

## MELHORAMENTO GENÉTICO DE FUNGOS UTILIZADOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS: UTILIZAÇÃO DO PROCESSO PARAMEIÓTICO

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Instituto de Genética, ESALQ, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 83, 13400 Piracicaba, SP, Brasil

O controle biológico de insetos, especialmente as pragas agrícolas, por microrganismos, vem em anos mais recentes, sendo considerado como uma importante alternativa ao controle químico. Não apresentando problemas como a alta toxicidade e a emergência de resistência nos insetos, o que ocorre no controle químico, o controle microbiológico pode, uma vez usado convenientemente, contribuir para a redução dos prejuízos causados por pragas da Agricultura. Para isso, há necessidade de uma maior conscientização do usuário com otimização das condições de produção e aplicação (Baldwin, 1987). Também, o melhoramento genético aplicado a espécies entomopatogênicas pode levar à obtenção de linhagens com características genéticas favoráveis como, entre outras, maior eficiência, alta especificidade, resistência a inibidores, e maior facilidade de produção e disseminação do entomopatógeno. Entretanto, para que os métodos de melhoramento genético possam ser utilizados, há necessidade de um amplo conhecimento da Biologia dos fungos a serem melhorados, especialmente dos processos de recombinação que ocorrem nesses fungos. Além da utilização da variabilidade natural já existente na espécie, e do isolamento de mutantes espontâneos ou induzidos, o perfeito conhecimento dos sistemas de recombinação existentes é um requisito essencial para que o melhoramento genético possa ser aplicado. Em fungos filamentosos, o processo de recombinação por meio do ciclo sexual ocorre em diferentes espécies e, nesse caso, o melhoramento genético, à semelhança do que ocorre em plantas e animais superiores, pode ser realizado por processos convencionalmente usados. No entanto, a grande maioria dos fungos entomopatogênicos são Deuteromicetos ou fungos imperfeitos, isto é, não possuem um ciclo sexual. É o caso, entre outros, de fungos entomopatogênicos largamente utilizados no controle de insetos como o *Metarhizium anisopliae*, a *Beauveria bassiana* e o *Verticillium lecani*. Nestes casos, alternativas genéticas de recombinação como o ciclo parassexual e processos biotecnológicos mais recen-

tes como a fusão de protoplastos e a tecnologia do DNA recombinante têm que ser buscadas, caso se queira desenvolver o melhoramento genético nessas espécies. De fato, o ciclo parassexual já foi descrito em *M. anisopliae* (Messias, 1979; Messias & Azevedo, 1980; Al-Aidroos, 1980, e Riba et al., 1980) e, mais recentemente, em *B. bassiana* (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1989). Também a fusão de protoplastos já foi descrita como um método auxiliar ao melhoramento genético de *M. anisopliae* (Silveira & Azevedo, 1987). Nos trabalhos realizados em *M. anisopliae* e *B. bassiana* para a descoberta no ciclo parassexual, conduzidos no Instituto de Genética, ESALQ/USP, verificou-se que uma alta frequência de recombinantes poderia ser obtido a partir de heterocários, sem o isolamento de um diplóide estável. Esse fenômeno que já havia sido relatado anteriormente em outros fungos, foi denominado de paramiose (Bonatelli Jr. et al., 1983). No presente trabalho, vão ser relatados detalhes da ocorrência do processo parameiótico em espécies entomopatogênicas, e como ele pode ser usado, de modo eficiente, no melhoramento genético.

Para que se possa entender o processo da paramiose é necessário resumir o que vem a ser o ciclo parassexual em fungos, que foi descrito pela primeira vez em *Aspergillus nidulans* por Pontecorvo & Roper (1952). No ciclo parassexual, à semelhança do ciclo sexual, núcleos haplóides fundem-se espontaneamente nas hifas, produzindo núcleos diplóides. Entretanto, ao contrário do ciclo sexual, esta fusão é rara e não ocorre em estruturas especializadas nas hifas. Assim, em um heterocário (hifas constituídas por núcleos com características genéticas distintas), os núcleos diplóides formados, ao contrário do que ocorre no ciclo sexual, não sofrem o processo meiótico e, conseqüentemente dão origem, por divisões mitóticas, a mais núcleos diplóides heterozigotos para as características genéticas divergentes e, eventualmente, dão origem a conídios diplóides, que podem ser isolados se marcas seletivas estiverem envolvi-

das. Esses conídios diplóides, se cultivados em meios apropriados dão origem a colônias diplóides que, por um processo de haploidização, e também permuta mitótica, produzem recombinantes. Esses recombinantes podem combinar características genéticas favoráveis das duas linhagens parentais utilizadas na formação do heterocário e diplóide e, assim, um programa de melhoramento genético pode ser montado, visando a obtenção e isolamento de linhagens com qualidades conjuntas para o controle biológico, e que anteriormente existiam isoladamente nas linhagens parentais.

O processo parameiótico é uma variação do ciclo parassexual. Presumivelmente, em algumas espécies de fungos, os diplóides formados em heterocários são extremamente instáveis e, assim, sofrem haploidização e/ou permuta mitótica na própria hifa heterocariótica. Resultam assim, núcleos recombinantes, que são incorporados aos conídios produzidos pelo heterocário. No caso de heterocários produzidos entre linhagens parentais diferentes, por possuírem marcadores auxotróficos, o que é o caso mais frequente, a seleção de diplóides em meio mínimo não recupera a maioria dos conídios derivados pelo processo parameiótico. De fato, apenas diplóides, eventuais aneuplóides e haplóides prototróficos são recuperados. Foi este fato que levou a não descoberta do processo até que Ball & Hamlyn (1982), por fusão de protoplastos em *Cephalosporium acremonium* e Bonatelli Jr. et al. (1983), utilizando meios seletivos apropriados contendo requisitos nutricionais puderam constatar a existência do processo que foi então chamado pelos últimos autores de parameiose por ser um sistema que produz recombinantes haplóides diretamente de heterocário, como no ciclo sexual, mas sem ser um processo que envolva a presença de divisão meiótica e corpos de frutificação.

No fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, Bergéron & Al-Aidroos (1982) já haviam se referido à alta instabilidade dos diplóides obtidos e, inclusive, aventaram a hipótese de que recombinantes haplóides poderiam ser obtidos de heterocários. Por fusão de protoplastos, Silveira & Azevedo (1987) demonstraram a existência do fenômeno quando por fusão de linhagens contendo marcadores nutricionais e para coloração distintos, obtiveram a partir de produtos de fusão, recombinantes que possuíam características das duas linhagens parentais, sem a ocorrência de um diplóide intermediário. Assim,

de um cruzamento entre linhagem de conídios amarelos e com requisitos para adenina e cisteína com outra de conídios violeta e requerendo lisina e ácido nicotínico, foi possível, entre outros, obter um recombinante que, além de requerer adenina e cisteína de uma das linhagens, requeriam também lisina. Isto levou a um estudo mais aprofundado do processo e por meio de heterocários, sem necessidade de fusão de protoplastos. Bagalhi (1987), utilizando meios apropriados, verificou a existência de grande quantidade de produtos recombinantes, provenientes do processo de parameiose. A Tabela mostra um dos resultados relevantes obtidos em um cruzamento específico em *M. anisopliae*.

A descoberta do processo de parameiose em *M. anisopliae* levou a pesquisar se o mesmo fenômeno estaria também ocorrendo em outro fungo entomopatogênico, a *B. bassiana*. Nesta espécie, embora tentativas fossem realizadas, a existência do ciclo parassexual ainda não havia sido descrita. Como talvez isto fosse devido à alta instabilidade dos diplóides formados, a mesma metodologia utilizada anteriormente para *M. anisopliae* revelou que, de fato, a alta instabilidade do diplóide possivelmente era a causa de seu não isolamento mas, recombinantes haplóides foram obtidos em grande quantidade (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1989). A Tabela dá um exemplo de recombinantes obtidos por parameiose em *B. bassiana*. Estava assim demonstrado que o processo de parameiose, parece ser bastante comum em fungos filamentosos e pode explicar a dificuldade de detecção do ciclo parassexual em espécies onde ele foi pesquisado e não encontrado.

As possibilidades do melhoramento genético de fungos entomopatogênicos fica, assim, bastante ampliada com a existência da parameiose. Nesses casos, a simples construção de um heterocário e seleção em meio apropriado, de conídios recombinantes, permite a obtenção de linhagens que combinam características nucleares e citoplasmáticas dos pais envolvidos. Como recombinantes prototróficos são obtidos, os recombinantes podem aliar características favoráveis dos pais para o controle biológico, sem possuir marcadores auxotróficos e de colorações distintas da linhagem selvagem que, em geral, são deletérias para o crescimento e eficiência no ataque aos insetos-pragas. De fato, Bagalhi (1987), utilizou recombinantes prototróficos de *M. anisopliae* em bioensaios, e veri-

ficou que alguns deles eram tão ou mais eficientes que as linhagens parentais selvagens. A parameiose utilizada como tal, ou aliada a processos como fusão de protoplastos e tecnologia do DNA recombinante, em programas de melhoramento genético, deverá levar à produção de linhagens com capacidades melhoradas para o controle biológico de insetos.

TABELA

Recombinantes obtidos pelo processo parameiótico em *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em cruzamento entre linhagens com diferentes marcadores genéticos

Cruzamento <sup>a</sup>	Tipos de recombinantes obtidos
<i>M. anisopliae</i>	
E6 <i>vio2, ade5, prol</i> x	<i>vio2</i> <i>leu6</i>
E9 <i>ylo1, leu6, ade9</i>	selvagem <i>ylo1 leu6 prol</i>
<i>B. bassiana</i>	
<i>ade2, ths1</i> x	<i>ths1</i> <i>met1</i>
<i>met1, bio1</i>	selvagem <i>ade2, bio1, met1, ths1</i>

<sup>a</sup> Os símbolos *ade*, *bio*, *leu*, *met*, *pro* e *ths* designam respectivamente requisitos nutricionais para adenina, biotina, leucina, metionina, prolina e tiosulfato de sódio. Os símbolos *vio* e *ylo* designam respectivamente coloração violeta e amarela dos conídios em oposição ao tipo selvagem que é verde.

REFERÊNCIAS

AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 22: 309-314.

BAGALHI, E., 1987. *Parameiose em Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin*. Tese Mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, 124 p.

BALDWIN, B., 1987. Commercialisation of microbiology-produced pesticides. *Int. Ind. Biotechnol.*, 7: 290-293.

BALL, C. & HAMLYN, P. F., 1982. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important Cephalosporin C. *Rev. Bras. Genet.*, 5: 1-13.

BERGERON, D. & MESSING-AL-AIDROOS, K., 1982. Haploidization analysis of heterozygous diploids of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 24: 643-651.

BONATELLI JR., R.; AZEVEDO, J. L. & VALENT, G. U., 1983. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Rev. Bras. Genet.*, 6: 399-405.

MESSIAS, C. L., 1979. *Parasexualidade em Metarhizium anisopliae*. Tese de Doutorado, ESALQ/USP, Piracicaba, 73 p.

MESSIAS, C. L. & AZEVEDO, J. L., 1980. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 75: 473-477.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. & AZEVEDO, J. L., 1989. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *J. Inverteb. Pathol.* (no prelo).

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

RIBA, G.; GLANDARD, A.; RAVELO-JOANA, A. M. & FERRON, P., 1980. Isolement de recombinés mitotiques stables de type "intermediaire" chez *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) par hybridation de biotypes sauvages. *Comp. Rend. Acad. Sci.*, 29: 657-660.

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