sólidos para verificação de produção de enzimas extracelulares amilase, lipase, protease, pectinase, quitinase, urease, DNase e RNase, e enfatizaram ser essa técnica um meio para estudos ecológicos e taxonômicos de vários fungos. Tal metodologia foi aplicada por ROSATO et alii (1981) para estudos de 11 isolados de *M. anisopliae* de diferentes regiões do Brasil para produção de exoenzimas amilase, lipase, protease e quitinase. Os autores concluíram que em geral, os isolados de mesma região tem índices enzimáticos similares, embora índices semelhantes fossem encontrados para isolados de regiões distintas.

Com o objetivo de traçar um perfil biológico e bioquímico de diferentes isolados de *M. anisopliae*, ALVES (1982) analisou as características morfológicas das colônias, produção de conídios, comprimento e viabilidade dos conídios, eletroforese para esterase e virulência para *Galleria mellonella*, *Diatraea saccharalis* e *Deois flavopicta*, mostrando que esse conjunto de técnicas permite a caracterização dos isolados. Também, outra técnica que pode ser utilizada como rotina para identificação de linhagens de *M. anisopliae* é a cromatografia gasosa, sugerida por MESSIAS et alii (1983), que compararam conídios de 6 linhagens de *M. anisopliae* var. *anisopliae* e de 1 linhagem da variedade *major*. Ainda tem sido utilizado para a identificação de linhagens de *M. anisopliae*, a avaliação qualitativa e quantitativa de ácidos graxos em conídios e micélio (PUPIN & MESSIAS, 1984).

2.1.2. O ciclo parassexual

O fungo entomopatogênico *M. anisopliae* é desprovido de ciclo sexual, pois embora SCHAEFFENBERG (1959) tenha reportado a ocorrência de peritécio, tal evidência não foi confirmada por outros autores. Desse modo, devem ocorrer outros meios de recombinação que podem ser utilizados, para eventual melhoramento e análise genética. Uma das possibilidades é o ciclo parassexual que basicamente, permite recombinação sem necessidade de um processo sexual e que foi descrito por ROPER (1952) e POTENCORVO & ROPER (1952).

O primeiro passo para elucidar o ciclo parassexual em *M. anisopliae*, foi dado por TINLINE & NOVIELLO (1971) que reportaram o fenômeno de heterocariose entre alguns mutantes auxotróficos e resistentes a drogas. MESSIAS (1979) e MESSIAS & AZEVEDO (1980), demonstraram pela primeira vez o ciclo parassexual nesse fungo, utilizando mutantes para coloração de conídios e auxotrofia, obtidos por irradiação com luz ultravioleta na dose que permitia 5% de sobreviventes (OKINO et alii 1978). AL-AIDROOS (1980) também constatou o ciclo parassexual em *M. anisopliae*, utilizando marcas para resistência a drogas, coloração de conídios e auxotrofia. RIBA et alii (1980) sem atentar para obtenção de recombinantes por haploidização, realizaram a mistura de *M. anisopliae* variedades *major* e *minor* obtendo tipos híbridos intermediários e estáveis, sugerindo trocas genéticas entre eles. BERGERON & AL-AIDROOS (1982) sugeriram utilizando o ciclo parassexual, que *M. anisopliae* apresenta cinco grupos de ligação, pela localização de oito marcas genéticas por elas isoladas. SILVEIRA (1983)

obteve recombinantes em *M. anisopliae* por meio do ciclo parassexual, e mostrou pela primeira vez, que ocorre fusão de protoplastos entre mutantes auxotróficos e morfológicos para coloração de conídios, os quais foram selecionados em alta frequência pela técnica de enriquecimento por filtração (SILVEIRA & AZEVEDO, 1982, 1984). Demonstrou que o estado heterocariótico é obtido, tanto no cruzamento dentro de linhagens como entre linhagens, ocorrendo recombinação e segregação, sem a obtenção do estado diplóide, fenômeno similar ao descrito em *Aspergillus niger* por BONATELLI Jr. et alii (1983) e denominado de paramiose. Entretanto, a técnica do "doador morto" (FRIGO, 1983) provou ser efetiva para obtenção de diplóides e segregantes entre linhagens distintas de *M. anisopliae*.

O emprego de qualquer metodologia que propicie a obtenção de recombinantes, poderia combinar qualidades favoráveis de duas linhagens em uma só, a qual, poderia constituir-se um entomopatôgeno promissor no controle microbiológico.

2.2. Importância de exoenzimas e toxinas em fungos entomopatogênicos

A habilidade dos fungos entomopatogênicos produzirem certas enzimas extracelulares ou exoenzimas sugerem que elas estão envolvidas na penetração do integumento do hospedeiro e no processo de colonização (FERRON, 1978). A síntese de exoenzimas quitinase e protease foi verificada "in vitro"

pela primeira vez por HÜBER (1958) nos fungos *Beauveria bassiana*, *Cordyceps militaris* e *Metarhizium anisopliae*.

A associação dos eventos secreção de enzimas e penetração do fungo na cutícula do inseto, foi descrita por BALFOUR-BROWNE (1960) em *M. anisopliae*, sugerindo papel fundamental das exoenzimas no processo de invasão das hifas no corpo do hospedeiro. Entretanto, além da penetração do fungo ser facilitada por exoenzimas, a pressão mecânica também ocorre, como foi estudado por ROBINSON (1966) através de várias observações sobre o modo de penetração do tegumento do inseto *Tenebrio molitor* por vários fungos patogênicos e não patogênicos e concluiu que a epicutícula é invadida por pressão mecânica e a endocutícula pelo uso de exoenzimas quitinase e/ou protease. O mesmo autor cita ainda que os fungos não patogênicos são incapazes de infectar insetos por não podem penetrar no exoesqueleto do hospedeiro.

Estudos histopatológicos e de atividade exoenzimática também foram realizados em quatro espécies de *Entomophthora* infectando *Galleria mellonella* e *Bombyx mori* (GABRIEL, 1968a, b) mostrando que "in vitro" houve produção de exoenzimas quitinase, lipase e protease pelos fungos e que suas atividades foram detectadas nos tegumentos dos hospedeiros.

Várias etapas do processo de penetração de *M. anisopliae* em larvas de *Elateridae*, foram reportadas por ZACHARUCH (1970a, b, c, 1971 e 1973), que podem ser assim resumidas:

- 1) - Formação do apressório, que é uma extremidade dilatada da hifa com alta atividade secretora, que permite a penetração da epicutícula inicialmente por pressão mecânica, mas primária-

mente enzimática (lipolítica, proteolítica e quitinolítica).

- 2) - Penetração da procutícula (também mecânica - enzimática) através de corpos hifais, os quais darão origem a hifas secundárias que se distribuem na cavidade do corpo.
- 3) - Formação de células com abundância de nutrientes armazenados e poucas inclusões metabolicamente ativas, sendo esse estágio chamado de clamidósporo, o qual parece manter a viabilidade fúngica no corpo do hospedeiro por períodos extensos, antes da esporulação superficial.

Em relação ao entomopatogênico *Beauveria bassiana* as exoenzimas quitinase, celulase, lipase e protease foram observadas em ensaios "in vitro" (LEOPOLD & SAMŠIŇÁKOVÁ, 1970) e através de estudos histoquímicos da cutícula de *Galleria mellonella*, foi verificado que a degradação dos componentes individuais do tegumento deste inseto pelo fungo se faz pela sequência de enzimas lipase, protease e quitinase (SAMŠIŇÁKOVÁ et alii, 1971).

Outros entomopatogênicos analisados quanto ao papel das exoenzimas na penetração do hospedeiro são mencionadas, tais como: *Nomuraea rileyi* (MOHAMED et alii, 1978) ; *Conidiobolus obscurus* (LATGÉ et alii, 1984).

Apesar do reconhecimento dos autores da importância das exoenzimas no processo de penetração dos entomopatogênicos nos diversos hospedeiros, resultado conflitantes surgem no que se refere a atividade exoenzimática e virulência das linhagens analisadas. Assim, SAMŠIŇÁKOVÁ & MIŠIKOVÁ (1973)

após estimarem a atividade de várias enzimas extracelulares para vários fungos entomopatogênicos e virulência dos mesmos a *Galleria mellonella*, não encontraram relação entre síntese de exoenzimas e patogenicidade das linhagens dos diferentes grupos de Deuteromicetos. Através de vários estudos sobre atividade enzimática de *Beauveria tenella* e virulência a *Melolontha melolontha* (SEGRETAIN et alii, 1971; PARIS & SEGRETAIN, 1975 e 1978; PARIS et alii, 1975; PARIS & FERRON, 1979), concluíram que as linhagens mais virulentas apresentaram alta atividade lipolítica, mas não encontraram relação entre quitinase e protease com virulência.

Extensivos estudos sobre atividade de exoenzimas de *Beauveria bassiana* e virulência a *Heliothis zea* (GRULA et alii, 1978 e 1984; CHAMPLIN & GRULA, 1979; PEKRUL & GRULA, 1979; SMITH et alii, 1981) e a *Curculio caryae* (CHAMPLIN et alii, 1981), levaram a uma conclusão comum de que não houve relação entre patogenicidade e atividades exoenzimáticas para lipases, proteases e quitinases. Entretanto, quando esse fungo era injetado na hemocela desse mesmo inseto, havia associação entre atividade proteolítica exocelular do fungo e manifestação entomopatológica (CHEUNG & GRULA, 1982).

Considerando a natureza multifatorial da virulência de um fungo entomopatogênico a vários hospedeiros, PAVLYUSHIN (1978) ensaiou a patogenicidade de 16 linhagens de *B. bassiana* a vários insetos, observando que linhagens fracamente virulentas apresentavam reduzidas atividades proteolítica e lipolítica. O mesmo autor verificou que variantes com aumento na atividade proteolítica induzidos por irradiação com luz ultravioleta, mostraram níveis de virulência a *G. mellonella* superiores a da linhagem parental.

No fungo *M. anisopliae*, a atividade exoenzimática amilolítica foi relacionada à virulência, após AL-AIDROOS & SEIFERT (1980) verificarem que mutantes com aumento na degradação de amido mostraram ser hipervirulentos a larvas de 3º estadio de *Culex pipiens pipiens*, embora isolados com alteração de exoenzima protease não fossem associados com virulência.

SOZA GÓMES & ALVES (1983), compararam diferentes isolados de *M. anisopliae* através de bioensaios em *Galleria mellonella*, *Diatraea saccharalis* e *Tenebrio molitor*. Suas atividades enzimáticas amilolítica, proteolítica e lipolítica foram avaliadas em meios de cultura sólido, sendo que nenhuma relação foi encontrada entre virulência e atividade enzimática, embora dois isolados mais virulentos apresentassem alta atividade lipolítica.

A diminuição da virulência de um entomopatogênico através de passagens em meio de cultura sintético é confirmada por alguns autores (FOX & JAQUES, 1958; KAWAKAMI, 1960; SCHAEFERFENBERG, 1964; AIZAWA, 1971; FARGUES, 1972; NAGAICH, 1973; HALL, 1980; SAMŠIŇÁKOVÁ & KÁLALOVÁ, 1983) e essa virulência atenuada pode ser, tentativamente, justificada através da atividade enzimática. Assim, SILVA et alii (1982) verificaram que a produção de enzimas extracelulares amilase, lipase e protease pela linhagem E₉ de *M. anisopliae* diminui quando é passada em subcultura, comparada com os índices enzimáticos do fungo isolado diretamente do inseto *Deois* sp. Também atividades exoenzimáticas lipase e quitinase em *M. anisopliae* var. *major* e virulência a *Oryctes rhinoceros* estão relacionados como concluíram SUNDARABABU e alii (1984) mostrando que sub-culturas do fungo apresentaram baixas viru

lências e atividades enzimáticas e que a passagem no hospedeiro, restaurou esses dois fatores a níveis normais.

As toxinas descritas em fungos entomopatogênicos, geralmente tem sido associadas com a morte do hospedeiro (ROBERTS, 1981). Embora compostos tóxicos a insetos tem sido reportados de filtrados de cultura e/ou micélio de vários fungos entomopatogênicos e de fungos que não infectam insetos naturalmente, poucas pesquisas para toxinas em fungos com ação patogênica a insetos tem sido conduzidas (ROBERTS & HUMBER, 1984).

No fungo *Metarhizium anisopliae*, KODAIRA (1961a, b e 1962) mostrou a produção "in vitro" e nos hospedeiros, de substâncias tóxicas a insetos e duas delas foram denominadas de destruxinas A e B. Suas fórmulas estruturais foram identificadas por TAMURA et alii (1964) e SUZUKI et alii (1966), sendo ambas depsipeptídeos cíclicos contendo cinco aminoácidos e um ácido graxo em razões equimolares. A confirmação dessas destruxinas foi feita por ROBERTS (1966a, b e 1969) que as ensaiou contra *Galleria mellonella* e *Bombyx mori*, obtendo mortalidade nesses insetos. VEEN (1968) verificou a toxicidade de toxinas extraídas do filtrado do meio de cultura de diferentes isolados de *M. anisopliae* em *G. mellonella* e *Schistocerca gregaria* e não encontrou relação entre produção de toxinas e virulência das linhagens, realçando que os dois insetos tem sensibilidade diferentes à mesma toxina. Essas destruxinas mostraram ser tóxicas também a mamíferos, pois TAMURA & TAKAHASHI (1971) constataram que quando injetadas intraperitonealmente em ratos, nas doses de 1,8 a 17,0 mg/kg causaram morte. Outras toxinas não identificadas como destruxinas, são liberadas de esporos de *M. anisopliae* ingeri

dos por larvas de mosquitos, causando intoxicação e morte , como foi demonstrado por CRISAN (1971).

Enzimas, particularmente proteases de *M. anisopliae*, estão presentes nos filtrados de cultura e quando injetadas na hemocela são tóxicas a certos insetos, mas seu papel no desenvolvimento da doença é desconhecido (KŮČERA, 1980). Entretanto, o mesmo autor em 1982 reportou a existência de inibidores de protease em vários órgãos de *G. mellonella* e que o processo de patogênese poderia resultar da falta de ação de inibidores no hospedeiro para as enzimas do patógeno.

No fungo *Beauveria bassiana*, várias substâncias tóxicas a insetos foram isoladas e identificadas, como oosperina (VINING et alii, 1962), proteases (KŮČERA & SAMŠIŇÁKOVÁ, 1968), beauvericina (HAMIL et alii, 1969) e bassianolide (SUZUKI et alii 1977 e MURAKOSHI et alii, 1978). Entretanto, faltam evidências convincentes de que essas toxinas produzidas são a causa da mortalidade do inseto, durante o processo de infecção pelo fungo. Assim, experimentos realizados utilizando beauvericina em *Bombyx mori* (KANAOA et alii, 1978) , e *Heliothis zea* (CHAMPLIN & GRULA, 1979), não mostraram haver efeitos letais por administração oral ou por injeções.

Outras toxinas produzidas por diversos fungos entomopatogênicos podem ser encontradas nas revisões e artigos de BONVENTRE et alii (1967), YENDOL et alii (1968) ; PRASERTPHON & TANADA (1969); LYSENKO & KŮČERA (1971); ROBERTS & YENDOL (1971); SOMERVILLE (1973); WASTI & HARTMANN (1978); CLAYDON (1979); ROBERTS (1981), entre outros.

2.3. Fatores físicos que afetam a patogênese

Os principais fatores que influem na germinação , esporulação e virulência de fungos entomopatogênicos são temperatura, umidade e luz (LATCH, 1965).

O desenvolvimento da micose pode ser retardado quando o entomopatógeno está sujeito à temperatura abaixo do ótimo, sem contudo afetar necessariamente a mortalidade (FERRON, 1967; ZACHARUCK & TINLINE, 1968; ROBERTS, 1970). Assim, a temperatura adequada para o desenvolvimento do fungo não é necessariamente a mesma para o desenvolvimento da doença. Entretanto, a influência da temperatura no hospedeiro deve ser levada em consideração, pois a redução dos períodos entre as mudas resultantes da alta temperatura pode diminuir a duração do estadio, impedindo assim a penetração do fungo através do integumento (FARGUES, 1972).

A água é essencial para a germinação dos esporos dos fungos e alta umidade atmosférica favorece o desenvolvimento da epizootia.

Várias informações permitem distinguir entre o papel da umidade atmosférica durante o processo de infecção e os vários fenômenos da epizootia. O desenvolvimento do fungo no hospedeiro e posterior esporulação estão associados com alta umidade, perto do ponto de saturação. Sob essas condições, a multiplicação do inóculo resulta em rápida contaminação de insetos sadios, favorecendo o desenvolvimento epizootico da micose (FERRON, 1978). Entretanto, a infecção do inseto pode ser obtida independentemente da umidade ambiental , pois o microclima na vizinhança do hospedeiro permite a ger-

minação do esporo e penetração, mesmo que a atmosfera seja praticamente seca, como reportaram vários autores (MASERA , 1957; VEEN, 1966; FERRON, 1967; DIOMANDÉ, 1969; ROBERTS & CAMPBELL, 1977; FARGUES & REMAUDIERE, 1977).

A luz também afeta a esporulação do fungo após a morte do hospedeiro, dificultando o controle por entomopatógenos (CHENG & CHEN, 1962; VEEN, 1968; MATTA & OLIVEIRA , 1978), em parte devido ao espectro ultravioleta da luz solar que pode inviabilizar os esporos, como reportaram MÜLLER-KÖGLER (1967) e MADELIN (1968).

As condições ambientais tem grande influência sobre os entomopatógenos e sendo essas adversas, o controle microbiológico torna-se prejudicado, o que justifica os esforços de vários pesquisadores nos objetivos de selecionar , induzir e melhorar linhagens de patógenos que apresentem características úteis para o êxito de seus empregos no campo , onde encontrarão certamente ambiente hostil ao seu pleno desenvolvimento e ação controladora de populações de insetos pragas.

2.4. Alguns aspectos biológicos de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859

O inseto *Rhodnius prolixus*, vulgarmente conhecido como barbeiro, pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae, sub-família Triatominae e constitui-se em um dos vetores do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas no homem.

A extensa literatura sobre *Rhodnius prolixus* e

doença de Chagas, torna quase inexequível uma revisão de todos os aspectos. Desse modo, abordar-se-ão algumas características gerais da biologia e do controle sobre *Rhodnius prolixus*, sendo que revisões mais abrangentes podem ser encontradas em BUXTON (1930), HARRINGTON (1960), FRIEND et alii (1965), LENT & JURBERG (1969), SHERLOCK (1979), ZELEDÓN & RABINOVICH (1981).

Segundo MARINKELLE (1968) e CARCAVALO (1976), *Rhodnius prolixus* é o principal vetor na Colômbia e Venezuela, e muito importante em outros países da América Central e Norte da América do Sul. No Brasil, a sua importância ainda não é grande, entretanto essa pode aumentar com o desbravamento da região amazônica, onde a espécie foi assinalada, conforme LENT (1962) e ZELEDÓN (1972). TAVARES (1971) já verificou sua presença em Mira Estrela no Estado de São Paulo.

PERLOWAGORA - SZUMLEWIECZ (1976), cita que em laboratório, a duração mínima e máxima em dias, da fase do ovo é de (11 - 24) e para ninfas: 1ª estadio (11 - 50); 2ª estadio (10 - 30); 3ª estadio (10 - 50); 4ª estadio (30 - 40); 5ª estadio (20 - 30), sendo esses valores, nas condições artificiais consideradas ótimas (25°C e 70% de U.R., segundo CLARCK, 1935). Todas as fases ninfais e ambos os sexos desse inseto são hematófagos obrigatórios, e ninfas de 3ª e 4ª estadio podem suportar jejum por até 7 meses, como assinalam PIÑERO & TORREALBA (1977). Só com alimentação sanguínea as cinco fases ninfais podem passar aos estádios seguintes.

WIGGLESWORTH (1967) descreveu que se a ninfa de *Rhodnius* recebe pequena quantidade de alimento, não sofrerá muda. Na verdade, pode ser dada uma sucessão de pequenas refeições, e mesmo que o estômago esteja sempre com alimento,

a muda não ocorrerá. Parece que é o mecanismo de distensão abdominal que promove um estímulo nervoso para o cérebro do inseto, necessário para que ocorra a ativação de células neurosscretórias. O hormônio responsável pela muda, produzido no corpus alatum na cabeça é chamado hormônio juvenilizante. Na ninfa de 5º estadio, o hormônio não mais existe e por isso há transformação para adulto. Toda alimentação sanguínea, mesmo que incompleta, é seguida de eliminação de fezes, quando então o *T. cruzi* pode ser passado a novo hospedeiro em repetidas oportunidades.

WIGGLESWORTH (1933 e 1934), descreveu pela primeira vez a cutícula larval de *R. prolixus* e ela consiste principalmente de epicutícula e endocutícula, estrutura também confirmada por HACKMAN (1975) e HILLERTON (1978).

WIGGLESWORTH (1967), relata que fundamentalmente a epicutícula é constituída de cuticulin (lipo-proteica), cêra (composta de uma mistura de hidrocarbonetos de cadeias longas, ester, ácidos carboxílicos, álcoois, esterres, triglicérides e fosfolípidios) e cimento. A endocutícula constitui-se de um complexo formado entre quitina e proteínas. ANDERSEN (1979) assinala entretanto, que a composição química de cutícula é variável entre os vários estadios de desenvolvimento e mesmo entre várias partes do corpo. Maiores detalhes da cutícula de *R. prolixus* podem ser encontrados nas revisões e artigos de WIGGLESWORTH (1957), BENNET-CLARK (1962, 1963 e 1971), BECKEL & FRIEND (1964), REYNOLDS (1975) e HACKMAN (1982).

As medidas de controle contra vetores da doença de Chagas de um modo geral, se faz com inseticidas químicos, tais como Hexachlorociclohexano (BHC), Dieldrin, Rhodiatox e

Gammexane, reportado por vários autores (FREITAS, 1950; DIAS & SILVA PINTO, 1952; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1954 e 1955).

Experiências em laboratórios para o controle biológico desses vetores não alcançaram resultados promissores, embora poucos autores se empenharam nessa linha, como assinala KINIPLING (1964). Entre os escassos estudos, encontram-se a utilização de indução de esterilidade em machos, realizado por PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & CORREIA (1972) e o emprego de microhimenópteros dos gêneros *Teleonomus* e *Coencyrtus*, parasitas de ovos de *Rhodnius prolixus*, reportados por PIÑERO (1976); FELICIANGELI & RABINOVICH (1977).

O emprego de fungos entomopatogênicos para verificar susceptibilidade de vários triatomíneos em laboratório tem sido objeto de poucos estudos e nem sempre bem conduzidos no que concerne às informações referentes ao patógeno, como: viabilidade e quantidade de conídios, linhagem empregada, temperatura e umidade relativa do ambiente do experimento e métodos estatísticos adequados para avaliar a virulência.

DIAS & LEÃO (1967) utilizaram *Beauveria bassiana* para infectar *Triatoma infestans*, *Triatoma vitticeps* e *Panstrongylus megistus*, mas não observaram mortalidade significativa em relação ao controle.

MOURA COSTA (1975 e 1978) assinalou pela primeira vez que *Metarhizium anisopliae* é capaz de infectar *Rhodnius prolixus*, sendo que MESSIAS et alii (1980) observaram os efeitos da umidade relativa e de diferentes linhagens deste fungo neste hospedeiro, mostrando que 100% de mortalidade foi alcançada após 5-8 dias em condições de alta umidade (97-100% de U.R.). SHERLOCK & GUITTON (1982) mostraram que *M. anisopliae* quando utilizado em suspensão aquosa apresenta

baixa infectividade para ninfas e adultos de *Triatoma brasiliensis* e *Rhodnius neglectus*. Os autores observaram que se os esporos do fungo fossem mantidos em meio de arroz cozido junto com exemplares de *T. infestans* e *T. brasiliensis*, 80% dos triatomíneos apresentavam-se infectados. Exemplares mortos de *T. infestans* pelo fungo, foram colocados juntos a insetos sadios de *T. infestans* e *T. brasiliensis* e esses foram infectados por *M. anisopliae* em sua grande maioria.

SILVA et alii (1983); SILVA & MESSIAS (1984a, b) , utilizaram duas linhagens de *M. anisopliae*, mutantes e revertentes para exoenzimas amilase, lipase e protease e verificaram que *R. prolixus* expostos a conídios em solução salina , foram infectados e mortos, sendo a LD₅₀ e LT₅₀ estimadas pelo método de probit.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas do fungo

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* utilizadas neste trabalho são designadas de E₉ e V₁₄. A linhagem E₉ foi isolada de insetos adultos de *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae) coletados no Estado do Espírito Santo e que nos foi gentilmente enviada pelo Dr. José Aires Ventura (ENCAPA). A linhagem V₁₄ de origem americana, remetida pelo Dr. Donald W. Roberts (Boyce Thompson, Cornell University - USA), foi isolada de *Conoderus* sp. (Coleoptera: Elateridae).

3.2. Inseto usado nos bioensaios

Ninfas de 3º estadio de *Rhodnius prolixus* em regime de fome, foram obtidas na SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) de Moji-Guaçu-SP, graças à colaboração do Sr. Antenor Nascimento Ferraz Filho. As ninfas até alcançarem o 3º estadio, foram alimentadas com sangue de galinha.

3.3. Meios de Cultura e soluções usadas

3.3.1. Meio Mínimo Sólido (MM) (PONTECORVO et alii, 1953)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
FeSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000,0 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1 N.

3.3.2. Meio Completo (MC) (PONTECORVO et alii, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Acrescentou-se ao meio mínimo:

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

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% ou HCl 1 N.

3.3.3. Meio Mínimo Líquido (PONTECORVO et alii ,
1953)

Preparado segundo o item 3.3.1., não sendo adicionado ágar.

3.3.4. Meio para atividade amilolítica

Ao meio mínimo preparado segundo o item 3.3.1. foi adicionado 0,2% de amido solúvel (Reagem, P.A.) O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4% ou HCl 1 N.

3.3.5. Meio para atividade lipolítica (HANKIN &
ANAGNOSTAKIS, 1975)

Peptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
CaCl ₂	0,1 g
Ágar	20,0 g

O pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4% ou HCl 1 N. Adicionou-se ao meio de cultura, tween 20, esterilizado numa concentração de 1%, no momento do uso.

3.3.6. Meio para atividade proteolítica

Ao meio mínimo preparado segundo o item 3.3.1. e pH ajustado para 6,0, acrescentou-se uma solução de gelatina a 4% do meio no momento do uso.

3.3.7. Solução de vitaminas

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

A solução foi parcialmente esterilizada em banho-maria a 100°C por 15 minutos e guardada em frasco escuro no refrigerador a 4°C.

3.3.8. Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras

Ácido nucleico de leveduras: 2 gramas em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico.

Ácido nucleico de leveduras: 2 gramas em 15 ml de solução normal de hidróxido de sódio.

Ambas as soluções foram aquecidas a 100°C por 20

minutos. Em seguida elas foram misturadas, e o pH foi ajustado para 6,0, filtrando-se a seguir. O volume completado a 40,0 ml e a preparação foi conservada em refrigerador a 4°C sob clorofórmio.

3.3.9. Solução de gelatina (8%)

Preparou-se a solução dissolvendo-se 8 g de gelatina em pó em 100 ml de água destilada, autoclavando-se em seguida e esta foi mantida à temperatura ambiente.

3.3.10. Solução saturada de sulfato de amônio

Adicionou-se sulfato de amônio (Reagem P.A.) em 500 ml de água destilada até a saturação, à temperatura ambiente.

3.3.11. Solução saturada de sulfato de potássio

Adicionou-se sulfato de potássio (Reagem, P.A.) em 500 ml de água destilada até a saturação, à temperatura ambiente.

3.3.12. Solução de iodo (1%)

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

3.3.13. Solução de Hipoclorito de sódio 2,5%

Hipoclorito de sódio (5%)	5,0 ml
Água destilada esterilizada	5,0 ml

3.3.14. Solução salina (0,85%)

Uma solução de cloreto de sódio 0,85% foi obtida , dissolvendo-se o sal em água destilada. Foram colocados 10 ml em frascos e a seguir autoclavados.

3.3.15. Solução de tween 80 (0,1%)

Adicionou-se 0,1 ml de tween 80 em 99,9 ml de água destilada. A solução de tween foi distribuída em quantidades iguais de 2,5 ml por frasco e autoclavou-se em seguida.

3.3.16. Solução de albumina (5%)

Adicionou-se 5,0 ml de clara de ovo em 100 ml de água destilada. A solução foi conservada no refrigerador, em frasco escuro.

3.3.17. Soluções de álcool etílico

As soluções foram preparadas nas concentrações de 50, 70 e 95%. As diluições do álcool foram realizadas com água destilada.

3.3.18. Solução fixadora

Preparou-se a solução com uma mistura de álcool absoluto, ácido acético glacial e ácido láctico, na proporção de 6:1:1, respectivamente.

3.3.19. Solução de Giemsa

Dissolveu 1 g de Giemsa em 54 ml de glicerina a quente e após o esfriamento, misturou-se com 84 ml de metanol, filtrou-se e a solução foi mantida à temperatura ambiente.

3.3.20. Tampão fosfato pH 6,9

KH_2PO_4	0,60 g
--------------------------	--------

Na_2HPO_4	2,80 g
---------------------------	--------

Água destilada	1000,0 ml
----------------	-----------

A solução foi conservada em refrigerador.

3.3.21. Tampão fosfato pH 6,0

Solução A

NaH_2PO_4	27,8 g
---------------------------	--------

Água destilada	1000,0 ml
----------------	-----------

Solução B

Na_2HPO_4	28,5 g
---------------------------	--------

Água destilada	1000,0 ml
----------------	-----------

A obtenção do tampão foi feita, adicionando-se 10 ml da solução B em 50 ml da solução A e completando-se o volume para 100 ml com água destilada. As soluções A e B foram conservadas em refrigerador e o tampão foi preparado no momento do uso.

3.3.22. Tampão tris-citrado pH 8,6

Trizma base	9,21 g
Ácido cítrico	1,05 g
Água destilada	1000,00 ml

3.3.23. Tampão borato pH 8,0

Ácido bórico	18,55 g
Hidróxido de sódio	2,40 g
Água destilada	1000,00 ml

3.3.24. Gel de amido

Amido hidrolizado Connaught	38,0 g
Tampão tris-citrado pH 8,6	300,0 ml

3.3.25. Corante Fast-Garnet

Fast-Garnet	0,4 g
Água destilada	10,0 ml

3.3.26. Corante α -naftilacetato

α -naftilacetato	0,1 g
Acetona	5,0 ml
Água destilada	5,0 ml

3.3.27. Solução de coloração de esterases

Fast Garnet	1,0 ml
α -naftilacetato	1,5 ml
Propanol	5,0 ml
Tampão fosfato pH 6,0	100,0 ml

3.4. Esterilização e temperatura de incubação

Os meios de culturas, frascos de bioensaios e algumas soluções foram autoclavadas a 120°C a pressão de 1 atmosfera, durante 15 minutos.

A temperatura de incubação em todos os experimentos foi de 28°C.

3.5. Curvas de sobrevivência à luz ultravioleta

Com a finalidade de determinar qual dose de radiação ultravioleta era conveniente para produzir 1 a 5% de sobreviventes, para posterior indução de mutação, foram feitas as curvas de sobrevivência das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*.

Conídios dos fungos em estudo previamente desenvolvidos em MC durante 7 dias, foram transferidos separadamente para solução de tween 80, agitados e seu número foi estimado através da contagem com hematímetro no microscópio. A seguir, a suspensão de conídios foi diluída em solução salina (1:10), colocada em placa de Petri esterilizada e, efetuou-se a irradiação, mantendo-se a suspensão irradiada a uma distância de 13 cm da fonte de luz ultravioleta 2.537 Å (intensidade aferida de 100 µw/cm²), em ambiente claro, em diferentes tempos. Após cada irradiação e diluições apropriadas, semeou-se 0,1 ml por placa com meio completo. Após 5 dias de incubação a 28°C, as placas foram observadas, e a porcentagem de sobreviventes foi calculada comparando-se com o número de colônias provenientes da amostra não irradiada.

3.6. Avaliação da produção de exoenzimas

A produção de enzimas extracelulares amilase, lipase e protease de colônias isoladas do fungo *M. anisopliae*, foi avaliada semi-quantitativamente através do uso de meio sólido em placas de Petri, conforme a técnica de HANKIN &

ANAGNOSTAKIS (1975), com modificações na composição dos meios para amilase e protease.

Para obtenção de colônias isoladas das linhagens em estudo, preparou-se uma suspensão de conídios em uma solução de tween 80. Esta solução favorece a quebra da cadeia de conídios e assim, diluições apropriadas puderam ser feitas, pipetando-se 1 ml da suspensão em 9 ml de solução salina. Aliquotas de 0,1 ml da suspensão de conídios foi semeada em placas de MC, com auxílio de uma alça de Drigalsky e essas, foram incubadas a 28°C por 5 dias. Após este tempo transferiu-se estas colônias individualmente, inoculando-as, por picada em 4 pontos equidistantes, em placas de Petri com 15 ml de meio de cultura específico para cada tipo de atividade enzimática. Após 5 dias de incubação do fungo a 28°C, a presença de uma halo ao redor da colônia indicava atividade enzimática e a relação entre o diâmetro deste halo (incluindo a colônia) e o diâmetro da colônia foi denominada de índice enzimático. Tal relação é similar à utilizada por FOSTER & DAVIS (1949); SILVA (1977); ROSATO et alii (1981).

3.6.1. Atividade amilolítica

A habilidade para degradar amido foi usada como critério para indicar produção da amilase. Utilizou-se o meio para atividade amilolítica, de acordo com a técnica descrita no item 3.6. Após a incubação, 10 ml de uma solução de iodo a 1% foram adicionadas na placa de Petri. Colônias que apresentavam atividade amilolítica eram circundadas por um

halo amarelo contrastante com a cor azul do meio de cultura.

3.6.2. Atividade lipolítica

O substrato tween 20 (Sorbitan monolaurato) adicionado ao meio de cultura para atividade lipolítica permitiu observar a produção de lipase. As colônias foram inoculadas nas placas de Petri com meio, conforme descrito no item 3.6. Após a incubação, a atividade de exoenzimas lipolíticas foi observada pela formação de um halo transparente em volta da colônia, devido a formação de cristais de sais de cálcio do ácido laurico liberados pela enzima. Para melhor visualização do halo, as placas foram colocadas em refrigerador a 4°C durante 12 horas.

3.6.3. Atividade proteolítica

Conforme a técnica descrita no item 3.6. procedeu-se à inoculação de colônias em placas de Petri contendo meio para atividade proteolítica. Após o tempo de incubação do fungo a 28°C, adicionou-se solução saturada de sulfato de amônio até a submersão das colônias na placa. A presença de um halo transparente em volta da colônia, indicou atividade proteolítica.

3.7. Obtenção de mutantes exoenzimáticos

As linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* foram submetidas à radiação ultravioleta, conforme descrito no item 3.5. A dose empregada foi a que permitiu cerca de 5% de sobreviventes, calculada através do método citado por BARACHO & ROSIM (1977). Após a irradiação, colônias isoladas obtidas de acordo com a técnica proposta no item 3.6., foram ensaiadas simultaneamente em meios específicos para atividades de exoenzimas amilase, lipase e protease, de acordo com os processos descritos nos itens 3.6.1., 3.6.2. e 3.6.3. respectivamente. As colônias que apresentaram Índices Enzimáticos iguais a um ou com valores acentuadamente inferiores àqueles obtidos com as linhagens selvagens, foram transferidas para tubos inclinados contendo meio completo e estocados para posterior estudos. Os possíveis mutantes para não produção de exoenzimas foram testados novamente em placas de Petri com meios contendo substratos específicos e somente os tipos estáveis foram utilizados posteriormente para análise de bioensaio.

3.8. Obtenção de revertentes

Devido a dificuldades de se ensaiar grande número de conídios para o teste de reversão espontânea dos mutantes exoenzimáticos, utilizou-se para esse fim radiação ultravioleta, na dose que propiciasse cerca de 95% de mortalidade dos conídios.

As técnicas de irradiação e ensaios para atividades enzimáticas foram referidas nos itens 3.5., 3.6., 3.6.1., 3.6.2. e 3.6.3.

As colônias mutantes ensaiadas que apresentaram valores de Índices Enzimáticos diferentes de um ou com valores semelhantes aos tipos selvagens, foram classificados como revertentes.

3.9. Caracterização dos padrões eletroforéticos de α -esterases das linhagens de *M. anisopliae*.

Utilizou-se gel de amido, em corrida horizontal conforme BUSCH & HUETTEL (1972).

3.9.1. Preparação do gel

Dissolveu-se 38 g de amido hidrolisado Connaught em 300 ml de tampão tris-citrato. Essa solução foi aquecida em bico de Bunsen, sendo agitada seguidamente até a fervura e o aparecimento de bolhas de ar. Em seguida, submeteu-se o gel assim preparado a um sistema de vácuo para remoção do ar e proteger contra a formação de bolhas. A seguir, o gel foi vertido em uma placa de acrílico de 21,5 x 190 x 2 cm. Após o resfriamento e solidificação em temperatura ambiente, o gel foi recoberto por um plástico fino para evitar evaporação. Cerca de uma hora antes da aplicação das amostras, o

gel era colocado em refrigerador, para evitar desnaturação das isoenzimas.

3.9.2. Preparo e aplicação das amostras

A técnica utilizada foi descrita por SOUZA et alii (1977) e De CONTI et alii (1980).

O micélio desenvolvido durante 7 dias a 28°C em tubos de ensaio com 5 ml de MM líquido, foi homogeneizado através de trituração. O micélio foi triturado em suspensão de água destilada a 4°C, utilizando-se um triturador com ponta de polietileno. O homogeneizado foi absorvido por pedaços de papel (4 x 9 mm) Whatmann nº 3. O gel foi então perfurado transversalmente, com auxílio de régua e espátula, a intervalos regulares (2 mm) e a uma distância sempre constante da ponte catódica (5 cm). Cada papel com o homogeneizado do micélio, foi inserido verticalmente em uma das fendas do gel.

3.9.3. Condições da eletroforese

As eletroforeses foram realizadas usando-se uma fonte (modelo LIFE - Japan). Para a corrida dos géis utilizou-se tampão borato pH 8,0. Esta foi realizada à temperatura de 4°C e uma corrente de 2,5 mA/cm foi mantida com a migração desejada de 12 cm alcançada em 6 horas.

3.9.4. Corte, incubação, coloração e fixação do gel

O corte do gel foi realizado por um fio de aço tensionado montado em arco de serra. A fatia do gel foi colocada em um recipiente plástico (19 x 9,5 x 2,8 cm) contendo a solução de coloração de esterases. A incubação se fez em estufa à 37°C, por um período variável, dependendo da nitidez do aparecimento das bandas. A fixação foi feita após a remoção do corante com uma mistura de água, metanol e ácido acético numa proporção de 5:5:1 e em seguida analisado.

3.10. Caracterização citológica dos conídios

O comprimento dos conídios e o número de núcleos por conídio foram determinados de acordo com a técnica de ROBINOW & CATEN (1969), com modificações propostas por PAES DE BARROS (1977).

As linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*, seus mutantes e revertentes foram desenvolvidos em placas de Petri contendo MM e incubados a 28°C durante sete dias. Depois os conídios foram coletados em lamínulas com uma gota de solução de albumina a 5%. Após secagem em condições ambientais os conídios foram submetidos à solução fixadora por 10 minutos. Em seguida fez-se hidratação em soluções de álcool (95, 70 e 50%) e água destilada por um minuto em cada fase. Logo após o material sofreu hidrólise em HCl durante 5 minutos, à tem-

peratura ambiente e durante 6 minutos à temperatura de 60°C em banho-maria. A seguir o material foi lavado cinco vezes em tampão fosfato pH 6,9 e corado por 15 minutos em Giemsa (10 ml de tampão fosfato pH 6,9 para 18 gotas de solução de Giemsa). O comprimento dos conídios foi determinado com o auxílio de uma ocular micrométrica pela análise de 50 conídios. O número de núcleos por conídio fez-se pelo exame de 500 conídios em diferentes campos microscópicos.

3.11. Germinação de conídios

O método para estimar a porcentagem de germinação dos conídios dos isolados utilizados nos bioensaios foi feito conforme AL-AIDROOS & ROBERTS (1978). Os conídios crescidos em placas de Petri com MC por 7 dias foram coletados, suspensos em solução de tween 80, agitados e transferidos para solução salina. Aliquotas de 0,1 ml foram semeados em placas de Petri com MC, que foram a seguir incubados a 28°C, durante 18 horas. Através do exame de placas ao microscópio, a germinação dos conídios foi estimada pela observação de 500 conídios. Tal verificação foi realizada 24 horas antes da utilização de cada isolado em bioensaio.

3.12. Bioensaio

As linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*, assim como

seus mutantes e revertentes, foram ensaiados para virulência em ninfas de 3º estadio de *Rhodnius prolixus* em regime de fome. Esse inseto testador, é um dos vetores da doença de Chagas e foi escolhido devido a facilidade de obtenção junto à SUCEN, Moji-Guaçu (SP), uniformidade de estadio das ninfas e não ocorrência de mortalidade no controle, nas condições dos experimentos.

3.12.1. Produção de conídios

Cada isolado a ser ensaiado, foi desenvolvido em placas com MC, durante 7 dias. Os conídios foram coletados através de uma alça de platina e transferidos para solução de tween 80, agitados e seu número foi estimado com hemátimetro em microscópio. A seguir, 1 ml dessa suspensão de conídios foi transferida para 9 ml de solução salina, obtendo-se, dessa forma diluições desejadas para as concentrações empregadas no bioensaio.

3.12.2. Preparação das ninfas de *Rhodnius prolixus* e inóculo do fungo

Ninfas de 3º estadio de *Rhodnius prolixus* em regime de fome durante 7 dias, foram colocadas em grupos de cinco em um frasco de polipropileno (5 x 6 cm) com papel de filtro na base da superfície interna, ambos esterilizados. Em

seguida, os frascos foram tampados com gase esterilizada . Antes da colocação das ninfas, alíquotas de 0,2 ml da suspensão de conídios, preparada como descrito no item 3.12.1., foram espalhadas uniformemente no papel de filtro. Os frascos contendo 5 ninfas cada, foram colocados em um recipiente de vidro (15 x 20 cm), conforme sugerem MESSIAS et alii (1980) e a umidade relativa (U.R.) foi mantida próxima a 97%, com a utilização de 150 ml de uma solução saturada de sulfato de potássio, conforme WEXLER & HASEGAWA (1954). A seguir, o conjunto (Figura 1) foi incubado a 28°C.

Para cada isolado ensaiado, 4 concentrações contendo diferentes números de conídios foram usadas e empregou-se 25 insetos por dose. A mortalidade foi avaliada diariamente, retirando-se os insetos mortos para evitar contaminação em outros. Para o grupo de insetos controle, procedeu-se da mesma forma, mas somente com 0,2 ml de solução salina no papel de filtro.



FIGURA 1 - Modelo usado para bioensaio de *M. anisopliae* em ninfas de *R. prolixus*.

3.12.3. Reisolamento do fungo

Para se ter maior segurança de que a mortalidade do inseto foi causada pela exposição ao fungo, cada ninfa morta foi colocada em um tubo de ensaio esterilizado e guardado a 4°C no refrigerador. Em seguida, procedeu-se ao reisolamento do patógeno, realizando-se a desinfecção do tegumento do inseto morto em solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, durante 3 minutos e em seguida era cortado e esmagado em uma placa de Petri com MC e incubação a 28°C, durante 7 dias.

3.12.4. Análise estatística da virulência dos isolados

Os resultados da virulência das linhagens selvagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae*, assim como seus mutantes e revertentes, foram avaliados em bioensaios conforme descritos nos itens 3.12., 3.12.1., 3.12.2. e expressos nas formas de LC_{50} e LT_{50} , calculados pelo método de Probit (FINNEY, 1971). Esses valores foram analisados quanto à hipótese de paralelismo entre as linhas de regressão, através do teste χ^2 , de acordo com critério adotado por BLISS (1935) e FINNEY (1971). A Potência Relativa da virulência dos mutantes e revertentes em relação ao padrão (controle), foi estimada de acordo com COCHRAN (1938), SCOSSIROLI (1962) e FINNEY (1971).

4. RESULTADOS

4.1. Sobrevivência à luz ultravioleta (UV)

Os dados referentes à sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* linhagens E₉ e V₁₄, submetidas à ação de várias doses de radiação ultravioleta estão expressos nas Tabelas 1 e 2, cujos valores permitiram construir curvas de sobrevivência as quais estão representadas graficamente na Figura 2.

Utilizando-se da metodologia citada por BARACHO & ROSIM (1977), obtém-se uma LD₉₅ em um tempo de 12,73 minutos para a linhagem E₉ e 13,26 minutos para a linhagem V₁₄ em condições usadas para a luz ultravioleta. Tais doses foram escolhidas posteriormente para obtenção de mutantes e revertentes.

TABELA 1 - Porcentagem de sobrevivência de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, linhagem E₉ após tratamentos com luz ultravioleta. (Média de 3 experimentos).

Tempo de irradiação (UV) em minutos	nº de conídios sobreviventes	Porcentagem de sobrevivência
0	220	100,00
3	140	63,63
6	59	26,81
9	17	7,72
12	13	5,90
15	1	0,45

TABELA 2 - Porcentagem de sobrevivência de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, linhagem V₁₄ após tratamentos com luz ultravioleta. (Média de 3 experimentos).

Tempo de irradiação (UV) em minutos	nº de conídios sobreviventes	Porcentagem de sobrevivência
0	96	100,00
3	51	53,12
6	32	33,33
9	15	15,62
12	8	8,33
15	0,66	0,68

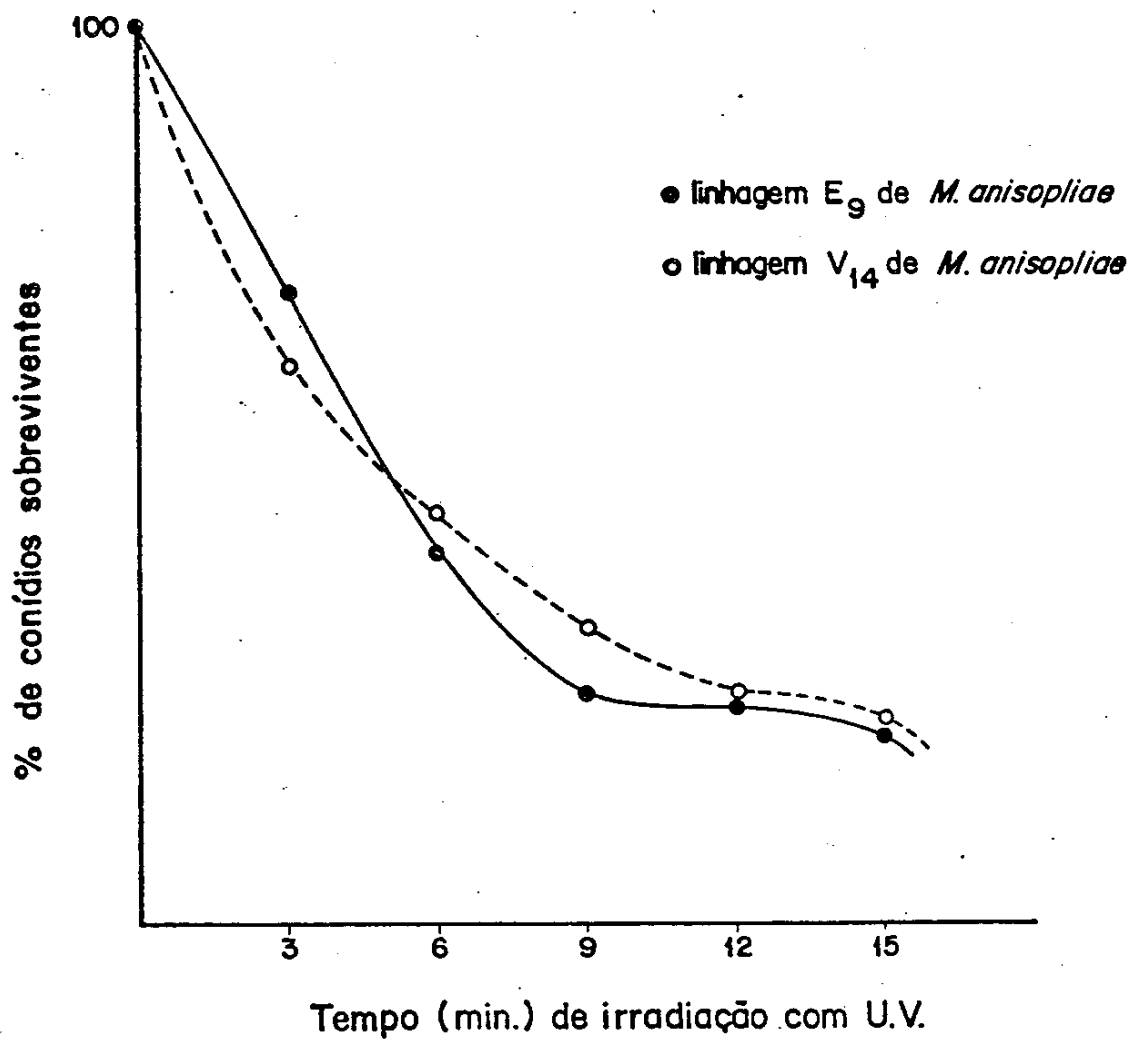


FIGURA 2 - Curvas de sobrevivência das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae*, sob ação de luz ultravioleta.

4.2. Produção de enzimas extracelulares nas linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae*

A produção de enzimas extracelulares (amilase, lipase e protease) foi avaliada semi-quantitativamente através da medida do tamanho do halo formado e colônia, relação essa denominada de índice enzimático. Os resultados de índices enzimáticos para as exoenzimas ensaiadas das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* estão na Tabela A.1. do Apêndice.

Os halos produzidos pela degradação de amido, tween 20 e gelatina, que são os substratos específicos para amilase, lipase e protease, podem ser observadas nas Figuras 2A, 3 e 4 respectivamente.

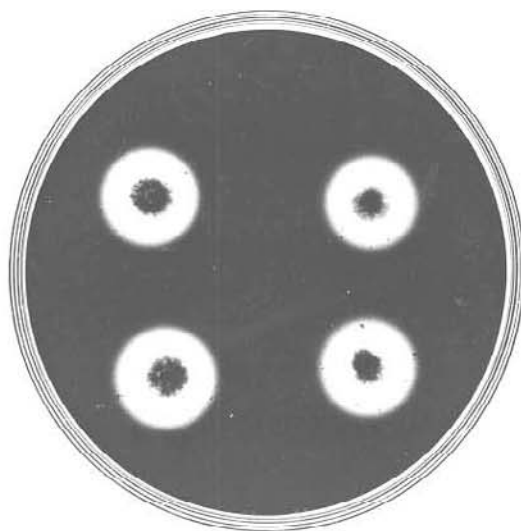


FIGURA 2A - Atividade amilolítica da linhagem E_9 de *M. anisopliae* detectada em meio contendo amido.



FIGURA 3 - Atividade lipolítica da linhagem E₉ de *M. anisopliae* detectada em meio contendo tween 20.

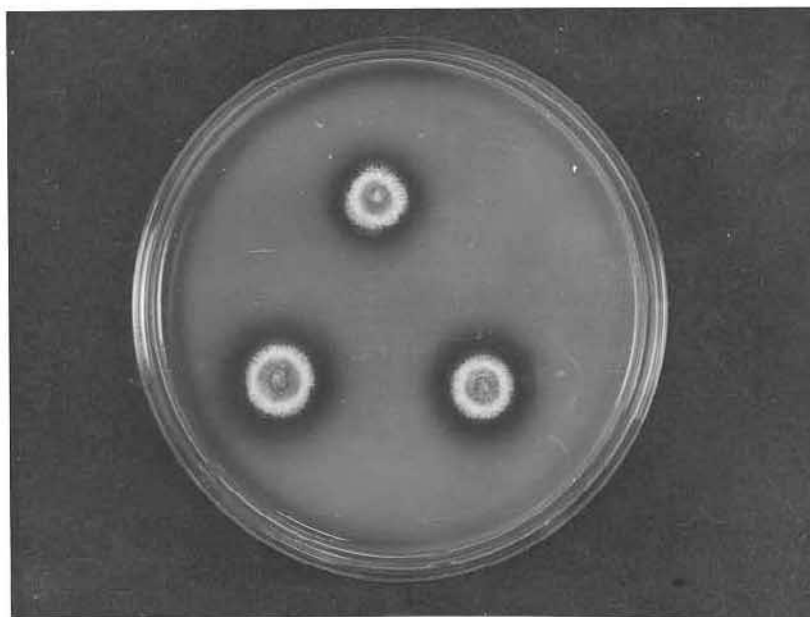


FIGURA 4 - Atividade proteolítica da linhagem E₉ de *M. anisopliae* detectada em meio contendo gelatina.

4.3. Obtenção de mutantes para não produção de exoenzimas

Suspensões de conídios das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* foram irradiadas com luz ultravioleta na dose que permitisse 5% de sobrevivência, conforme determinado no item 4.1., para obtenção de mutantes com não produção de exoenzimas. A seleção dos mutantes, foi baseada na ausência de formação de um halo em volta da colônia ou pela redução deste, como no caso de protease.

As figuras 5, 6 e 7 ilustram mutantes para amilase, lipase e protease e a Tabela 3 mostra o número de mutantes obtidos para as colônias ensaiadas.

Deve-se mencionar que outros aparentes mutantes foram obtidos, mas que não foram bem caracterizados ou não se mantiveram quando ensaiados em placas com meios contendo substratos específicos e somente um mutante de cada tipo, mais estável, foi analisado posteriormente em bioensaio.

TABELA 3 - Número de mutantes das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*, selecionados para não produção de exoenzimas amilase, lipase e protease.

Mutantes	Linhagens	
	E ₉	V ₁₄
Amilase ⁻	1 (800)*	1 (700)
Lipase ⁻	1 (400)	1 (500)
Protease ⁻	1 (650)	1 (800)

* O número entre parênteses, refere-se ao total de colônias ensaiadas.



FIGURA 5 - Mutante (seta) da linhagem E₉ de *M. anisopliae* para exoenzima amilase.



FIGURA 6 - Mutante (seta) da linhagem E₉ de *M. anisopliae* para exoenzima lipase.

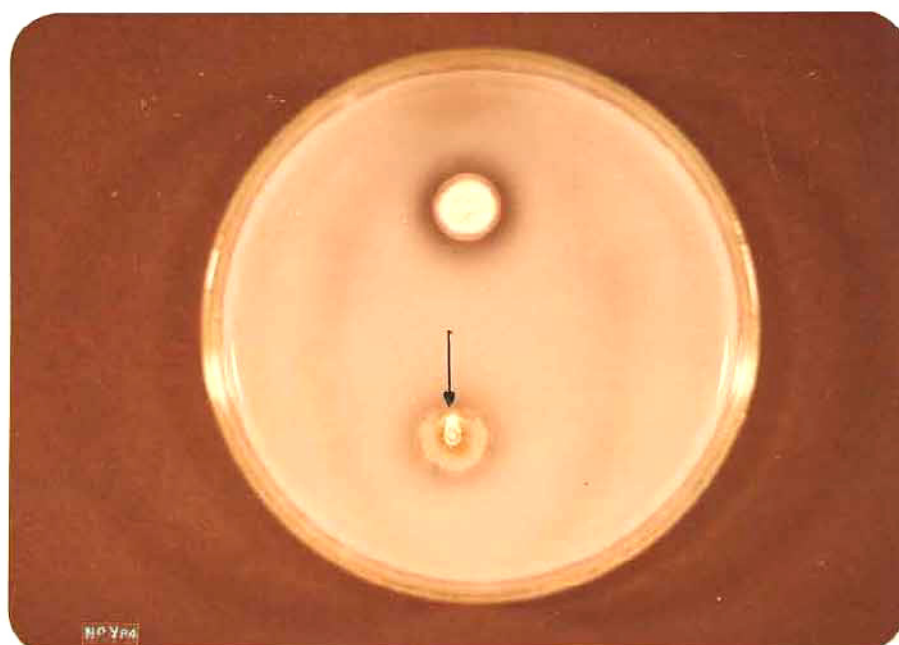


FIGURA 7 - Mutante (seta) da linhagem E₉ de *M. anisopliae* para exoenzima protease.

4.4. Obtenção de revertentes

Os mutantes exoenzimáticos das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*, quando irradiados novamente com luz ultravioleta, sofreram reversão para produção de enzimas extracelulares. A Tabela 4 mostra a frequência de revertentes para cada mutante e as Figuras 8, 9 e 10 ilustram cada tipo de revertente.

TABELA 4 - Revertentes das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* selecionados para produção de exoenzimas amilase, lipase e protease.

Revertentes	Linhagens	
	E ₉	V ₁₄
Amilase ⁺	1 (500)*	1 (600)
Lipase ⁺	1 (300)	1 (400)
Protease ⁺	1 (700)	1 (600)

* O número entre parênteses, refere-se ao total de colônias ensaiadas.

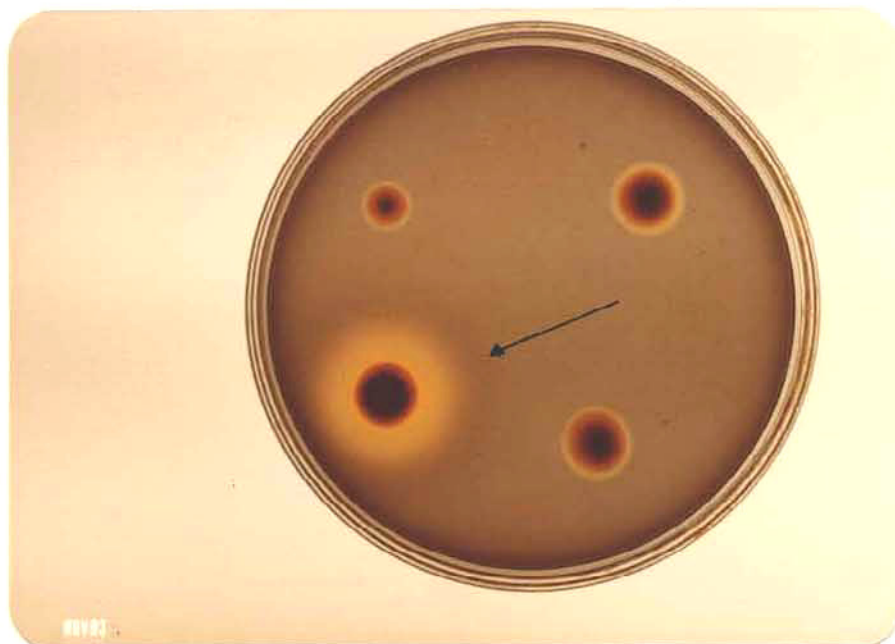


FIGURA 8 - Revertente (seta) da linhagem E₉ de *M. anisopliae* para amilase.

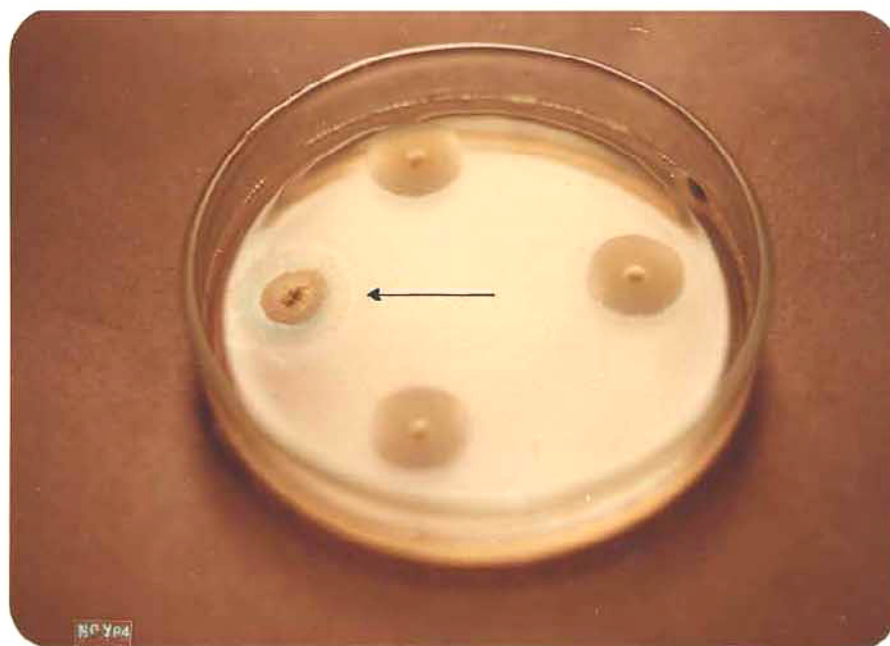


FIGURA 9 - Revertente (seta) da linhagem E₉ de *M. anisopliae* para lipase.

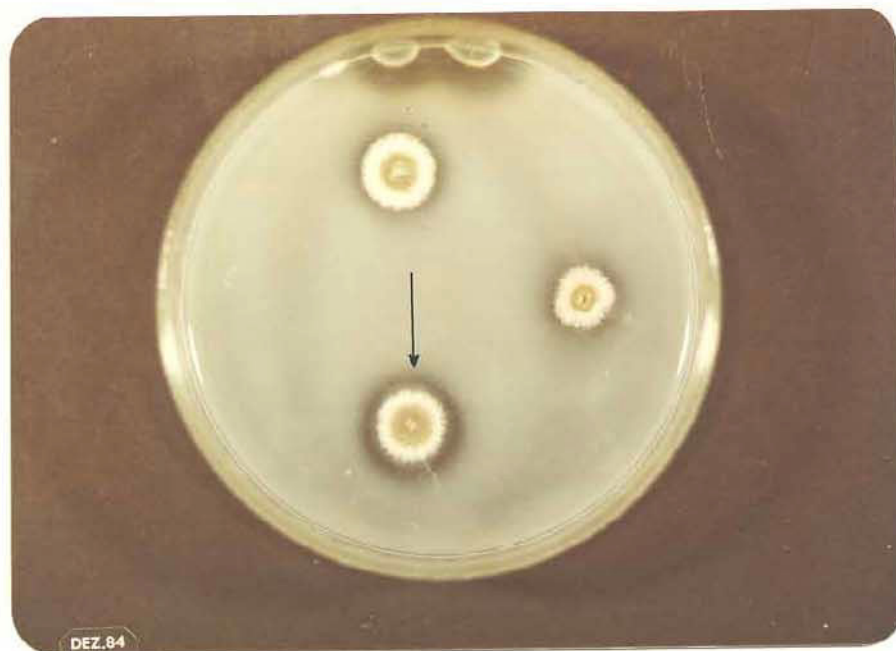


FIGURA 10 - Revertente (seta) da linhagem E₉ de *M. anisopliae* para protease.

A Figura 11 mostra esquematicamente os passos utilizados para obtenção de mutantes e revertentes para exoenzimas amilase, lipase e protease e a Tabela 5 apresenta a simbologia usada para caracterizá-los.

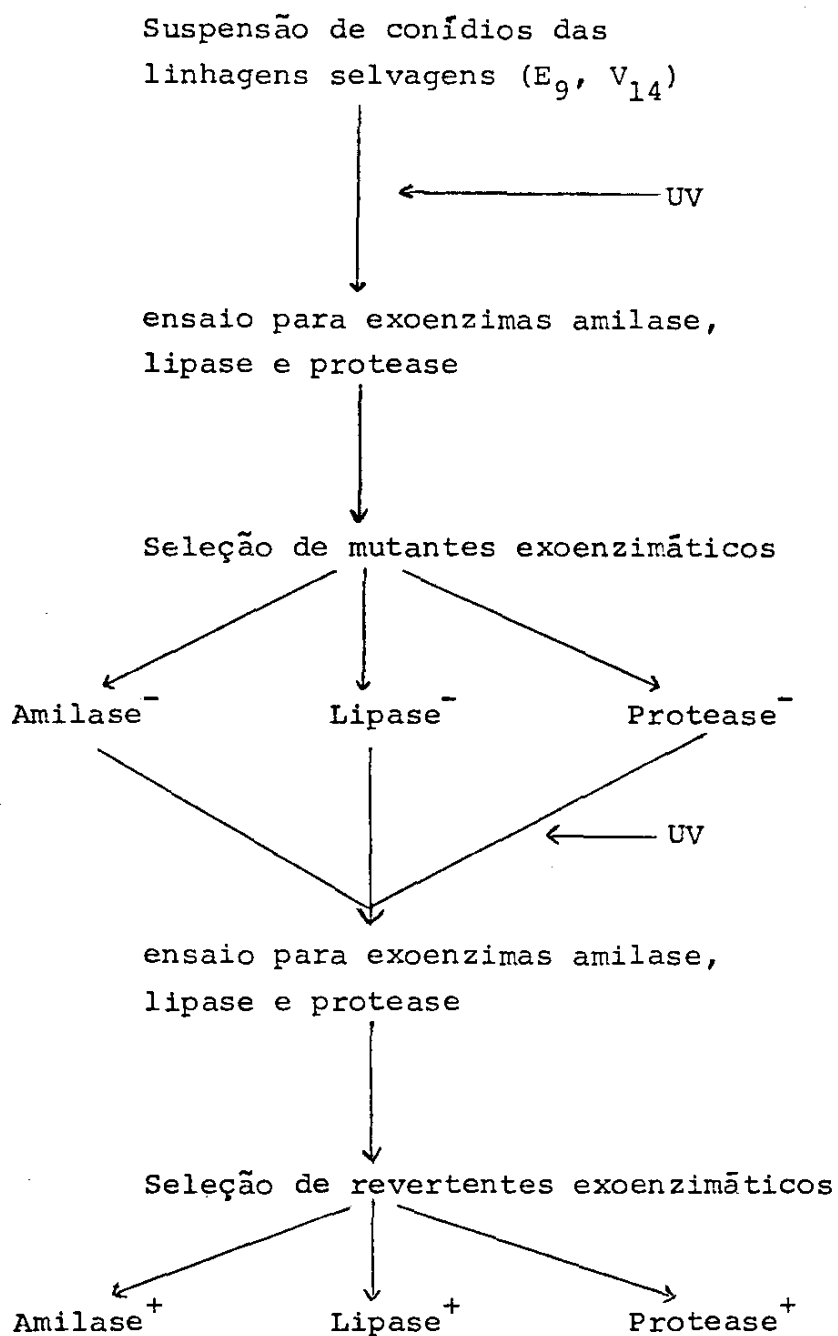


FIGURA 11 - Esquema para obtenção de mutantes e revertentes exoenzimáticos das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*

TABELA 5 - Simbologia dos mutantes e revertentes para exoenzimas de *M. anisopliae* obtidos por irradiação à luz ultravioleta.

Isolado selvagem irradiado	Índices enzimáticos alterados	*Simbologia dos Mutantes e Revertentes
E ₉	Amilase	E ₉ ami ⁻
	Normal**	E ₉ ami ⁺
	Lipase	E ₉ lip ⁻
	Normal	E ₉ lip ⁺
	Protease	E ₉ prt ⁻
	Normal	E ₉ prt ⁺
V ₁₄	Amilase	V ₁₄ ami ⁻
	Normal	V ₁₄ ami ⁺
	Lipase	V ₁₄ lip ⁻
	Normal	V ₁₄ lip ⁺
	Protease	V ₁₄ prt ⁻
	Normal	V ₁₄ prt ⁺

* O sinal (-) representa o mutante e (+) o revertente.

** O índice enzimático normal indica o restabelecimento do fenótipo selvagem para a exoenzima alterada no mutante.

Os valores de índices enzimáticos dos mutantes e revertentes, encontram-se nas Tabelas A.2, A.3 e A.4 do Apêndice. Pode-se verificar nelas que os mutantes e revertentes para a exoenzima protease em ambas linhagens, apresentam va-

lores de índices enzimáticos diferentes de um; sendo assim , foi feito a análise de variância, conforme PIMENTEL GOMES (1976), comparando os índices enzimáticos para protease. Os resultados da análise de variância, feita nos moldes de experimentos completamente casualizado, encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6 - Análise de variância dos dados apresentados para efeito do tratamento com raios ultravioleta sobre o Índice Enzimático para protease.

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	5	1,5447	0,3098	53,36**
Resíduo	54	0,3130	0,0057	
Total	59			

C.V. = 5,63%

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Pela observação da Tabela 6, verifica-se que houve um efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade devido às diferenças no Índice Enzimático para protease nos mutantes e revertentes das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*.

O estudo comparativo das médias do índice enzimático para protease, foi feito através do teste de Tukey, cujos resultados encontram-se na Tabela 7.

TABELA 7 - Comparação do índice enzimático para protease entre mutantes, revertentes e as linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*.

Linhagens	Médias de índices enzimáticos*
V ₁₄	1,57 a
V ₁₄ prt ⁺	1,46 a b
E ₉	1,41 b
E ₉ prt ⁺	1,38 b
V ₁₄ prt ⁻	1,18 c
E ₉ prt ⁻	1,10 c

* Valores seguidos da mesma letra não são diferentes entre si ao nível de 1% de probabilidade.

= d.m.s. = 0,12

Os mutantes E₉ prt⁻ e V₁₄prt⁻, embora não tenham índice enzimático igual a um, como observados para os mutantes E₉ lip⁻, E₉ ami⁻, V₁₄ lip⁻ e V₁₄ ami⁻, podem ser caracterizados pelos baixos valores de índices enzimáticos, que estatisticamente são significativos como mostra a Tabela 7. Os revertentes E₉ prt⁺ e V₁₄ prt⁺ não são diferentes estatisticamente às linhagens controle, em relação ao índice enzimático para protease, o que indica que o fenótipo para a exoenzima foi restabelecido.

Os revertentes E₉ ami⁺, E₉ lip⁺, V₁₄ ami⁺ e V₁₄ lip⁺, puderam ser discernidos dos mutantes, pois apresentam valores de índices enzimáticos para amilase e lipase, dife -

rentes de um, o que não ocorreram com os respectivos mutantes.

4.5. Caracterização isoenzimática para α -esterase das linhagens selvagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes

A Figura 12 ilustra esquematicamente os padrões eletroforéticos dos sistemas α -esterases das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes. É possível distinguir 5 bandas isoenzimáticas α -esterases para a linhagem E_9 e 3 bandas para a linhagem V_{14} , embora a 2a. e 3a. bandas não se mostrassem nitidamente separadas.

Em relação aos mutantes analisados, em ambas linhagens houve ausência de uma banda somente nos isolados lip^- .

Análise dos revertentes revelou que suas bandas não se alteraram em relação aos seus respectivos mutantes.

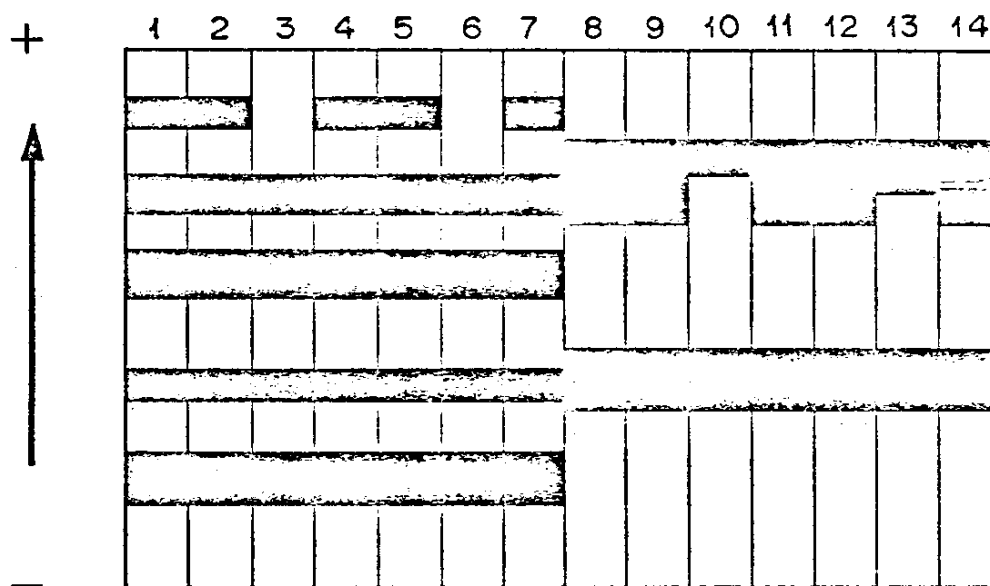


FIGURA 12 - Representação esquemática dos padrões de α -esterases do micélio das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisoplica* e de seus mutantes e revertentes.

- | | |
|-------------------|----------------------|
| 1. linhagem E_9 | 8. linhagem V_{14} |
| 2. E_9 ami^- | 9. V_{14} ami^- |
| 3. E_9 lip^- | 10. V_{14} lip^- |
| 4. E_9 prt^- | 11. V_{14} prt^- |
| 5. E_9 ami^+ | 12. V_{14} ami^+ |
| 6. E_9 lip^+ | 13. V_{14} lip^+ |
| 7. E_9 prt^+ | 14. V_{14} prt^+ |

4.6. Caracterização citológica das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes

4.6.1. Número de núcleos por conídio

As Tabelas 8 e 9 apresentam as porcentagens de conídios binucleados, que foram encontrados para as linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e nos mutantes e revertentes.

Para cada um dos isolados, calculou-se a proporção de conídios binucleados para cada grupo de 100 conídios examinados e esses resultados encontram-se nas Tabelas A.5 e A.6 do Apêndice. Os dados dessas Tabelas, depois de transformados em ângulo = arco-seno $\sqrt{\text{proporção}}$, (FISCHER & YATES, 1943), foram submetidos à análise de variância, cujos resultados se encontram nas Tabelas 10 e 11.

TABELA 8 - Porcentagem de conídios binucleados na linhagem E₉ de *M. anisopliae* e em seus mutantes e revertentes.

Isolados	Porcentagem de conídios binucleados
E ₉	4,8
E ₉ ami ⁻	5,0
E ₉ lip ⁻	4,6
E ₉ prt ⁻	4,8
E ₉ ami ⁺	4,2
E ₉ lip ⁺	4,0
E ₉ prt ⁺	4,6

TABELA 9 - Porcentagem de conídios binucleados na linhagem V₁₄ de *M. anisopliae* e em seus mutantes e revertentes.

Isolados	Porcentagem de conídios binucleados
V ₁₄	4,0
V ₁₄ ami ⁻	3,0
V ₁₄ lip ⁻	4,6
V ₁₄ prt ⁻	4,6
V ₁₄ ami ⁺	3,8
V ₁₄ lip ⁺	4,2
V ₁₄ prt ⁺	3,6

TABELA 10 - Análise de variância para os dados da Tabela 8 ,
transformados em ângulo = arco-seno $\sqrt{\text{proporção}}$.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isolados	6	6,67	1,11	0,15 N.S.
Resíduo	28	214,39	7,66	
Total	34	221,06		

N.S. - não significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 11 - Análise de variância para os dados da Tabela 9 ,
transformados em ângulo = arco-seno $\sqrt{\text{proporção}}$.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isolados	6	11,17	1,86	1,14 N.S.
Resíduo	28	45,67	1,63	
Total	34	56,84		

N.S. - não significativo ao nível de 1% de probabilidade

As análises de variância das Tabelas 10 e 11, permitem constatar que não houve diferença estatística signifi-

cativa entre a linhagem E_9 , seus mutantes e revertentes, o mesmo ocorrendo com a linhagem V_{14} de *M. anisopliae* em relação a proporção de conídios binucleados.

4.6.2. Comprimento de conídios

Mediu-se o comprimento de 50 conídios das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes e os resultados encontram-se nas Tabelas A.7 e A.8 do Apêndice. As análises de variância desses dados, estão representadas nas Tabelas 12 e 13.

TABELA 12 - Análise de variância dos comprimentos de conídios da linhagem E_9 de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isolados	6	0,77	0,13	1,12 N.S.
Resíduo	63	7,20	0,11	
Total	69	7,97		

N.S. - não significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 13 - Análise de variância dos comprimentos de conídios da linhagem V_{14} de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isolados	6	0,74	0,12	1,16 N.S.
Resíduo	63	6,66	0,11	
Total	69	7,40		

N.S. - não significativo ao nível de 1% de probabilidade

As análises de variância das Tabelas 12 e 13 revelaram que os comprimentos dos conídios das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes não são estatisticamente diferentes.

4.7. Germinação de conídios

As linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae*, seus mutantes e revertentes usados em bioensaios, foram ensaiados para germinação em MC, conforme descrito no item 3.11. e os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas A.9 e A.10 do Apêndice. Os dados dessas Tabelas, depois de transformados em ângulo = arco-seno $\sqrt{\text{taxa}}$, foram submetidos à análise de variân-

cia, cujos resultados se encontram nas Tabelas 14 e 15.

TABELA 14 - Análise de variância da taxa de germinação da linhagem E₉ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isolados	6	96,74	16,12	1,60 N.S.
Resíduo	28	281,96	10,07	
Total	34	378,70		

N.S. - não significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 15 - Análise de variância da taxa de germinação da linhagem V₁₄ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Isolados	6	51,04	8,51	1,43 N.S.
Resíduo	28	166,60	5,95	
Total	34	217,64		

N.S. - não significativo ao nível de 1% de probabilidade

Pelas análises de variância, verificam-se que não há diferença estatística significativa na taxa de germinação em MC para as linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e seus mutantes e revertentes.

4.8. Bioensaio

Suspensões de conídios das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*, seus mutantes e revertentes preparados segundo o item 3.12.1. foram espalhadas em papel de filtro nos frascos que continham ninfas de *R. prolixus* como descrito no item 3.12.2.

Os resultados da porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de conídios dos isolados ensaiados encontram-se nas Tabelas A.11, A.12, A.13 e A.14 do Apêndice.

As Tabelas A.15 e A.16 expressam a porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após diferentes dias de exposição a uma concentração aproximada de 330×10^2 conídios/ml das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

4.8.1. Reisolamento dos isolados a partir das ninfas

Todas as ninfas mortas foram analisadas e o reiso-

lamento do fungo foi feito, como descrito no item 3.12.3.

A ninfa infectada pelo fungo (Figura 13) apresentava-se dura e quebradiça talvez pela perda de água e nutrientes e o fungo após 72 horas tem aparência branca e decorrido 7 dias, os conídios emergentes do corpo do hospedeiro, dão coloração verde a massa fúngica que recobre o cadáver do inseto.

Foi possível isolar o fungo em todos os insetos , o que assegura que a mortalidade causada na ninfa de *R. prolixus*, foi provavelmente provocada pelo patógeno em estudo.

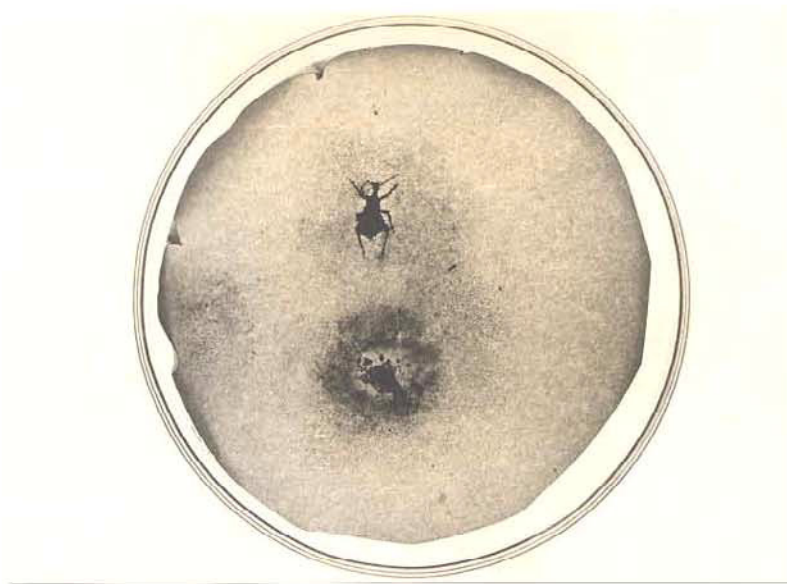


FIGURA 13 - Ninfas de *R. prolixus* mortas pela infecção por *M. anisopliae*.

4.8.2. Análise estatística da virulência dos isolados

Os resultados de bioensaios, referentes a virulência das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae*, seus mutantes e revertentes foram expressos na forma de LC_{50} e LT_{50} .

4.8.2.1. LC_{50}

A virulência que é a medida do poder de infecção pelo patógeno, foi expressa na forma de LC_{50} , que é a concentração de conídios necessária para matar 50% da população de ninfas de *R. prolixus*.

Os resultados de LC_{50} acham-se expressos nas Tabelas 16 e 17 e foram baseados na mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de conídios, conforme dados das Tabelas A.11, A.12, A.13 e A.14 (Apêndice). O grupo controle não apresentou mortalidade.

As Figuras 14, 15, 16 e 17, representam graficamente os valores de mortalidade plotados em escala probit, baseados em diferentes concentrações de conídios.

TABELA 16 - Concentração letal 50% (LC_{50}), Intervalos de Confiança (I.C.) das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus mutantes expressos em 10^2 conídios/ml.

Mutantes	LC_{50}	I.C.	
		Inferior	Superior
E_9 (padrão)	724,93	314,42	1.671,40
E_9 ami^-	2.272,43	711,11	7.261,74
E_9 lip^-	2.160,72	841,43	5.548,54
E_9 prt^-	906,20	423,43	1.939,16
V_{14} (padrão)	236,26	105,80	527,35
V_{14} ami^-	1.302,13	433,28	3.912,22
V_{14} lip^-	1.228,93	486,59	3.103,79
V_{14} prt^-	283,84	111,29	723,98

TABELA 17 - Concentração letal 50% (LC_{50}), Intervalos de Confiança (I.C.) das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus revertentes, expressos em 10^2 conídios/ml.

Revertentes	LC_{50}	I.C.	
		Inferior	Superior
E_9 (padrão)	724,93	314,42	1.671,40
E_9 ami^+	1.044,42	463,49	2.353,75
E_9 lip^+	972,46	424,14	2.229,92
E_9 prt^+	787,06	347,26	1.783,82
V_{14} (padrão)	236,26	105,80	527,35
V_{14} ami^+	353,58	146,97	850,71
V_{14} lip^+	307,36	114,86	822,27
V_{14} prt^+	213,40	99,36	458,31

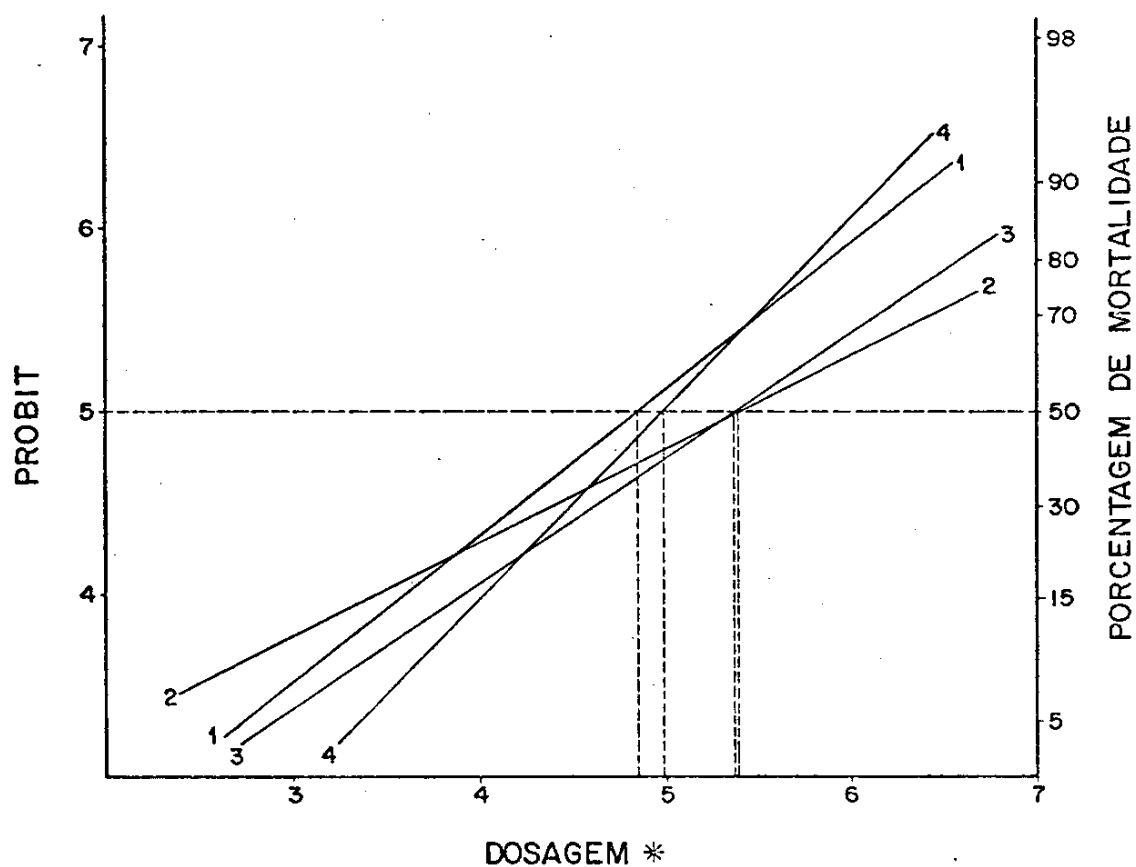


FIGURA 14 - Curvas de dosagem mortalidade para ninfas de *Rhodnius prolixus* após 7 dias de exposição à linhagem E_9 de *M. anisopliae* e seus mutantes.

1. E_9 (padrão)

2. $E_9 \text{ ami}^-$

3. $E_9 \text{ lip}^-$

4. $E_9 \text{ prt}^-$

* Dosagem: concentração de conídios/ml (esc. log.)

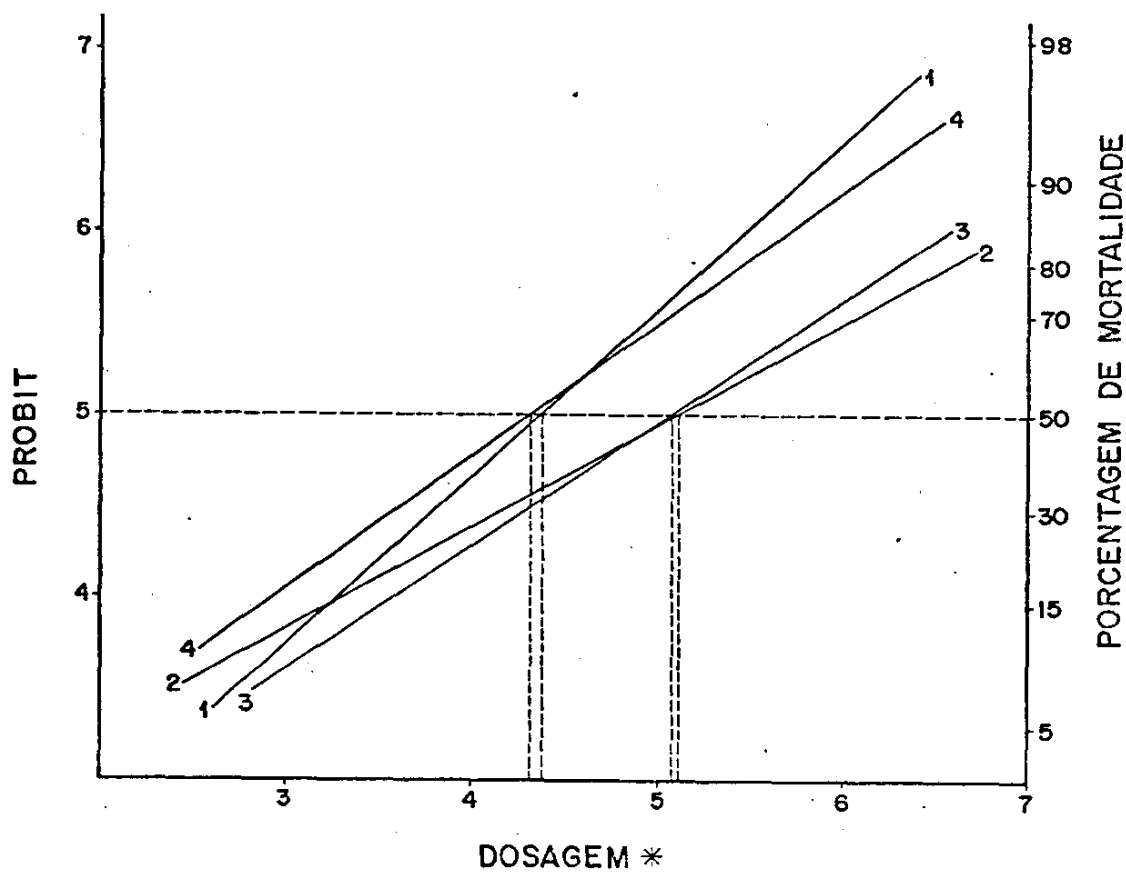


FIGURA 15 - Curvas de dosagem mortalidade para ninfas de *Rhodnius prolixus* após 7 dias de exposição à linhagem V_{14} de *M. anisopliae* e seus mutantes.

1. V_{14} (padrão)

2. $V_{14} \text{ ami}^-$

3. $V_{14} \text{ lip}^-$

4. $V_{14} \text{ prt}^-$

* Dosagem: concentração de conídios/ml (esc. log.)

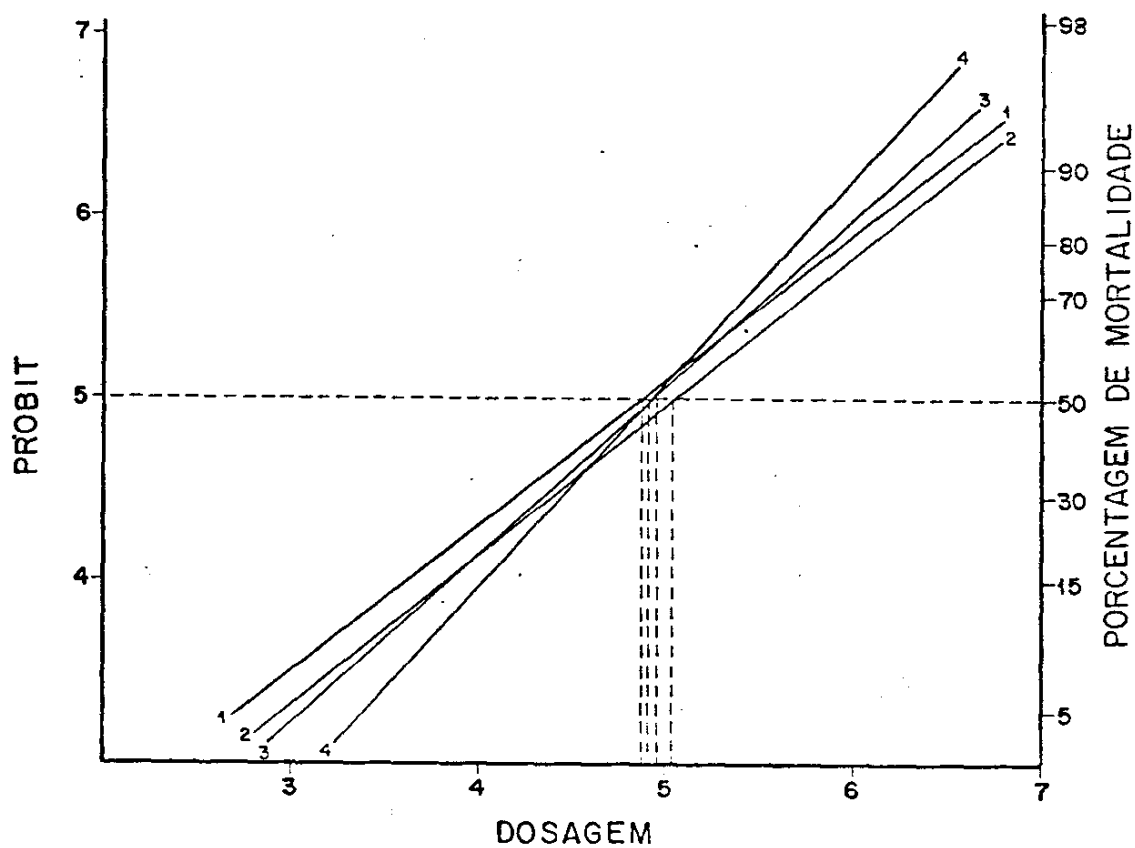


FIGURA 16 - Curvas de dosagem mortalidade para ninfas de *Rhodnius prolixus* após 7 dias de exposição à linhagem E_9 de *M. anisopliae* e seus revertentes.

1. E_9 (padrão)

2. E_9 ami^+

3. E_9 lip^+

4. E_9 pri^+

* Dosagem: concentração de conídios/ml (esc. log.)

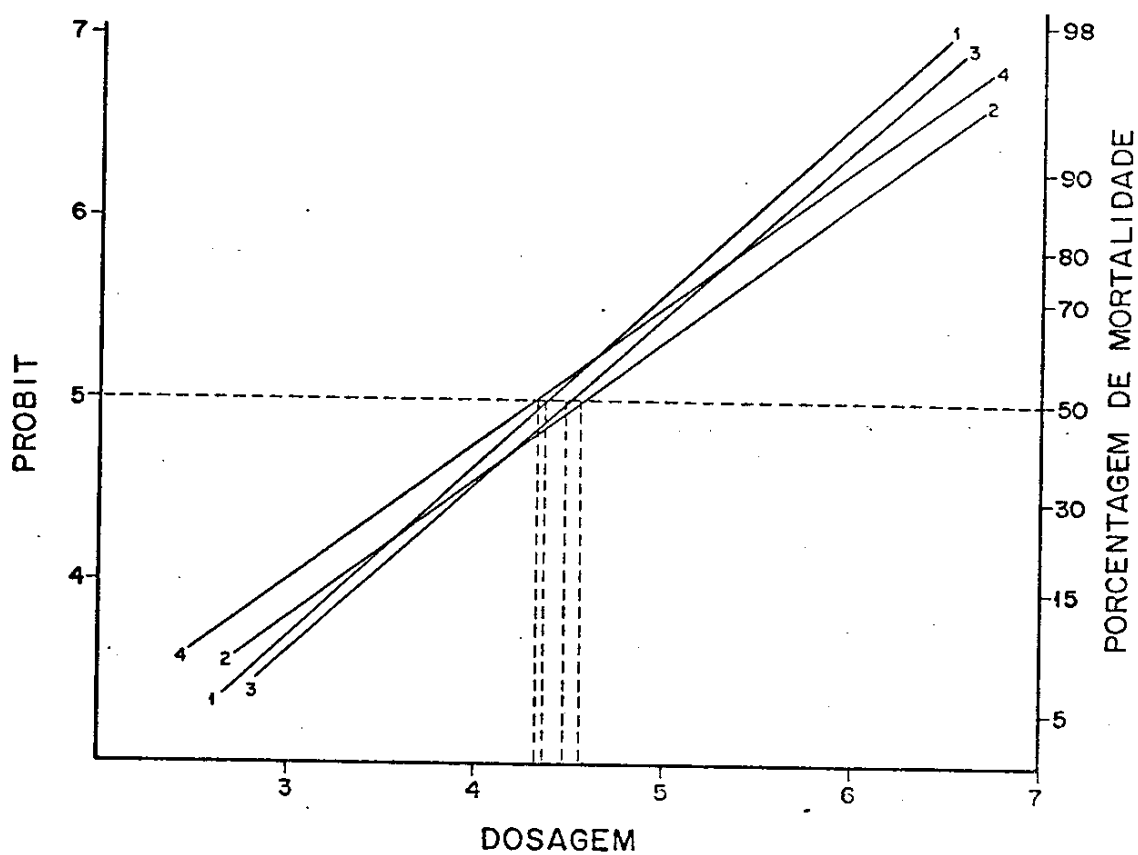


FIGURA 17 - Curvas de dosagem mortalidade para ninfas de *Rhodnius prolixus* após 7 dias de exposição à linhagem *V*₁₄ de *M. anisopliae* e seus revertentes.

1. *V*₁₄ (padrão)

2. *V*₁₄ *ami*⁺

3. *V*₁₄ *lip*⁺

4. *V*₁₄ *prt*⁺

* Dosagem: concentração de conídios/ml (esc. log.)

4.8.2.2. LT_{50}

LT_{50} expressa o tempo que uma concentração única de conídios provoca 50% de mortalidade na população de ninfas de *R. prolixus*.

Os resultados de LT_{50} encontram-se nas Tabelas 18 e 19 e foram calculados com base na mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus*, após diferentes dias de exposição a uma única concentração de conídios (330×10^2 conídios/ml), conforme valores das Tabelas A.15 e A.16 do Apêndice. Graficamente esses resultados são representados nas Figuras 18, 19, 20 e 21.

TABELA 18 - Tempo letal (LT_{50}), Intervalos de Confiança (I.C.) das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus mutantes.

Mutantes	LT_{50} (dias)	I.C.	
		Inferior	Superior
E_9 (padrão)	8,05	7,40	8,76
E_9 ami^-	9,73	8,58	11,04
E_9 lip^-	9,46	8,62	10,38
E_9 prt^-	8,41	7,76	9,11
V_{14} (padrão)	6,37	5,77	7,04
V_{14} ami^-	7,84	6,90	8,92
V_{14} prt^-	7,86	6,87	8,99
V_{14} prt^-	6,61	5,95	7,34

TABELA 19 - Tempo letal (LT_{50}), Intervalos de Confiança (I.C.)
das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus
revertentes.

Revertentes	LT_{50} (dias)	I.C.	
		Inferior	Superior
E_9 (padrão)	8,05	7,40	8,76
E_9 ami ⁺	8,65	7,89	9,48
E_9 lip ⁺	8,39	7,68	9,16
E_9 prt ⁺	8,20	7,48	8,98
V_{14} (padrão)	6,37	5,77	7,04
V_{14} ami ⁺	6,42	5,71	7,22
V_{14} lip ⁺	6,60	5,90	7,37
V_{14} prt ⁺	6,89	6,16	7,69

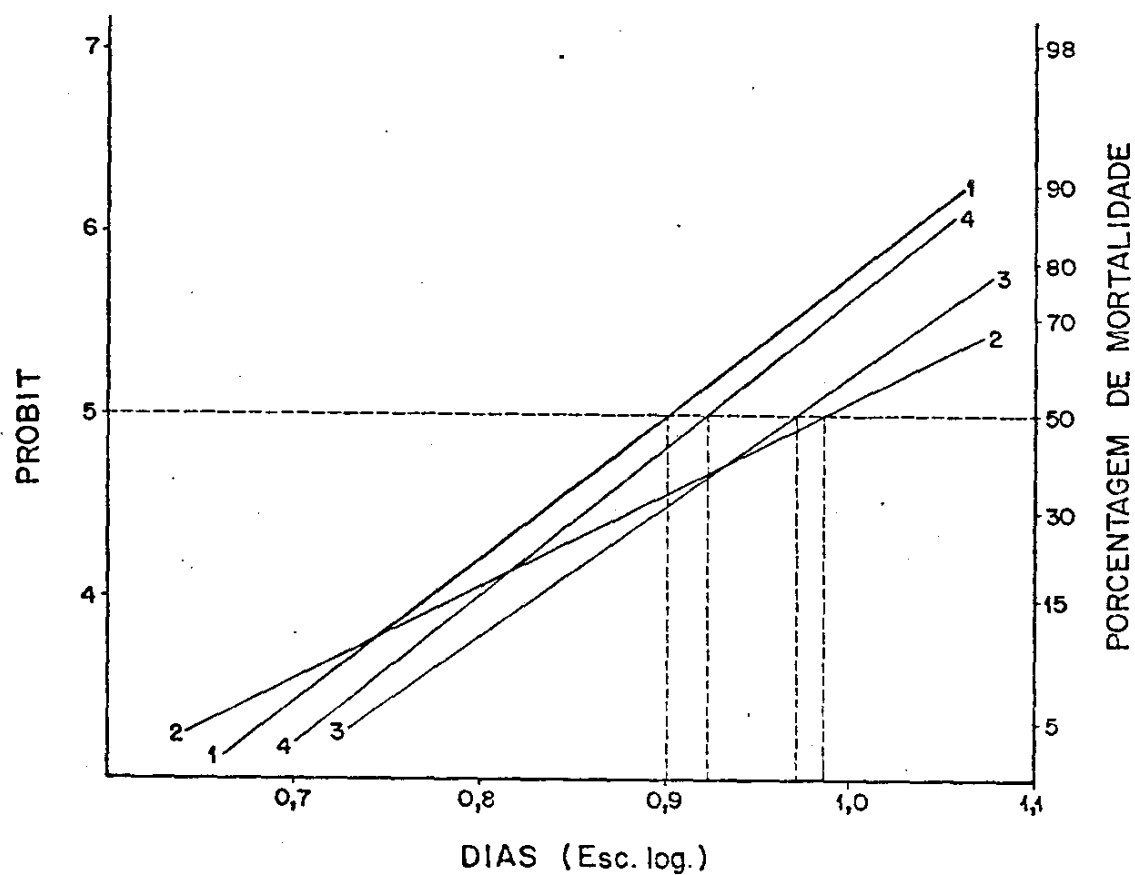


FIGURA 18 - Curvas de tempo mortalidade para ninfas de *Rhodnius prolixus* após exposição à linhagem E₉ de *M. anisopliae* e seus mutantes.

1. E₉ (padrão)
2. E₉ ami⁻
3. E₉ lip⁻
4. E₉ prt⁻

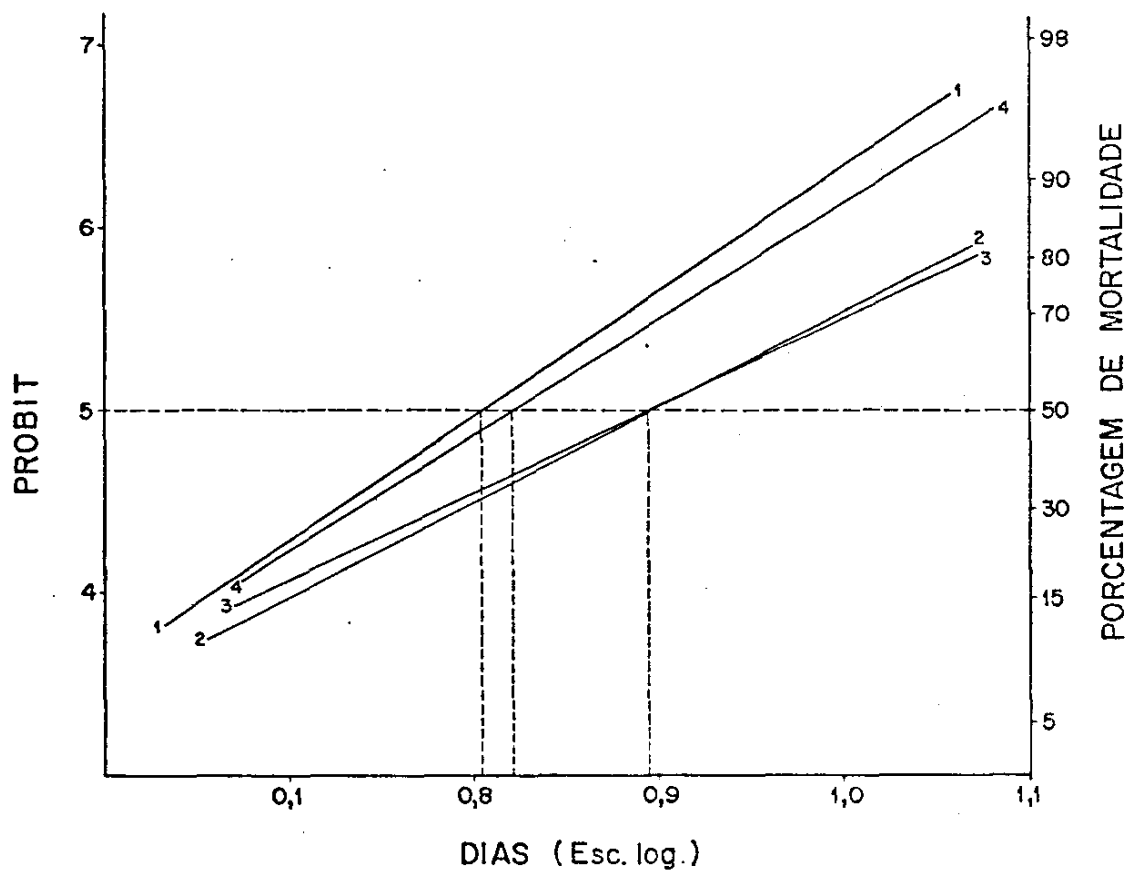


FIGURA 19 - Curvas de tempo mortalidade para ninfas de *Rhodnius prolixus* após exposição à linhagem V₁₄ de *M. anisopliae* e seus mutantes.

1. V₁₄ (padrão)
2. V₁₄ ami⁻
3. V₁₄ lip⁻
4. V₁₄ prt⁻

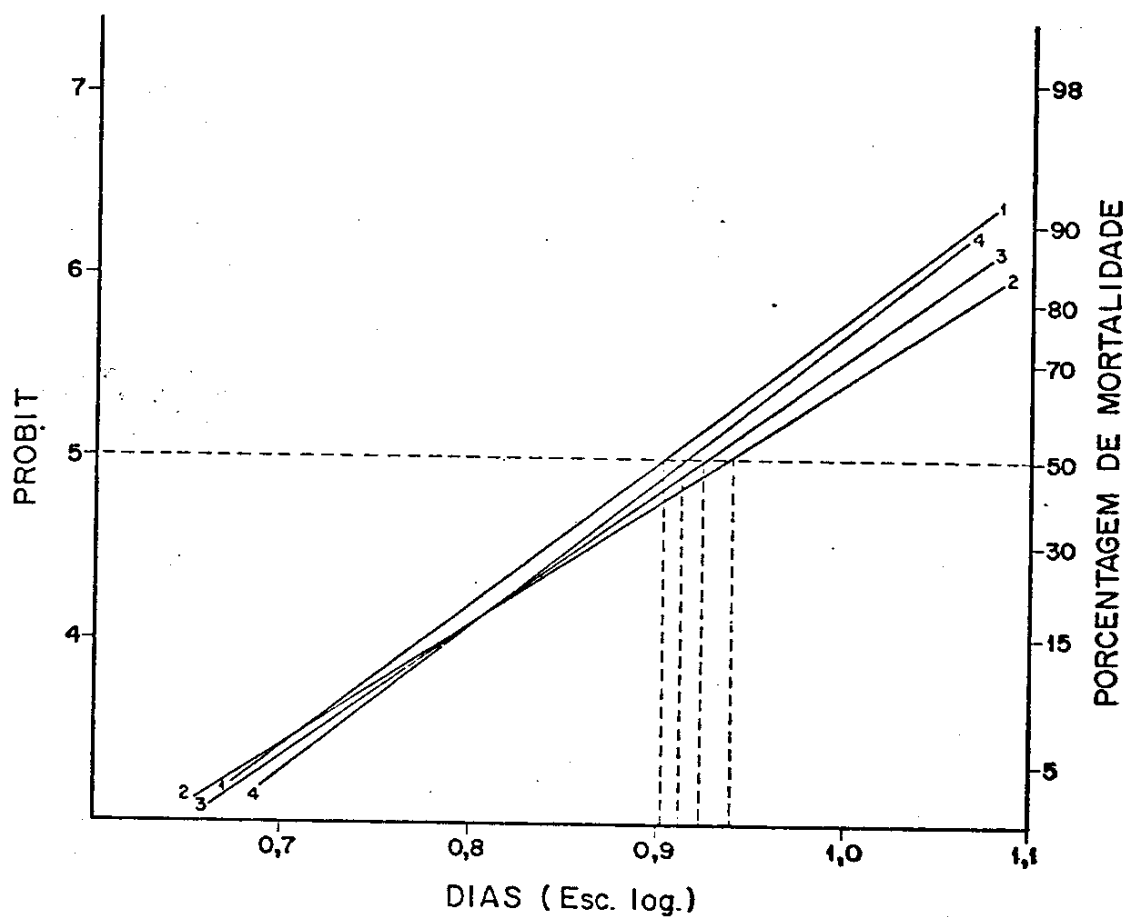


FIGURA 20 - Curvas de tempo mortalidade para ninfas de *Rhodnius prolixus* após exposição à linhagem E_9 de *M. antisopliae* e seus revertentes.

1. E_9 (padrão)
2. E_9 ami^+
3. E_9 lip^+
4. E_9 pri^+

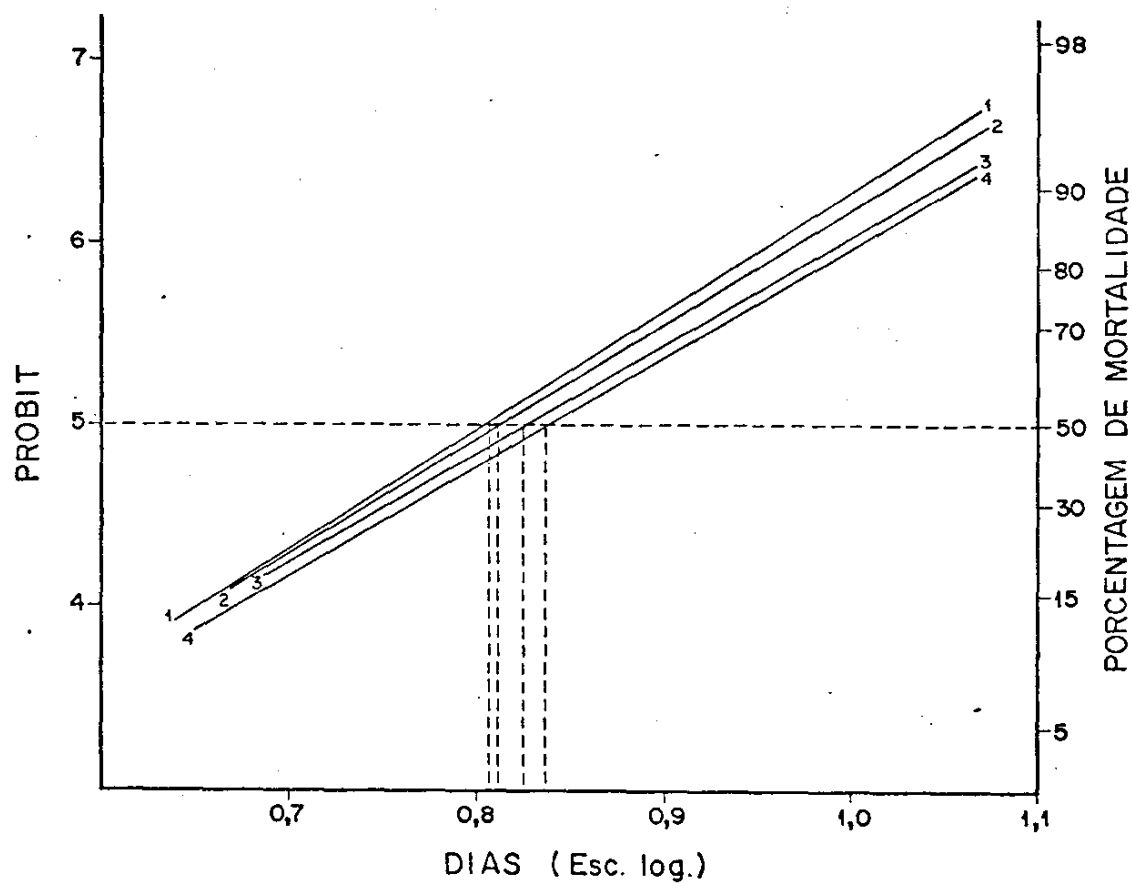


FIGURA 21 - Curvas de tempo mortalidade para ninfas de *Rhodnius prolixus* após exposição à linhagem V_{14} de *M. anisopliae* e seus revertentes.

1. V_{14} (padrão)
2. $V_{14} \text{ ami}^+$
3. $V_{14} \text{ lip}^+$
4. $V_{14} \text{ prt}^+$

4.8.2.3. Hipótese de paralelismo

A verificação de paralelismo das retas de regressão, utilizando o teste de x^2 para os mutantes e revertentes das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* em relação aos LC_{50} e LT_{50} está representado nas Tabelas 20, 21, 22 e 23. Pode-se observar que todos os valores foram não significativos, indicando que os mutantes e revertentes, derivados das linhagens E_9 e V_{14} , podem ter o mesmo valor angular na equação da reta de regressão e que a distribuição das respostas aderem perfeitamente à reta de regressão, existindo uma concordância satisfatória entre as curvas observada e calculada.

TABELA 20 - Teste de χ^2 para comparação dos LC_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus mutantes.

Componentes	G.L.	χ^2	Significância*
E_9 (padrão)	2	2,38	n.s.
E_9 ami^-	2	1,03	n.s.
E_9 lip^-	2	1,48	n.s.
E_9 pvt^-	2	0,20	n.s.
Heterogeneidade	8	5,09	n.s.
Paralelismo	3	3,41	n.s.
Total	11	8,50	n.s.
V_{14} (padrão)	2	0,84	n.s.
V_{14} ami^-	2	0,32	n.s.
V_{14} lip^-	2	0,37	n.s.
V_{14} pvt^-	2	3,74	n.s.
Heterogeneidade	8	5,27	n.s.
Paralelismo	3	3,07	n.s.
Total	11	8,34	n.s.

* n.s. não significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 21 - Teste de χ^2 para comparação dos LC_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus reversos.

Componentes	G.L.	χ^2	Significância*
E_9 (padrão)	2	2,38	n.s.
E_9 ami ⁺	2	1,30	n.s.
E_9 lip ⁺	2	0,21	n.s.
E_9 prt ⁺	2	3,43	n.s.
Heterogeneidade	8	7,32	n.s.
Paralelismo	3	0,11	n.s.
Total	11	7,43	n.s.
V_{14} (padrão)	2	0,84	n.s.
V_{14} ami ⁺	2	0,29	n.s.
V_{14} lip ⁺	2	1,81	n.s.
V_{14} prt ⁺	2	1,93	n.s.
Heterogeneidade	8	4,87	n.s.
Paralelismo	3	2,14	n.s.
Total	11	7,01	n.s.

* n.s. não significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 22 - Teste de χ^2 para comparação dos LT_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus mutantes.

Componentes	G.L.	χ^2	Significância*
E_9 (padrão)	2	1,27	n.s.
E_9 ami^-	2	0,75	n.s.
E_9 lip^-	2	0,74	n.s.
E_9 prt^-	2	1,19	n.s.
Heterogeneidade	8	3,95	n.s.
Paralelismo	3	3,16	n.s.
Total	11	7,11	n.s.
V_{14} (padrão)	2	1,70	n.s.
V_{14} ami^-	2	0,22	n.s.
V_{14} lip^-	2	2,13	n.s.
V_{14} prt^-	2	1,02	n.s.
Heterogeneidade	8	5,07	n.s.
Paralelismo	3	2,13	n.s.
Total	11	7,20	n.s.

* n.s. não significativo ao nível de 5% de probabilidade

TABELA 23 - Teste de χ^2 para comparação dos LT_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e de seus reверtentes.

Componentes	G.L.	χ^2	Significância*
E_9 (padrão)	2	1,27	n.s.
E_9 ami ⁺	2	0,98	n.s.
E_9 lip ⁺	2	1,25	n.s.
E_9 prt ⁺	2	0,78	n.s.
Heterogeneidade	8	4,28	n.s.
Paralelismo	3	0,28	n.s.
Total	11	4,56	n.s.
V_{14} (padrão)	2	0,80	n.s.
V_{14} ami ⁺	2	0,83	n.s.
V_{14} lip ⁺	2	0,46	n.s.
V_{14} prt ⁺	2	0,44	n.s.
Heterogeneidade	8	2,53	n.s.
Paralelismo	3	1,89	n.s.
Total	11	4,42	n.s.

n.s. não significativo ao nível de 5% de probabilidade

4.8.2.4. Potência Relativa

A potência relativa dos LC_{50} e LT_{50} entre os mutantes, revertentes e as linhagens padrões, pode ser calculada se a hipótese de paralelismo das retas de regressão se confirma, como mostra os resultados no item 4.8.2.3.

Os valores da potência relativa e seus Intervalos de Confiança ao nível de 95% para os LC_{50} se encontram nas Tabelas 24, 25, 26 e 27. Graficamente esses resultados são ilustrados nas Figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29.

TABELA 24 - Potência Relativa (R) e seus Intervalos de Confiança para os LC_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e seus mutantes.

Mutantes	Potência Relativa (R)	Intervalo de Confiança	
		Inferior	Superior
E_9 (padrão)	1,00	-	-
E_9 ami^-	0,35	0,09	0,76
E_9 lip^-	0,33	0,09	0,78
E_9 prt^-	0,78	0,21	2,97
V_{14} (padrão)	1,00	-	-
V_{14} ami^-	0,15	0,04	0,61
V_{14} lip^-	0,15	0,04	0,63
V_{14} prt^-	0,91	0,23	3,55

TABELA 25 - Potência Relativa (R) e seus Intervalos de Confiança para os LC_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e seus revertentes.

Revertentes	Potência Relativa (R)	Intervalo de Confiança	
		Inferior	Superior
E_9 (padrão)	1,00	-	-
E_9 ami ⁺	0,70	0,22	2,26
E_9 lip ⁺	0,74	0,24	2,38
E_9 prt ⁺	0,92	0,28	3,02
V_{14} (padrão)	1,00	-	-
V_{14} ami ⁺	0,59	0,17	1,90
V_{14} lip ⁺	0,61	0,20	1,93
V_{14} prt ⁺	1,15	0,35	3,78

TABELA 26 - Potência Relativa (R) e seus Intervalos de Confiança para os LT_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e seus mutantes.

Mutantes	Potência Relativa (R)	Intervalos de Confiança	
		Inferior	Superior
E_9 (padrão)	1,00	-	-
E_9 ami^-	0,84	0,73	0,96
E_9 lip^-	0,85	0,74	0,97
E_9 prt^-	0,96	0,84	1,09
V_{14} (padrão)	1,00	-	-
V_{14} ami^-	0,81	0,68	0,97
V_{14} lip^-	0,82	0,69	0,97
V_{14} prt^-	0,97	0,83	1,15

TABELA 27 - Potência Relativa (R) e seus Intervalos de Confiança para os LT_{50} das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* e seus revertentes.

Revertentes	Potência Relativa (R)	Intervalos de Confiança	
		Inferior	Superior
E_9 (padrão)	1,00	-	-
E_9 ami ⁺	0,93	0,82	1,05
E_9 lip ⁺	0,98	0,87	1,17
E_9 prt ⁺	0,96	0,88	1,09
V_{14} (padrão)	1,00	-	-
V_{14} ami ⁺	0,98	0,84	1,15
V_{14} lip ⁺	0,96	0,82	1,12
V_{14} prt ⁺	0,92	0,78	1,08

FIG. 22

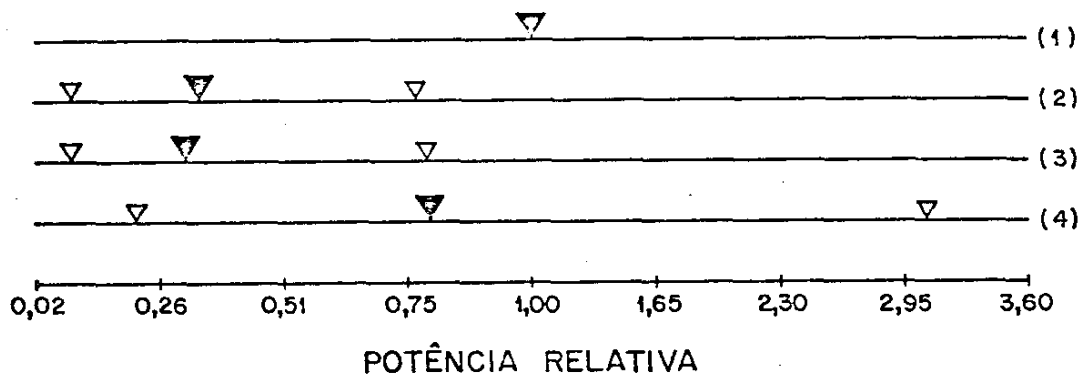
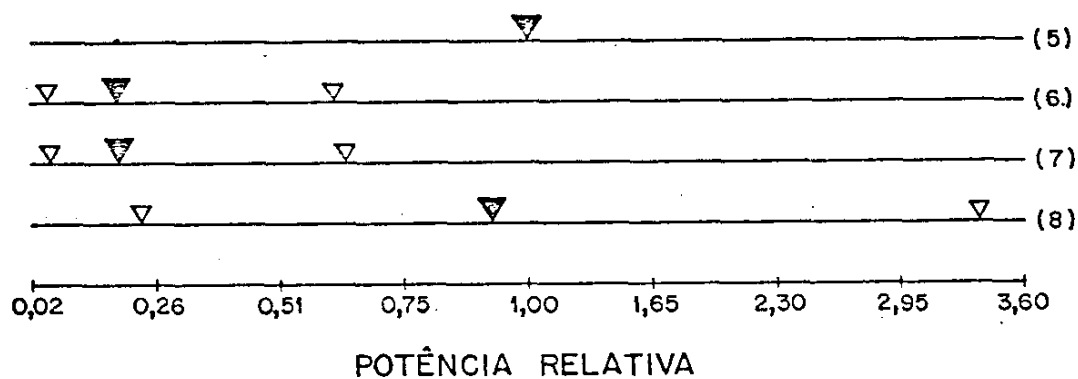


FIG. 23



Intervalos de Confiança da Potência Relativa dos LC_{50} das linhagens E_9 (Fig. 22) e V_{14} (Fig. 23) de *Metarhizium anisopliae* e seus mutantes.

(1) E_9 (padrão)

(5) V_{14} (padrão)

(2) E_9 ami^-

(6) V_{14} ami^-

(3) E_9 lip^-

(7) V_{14} lip^-

(4) E_9 pri^-

(8) V_{14} pri^-

FIG. 24

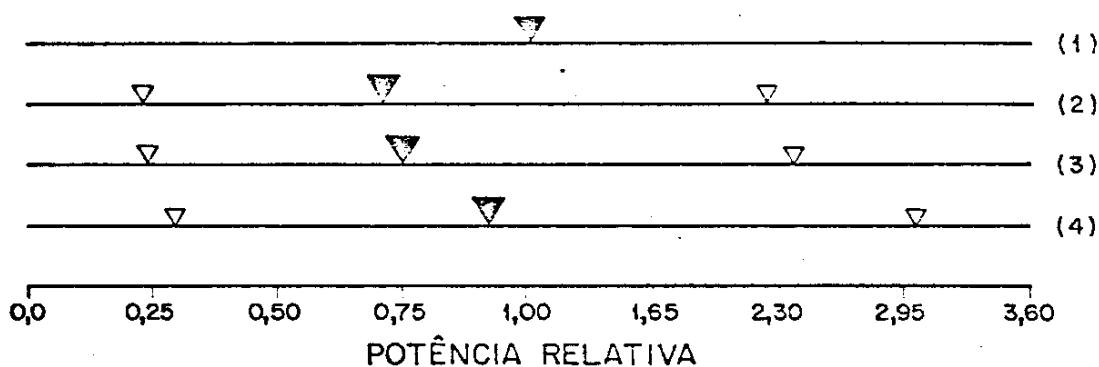
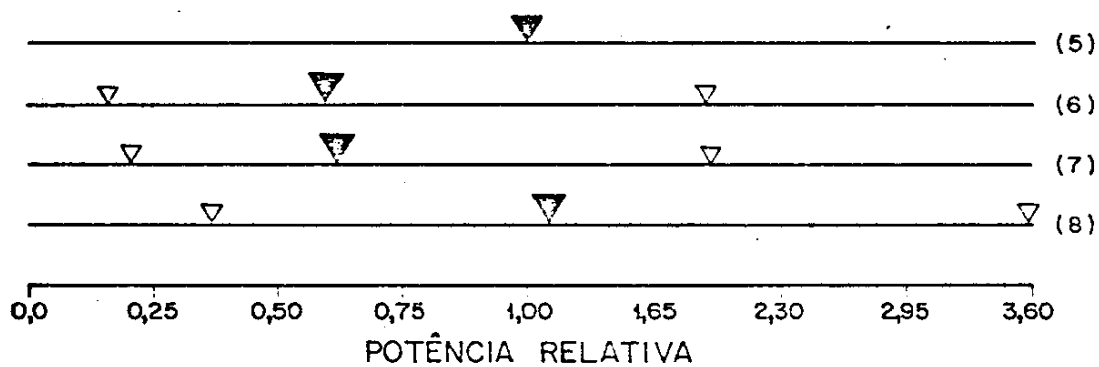


FIG. 25



Intervalos de Confiança da Potência Relativa dos LC_{50} das
linhagens E_9 (Fig. 24) e V_{14} (Fig. 25) de *M. anisopliae* e
seus revertentes.

(1) E_9 (padrão)

(2) E_9 ami^+

(3) E_9 lip^+

(4) E_9 pvt^+

(5) V_{14} (padrão)

(6) V_{14} ami^+

(7) V_{14} lip^+

(8) V_{14} pvt^+

FIG. 26

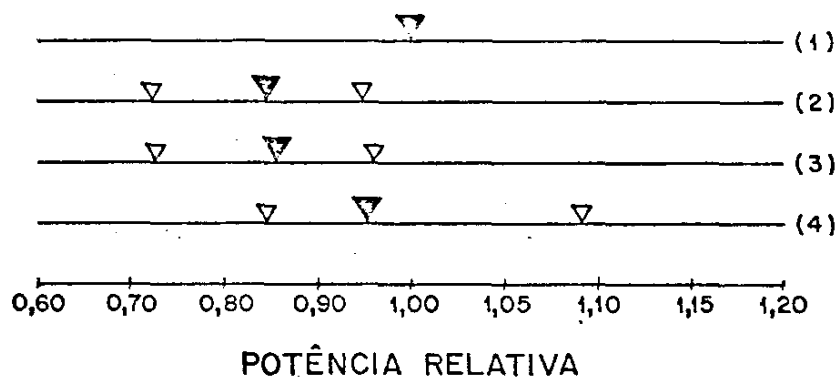
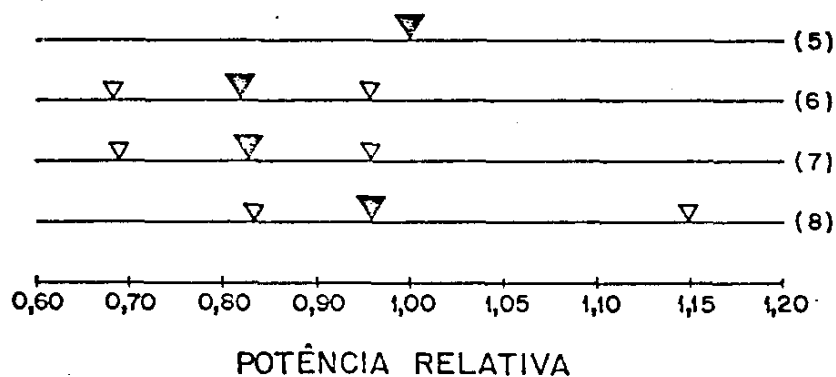


FIG. 27



Intervalos de Confiança da Potência Relativa dos LT_{50} das linhagens E_9 (Fig. 26) e V_{14} (Fig. 27) de *Metarhizium anisopliae* e seus mutantes.

(1) E_9 (padrão)

(2) E_9 ami^-

(3) E_9 lip^-

(4) E_9 pri^-

(5) V_{14} (padrão)

(6) V_{14} ami^-

(7) V_{14} lip^-

(8) V_{14} pri^-

FIG. 28

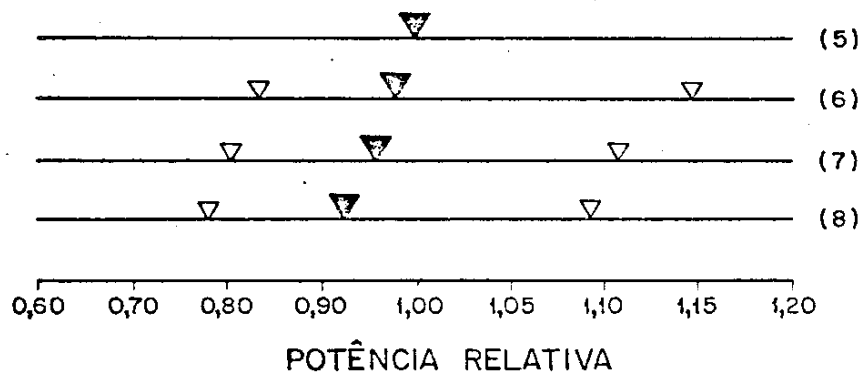
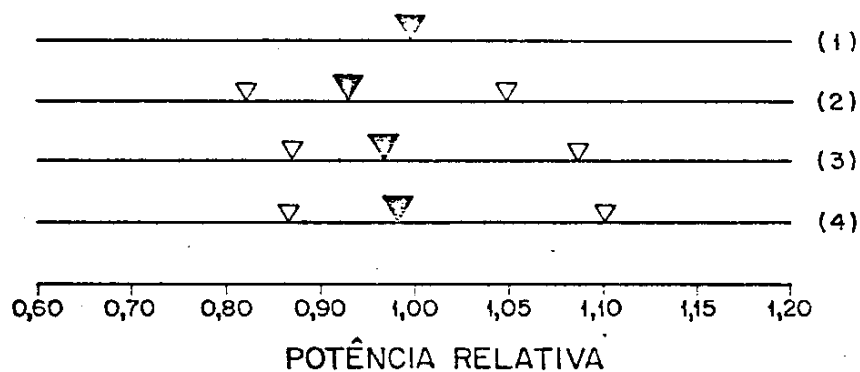


FIG. 29

Intervalos de Confiança da Potência Relativa dos LT_{50} das linhagens E_9 (Fig. 28) e V_{14} (Fig. 29) de *M. anisopliae* e seus revertentes.

(1) E_9 (padrão)

(2) E_9 ami^+

(3) E_9 lip^+

(4) E_9 prt^+

(5) V_{14} (padrão)

(6) V_{14} ami^+

(7) V_{14} lip^+

(8) V_{14} prt^+

Com os resultados obtidos nas Tabelas 24, 25, 26 e 27 e nas Figuras 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29, pode-se observar que:

a) Os Intervalos de Confiança da Potência Relativa para os LC_{50} dos mutantes das linhagens E_9 e V_{14} , somente os mutantes $E_9 \text{ prt}^-$ e $V_{14} \text{ prt}^-$ superpõem ao padrão, indicando que suas virulências não são diferentes estatisticamente às linhagens E_9 V_{14} de *M. anisopliae*, dos quais são derivados.

b) A observação referida anteriormente é válida também para os valores de Potência Relativa do LT_{50} .

c) Todos os revertentes tem seus Intervalos de Confiança da Potência Relativa para os LC_{50} e LT_{50} , superpostos ao padrão, indicando que suas virulências não são estatisticamente diferentes às linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae*.

d) Verifica-se resumidamente que mutação reversa ou supressão, originando fenótipo de exoenzima selvagem, restabelece a virulência para o inseto utilizado, pelos menos em condições de nossos experimentos.

e) Os valores de LC_{50} e LT_{50} apresentam resultados que levam a conclusões semelhantes concernentes à virulência.

f) O mesmo tipo de mutação e reversão nas duas linhagens (E_9 e V_{14}) apresentam a mesma resposta de virulência ao inseto testador utilizado.

5. DISCUSSÃO

5.1. Luz ultravioleta como agente mutagênico para *M. anisopliae*

A luz ultravioleta vem sendo largamente usada para produção de mutações em microorganismos, uma vez que é de fácil utilização, oferece pouco risco ao usuário e não produz em tão alto grau o problema de causar aberrações cromossômicas, ao contrário por exemplo dos raios gama.

A dose de irradiação com luz ultravioleta para obtenção de mutantes é aquela que geralmente permite 1 - 5% de sobreviventes e particularmente para *M. anisopliae*, diferentes mutações tem sido obtidas como tal dose (TINLINE & NOVIELLO, 1971; MESSIAS et alii, 1978; MESSIAS, 1979; MESSIAS & AZEVEDO, 1980; SILVEIRA, 1983; FRIGO, 1983; SILVEIRA & AZEVEDO, 1984).

As curvas de sobrevivência obtidas no presente trabalho para as linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* (Figura 2) evidenciam uma relação entre dose e mortalidade. Deve-se realçar que diferentes linhagens de *M. anisopliae* tem sensibilidade variável à luz ultravioleta como mostraram SANTOS (1978); CORREA (1982) e ARRAIS DE MATOS (1983). Uma mesma linhagem pode apresentar resultados diferentes de mortalidade provavelmente devido a potência alterada da lâmpada e, em vista disso, SILVEIRA (1983) sugere que se use um dosímetro

para luz ultravioleta, o que torna possível a medida das doses, permitindo construir uma curva padronizada.

5.2. Enzimas extracelulares de *M. anisopliae*

A verificação da produção de enzimas extracelulares em meio sólido permite com rapidez a seleção de uma população grande de fungos para ausência ou presença de exoenzimas específicas e viabiliza facilmente variantes genéticas que se queiram estudar, como citam HANKINS & AGNOSTAKIS (1975).

A avaliação na produção de exoenzimas, foi determinada semi-quantitativamente pela medida do halo formado e diâmetro da colônia, sendo essa relação denominada de índice enzimático, cujos resultados para amilase, lipase e protease expressos na Tabela A.1. parecem indicar que a produção dessas exoenzimas tende à variação contínua, sugerindo caráter poligênico, como cita BURNETT (1975). Outra exoenzima produzida por *M. anisopliae* é a quitinase, demonstrado por vários autores (HÜBER, 1958; ROBINSON, 1966; GABRIEL, 1968a; ROSATO et alii, 1981; LEITE & MESSIAS, 1984; SILVA, não publicado) e todos concordam que as enzimas extracelulares devem ter alguma função no processo de patogênese.

Um estudo de melhoramento genético relacionado à produção dessas exoenzimas, poderia resultar linhagens promissoras para maior virulência no controle de populações de insetos.

5.3. Obtenção de mutantes e revertentes exoenzimáticos

A irradiação com luz ultravioleta em conídios das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*, produziu mutantes e revertentes exoenzimáticos com frequências apresentadas na Tabelas 3 e 4. Baseado nessas frequências, pode-se verificar que os valores são próximos e geralmente a frequência de mutação reversa de uma marca genética é significativamente menor que a frequência de mutação direta, como assinalam STENT & CALENDAR (1978) para *Escherichia coli*. Desse modo, embora a análise de frequência de mutação e reversão seja simplista, pode-se levantar a hipótese de que a restauração do fenótipo normal, seja resultado de supressão, que classicamente é um termo usado para designar a reversão de um fenótipo mutante através de uma segunda mutação em um locus distinto daquele da mutação original, como descrevem FINCHAM & DAY (1971). Revisões detalhadas sobre supressão em fungos filamentosos podem ser encontradas em MIRANDA FILHO (1972), HARTMAN & ROTH (1973); MONTEIRO (1979) e COSTA (1981).

A seleção dos mutantes para amilase e lipase pode ser facilmente distinguível dos tipos selvagens, pois como verificado nas Figuras 5 e 6, eles não produzem halos e consequentemente tem índices enzimáticos iguais a um. Os mutantes para protease apresentam índices enzimáticos diferentes de um e portanto fez-se necessário uma análise de variância (Tabela 6) e teste de Tukey (Tabela 7), cujos resultados permitiram discerní-los do tipo selvagem.

Análise dos revertentes (Figuras 8, 9 e 10), mostrou o restabelecimento do fenótipo, verificado pelos índi -

ces enzimáticos correspondentes a cada enzima extracelular alterada.

Todos os mutantes e revertentes obtidos, não revelaram efeito pleiotrópico visível pelas observações efetuadas como: taxa de crescimento da colônia, esporulação e morfologia, embora esses resultados não constem nesse trabalho.

Estudos genéticos complementares nos mutantes e revertentes, como cruzamentos entre os mutantes, revertentes, e tipo selvagem por exemplo, poderiam elucidar a natureza genética da mutação e/ou reversão.

Deve ser realçado que, embora não se detectasse halos para os mutantes amilase e lipase e esse se revele pequeno para protease, essas enzimas devem ocorrer intracelularmente pois todos os isolados desenvolvem-se bem em meio de cultura contendo como fonte de carbono amido, tween 20 e gelatina, respectivamente (SILVA, não publicado).

5.4. Padrões eletroforéticos para α -esterase

Os resultados obtidos na Figura 12, permitem distinguir diferentes padrões eletroforéticos para α -esterase nas linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae*. Esses dados confirmam a variabilidade detectada no sistema esterase de *M. anisopliae*, permitindo a caracterização de linhagens diferentes, como já foi verificado por De CONTI et alii (1980).

Os mutantes lipase em ambas as linhagens, apresentaram ausência de uma banda, talvez indicando que tenha ocorrido alteração no(s) gene(s) para α -esterase, provocados pe-

la luz ultravioleta, semelhante ao mutante morfológico de *M. anisopliae*, reportado por PENALVA DA SILVA & AZEVEDO (1983).

Os revertentes lipase mantiveram os mesmos padrões dos mutantes lipase e admitimos algumas hipóteses para o fenômeno. Uma delas é que o halo para lipase não corresponde aos padrões α -esterases, pois no revertente a volta do fenótipo exoenzimático lipase, implicaria no reaparecimento da banda perdida no mutante lipase, o que não ocorreu. A ausência da banda não se relaciona com a virulência da linhagem (item 5.8.2.) pois o restabelecimento da virulência no revertente lipase não mostrou nova formação de banda. Isto aliás, confirma que não há relação de virulência e padrão eletroforético para α -esterase, fato já assinalado por ALVES (1982) que encontrou isolados de padrões eletroforéticos com diferentes patogenidades.

Estudos complementares de padrões eletroforéticos para protease e amilase nos mutantes e revertentes poderiam esclarecer se o fenômeno observado para α -esterase poderia ser confirmado ou não para essas enzimas.

Deve-se realçar que a caracterização da patogenidade de uma linhagem de *M. anisopliae* compreende uma série de requisitos como enumeram vários autores. Deve-se considerar a produção de enzimas extracelulares (ROBINSON, 1966 ; SAMŠIŇÁKOVÁ & MIŠIKOVÁ, 1973; AL-AIDROOS & SEIFERT, 1980) produção de toxinas (KODAIRA, 1962; ROBERTS, 1966; CRISAN, 1971) e germinação precoce e viabilidade dos conídios (AL-AIDROOS & ROBERTS, 1978; DAOUST & ROBERTS, 1983a, b).

Provavelmente esses fatores com outros, não bem estudados, agem na virulência e capacidade de infectar os diferentes hospedeiros, desde que sejam oferecidas condições

favoráveis para o desenvolvimento do fungo.

5.5. Aspectos citológicos dos mutantes e revertentes

O número de núcleos por conídio é bastante importante em estudos genéticos de fungos filamentosos, sendo que aqueles com conídios uninucleados em sua grande maioria são os mais utilizados para análise genética, devido a facilidades na obtenção de mutantes, segregação de marcadores e não interferência de heterocariose e/ou recombinação natural em fungos com conídios binucleados ou multinucleados.

Os valores de porcentagem dos conídios binucleados das Tabelas 8, 9 e as análises de variância das Tabelas 10 e 11, evidenciam que a proporção de conídios binucleados nos diferentes mutantes e revertentes, não foi alterada pela radiação ultravioleta. A presença de conídios binucleados em *M. anisopliae*, segundo alguns autores (ZACHARUK, 1970b ; TINLINE, 1971) devem ser resultados de anastomose ou processo de germinação tão comuns em conídios. Apesar de ser constatado baixa frequência de conídios binucleados em *M. anisopliae* (MESSIAS et alii, 1978; ARRAIS DE MATOS, 1983; SILVEIRA, 1983) esse fungo tem sido geneticamente analisado após a demonstração de seu ciclo parassexual (MESSIAS, 1979; MESSIAS & AZEVEDO, 1980; AL-AIDROOS, 1980).

Constatou-se que os conídios uninucleados, apresentam núcleos em diferentes posições (central e polar) e isso talvez indique que o conídio com núcleo polar poderia estar iniciando o processo de divisão, como sugere ZACHARUK (1970a)

através de estudos de microscopia eletrônica de conídios de *M. anisopliae*.

O número de núcleos por conídio também é um elemento auxiliar na diferenciação de linhagens haplóides e diplóides em *M. anisopliae*, pois MESSIAS (1979); MESSIAS & AZEVEDO (1980) e SILVEIRA (1983), constataram que os diplóides não apresentam conídios binucleados.

Os resultados expressos nas Tabelas A.7 e A.8, apresentam valores médios de comprimentos de conídios que confirmam serem as linhagens E_9 e V_{14} , mutantes e revertentes de *M. anisopliae*, pertencentes à variedade *minor* ou *anisopliae*, de acordo com o tamanho proposto por TULLOCH (1976) para essa variedade. Os conídios são irregulares em seus formatos, desde quase - cilíndricos até quase - esféricos, por isso a leitura da largura não foi efetuada devido a falta de precisão da mesma, como advertem AZEVEDO & MESSIAS (1981) e esses autores devido a isso, sugerem a utilização de um "Coulter Channelizer" para medidas mais refinadas.

O comprimento de conídios não é efetivo para distinguir colônias haplóides e diplóides como foi demonstrado para vários fungos como *Aspergillus oryzae*, *A. sojae* (IKEDA et alii, 1957); *A. flavus* (PAPA, 1973; MESSIAS, 1977); *A. parasiticus* (PAPA, 1978); *Aspergillus* sp. (PEREIRA, 1978); *M. anisopliae* (MESSIAS, 1979; MESSIAS & AZEVEDO, 1980). Contrariamente a esses autores MAGOON & AL-AIDROOS (1984), reportaram que linhagens haplóides e diplóides de *M. anisopliae* são distintas, quando comparadas pelo diâmetro do conídio e núcleo. Por outro lado, TULLOCH (1976) baseado no tamanho de conídios, sugere que em *M. anisopliae* a variedade *major* poderia ser uma forma poliplóide da variedade *minor*.

A relação tamanho de conídios e virulência da linhagem em *M. anisopliae*, apresenta resultados não tão esclarecedores devido a escassos estudos. MURAYAMA et alii (1982) verificaram que repicagens sucessivas de um isolado de *M. anisopliae* em meio de arroz, resultaram em mudanças morfológicas e de tamanho de esporos, bem como atenuação da virulência em *G. mellonella* após a 9ª repicagem. SILVA et alii (1982) mostraram que houve um pequeno aumento no comprimento de conídios de *M. anisopliae* quando provenientes de subculturas, comparados com aqueles isolados diretamente do inseto *Deois* sp (Homoptera: Cercopidae).

Outras análises poderão ser realizadas, para obtenção de linhagens selecionadas para tamanho de conídios e maior virulência que talvez possam ser promissoras no controle de populações de insetos.

5.6. Taxa de germinação dos conídios

No item 4.7., verificou-se que a taxa de germinação dos conídios em MC, para os mutantes e revertentes exoenzimáticos das linhagens E₉ e V₁₄, não apresentou diferença estatística significativa. Tais resultados são importantes quando se realizam bioensaios comparando diferentes linhagens, pois um dos fatores importantes na virulência é a germinação dos conídios ou viabilidade, como demonstraram DAOUST & ROBERTS (1982, 1983a, b).

Vários fatores, entre eles a temperatura, umidade e luz, influem na germinação dos conídios e, conseqüentemen-

te, atuam na virulência das linhagens, como assinalam ROBERTS & YENDOL (1971); YENDOL & HAMLEN (1973) e FERRON (1978).

5.7. Infecção das ninfas por isolados de *M. anisopliae*

Os resultados obtidos no item 4.8.1. indicaram que conídios de *M. anisopliae* em suspensão salina, provocam infecção e morte em ninfas de *R. prolixus*. Esses dados são contrastantes aos reportados por SHERLOCK & GUITTON (1982) que concluíram que *M. anisopliae* quando utilizado em suspensão aquosa apresenta baixa infectividade para os triatomíneos ; mas os autores não determinaram a viabilidade e concentração dos conídios empregados e nem qual linhagem utilizaram, sendo provavelmente sua baixa virulência a justificativa de seus resultados.

Através das observações realizadas nas ninfas mortas (Figura 13) e durante o processo de infecção, verificamos que o inseto apresenta diminuição de movimentos, com pouca reação aos estímulos externos e depois de morto, a emergência do fungo é semelhante ao observado por vários autores em diferentes hospedeiros (BALFOUR-BROWNE, 1960; MADELIN, 1963; McCAULEY et alii, 1968; VEEN, 1968; FERRON, 1978; MOURA COSTA, 1978; SHERLOCK & GUITTON, 1982).

Estudos histopatológicos dos exemplares infectados poderão esclarecer o mecanismo patogênico do fungo para *R. prolixus* e em outros triatomíneos.

5.8. Virulência dos isolados

A discussão da virulência dos mutantes e revertentes das linhagens E_9 e V_{14} de *M. anisopliae* baseia-se nos resultados obtidos nos itens 4.8.2.1., 4.8.2.2., 4.8.2.3. e 4.8.2.4.

De acordo com os resultados de LC_{50} ilustrados nas Figuras 14, 15, 16 e 17, pode verificar claramente um efeito direto entre concentração de conídios e mortalidade dos insetos. Apesar das dosagens serem representadas pelo número de conídios esperado para os diferentes isolados, convém mencionar que a quantidade de esporos que aderiram às ninfas deve ter sido bem menor, mas torna-se impraticável o cálculo real de conídios infectantes.

Os valores de LC_{50} das linhagens selvagens E_9 e V_{14} , obtidos nas Tabelas 16 e 17, não podem ser comparados diretamente com os resultados obtidos por MOURA COSTA (1978) que verificou pela primeira vez que *Rhodnius prolixus* é susceptível a *M. anisopliae*, pois não se informa nesse artigo a linhagem utilizada do fungo, concentração de conídios, umidade relativa do ar, temperatura durante o experimento e número de insetos tratados e do controle.

As observações sobre LT_{50} , assemelham-se àquelas feitas para LC_{50} , verificando-se através das Figuras 18, 19, 20 e 21 um efeito direto entre tempo de exposição a conídios e mortalidade dos insetos.

Ressalte-se a importância de calcular LT_{50} , porque somente com a comparação de virulência por LC_{50} , não se estima com precisão o efeito patogênico de uma linhagem, pois o

tempo de mortalidade é um fator importante nos bioensaios , principalmente em aplicações de campo, como salientam BENZ (1971); BURGESS & THOMSON (1971).

Os experimentos de bioensaios realizados, foram tentativamente padronizados para vários fatores como: ausência de mortalidade no controle; temperatura, luz e umidade controladas; mesmo estadio e tamanho semelhante das ninfas e mesmo tempo de regime de fome dessas. Todas essas variáveis podem influenciar os resultados de biotestes, como demonstraram alguns autores para diferentes hospedeiros de fungos entomopatogênicos (VEEN, 1968; ZACHARUK & TILINE, 1968 ; FERRON & ROBERT, 1975; FERRON et alii, 1975; LATCH, 1976 ; MESSIAS et alii, 1980). Sugerimos para futuros estudos, bioensaios em *R. prolixus* e outros triatomíneos, verificando efeitos de sexo, estadios e alimentação das ninfas na suscetibilidade ao patógeno *M. anisopliae*.

As comparações de virulência entre os mutantes, re^uvertentes e linhagens selvagens dos quais foram derivados , foram possíveis através da potência relativa, pois, em todos os casos analisados, observou-se paralelismo das retas de regressão, conforme resultados obtidos nas Tabelas 20, 21 , 22 e 23. Segundo enfatizam vários autores (BLISS, 1935 ; COCHRAN, 1938; LITCHFIELD & WILCOXON, 1949; SCOSSIROLI, 1962; FINNEY, 1971) existe necessidade de ocorrer paralelismo entre as linhas de regressão, para que as diferenças observadas sejam ou não significativas, através da sobreposição dos intervalos de confiança da potência relativa.

Os resultados obtidos de potência relativa dos mutantes e revertentes, derivados das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae*, necessitam uma discussão pormenorizada, como des

crevemos abaixo.

5.8.1. Virulências dos mutantes amilase⁻ e re⁻vertentes amilase⁺

Foi constatado que os mutantes amilase⁻ das linhagens E₉ e V₁₄ apresentam virulência menor que o tipo selva-gem e que reversão, dessa marca, restabelece a virulência. Esses resultados nos permite concluir que há uma relação entre virulência e amilase extracelular. EVLAKHOVA (1966), reportou atividade amilolítica de fungos entomopatogênicos relacionada à patogenicidade; a mesma conclusão foi obtida por AL-AIDROOS & SEIFERT (1980) que conseguiram obter mutantes de *M. anisopliae* que aumentavam degradação de amido e mostravam ser hipervirulentas a *Culex pipiens pipiens* em ensaios de laboratório.

A explicação possível para relacionar exoenzima amilase e virulência pode ser devido a reserva de carboidrato de *R. prolixus* estar na forma de glicogênio (WIGGLESWORTH, 1967) o qual é degradado pela amilase e transformado em trehalose, o qual circula na hemolinfa conforme FLORKIN & JEUNIAUX (1974). Assim, o fungo "in vivo" poderia utilizar o glicogênio e acelerar a invasão dos tecidos do inseto. Entretanto, HEALE (1984) verificou que uma linhagem de *Verticillium lecanii* era altamente virulenta a afídios, mas não produtora de exoenzima amilase e, isso pode estar relacionado ao tipo de hospedeiro e fungo, mostrando que essa característica exoenzimática não pode ser generalizada.

5.8.2. Virulência dos mutantes lipase⁻ e revertentes lipase⁺

Os mutantes lipase⁻ das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* apresentaram virulência menor à ninfas de *R. prolixus* e os revertentes lipase⁺ a restabeleceu, num nível semelhante ao tipo normal ou selvagem. Desse modo, a produção de exoenzima lipase e virulência, nessas linhagens e hospedeiro citado, estão relacionadas. Tal conclusão é apoiada também pelo fato da cutícula de ninfas de *R. prolixus* ser constituída fundamentalmente de quitina, proteínas e lipídios (WIGGLESWORTH, 1967) e, a exolipase, teria papel na digestão de lipídios da epicutícula, facilitando a penetração do fungo no corpo do hospedeiro. KOIDSUMI (1957) foi o primeiro autor que evidenciou o papel dos lipídios em larvas de *Chilo simplex* (Lepidoptera: Pyralidae) como barreira na cutícula para penetração de *Aspergillus flavus* e outros fungos e constatou que a remoção da epicutícula facilitava a penetração dos entomopatógenos. Entretanto, ROBINSON (1966) contestou tais resultados, pois argumentou que a remoção da epicutícula levaria a um aumento na mortalidade dos insetos hospedeiros e verificou que a remoção de lipídios da epicutícula em *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) por solventes orgânicos, não facilitava a penetração de diferentes fungos, mas admitiu que os resultados conflitantes originavam-se do uso de diferentes insetos. Vários autores (SAMŠIŇÁKOVÁ et alii 1971; SAMŠIŇÁKOVÁ & MIŠIKOVÁ, 1973; PEKRUL & GRULA, 1979; SMITH et alii, 1981) enfatizam para diferentes hospedeiros e fungos entomopatogênicos, a importância da lipase

na penetração da cutícula pelo fungo através da digestão de lipídios na epicutícula. Contudo, relação entre atividade lipolítica e virulência, foi verificado somente no fungo *Beauveria tenella* infectando *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabeidae), como reportado por SECRETAIN et alii (1971) ; PARIS & SECRETAIN (1975 e 1978); PARIS et alii (1975); PARIS & FERRON (1979).

5.8.3. Virulência dos mutantes protease⁻ e revertentes protease⁺

Os mutantes protease⁻ das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* apresentaram virulência atenuada em relação ao tipo selvagem, entretanto, essa não foi estatisticamente significativa. Os revertentes protease⁺, melhoraram sua virulência em níveis semelhantes às linhagens padrões. A ausência de significância estatística na virulência dos mutantes protease⁻, pode ser explicada pelo fato de não conseguirmos mutantes com índices enzimáticos iguais a um, o que ocorreram com os mutantes amilase⁻ e lipase⁻. Isso implica que a exo-protease estimada semiquantitativamente foi maior que as exo-enzimas amilase e lipase, conseqüentemente a virulência diminuiu, mas não tanto como a dos mutantes amilase⁻ e lipase⁻. Também pode-se explicar que a exoenzima protease não tem como amilase e lipase, relação com a virulência. A respeito de produção de enzima extracelular protease e virulência da linhagem, artigos conflitantes foram reportados para diferentes patógenos e hospedeiros. Alguns autores não encontraram

associação entre esses fatores (WRETLIND & KRONEVI, 1978 ; AL-AIDROOS & SEIFERT, 1980; JARREL & KROPINSKI, 1982); outros verificaram relação inversa (PARIS & SEGRETAINE, 1975) mas contudo nenhum justificou seus resultados encontrados.

Inquestionavelmente, atividade proteolítica é importante na penetração do integumento pelo fungo, (SAMŠIŇÁKOVÁ et alii, 1971; SAMŠIŇÁKOVÁ & MIŠIKOVÁ, 1973; PEKRUL & GRULA, 1979; SMITH et alii, 1981) pois proteínas são elementos constituintes comuns em toda cutícula de artrópodos e sua digestão é um dos eventos necessários para o processo de invasão do entomopatógeno.

O isolamento de mutantes quitinase⁻ e revertentes quitinase⁺ poderia complementar o estudo das principais exoenzimas que atuam na virulência. A análise em conjunto dos mutantes e revertentes através de técnicas histopatológicas poderiam esclarecer pontos obscuros no processo de infecção e colonização do hospedeiro pelo fungo.

6. CONCLUSÕES

Dos experimentos realizados e de acordo com os resultados obtidos e discutidos, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

1. A luz ultravioleta foi agente mutagênico efetivo a *M. anisopliae*, permitindo a obtenção de diferentes mutantes para não produção de exoenzimas amilase, lipase e com baixa produção de protease. Induziu também reversão ou supressão dessas marcas, restabelecendo o fenótipo exoenzimático.

2. Eletroforese para padrões de α -esterase, revelou que somente os mutantes lipase⁻ sofreram alteração e que os revertentes lipase⁺ não restabeleceram o padrão normal para essa isoenzima.

3. Os aspectos citológicos comprimento de conídios e número de núcleos por conídio nos mutantes e revertentes, revelaram que a luz ultravioleta não produziu efeitos pleiotrópicos nessas características morfológicas.

4. Os mutantes e revertentes apresentaram taxa de germinação de conídios em MC, semelhante aos tipos selvagens dos quais foram derivados.

5. Os mutantes amilase⁻ e lipase⁻, apresentaram índices enzimáticos iguais a um, não detectando-se halos, ao passo que os mutantes protease⁻ mostraram halos reduzidos, portanto com índices enzimáticos diferentes de um.

6. Os bioensaios dos mutantes a *R. prolixus*, revelaram que os mutantes amilase⁻ e lipase⁻ apresentaram virulência menor que os tipos selvagens. Os mutantes protease⁻ mostraram virulência que não foi diferente estatisticamente.

7. A virulência de todos os revertentes foi restabelecida a níveis semelhantes aos tipos selvagens.

8. A virulência de *M. anisopliae* var. *anisopliae* a *R. prolixus* é alterada em função de modificações na produção de exoenzimas e isso é promissor no controle de triatomíneos.

7. RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar através do índice enzimático, a obtenção de diferentes mutantes de *M. anisopliae* para não produção de exoenzimas amilase, lipase e protease e revertentes, utilizando luz ultravioleta. Também procurou-se caracterizar os mutantes e revertentes exoenzimáticos, através de eletroforese para os padrões de α -esterase e aspectos citológicos como comprimento de conídios e número de núcleos por conídio. Por fim, determinou-se a virulência dos mutantes e revertentes a ninfas de 3º estadio de *Rhodnius prolixus*. Para isso, empregaram-se as linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Os mutantes amilase⁻ e lipase⁻ apresentaram índices enzimáticos iguais a um, o que não ocorreram com os mutantes protease⁻. Todos os revertentes apresentaram fenótipo exoenzimático semelhante aos tipos selvagens. Não houve alteração na germinação, comprimento de conídios e número de núcleos por conídio dos mutantes e revertentes. O padrão eletroforético de α -esterase mostrou-se diferente somente nos mutantes lipase⁻, entretanto não houve alteração para os revertentes correspondentes lipase⁺. A virulência dos mutantes amilase⁻ e lipase⁻ diminuiu significativamente, enquanto os mutantes protease⁻, não mostraram redução significativa. Os revertentes restabeleceram a virulência em níveis semelhantes aos tipos selvagens.

8. SUMMARY

The present work was conducted in order to study by means of enzymatic index the obtainment of mutants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* strains E₉ and V₁₄ which lost or had some reduction in their capability to produce extracellular enzymes namely amylases, lipases and proteases as well their reversion induced by ultraviolet light.

The mutants and revertants were characterized electrophoretically for α -esterase pattern and cytologically for conidia size as well as number of nuclei.

The virulence of mutants and revertant strains were evaluated in bioassays against third instar nymphae of *Rhodnius prolixus*. The mutant strains for amylase and lipase showed enzymatic indexes equal to one but the same was not observed for the proteolytic mutant. The revertant strains were phenotypically similar to their parental strains, and it was not observed variation in length, germination and number of nuclei per conidia for both mutants and their revertants.

The electrophoretic pattern for α -esterases was similar for most of the studied strains except for the mutant showing deficiency for lipolytic activity.

The virulence of amylolytic and lipolytic mutants were reduced when compared to their parental strain, while

the proteolytic mutants did not show any significant reduction.

The virulence was restored for all revertant strains.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZAWA, K. Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. In: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W., eds. *Microbial Control of Insects and Mites*. London, Academic Press, 1971. Cap. 30, p. 655-672.

AL-AIDROOS, KAREN M, & ROBERTS, D.W. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 20: 211-9, 1978.

_____. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 22: 309-14, 1980.

_____ & SEIFERT, A.M. Polysaccharide and protein degradation, germination, and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 36: 29-34, 1980.

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

ANDERSEN, S.O. Biochemistry of insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol.*, 24: 29-61, 1979.

ARRAIS DE MATOS, A.J. Crescimento, germinação, conidiação e resistência a luz ultravioleta de linhagens de *Metarhizium anisopliae*. Campinas, 1983. 78p. Tese de Mestrado. UNICAMP.

AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de Genética. Orgs. São Paulo, Ed. Nacional, EDUSP, 1973. p. 288.

& MESSIAS, C.L. Tamanho de conídios em diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*. Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol., (2): 5-8, 1981.

BALFOUR-BROWNE, F.L. The green muscardine disease of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea. Proc. R. Ent. Soc. Lond. (A) 35: 65-74, 1960.

BARACHO, I.R. & ROSIM, REGINA, T. Tabela por la kalkulado de MD₉₅, en fungoj. Sciencia Revuo, 28: 223-6, 1977.

BARON, G. The genera of hyphomycetes from soil. Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1968. 686p.

BECKEL, W.E. & FRIEND, W.G. The relation of abdominal distension and nutrition to molting in *Rhodnius prolixus* (Stahl) (Hemiptera). Can. J. Zool., 42: 71-8, 1964.

BENNET-CLARK, H.C. Active control of the mechanical properties of insect endocuticle. J. Insect Physiol., 8: 627-33, 1962.

- _____. The relation between epicuticular folding and the subsequent size of an insect. *J. Insect Physiol.*, 9: 43-6, 1963.
- _____. The cuticle as a template for growth in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, 17: 2421-34, 1971.
- BENZ, G. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W. eds. *Microbial Control of Insects and Mites*. London, Academic Press, 1971. Cap. 14, p. 327-55.
- BERGERON, DOMINIQUE & AL-AIDROOS, KAREN, M. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 643-51, 1982.
- BLISS, C.I. The comparison of dosage-mortality data. *Ann. Appl. Biol.*, 22: 134-67, 1935.
- BONATELLI Jr., R.; AZEVEDO, J.L. & VALENT, GISELA, U. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Rev. Bras. Genet.*, 6: 399-405, 1983.
- BONVENTRE, P.F.; LINCOLN, R.E. & LAMANNA, C. Status of bacterial toxins and their nomenclature: need for discipline and clarity of expression. *Bact. Rev.*, 31: 95-109, 1967.
- BURGESS, H.D. & THOMSON, E.M. Standardization and assay of microbial insecticides. In: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W. eds. *Microbial Control of Insects and Mites*. London, Academic Press, 1971. Cap. 27, p. 591-622.

- BURNETT, J.H. *Mycogenetics*. London, John Wiley and Sons, 1975. 375p.
- BUSH, G.L. & HUETTEL, R.N. *Starch gel electrophoresis of tephritid proteins*. International Biological Programme, ed., 1972, 56p.
- BUXTON, P.A. Biology of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Trans. Ent. Soc. London*, 78: 227-36, 1930.
- CARCAVALO, R.V. Aspects of the epidemiology of Chagas disease in Venezuela and Argentina. In: *New Approaches in American Trypanosomiasis Research*, Proc. Int. Symp. Pan Am. Health Organ. Sci. Publ. n° 318, p. 347-58, 1976.
- CHAMPLIN, F.R. & GRULA, E.A. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 1122-5, 1979.
- _____; CHEUNG, P.Y.K.; PEKRUL, S.; SMITH, R.J. ; BURTON, R.L. & GRULA, E.A. Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for the pecan weevil. *J. Econ. Entomol.*, 74: 617-21, 1981.
- CHENG, W.Y. & CHEN, C.B. Preliminary studies on green muscardine fungus. *Rep. Taiwan Sug. Exp. Stn.*, 29: 72-3, 1962.

- CHEUNG, P.Y.K. & GRULA, E.A. In vivo events associated with entomopathology of *Beauveria bassiana* for the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 303-13, 1982.
- CLARCK, NANCY. The effect of temperature and humidity upon the eggs of the bugs *Rhodnius prolixus*. *J. Anim. Ecol.*, 4: 82-7, 1935.
- CLAYDON, N. Insecticidal secondary metabolites from entomogenous fungi: *Entomophthora virulenta* on *Calliphora erythrocephala*. *J. Invertebr. Pathol.*, 32: 319-23, 1979.
- COCHRAN, W.G. The problem of the evaluation of Rotenone containing plants (Appendix). *Ann. Appl. Biol.*, 25: 426-9, 1938.
- CORREA, G.S. Influência da radiação ultravioleta na germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no solo. *Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol.*, (3): 8-9, 1982.
- COSTA, C. Interação entre supressores de mutantes para deficiência em ácido nicotínico em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1981. 94p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- CRISAN, E.V. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarhizium* spores in mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 17: 260-4, 1971.

DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Virulence of natural and insect-passaged strains of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 107-17, 1982.

& ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, 41: 143-50, 1983a.

& ROBERTS, D.W. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, 41: 161-70, 1983b.

De CONTI, ELIANE; MESSIAS, C.L.; SOUZA, HEBE MYRINA L. de & AZEVEDO, J.L. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, 36: 293-4, 1980.

DIAS, E. & SILVA PINTO, O. Combate ao *Triatoma* com BHC, na cidade de Bambuí, MG. *Rev. Brasil. Med. Doenças Trop.*, 4: 62-4, 1952.

DIAS, J.C.P. & LEÃO, A.E. de A. Parasitismo de fungos (*Beauveria bassiana*) sobre triatomíneos brasileiros criados em laboratório. *Atas Soc. Biol. (Rio de Janeiro)*, 11: 85-87, 1967.

- DIOMANDÉ, T. Contribution à l'étude du développement de la muscardine verte à *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Fungi Imperfecti) des larves d'*Oryctes monoceros*. *Bull. Inst. Fondam. Afr. Noire*, Ser A, 21: 1381-405, 1969.
- DURIEZ-VAUCELLE, T.; FARGUES, S.J.; ROBERT, P.H. & POPEYE, R. Étude enzymatique comparée de champignons entomopathogènes des genres *Beauveria* et *Metarhizium*. *Mycopathologia*, 75: 109-26, 1981.
- EVLAKHOVA, A.A. Experimental enhancement of the virulence of entomopathogenic fungi by the action of chemical and physical factors. *Tr. Mosk. Obshchest. Ispyt. Priro. Fed. Biol.*, 22: 257-62, 1966.
- FARGUES, J. Étude des conditions d'infection des larves de Doryphores *Leptinotarsa decemlineata* say par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Fungi Imperfecti). *Entomophaga*, 17: 319-37, 1972.
- _____; DURIEZ; THÉRÈSE; ANDRIEV, SUZANNE, POPEYE, RÉJANE & ROBERT, P. Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (Delacr.) Siem, Champignon Hyphomycète entomopathogène. *C.R. Acad. Sc.*, Paris, Ser. D, 281: 1781-4, 1975.
- _____ & REMAUDIERE, G. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia*, 62: 31-7, 1977.

- _____ ; DURIEZ, THÉRÈSE; POPEYE, REJANE; ROBERT, P. & BIGUET, J. Immunological characterization of the entomopathogenic hyphomycetes *Beauveria* and *Metarhizium*. Comparison of strains. *Mycopathologia*, 75: 101-8, 1981.
- FELICIANGELI, D. & RABINOVICH, J.E. Efecto de la densidad en *Coencyrtus trinidadensis*, un parasito endófago de los huevos de *Rhodnius prolixus*, vector de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 19: 21-34, 1977.
- FERRON, P. Étude en laboratoire des conditions écologiques favorisant le développement de la mycose à *Beauveria tenella* du ver blanc. *Entomophaga*, 12: 257-93, 1967.
- _____ & ROBERT, P.H. Virulence of entomopathogenic fungi (Fungi imperfecti) for the adults of *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 25: 379-88, 1975.
- _____ ; ROBERT, P.H. & DEOTTE, A. Susceptibility of *Orcytes rhinoceros* adults to *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 25: 313-20, 1975.
- _____. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.*, 23: 409-42, 1978.
- FINCHAM, J.R.S. & DAY, P.R. *Fungal Genetics*. 3th. Ed. Oxford, England, Blackweel Scientific Publications, 1971. 401p.

- FINNEY, D.J. *Probit analysis*. 3th. Ed. Cambridge, Un. Press, 1971, 333p.
- FISHER, R.A. & YATES, F. *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*. 2th. Ed., Lond. , Oliver and Boyd, 1943, 150p.
- FOSTER, J.V. & DAVIS, H. Detection and ocurrence of acid producing fungi. *Bull. Torrey Bot. Club*, 76: 174-6 , 1949.
- FOX, C.J.S. & JAQUES, R.P. Note on the green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., as a control for wireworms. *Can. Entomol.*, 90: 314-5, 1958.
- FLORKIN, M. & JEUNIAUX, C. Hemolymph: composition. In: ROCKSTEIN, M. ed. *The physiology of Insecta*. New York, Academic Press, 1974; p.255-307.
- FREITAS, J.L.P. Resultados da aplicação de Rhodiatox e Gammexane contra triatomíneos. Observações sobre o poder residual. *Rev. Paul. Med.*, 36: 235-44, 1950.
- FRIEDERICH, K. Die Grundfragen und Gesetzmässigkeiten der Landund Forstwirtschaftliche zoologie insbesondere der entomologie. II Bd. *Wirtschaftliches Teil*. P. Parey , Berlin, p. 463, 1930. Apud TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 66: 407-11, 1976.

FRIEND, W.G.; CHOY, C.T.H. & CARTWRIGHT, E. The effect of nutrient intake on the development and eggs production of *Rhodnius prolixus* stal. *Can. J. Zool.*, 43: 891-904, 1965.

FRIGO, S.M. Variabilidade e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 119p. Tese de Doutorado ESALQ/USP.

GABRIEL, B.P. Enzymatic activities of some Entomophthorous fungi. *J. Invertebr. Pathol.*, 11: 70-81, 1968a.

. Histochemical study of the insect cuticle infected by the fungus *Entomophthora coronata*. *J. Invert. Pathol.*, 11: 82-9, 1968b.

GARCIA, ANGELA ESPIN; MESSIAS, C.L.; SOUZA, HEBE MYRINA, L. & PIEDRABUENA, A.E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a *Ceratitis capitata* (wield.) (Diptera-Tephritidae) *Rev. Bras. Ent.*, 1984 (no prelo).

; BARACHO, I.R.; SOUZA, HEBE MYRINA, L. & MESSIAS, C.L. Virulência de linhagens mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* em *Ceratitis capitata* (wield) (Diptera-Tephritidae). *Rev. Bras. Ent.*, 1985 (no prelo).

GRULA, E.A.; BURTON, R.L.; SMITH, REBECCA; MAPES, T.L. ;
 CHEUNG, P.Y.K.; PEKRUL, SUE; CHAMPLIN, F.R.; GRULA, MARY
 & ABEGAZ, B. Biochemical basis for entomopathogenicity
 of *Beauveria bassiana*. Conference on the production ,
 selection and standardization of entomopathogenic fungi
 of Project V, Microbiological control of insects pests ,
 of the US/USSR joint working group on the production of
 substances by microbiological means. Conf. Riga, Latvia.
 SSR, May-20-21, 1978. p.192-216.

_____ ; WOODS, S.P. & RUSSEL, H. Studies utilizing
Beauveria bassiana as an entomopathogen. In: ROBERTS ,
 D.W. & AIST, J.R. Eds. *Infection Processes of Fungi*.
 USA, The Rockefeller Foudation, 1984. p.147-52.

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

HACKMAN, R.H. Expanding abdominal cuticle in the bug
Rhodnius and the tick *Boophilus*. *J. Insect Physiol.* ,
 21: 1616-23, 1975.

_____. Structure and function in tick cuticle .
Ann. Rev. Entomol. 27: 75-95, 1982.

HALL, R.A. Effect of repeated subculturing on agar and
 passaging through and insect host on pathogenicity ,
 morphology and growth rate of *Verticillium lecanii*. *J.*
Invertebr. Pathol., 36: 216-22, 1980.

- HAMILL, R.L.; HIGGENS, C.E.; BOAZ, H.E. & GORMAN, M. The structure of Beauvericin, a new antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett.*, 49: 4255-8, 1969.
- HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597-607, 1975.
- HARRINGTON, J.S. Studies on *Rhodnius prolixus*: growth and development of normal and sterile bugs, and the symbiotic relationship. *Parasitology*, 50: 279-86, 1960.
- HARTMAN, P.E. & ROTH, J.R. Mechanisms of suppression. In: CASPARI, E.W. Ed. *Advances in Genetics*. New York and London, Academic Press, 1973. Vol. 17, 516p.: 1-105.
- HILLERTON, J.E. Changes in the structure and composition of the extensible cuticle of *Rhodnius prolixus* through the 5th larval instar. *J. Insect Physiol.*, 24: 399-412, 1978.
- HÜBER, J. Untersuchungen zur physiologie insektentötender pilze. *Arch. Mikrobiol.*, 29: 257-76, 1958.
- IKEDA, Y.; NAKAMURA, K.; UCHIDA, K. & ISHITANI, G. Two attempts upon improving an industrial strain of *Aspergillus oryzae* through somatic recombination and polyploidization. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 3: 93-101, 1957.

- JARREL, K.F. & KROPINSKI, A.M. . The virulence of protease and cell surface mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for the larvae of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 395-400, 1982.
- JOHNSTON, J.R. The entomogenous fungi of Porto Rico. *P. R. Bd. Comm. Agr. Bull.* 10: 1-33, 1915.
- KAMAT, M.N.; PATEL, M.K. & DHANDE, G.W. Ocurrence of the green muscardine fungus on *Pyrilla* species in Bombay . *Curr. Sci.* 21: 317, 1952.
- KANAOKA; M.; ISOGAI, A.; MURAKOSHI, S.; ICHINOE, M.; SUZUKI, A. & TAMURA, S. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Agric. Biol. Chem.*, 42: 629-35, 1978.
- KAWAKAMI, K. On the change of characteristics of the silkworm muscardines through successive cultures. *Bull. Sericult. Exp. Sta.*, 26: 83-99, 1960.
- KNIPLING, E.F. The sterility principle of insect population control. In: *Proceedings International Congress of Entomology*, 12. London, 1964. *Abstracts.* p. 10-11.
- KODAIRA, Y. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworms, *Bombyx mori*. *J. Fac. Textile Sericult.* , 29: 1-68, 1961a.

- _____. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. *Agr. Biol. Chem.*, 25: 261-2, 1961b.
- _____. Studies on the new toxic substances to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. *Agr. Biol. Chem.*, 26: 36-42, 1962.
- KOIDSUMI, K. Antifungal action of cuticular lipids in insects. *J. Insect Physiol.*, 1: 40-51, 1957.
- KÜČERA, M. & SAMŠIŇÁKOVÁ, ANNA. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 316-20, 1968.
- _____. Protease from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 35: 304-10, 1980.
- _____. Inhibition of the proteases from *Metarhizium anisopliae* by extracts of *Galleria mellonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 40: 299-300, 1982.
- LATCH, G.C.M. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. *N.Z. Jl. Agric. Res.* 8: 384-96, 1965.

- _____. Studies on the susceptibility of *Oryctes rhinoceros* to some entomogenous fungi. *Entomophaga*, 21: 31-8, 1976.
- LATGÉ, J.P.; SAMPEDRO, L. & HALL, R. Agressivité de *Conidiobolus obscurus* vis-a-vis du puceron du pois. III. Activités enzymatiques exocellulaires. *Entomophaga*, 29: 185-201, 1984.
- LEITE, B. & MESSIAS, C.L. Atividade enzimática para linhagens de *Metarhizium anisopliae*. *Cien. Cult.*, 36: 814 , 1984.
- LENT, H. Estado atual dos estudos sobre os transmissores da doença de Chagas. *An. Congr. Int. Doença de Chagas*. 3: 739-70, 1962.
- _____. & JURBERG, J. O gênero "*Rhodnius*" Stal , 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies. *Rev. Bras. Biol.*, 29: 487-560, 1969.
- LEOPOLD, J. & SAMŠIŇÁKOVÁ, ANNA. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 34-42 , 1970.
- LIHNELL, D. Grönmykos Försärsaked av *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. II Fysiologiska undersökningar över grönmykosens svamp. Stat. Västskyddsanst. *Stockholm Meddel.*, 43: 59-90, 1944.

LYSENKO, O. & KÜČERA; M. Micro-organisms as sources of new insecticidal chemicals: toxins. In: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W. Eds. *Microbial Control of Insects and Mites*. London, Academic Press, 1971. cap. 9, 205-227.

MADELIN, M.F. Disease caused by Hyphomycetous fungi. In: STEINHAUS, E.A. ed. *Insect Pathology*. New York, Academic Press, 1963. V.2, Cap. 7, p. 233-71.

_____. Fungal parasites of invertebrates. I. Entomogenous fungi. In: AINSWORTH, G.C. & SUSSMAN, A.S. eds. *The Fungi*. New York, Academic Press, 1968. p. 227-38.

MAGOON, JOANNE & AL-AIDROOS, KAREM M. Determination of ploidy of sectors formed by mitotic recombination in *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 82: 95-8, 1984.

MARINKELLE, C.J. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* Stal in nature (Hemiptera, Reduviidae, and Kinetoplastida: Trypanosomidae). *J. Med. Entomol.*, 5: 497-9, 1968.

MASERA, E. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, a parasita del baco da seta. *Ann. Sper. Agr.*, 11: 281 - 95, 1957.

- MATTA, E.A.F. & OLIVEIRA, M.Z.A. Efeito da luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., "in vitro". In: *Congresso Latinoamericano de Entomologia*, 3., *Congresso Brasileiro de Entomologia*, 5. Salvador, Bahia, 1978. *Resumos*. p. 75.
- MCCAULEY, V.J.E.; ZACHARUK R.Y. & TINLINE, R.D. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of elateridae (Coleoptera). *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 444-59, 1968.
- MESSIAS, C.L. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, 1977. 75p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- _____; AZEVEDO, J.L.; De CONTI, ELIANE & SOUZA, HEBE MYRINA L. de. Aspectos biológicos e indução de mutantes em *Metarhizium anisopliae*. In: *Congresso Latinoamericano de Entomologia*, 3., *Congresso Brasileiro de Entomologia*, 5., Salvador, Bahia, 1978. *Resumos*. p. 69.
- _____. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1979, 73p. Tese de Doutoramento, ESALQ/USP.
- _____ & AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 75: 473-7, 1980.

- _____ ; DAOUST, R.A. & ROBERTS, D.W. Effects of humidity and fungal strains on infection of *Rhodnius prolixus*. In: *Annual Meeting of Society of Invertebrate Pathology*, XII. Seattle, Washington, USA, may, 1980. *Abstracts*.
- _____ ; ROBERTS, D.W. & GREFIG, A.T. Pyrolysis-gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*: an aid to strain indentification. *J. Invertebr. Pathol.*, 42: 393-6, 1983.
- MIRANDA FILHO, J.B. Supressores do mutante nic_8 em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1972. 82p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- MOHAMED, A.K.A.; SIKOROWSKI, P.P. & BELL, J.V. Histopathology of *Nomuraea rileyi* in the larvae of *Heliothis zea* and in vitro enzymatic activity. *J. Invertebr. Pathol.*, 31: 345-52, 1978.
- MONTEIRO, A.C. Isolamento e caracterização genética de supressores do mutante $nicB_8$ em *Aspergillus nidulans*. Piracicaba, 1979. 145p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- MOURA-COSTA, M.D. Infecção experimental de *Rhodnius prolixus* (barbeiro), criado em laboratório, pelo fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. In: *Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 6., Salvador, Bahia, 1975. Resumos. p. 309.

- _____. Suscetibilidade do triatomíneo *Rhodnius prolixus* ao fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. *An. Acad. Med. (Bahia)*, 1: 35-44, 1978.
- MÜLLER-KÖGLER; E.A. Nebenwirkungen insektenpathogener Pilze auf Mensch und Wirbeltiere: Aktuelle Fragen. *Entomophaga*, 12: 429-41, 1967.
- MURAKOSHI, S.; ICHINDE, M.; SUZUKI, A.; KANAOKA, M.; ISOGAI, A. & TAMURA, S. Presence of toxic substance in fungus bodies of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Appl. Ent. Zool.*, 13: 97-102, 1978.
- MURAYAMA, MARINA Y.; ALVES, S.B. & ALMEIDA, L.C. Efeito de repicagens em meio de arroz na patogenicidade, morfologia e produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sork. *Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol.*, (3): 5, 1982.
- NAGAICH, B.B. *Verticillium* species pathogenic on aphids. *Indian Phytopathol.*, 26: 163-5, 1973.
- OKINO, LINDALVA A.; SILVA, J.C.; SANTOS, ALDA L. LOUREIRO ; MESSIAS C.L. & AZEVEDO, J.L. Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. *O Solo*, 70: 32-6, 1978.
- PAES DE BARROS, J. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, 1977. 81p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.

PAPA, K.E. The parasexual cycle in *Aspergillus flavus* .

Mycologia, 68: 1201-5, 1973.

_____. The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*.

Mycologia, 70: 766-73, 1978.

PARIS, SOPHIE & SEGRETAINE, G. Caractères physiologiques de *Beauveria tenella* en rapport avec la virulence de souches de ce champignon pour la larve du hanneton commun., *Melolontha melolontha*. *Entomophaga*, 20: 135-8, 1975.

_____; BIZZINI, B. & SEGRETAINE, G. Purification d'une protéine caractéristique des souches pathogènes de *Beauveria tenella*. *Ann. Microbiol.*, 126: 193-202, 1975.

_____ & SEGRETAINE, G. Étude de l'activité lipasique-estérasique intracellulaire de *Beauveria tenella*. *Ann. Microbiol.*, 129: 133-45, 1978.

_____ & FERRON, P. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria brongniartii* (= *Beauveria tenella*). *J. Invertebr. Pathol.*, 34: 71-7, 1979.

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

- PEKRUL, S. & GRULA, E.A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *J. Invertebr. Pathol.*, 34: 238-47, 1979.
- PENALVA DA SILVA, F. & AZEVEDO, J.L. Esterase pattern of a morphological mutant of the Deuteromycete, *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 81: 161-3, 1983.
- PEREIRA, J.O. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, 1978. 108p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. A eficácia de expurgo domiciliário com Hexachlorociclohexana no controle do vetor da doença de Chagas. *Rev. Brasil. Mariol. Doenças Trop.*, 6: 63-100, 1954.
- _____. A eficácia do expurgo domiciliário com Dieldrin no controle do vector da doença de Chagas. *Rev. Brasil. Mariol. Doenças Trop.*, 8: 289-304, 1955.
- _____ & CORREIA, M.A. Induction of male sterility through manipulation of genetic mechanisms present in vector species of Chagas disease (remarks on integrating sterile-male release with insecticidal control measures against vectors of Chagas disease). *Rev. Inst. Med. Trop.*, 14: 360-71, 1972.

_____. Laboratory colonies of *Triatominae*, biology and population Dynamics. In: *New Approaches in American Trypanosomiasis Research, Proc. Int. Symp. Pan. Am. Health Organ. Sci. Publ.*, nº 318, p. 63-82, 1976.

PETCH, T. Notes on entomogenous fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 16: 55-75, 1931.

PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. 6ª Ed. Piracicaba, S.P., Livraria Nobel S/A., 1976. 430p.

PIÑERO, D.F. Control biológico: una nueva alternativa en la lucha contra *Rhodnius prolixus*, principal vector de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol. Dir. Malar. Saneam. Ambiental*, 16: 367-73, 1976.

_____ & TORREALBA, J.W. Observaciones sobre *Rhodnius prolixus* en su biotopo silvestre *Copernitia tectorum*. *Bol. Dir. Malar. Saneam. Ambiental*, 17: 198-205, 1977.

PONTECORVO, G. & ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploid in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, 6: vii, 1952.

_____; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MCDONALD, K.D. & BUFTON, W.F.C. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5: 141-238, 1953.

- PUPIN, A.M. & MESSIAS, C.L. Ácidos graxos em diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae* como ajuda para identificação. *Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol.*, (5): 12, 1984.
- PRASERTPHON, S. & TANADA, Y. Mycotoxins of entomophthoraceous fungi. *Hilgardia*, 39: 581-600, 1969.
- REYNOLDS, S.E. The mechanical properties of the abdominal cuticle of *Rhodnius* larvae. *J. Exp. Biol.*, 62: 69-80, 1975.
- RIBA, G.; GLANDARD, ANNICK; RAVELOJAONA, ANNE-MARIE & FERRON, P. Isolement de recombinaisons mitotiques stables de type "intermédiaire" chez *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) par hybridation de biotypes sauvages. *C.R. Acad. Sc. Paris, Sér. D.*, 281: 657-60, 1980.
- ROBERTS, D.W. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. I. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. *J. Invertebr. Pathol.*, 8: 212-21, 1966a.
- _____. Toxins of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. II. Symptoms and detection in moribund hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 8: 222-7, 1966b.
- _____. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*: Isolation of destruxins from submerged cultures. *J. Invertebr. Pathol.*, 14: 82-8, 1969.

- _____. *Coelomomyces, Entomophthora, Beauveria* ,
and *Metarhizium* as parasites of mosquitoes. *Misc. Publ.*
Entomol. Soc. Amer. 7: 140-55, 1970.
- _____ & YENDOL, W.G. Use of fungi for microbial
control of insects. In: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.D. eds.
Microbial Control of Insects and Mites. London, Academic
Press, 1971. Cap. 5, p.125-49.
- _____ & CAMPBELL, A.S. Stability of entomopathogenic
fungi. *Misc. Publ. Ent. Soc. Am.*, 10: 19-76, 1977.
- _____. Toxins. In: BURGESS, H.D. ed. *Microbial*
Control of pests and plant diseases. New York, Academic
Press, 1981. p.441-464.
- _____ & HUMBER, R.A. Entomopathogenic fungi.
In: ROBERTS, D.W. & AIST, J.R. eds. *Infection Process*
of Fungi. USA, The Rockefeller Foundation, 1984. p. 1-12.
- ROBINOW, C.F. & CATEN, C.E. Mitosis in *Aspergillus nidulans* .
J. Cell. Sci., 5: 403-31, 1969.
- ROBINSON, R.K. Studies on penetration of insect integument
by fungi. *Pest. Art. News Summ.* Sect. B., 12: 131-
42, 1966.
- ROPER, J.A. Production of heterozygous diploids in
filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14-5, 1952.

ROSATO, YOKO B.; MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Production of extracellular enzymes in isolates of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 1-3, 1981.

SAMŠIŇÁKOVÁ, ANNA; MIŠIKOVÁ, SYLVIE & LEOPOLD, J. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *J. Invertebr. Pathol.*, 18: 322-30, 1971.

_____ & MIŠIKOVÁ, SYLVIE. Enzyme activities in certain entomophagous representatives of Deuteromycetes (Moniliales) in relationship to their virulence. *Ceska Mykol.*, 27: 55-60, 1973.

_____ & KÁLALOVÁ, S. The influence of a single-spore isolate and repeated subculturing on the pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 42: 156-61, 1983.

SANTOS, ALDA L. LOUREIRO. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sork. Piracicaba, 1978, 148p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.

SCHAERFFENBERG, B. Zur Biologie und Ökologie des insektentötenden Pilzes *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Z. Angew. Ent.*, 44: 262-71, 1959.

_____. Biological and environmental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. *J. Insect. Pathol.*, 6: 8-20, 1964.

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

SEGRETAİN, G.; PARIS, SOPHIE; FERRON, P. & ARCOUTEIL, A. Rapport entre la pathogénicité de *Beauveria tenella* (Delacr.) Siemaszko pour la larve du hanneton *Melolontha melolontha* L. et la présence d'un arc de précipitation en immunoélectrophorèse. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. D.*, 273: 140-2, 1971.

SCHABEL, H.G. Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 27: 377-83, 1976.

SHERLOCK, I.A. Vetores. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z.A. eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara, Koogan, 1979, cap. 2, p. 42-88.

_____. & GUITTON, N. Observações sobre ação do fungo *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff sobre algumas espécies de triatominae. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 24: 234-39, 1982.

SILVA, J.C. Seleção de *Aspergillus niger* para produção de ácidos. Campinas, 1977. 91p. Tese de Mestrado. UNICAMP.

- _____; MESSIAS, C.L. & BARACHO, I.R. Tamanho de conídios e produção de algumas enzimas extracelulares de *Metarhizium anisopliae* proveniente de inseto e meio de cultura. *Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol.*, (3): 14-5, 1982.
- _____; MESSIAS, C.L. & PIEDRABUENA, A.E. Virulência de alguns mutantes de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*. *Cienc. Cult.*, 35: 703, 1983.
- _____; MESSIAS, C.L. Virulência de alguns mutantes de *M. anisopliae* em *Rhodnius prolixus* e obtenção de revertentes. In: *Reunião Anual de Genética de Microorganismos*, 11. Londrina, Paraná, 1984a. Resumos nº 20.
- _____ & MESSIAS, C.L. Virulência de mutantes e revertentes de exoenzimas de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodnius prolixus*. *Cienc. Cult.*, 36: 814, 1984b.
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Obtenção de mutantes pela técnica de enriquecimento em *Metarhizium anisopliae*. *Bolm. Grp. Pesq. Cont. Biol.*, (3): 14, 1982.
- _____. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1983. 153p. Tese de Mestrado. ESALQ/USP.
- _____ & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by the filtration enrichment technique. *Rev. Bras. Genet.*, 7: 1-8, 1984.

- SMITH, R.J.; PEKRUL, S. & GRULA, E.A. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 335-44, 1981.
- SOMERVILLE, H.J. Microbial Toxins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 217: 93-108, 1973.
- SOUZA, HEBE MYRINA L.; BARACHO, I.R.; MESSIAS, C.L. & AZEVEDO, J.L. Eletrophoretic variation in esterases in 3 wild-type and respective mutant strains of *Aspergillus flavus*. *Experientia*, 33: 1433-4, 1977.
- SOZA GÓMEZ, D.R. & ALVES, S.B. Caracterización de once aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok . 1. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. *CIRPON- Rev. Invest.* 1: 83-102, 1983.
- STENT, G.S. & CALENDAR, R. *Molecular Genetics*. 2th Ed. San Francisco, California, W.H. Freeman and Company , 1978. 773p.
- SUZUKI, A.; KUYAMA, S.; KODAIRA, Y & TAMURA, S. Structural elucidation of destruxin A. *Agr. Biol. Chem.*, 30: 517-8, 1966.
- _____ ; KANAOKA, M.; ISOGAI, A.; MURAKOSHI, S. ; ICHINOE, M. & TAMURA, S. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Lett.* 25: 2167-70, 1977.

SUNDARABABU, P.C.; BALASUBRAMANIAN, M. & JAYARAJ, S. Studies on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *major* Tulloch in *Oryctes rhinoceros* (L.) . Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore-3. 32p., 1984.

TAMURA, S.; KUYAMA, S.; KODAIRA, Y. & HIGASHIKAWA, S. The structure of destruxin B, a toxic metabolite of *Oospora destructor*. *Agr. Biol. Chem.*, 28: 137-8, 1964.

& TAKAHASHI, N. Destruxins and piericidins. In: JACOBSON, M. & CROSBY, D.G. eds. *Naturally-occurring Insecticides*. New York, Marcel Dekker, 1971. p.499-539.

TAVARES, O. Nota sobre a presença do *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, no Estado de São Paulo, Brasil. (Hemiptera , Reduviidae, Triatominae). *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, 5: 319-22, 1971.

TINLINE, R.D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, 63: 713-21, 1971.

& NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, 63: 701-12, 1971.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 66: 407-11, 1976.

- VEEN, K.H. Oral infection of second instar nymphs of *Schistocerca gregaria* by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 9: 276-8, 1966.
- _____. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 9: 276-8, 1967.
- _____. Recherches sur la maladie à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pérelin. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen*, 68: 1-77, 1968.
- VINING, L.C.; KELLEHER, W.J. & SCHWARTING, A.E. Oosperin production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Ammanita muscaria*. *Can. J. Microbiol.*, 8: 931-3, 1962.
- WATI, S.S. & HARTMANN, G.C. Microbial toxin activity on larvae of the gypsy moth and greater wax moth. *Z. Angew. Entomol.* 85: 192-6, 1978.
- WEXLER, A. & HASEGAWA; S. Relative humidity-temperature relationship of some saturated salt solutions in the temperature range 0° to 50°C. *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 53: 19-26, 1954.
- WIGGLESWORTH, V.B. The physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus*. *Q. Jl. Microsc. Sci.*, 76: 269-318, 1933.

- _____. The physiology of ecdysis in *Rhodnius*. II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Q. Jl. Microsc. Sci.*, 77: 191-222, 1934.
- _____. The physiology of insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol.*, 2: 37-54, 1957.
- _____. *The Principles of Insect Physiology*. 6th., London, Mathuen & Co. Ltda, 1967. 741p.
- WRETLIND, B. & KRONEVI, T. Experimental infections with protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *J. Med. Microbiol.*, 11: 145-54, 1978.
- YENDOL, W.G.; MILLER, E.M. & BEHNKE, G.N. Toxic substances from entomophthoraceous fungi. *J. Invertebr. Pathol.*, 10: 313-9, 1968.
- _____. & HAMLEM, R.A. Ecology of entomogenous viruses and fungi. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 217: 18-30, 1973.
- ZACHARUK, R.Y. & TINLINE, R.D. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and other fungi, for five elaterids (Coleoptera) in Saskatchewan. *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 294-309, 1968.
- _____. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 63-80, 1970a.

_____. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and apressoria. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 81-91, 1970b.

_____. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. *J. Invertebr. Pathol.*, 15: 372-96, 1970c.

_____. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). IV. Development within the host. *Can J. Microbiol.*, 17: 525-29, 1971.

_____. Penetration of the cuticular layers of elateridae larvae (Coleoptera) by the fungus *Metarhizium anisopliae*, and notes on a bacterial invasion. *J. Invertebr. Pathol.*, 21: 101-6, 1973.

ZELEDÓN, R. Los vectores de la enfermedad de Chagas en America. *An. Simp. Intern. Doença de Chagas*, 12: 327-45, 1972.

_____ & RABINOVICH, J.E. Chagas disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Ann. Rev. Entomol.*, 26: 101-33, 1981.

A P P E N D I C E

TABELA A.1. - Valores de índices enzimáticos para amilase, lipase e protease das linhagens *E₉* e *V₁₄* de *M. anisopliae*.

Exoenzimas	Linhagens	Valores de índices enzimáticos*											
Amilase	<i>E₉</i>	1,58	1,50	1,33	1,43	1,53	1,43	1,58	1,62	1,47	1,53		
	<i>V₁₄</i>	1,53	1,58	1,50	1,42	1,50	1,46	1,66	1,58	1,50	1,57		
Lipase	<i>E₉</i>	1,56	1,21	1,52	1,64	2,25	1,29	1,37	1,47	1,43	1,52		
	<i>V₁₄</i>	1,83	1,83	1,66	1,53	1,69	1,83	1,69	1,69	1,56	1,53		
Protease	<i>E₉</i>	1,52	1,47	1,26	1,50	1,52	1,33	1,33	1,50	1,37	1,33		
	<i>V₁₄</i>	1,61	1,50	1,53	1,69	1,61	1,53	1,61	1,53	1,53	1,53		

* Índice Enzimático foi obtido pela razão diâmetro do halo/diâmetro da colônia (média de 2 repetições).

TABELA A.2. - Valores de índices enzimáticos para amilase* das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Linhagens	Valores de índices enzimáticos**													
E ₉	1,58	1,50	1,33	1,43	1,53	1,43	1,58	1,62	1,47	1,53				
E ₉ lip ⁻	1,54	1,50	1,57	1,73	1,42	1,54	1,54	1,46	1,35	1,21				
E ₉ prt ⁻	1,67	1,54	1,53	1,50	1,63	1,54	1,43	1,50	1,46	1,33				
E ₉ ami ⁺	1,47	1,54	1,25	1,31	1,41	1,36	1,40	1,37	1,41	1,47				
E ₉ lip ⁺	1,50	1,54	1,46	1,38	1,43	1,40	1,46	1,43	1,38	1,54				
E ₉ prt ⁺	1,43	1,46	1,46	1,50	1,40	1,50	1,46	1,54	1,50	1,54				
V ₁₄	1,53	1,58	1,50	1,42	1,50	1,46	1,66	1,58	1,50	1,57				
V ₁₄ lip ⁻	1,46	1,43	1,58	1,50	1,54	1,54	1,54	1,50	1,50	1,50				
V ₁₄ prt ⁻	1,50	1,46	1,46	1,50	1,57	1,50	1,54	1,42	1,50	1,42				
V ₁₄ ami ⁺	1,50	1,54	1,46	1,43	1,50	1,46	1,54	1,41	1,54	1,54				
V ₁₄ lip ⁺	1,50	1,43	1,46	1,50	1,46	1,50	1,46	1,54	1,50	1,54				
V ₁₄ prt ⁺	1,36	1,33	1,37	1,43	1,53	1,40	1,50	1,53	1,50	1,61				

* Os mutantes ami⁻ tem índices enzimáticos iguais a um.

** Cada valor de índice enzimático é a média de duas repetições.

TABELA A.3. - Valores de índices enzimáticos para lipase* das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Linhagens	Valores de índices enzimáticos											
E ₉	1,56	1,21	1,52	1,64	2,25	1,29	1,37	1,47	1,43	1,52		
E ₉ ami ⁻	1,37	1,47	1,56	1,65	1,52	1,62	1,29	1,65	1,62	1,56		
E ₉ prt ⁻	1,67	1,54	1,53	1,50	1,63	1,54	1,43	1,50	1,46	1,33		
E ₉ ami ⁻	1,53	1,57	1,39	1,50	1,53	1,61	1,75	1,53	1,61	1,57		
E ₉ lip ⁺	1,40	1,44	1,41	1,44	1,37	1,44	1,52	1,56	1,47	1,52		
E ₉ prt ⁺	1,54	1,50	1,58	1,53	1,58	1,63	1,58	1,53	1,54	1,50		
V ₁₄	1,83	1,83	1,66	1,53	1,69	1,83	1,69	1,69	1,56	1,53		
V ₁₄ ami ⁻	1,66	1,61	1,75	1,53	1,43	1,50	1,50	1,61	1,66	1,66		
V ₁₄ prt ⁻	1,71	1,83	1,61	1,75	1,56	1,61	1,56	1,61	1,53	1,53		
V ₁₄ ami ⁺	1,75	1,69	1,82	1,61	1,72	1,54	1,50	1,54	1,54	1,43		
V ₁₄ lip ⁺	1,66	1,53	1,66	1,66	1,69	1,53	1,75	1,82	1,69	1,75		
V ₁₄ prt ⁺	1,53	1,50	1,47	1,61	1,71	1,61	1,61	1,67	1,50	1,67		

* Os mutantes lip⁻ tem índices enzimáticos iguais a um.

TABELA A.4. - Valores de índices enzimáticos para protease das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e seus mutantes: e revertentes.

Linhagens	Valores de índices enzimáticos											
E ₉	1,52	1,47	1,26	1,50	1,52	1,33	1,33	1,33	1,50	1,37	1,33	1,33
E ₉ ami ⁻	1,50	1,35	1,38	1,53	1,47	1,50	1,33	1,33	1,26	1,33	1,21	1,21
E ₉ lip ⁻	1,36	1,60	1,25	1,47	1,50	1,57	1,40	1,40	1,43	1,31	1,40	1,40
E ₉ prt ⁻	1,20	1,10	1,08	1,04	1,04	1,11	1,10	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11
E ₉ ami ⁺	1,47	1,50	1,50	1,41	1,50	1,41	1,44	1,44	1,53	1,47	1,50	1,50
E ₉ lip ⁺	1,33	1,36	1,31	1,37	1,33	1,41	1,44	1,44	1,37	1,50	1,53	1,53
E ₉ prt ⁺	1,31	1,35	1,32	1,25	1,41	1,50	1,47	1,47	1,39	1,37	1,41	1,41
V ₁₄	1,61	1,50	1,53	1,69	1,61	1,53	1,61	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53
V ₁₄ ami ⁻	1,50	1,66	1,61	1,58	1,31	1,50	1,58	1,58	1,53	1,31	1,31	1,31
V ₁₄ lip ⁻	1,53	1,66	1,50	1,60	1,53	1,66	1,43	1,43	1,53	1,53	1,33	1,33
V ₁₄ prt ⁻	1,14	1,25	1,16	1,15	1,12	1,10	1,11	1,11	1,19	1,33	1,25	1,25
V ₁₄ ami ⁺	1,54	1,50	1,37	1,58	1,54	1,43	1,54	1,54	1,58	1,54	1,54	1,54
V ₁₄ lip ⁺	1,53	1,58	1,46	1,43	1,40	1,53	1,50	1,50	1,53	1,47	1,53	1,53
V ₁₄ prt ⁺	1,36	1,33	1,37	1,43	1,53	1,40	1,50	1,50	1,53	1,50	1,61	1,61

TABELA A.5. - Proporção de conídios binucleados da linhagem E₉ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Isolados	Proporção de conídios binucleados				
E ₉	0,05	0,08	0,02	0,03	0,06
E ₉ ami ⁻	0,04	0,03	0,06	0,05	0,07
E ₉ lip ⁻	0,03	0,03	0,04	0,05	0,08
E ₉ prt ⁻	0,08	0,02	0,03	0,06	0,05
E ₉ ami ⁺	0,03	0,04	0,05	0,03	0,06
E ₉ lip ⁺	0,05	0,04	0,03	0,06	0,02
E ₉ prt ⁺	0,02	0,03	0,07	0,06	0,05

TABELA A.6. - Proporção de conídios binucleados da linhagem V₁₄ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Isolados	Proporção de conídios binucleados				
V ₁₄	0,05	0,03	0,03	0,04	0,05
V ₁₄ ami ⁻	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04
V ₁₄ lip ⁻	0,04	0,06	0,05	0,04	0,04
V ₁₄ prt ⁻	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04
V ₁₄ ami ⁺	0,04	0,03	0,05	0,03	0,04
V ₁₄ lip ⁺	0,03	0,05	0,06	0,04	0,03
V ₁₄ prt ⁺	0,04	0,03	0,04	0,03	0,04

TABELA A.7. - Medidas do comprimento dos conídios da linhagem E₉ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Isolados	Comprimento de conídios (µm)*										Média
E ₉	5,95	5,95	5,95	5,47	5,95	6,66	6,19	6,19	5,95	5,95	6,02
E ₉ ami ⁻	5,47	5,47	5,95	5,95	6,19	6,19	6,19	5,95	5,95	5,95	5,93
E ₉ lip ⁻	5,95	5,47	5,47	5,95	6,19	5,95	5,47	6,19	6,19	5,47	5,83
E ₉ prt ⁻	6,19	6,19	5,95	6,66	6,19	5,95	5,95	6,42	5,71	5,47	6,07
E ₉ ami ⁺	5,71	5,95	5,47	6,19	5,71	5,95	5,24	5,24	6,19	5,71	5,74
E ₉ lip ⁺	6,66	5,24	6,19	6,19	5,71	6,19	5,71	6,19	5,24	6,19	5,95
E ₉ prt ⁺	6,24	6,19	5,71	5,47	5,95	5,71	5,71	6,24	6,24	6,24	5,97

* Cada valor é a média de comprimento de 5 conídios.

TABELA A.8. - Medidas do comprimento dos conídios da linhagem V₁₄ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes.

Isolados	Comprimento de conídios (µm)*										Média
V ₁₄	5,71	5,95	6,19	6,66	5,95	5,71	6,14	5,71	6,19	6,10	6,04
V ₁₄ ami ⁻	5,95	5,24	6,19	6,14	6,66	5,71	6,14	6,14	5,95	5,71	5,98
V ₁₄ lip ⁻	5,71	5,71	6,19	6,14	5,95	5,71	5,71	5,95	5,95	5,71	5,87
V ₁₄ prt ⁻	5,95	5,95	5,24	6,14	6,14	5,71	6,19	5,95	6,14	6,14	5,95
V ₁₄ ami ⁺	6,14	6,19	6,66	5,95	5,71	5,71	6,14	6,14	5,71	6,14	6,05
V ₁₄ lip ⁺	6,19	6,14	6,14	6,19	5,95	6,14	6,19	5,71	6,14	6,19	6,10
V ₁₄ prt ⁺	7,14	7,14	6,19	6,19	6,14	6,14	5,71	5,71	6,14	6,14	6,22

* Cada valor é a média de comprimento de 5 conídios.

TABELA A.9. - Taxa de germinação da linhagem E₉ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes em MC.

Isolados	Taxa de germinação*				
E ₉	0,94	0,95	0,97	0,96	0,99
E ₉ ami ⁻	0,95	0,96	0,98	0,94	0,96
E ₉ lip ⁻	0,99	0,96	0,98	0,97	0,99
E ₉ prt ⁻	0,94	0,89	0,93	0,96	0,98
E ₉ ami ⁺	0,95	0,94	0,98	0,97	0,96
E ₉ lip ⁺	0,96	0,99	0,93	0,94	0,93
E ₉ prt ⁺	0,97	0,96	0,98	0,99	0,95

* Cada valor corresponde ao exame de 100 conídios.

TABELA A.10. - Taxa de germinação da linhagem V₁₄ de *M. anisopliae* e de seus mutantes e revertentes em MC.

Isolados	Taxa de germinação*				
V ₁₄	0,92	0,90	0,93	0,86	0,89
V ₁₄ ami ⁻	0,95	0,93	0,90	0,82	0,90
V ₁₄ lip ⁻	0,94	0,93	0,93	0,94	0,91
V ₁₄ prt ⁻	0,90	0,94	0,91	0,88	0,87
V ₁₄ ami ⁺	0,93	0,90	0,95	0,93	0,89
V ₁₄ lip ⁺	0,91	0,96	0,93	0,92	0,93
V ₁₄ prt ⁺	0,90	0,89	0,92	0,88	0,95

* Cada valor corresponde ao exame de 100 conídios.

TABELA A.11. - Porcentagem de mortalidade acumulada de nin-
fas de *R. prolixus* após 7 dias de exposição à
linhagem E₉ de *M. anisopliae* e seus mutantes.

Mutantes	Concentração (conídios/ml)	Porcentagem de mor- talidade acumulada
E ₉ (padrão)	325 x 10	16
	325 x 10 ²	40
	325 x 10 ³	60
	325 x 10 ⁴	96
E ₉ ami ⁻	330 x 10	12
	330 x 10 ²	40
	330 x 10 ³	52
	330 x 10 ⁴	72
E ₉ lip ⁻	310 x 10	18
	310 x 10 ²	36
	310 x 10 ³	48
	310 x 10 ⁴	80
E ₉ prt ⁻	310 x 10	12
	310 x 10 ²	32
	310 x 10 ³	68
	310 x 10 ⁴	92

TABELA A.12. - Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após 7 dias de exposição à linhagem V_{14} de *M. anisopliae* e seus mutantes.

Mutantes	Concentração (conídios/ml)	Porcentagem de mortalidade acumulada
V_{14} (padrão)	400×10	24
	400×10^2	56
	400×10^3	92
	400×10^4	96
V_{14} ami^-	315×10	16
	315×10^2	40
	315×10^3	60
	315×10^4	76
V_{14} lip^-	306×10	12
	306×10^2	36
	306×10^3	64
	306×10^4	80
V_{14} pri^-	370×10	20
	370×10^2	64
	370×10^3	80
	370×10^4	92

TABELA A.13. - Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após 7 dias de exposição à linhagem E₉ de *M. anisopliae* e seus revertentes.

Revertentes	Concentração (conídios/ml)	Porcentagem de mortalidade acumulada
E ₉ (padrão)	325 x 10	16
	325 x 10 ²	40
	325 x 10 ³	60
	325 x 10 ⁴	96
E ₉ ami ⁺	305 x 10	12
	305 x 10 ²	36
	305 x 10 ³	56
	305 x 10 ⁴	92
E ₉ lip ⁺	340 x 10	12
	340 x 10 ²	40
	340 x 10 ³	64
	340 x 10 ⁴	88
E ₉ prt ⁺	320 x 10	20
	320 x 10 ²	28
	320 x 10 ³	64
	320 x 10 ⁴	96

TABELA A.14. - Porcentagem de mortalidade acumulada de ninfas de *R. prolixus* após 7 dias de exposição à linhagem V_{14} de *M. anisopliae* e seus revertentes.

Revertentes	Concentração (conídios/ml)	Porcentagem de mortalidade acumulada
V_{14} (padrão)	400 x 10	24
	400 x 10 ²	56
	400 x 10 ³	92
	400 x 10 ⁴	96
V_{14} ami ⁺	305 x 10	20
	305 x 10 ²	52
	305 x 10 ³	80
	305 x 10 ⁴	92
V_{14} lip ⁺	360 x 10	20
	360 x 10 ²	60
	360 x 10 ³	80
	360 x 10 ⁴	88
V_{14} prt ⁺	350 x 10	24
	350 x 10 ²	52
	350 x 10 ³	84
	350 x 10 ⁴	96

TABELA A.15. - Porcentagem de mortalidade acumulada de *R. prolixus* após diferentes dias de exposição a conídios das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e seus mutantes.

Dias	Mutantes							
	E ₉ (padrão)	E ₉ ami ⁻	E ₉ lip ⁻	E ₉ prt ⁻	V ₁₄ (padrão)	V ₁₄ ami ⁻	V ₁₄ lip ⁻	V ₁₄ prt ⁻
4	8	-	-	4	12	8	12	12
5	12	-	-	8	16	12	12	16
6	20	12	8	16	36	24	20	32
7	40	40	36	32	56	40	36	64
8	40	40	36	36	72	52	48	72
9	76	44	40	60	80	60	52	76
10	80	48	48	72	96	72	76	88
11	88	56	72	88	96	80	88	92
12	92	68	80	92	100	92	92	96

TABELA A.16. - Porcentagem de mortalidade acumulada de *R. prolixus* após diferentes dias de exposição a confídios das linhagens E₉ e V₁₄ de *M. anisopliae* e seus revertentes.

Dias	Revertentes							
	E ₉	E ₉	E ₉	E ₉	V ₁₄	V ₁₄	V ₁₄	V ₁₄
	(padrão)	ami ⁺	lip ⁺	prt ⁺	(padrão)	ami ⁺	lip ⁺	prt ⁺
4	8	8	8	12	12	12	12	8
5	12	12	8	16	16	36	28	28
6	20	16	16	20	36	48	40	40
7	40	36	36	32	56	56	52	52
8	40	40	44	40	72	64	64	60
9	76	48	52	56	80	76	72	68
10	80	60	64	76	96	88	88	84
11	88	72	76	84	96	96	92	88
12	92	88	92	88	100	100	96	100