

JULIANA ZANETTI RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE
RECOMBINAÇÃO NOS FUNGOS**

Metarhizium anisopliae* E *Beauveria bassiana

**Monografia apresentada para
obtenção do Grau de Bacharel em
Ciências Biológicas da Universi-
dade Federal do Paraná, sob
orientação da Professora Vanessa
Kava-Cordeiro.**

**CURITIBA
2000**

*“A estabilidade da sociedade humana depende da
capacidade dos geneticistas para fazer
malabarismos com os caracteres hereditários que
moldam as formas de vida”.*

(Suzuki)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à DEUS, pois somente por vontade Dele, que a realização desta caminhada e a convivência com todas essas pessoas tornou-se possível.

À minha Professora Vanessa Kava-Cordeiro, por seu carisma, incentivo, amizade e paciência em conduzir a orientação desta monografia.

*À amiga e companheira Patrícia Dalzoto não só pelas linhagens de *Beauveria bassiana*, gentilmente cedidas, mas principalmente, pela ajuda e conselhos preciosos em todos os momentos.*

Às professoras Chirlei Glienke de Blanco e Lygia Vitória Galli Teresawa e amigas Eliana, Danyelle, Leila, Flávia, Luciana e D. Isolde do Laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR, pela amizade e pelo companheirismo no decorrer do trabalho.

À professora Ida Chapaval Pimentel do Departamento de Patologia Básica da UFPR pelos conselhos e convivência muito agradável.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Humana, pela paciência e empréstimo da bomba à vácuo.

Aos colegas do Laboratório de Imunogenética, pela disponibilidade no empréstimo do nitrogênio líquido.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, pelo auxílio e empréstimo da centrífuga refrigerada.

À todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Genética da UFPR, que de alguma forma, tornaram a realização desta monografia uma tarefa agradável e proveitosa.

À amiga Cynthia Helena Merlin pela convivência durante o curso, pela amizade, estímulo e ajuda sempre que precisei.

Ao meu pai Antonio Carlos, minha irmã Flávia e minha avó Jamile, pelo incentivo, compreensão e confiança.

À minha mãe Assunta Vitória e minha tia Dayse, pelo incentivo, confiança, ajuda constante em todos os sentidos e o empréstimo do computador nas horas mais inusitadas.

Por fim, às outras pessoas que aqui não foram citados, mas que direta ou indiretamente participaram da minha formação profissional, e com toda certeza sempre serão lembrados.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	viii
RESUMO	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
3 REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1 <i>Metarhizium anisopliae</i>	3
3.2 <i>Beauveria bassiana</i>	7
3.3 CICLO PARASSEXUAL	10
3.4 PARAMEIOSE	11
3.5 ELETROFORESES DE PROTEÍNA TOTAL E ISOENZIMAS.....	12

4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 LINHAGENS UTILIZADAS	15
4.2 MEIOS DE CULTURA	16
4.2.1 Meio Mínimo - MM (PONTECORVO et al., 1953a)	16
4.2.2 Meio Completo - MC (PONTECORVO et al., 1953a, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)	17
4.2.3 Meio Mínimo mais 4% de Meio Completo	18
4.3 SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS ADICIONADOS AO MEIO MÍ- NIMO.....	18
4.3.1 Vitaminas	18
4.3.2 Aminoácidos	19
4.3.3 Ácidos Nucléicos	19
4.4 SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	20
4.4.1 Solução Salina (0,85% - p/v)	20
4.4.2 Solução de Tween 80 (0,1% - v/v)	20
4.4.3 Solução de Vitaminas	21
4.4.4 Solução Estoque de Tampão do Gel Concentrador (Tris-HCl 0,6173M pH6,8).....	21
4.4.5 Solução Estoque de Tampão do Gel Separador (Tris-HCl 3,778M pH8,9).....	22
4.4.6 Solução de Persulfato de Amônia 10%	22

4.4.7 Solução Estoque de Acrilamida.....	22
4.4.8 Solução Estoque do Tampão do Tanque pH 8,9 10X ou Tampão de Corrida	23
4.4.9 Solução do Tampão da Amostra	23
4.4.10 Solução de Esterase	23
4.4.11 Tris-HCl 0,5M pH7,1	24
4.4.12 Solução Estoque de Proteína Total - Fixador PAGE	24
4.4.13 Gel Separador à 10% (ALFENAS et al., 1991)	25
4.4.14 Gel Concentrador à 4% (ALFENAS et al., 1991)	25
4.4.15 Corante para Esterase α e β (BREWER e SING, 1970; CONKLE et al., 1982; MARTY et al., 1984; MICALES et al., 1986; SICILIANO e SHAW, 1976; SOLTIS et al., 1983; STUBER et al., 1988; YAMADA e GURIES, 1989).....	26
4.4.16 Corante para Gel de Proteínas (ALFENAS et al., 1991).....	26
4.4.17 Corante Álcool Desidrogenase (BREWER e SING, 1970; CHELIAK e PITEL, 1984; CONKLE et al., 1982; HARRIS e HOPKINSON, 1978; MICALES et al., 1986; SHAW e PRASAD, 1970; YAMADA e GURIES, 1989).....	27
4.4.18 Corante Sorbitol Desidrogenase (HARRIS e HOPKINSON, 1978; MARTY et al., 1984; SHAW e PRASAD, 1970; YAMADA e GURIES, 1989)	27
4.4.19 Solução Sulfocrômica	28

4.5 PREPARO DE MATERIAL.....	28
4.5.1 Esterilização	28
4.5.2 Incubação dos Fungos	29
4.5.3 Manuseio Básico do Material	29
4.6 SOBREVIVÊNCIA A LUZ ULTRAVIOLETA.....	30
4.7 ISOLAMENTO DE MUTANTES MORFOLÓGICOS E AUXOTRÓFI-	
 COS	32
4.7.1 Mutantes Morfológicos	32
4.7.2 Mutantes Auxotróficos	32
4.8 TESTE DE REVERSÃO	34
4.9 OBTENÇÃO DE RECOMBINANTES	34
4.10 CARACTERIZAÇÃO PARA PADRÕES DE ISOENZIMAS(PACCOLA-	
 MEIRELLES et al., 1988, MODIFICADO POR KAVA-CORDEIRO,	
 1998 - COMUNICAÇÃO PESSOAL) E PADRÕES DE PROTEÍNA	
 TOTAL (ALFENAS et al., 1991).....	37
4.10.1 Cultivo dos Fungos e Extração de Proteínas	37
4.10.2 Placas de Gel de Acrilamida	38
4.10.3 Coloração para Revelação de Esterase	39
4.10.4 Coloração para Revelação de Proteína Total	39
4.10.5 Coloração para Revelação de Álcool Desidrogenase	40

4.10.6 Coloração para Revelação de Sorbitol Desidrogenase	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 OBTENÇÃO DE MUTANTES EM <i>Metarhizium anisopliae</i>	41
5.2 TESTE DE REVERSÃO	44
5.3 OBTENÇÃO DE RECOMBINANTES EM <i>Metarhizium anisopliae</i>	45
5.4 ANÁLISE DE ISOENZIMAS E PROTEÍNA TOTAL	46
6 CONCLUSÕES	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO 5X5+1 (AZEVEDO & COSTA,1973)..... 33
- FIGURA 2 - CRESCIMENTO FÚNGICO AO REDOR DO POÇO..... 35
- FIGURA 3 - DEMONSTRAÇÃO DOS REPIQUES REALIZADOS EM MC.... 36
- FIGURA 4 - MUTAÇÃO MORFOLÓGICA PARA COLORAÇÃO VINHO PÁLIDO - PVI EM *Metarhizium anisopliae* 42
- FIGURA 5 - MUTAÇÃO MORFOLÓGICA PARA COLORAÇÃO AMARELO CLARO - YLO EM *Metarhizium anisopliae* 42
- FIGURA 6 - REVERSÃO DE MUTAÇÃO PARA COLORAÇÃO VERDE ORIGINAL EM *Metarhizium anisopliae* 43

FIGURA 7 - ELETROFEROGRAMA DE ÁLCOOL DESIDROGENASE PARA <i>Metarhizium anisopliae</i>	47
FIGURA 8 - ELETROFEROGRAMA DE SORBITOL DESIDROGENASE PARA <i>Metarhizium anisopliae</i>	47
FIGURA 9 - ELETROFEROGRAMA DE PROTEÍNA TOTAL PARA <i>Metarhizium anisopliae</i>	48
FIGURA 10 - ELETROFEROGRAMA DE PROTEÍNA TOTAL PARA <i>Beauveria bassiana</i>	51
TABELA 1 - HISTÓRICO DAS IRRADIAÇÕES, FREQUÊNCIA E ASPECTO DOS MUTANTES OBTIDOS EM <i>Metarhizium anisopliae</i>	41

RESUMO

A atual conscientização acerca dos riscos que os pesticidas químicos oferecem e a crescente preocupação com o meio ambiente tem aumentado as pesquisas envolvendo fungos entomopatogênicos que apresentam um grande potencial no manejo de insetos pragas. Dentro deste contexto, encontram-se os fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* que são pertencentes a subdivisão Deuteromycotina, a qual engloba os fungos imperfeitos, ou seja, que não apresentam ciclo sexual conhecido, limitando os estudos genéticos. Assim, denota-se a importância em superar essas barreiras através do conhecimento da biologia desses fungos, principalmente, por aspectos da genética clássica como o ciclo parassexual e a paramiose que tornam possível a obtenção de linhagens que combinem características favoráveis de seus pais para o controle biológico. Desta maneira, a partir de mutantes morfológicos e auxotróficos de *Metarhizium anisopliae* obtidos, realizou-se 3 cruzamentos pelo método do "Poço" a fim de induzir a formação de recombinantes, sendo estes: AL paba1 pro7 ile1 pvi1 X A19 met1 nic1 ylo2, AL val1 lis1 X A19 met1 pir1 ylo2 e AL val1 lis1 X AL pro2 cys1. Nos 3 cruzamentos foram obtidos recombinantes, sendo o maior número no cruzamento 2. A partir desses resultados, esses recombinantes, parentais e selvagens de *Metarhizium anisopliae*, juntamente com recombinantes já obtidos, parentais e selvagens de *B. bassiana* foram analisados por eletroforese de proteína total e isoenzimas. Como os parentais envolvidos nos cruzamentos apresentaram padrões eletroforéticos bastante parecidos, não pode-se afirmar que a mistura de bandas não está ocorrendo. Para *Metarhizium anisopliae*, pode-se sugerir que não ocorreu formação de diplóides através da análise morfológica dos recombinantes obtidos. Já com relação aos recombinantes que apresentaram bandas novas, estas foram atribuídas ao desenvolvimento de proteínas com propriedades novas ou modificadas.

1 INTRODUÇÃO

Registros em ambar de associações de fungos patogênicos com insetos hospedeiros datam de 25 milhões de anos (POINAR & THOMAS, 1982, 1984), embora o primeiro experimento demonstrando essa patogenicidade tenha sido realizado somente em 1834. Hoje existem, em média, 90 gêneros e 700 espécies envolvidas com entomopatogenicidade, mas somente poucos desses fungos tem sido bem estudados. E, em conseqüência, muito pouco do potencial desses microrganismos tem sido utilizado no controle biológico, mesmo diante da necessidade em se reduzir o uso de inseticidas químicos.

Dentro do contexto do controle de pragas por microrganismos destacam-se os fungos *Metarhizium anisopliae* (SOROKIN) e *Beauveria bassiana* (VUILL.) que vem sendo encontrados em várias regiões do mundo. Para que venham a apresentar resultados satisfatórios como agentes entomopatogênicos é necessário um maior conhecimento dos aspectos fisiológicos como o crescimento, atividade metabólica, bases genéticas da virulência e especificidade ao hospedeiro.

Desta forma, denota-se a importância de estudos mais aprofundados da genética desses fungos, tanto pelas vias clássicas - ciclo parassexual e paramiose, quanto pelas técnicas moleculares como eletroforeses de proteína total e isoenzimas.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o estudo da genética dos fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, pelo potencial que apresentam como agentes de controle biológico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir e identificar os mecanismos de recombinação em *M. anisopliae*, com isolamento de recombinantes;
- Através da técnica de eletroforeses de proteína total e isoenzimas, comparar recombinantes obtidos de *M. anisopliae* e recombinantes de *B. bassiana* com seus parentais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Metarhizium anisopliae*

Pertencente à subdivisão Deuteromycotina, ordem Moniliales, família Moniliaceae (KAVA-CORDEIRO, 1993), subdivisão essa que abriga os fungos chamados imperfeitos, ou seja, fungos cujo estágio sexual não é conhecido.

Foi descrito pela primeira vez por Metschnikoff em 1879, na Rússia, parasitando larvas de *Anisopliae austriaca*, sendo então denominado *Entomophthora anisopliae*. Após uma série de proposições de diversos sinônimos, em 1883, Sorokin o classificou como *Metarhizium anisopliae* (KAVA-CORDEIRO, 1993).

TULLOCH (1976) considerou como aceitável a existência de somente 2 espécies: *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium flavoviride*, sendo que a primeira apresenta 2 variedades: variedade *anisopliae* com conídio entre 3,5-9,0µm de comprimento e a variedade *major* com conídios entre 9,0-18,0µm de comprimento.

TINLINE & NOVIELLO (1971) corroborado por SAMUELS et al., (1989a) aventaram a possibilidade de que a variedade *major* seja um diplóide natural. Segundo estes autores, o aumento na resistência à luz ultravioleta e o fracasso em se isolar mutantes auxotróficos, juntamente com a medida de esporos

e volume nuclear, proporcionam evidências para a natureza diplóide estável dos isolados da variedade *major*.

O fungo *Metarhizium anisopliae* apresenta conídios de coloração esverdeada e estes são cilíndricos com as pontas arredondadas e freqüentemente mais estreitos no meio. São formados a partir de conidióforos originados diretamente das hifas hialinas e são geralmente uninucleados (TINLINE, 1971), com pequena proporção de binucleados (MESSIAS & AZEVEDO, 1980) ou mesmo multinucleados em algumas linhagens (LUNA, 1985). Durante a germinação, os núcleos se dividem e um migra para o tubo germinativo enquanto o outro permanece no conídio (VEEN, 1968; ZACHARUK, 1989). Segundo LUNA (1985), em conídios multinucleados, ocorrem mitoses sucessivas a partir de um núcleo, antes de migrarem para os tubos germinativos, sendo que, nestes casos, também podem ocorrer conídios septados com emissão de 2 tubos germinativos. Ainda, de acordo com LUNA (1985), as hifas são freqüentemente uninucleadas em seus segmentos, podendo ocorrer dois ou mais núcleos, sendo que esses segmentos multinucleados geralmente aparecem em pontas de hifas. A ocorrência de anastomose entre hifas bem como entre conídios propicia a obtenção de heterocários, apesar da dificuldade em perpetuar esta condição, devido aos conidióforos uninucleados que impedem a transmissão desta condição heterocariótica aos conídios (TINLINE & NOVIELLO, 1971).

Este fungo apresenta crescimento ótimo em temperaturas entre 25°C e 30°C (VILACORTA, 1978). Após exposição à 40°C por 24 horas, ocorre perda de viabilidade (ALVES & NOGUEIRA, 1984). Portanto, a rapidez no desenvolvimento do micélio e a conseqüente rapidez na evolução da infecção, dependem da temperatura, sendo que, FERRON (1978) considera entre 27°C e 28°C a melhor temperatura de desenvolvimento para este fungo.

Quanto ao pH, é tolerante a uma faixa de 2,0 a 8,5, sendo que 6,9 é a melhor condição para o crescimento e esporulação (VEEN, 1968).

Este fungo é pouco exigente em relação a fonte nutritiva, desenvolvendo-se em vários meios de cultura. No entanto, estudos realizados por HALL et al., (1994) mostraram que a idade do meio de cultura tem influência no crescimento, sendo que as colônias desenvolvem-se mais rapidamente em culturas novas que naquelas mais velhas.

Embora cada fungo e cada inseto hospedeiro possam apresentar características próprias na instalação e desenvolvimento da micose, geralmente isso se dá pelo contato do esporo do fungo com a cutícula do inseto. Em condições favoráveis, esse esporo germina e emite uma estrutura (apressório) que força a cutícula e penetra no interior do inseto (FERRON, 1978). Por meio de microscopia eletrônica pode-se verificar a quebra enzimática da cutícula durante a penetração e estudos *in vitro*, usando uma bateria de enzimas, mostram que a aplicação sequencial de enzimas líticas como lipase, protease e quitinase são necessárias para a digestão da cutícula (HOWARD & MILLER, 1997). Após penetração, são produzidos blastóporos no interior do hospedeiro que atingem a hemolinfa e então há a colonização do inseto. Após sua morte, este fica com aspecto mumificado podendo ainda ficar coberto de esporos que se formam a partir das hifas que emergem do inseto atacado (ST. LEGER et al., 1989). A morte do inseto ocorre como um resultado da destruição massiva, depleção de nutrientes e produção de toxinas pelo fungo.

O fungo *Metarhizium anisopliae* é patogênico a mais de 200 espécies de insetos (VEEN, 1968) e é enquadrado na categoria de parasita facultativo pois

tem a capacidade de se desenvolver em ambientes naturais mesmo na ausência de seus hospedeiros (FARGUES & REMAUDIERE, 1977).

ROBERTS & HAJEK (1992) listaram 14 gêneros de fungos que tem grande potencial como agentes de controle biológico contra insetos, dos quais 6 têm sido registrados no uso mundial. No Brasil, pode-se citar o *Metarhizium anisopliae* na utilização contra cigarrinha da cana-de-açúcar, embora somente em pequena escala por produtores locais. Segundo ALVES (1986), já vem sendo utilizado contra esta cigarrinha, *Mahanarva posticata*, desde 1910. Também vem sendo utilizado contra os gêneros *Deois* e *Zulia* (cigarrinhas das pastagens) que representam as principais pragas das pastagens no Brasil e *Diatraea saccharalis* que é a broca-da-cana.

Sua patogenicidade também tem sido verificada em outros importantes insetos pragas como: *Chalcodermus aneus*, manhoso (LORD, 1986; QUINTELA et al., 1989; BAGALHI, 1987); *Anthonomus grandis*, bicudo do algodão (JARAMILLO & ALVES, não publicado, In: ALVES, 1986); *Hypothenemus hampei*, broca-do-café (LECUONA et al., , 1986); formiga do gênero *Atta* (ALVES & SOSA GÓMEZ, 1983); *Atta sexdens piriventus*, formiga saúva (DIEHL-FLEIG et al., 1988), *Heliothis armigera* (GOPALAKRISHNAN & NARAYANAN, 1988); *Inopus rubriceps*, praga da cana-de-açúcar (SAMUELS et al., 1989b); *Antitrogus parvulus*, praga de cana-de-açúcar (SAMUELS et al., 1990); *Manduca sexta*, praga do tabaco (SAMUELS et al., 1988; HASSAN et al., 1989); *Nilaparvata lugens* (SAMUELS et al., 1989a); *Ceratitis capitata*, mosca de frutas (GARCIA et al., 1985, 1989); *Otiorynchus sulcatus*, inseto praga de plantas ornamentais como Azaléia, Begônia e Gerânio (REINECKE et al., 1990), entre outros.

Também já foi comprovada sua patogenicidade em insetos de interesse médico como: *Rhodnius prolixus* (SILVA & MESSIAS, 1986); *Triatoma infestans* (SILVA et al., 1989); *Glossina morsitans morsitans*, mosca tsé-tsé (KAAYA, 1989; KAAYA & OKECHI, 1990); os mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles stephens* (PATEL et al., 1990).

3.2 *Beauveria bassiana*

Este fungo também é imperfeito, pois pertence à subdivisão Deuteromycotina, ordem Moniliales, família Moniliacea (DALZOTO, 1996).

O gênero *Beauveria* foi descrito em 1911 e 1912 por Beauveria e Vuillemin respectivamente. Duas espécies são conhecidas, *B. bassiana* e *B. tenella* (*B. brongniartii*) (DALZOTO, 1996).

Os conídios de *Beauveria bassiana* são arredondados e uninucleados (PACCOLA-MEIRELLES, 1988), sendo que os núcleos localizam-se perifericamente. Suas hifas modificam-se em estruturas dilatadas, os conidióforos, nos quais formam-se os conídios.

Seu micélio é branco ou levemente corado com aparência "fluffy" a pulverulenta com conidióforos únicos irregularmente agrupados (BARNETT, 1958). Sua reprodução é, principalmente, assexuada na qual os esporos ou conídios são produzidos por sucessivas divisões celulares. Possui 8 cromossomos identificados através de eletroforese em campo pulsado, sendo o total do genoma estimado em $40,6 \pm 1.1$ Mb (PFEIFER & KHACHATOURIANS, 1993).

Este fungo apresenta crescimento em vários tipos de meios de cultura embora este seja sensivelmente melhorado em meio completo, BDA modificado e BDA respectivamente (DALZOTO, 1996).

Devido as características de seu ciclo biológico é considerado entomopatogênico, pois suas hifas penetram no tegumento do inseto alcançando a hemolinfa e causando sua morte. Após, as hifas exteriorizam-se e os conídios são liberados no ambiente (PACOLLA-MEIRELLES, 1988).

Segundo KHACHATOURIANS (1986), o fungo *Beauveria bassiana* é encontrado parasitando muitos insetos pragas no mundo inteiro. Também pode ser isolado diretamente do solo, como verificado por TIGANO-MILANI et al. (1993), em 8 isolados desse fungo nos estados de Goiás e Rio Grande do Sul.

De acordo com SOPER & WARD (1981) os fungos constituem o maior grupo de patógenos de insetos e McLEOD (1954) afirma que *B. bassiana* é o isolado fúngico mais encontrado em insetos mortos na natureza, afetando, segundo ALVES (1986) cerca de 200 espécies de insetos de diferentes ordens.

Estudos realizados com o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, no Ceará, Brasil, demonstraram que o uso conjunto de inseticidas e entomopatógenos pode dar bons resultados, uma vez que o produto químico causa uma vulnerabilidade na população da praga, ficando esta mais susceptível ao patógeno. Outra associação que vem dando bons resultados no controle biológico de insetos no Brasil é a de conídios de *B. bassiana* e óleo mineral, que faz com que estes fiquem aderidos à cutícula do inseto, sendo mais efetivo na infecção, principalmente do moleque da bananeira, *Cosmopolites sordidus* (BATISTA FILHO et al., 1994).

Sua patogenicidade também tem sido demonstrada contra os besouros da batata, *Leptinotarsa decelneata* e *Ostrina nubiales* (MESSIAS, 1989); *Camponotus pennsylvanicus*, formiga da terra (KELLEY-TUNIS et al., 1995); *Musca domestica*, mosca doméstica (GEDEN et al., 1995); gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* (BIDOCHKA & KHACHATOURIANS, 1990); carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* (MWANGI et al., 1995); broca-do-café *Hypothenemus hampei* (BENASSI, 1995); cupins *Nasutitermes* sp. (MALAGODI & VEIGA, 1995); percevejo do colmo do arroz *Tibraca limbativentris* (MARTINS & LIMA, 1994); formigas cortadeira dos gênero *Acromyrex* (DIEHL-FLEIG et al., 1993); gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (BADILLA & ALVES, 1991).

Além desses, também apresenta patogenicidade a insetos de interesse médico como: *Rhodnius prolixus*, um dos vetores do *Trypanosoma cruzi*, causador da Doença de Chagas (ROMANA & FARGUES, 1992), ao vetor da dengue, o mosquito *Aedes aegypt* em sua fase larval (MIRANPURI & KHACHATOURIANS, 1991); larvas de moscas tsé-tsé do gênero *Glossina*, causadoras da Doença do Sono (KAAYA & MUNYINYI, 1995).

Existem poucos indícios de que *Beauveria bassiana* seja patogênico a outros organismos, porém, foi descrito na Espanha uma micose pulmonar causada por este fungo em tartarugas vindas de Cuba e mantidas em cativeiro (GONZALES-CABO et al., 1995).

Quanto a patogenicidade a humanos e outros mamíferos, fator de preocupação para o uso de bioinseticidas, experimentos foram realizados com ratos e comprovou-se que *Beauveria bassiana* não causa infecção, não cresce e não sobrevive mais do que 3 dias quando infectados intramuscularmente em ratos sadios (SEMALULU et al., 1992).

3.3. CICLO PARASSEXUAL

O ciclo parassexual foi descoberto em 1952 por PONTECORVO & ROPER no fungo *Aspergillus nidulans*. Posteriormente foi descrito em outros fungos, mas foi para os fungos imperfeitos que a descrição deste mecanismo de recombinação foi mais relevante pois permitiu estudos genéticos destes fungos, possibilitando trabalhos de melhoramento genético.

Este mecanismo consiste em um processo de produção de recombinantes sem o envolvimento de sexualidade e sem a ocorrência de meiose, mas, segundo AZEVEDO (1985), com fusão de núcleos haplóides de genótipos diferentes em um heterocário, dando, assim, um núcleo diplóide.

Para uma melhor definição didática, pode ser dividido em 4 fases:

⇒ Heterocariose

Detectada por TINLINE & NOVIELLO (1971) através do emprego de mutantes auxotróficos, é, de acordo com AZEVEDO (1985), a coexistência de núcleos geneticamente diferentes em um citoplasma comum.

Tem sua importância evidente para os fungos, geralmente haplóides, pois permite condições similares a da diploidia mantendo uma heterozigose inclusive podendo ocasionar certo vigor de híbrido (AZEVEDO, 1985). Além disso, confere a vantagem de uma resposta rápida a pressões de seleção como mudança nutricional ou outro regime ambiental pela alta flexibilidade de adaptação (INGOLD & HUDSON, 1993).

No entanto, a heterocariose em si não é um sistema dos mais favoráveis no que se refere a propagação da variabilidade genética. Em espécies com esporos uninucleados, a heterocariose só pode ser obtida através de mutação ou de

anastomose de hifas com cultura vizinha de genótipo diferente. Além do mais, o heterocário não pode produzir novos genótipos por recombinação entre os núcleos (AZEVEDO, 1985).

⇒ Fusão de Núcleos: forma-se um núcleo diplóide heterozigoto, mas não necessariamente um conídio diplóide.

⇒ Produção de Recombinantes: ocorrem permutas mitóticas e arranjos cromossômicos misturando cromossomos parentais nas células descendentes.

⇒ Haploidização: ocorre por não disjunção mitótica, com possibilidade de recombinação genética. O diplóide pode passar por diversas fases de aneuploidia e originar haplóides que se diferenciam dos haplóides os quais originaram o diplóide.

Associado ao fenômeno da parassexualidade está o fato de que linhagens que possuem um segmento cromossômico em duplicata são instáveis e podem produzir novos fenótipos.

Esta forma de recombinação apresenta grande importância por representar um mecanismo que proporciona uma fase diplóide estável em fungos. Em entomopatogênicos pode-se apontar principalmente para a possibilidade de obtenção de linhagens que combinem características importantes dos pais para eficiente controle biológico, como: fácil disseminação, resistência a condições adversas, ótima conidiação, crescimento elevado (FRIGO & AZEVEDO, 1984).

3.4 PARAMEIOSE

Caracteriza-se por um processo de recombinação através do surgimento de conídios recombinantes, no próprio heterocário, sem a observação do diplóide

e de setores aneuplóides, ou seja, um processo de haploidização rápida semelhante à meiose.

Esse termo foi proposto por BONATELLI JR. et al. (1983) observando esse processo em *Aspergillus niger*. Tanto em *Beauveria bassiana* (PACOLLA-MEIRELLES & AZEVEDO, 1991) quanto em *Metarhizium anisopliae* (BAGALHI, 1987), a parameiose já foi detectada e também constitui um mecanismo de grande importância no estudo destes fungos ampliando a possibilidade de melhoramento genético de linhagens para o controle biológico.

3.5 ELETROFORESES DE PROTEÍNA TOTAL E ISOENZIMAS

A eletroforese é uma técnica relativamente simples, rápida e de alto valor informativo, e, por esses fatores, sua aplicação na evidencição de proteínas tem sido crescentemente ampliada para estudos de taxonomia, fisiologia e genética de plantas, animais e microrganismos (ALFENAS et al., 1991).

Visando definidas enzimas ou proteínas solúveis, seu emprego tem se destacado na identificação de certos grupos de fungos (HALL, 1974; MOREIRA & ALFENAS, 1985), bactérias (BAPTIST et al., 1971; SMITH & POWELL, 1968), vírus (KOENIG et al., 1970) e nematóides (DICKSON et al., 1971).

As bandas enzimáticas, presentes nos géis, apresentam grande potencialidade na caracterização de raças de fitopatógenos (BERNIER et al., 1983; KIM et al., 1984), nos estudos de genética e evolução de fungos fitopatogênicos (BURDON et al., 1982; TOOLEY et al., 1985) e plantas (HAMRICK, 1983).

Além dessas, a análise eletroforética pode ser utilizada para a identificação de clones, cultivares e linhagens, estudo da citogenética, fisiologia e bioquímica de plantas, e, também, apresenta grande potencial para a caracterização de variedades e linhagens de plantas resistentes à doenças e estudo das relações patógeno-hospedeiro (ALFENAS et al., 1991).

A eletroforese consiste, ainda, segundo ALFENAS et al. (1991), na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares em campo elétrico. Moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo ou anodo e as com carga positiva para o pólo negativo ou catodo. Essa carga das moléculas de proteínas é função somatória dos aminoácidos que as constituem e essa capacidade de adquirir carga positiva ou negativa é dada em função do pH.

O poder de resolução é um fator relevante na escolha do meio e a escolha deste depende dos objetivos de estudo. Para proteínas, géis de poliacrilamida têm sido preferidos por apresentarem maior poder de resolução e permitirem ampla variação no diâmetro de seus poros. Além disso, são altamente translúcidos o que permite quantificar a atividade enzimática por densitometria. Já para enzimas, tanto géis de amido quanto de poliacrilamida oferecem boas resoluções (ALFENAS et al., 1991).

A avaliação quantitativa (densitometria) dos zimogramas é também conduzida em ampla escala. A variação na intensidade de bandas é função da atividade enzimática, da estrutura quaternária da enzima, do número de locos e número de alelos no loco que contribuem para a síntese da enzima.

A variabilidade dos padrões enzimáticos de uma população é geralmente atribuída à segregação genética e designada polimorfismo. Isoenzimas (formas diferentes de uma mesma enzima que ocorrem num mesmo organismo com afinidade para um mesmo substrato) e aloenzimas (quando representam a expressão fenotípica de alelos situados num mesmo loco) constituem uma importante fonte de marcadores genéticos, que podem ser empregados em vários programas experimentais teóricos e práticos. Apresentam ainda, segundo HEDRICK (1983), vantagens em relação a outros marcadores tradicionais, pois permitem a análise de vários locos simultaneamente; os alelos de cada loco são codominantes, permitindo a identificação de heterozigotos; medem a variabilidade a um nível mais próximo do DNA do que outras características fenotípicas, pois constituem um produto direto da ação gênica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS UTILIZADAS

Beauveria bassiana:

- Linhagens selvagens utilizadas:

252

E3

196

As linhagens parentais e recombinantes de *B. bassiana* foram cedidas por DALZOTO (1999).

- Linhagens parentais:

252 J4/1 nic tia (ARAÚJO, 1998)

196 W1/6 paba nic (ARAÚJO, 1998)

E3 A1/1 bio cys (DALZOTO, 1999)

- Linhagens recombinantes:

C4R3 tia

C7R2 paba

C4R4 nic

C7R1 cys

C4R2 nic cys

C7R3 nic cys

C4R6 bio

C4R5 cys

C4R1 prototrófico

Metarhizium anisopliae

- Linhagem selvagem:

A19 (cedida pelo Laboratório de Genética de Microrganismos, ESALQ/USP)

- Linhagens parentais:

AL paba1 pro7 ile1 pvi1 (paba1 pro7 - KAVA-CORDEIRO et al., 1995; ile1 pvi1 - SCHOENENBERGER, 1997)

AL pro2 cys1 (pro2 - KAVA-CORDEIRO et al., 1995; cys1 - YOSHIDA, 1996)

AL val1 lis1 (val1 - KAVA-CORDEIRO et al., 1995; lis1 - SCHOENENBERGER, 1997)

4.2 MEIOS DE CULTURA**4.2.1 Meio Mínimo - MM (PONTECORVO et al., 1953a)**

O Meio Mínimo é um meio no qual só crescem microrganismos que não tenham deficiências nutricionais de nenhum tipo. Este meio é composto de:

NaNO ₃	6,00g
KH ₂ PO ₄	1,50g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50g
FeSO ₄	0,02g
ZnSO ₄	0,02g

Glicose 10,00g
Água Destilada p/ 1000ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N. Para MM sólido foi acrescentado 1,5% de ágar DIFCO diretamente no Erlenmeyer que foi fechado com rolha de algodão e papel alumínio. Após, o meio foi autoclavado por 20 minutos a 1 atmosfera e armazenado em temperatura ambiente.

4.2.2 Meio Completo - MC (PONTECORVO et al., 1953a modificado, por AZEVEDO & COSTA, 1973)

O Meio Completo é um meio nutritivo amplamente utilizado e favorece o crescimento de grande parte dos fungos. Este meio é composto de meio mínimo adicionado de (para 1000ml):

Extrato de Levedura 2,0g
Peptona 2,0g
Caseína Hidrolisada 1,5g
Solução de Vitaminas 1,0ml

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N. Para MC sólido foi acrescentado 1,5% de ágar diretamente no Erlenmeyer igualmente fechado, autoclavado e armazenado.

4.2.3 Meio Mínimo mais 4% de Meio Completo

Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,5ml de meio mínimo líquido mais 4% de meio completo líquido. Estes tubos foram autoclavados e armazenados a 4°C.

4.3 SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS ADICIONADOS AO MEIO MÍNIMO

Eventualmente foram adicionados ao meio mínimo suplementos nutricionais. Estes suplementos foram vitaminas, aminoácidos ou ácidos nucléicos. Esta adição de nutrientes ao meio confere a ele uma condição seletiva. Um pouco ou até bem antes do uso foi adicionado 0,1ml da solução estoque ou do suplemento desejado.

Os suplementos foram adicionados em frascos contendo 10 ml de água destilada previamente esterilizada em autoclave e em seguida foram aquecidos em banho-maria (98°C) por 15 minutos e depois mantidos em geladeira a 4°C.

4.3.1 Vitaminas

Ácido Nicotínico (nic).....	0,10 mg/ml
Ácido Paraminobenzóico (paba)	0,05 mg/ml
Biotina (bio)	0,04 mg/ml
Piridoxina (pir)	0,05 mg/ml
Riboflavina (rib)	0,10 mg/ml
Tiamina (tia)	0,05 mg/ml

4.3.2 Aminoácidos

Ácido Aspártico (asp)	10,0 mg/ml
Ácido Glutâmico (glu)	10,0 mg/ml
Arginina (arg)	10,0 mg/ml
Asparagina (asn)	10,0 mg/ml
Cistina (cis)	10,0 mg/ml
Cisteína (cys)	10,0 mg/ml
Fenilalanina (fen)	10,0 mg/ml
Glicina (gli)	10,0 mg/ml
Glutamina (gln)	10,0 mg/ml
Histidina (his)	10,0 mg/ml
Isoleucina (Ile)	10,0 mg/ml
Leucina (leu)	10,0 mg/ml
Lisina (lis)	10,0 mg/ml
Metionina (met)	10,0 mg/ml
Serina (ser)	10,0 mg/ml
Tirosina (tir)	10,0 mg/ml
Treonina (tre)	10,0 mg/ml
Triptofano (trp)	10,0 mg/ml
Valina (val)	10,0 mg/ml

4.3.3 Ácido Nucléico

Adenina (ade)	10,0 mg/ml
---------------------	------------

4.4 SOLUÇÕES UTILIZADAS

4.4.1 Solução Salina (0,85% - p/v)

NaCl 0,85g
Água Destilada p/ 100ml

Foram colocadas alíquotas de 9ml em vidros com tampa, autoclavados e mantidos a 4°C.

4.4.2 Solução de Tween 80 (0,1% - v/v)

Esta solução foi utilizada no preparo das suspensões de esporos. O Tween é uma espécie de detergente que auxilia na separação dos esporos.

Tween 80 0,1ml
Água Destilada p/ 100ml

Foram colocadas alíquotas de 2,5ml em tubos de ensaio, estes foram fechados com algodão e papel alumínio, autoclavados e mantidos a 4°C.

4.4.3 Solução de Vitaminas

Esta solução foi utilizada na preparação de meio de cultura completo (MC).

Ácido Nicotínico	100,0mg
Ácido Paraminobenzóico	0,2mg
Biotina	0,2mg
Piridoxina	50,0mg
Riboflavina	100,0mg
Tiamina	50,0mg
Água Destilada	p/ 100ml

Foi, então, aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e armazenada em frasco escuro a 4°C.

4.4.4 Solução Estoque de Tampão do Gel Concentrador (Tris-HCL 0,6173M pH6,8)

Tris-base	7,475g
Água Destilada	p/ 100ml

O pH foi acertado para 6,8 com HCl para análise. A solução foi filtrada e armazenada a 4°C.

4.4.5 Solução Estoque de Tampão do Gel Separador (Tris-HCL 3,778M pH8,9)

Tris-base 45,75g
Água Destilada p/ 100ml

O pH foi acertado para 8,9 com HCl para análise. Após, a solução foi filtrada e armazenada a temperatura ambiente.

4.4.6 Solução de Persulfato de Amônia 10% (p/v)

Persulfato de Amônia 0,1g
Água Destilada p/ 1ml

Para melhores resultados, esta solução foi preparada no momento do uso para evitar a perda de função.

4.4.7 Solução Estoque de Acrilamida

Acrilamida 73g
Bis-acrilamida 2g
Água Destilada 250ml

Esta solução foi filtrada e armazenada a 4°C. Em seu preparo foi utilizado máscara para evitar o contato com os componentes acrílicos que são neurotóxicos na forma monomérica.

4.4.8 Solução Estoque do Tampão do Tanque pH8,9 10X ou Tampão de Corrida

Tris-base	63,2g
Glicina	39,9g
Água Destilada	p/ 1000ml

O pH foi acertado para 8,9 com HCl para análise e então, foi armazenada a 4°C.

4.4.9 Solução do Tampão da Amostra

Glicerol	5,0ml
Tampão do Gel Concentrador (Estoque)	2,5ml
Azul de Bromofenol	2,5mg
Água Destilada	p/ 25ml

Alíquotas de 1ml foram colocadas em Eppendorf e armazenadas a -20°C.

4.4.10 Solução de Esterase

Solução A:

α -Naftil Acetato	0,1g
Acetona	5,0ml
Água Destilada	5,0ml

Solução B:

β -Naftil Acetato	0,1g
Acetona	5,0ml
Água Destilada	5,0ml

Essas soluções foram armazenadas a 4°C, em frascos separados.

4.4.11 Tris-HCL 0,5M pH7,1

Tris-base	1,817g
Água Destilada	p/ 30ml

O pH foi acertado para 7,1 com HCl para análise e, então, foi armazenada a 4°C.

4.4.12 Solução Estoque de Proteína Total - Fixador PAGE

Metanol	45ml
Ácido Acético Glacial	10ml
Água Destilada	45ml

Armazenado a 4°C.

4.4.13 Gel Separador à 10% (ALFENAS et al., 1991)

Solução de Acrilamida (Estoque)	27,00ml
Persulfato de Amônia	0,267ml
Temed	0,027ml
Tampão do Gel Separador (Estoque)	8,00ml
Água Destilada	44,80ml

Esse gel foi preparado no momento do uso, pois a polimerização inicia logo após a mistura dos ingredientes.

4.4.14 Gel Concentrador à 4% (ALFENAS et al., 1991)

Solução de Acrilamida (Estoque)	4,00ml
Persulfato de Amônia	0,10ml
Temed	0,02ml
Tampão do Gel Concentrador (Estoque)	3,00ml
Água Destilada	22,80ml

Esse gel foi preparado no momento do uso, pois a polimerização inicia logo após a mistura dos ingredientes.

4.4.15 Corante para Esterase α e β (BREWER e SING, 1970; CONKLE et al., 1982; MARTY et al., 1984; MICALES et al., 1986; SICILIANO e SHAW, 1976; SOLTIS et al., 1983; STUBER et al., 1988; YAMADA e GURIES, 1989)

Fast Blue RR	50 mg
Tris-HCl 0,5M pH7,1 (Estoque)	5,00ml
Água Destilada	43,5ml
α -Naftil-Acetato (Estoque)	0,75ml
β -Naftil Acetato (Estoque)	0,75ml

Essa solução corante foi preparada no momento do uso.

Para a revelação das esterases separadamente utilizou-se para α -Esterase 1,5ml da solução A (não foi utilizada solução B) e para β -Esterase, 1,5ml da solução B (não foi utilizada solução A).

4.4.16 Corante para Gel de Proteínas (ALFENAS et al., 1991)

Fixador PAGE (Estoque)	100ml
Brilliant Blue R-250	0,1g

Esse corante foi preparado no momento do uso.

4.4.17 Corante Álcool Desidrogenase (BREWER e SING, 1970; CHELIAK e PITEL, 1984; CONKLE et al., 1982; HARRIS e HOPKINSON, 1978; MICALES et al., 1986; SHAW e PRASAD, 1970; YAMADA e GURIES, 1989)

Etanol (95% v/v)	20ml
NAD ⁺ , Na	20mg
MTT	20mg
PMS	2mg
Tris-HCl 0,2M pH 8,0	p/ 100ml

Esse corante foi preparado no momento do uso.

4.4.18 Corante Sorbitol Desidrogenase (HARRIS e HOPKINSON, 1978; MARTY et al., 1984; SHAW e PRASAD, 1970; YAMADA e GURIES, 1989)

Sorbitol	500mg
NAD ⁺ , Na ₂	20mg
MTT ou NBT	20mg
PMS	2mg
Tris-HCl 0,05M pH 8,0	p/ 100ml

Esse corante foi preparado no momento do uso.

4.4.19 Solução Sulfocrômica

Dicromato de potássio	20g
H ₂ SO ₄ p.a	200ml
Água Destilada	p/ 1000ml

4.5 PREPARO DE MATERIAL

4.5.1 Esterilização

Vidrarias e palitos de transferência foram esterilizados em forno Pasteur a 180° C por 4 horas.

Filtros de Büchner, papel de filtro, luvas, frascos vazios, tubos Falcon, tubos de centrífuga, pinças, espátulas e caixas com ponteiras para micropipetas, foram embrulhados separadamente em papel alumínio e autoclavados a uma atmosfera, também, por 20 minutos.

Todos os materiais, exceto pipetas, após utilizados foram também esterilizados em autoclave a uma atmosfera por 20 minutos e após lavados normalmente. As pipetas foram colocadas dentro de uma proveta contendo solução sulfocrômica, durante 24h no mínimo, e então colocadas em um enxaguador de pipetas ligado à água corrente por no mínimo 12 h.

O material de manuseio, como alças e pinças, foi flambado em bico de Bunsen no momento do uso e após.

4.5.2 Incubação dos Fungos

As placas de ambos os fungos - *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* - foram incubadas a 28°C em estufa tipo BOD por aproximadamente 8 dias. Para os heterocários, a incubação ocorreu também a esta temperatura, em estufa tipo BOD, mas por aproximadamente 20 dias.

Em meios líquidos, a incubação também ocorreu a 28°C, em agitador orbital com rotação variável, descrita em cada caso.

4.5.3 Manuseio Básico do Material

Para evitar contaminação por outros microrganismos, todos os procedimentos realizados com os fungos foram feitos em bancada previamente limpa com Lisoform e próximo à chama do bico de Bunsen.

Os meios de cultura sólidos foram aquecidos em forno microondas até que estivessem totalmente fundidos para então serem vertidos em placas de Petri no fluxo laminar ou próximo a chama do Bico de Bunsen.

As soluções e suspensões de esporos adicionados às placas de Petri contendo meio de cultura, foram espalhados uniformemente por toda superfície com auxílio da alça de Drigalski que foi mantida em um becker contendo álcool 95% ou álcool comercial e também foi flambada em bico de Bunsen antes do uso.

4.6 SOBREVIVÊNCIA À LUZ ULTRAVIOLETA

Conídios da linhagem desejada foram colocados em tubos de ensaio contendo solução de Tween 80 (item 4.4.2) e então este foi levado ao agitador de tubos para homogeneização. Com auxílio de uma pipeta, foi retirado 1 ml e colocado em um frasco contendo salina (item 4.4.1) (9ml) de onde, após homogeneização, foi retirada uma alíquota e realizada a contagem em câmara de Neubauer para estimar-se a concentração de esporos por ml de suspensão. A contagem foi realizada nos 2 campos da câmara (5 quadrículos em diagonal em cada campo) da seguinte maneira:

$$\text{Contagem} = \bar{x} \cdot 5 \cdot 10^4 \cdot 10^{-1} \cdot \text{Sobrevivência (5\% - 1min)}$$

\bar{x} → média dos 2 campos
 5 → igual ao nº. total de quadrículos (25)
 10^4 → volume da câmara (p/ chegar a ml)
 10^{-1} → volume que vai ser plaqueado

Na sala de irradiação, a suspensão de esporos foi despejada em uma placa de Petri esterilizada para obtenção de uma maior superfície de exposição à luz ultravioleta (lâmpada germicida 2500Å de 15W de potência). O tempo de exposição foi de 1 minuto, o que permitiu em torno de 5% de sobrevivência (KAVA-CORDEIRO, 1993).

Após a irradiação foram feitas diluições em solução salina (item 4.4.1) convenientes para um crescimento de 30 a 100 colônias e então semeados 0,1ml da suspensão diluída em placas de Petri contendo MC (item 4.2.2). A suspensão adicionada em cada placa foi espalhada com a alça de Drigalski e as placas foram guardadas na estufa a 28°C, acondicionadas em latas de alumínio por no mínimo 24 horas para evitar o mecanismo de fotorreativação que é responsável pela correção de erros na molécula de DNA e conseqüente reversão de mutações. A enzima responsável pela correção só é ativada na presença da luz visível pois necessita da energia dissipada pelo comprimento de onda no espectro azul para atuar. Após o período mínimo de 24 horas, as placas foram retiradas das latas e mantidas na estufa a 28°C por aproximadamente 6 a 7 dias ou até o aparecimento de esporos nas colônias sobreviventes.

4.7 ISOLAMENTO DE MUTANTES MORFOLÓGICOS E AUXOTRÓFICOS

4.7.1 Mutantes Morfológicos

O isolamento de mutantes morfológicos foi feito por inspeção visual nas placas que continham os conídios expostos ao mutagênico comparando as colônias originadas a partir destes, com a morfologia das colônias selvagens.

4.7.2 Mutantes Auxotróficos

O isolamento de mutantes auxotróficos foi feito pelo método de isolamento total (PONTECORVO et al., 1953a), retirando-se conídios das colônias sobreviventes à ação do mutagênico e transferindo-se, com auxílio dos palitos de transferência, para placas de Petri contendo MM (item 4.2.1), na distribuição de 5x5+1 (AZEVEDO & COSTA, 1973), conforme Figura 1.

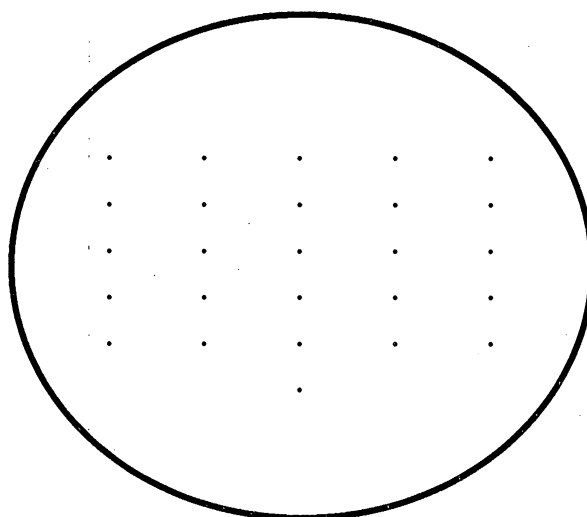


FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO 5x5+1 (AZEVEDO & COSTA, 1973)

Após 48 horas em estufa a 28°C, as colônias que não se desenvolveram neste meio foram consideradas mutantes auxotróficos. O ponto de inóculo sem crescimento foi transferido para MC (item 4.2.2), para que houvesse o desenvolvimento da colônia e futura identificação da mutação.

Para a caracterização de mutantes auxotróficos, estes foram inoculados em uma bateria de placas contendo MM (item 4.2.1) + suplementos (item 4.3) na quantidade de 0,1ml (de vitaminas, aminoácidos ou ácidos nucléicos). A mutação auxotrófica foi identificada na placa com o suplemento que proporcionou o crescimento da colônia.

4.8 TESTE DE REVERSÃO

As linhagens mutantes e recombinantes foram ensaiadas quanto a reversão das marcas nutricionais. A partir de uma colônia monospórica (colônia que cresceu a partir de um único esporo) foram coletados esporos e estes repicados em MC (item 4.2.2), MM (item 4.2.1) e MM + suplemento (item 4.3) no caso de mutantes auxotróficos simples e em MC, MM, MM + 1º. suplemento, MM + 2º. suplemento e MM + 1º. suplemento + 2º. suplemento em caso de mutantes auxotróficos duplos. A ausência ou presença de crescimento foi verificada após 7-8 dias de incubação.

4.9 OBTENÇÃO DE RECOMBINANTES

Para a obtenção de recombinantes utilizou-se a Técnica do "Poço" de AZEVEDO (1971). Esta técnica consistiu na mistura de conídios de duas linhagens com no mínimo duas deficiências auxotróficas complementares em meio mínimo acrescido de 4% de meio completo (item 4.2.3). Após homogeneização, esta suspensão foi colocada no centro de uma placa contendo meio mínimo (item 4.2.1) sólido, na qual foi feito um orifício de 1 cm de diâmetro - "poço".

Essas placas foram mantidas em estufa tipo BOD a 28°C por aproximadamente 20 dias, quando se analisou o crescimento ao redor do poço, de acordo com a Figura 2.

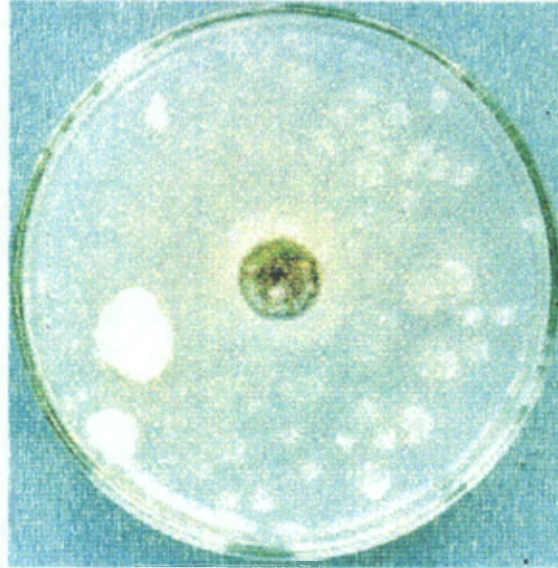


FIGURA 2 - CRESCIMENTO FÚNGICO AO REDOR DO POÇO

Com auxílio de uma alça acoplada ao cabo de Kule, foi coletada parte do crescimento próximo a borda do poço e colocada em solução salina (item 4.4.1). Desta solução, 0,1ml foi posto em placas de Petri com MM (item 4.2.1) e MM + combinações 2 a 2 das mutações, exceto as parentais. Por exemplo, para o cruzamento 3 (AL val1 lis1 X AL pro2 cys1), foi plaqueado em:

MM

MM + val + pro

MM + val + cys

MM + lis + pro

MM + lis + cys

As soluções de esporos foram espalhadas nas placas com auxílio da alça de Drigalski e essas placas foram incubadas também a 28°C por 8 dias. Nas placas que apresentaram crescimento, as colônias foram transferidas para placas contendo MC (item 4.2.2) de acordo com a Figura 3:

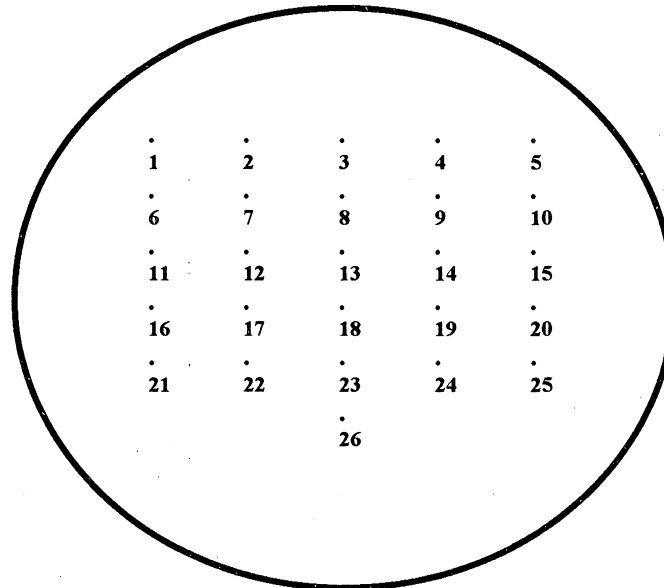


FIGURA 3 - DEMONSTRAÇÃO DOS REPIQUES REALIZADOS EM MC

Na tampa de cada placa contendo MC (item 4.2.2), anotou-se de que placa com MM (item 4.2.1) + suplementos (item 4.3) essas colônias foram retiradas. Essas placas foram incubadas até esporularem, ou seja, aproximadamente 8 dias em BOD a 28°C. Após, cada colônia foi transferida para MM com os suplementos da placa de MM original, também na distribuição de 26 pontos devidamente

numerados. Por exemplo: colônias que cresceram na primeira etapa em MM + lis + pir foram repicadas em MC. Após esporulação das 26 colônias, essas foram transferidas para MM + lis, MM + pir e MM + lis + pir. Novamente foram incubadas a 28°C e após 3 a 4 dias identificou-se as colônias que cresceram e conseqüentemente os recombinantes.

4.10 CARACTERIZAÇÃO PARA PADRÕES DE ISOENZIMAS (PACCOLA-MEIRELLES, 1988, MODIFICADO POR KAVACORDEIRO, 1998 - COMUNICAÇÃO PESSOAL) E PADRÕES DE PROTEÍNA TOTAL (ALFENAS et al., 1991)

4.10.1 Cultivo dos Fungos e Extração de Proteínas

Conídios das linhagens ensaiadas foram coletados e colocados em Solução de Tween 80 (item 4.4.2), homogeneizadas e inoculados em frascos Erlenmeyer contendo MC (item 4.2.2) líquido. Incubou-se esses frascos em agitador orbital a 150 rpm a 28°C por aproximadamente 3 dias. O micélio produzido foi coletado em funil de Büchner contendo papel filtro, com auxílio de bomba de vácuo. O micélio foi lavado várias vezes com água destilada esterilizada, para retirar-se o restante do meio de cultura. Esse micélio permaneceu acondicionado em placa de Petri esterilizada e devidamente vedada a -20°C.

O micélio foi, então, triturado em cadinho com macerador, adicionando-se Nitrogênio líquido, colocados em tubos de centrífuga cujas massas já haviam sido verificadas e para cada 300mg de micélio foi adicionado 1ml de solução extratora (solução estoque de tampão do gel concentrador) (item 4.4.4) e então, armazenado a 4°C por, no mínimo, 12 horas. Após, foi centrifugado a 4000 rpm em centrífuga refrigerada (5°C, pois o aquecimento pode desnaturar as proteínas e afetar a atividade enzimática) por 1 hora. Retirou-se o sobrenadante (extrato protéico), que foi armazenado em tubos de microcentrífuga de 1,5ml a -20°C.

4.10.2 Placas de Gel de Acrilamida

As placas foram montadas em sistema vertical e vedadas com ágar-água 4%. Foi preparado o gel separador à 10% (item 4.4.3) e vertido na placa com o auxílio de uma seringa até 1,5 cm abaixo da parte inferior do pente. Aproximadamente 250µl de butanol foi adicionado para linearização. Após polimerização - que ocorre pela formação de radicais livres de acrilamida obtidos quimicamente e catalisada pela presença do TEMED -, foi retirado o butanol e lavado com água. Foi preparado o gel concentrador a 4% (item 4.4.14), vertendo-o em seguida, acima do gel separador, também com auxílio de seringa. Introduziu-se o pente sobre o gel empilhador e conservou-se à temperatura ambiente para polimerização.

Eventualmente, o gel foi colocado em plástico devidamente vedado e acondicionado em geladeira por até 3 dias, sem prejuízo nos resultados.

Polimerizado o gel, foi retirado o pente e o espaçador inferior das placas, limpando-se o ágar-água. Foi, então, fixada a placa à cuba de corrida e os poços deixados pelo pente, foram lavados com o tampão de corrida.

As amostras foram preparadas em tubos de microcentrífuga, sendo utilizados 10 μ l de tampão da amostra (item 4.4.9) para 40 μ l de amostra, que após homogeneizados foram adicionadas aos poços. Os tanques superior e inferior foram preenchidos com tampão de corrida, tomando-se o cuidado de eliminar as bolhas. A corrida teve início em 100V, sendo que ao final do gel concentrador, elevada a voltagem para 200V até o final.

4.10.3 Coloração Para Revelação de Esterase

Ao término da corrida, o gel foi retirado da placa e colocado em solução corante para esterase por 10-15 minutos a 37°C (item 4.4.15). Após este período, o gel foi retirado do corante, lavado com água destilada e mantido em água destilada a 4°C.

4.10.4 Coloração para Revelação de Proteína Total

O gel foi retirado da placa e colocado em solução corante para proteína total a 37°C por 12 horas (item 4.4.16). Em seguida, lavagens sucessivas foram efetuadas com a solução de fixador PAGE (item 4.4.12) para fixar-se as bandas e remover-se o excesso do corante. Manteve-se o gel em água destilada a 4°C.

4.10.5 Coloração para Revelação de Álcool Desidrogenase

O gel foi incubado no escuro a 30-37°C por 15-60 min (item 4.4.17). Após, a solução foi descartada e o gel foi fixado em solução aquosa de glicerol 10%.

4.10.6 Coloração para Revelação de Sorbitol Desidrogenase

O gel foi incubado no escuro a 30-37°C até as bandas aparecerem (item 4.4.18). A solução foi descartada e o gel foi fixado em solução aquosa de glicerol 10%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DE MUTANTES EM *Metarhizium anisopliae*

Durante o trabalho, foram realizados 3 tratamentos com luz ultravioleta para a obtenção de mutantes que foram utilizados nos heterocários, de acordo com a Tabela 1.

O tempo de exposição à luz ultravioleta foi de 1 minuto, buscando-se uma taxa de sobrevivência de 1 a 5%, ou até menor.

TABELA 1 - HISTÓRICO DAS IRRADIAÇÕES, FREQUÊNCIA E ASPECTO DOS MUTANTES OBTIDOS EM *Metarhizium anisopliae*

TRATAMENTO COM UV	Nº DE COLÔNIAS ENSAIADAS	MUTANTES MORFOLÓGICOS	MUTANTES AUXOTRÓFICOS
A19 met1 ylo2	248	selvagem e pvi1	nic1 e pir1
A19 met1 ylo2	232	-	-
A19 pvi1	217	-	-
TOTAL	697	02	02

Obs.: pvi corresponde à coloração vinho pálido (Figura 4), ylo à coloração amarelo claro (Figura 5), selvagem à coloração verde original (Figura 6), met à deficiência para o aminoácido metionina, nic e pir à deficiências para as vitaminas ácido nicotínico e piridoxina respectivamente.



**FIGURA 4 - MUTAÇÃO MORFOLÓGICA PARA COLORAÇÃO
VINHO PÁLIDO - PVI EM *Metarhizium anisopliae***



**FIGURA 5 - MUTAÇÃO MORFOLÓGICA PARA COLORAÇÃO
AMARELO CLARO - YLO EM *Metarhizium anisopliae***

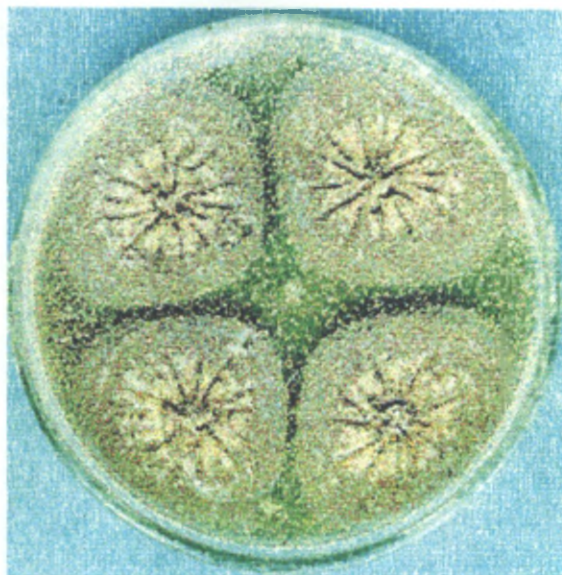


FIGURA 6 - REVERSÃO DE MUTAÇÃO PARA COLORAÇÃO VERDE ORIGINAL EM *Metarhizium anisopliae*

A frequência de obtenção tanto de mutantes morfológicos quanto auxotróficos foi de 0,28694%.

Ambos os mutantes auxotróficos apresentaram crescimento apenas em MM+met+vitamina (pois já apresentavam a deficiência para metionina) procedendo-se assim novos repiques em MM + todas as combinações de vitaminas + met, da seguinte maneira:

Placa 1 - MM + Met + Nic + Pir + Tia

Placa 2 - MM + Met + Paba + Ribo + Tia

Placa 3 - MM + Met + Bio + Pir + Ribo

O crescimento foi verificado apenas na placa nº. 1 para uma das colônias mutantes, identificando-se, desta forma, deficiência para ácido nicotínico, que está presente somente nesta placa. Para a outra colônia mutante, o crescimento foi verificado na placa 1 e 3, identificando-se piridoxina como a deficiência presente. Estas marcas auxotróficas foram confirmadas em outro repique.

5.2 TESTE DE REVERSÃO

Para *Metarhizium anisopliae*, as linhagens AL paba1 pro7 ile1 pvi1, AL pro2 cys1, AL val1 lis1, os mutantes auxotróficos e recombinantes obtidos foram ensaiadas quanto à reversão espontânea de suas marcas. No entanto, não apresentaram marcas revertentes.

Para *Beauveria bassiana*, além dos mutantes 252 nic tia, 196 paba nic e E3 bio cys, todos os recombinantes obtidos por DALZOTO (1999) também foram ensaiados quanto a reversão de suas marcas. Os mutantes não apresentaram reversão de suas marcas. Já quanto aos recombinantes, apenas dois - C7R1 e C4R1 - não apresentaram reversão de suas marcas. Desta forma, optou-se por utilizar somente essas duas linhagens na caracterização molecular de eletroforeses de isoenzimas e proteína total.

5.3 OBTENÇÃO DE RECOMBINANTES EM *Metarhizium anisopliae*

Foram escolhidas linhagens complementares diferentes para a tentativa de obtenção de heterocários e produção de recombinantes pelo método do "Poço" de AZEVEDO (1971). Foram realizados 3 cruzamentos, os quais:

Cruzamento 1: AL paba1 pro7 ile1 pvi1 X A19 met1 nic1 ylo2

Cruzamento 2: AL val1 lis1 X A19 met1 pir1 ylo2

Cruzamento 3: AL val1 lis1 X AL pro2 cys1

Os recombinantes obtidos foram os seguintes:

Cruzamento 1: Recombinante nic⁻

Cruzamento 2: Recombinante val⁻

Recombinante val⁻ pir⁻

Recombinante met⁻

Recombinante lis⁻ pir⁻

Recombinante pir⁻

Recombinante prototrófico

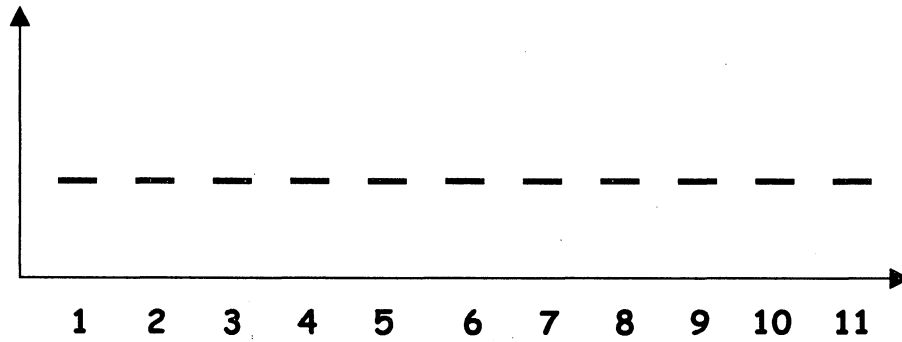
Cruzamento 3: Recombinante cys⁻

5.4 ANÁLISE DE ISOENZIMAS E PROTEÍNA TOTAL

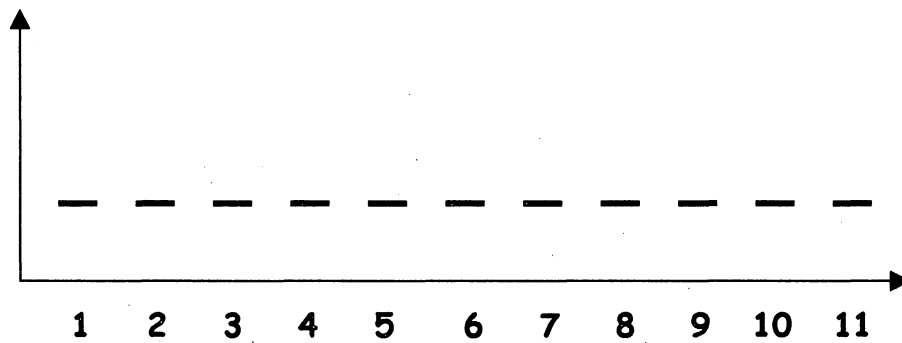
Inicialmente, a caracterização eletroforética foi realizada através de quatro diferentes isoenzimas, sendo: Esterase α , Esterase β , Álcool Desidrogenase e Sorbitol Desidrogenase.

Tanto para Esterase α quanto para Esterase β , os fungos - *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* - não apresentaram bandas, embora RIBEIRO (1999) tenha obtido bandas polimórficas para linhagens de *M. anisopliae*. As revelações para esterase costumam formar grande número de bandas porque qualquer enzima capaz de quebrar a ligação naftil acetato dá reação positiva. Desta maneira, HALL et al. (1969) cita alguns problemas que podem responder a ausência de bandas para essas linhagens, como: problemas na otimização das condições de extração e eletroforese de cada isoenzima dentro dos sistemas enzimáticos. Para confirmar a possibilidade de problemas na extração, em uma das corridas foram utilizados extratos protéicos de linhagens de *M. anisopliae* de RIBEIRO (1999), as quais continuaram não apresentando bandas para esterase. Assim, outros problemas citados por ALFENAS et al., (1991) podem ser levantados, como polaridade reversa, baixa concentração da amostra ou ainda, oxidação ou ação de proteases.

Para Álcool Desidrogenase e Sorbitol Desidrogenase, além de só apresentarem bandas para *Metarhizium anisopliae* (Figura 7 e 8), não foi verificado variação entre as linhagens.



**FIGURA 7 - ELETROFEROGRAMA DE ÁLCOOL DESIDROGENASE
PARA *Metarhizium anisopliae***

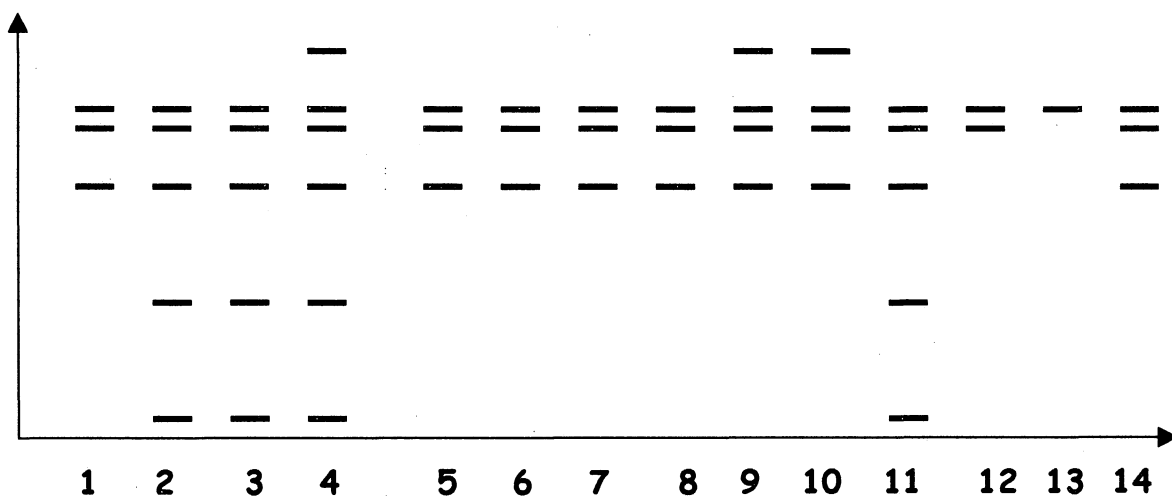


**FIGURA 8 - ELETROFEROGRAMA DE SORBITOL DESIDROGENASE
PARA *Metarhizium anisopliae***

Para ambas as Figuras 7 e 8, os números correspondem as seguintes linhagens:

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 - A19 | 7 - Recombinante lis pir |
| 2 - AL val1 lis1 | 8 - A19 met1 pir1 ylo2 |
| 3 - Recombinante prototrófico | 9 - AL paba1 pro7 ile1 pvi1 |
| 4 - Recombinante val pir | 10 - Recombinante nic |
| 5 - Recombinante met | 11 - A19 met1 nic1 ylo2 |
| 6 - Recombinante pir | |

Diante destes resultados, optou-se por caracterizar os recombinantes através de proteína total (Figuras 9 e 10) que é capaz de fornecer todas as proteínas/enzimas que estão sendo sintetizadas pelo organismo.



**FIGURA 9 - ELETROFEROGRAMA DE PROTEÍNA TOTAL
PARA *Metarhizium anisopliae***

Os números no eletroferograma de Proteína Total para *Metarhizium anisopliae* representam as seguintes linhagens:

1 - A19 (selvagem)

2 - A19 met¹ nic¹ ylo² (parental) → CRUZAMENTO 1

3 - Recombinante nic⁻

4 - AL paba 1 pro⁷ ile¹ pvi¹¹ (parental)

5 - AL val¹ lis¹ (parental)

6- Recombinante met⁻

7 - Recombinante pir⁻

8 - Recombinante lis⁻ pir⁻ → CRUZAMENTO 2

9 - Recombinante val⁻ pir⁻

10 - Recombinante prototrófico

11 - A19 met¹ pir¹ ylo² (parental)

12 - AL pro² cys¹ (parental)

13 - Recombinante cys⁻ → CRUZAMENTO 3

14 -AL val¹ lis¹ (parental)

No cruzamento 1, o único recombinante obtido apresentou padrão de bandas idêntico a ambos os parentais, diferindo em somente 1 banda do parental 4 (AL paba¹ pro⁷ ile¹ pvi¹¹).

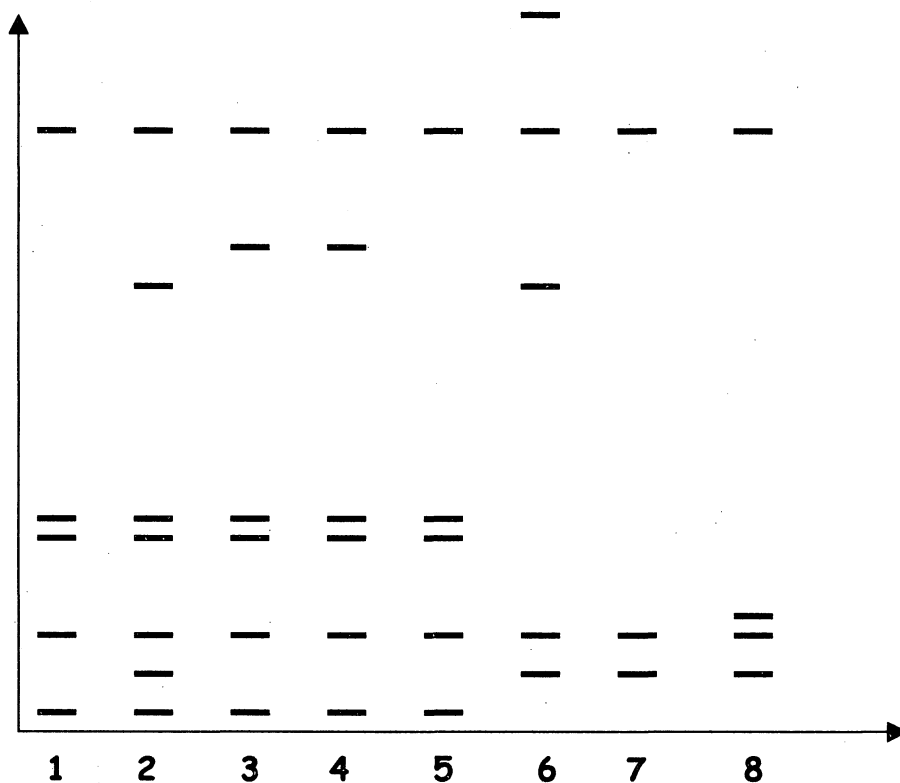
No cruzamento 2, mais especificamente nos recombinantes 9 (val⁻ pir⁻) e 10 (prototrófico) houve a presença de uma banda nova que não está presente nos

parentais e nem selvagens. No entanto, os outros recombinantes apresentam bandas que estão presentes em ambos os parentais, diferindo do parental 11 (A19 met1 pir1 ylo2) em duas bandas que não estão presentes em nenhum dos recombinantes.

Com relação ao cruzamento 3, o recombinante apresentou apenas 1 banda, sendo que esta também está presente nos dois parentais. Deste modo, este cruzamento mostrou-se pouco informativo.

Como os parentais envolvidos nos 3 cruzamentos apresentaram um padrão eletroforético bastante parecido, não se pode afirmar que não ocorreram mistura de bandas que caracterizaria a formação de diplóides, seguida de permuta mitótica e haploidização rápida. Por outro lado, pode-se sugerir que a essa formação de diplóides não tenha ocorrido, porque esta é facilmente detectável na morfologia da colônia de *Metarhizium anisopliae*, que após a formação do heterocáριο não apresentou setores e também, no cruzamento 1, os esporos não retornaram à coloração selvagem, caracterizando diploidia.

O aparecimento de apenas duas bandas novas em dois recombinantes permite inferir que esteja ocorrendo uma alteração no genoma desses. Trabalhos realizados por PACOLLA-MEIRELLES e AZEVEDO (1994) através de eletroforese de esterase, mostraram que os produtos recombinantes podiam assemelhar-se às linhagens parentais, ser uma mistura dos dois parentais ou então apresentar algumas bandas não existentes nos parentais. Estas novas bandas foram atribuídas ao desenvolvimento de proteínas com propriedades novas ou modificadas.



**FIGURA 10 - ELETROFEROGRAMA DE PROTEÍNA TOTAL
PARA *Beauveria bassiana***

Os números no eletroferograma de Proteína Total para *Beauveria bassiana* representam as seguintes linhagens:

- 1 - 196 (selvagem)
- 2 - 196 paba nic (parental)
- 3 - Recombinante 196 X E3 cys (C7R1)
- 4 - E3 bio cys (parental)
- 5 - E3 (selvagem)
- 6- Recombinante 252 X E3 prototrófico (C4R1)
- 7 - 252 nic tia (parental)
- 8 - 252 (selvagem)

De acordo com a Figura 10, o recombinante C7R1 é semelhante a ambos parentais, sendo que o parental 2 (196 paba nic) difere em duas bandas. Deste modo, não se pode afirmar que não ocorreu mistura de bandas, pois os parentais envolvidos são muito semelhantes para tal padrão eletroforético, embora DALZOTO (1999), investigando estas linhagens por RAPD, encontrou 100% de similaridade do recombinante com o parental 4 e apenas 14% com o parental 2.

Já o recombinante C4R1 apresentou semelhança com o parental 4 (E3 bio cys) e selvagem E3 em apenas duas bandas, sendo esta, maior ao parental 7 (252 nic tia) e selvagem 252, embora tenha apresentado 2 bandas novas, que como já discutido para *Metarhizium anisopliae*, podem ser atribuídas ao desenvolvimento de proteínas com propriedades novas ou modificadas. Comparando-se aos dados de DALZOTO (1999), este recombinante apresentou 28% de similaridade com o parental 4 e selvagem E3, em torno de 60% com o parental 7 e, diferindo dos resultados encontrados neste trabalho, 100% com o selvagem 252. Neste cruzamento, pode-se sugerir que o recombinante obtido apresentou padrão eletroforético mais semelhante a um dos parentais. Assim, como já observado por DALZOTO (1999), a recombinação não parece estar acontecendo por formação de diplóides, seguida de permuta e haploidização rápida, embora para *Beauveria bassiana*, a diploidia não é facilmente detectável em sua morfologia, sendo necessária a utilização de técnicas citológicas e de quantificação de DNA.

Diante dos resultados encontrados para os dois fungos não foi possível afirmar que tipo de recombinação está ocorrendo. Para comparação, em trabalhos posteriores, realizar-se-á uma análise direta do DNA por outras metodologias, pois, segundo ST LEGER et al. (1992), algumas isoenzimas tem sua produção alterada em virtude dos componentes do meio de cultura limitando as análises e conseqüentemente, as interpretações.

6 CONCLUSÕES

. O método do "Poço" descrito por AZEVEDO (1971) foi eficiente na obtenção de recombinantes nos três cruzamentos realizados em *Metarhizium anisopliae*, sendo o maior número obtido no cruzamento 2. Esses produtos recombinantes foram obtidos diretamente do heterocário, sem a observação de diplóides, indicando, desta forma, a ocorrência de parameiose.

. A eletroforese de proteína total foi eficiente na caracterização de linhagens selvagens e mutantes. No entanto, somente esta análise não propicia indicar o tipo de recombinação que está ocorrendo em *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Assim, a utilização de linhagens parentais mais contrastantes e outras metodologias podem propiciar melhores interpretações.

. 28,57% dos recombinantes de *Metarhizium anisopliae* apresentaram bandas novas, enquanto que para *Beauveria bassiana*, um, dos dois recombinantes utilizados, apresentou duas novas bandas. Estas podem ser atribuídas ao desenvolvimento de proteínas com propriedades novas ou modificadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Editora Manole Ltda., 1986, 407 p.
- ALVES, S. B.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). *Poliagro*, Bandeirantes, v.5, n.1, p. 1-9, 1983.
- ALVES, S. B.; NOGUEIRA, Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: **Congresso Brasileiro de Entomologia 9**, Londrina, 1984, P. 170. Resumos. Londrina, 1984.
- ARAÚJO, W.L. Comunicação Pessoal. Dados não publicados, 1998
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo: EDUSP, 1973, 288p.
- AZEVEDO, J.L. **Mitotic instability in *Aspergillus nidulans***. England, 1971. University of Sheffield. Phd Thesis, 198p.
- AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética**. Piracicaba: FEALQ, 1985, 173p.

- BADILLA, F.F.; ALVES, S.B. Controle do gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera - Curculionidae) com *Beauveria bassiana* em condições de laboratório e campo. **An. Soc. Entomol. Brasil.** 20(2):251-263, 1991.
- BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1987, 124p. Thesis (M.Sc.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BAPTIST, J.N.; SHAW, C.R.; MENDEL, M. Comparative zone eletrochrophoresis of enzymes of *Pseudomonas solanacearum* and *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Bacteriology**, 108:799-803, 1971. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- BARNETT, H. L. **Illustred genera of imperfect fungi**. Minneapolis, Burges Publisingh Company, 1958, 225 p., *apud* PACOLLA-MEIRELLES, L. D. **Variabilidade e recombinação no fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Vuill.)**. Piracicaba, 1988, 193p., Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP.
- BATISTA FILHO, A.; LEITÃO, A.E.F.; SATO, M.E.; LAITE, L.G.; RAGA, A. Efeito da associação *Beauveria bassiana* (BALLS) VUILL com óleo mineral, na mortalidade de *Cosmopolites sordidus* GERMAR (Coleoptera - Curculionidae). **An. Soc. Entomol. Brasil.** 23(3):379-383, 1994.
- BENASSI, V.L.R.M. Levantamento dos inimigos naturais da broca do café *Hypothenemus hampei* (FERR) (Coleoptera - Scolytidae) no Norte do Espírito Santo. **An. Soc. Entomol. Brasil.** 24(3):635-638, 1995.
- BERNIER, L.; JENG, R.S.; HUBBES, M. Differentiation of aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* by polyacrylamide gel eletrochrophoresis of intramycelial enzymes. **Mycotaxon**, 17:456-72, 1983. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.

- BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **J. Invert. Pathol.** 56(3):363-370, 1990.
- BONATELLI JR, R.; AZEVEDO, J.L.; VALENT, G.V. Parasexuality in a citric acid producing of *Aspergillus niger*. **Rev. Brasil. Genet.** Ribeirão Preto, v.6, p.399-405, 1983.
- BREWER, G.J. & SING, C.F. An introduction to isozyme techniques. Academic Press, New York, 1970, 186p. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.
- BURDON, J.J.; MARSHALL, D.R.; LUIG, N.H.; GOW, D.J.S. Isoenzyme studies on the origin and evolution of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* in Australia. **Australian Journal of Biological Sciences**, 35: 231-8, 1982. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- CHELIAK, W.M. & PITEL, J.A. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Patawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service Information Report PI-X-42, 1984, 49 p. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.
- CONKLE, M.T., HODGRIS, P.D.; NUNNALLY, L.B.; HUNTER, S.C. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. USDA, Pacific southwest forest and range experimental station, 1982, 18p. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.
- DALZOTO, P.R. Estudos genéticos no fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* Vuill. Curitiba, 1996, 71 p., Monografia - Universidade Federal do Paraná.

- DALZOTO, P.R. **Investigação dos processos de recombinação no Deuteromiceto *Beauveria bassiana* Vuill por meio de RAPD.** Curitiba, 1999, 97 p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
- DICKSON, D.W.; HUISING, D.; SASSER, J.N. Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases, and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. **Journal of Nematology**, 3:1-18, 1971. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; PACHECO, M.R.M. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v. 40, p. 1103-1105, 1988.
- DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; SPECHT, K.L.; VALIM-LABRES, M.E. Efficiency of *Beauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. control (Hymenoptera - Formicidae). **An. Soc. Entomol. Brasil.** 22(2):281-285, 1993.
- FARGUES, J.; REMAUDIERE, G. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. **Mycopathologia.** Dordrecht, v.62, v.1, p. 31-37, 1977.
- FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Ann. Rev. Entomol. Soc.**, Stanford, v.23, p. 409-442, 1978.
- FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L. Variabilidade natural para crescimento, conidição e sobrevivência à luz ultravioleta em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Rev. da Agric.** 61:137-147, 1984. *Apud*: VILAS BOAS, A.M.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A. Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. **Arq. Biol. Technol.** 35(4):749-761, 1992.
- GARCIA, A.T.E.; BARACHO, I.R.; SOUZA, H.M.L., MESSIAS, C.L. Virulência de linhagens mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae*, em *Ceratitia capitata* (Wied) (Diptera, Tephritidae). **Rev. Bras. Entomol.**, São Paulo, v. 29, p. 267-270, 1985.

- GARCIA, A.T.E.; SOUZA, H.M.L.; MESSIAS, C.L.; PIEDRABUENA, A.E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae*, nas diferentes fases de desenvolvimento de *Ceratitis capitata* (Wied) (Diptera, Tephritidae). *Rev. Bras. Entomol.*, São Paulo, v. 23, p. 17-23, 1989.
- GEDEN, C.J.; RUTZ, D.A.; STEINKRAUS, D.C. Virulence of different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for house flies and the parasitoid *Muscidifurax raptor*. *Biol. Control*. 5(4):615-621, 1995.
- GONZALES-CABO, J.F.; ESPEJO-SERRANO, J.; BARCENA-ASENSIO; M.C. Mycotic pulmonar disease by *Beauveria bassiana* in a captive tortoise. *Mycosis*. 38(3-4):167-169, 1995.
- GOPALAKRISHNAN, C.; NARAYANAN, K. Occurrence of two entomofungal pathogens, *Metarhizium anisopliae* (Metschinikoff) Sorokin var *minor* Tulloch and *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, on *Heliothis armigera* Hubner (Noctuidae Lepidoptera). *Curr. Sci. (Bangalore)*, v. 57, n. 15, p. 867-868, 1988.
- HALL, R.A.; PETERKIN, D.D.; ALI, B.; LOPEZ, V.F. Influence of culture age on rate of conidiospore germination in four deuteromycetous entomogenous fungi. *Mycol. Res.* v. 98, n. 7, p. 763-768, 1994.
- HALL, R. Molecular approaches to taxonomy of fungi. *Botanical Review*, 35:285-304, 1969. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletrforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- _____. Eletrophoretic protein profiles as criteria in the taxonomy of fungi and algae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 100:253-9, 1974. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletrforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic within and among natural plant population. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, L. (eds). **Genetics and conservation**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California, p. 335-48, 1983. In:

ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.

HARRIS, H. & HOPKINSON, D.A. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics (with supplements). Oxford American Elsevier Publishing Co., New York, 1978. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.

HASSAN, A.E.M.; DILLON, R.J.; CHARNLEY, A.K. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca Sexta*. **J. Invertebr. Pathol.**, Duluth, v. 54, n. 2, p. 277-279, 1989.

HEDRICK, P.W. Genetics of Populations. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1983. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.

HOWARD, D.H.; MILLER, J.D. **The Mycota: human and animal relationships**. v.6, New York: Springer, 1997.

INGOLD, C.T.; HUDSON, H.J. **The biology of fungi**. 6^a ed., New York: Chapman & Hall, 1993.

KAAYA, G.P. *Glossina morsitans morsitans*. Mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 107-114, 1989.

KAAYA, G.P.; OKECHI, M.A. Horizontal transmission of mycotic infection in adult tse-tse, *Glossina morsitans morsitans*. **Entomophaga**, Paris, v. 35, n. 4, p. 589-600, 1990.

KAAYA, G.P.; MUNYINYI, D.M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for Tsetse flies (*Glossina* spp) at development sites. **J. Inv. Pathol.** 66(3):237-241, 1995.

- KAVA-CORDEIRO, V. **Cariótipos eletroforéticos de linhagens selvagens e mutantes do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.** Curitiba, 1993, 92 p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
- KAVA-CORDEIRO, V.; LUNA-ALVES-LIMA, E.A.; AZEVEDO, J.L. Survival and mutant production induced by mutagenic agents in *Metarhizium anisopliae*. **Scientia Agricola.**, v. 52, n. 3, p. 548-554, 1995.
- KAVA-CORDEIRO, V. Comunicação pessoal, 1998.
- KELLEY-TUNIS, K.K.; BYRON, R.L.; ANDIS, M. Activity of entomopathogenic fungi in free-foraging workers of *Camponotus pennsylvanicus*. **J. of Economic Entomology.** 88(4):937-943, 1995.
- KHACHATOURIANS, G.G. Production and use of biological pest control agents. **Trends. Biothech.** 4:120-124, 1986. *Apud*: KOSIR, J.M.; MACPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. Genomic analysis of a virulent and a less virulent strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragment length polymorphisms. **Can. J. Microbiol.** 37: 534-541, 1991.
- KIM, W.D.; MARTENS, J.W.; HOWES, N.K. Electrophoretic analysis of detergent-soluble polypeptides of nine races of *Puccinia graminis* f.sp. *avenae* and their relation to *P. graminis* f.sp. *tritici*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 6: 111-8, 1984. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- KOENIG, R.; STEGEMANN, H.; FRANCKSEN, H.; PAUL, H.L. Protein subunits in the potato virus X group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 207: 184-9, 1970. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.

- LECUONA, R.E.; FERNANDES, P.M.; ALVES, S.B.; BLEICHER, E. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, à broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). **An. Soc. Entomol. Bras.**, Itabuna, v. 15. Supl., p. 21-27, 1986.
- LORD, J.C. Fungos entomopatogênicos. In: **Curso de controle microbiológico de pragas de caupi e feijão, 3**, Goiânia. Goiânia: EMBRAPA, 1986, 15p.
- LUNA, E.A. **Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin**. Rio de Janeiro, 1985, 260p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- MALAGODI, M.; VEIGA, A.F.S.L. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. E *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill. Sobre o cupim *Nasutitermes* (DUDLEY) (Isoptera - Termitidae) em laboratório. **An. Soc. Entomol. Brasil**. 24(2):315-322, 1995.
- MARTINS, S.F.S.; LIMA, M.G.A. Fungos entomopatogênicos no controle do percevejo do colmo do arroz *Tibraca limbativentris* STAL., virulência de isolados de *B. bassiana* (Balls) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. **An. Soc. Entomol. Brasil**. 23(3):379-383, 1994.
- MARTY, T.L.; O'MALLEY, D.M.; GURIES, R.P. A Manual for Starch Gel Electrophoresis: Mew Microwave Edition. Staff Paper Series, Department of Forestry, University of Wisconsin, Madison, 1984, 21p. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais**. Viçosa: SIF, 1991.
- McLEOD, D.M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. And *Tritirachium* Limber. **Can. J. Bot.** 32:818-893, 1954. *Apud*: MESSIAS, C.L. Fungos, sua utilização para o controle de insetos de importância médica e agrícola. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, RJ**. 84-III:57-59, 1989.
- MESSIAS, C.L. Fungos, sua utilização para o controle de insetos de importância médica e agrícola. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, RJ**. 84-III:57-59, 1989.

- MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society, Cambridge*, v. 75, p.473-477, 1980.
- MICALES, J.A.; BONDE, M.R.; PETERSON, G.L. The use of Enzyme analysis in Fungal Taxonomy and Genetics. *Mycotaxon*, 27:405-49, 1986. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais**. Viçosa: SIF, 1991.
- MIRANPURI, G.S.; KHACHATOURIANS, G.G. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of mosquito *Aedes aegypti*. *Entomol. Exp. Et Applic.* 59(1):19-28, 1991.
- MOREIRA, A.M.; ALFENAS, A.C. Diferenciação de espécies de *Cylindrocladium* por meio da análise eletroforética de proteínas e isoenzimas em géis de poliacrilamida. *Fitopatologia Brasileira*, 10:258, 1985. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- MWANGI, E.N.; KAYA, G.P.; ESSEMAN, S. Experimental infections of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and natural infections of some ticks with bacteria and fungi. *J. Afr. Zoo.* 109(2):151-160, 1995.
- PACCOLLA-MEIRELLES, L.D. **Variabilidade e recombinação genética no Deuteromiceto *Beauveria bassiana* (Vuill.)**. Piracicaba, 1988, 193p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP.
- PACCOLLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57:172-176, 1991.
- PACCOLLA-MEIRELLES, L.D.; AZEVEDO, J.L. Genetic recombination by protoplast fusion in the deuteromycete *B. bassiana*. *Revista Brasileira de Genética*. 17(1):15-18, 1994.
- PATEL, K.C.; PATEL, S.C.; GUPTA, D.K. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria brongniartii* as pathogens of mosquito larvae. *Indian J. Microbiol.*, Maharashtra, v. 30, n. 1, p. 59-62, 1990.

- PFEIFER, T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Eletrophoretic karyotype of entomopathogenic deuteromycete *Beauveria bassiana*. *J. Inv. Pathol.* 61(3): 231-235, 1993.
- POINAR, G.O.; THOMAS, G.M. An entomogenous fungus from Dominican amber. *Mycologia*. 74:332-334, 1982. In.: HOWARD, D.H.; MILLER, J.D. *The Mycota: human and animal relationships*. v.6, New York: Springer, 1997.
- POINAR, G.O.; THOMAS, G.M. A fossil entomogenous fungus from Dominican amber. *Experimentia*. 40:578-579, 1984. In.: HOWARD, D.H.; MILLER, J.D. *The Mycota: human and animal relationships*. v.6, New York: Springer, 1997.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploid in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 6, p. Vii, 1952.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; FORBES, E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v.8, p. 198-210, 1953a.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D.; BUFTON, A.J.W. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, v. 5, p. 141-238, 1953b.
- QUINTELA, E.D.; WRAIGHT, S.P.; WRAIGHT, S.G.; ROBERTS, D.W. Controle de *Chalcodermus bimaculatus* por *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 84, supl. 3, p. 145, 1989.
- REINECKE, P.; ANDERSCH, W.; STENZEL, K.; HARTWIG, J. BIO 1020, a new microbial insecticide for use in horticultural crops. Brighton Crop Protection Conference. *Pests and Diseases*, v. 1, p. 49-54, 1990.
- RIBEIRO, J.Z. Estudos genéticos em *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN - fungo entomopatogênico. Curitiba, 1999. Relatório Final de Iniciação Científica - Universidade Federal do Paraná.

- ROBERTS, D.W.; HAJEK, A.E. (1992) Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. In: LEATHAM, G.F. (ed). **Frontiers in industrial mycology**. Chapman & Hall, London, pp 144-173. In: HOWARD, D.H.; MILLER, J.D. **The Mycota: human and animal relationships**. v.6, New York: Springer, 1997.
- ROMANA, C.A.; FARGUES, J.F. Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hyphomycete *Beauveria bassiana*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, RJ**. 87(3):363-368, 1992.
- SAMUELS, K.D.Z.; HEALE, J.B.; LLEWELLYN, M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 53, n. 1, p, 25-31, 1989a.
- SAMUELS, K.D.Z.; PINNOCK, D.E.; ALLSOPP, P.G. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina Hyphomycetos) as a biological control agent of *Snypus rubriceps* (Macquart) (Diptera Stratiommuidae). **J. Aust. Entomol. Soc.**, Sidney, v. 28, n. 1, p. 69-74, 1989b.
- SAMUELS, K.D.Z.; PINNOCK, D.E.; BULL, R.M. Scarabeid larvae control in sugarcane using *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol.**, New York, v. 55, n. 1. P. 135-137, 1990.
- SAMUELS, R.I.; CHARNLEY, A.K.; REYNOLDS, S.E. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 51-58, 1988.
- SCHOENENBERGER, M.F.B. Estudos genéticos em linhagens do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Curitiba, 1997, 59p. Relatório Final de Iniciação Científica - Universidade Federal do Paraná.
- SEMALULU, S.S.; MacPHERSON, J.M.; SCHIEFER, H.B.; KHACHATOURIANS, G.G. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* in mice. **J. of Vet. Med. Series B** 39(2):81-90, 1992.

- SHAW, C.R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, 4:297-9, 1970. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.
- SICILIANO, M.J.; SHAW, C.R. Separation and visualization of enzyme on gels. In: SMITH, I. (ed.). *Cromatografic and electrophoresis techniques*. heinemann, London, p. 185-209, 1976. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.
- SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L. Virulence of mutants and rever-tants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.*, New York, v. 48, p. 368-374, 1986.
- SILVA, J.C.; SIQUEIRA JR, J.P.; MARCONDES, C.P. Selection of *Metarhizium anisopliae* for extracellular enzyme and virulence toward *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v. 84, supl. 3, p. 151, 1989.
- SMITH, J.M.; POWELL, D.A. A disc electrophoresis comparision of protein patterns of *Erwinia amylovora* with other bacteria including associated yellow forms. *Phytopathology*, 58:972-5, 1968. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- SOLTIS, D.E.; HAUFLER, C.H.; DARROW, D.C.; GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *American Fern Journal*, 73:9-27, 1983. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.
- SOPER, R.S.; WARD, M.G. Production, formulation and aplication of fungi for insect control. p. 161-181, 1981. In: PAPAIVIZAS, G.C. *Biological control in crop production*. Allan Held, Osmun Publisher, Granada, London, Toronto, Sydney. *Apud*: MESSIAS, C.L. *Fungos, sua utilização para o controle de insetos de importância médica e agrícola*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, RJ. 84-III:57-59, 1989.

- ST LEGER, R.J.; BUTT, T.M.; GOETTEL, M.S.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Production *in vitro* of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.*, Duluth, v. 13, p. 274-288, 1989.
- ST LEGER, R.J.; ALLEE, L.L.; MAY, B.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. World wide distribution of genetic variation in *Beauveria* spp. *Mycological Research*. 96: 1007-1015, 1992.
- STUBER, C.W.; WENDEL, J.F.; GOODMAN, M.M.; SMIEH, J.S.C. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). technical Bulletin, 286, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, 1988, 87p. In: ALFENAS, et al., **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: SIF, 1991.
- TIGANO-MILANI, M.S.; FARIA, M.R.; MARTINS, I.; LECUONA, R.E. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Balls) Vuill, *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. e *Paecilomyces* sp. em solos de diferentes regiões do Brasil. *An. Soc. Entomol. Brasil*. 22(1):391-393, 1993.
- TINLINE, R.D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia.*, New York, v. 63, p. 713-771, 1971.
- TINLINE, R.D.; NOVIELLO, C. Heterokaryosis in the entomogeneous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, New York, v. 63, p. 701-712, 1971.
- TOOLEY, P.W.; FRY, W.E.; GONZALES, M.J.V. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *Journal of Heredity*, 76:431-5, 1985. In: ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Minas Gerais, Viçosa: U.F.V., 1991, 242p.
- TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, Cambridge, v. 66. N. 3, p. 407-411, 1976.

- VEEN, K.H. Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Meded. Landbouwhogesch. Wageningen*, Wageningen, v. 68, p. 1-77, 1968.
- VILACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae* Sorok. In: Congresso Latinoamericano de Entomologia, 3; Congresso Brasileiro de Entomologia, 4, Bahia, 1978, p. 70. *Resumos*, 1978.
- YAMADA, M.M.; GURIES, R.P. A manual for starch gel electrophoresis: new chocolate lovers edition. Staff Paper Series n^o.39, Department of Forestry, University of Wisconsin, Madison, 1989, 22p. In: ALFENAS, et al., *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa: SIF, 1991.
- YOSHIDA, R. Estudos genéticos no fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Curitiba, 1996, 62p. Monografia - Universidade Federal do Paraná.
- ZACHARUK, R.Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germination conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 53:307-14, 1989.