

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/10021
IB/80942

DOUTORADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1988

82442

de



ADMIR (JOSAFÁ) ARRAIS DE MATOS

Este Exemplar corresponde a Redação Final da
Tese Apresentada pelo Candidato Admir José
Arrais de Matos - 10/08/88
Cláudio

GERMINAÇÃO CONIDIAL EM
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN

ORIENTADOR: Dr. Cláudio Luiz Messias

120

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da UNICAMP para a
obtenção do título de Doutor
em Ciências

Campinas-1988

Classif.	T
Autor	M428g
V.	Ex.
Tombo BC/	10.021
1B/	235

1B/80942

24/30021

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para que alcançássemos o ideal proposto. Entre muitos, destacamos as seguintes pessoas e instituições:

Professor: Dr Claudio Luiz Messias,

pela orientação segura.

Professores: Dr João Lúcio de Azevedo,

Dr Pedro Magalhães Lacava,

Dr Aquiles Eugênio Piedrabuena,

Dr Ivanhoê Rodrigues Baracho e

Dr Renato Donatelli Jr.,

membros da Comissão Julgadora, pelas sugestões.

Unicamp: pelo apoio na pesquisa.

CNPq: pelo apoio financeiro

I.A.E.: pelas facilidades.

Professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética: pela eficiência e amizade.

Familiares: pelo carinho e compreensão.

Deus: por tudo, enfim!

INDICE

	página
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1- Considerações gerais sobre <i>Metarhizium anisopliae</i>	3
2.2- Considerações sobre a morfologia e fisiologia de <i>Metarhizium anisopliae</i>	7
2.3- Germinação conidial em <i>Metarhizium anisopliae</i>	13
2.4- Inibição da germinação em fungos.....	17
2.4.1- Inibição por desorganização da membrana lipoproteica.....	18
2.4.2- Inibição por condução de prótons através da membrana lipoproteica.....	26
2.4.3- Inibição da transferência de energia e da cadeia respiratória.....	28
2.4.4- Inibição da síntese de componentes da parede celular.....	29
2.4.5- Inibição por stress osmótico.....	34
3- MATERIAIS E METODOS.....	43
3.1- Linhagens de <i>M. anisopliae</i> utilizadas.....	43
3.2- Meios de cultura usados.....	45
3.2.1- Meio mínimo (MM).....	45
3.2.2- Meio mínimo + Extrato de levedura (MM+E)..	45
3.2.3- Meio mínimo + Peptona (MM+P).....	45
3.2.4- Meio mínimo + Caseína (MM+C).....	45
3.2.5- Meio mínimo + Caseína + Peptona (MM+C+P)..	46
3.2.6- Meio mínimo + Extrato de levedura + Caseína (MM+E+C).....	46

3.2.7- Meio mínimo + Extrato de levedura + Peptona (MM+E+P).....	46
3.2.8- Meio mínimo + Caseína + Extrato de levedura + Peptona (MM+C+E+P).....	46
3.2.9- Meio completo (MM+C).....	47
3.2.10- Meio mínimo líquido (MML)....:	47
3.2.11- Meio completo líquido (MCL).....	47
3.2.12- Meio mínimo líquido + Extrato de levedura (MML+E).....	47
3.2.13- Meio mínimo + 2% de Meio completo (MM+2XMC).....	48
3.2.14- Meio mínimo líquido + Glicerol.....	48
3.2.15- Meio mínimo líquido + Polietilenoglicol..	48
3.2.16- Meio mínimo líquido + m-Cresol.....	48
3.2.17- Meio mínimo líquido + Alcool éter + Alquil-sulfato de sódio.....	48
3.2.18- Meio mínimo líquido + Benzeno.....	48
3.2.19- Meio mínimo líquido + Clorofórmio.....	49
3.2.20- Meio mínimo líquido + Cicloheximida.....	49
3.3- Soluções empregadas.....	49
3.3.1- Solução de vitaminas.....	49
3.3.2- Solução de tween 80.....	50
3.3.3- Solução salina.....	50
3.3.4- Solução de NaOH 1N.....	50
3.3.5- Solução de HCl 1N.....	50
3.4- Morfologia e fisiologia.....	51
3.5- Germinação de conídios.....	52
3.6- Inibição da germinação de conídios.....	53
3.7- Número de tubos germinativos.....	53
	55

III

4- RESULTADOS OBTIDOS.....	56
4.1- Morfologia e fisiologia.....	56
4.2- Germinação de conídios.....	68
4.3- Inibição da germinação de conídios.....	69
4.4- Número de tubos germinativos.....	97
4.5- Crescimento de tubos germinativos.....	110
5- DISCUSSÃO.....	114
5.1- Morfologia e fisiologia.....	114
5.2- Germinação de conídios.....	116
5.3- Inibição da germinação de conídios.....	121
5.4- Número de tubos germinativos.....	125
5.5- Crescimento de tubos germinativos.....	128
6- CONCLUSÕES.....	134
7- RESUMO.....	137
8- SUMMARY.....	139
9- BIBLIOGRAFIA.....	141
10- APENDICE.....	176

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais inibidores em fungos apresentados na revisão e/ou utilizados no presente trabalho.	38
Tabela 2- Linhagens de <i>M.anisopliae</i> obtidas no banco de germoplasmas do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas.....	44
Tabela 3- Medidas do comprimento e largura de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> no tempo zero e depois de incubados em H ₂ O e MCL por 4 e 6 horas, dados em μm	57
Tabela 4- Volume de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> no tempo zero e depois de incubados em H ₂ O e MCL por 4 e 6 horas, dados em μm^3	59
Tabela 5- Análise de variância do volume de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> nos tempos zero, 4 e 6 horas em H ₂ O e MCL (após transformação em $\sqrt{x}$)	60
Tabela 6- Comparação das médias do volume de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em zero, 4 e 6 horas em H ₂ O e MCL (após transformação $\sqrt{x}$).....	60
Tabela 7- Porcentagem de aumento do volume médio de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em zero, 4 e 6 horas em H ₂ O e MCL, medidos em μm^3	61

Tabela 8- Porcentagem de água em conídios de 4 linhagens de <i>M.anisopliae</i> colocados em fluxo laminar (a temperatura de 32°C e velocidade do ar de 0,45 m/s) e estufa (a 70°C). Os dados que não estão indicados em porcentagem, são em miligramas.	62
Tabela 9- Tamanho de colônias (diâmetro) de 4 linhagens de <i>M.anisopliae</i> crescidas a 28°C em 9 meios diferentes durante 6 dias, medidas em centímetros.	63
Tabela 10- Análise de variância para o tamanho de colônias de 4 linhagens de <i>M.anisopliae</i> , crescidas a 28°C em 9 meios diferentes durante 6 dias.....	64
Tabela 11- Análise de variância (modificada) para o tamanho de colônias de 4 linhagens de <i>M.anisopliae</i> , crescidas a 28°C em 9 meios diferentes durante 6 dias.....	65
Tabela 12- Comparação das médias do tamanho de colônias de 4 linhagens de <i>M.anisopliae</i> em 9 meios de cultura a 28°C.....	66
Tabela 13- Comparação da média do tamanho de colônias em 9 meios de cultura de 4 linhagens de <i>M.anisopliae</i> crescidas a 28°C durante 6 dias.....	67
Tabela 14- Tempo mínimo de germinação (TGM) de conídios das linhagens E9 e Pegro, de <i>M.anisopliae</i> em MM, MC e MM+E, tanto sólidos como líquidos, dados em horas.....	68

VI

Tabela 15- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML+Glicerol (235 ml/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.....	70
Tabela 16- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML + Glicerol (235 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	71
Tabela 17- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML + Glicerol (235 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	72
Tabela 18- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML+Glicerol (235 ml/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.....	73
Tabela 19- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML+Glicerol (235 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	74

VII

Tabela 20- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de M.anisopliae em MM + Glicerol (235 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	75
Tabela 21- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de M.anisopliae em MML + Polietilenoglicol (178 g/l), à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.....	76
Tabela 22- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de M.anisopliae em MML+Polietilenoglicol (178 g\l), à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	77
Tabela 23- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de M.anisopliae em MML+Polietilenoglicol (178 g\l), à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos)	78
Tabela 24- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de M.anisopliae em MML + Polietilenoglicol (178g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.....	79

VIII

Tabela 25- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML+Polietilenoglicol (178 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	80
Tabela 26- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML+Polietilenoglicol (178 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	81
Tabela 27- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML + m-Cresol (0,5ml/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.....	82
Tabela 28- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML+m-Cresol (0,5 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	83
Tabela 29- Comparação das médias da porcentagem de germinação conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML+m-Cresol (0,5 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	84

IX

Tabela 30- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML+m-Cresol (0,5ml/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.....	85
Tabela 31- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML+m-Cresol (0,5 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	86
Tabela 32- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML+m-Cresol (0,5 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	87
Tabela 33- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML + Alcool éter + alquil-sulfato de sódio (10 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.....	88
Tabela 34- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sódio (10,0 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	89

Tabela 35- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de M.anisopliae em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sódio (10 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	90
Tabela 36- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de M.anisopliae em MML + Alcool éter + alquil-sulfato de sódio (10 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.....	91
Tabela 37- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de M.anisopliae em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sódio (10 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	92
Tabela 38- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de M.anisopliae em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sódio (10 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	93
Tabela 39- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de M.anisopliae em MML+Cicloheximida (2g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.....	94

Tabela 40- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML+Cicloheximida (2 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianós).....	95
Tabela 41- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML+Cicloheximida (2 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos)	96
Tabela 42- Número de tubos germinativos de conídios de 4 linhagens de <i>M.anisopliae</i> , em MM a 28°C nos tempos de 4, 7 e 10 horas.....	98
Tabela 43- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em diferentes dosagens de benzeno (MML+Benzeno), durante 41 horas à temperatura ambiente.....	99
Tabela 44- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em diferentes dosagens de polietilenoglicol (MM + Polietilenoglicol), durante 57 horas sob agitação à temperatura ambiente.....	100
Tabela 45- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em diferentes dosagens de glicerol (MML + Glicerol), durante 70 horas sob agitação à temperatura ambiente.....	101

Tabela 46- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em diferentes dosagens de m-cresol (MML + m-cresol), durante 65 horas sob agitação à temperatura ambiente.....	102
Tabela 47- Número de tubos germinativos de conídios previamente tratados com m-cresol da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MM a 28°C em 3 ciclos durante 4, 7 e 10 horas.....	103
Tabela 48- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em diferentes dosagens de álcool éter + alquil-sulfato de sódio (MML + álcool éter + alquil-sulfato de sódio), durante 65 horas sob agitação à temperatura ambiente.....	104
Tabela 49- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em diferentes dosagens de clorofórmio (MML + Clorofórmio), durante 57 horas sob agitação à temperatura ambiente.....	105
Tabela 50- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em diferentes tempos à temperatura de 37°C em MM sólido.....	106
Tabela 51- Número de tubos germinativos de conídios de microcolônias selecionadas da linhagem 10 de <i>M.anisopliae</i> , sem e com pré-tratamento com m- cresol em MM a 28°C durante 16 horas.....	107

XIII

Tabela 52- Número de tubos germinativos de conídios de microcolônias selecionadas da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> , sem e com pré - tratamento com m-cresol, em MM a 28°C durante 16 horas.....	108
Tabela 53- Comparação do número de tubos germinativos de conídios de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de <i>M.anisopliae</i> em 18 horas, a 28°C em MC.....	109
Tabela 54- Crescimento de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> a 28°C nos tempos de 4, 6, 12 e 18 horas em MC.....	111
Tabela 55- Crescimento de tubos germinativos de conídios da linhagem 10 de <i>M.anisopliae</i> a 28°C nos tempos de 4, 6, 12 e 18 horas em MC.....	112

LISTA DE TABELAS DO APENDICE

Tabela A1- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML, sob agitação, à temperatura ambiente em diversos tempos e concentrações.....	176
Tabela A2- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M. anisopliae</i> em MML sob agitação a temperatura ambiente em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).....	177
Tabela A3- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MCL, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.....	178
Tabela A4- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MCL, sob agitação à temperatura ambiente em diversos tempos e concentrações (após transformação arco seno radianos).....	179
Tabela A5- Germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML sob agitação, a temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.....	180
Tabela A6- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML sob agitação à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).....	181

Tabela A7- Germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MCL, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.....	182
Tabela A8- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MCL, sob agitação à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).....	183
Tabela A9- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MM sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos.....	184
Tabela A10- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MM sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	185
Tabela A11- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MC sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos.....	186
Tabela A12- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MC sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	187
Tabela A13- Germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MM sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos.....	188

Tabela A14- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MM.sólido à temperatura de 28°C em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	189
Tabela A15- Germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MC sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos.....	190
Tabela A16- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MC sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	191
Tabela A17- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MM+E sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos.....	192
Tabela A18- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MM+E sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	193
Tabela A19- Germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MM+E sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos.....	194
Tabela A20- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MM+E sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).....	195

XVII

Tabela A21- Germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML+E , sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.....	196
Tabela A22- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de <i>M.anisopliae</i> em MML+E, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).....	197
Tabela A23- Germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML+E, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.....	198
Tabela A24- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em MML+E, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).....	199
Tabela A25- Número de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em 18 horas a 28°C em MC sólido.....	200
Tabela A26- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{X+0,5}$).....	201

XVIII

Tabela A27- Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de <i>M.anisopliae</i> em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	201
Tabela A28- Número de tubos germinativos de conídios de Y5 (mutante da linhagem E9) de <i>M.anisopliae</i> , em 18 horas, a 28°C em MC sólido.....	202
Tabela A29- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de Y5 (mutante da linhagem E9) de <i>M.anisopliae</i> em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	203
Tabela A30- Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios de Y5 (mutante da linhagem E9) de <i>M.anisopliae</i> em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	203
Tabela A31- Número de tubos germinativos de conídios de B/vi (mutante da linhagem E9) de <i>M.anisopliae</i> em 18 horas, a 28°C em MC sólido.....	204
Tabela A32- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de B/vi (mutante da linhagem E9) de <i>M.anisopliae</i> , em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	205

XIX

Tabela A33- Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios de B\vi (mutante da linhagem E9) de M.anisopliae, em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$)	205
Tabela A34- Número de tubos germinativos de conídios de X/vi (mutante da linhagem E9) de M.anisopliae em 18 horas, a 28°C em MC sólido.....	206
Tabela A35- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de X/vi (mutante da linhagem E9) de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	207
Tabela A36- Comparação do número de tubos germinativos de conídios de X\vi (mutante da linhagem E9) de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	207
Tabela A37- Número de tubos germinativos de conídios da linhagem F84 de M.anisopliae, em 18 horas a 28°C em MC sólido.....	208
Tabela A38- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios da linhagem F84 de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	209

- Tabela A39- Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios da linhagem F84 de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$). 209
- Tabela A40- Número de tubos germinativos de conídios de F84nic- (mutante da linhagem F84) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido. 210
- Tabela A41- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de F84nic- (mutante da linhagem F84) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$). 211
- Tabela A42- Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios de F84nic- (mutante da linhagem F84) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$). 211
- Tabela A43- Número de tubos germinativos de conídios de F84tia- (mutante da linhagem F84) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido. 212
- Tabela A44- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de F84tia- (mutante da linhagem F84), de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$). 213

XXI

Tabela A45- Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios de F84tia ⁻ (mutante da linhagem F84) de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).	213
Tabela A46- Número de tubos germinativos de conídios do diplóide D5 (F84nic ⁻ X Y5) de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido.....	214
Tabela A47- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios do diplóide D5 (F84nic ⁻ X Y5) de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	215
Tabela A48- Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios do diplóide D5 (F84nic ⁻ X Y5) de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	215
Tabela A49- Número de tubos germinativos de conídios do diplóide 5 (F84tia ⁻ X Y5) de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido.....	216
Tabela A50- Análise de variância do número de tubos germinativos do diplóide 5 (F84tia ⁻ X Y5) de M.anisopliae em 18 horas, a 28°C, em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	217
Tabela A51- Comparação das médias do número de tubos germinativos do diplóide 5 (F84tia ⁻ X Y5) de M.anisopliae em 18 horas, a 28°C, em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).....	217

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Colônia da linhagem E9 de *M.anisopliae*, crescida no MC, durante 1 semana a 28°C..... 12
- Figura 2- Germinação, crescimento e ramificação de tubos germinativos de conídios de *M.anisopliae*.....113
- Figura 3- Curva de germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MC a 28°C.....117
- Figura 4- Curva do crescimento de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MC, em 4, 6, 8 e 12 horas a 28°C.....130
- Figura 5- Curva do crescimento de tubos germinativos de conídios da linhagem 10 de *M.anisopliae* em MC, em 4, 6, 8 e 12 horas a 28°C.....131

1-INTRODUÇÃO

O presente trabalho visou estudar um dos importantes aspectos no desenvolvimento de fungos filamentosos: trata-se do processo de germinação conidial.

O fungo escolhido foi *Metarhizium anisopliae*, um fungo entomopatogênico, de grande utilidade no controle de insetos considerados pragas de importância agrícola, bem como de vetores de doenças humanas.

A ação de fungos entomopatogênicos para causar doenças em insetos é conhecida como sendo dependente da ação de enzimas, associada a um processo mecânico. Na maioria dos entomopatogênicos descritos ela inicia-se pela germinação do conídio sobre o tegumento do inseto e penetração através da cutícula e raramente por via oral, o que torna muito importante estudos relacionados com o processo de germinação conidial, que, na relação patógeno \ hospedeiro \ doença, é parte básica para o processo infeccioso.

No estudo deste importante aspecto do desenvolvimento, usou-se agentes inibidores do processo de germinação conidial (glicerol, polietilenoglicol, benzeno, clorofórmio, m.cresol, álcool éter + alquil-sulfato de sódio e cicloheximida) e procedeu-se várias observações das mudanças morfológicas em *M.anisopliae*. Elas poderão contribuir para o melhor conhecimento de alguns passos metabólicos e também

para o desenvolvimento de técnicas mais adequadas para sincronizar a germinação, que permitirão ao fungo otimizar a fase inicial da infecção, através da germinação dos conídios.

Estudos desta natureza ampliam o conhecimento deste fungo e aumentam a sua potencialidade no controle microbiológico de insetos pragas

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Considerações gerais sobre *Metarhizium anisopliae*

O fungo *M.anisopliae* apresenta duas variedades que se diferenciam pelo tamanho dos conídios. Dentro das variedades há um grande número de linhagens, isoladas nas mais diversas regiões e de diversos insetos. Estas linhagens têm sido caracterizadas por diversas técnicas. Entre elas se incluem: Comparação dos aspectos morfológicos, citológicos e fisiológicos, virulência, eletroforese, imuno-eletroforese, serologia, cromatografia, produção de enzimas e ácidos graxos (FERRON *et alii*, 1972; FARGUES *et alii*, 1975; TULLOCH, 1976; FARGUES, 1976; FARGUES *et alii*, 1981; DURIEZ - VAUCELLE *et alii*, 1981; ROSATO *et alii*, 1981; ALVES, 1982; MESSIAS *et alii*, 1983; PUPIN, 1984; RIBA *et alii*, 1986; SILVA & MESSIAS, 1986; LEITE, 1987 e MESSIAS *et alii*, 1987.

A literatura disponível tem-se referido a várias pragas que podem ser efetivamente controladas por *M.anisopliae*, o qual, de acordo com FARGUES *et alii* (1975), pode atacar mais de duzentas espécies de insetos.

O ciclo conidial de *M.anisopliae* dura cerca de 15 ou 20 dias e se inicia com a germinação de conídios; estes, em contato com o tegumento do inseto, emitem tubos germinativos onde se diferenciam os apressórios (FERRON, 1978), que

atingem a endocutícula e epiderme, formando as hifas. Estas se constituem num sistema intrincado de entrelaçamentos, que formam o micélio. No inseto, as hifas além de elaborarem enzimas que digerem os componentes celulares do hospedeiro, também secretam toxinas. No micélio, diferenciam-se estruturas de reprodução assexuada, onde são formados os conídios. Estes, quando liberados, podem infectar outras partes do inseto ou outros insetos, reiniciando o ciclo. Segundo ZACHARUK (1970b), os apressórios contêm mitocôndrias, dictiossomas, ribossomos e abundante retículo endoplasmático ao longo da parede apoiada no tegumento do hospedeiro, sugerindo alta atividade metabólica semelhante ao que ocorre durante a germinação conidial.

Vários estudos fisiológicos permitiram compreender melhor o modo de infecção de *M. anisopliae* como os de FARGUES *et alii* (1976); AL-AIDROOS & ROBERTS (1978); SCHABEL (1978); AL-AIDROOS & SEIFERT (1980) e FARGUES *et alii* (1981). VEY *et alii* (1982), verificaram em seus estudos ultraestruturais e histológicos que há muitos fatores ao nível de cutícula e da cavidade do corpo do inseto que participam na determinação da especificidade das linhagens, como a habilidade de aderência, agregação e persistência dos conídios ao tegumento, a presença de comensais na área de infecção, a capacidade de deprimir as reações imunológicas do hospedeiro, o efeito inibidor do plasma e células sanguíneas do hospedeiro e nutrientes internos. Outros

fatores que podem influir na infecção como temperatura e umidade, são ainda discutidos por FERRON (1978).

Os fungos entomopatogênicos invadem predominantemente seus hospedeiros através da cutícula externa, contudo há relatos de infecções via oral conforme os trabalhos de DILLON & CHARNLEY (1986a e 1986b) em *M.anisopliae*. HUXHAN & LACKIE (1986) propuseram um método visual para a determinação da atividade de hemócitos de insetos, usando a produção de melanina e fenoloxidase quando infectados por *M.anisopliae*.

Uma das questões que tem sido estudadas atualmente é quanto a produção de enzimas hidrolíticas pelos fungos entomopatogênicos, como as proteases e quitinases que parecem facilitar sua penetração através do tegumento de seus hospedeiros. Em 1980, KUCERA e em 1981, ROSATO *et alii*, verificaram a produção de enzimas extracelulares em *M.anisopliae*. VEY *et alii* (1982), enfatizaram a grande significância da habilidade de *M.anisopliae* produzir toxinas. Em 1984, tanto KUCERA, como PERSON *et alii*, analisaram a atividade de proteases e suas propriedades em *M.anisopliae*. ROBERT & AL-AIDROOS (1985), estudaram o relacionamento de várias enzimas com a virulência em fungos entomopatogênicos, tais como amilases, proteases e quitinases. SILVA & MESSIAS (1986), avaliaram a correlação entre mutantes de *M.anisopliae* que não produziam enzimas extracelulares e sua virulência para *Rhodnius prolixus*. ST

LEGER *et alii* (1986a, 1986b, 1986c e 1987), fizeram uma série de trabalhos relacionados com enzimas de *M.anisopliae* que degradam a cutícula. Inicialmente obtiveram enzimas purificadas e verificaram *in vitro* a degradação da cutícula de *Shistocerca gregaria*. Depois verificaram a afinidade dessas enzimas com a cutícula dos insetos, indicando que adsorção parece ser um dos mecanismos responsáveis pela degradação localizada da cutícula. LEITE (1987), verificou que houve variabilidade natural quando estudou 15 linhagens de *M.anisopliae*, quanto a produção de proteases, quitinases, amilases e lipases.

2.2- Considerações sobre a morfologia e fisiologia de *Metarhizium anisopliae*

Os conídios de *M.anisopliae* têm formas variadas desde quase cilíndricos até quase esféricos. Embora haja grande variabilidade, os conídios podem ser classificados basicamente em 2 grupos: No primeiro estão os de forma **Minor**, cujos comprimentos variam de 3,5 a 9,0 μm (*M.anisopliae*, variedade **anisopliae**) e no outro os de forma **Major**, cujos comprimentos variam de 9,0 a 18,0 μm (*M.anisopliae*, variedade **major**) (TULLOCH, 1976; AZEVEDO & MESSIAS, 1981; ARRAIS DE MATOS, 1983; LUNA, 1985 e LEITE, 1987). Os conídios da variedade **anisopliae** têm volumes compreendidos entre 12,0 e 25,0 μm^3 e os conídios de um isolado da variedade **major** têm volumes em torno de 52,0 μm^3 (AZEVEDO & MESSIAS, 1981 e ARRAIS DE MATOS, 1983).

Um conídio típico de *M.anisopliae* tem um núcleo circular, central, contendo um meio denso e amorfo, o nucleoplasma, limitado por uma dupla membrana nuclear. Cerca de 5% dos conídios podem ser bi ou tri-nucleados. Observa-se no nucleoplasma, pequenos e irregulares grânulos densos de cromatina. O nucléolo nem sempre é notado. O endoplasma limitado por uma membrana plasmática e pela parede celular apresenta-se mais denso nos conídios dormentes do que nos conídios em germinação e abriga numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático e densos corpos de inclusão com

nutrientes armazenados (VEEN, 1967; ZACHARUK, 1970a; TINLINE, 1971; MESSIAS et alii, 1978; ARRAIS DE MATOS, 1983; SILVEIRA, 1983; SILVA, 1985 e LUNA, 1985). Estudos químicos combinados com difração de raios X, espectroscopia, autoradiografia e extrações de polímeros têm contribuído para um melhor conhecimento da ultraestrutura de fungos (BARTINICKI-GARCIA, 1973 e DEY & PRINSON, 1984).

A morfologia dos fungos é primariamente um reflexo da fabricação, crescimento e modificações da parede celular. Seu desenvolvimento morfológico pode ser reduzido a questão de morfogênese da parede celular e parece ser o mais definitivo produto da regulação bioquímica em fungos. Polissacarídeos como amino-açúcares, hexoses, ácidos hexurânicos, metil-pentoses e pentoses constituem cerca de 80 a 90% da matéria seca da parede celular. Glucose e N-acetil-D-glucosamina (GluNAc) usualmente representam os elementos químicos dos polissacarídeos da parede esquelética, como quitina, celulose, α -glucanas e β -glucanas não celulósicas. Os outros açúcares estão presentes principalmente na forma de vários homo e heteropolissacarídeos, muitas vezes em complexos químicos com proteínas. Em virtude das propriedades físico-químicas, os diferentes polissacarídeos devem cumprir funções específicas na parede celular. Ao passo que os polissacarídeos quitina e β -glucanas são os componentes responsáveis pela resistência mecânica da parede, os amorfos homo e heteropolissacarídeos, muitas vezes em associação com proteínas, fazem o papel de

substâncias cimentantes e constituem os carboidratos das enzimas extracelulares e antígenos de parede celular (ARONSON, 1965 e 1981; BARTINICKI-GARCIA, 1968; SINGER, 1974 e FARKAS, 1979).

Segundo FARKAS (1979), a biossíntese de cada um dos componentes da parede, procede por diferentes vias. O complexo proteína-polissacarídeo é polimerizado a partir de seus precursores ativados por enzimas localizadas no retículo endoplasmático liso ou rugoso. Os produtos polimerizados são empacotados em vesículas derivadas das membranas do retículo endoplasmático e transportados para sítios adjacentes ao plasmalema nas regiões de crescimento da parede. A biossíntese de polissacarídeos esqueléticos é catalizada por polissacarídeos sintetases uniformemente distribuídas no plasmalema. Estas enzimas podem existir no estado ativo ou temporariamente inativas. O processo de ativação-inativação com polissacarídeos sintetases parece ser reversível e representa o principal mecanismo pelo qual é regulada a morfogênese em fungos.

Os conídios de *M. anisopliae* tem um metabolismo bastante ativo durante a germinação produzindo mudanças bioquímicas e morfológicas que se caracterizam por apresentar estruturas de reprodução assexuada, denominadas de conidióforos onde são formados os conídios conforme MARCHIONATO, 1942; BARON, 1968; TINLINE, 1971; BURNETT & HUNTER, 1972; HAMMIL, 1972, 1977 e 1981; COLE, 1981 e LUNA, 1985.

O fungo *M.anisopliae*, em meios sólidos de crescimento e cultivo de fungos geralmente forma colônias circulares que podem apresentar coloração verde, ou branco-amareladas; em meio completo (PONTECORVO *et alii*, 1953), cresce cerca de 10,0 cm² em uma semana (figura 1), podendo produzir cerca de 10⁷ conídios. (SANTOS, 1978; ARRAIS DE MATOS, 1983 e LEITE, 1987).

A temperatura ótima para o desenvolvimento de *M.anisopliae* se situa entre 25 e 30°C (LATCH, 1965). Usualmente 28°C é a temperatura utilizada para o cultivo em laboratório (BALFOUR-BROWNE, 1960; VILLACORTA, 1978 e SANTOS, 1978). Estudando a influência do fotoperíodo e temperatura no desenvolvimento de *M.anisopliae*, ALVES *et alii* (1984), concluíram que a temperatura de 28°C e fotoperíodo de 16 horas de luz são os mais adequados para a produção do fungo. Outros estudos nesta linha foram feitos por MADELIN (1968); BASTOS & MATTA (1976a e 1976b); SANTOS (1978); ALVES & MORAIS (1979); ALVES *et alii* (1980b); DOBERSKI & TRIBE (1980) e DOBERSKI (1981). Há vários trabalhos sobre os requerimentos nutricionais, umidade e outros fatores físicos que atuando no *M.anisopliae*, relacionam-se com a germinação, esporulação, morfologia dos conídios, virulência, produção de enzimas e epizootia (MARCHIONATO, 1942; LIHNELL, 1944; MASERA, 1957; HUBER, 1958; CHENG & CHEN, 1962; ADAMEK, 1965; LATCH, 1965; EVLAKHOVA, 1966; VEEN, 1966; MULLER-KOGLER, 1967; FERRON, 1967; VEEN, 1968; MADELIN, 1968; DIOMANDE, 1969; ROBERTS,

1970; FARGUES, 1972; MOURA COSTA & MAGALHAES, 1974; BARNES *et alii*, 1975; BASTOS & MATTIA, 1976a e 1976b; ROBERTS & CAMPBELL, 1977; FARGUES & REMAUDIERE, 1977; SANTOS, 1978; FERRON, 1978; ALVES, 1982; IGNOFFO *et alii*, 1982; DAoust *et alii*, 1982 e 1983; DAoust & ROBERTS, 1983a e 1983b; FARGUES & ROBERT, 1983; ARRAIS DE MATOS, 1983; FARGUES *et alii*, 1985; GEMMA *et alii*, 1985; ROBERT & AL-AIDROOS, 1985; LUNA, 1985; ST LEGER *et alii*, 1986a e 1986b; CHASE *et alii*, 1986; DAoust & PEREIRA, 1986; MAGALHAES *et alii*, 1987; RAGA *et alii*, 1987; ALVES & ALVES, 1987a e 1987b; MENDONÇA & COSTA, 1987 e SILVEIRA, 1987).



Figura 1- Colônia da linhagem E9 de *M.anisopliae*, crescida no MC, durante 1 semana a 28°C.

2.3- Germinação conidial em *Metarhizium anisopliae*

Para fungos em geral, germinação dos esporos é um evento crucial na propagação da espécie e para fungos patogênicos em particular, é um fator determinante para iniciar a colonização de seus hospedeiros (ABDEL-RAHIN & ARBAB, 1985). A germinação além de estabelecer a fase vegetativa, está diretamente relacionada com o fenômeno de viabilidade e virulência (SCHMIT & BRODY, 1976 e AL-AIDROOS & SEIFERT, 1980). SUSSMAN (1966), citado por SWARD (1981), definiu germinação como o primeiro estágio irreversível que é reconhecidamente diferente do organismo dormente, o qual pode ser avaliado através de critérios morfológicos, citológicos, fisiológicos ou bioquímicos. MARTIN & NICOLAS (1970), definiram germinação como a transformação de um esporo relativamente inativo, para uma célula vegetativa altamente ativa. SCHMIT & BRODY (1976), definiram germinação como todos aqueles eventos que culminam e incluem a formação e crescimento rápido do tubo germinativo. Segundo MANNERS (1966), citado por SCHMIT & BRODY (1976), o processo de germinação conidial inclui: Hidratação, mudanças internas, emergência e alongação do tubo germinativo. CAMPBELL (1971), descreveu germinação como um processo contínuo definido por cinco mudanças ou estágios arbitrários: Dormência, aumento inicial do volume do esporo, aumento final do volume do

esporo, emergência do tubo germinativo e extensão do tubo germinativo.

A avaliação da germinação em fungos filamentosos segundo SCHMIT *et alii* (1975), pode ser feita através de 4 parâmetros, a saber: o peso seco total, o peso residual, a densidade óptica e a média do tamanho do tubo germinativo. Os estudos bioquímicos que têm sido feitos sobre germinação de conídios, incluem as medidas de: a) Os níveis metabólicos intermediários de baixo peso molecular como aminoácidos livres e ATP; b) A taxa de síntese de macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e polímeros de parede celular; c) A atividade específica de enzimas; d) A taxa de transporte molecular; e e) O aumento do consumo de oxigênio.

Nos estágios iniciais da germinação de *M. anisopliae*, a parede do conídio, com todas as três camadas intactas, projeta-se no sítio de formação do tubo germinativo. Ao mesmo tempo, uma outra camada de material da parede é secretada sob a parede primária do conídio. Esta camada é semelhante em densidade a parede primária. Com a continuação da protrusão da parede do conídio, esta se rompe e ocorre a extrusão da quarta camada, que continua a se estender dando início ao tubo germinativo (ZACHARUK, 1970a).

Ainda segundo ZACHARUK (1970a), pouco antes da germinação propriamente dita, os citossomos são transformados em 2 grandes vacúolos. A quantidade de

retículo endoplasmático e o número de mitocôndrias aumentam apreciavelmente. O plasmalema parece ser muito ativo durante a germinação conidial, particularmente na formação de muitas organelas membranosas e corpos extraplasmáticos. Numerosas vesículas e organelas com inclusões lipídicas e vacúolos são formados particularmente no polo do conídio em germinação, próximo ao local de início do tubo germinativo. Numa germinação típica, o núcleo se divide apenas uma vez, um deles se move através do tubo germinativo e o outro permanece no conídio.

LUNA (1985), estudando a germinação em *M.anisopliae*, notou que algumas linhagens apresentavam apenas 1 tubo germinativo, outras 1 ou 2 e outras ainda 1, 2 ou 3 tubos. Havia predominância de germinação na região polar do conídio. Os tubos germinativos geralmente eram uninucleados e raramente anucleados ou multinucleados. Não ocorria fusão dos tubos germinativos. As linhagens estudadas apresentaram variação quanto a emissão de tubos germinativos em relação ao tempo. Para as situações de tubos uninucleados, o fenômeno pode ser explicado pela migração de um núcleo para a porção polar da célula, e proliferação de um tubo germinativo. Considerando a condição multinucleada, os resultados indicam mitoses sucessivas a partir de um núcleo (VEEN, 1967; ZACHARUK, 1970a e LUNA, 1985).

A germinação de *M.anisopliae* sofre variação. Isto ocorre devido a grande vulnerabilidade do processo de

germinação, que pode ser afetado por agentes químicos, físicos, componentes do meio de cultura, concentração de conídios no meio de cultura, idade dos conídios, condições de pré-armazenamento e pré-incubação, métodos de colheita, herança genética e outros fatores (URS *et alii*, 1967; RAMAJE *et alii*, 1967; GRUNER, 1973; SCHMIT & BRODY, 1976; ALVES, 1978; MATTA & OLIVEIRA, 1978; SANTOS, 1978; ALVES *et alii*, 1980a; CAMARGO & GABRIEL, 1980; HALL, 1981; CORREA, 1982, 1983 e 1984; ARRAIS DE MATOS, 1983 e LUNA 1985). Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a influência de vários desses fatores na germinação de *M. anisopliae*.

2.4- Inibição da germinação em fungos

SCHMIT & BRODY (1976), classificaram os eventos que ocorrem durante a germinação em 3 grupos. No primeiro estão aqueles que ocorrem antes da emergência do tubo germinativo, e geralmente nos primeiros 20 minutos como: Hidratação, degradação de ácido glutâmico livre, formação de ácido aspártico e aminobutírico, conversão de muitos nucleotídeos pirimidina a sua forma reduzida, redução de glutathion oxidado e a iniciação da síntese de proteínas e RNA. A síntese de proteínas e RNA continuam através do crescimento vegetativo. Estes primeiros eventos estão relacionados com a quebra da dormência do conídio. No segundo grupo estão aqueles eventos que aproximadamente coincidem com a formação do tubo germinativo como a síntese de DNA, divisão nuclear, o aparecimento de fosforilação oxidativa acoplada a mitocôndria, migração de enzimas da via isoleucina-valina para a mitocôndria e acumulação de altos níveis de arginina e ornitina livres. Estes eventos incluem a formação do tubo germinativo associada a muitas mudanças na estrutura da membrana. No terceiro grupo estão aqueles eventos bioquímicos que ocorrem relativamente no final da germinação como a síntese e acúmulo de quitina e polímeros de galactosamina na parede celular. A síntese de quitina não é necessária para a formação do tubo germinativo, mas pode ser requerida na sua elongação. Polímeros de galactosamina

que estão essencialmente ausentes no conídio, começam a se acumular bem depois do tubo germinativo ter se formado. Estes polímeros não são requeridos (pelo menos não a altos níveis) para a formação do tubo.

Muitas pesquisas têm sido feitas na tentativa de se verificar quais os eventos que são essenciais ou que enzimas são específicas no processo germinativo. Geralmente estas pesquisas utilizam substâncias inibidoras para induzirem efeitos bloqueadores ou morfogênicos em fungos. No presente trabalho, muitas destas substâncias foram testadas em *M. anisopliae*. Tais substâncias podem inibir a germinação atuando em diversos processos como: osmoregulação, síntese de ácidos nucleicos, síntese de proteínas, divisão nuclear e enzimas respiratórias.

2.4.1- Inibição por desorganização da membrana lipoproteica

A integridade estrutural da membrana depende sobretudo dos arranjos ordenados tanto de proteínas como de lipídios, mas sua impermeabilidade para pequenas moléculas solúveis em água pode ser atribuída primariamente a superfície lipídica. Ela serve como barreira devido a hidrocarbonetos que repelem água. Desorganização da membrana por solventes ou detergentes, implica numa mudança estrutural, sendo quebrada esta barreira hidrofóbica. Compostos que podem desorganizar

a membrana lipoproteica de microorganismos foram classificados na revisão feita por HAROLD (1970) como segue:

A-Solventes orgânicos como clorofórmio, tolueno e álcoois;

B-Detergentes como dodecilsulfato de sódio;

C-Antibióticos peptídicos como tirocidinas e polimixinas;

D-Proteínas e polipeptídeos básicos como histonas, protaminas e polilisinas; e

E-Antibióticos poliênicos como nistatina, filipina e anfotericina B.

HAROLD (1970), explica que as substâncias acima causam inicialmente ruptura das barreiras de permeabilidade ocasionando alterações subsequentes, algumas envolvendo enzimas autolíticas que degradam ribossomos e quebram ácidos nucleicos. Outras subsequentemente inibem a respiração por levar a membrana plasmática a perder pequenos metabólitos.

KERWIN (1982), testou muitos detergentes em *Entomophthora culicis* e seus efeitos na germinação conidial. Cetiltrimetilamonio de bromo inviabilizou 100% dos conídios (a 5%). Ácido deóxico-clórico, sulfato dodecil de sódio e N-sarcosinato dodecil de sódio inviabilizaram os conídios, também na mesma concentração. Tween 20 e 80 não inviabilizaram, permitindo germinação vegetativa e

esporulação. Foram também testados os álcoois, estearil e crotil os quais invibializaram os conídios, quando incorporados ao meio de cultura. Estes componentes tóxicos acumulados no conidio causaram alterações na membrana e iniciaram auto-oxidação de enzimas e proteínas estruturais.

Durante a morfogênese de *Mucor racemosus*, há um aumento na síntese de lipídios, com um aumento paralelo na síntese de RNA e proteínas. Cerulina é um antibiótico poliênico que inibe a síntese de ácidos graxos, aparentemente pela inibição de ácidos graxos sintetases, bloqueando a esporulação em *Saccharomyces cerevisiae*, inibindo a germinação de esporos de *Botryodiplloata* e em baixas concentrações bloqueia completamente a morfogenia de *M.racemosus* (ITO et alii, 1982).

SCHMIDT (1985), estudando *in vitro* a ação de vários ácidos alifáticos saturados em 4 isolados de basidióforos, observou que os ácidos de cadeia longa inibiram a germinação e mataram os esporos, enquanto os outros ácidos testados foram menos ativos.

Muitos agentes químicos têm sido testados que alteram a morfologia de linhagens de *Neurospora crassa*. O conidio continua crescendo continuamente em volume sem germinar, induzindo uma variedade de mudanças físicas ou químicas nas células. Estes compostos geralmente interagem com as membranas celulares, e, em altas concentrações, destroem a integridade da membrana. FRERHART (1977), testou 3 grupos de

inibidores em diversas concentrações. No primeiro grupo estavam aqueles que causaram inibição do tubo germinativo nas concentrações que paraliza todo o crescimento em 48 horas, e incluiu: n-butanol, fenol, nitrobenzeno, álcool fenetil, o-cresol, m-cresol e p-cresol. No segundo grupo de inibidores estavam aqueles que causaram menor efeito morfológico em 46 horas e incluiu: anilina e difenilamina. E no terceiro grupo, os inibidores que permitiram o aparecimento de hifa em 30 horas: Triton X-100, xileno, tolueno, benzeno, clorofórmio e octanol. Após a retirada dos inibidores e volta ao meio normal de crescimento, as células túrgidas germinaram e em alguns casos produziram mais que um tubo germinativo por célula. O número de tubos germinativos segundo o pesquisador, é uma característica do inibidor específico usado. Os inibidores m-cresol e álcool fenetil, produziram tubos germinativos múltiplos.

LESTER (1965), verificou que o álcool fenetil inibe a germinação conidial em *N. crassa* e mesmo após 8 horas de exposição não houve diminuição da viabilidade. Sua adição em culturas causaram tanto a inibição do crescimento como da síntese de ácidos nucleicos e proteínas. TERENCE & STORCK (1969), reportaram que o álcool fenetil suprime completamente a replicação do DNA, e também interfere na biossíntese de RNA e proteínas em *Mucor rouxii*. Ele também limita a incorporação de aminoácidos e glucose, sugerindo que a membrana citoplasmática é o primeiro sítio de ação. Ele suprime a germinação, mas conserva a viabilidade, mesmo

após muitas horas de contato. Foi também verificado que o álcool fenetil inibiu a fosforilação oxidativa na mitocôndria.

Segundo LEVI *et alii* (1980), durante o crescimento de *Neurospora crassa* em etilenoglicol, o aumento do número de núcleos é proporcional ao aumento do volume, somente na fase de máximo crescimento. Semelhantemente a síntese de DNA se inicia tardiamente e diminui completamente antes da síntese proteica terminar. A diluição de etilenoglicol é seguida pela germinação do conídio, que é caracterizada pela ausência da fase lag, com um alto grau de sincronismo e a formação de mais de um tubo germinativo por conídio. Segundo os pesquisadores, o número de tubos germinativos é dependente do volume alcançado pelo conídio no final do tratamento. A retomada da síntese de DNA após a germinação é precedida por um rápido aumento na síntese de proteína.

MACH & SLAYMAN (1966), estudaram o modo de ação da tirocidina em *Neurospora crassa*. Tanto os conídios não germinados como os que estão na fase de germinação são sensíveis ao antibiótico e seu efeito é irreversível. A síntese de DNA, RNA, e proteínas é inibida ao mesmo tempo. As células expostas a tirocidina perdem para o meio uma variedade de componentes incluindo K^+ , nucleotídeos, ácidos nucleicos e proteínas. A rapidez do processo, mesmo em baixas concentrações, sugere que a membrana é o primeiro sítio de ação do antibiótico.

Polimixina B é um complexo antibiótico muito tóxico para células de bactérias, fungos e animais. Ele consiste de uma porção peptídica cíclica e outra de acil-graxo cujos efeitos destroem a integridade das membranas celulares. NEWTON (1956), fez uma ampla revisão sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas, o modo e sítio de ação e os efeitos das polimixinas. BOGUSLAWSKI (1985), mostrou seus efeitos sobre *S.cerevisiae*, alterando a permeabilidade celular.

A anfotericina liga-se a esteróis, especificamente o ergosterol, presente na membrana celular de alguns fungos, algas, protozoários e células animais. Essa ligação aumenta a permeabilidade da célula com perda de alguns componentes essenciais como a glicose e, notadamente, potássio (UTZ,1982).

A griseofulvina produz rapidamente enrugamento e atrofia de hifas recentemente desenvolvidas, tanto que ela foi inicialmente denominada de "fator de enrolamento". Ela parece exercer esse efeito prejudicando a síntese proteica e de ácidos nucleicos e destruindo a membrana de organelas intracelulares (UTZ,1982). CRACKOWER (1972), verificou os efeitos de griseofulvina sobre a mitose de *Aspergillus nidulans*. PIZZIRANI-KLEINER & AZEVEDO (1986), ao fazerem uma análise genética e caracterização de uma linhagem de *A.nidulans* que produzia conídios multinucleados, reportaram que, griseofulvina e os benzimidazólicos atuam no processo

de divisão nuclear. Há também genes relatados no processo de divisão.

BETANCOURT *et alii* (1985), verificaram em seus estudos sobre os eventos celulares e moleculares durante a transição de *Sporothrix schenckii*, que a adição de hidroxíurea, um inibidor da síntese de DNA, ao meio, também inibiu a divisão nuclear e crescimento do tubo germinativo. JACOBS *et alii* (1985), também estudaram a ação de hidroxíurea, mas no desenvolvimento de *Wangiella dermatidis*, encontrando resultados semelhantes.

KINSKY (1961), analisou os efeitos de 33 antibióticos e fungicidas sintéticos sobre o crescimento e morfologia de *Neurospora crassa*. Somente os antibióticos poliênicos, nistatina, anfotericina B e filipina causaram uma diminuição no peso seco da massa micelial, que foi acompanhada pelo aparecimento de constituintes citoplasmáticos essenciais no meio. As evidências indicaram que os poliênicos exerceram seu efeito primário alterando a permeabilidade, provavelmente devido a ação direta na membrana. Em 1962a, o mesmo autor verificou que estes poliênicos induziram retração em protoplastos de *N. crassa*. Com filipina em baixas concentrações ou nistatina e anfotericina B em altas concentrações, a retração foi seguida de turgidez e lise do protoplasto. Novamente as evidências foram consistentes com a hipótese de que esses antibióticos alteram a permeabilidade celular. No mesmo ano (1962b), e trabalhando

só com nistatina, KINSKY lançou as bases da seletividade tóxica destes agentes poliênicos na membrana de fungos.

Tunicamicina é um agente antimicrobiano que inibe a primeira reação na passagem de dolicol a n-glicosilação de proteínas. A droga inibe o crescimento e as células aumentam em volume. CHAFFIN (1985), verificou que o efeito de tunicamicina no crescimento do fungo *C.albicans* diferiu, dependendo da fase de crescimento do organismo. A adição de tunicamicina na fase estacionária do fungo, inibiu o crescimento morfológico das células, como formação do tubo germinativo. Quando foi acrescentada em culturas com tubo germinativo já formado, a divisão nuclear e formação de septo continuaram por mais algum tempo até cessarem completamente. Na adição da droga em culturas na fase exponencial de crescimento, em cerca de 45% das células houve interrupção da divisão celular.

LAL & SAXENA (1982), em sua revisão sobre a acumulação, metabolismo e efeito de inseticidas organoclorados em microorganismos, concluíram que eles interferem com as membranas celulares, enzimas, ácidos nucleicos e várias outras mudanças bioquímicas no metabolismo celular.

2.4.2- Inibição por condução de prótons através da membrana lipoproteica

Ions atravessam a membrana em associação com lipídios solúveis, contudo, certos agentes farmacológicos exercem seus efeitos servindo como condutor artificial de ions. A inibição da fosforilação oxidativa torna a membrana mitocondrial permeável a prótons. Valinomicina, pentaclorofenol e tetracloro-trifluorometil-benzimidazol interferem na permeabilidade de K^+ a nível de mitocôndria. Eles inibem o crescimento de muitos fungos (HAROLD, 1970).

HOWARD & AIST (1977 e 1980), estudaram o efeito de metil-benzimidazole 2-ylcarbamato (MBC), agente ativo contra microtúbulos de fungo, em *Fusarium acuminatum*. MBC causou inibição das mitocôndrias dos ápices das hifas, desaparecimento das vesículas de Spitzenkorpers, redução da taxa de crescimento e interrupção da metáfase de todas as mitoses. Ele causa desorientação na ponta das hifas parecido com os efeitos de oncodazole, colchicina e benomil. Os microtúbulos podem estar envolvidos com o crescimento linear direcionado de *F.acuminatum*. Junto com esta implícita evidência, esta hipótese é suportada pela extensiva literatura sobre a função do transporte intracelular dos microtúbulos numa variedade de células de eucariontes e que as vesículas contendo materiais de parede migram para o ápice e se fundem com o plasmalema. Os autores sugerem que

os microtúbulos citoplasmáticos podem fazer o papel no transporte intracelular de semelhantes vesículas. Assim, o efeito de MBC no crescimento pode ser interpretado como o resultado da desorganização dos microtúbulos que mediam o transporte de materiais de parede ou integridade de "spitzenkorper", ou ambos. Há um aumento de ramificações, emergência de múltiplos tubos germinativos como lógica consequência de semelhante desorganização, sendo que as vesículas apicais não se acumularam num único sítio. DAVIDSE & FLACH (1977), sugerem outros inibidores de microtúbulos além do MBC em *A.nidulans* como podofilotoxina, sulfato de vimblastina, melótonina e griseofulvina.

As eniatinas são uma família de antibióticos que inibem o crescimento de fungos. Eles têm estrutura e ação semelhantes as valinomicinas, mas são menos potentes. As gramicidinas alteram o transporte de K^+ , Na^+ , Li^+ , e NH_4^+ , fazendo pouca discriminação entre os cátions que inibem a fosforilação oxidativa. Nonactina, nigericina, monensina, monazomicina, polieteres e alameticina também são inibidores semelhantes a valinomicina (HAROLD, 1970).

Fosfona D, alterou a permeabilidade em *Rhodotorula glutinis*, mais precisamente, o tratamento causou supressão do gradiente eletroquímico de prótons através do plasmalema e, simultaneamente, um efluxo de ions de sódio e potássio. Outras mudanças celulares envolveram diminuição do consumo de oxigênio, diminuição de materiais orgânicos, enrugamento

do plasmalema e autofagia. Fosfona D se difunde inicialmente através das porções lipídicas da membrana plasmática alterando o estado de matriz lipídica e conseqüentemente a condução do transporte (VANNINI & BONORA, 1985).

2.4.3- Inibição da transferência de energia e da cadeia respiratória

Há inibidores que interagem com proteínas individuais, estruturais ou catalíticas, bloqueando passos específicos nas vias metabólicas associadas com membranas. Eles podem acoplar-se ao transporte de elétrons que geram ATP, utilizar energia metabólica para o transporte ativo e outras funções na cadeia respiratória. As oligomicinas e rutamicinas são exemplos de antibióticos que inibem ATPases em fungos filamentosos. Outros agentes inibidores da cadeia respiratória são: Piericidina, rotenona, antimicina, flavensomicina e piocianina. Muitos metais pesados são tóxicos aos fungos. Componentes mercurícos, uranílicos e outros interagem com grupos sulfidrílicos de enzimas e membranas afetando diversos processos de membrana como o transporte de açúcares (HAROLD, 1970).

NAKASHIMA (1984), estudando os efeitos de inibidores respiratórios, o conteúdo de ATP e conidiação em *N. crassa*, verificou que a cianida de potássio, azida de sódio, antimicina A e carbonil cianida *m*-clorofenil

hidrazona mudaram o ritmo de conidiacção. Em particular, cianida de potássio diminuiu completamente o conteúdo de ATP. O autor acredita que houve um envolvimento dos inibidores respiratórios com a mitocôndria ou eles indiretamente suprimiram a síntese de proteínas pela diminuição da energia. Os resultados foram semelhantes quando usou-se cicloheximida.

Rubratoxina B é uma micotoxina que produz efeitos metabólicos e morfológicos em fungos filamentosos. Em *Aspergillus niger*, segundo MOSS & BADIO (1980), ela deprime a taxa de respiração do micélio, tornando as hifas curtas e inchadas. Quando o micélio é transferido para o meio sem inibidor, o seu desenvolvimento é normal com formação de esporos assexuais. Rubratoxina B também afeta o consumo de glucose, síntese de proteínas, produção de pigmentos, morfogénese e composição da parede celular.

2.4.4- Inibição da síntese de componentes da parede celular

As β -glucanas estão entre os mais importantes polissacarídeos estruturais de fungos. FINKELMAN & VARDANIS (1987), ao examinarem sua síntese em extratos de células, reportaram que gluconolactona inibe a enzima β -gluconá sintetase em *Aureobasidium pullulans*. UYEDA et alii (1985), também se referem que há uma estreita relação entre

degradação de enzimas endógenas de β -D-glucana e constituição da parede celular ou morfogênese de um fungo. Após vários exames de muitas enzimas em *Rhizoctonia solani*, verificaram que validamicina tem um efeito sobre a produção de glucana sintetase e laminarinase. Em presença do antibiótico, a produção de laminarinase diminuiu no micélio, por outro lado houve um aumento na produção de glucana sintetase. Como consequência, houve mudanças morfológicas caracterizadas por ramificações anormais no fungo.

Quitina é outro componente estrutural essencial de paredes celulares de fungos. Seu conteúdo aumenta em várias vezes durante a germinação. O metabolismo das enzimas n-acetil-D-glucosamina (GLcNAc), GLcNAc-6-fosfato diacetilase e GLcNAc-6-fosfato desaminase podem induzir a formação de tubo germinativo. Segundo GOPAL et alii (1982), a presença de lomofungina, um inibidor da transcrição ou tricodermina, um inibidor da tradução em suspensões de células de *Candida albicans* contendo GLcNAc, inibiu a atividade específica das enzimas. 2-deoxiglucose também inibiu a formação do tubo germinativo por inibição parcial da diacetilase e desaminase.

Há muitas pesquisas sobre a inibição de quitina sintetase pela polioxina D, bem como seus efeitos no desenvolvimento morfológico em fungos como os relatados por BARTINICKI-GARCIA & LIPPMAN (1972). FARKAS (1979), verificou em exaustiva revisão que um dos mais poderosos inibidores de

quitina sintetase em fungos é o antibiótico polioxina D. CHIEW et alii (1980), confirmaram esses achados em *C.albicans*. SHEPHERD et alii (1980), também em *C.albicans*, verificaram que nistatina, álcool fenetil, 2,4-dinitrofenol, azaserina, ácido salicilidroxâmico e 5-fluorocitosina foram efetivos inibidores da formação de tubo germinativo. Cisteína, cianida de potássio e polioxina D não evitaram a germinação. A incorporação tanto de uracila como leucina ocorreram rapidamente durante a formação do tubo germinativo. Os inibidores de síntese de RNA: actinomicina D, cordicepina e daunomicina preveniram a germinação e inibiram a incorporação de uracila. Os inibidores da tradução: tricodermina, ácido tricarboxílico aurina, puramicina e cicloheximida foram efetivos em inibir tanto a formação de tubo germinativo como a incorporação de leucina. SULLIVAN & SHEPHERD (1982), também em *C.albicans*, verificaram que tricodermina inibiu a indução de GLcNAc.

DEANS & SMITH (1979), verificaram o efeito de vários inibidores metabólicos em *A.niger*. Eles usaram: 2,4-dinitrofenol (inibidor da fosforilação oxidativa), puromicina (inibidor da síntese de proteína), tetraciclina (inibidor da função mitocondrial e da síntese de proteína), rifampicina (inibidor da função mitocondrial e da biossíntese de ácido nucleico), cicloheximida (inibidor da síntese de proteína), azida de sódio (inibidor da fosforilação oxidativa), cloranfenicol (inibidor da função mitocondrial), emetina (inibidor da síntese de proteína), 5-

fluorouracila, actinomicina D, 8-azaguanina e mitomicina C (inibidores da biossíntese de ácidos nucleicos) e ácido nalidixico (inibidor da função mitocondrial e síntese de proteína). Seus resultados mostraram que a germinação dos esporos a 30°C foi altamente susceptível aos vários inibidores da síntese de proteína, ácido nucleico e da função mitocondrial.

FARKAS (1979), reportou que cicloheximida bloqueia a síntese de proteína, bloqueando a síntese de manana, importante na formação da parede celular de fungos. Segundo ARMSTRONG et alii (1984), cicloheximida inibiu a germinação de *S.cerevisiae* pela inibição da síntese de proteína, diminuindo o transporte de metionina e adenina.

STENLID & HAGGBLOM (1985), verificaram que os mais efetivos inibidores de germinação conidial de *Heterobasidium annosum* foram cicloheximida, brometo de etídio e sulfato de proflavina. Eles sugeriram que a síntese de proteína e RNA são necessárias para a germinação desse fungo. MIKHAILOVA et alii (1984), em seus estudos sobre o conteúdo de fosfolípidios neutros em *Cunninghamella japonica*, utilizaram com sucesso cicloheximida e actinomicina D, inibidores respectivamente da síntese de proteína e do processo de transcrição. JACOBS et alii (1985), também utilizaram cicloheximida para estudar as condições de desenvolvimento do fungo *Wangiella dermatidis*, verificando que síntese de RNA foi inibida. LINZ & ORLOWSKI (1987), inibiram a síntese

de RNA em *Mucor racemosus* pelo uso de azida de sódio e fluorito de sódio.

COHEN et alii (1986), verificaram que a atividade em preparações de quitina sintetase foi estimulada pela GLcNAc e cátions de magnésio, mas foi inibida fortemente pelos antibióticos polioxina D e mikomicina, e fracamente inibida por benzimidazole terpenoila e 1-geranil-2-metil-benzimidazole. As alterações na formação de quitina pela polioxina D causaram um aumento de hifas com numerosas depressões.

Os imidazólicos causam espessamento da parede celular do fungo e proliferação do plasmalema. Essas alterações morfológicas prejudicam a captação de nutrientes essenciais tais como as purinas (adenina, guanina e hipoxantina) e glutamina. Existe ainda interferência da droga com enzimas mitocondriais e peroxisomais (UTZ, 1982). Os imidazólicos mais utilizados clinicamente são: Clotrimazole, miconazole e ketoconazole (TRABULSI, 1986).

UBUKATA et alii (1986), afirmaram que muitos dos antibióticos que são conhecidos por inibir a síntese de glucana de parede celular de fungos como neopeptinas, lipopeptinas, papulacandina, echinocandina e flavomicina têm uma longa cadeia de ácidos graxos. Todos esses compostos têm atividades hidrofílica e lipofílica. Estas características estruturais podem ter muitas correlações com a estrutura de

Segundo BRAMBL & GADE (1985), as lecitinas de sementes de plantas ligam-se as paredes de fungos e podem, causar ruptura. Elas podem quebrar e lisar os tubos germinativos. Segundo os modelos sobre a arquitetura da parede celular de fungos correntemente apresentados por BARTINICKI-GARCIA (1973), FARKAS (1979), GOODAY (1977) e GOODAY & TRINCI (1980), as lecitinas podem se ligar tanto a quitina como a glucana. Elas podem diminuir o desenvolvimento da parede no ápice biogênico pela ligação com esses polímeros, causando alteração das atividades balanceadas da síntese e hidrólise de polímeros necessários para a formação e expansão de nova parede durante a germinação.

2.4.5- Inibição por stress osmótico

Os fungos em geral têm um alto requerimento de água, bem como um estreito limite, abaixo do qual não conseguem sobreviver. Quando conídios são incubados num meio de baixa atividade de água (a_w), eles podem perder componentes essenciais a germinação. Segundo CHARLANG & HOROWITZ (1971 e 1974); HOROWITZ *et alii* (1976) e CHARLANG & WILLIAMS (1977), clorofórmio e muitos antibióticos têm um efeito semelhante por aumentar a permeabilidade da membrana celular. Isto sugere que danos ocorrem na membrana em meio de baixo a_w e que um aumento na permeabilidade é responsável pela perda de componentes celulares. Os danos causados em meio de baixo a_w não é letal em muitos casos, e o conídio volta ao normal

quando é transferido para um meio nutriente normal. Nos estudos em *Neurospora*, os resultados mostraram que a sucrose foi melhor inibidor que glicerol, NaCl e glucose. Nistatina e tirocidina inibiram a germinação com danos irreversíveis. Eles diminuíram a viabilidade do conídio a zero em cerca de 24 horas. Polimixina B é também conhecida por quebrar a barreira osmótica, provavelmente induzindo a reorientação dos lipídios da membrana. KINSKY (1961, 1962a e 1962b), mostrou que polioxina B inibe tanto a germinação como o crescimento em *N.crassa*.

No fungo filamentoso *Phanaerochaete velutina*, quando glicerol foi usado como crioprotetor, ele causou um rearranjo dos microtúbulos, o qual foi proporcional a concentração e ao tempo de exposição (INDI *et alii*, 1988).

Segundo NIEDERMEYER *et alii* (1977), quando células de fungos transferidas para uma solução de alta osmolaridade contendo soluto permeável, inicialmente elas diminuem de volume e em seguida aumentam. Eles notaram também que a aplicação de crioprotetores ou soluções hipertônicas podem drasticamente alterar a morfologia da membrana. MORFIS *et alii* (1983), verificaram que stress osmótico por soluções hipertônicas de componentes não permeáveis pode afetar a ultraestrutura e viabilidade do fungo *S.cerevisiae*.

BATES & WILSON (1974), notaram que conídios de *N.crassa* em meio nutriente contendo etilenoglicol ou glicerol crescem em células simples sem formar tubos germinativos

característicos. Etilenoglicol foi mais efetivo que glicerol em produzir esta resposta. Ocorrem alterações nas células devido a uma abrupta diminuição da pressão osmótica. Células adaptadas gradualmente a baixas concentrações de etilenoglicol mostraram ser mais sincronizadas na formação do tubo germinativo que conídios não tratados.

Poli(etilenoglicol) (PEG), é um polímero sintético solúvel em água com interessantes propriedades que podem ter aplicações em tecnologia, biologia e possivelmente medicina. Além do uso para fusão de células, ele é aplicado como agente de fracionamento para a purificação de proteína, cristalização de DNA e proteína e criopreservação de materiais biológicos. Vários experimentos demonstraram que PEG torna os solventes menos polares e que a separação de moléculas polares e hidrofóbicas entre a membrana e a fase externa é modificada. Desta maneira PEG pode influenciar as propriedades conformacionais de macromoléculas ou componentes da membrana sem interagir de maneira direta com estas moléculas. PEG também exerce uma alta pressão osmótica resultando por algum tempo num enrugamento da célula e numa redução do número de moléculas de água ligadas nas bicamadas de fosfolípidios. Há um aumento de permeabilidade a cátions que pode ser explicado como efeito da mudança da constante dielétrica na transferência de energia (ARNOLD et alii, 1985).

CHAVEZ *et alii* (1987), reportam que a inibição de muitas funções mitocondriais ocorre quando é aumentada a osmolaridade do meio. Alta osmolaridade inibe a fosforilação oxidativa bem como a atividade da ATPase e formação de ATP-dependente como consequência da inibição de adenina nucleotideo translocase. A diminuição na taxa de oxidação de malato-glutamato e atividade de ATPase foi aumentada pela adição de valinomicina e desacopladores. Mudanças na osmolaridade causaram uma alteração no mecanismo de regulação do efluxo de Ca^{++} .

Informações podem ser obtidas na revisão feita por INGRAN (1957), sobre a resistência de microorganismos a altas concentrações de açúcares e sais, onde é abordado o efeito dessas concentrações sobre microorganismos em diferentes circunstâncias como de temperatura, concentração de ions de hidrogênio, condições aeróbicas ou anaeróbicas e nutrição. Outras informações sobre o efeito de stress osmótico na morfologia, ultraestrutura e sobrevivência de conídios podem ser obtidas nos estudos feitos por IMSHENETSKII *et alii* (1984) e RAPPORT & BEKER (1985).

As principais substâncias inibidoras da germinação de conídios de fungos apresentadas nesta revisão, bem como sua ação geral e específica, poderão ser encontradas ordenadas na tabela a seguir.

Tabela 1- Principais inibidores em fungos apresentados na
revisão e/ou utilizados no presente trabalho.

A-Ação Geral: Desorganização da membrana lipoproteica

Substâncias inibidoras Ação inibidora específica

Alcool éter + alquil

sulfato de sódio *

PO, FO ?, ATP ?

Alcool fenetil

PO, FO, DNA, RNA, PRO

Anfotericina B

PO, FO ?, ATP ?

Anilina

PO, FO ?, ATP ?

Benzeno *

PO, FO ?, ATP ?

Cerulina

PO, AG

Clorofórmio *

PO, FO ?, ATP ?

Difenilamina

PO, FO ?, ATP ?

Dodecil-sulfato de sódio

PO, FO ?, ATP ?

Etilenoglicol

PO, DNA

Fenol

PO, FO ?, ATP ?

Filipina

PO, FO ?, ATP ?

Glicerol *

PO, FO ?, ATP ?

Griseofulvina

PO, DNA, RNA, PRO

Hidroxiurea

PO, DNA

m-Cresol *

PO, FO ?, ATP ?, DNA ?

n-Butanol

PO, FO ?, ATP ?

Nistatina

PO, FO ?, ATP ?

Nitrobenzeno

PO, FO ?, ATP ?

o-Cresol

PO, FO ?, ATP ?

Octanol

PO, FO ?, ATP ?

continuação ...

p-cresol	FO, FO ?, ATP ?
Poli(etileno)glicol *	FO, FO ?, ATP ?
Polilisisina	FO, FO ?, ATP ?
Polimixina B	FO, FO ?, ATP ?
Protamina	FO, FO ?, ATP ?
Tiroidina	FO, DNA, RNA, PRO
Tolueno	FO, FO ?, ATP ?
Triton x-100	FO, FO ?, ATP ?
Tunicamicina	FO, PRO, FO ?, ATP ?
Xileno	FO, FO ?, ATP ?

 B-Ação Geral: Inibição da condução de prótons através da membrana lipoproteica.

Alameticina	FO
Fosfona D	FO
Gramicidina	FO
Metil-benzimidazole- 2-ylcarbamate (MBC)	FO
Nigericina	FO
Nonactina	FO
Nonensina	FO
Pentaclorofenol	FO
Valinomicina	FO

Continuação...

C-Ação Geral: Inibição da transferência de energia da cadeia respiratória

Antimicina	ATP
Azida de sódio	ATP
Cianida de potássio	ATP
Oligomicina	ATP
Piericidina	ATP
Piocianina	ATP
Rotenona	ATP
Rubratoxina B	ATP
Rutamicina	ATP

continuação...

D-Ação Geral: Inibição da síntese de componentes da parede celular.

Actinomicina	RNA
Cicloheximida *	RNA, PRO
Cordicepina	RNA
Daunomicina	RNA
2-Deoxiglucose	DIA, DES, QUI
Flavomicina	GLU
Gluconolactona	GLU
Lipopeptina	GLU
Lomofungina	RNA, QUI
Mikomicina	QUI
Neopeptina	GLU
Polioxina D	QUI
Tricodermina	PRO, QUI
Validamicina	GLU

continuação...

* Inibidores utilizados no presente trabalho

PO- Alteração da pressão osmótica, podendo causar stress osmótico

FO- Inibição da fosforilação oxidativa

AG- Inibição da síntese de ácidos graxos

DNA- Inibição da síntese de DNA

RNA- Inibição da síntese de RNA

PRO- Inibição da síntese de proteínas

ATP- Inibição de ATPases

DIA- Inibição de diacetilases

DES- Inibição de desaminases

GLU- Inibição da síntese de glucana

QUI- Inibição da síntese de quitina

3-MATERIAIS E METODOS

3.1- Linhagens de *M.anisopliae* utilizadas

Foram utilizadas nos vários experimentos, as linhagens E9, V14, 7, 10, Pegro e F84 conforme a tabela abaixo. Todas as linhagens foram obtidas no Banco de Germoplasmas de Fungos Entomopatogênicos do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas.

Tabela 2- Linhagens de *M.anisopliae* obtidas no banco de germoplasmas do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas.

Linhagem	Variedade	Inseto em que foi isolada	Local
E9	anisopliae	Deois flavopicta	Esp.Santo
V14	anisopliae	Coleóptera	U.S.A.
Pegro	anisopliae	Deois flavopicta	Esp.Santo
7	major	Coleóptera	Samoa
10	anisopliae		R.Janeiro
F84	anisopliae	Coleóptera	U.S.A.

Utilizaram-se também os mutantes Y5, B/vi e X/vi (de E9); os mutantes F84nic⁻ e F84tia⁻ (de F84) e os diplóides D5 e 5. Os mutantes de E9 foram obtidos por MESSIAS (1979), e os de F84 por LUGLI & MESSIAS (1981) através da ação da luz ultravioleta. Os diplóides foram obtidos por LUGLI & MESSIAS (1982) através do ciclo parassexual, D5 (cruzando-se o mutante Y5 da linhagem E9 com o mutante F84nic⁻ de F84) e o 5 (cruzando-se o mutante Y5 com F84tia⁻).

3.2- Meios de cultura usados

3.2.1- Meio minimo (MM) (PONTECORVO et alii, 1953)

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

O pH foi ajustado para 6,8 com solução NaOH (1N) ou HCl (1N).

3.2.2- Meio minimo + Extrato de levedura (MM+E)

Foi acrescentado a 1000 ml de meio minimo, 0,5g de extrato de levedura.

3.2.3- Meio minimo + Peptona (MM+P)

Foi acrescentado a 1000 ml de meio minimo, 2,0 g de peptona.

3.2.4- Meio minimo + Caseína (MM+C)

Foi acrescentado a 1000 ml de meio minimo, 1,5g de

3.2.5- Meio minimo + Caseina + Peptona (MM+C+P)

Foi acrescentado a 1000 ml de meio minimo, 1,5g de caseina e 2,0g de peptona.

3.2.6- Meio minimo + Extrato de levedura + Caseina (MM+E+C)

Foi acrescentado a 1000 ml de meio minimo, 0,5g de extrato de levedura e 1,5g de caseina.

3.2.7- Meio minimo + Extrato de levedura + Peptona (MM+E+P)

Foi acrescentado a 1000 ml de meio minimo, 0,5g de extrato de levedura e 2,0g de peptona

3.2.8- Meio minimo + Caseina + Extrato de levedura + Peptona (MM+C+E+P)

Foi acrescentado a 1000 ml de meio minimo, 1,5g de caseina, 0,5g de extrato de levedura e 2,0g de peptona.

3.2.9- Meio completo (MC) (PONTECORVO *et alii*, 1953)

Adicionou-se a 1000 ml de meio minimo:

Peptona.....	2,0g
Caseina.....	1,5g
Extrato de levedura.....	0,5g
Solução de vitaminas.....	1,5ml
Acido nucleico de levedura hi-	
drolisado.....	2,5ml

O pH foi ajustado para 6,8 com solução de NaOH (1N) ou HCl (1N).

3.2.10- Meio minimo liquido (MML)

Preparado com a mesma composição do MM (item 3.2.1), sem ágar.

3.2.11- Meio completo liquido (MCL)

Preparado com a mesma composição do MC (item 3.2.9), sem ágar.

3.2.12- Meio minimo liquido + Extrato de levedura (MML+E)

Preparado com a mesma composição do MM+E (item 3.2.2), sem ágar.

3.2.13- Meio mínimo + 2% de Meio completo (MM+2%MC)

Foram tomados 100ml de meio mínimo e adicionados 2ml de meio completo.

3.2.14- Meio mínimo líquido + Glicerol

Foi acrescentado glicerol ao meio mínimo líquido para uma concentração final de: 100,0; 235,0; 500,0; 1000,0 e 2000,0 ml/l.

3.2.15- Meio mínimo líquido + Polietilenoglicol(4000)

Foi acrescentado polietilenoglicol ao meio mínimo líquido para uma concentração final de: 178,0; 500,0; 1000,0; 2000,0 e 3000,0 g/l.

3.2.16- Meio mínimo líquido + m-Cresol

Foi acrescentado m-cresol ao meio mínimo líquido para uma concentração final de: 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 ml/l.

3.2.17- Meio mínimo líquido + Alcool éter + Alquil-sulfato de sódio

Foi acrescentado álcool éter + alquil-sulfato de sódio ao meio mínimo para uma concentração final de: 10,0; 50,0; 100,0 e 300,0 g/l.

3.2.18- Meio mínimo líquido + Benzeno

Foi acrescentado benzeno ao meio mínimo líquido para uma concentração final de 50,0; 100,0; 200,0; e 1000,0 ml/l.

3.2.19- Meio minimo liquido + Clorofórmio

Foi acrescentado clorofórmio ao meio minimo, liquido para uma concentração final de: 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 ml/l.

3.2.20- Meio minimo liquido + Cicloheximida

Foi acrescentado cicloheximida ao meio minimo liquido para uma concentração final de: 2,0 g/l

3.3- Soluções empregadas

3.3.1- Solução de vitaminas

Acido nicotínico.....	2,0mg
Acido p-amionobenzóico.....	10,0mg
Biotina.....	0,2mg
Piridoxina.....	50,0mg
Riboflavina.....	100,0mg
Tiamina.....	50,0mg
Agua destilada esterilizada....	100,0ml

A solução foi guardada em frasco escuro no refrigerador a 4°C sobre clorofórmio depois de ter sido aquecida em banho-maria a 60°C por 15 minutos.

3.3.2- Solução de tween 80

Tween 80..... 0,1ml
Água destilada.....99,9ml

Após agitação a solução foi distribuída em tubos de ensaio na quantidade de 2,5ml. A seguir os tubos foram autoclavados e conservados a temperatura ambiente.

3.3.3- Solução salina

NaCl.....8,5g
Água destilada.....1000,0ml

O volume foi distribuído em frascos (9ml por frasco). Depois de autoclavados, foram conservados à temperatura ambiente.

3.3.4- Solução de NaOH 1N

NaOH.....40,0g
Água destilada.....1000,0ml

A solução foi conservada à temperatura ambiente.

3.3.5- Solução de HCl 1N

HCl (37%).....85,0ml
Água destilada.....1000,0ml

A solução foi conservada à temperatura ambiente.

3.4- Morfologia e fisiologia

Foi colocada uma gota de água destilada sobre uma lâmina de vidro. Com o auxílio de uma alça de inoculação, foram tomados conídios da linhagem **Pegro** de tubos de MM de 8 dias a 28°C. Eles foram suspensos em lâmina e foram efetuadas medidas do comprimento e largura com o auxílio de um microscópio óptico, usando-se uma ocular milimetrada previamente calibrada em micrômetros. Foram medidos 25 conídios. Calculou-se então o volume dos conídios utilizando a relação superfície/volume (85/100) que pode ser inferida dos resultados obtidos por AZEVEDO & MESSIAS (1981). A seguir os conídios foram colocados em H₂O e MCL e novamente avaliados quanto ao tamanho em 4 e 6 horas.

Conídios das linhagens **E9**, **V14**, **7** e **Pegro** colhidos semelhantemente foram inoculados em placas contendo MM, MM+P; MM+C; MM+E; MM+C+E; MM+C+P; MM+E+P; MM+2%MC. Após 6 dias a 28°C, foram medidos os diâmetros das colônias com o auxílio de uma régua.

Além do tamanho dos conídios e tamanho das colônias, os conídios foram avaliados quanto a quantidade de água. Com o auxílio de um pincel, conídios das linhagens **E9**, **V14**, **7** e **Pegro** foram colhidos de placas de MM sólido de 8 dias a 28°C. A seguir foram colocados em recipientes de alumínio e pesados. Depois foram postos no fluxo laminar (temperatura

de 32°C e velocidade do ar de 0,45 m/s) e pesados (após 2, 4, 5 e 7 horas), subsequentemente colocados em estufa (temperatura de 70°C) e também pesados (após 1, 2, 3 e 21 horas). A seguir calculou-se a quantidade de água perdida pelos conídios.

3.5- Germinação de conídios

Conídios das linhagens E9 e Pegro crescidos em MM durante 8 dias a 28°C foram inoculados em MM, MC, MM+E, MML, MCL e MML+E e verificada sua germinação em microscópio em diversos tempos. Foi verificado o tempo mínimo em que 85% dos conídios germinam. Semeou-se várias concentrações de conídios (10^2 a 10^7 /ml) nos meios líquidos (MML, MCL, MML+E) para se observar também algum possível efeito inibidor. Os conídios eram agitados à temperatura ambiente. Os conídios semeados em meios sólidos (MM, MC, MM+E), foram incubados em estufa a 28°C. Para a contagem dos conídios germinados em meio sólido, as placas eram abertas diretamente sob o microscópio. Para o meio líquido, pipetava-se e colocava-se a gota sobre a lâmina e observava-se também ao microscópio. Considerava-se germinado o conídio cujo tubo germinativo era igual ou maior ao próprio conídio.

3.6- Inibição da germinação de conídios

Cerca de 10^8 conídios/ml da linhagem **Pegro** produzidos em MM durante 8 dias à 28°C foram inoculados em frascos contendo MM+Inibidor. Os inibidores e suas respectivas concentrações foram: glicerol (235,0 ml/l), polietilenoglicol (178,0 g/l), m-cresol (0,5 ml/l), álcool éter + alquil-sulfato de sódio (10,0 g/l) e cicloheximida (2,0 g/l). De tempos em tempos, conídios eram colhidos, lavados 3 vezes em salina através de centrifugação e reinoculados em MM sem o inibidor. Nesta oportunidade era verificada a porcentagem de germinação em cada caso. Os mesmos experimentos foram realizados também com a linhagem **E9**, com exceção da cicloheximida.

3.7- Número de tubos germinativos

Conídios das linhagens **E9**, **V14**, **Pegro** e **10**, produzidos em MM durante 8 dias à 28°C foram suspensos em solução de tween 80, e após convenientes diluições, foram semeados em placas contendo MM e incubados a 28°C. Após 4, 7 e 10 horas, observou-se o número de tubos germinativos.

Cerca de 10^8 conídios/ml da linhagem **E9** foram inoculados em MM+inibidor. Os inibidores e concentrações

foram: Glicerol (100,0; 500,0; 1000,0 e 2000,0 ml/l), polietilenoglicol (500,0; 1000,0; 2000,0 e 3000,0 g/l), m-cresol (0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 ml/l), álcool éter + alquil-sulfato de sódio (10,0; 50,0; 100,0 e 300,0 g/l), benzeno (50,0; 100,0; 200,0 e 1000 ml/l) e clorofórmio (1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 ml/l). Conídios de cujas concentrações não houve germinação foram tomados, lavados em salina através de centrifugação e semeados em MM. Durante 12 horas foi avaliado o número de tubos germinativos. Nos casos em que houve variação do número de tubos, procurou-se acompanhar a germinação dos conídios oriundos destas colônias em novas condições de cultivo, sem o inibidor. Observou-se também a germinação de conídios à 37°C, em 10, 20, 48 e 60 horas em MM.

Semeou-se também em placas contendo MM cerca de 20 conídios das linhagens E9 e 10 provenientes de MM, sem tratamento prévio e com tratamento prévio com m-cresol (5,0 ml/l durante 65 horas). Após 16 horas, as placas foram abertas e com auxílio de uma lupa e alça de inoculação, cerca de 4 microcolônias em cada caso que exibiam tubos germinativos múltiplos, foram retiradas e inoculadas individualmente em tubos contendo MM inclinado. Após uma semana e consequente conidiagão, os conídios foram colhidos e suspensos em solução de tween 80 e inoculados respectivamente em placas contendo MM, e após 16 horas, examinadas sob o microscópio. As placas eram abertas e examinados 100 conídios, quanto a expressão de tubos germinativos.

Foram suspensos em solução tween 80, conídios produzidos em MC durante 8 dias à 28°C das linhagens E9, F84; dos mutantes Y5, B/vi e X/vi e dos diplóides D5 e 5. Após convenientes diluições, foram inoculados em MC, incubados a 28°C e observados durante 18 horas, quanto a expressão de tubos germinativos.

3.8- Crescimento de tubos germinativos

Conídios das linhagens E9 e 10 produzidos em MM durante 8 dias à 28°C, foram suspensos em solução de tween 80 e após convenientes diluições, foram semeados em placas contendo MC e incubados a 28°C. Após 4, 6, 12 e 18 horas, as placas foram abertas sob o microscópio e com o auxílio de uma ocular micrométrica previamente calibrada em micrômetros, os tubos germinativos foram medidos.

4- RESULTADOS OBTIDOS

4.1- Morfologia e fisiologia

Os conídios da linhagem **Pegro** foram examinados quanto ao tamanho e em seguida incubados em H₂O e MCL sob agitação, quando também foram avaliados nos tempos de 4 e 6 horas. Foram efetuadas 25 medidas do comprimento e largura, dados em μm , conforme a tabela 3.

Tabela 3- Medidas do comprimento e largura de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* no tempo zero e depois de incubados em H2O e MCL por 4 e 6 horas, dados em μm .

T=0		T=4		T=6	
		H2O		H2O	
		MCL		MCL	
C	L	C	L	C	L
6,65-2,66	7,98-2,66	6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
7,98-3,99	6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-3,99	6,65-2,66	13,30-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	6,65-3,99
6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-5,32	6,65-3,99	7,98-5,32	7,98-5,32
9,31-2,66	7,98-3,99	6,65-2,66	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
7,98-2,66	9,31-3,99	7,98-3,99	10,64-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-2,66	6,65-2,66	9,31-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-2,66	7,98-3,99	6,65-3,99	6,65-2,66	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-2,66	7,98-2,66	6,65-2,66	9,31-3,99	9,31-3,99	9,31-3,99
7,98-2,66	7,98-2,66	7,98-3,99	7,98-3,99	6,65-3,99	6,65-3,99
7,98-2,66	7,98-3,99	7,98-3,99	9,31-3,99	9,31-3,99	9,31-3,99
6,65-3,99	7,98-3,99	6,65-2,66	6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
7,98-2,66	6,65-2,66	9,31-3,99	7,98-3,99	9,31-5,32	9,31-5,32
6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	10,64-3,99	10,64-3,99
7,98-3,99	9,31-3,99	6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-2,66	6,65-2,66	7,98-3,99	6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-2,66	7,98-3,99	6,65-2,66	6,65-3,99	6,65-3,99	6,65-3,99
7,98-2,66	6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
7,98-2,66	9,31-3,99	10,64-2,66	6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-2,66	6,65-2,66	6,65-3,99	6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-2,66	7,98-2,66	9,31-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-2,66	7,98-3,99	6,65-2,66	5,32-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-2,66	6,65-3,99	6,65-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99	7,98-3,99
6,65-3,99	6,65-2,66	7,98-5,32	5,32-2,66	10,64-5,32	10,64-5,32
7,98-2,66	6,65-2,66	7,98-3,99	7,98-3,99	6,65-5,32	6,65-5,32

C=comprimento

L=largura

T=tempo em horas

Os coeficientes de correlação entre o comprimento e largura dos conídios foram: $T=0$, $c=-0,1684$ (não houve correlação); $T=4(H2O)$, $c=0,4753$; $T=4(MCL)$, $c=0,2699$; $T=6(H2O)$, $c=0,4122$ e $T=6(MCL)$, $c=0,2167$.

Considerando-se a relação superfície / volume (85/100), calculou-se o volume dos conídios, cujos resultados estão a seguir.

Tabela 4- Volume de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* no tempo zero e depois de incubados em H2O e MCL por 4 e 6 horas, dados em μm^3 .

T=0	T=4		T=6	
	H2O	MCL	H2O	MCL
20,80	24,96	31,20	36,51	36,51
36,51	31,20	36,51	36,51	36,51
31,20	20,80	62,41	36,51	31,20
31,20	36,51	49,93	31,20	49,93
29,12	36,51	20,80	36,51	36,51
24,96	43,68	36,51	49,93	36,51
20,80	20,80	43,68	36,51	36,51
20,80	36,51	31,20	20,80	36,51
20,80	24,96	20,80	43,68	43,68
24,96	24,96	36,51	36,51	31,20
24,96	36,51	36,51	43,68	43,68
31,20	36,51	20,80	31,20	36,51
24,96	20,80	43,68	36,51	58,25
31,20	36,51	36,51	36,51	49,93
31,20	43,68	31,20	36,51	36,51
20,80	20,80	36,51	31,20	36,51
20,80	36,51	20,80	31,20	31,20
24,96	31,20	36,51	36,51	36,51
24,96	43,68	33,28	31,20	36,51
20,80	20,80	31,20	31,20	36,51
20,80	24,96	43,68	36,51	36,51
20,80	36,51	20,80	24,96	36,51
20,80	31,20	31,20	36,51	36,51
31,20	20,80	49,93	16,64	66,57
24,96	20,80	36,51	36,51	41,60

T=tempo em horas

A seguir foi realizada uma análise estatística da variação do volume dos conídios nos diversos tratamentos, após serem normalizados, cujos resultados se encontram na próxima tabela.

Tabela 5- Análise de variância do volume de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* nos tempos zero, 4 e 6 horas em H2O e MCL (após transformação em $\sqrt{x}$)

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Volumes	4	31,28	7,82	4,01**
Resíduo	120	233,71	1,94	
Total	124	264,99		

** significativo ao nível de 1%

A seguir comparou-se a média dos volumes dos conídios utilizando o teste de Tukey, conforme a tabela 6.

Tabela 6- Comparação das médias do volume de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em zero, 4 e 6 horas em H2O e MCL (após transformação $\sqrt{x}$).

Meios	Média do volume de conídios, $\sqrt{x} \text{ } \mu\text{m}^3$ (1)
----- (T=0)	4,82a
H2O (T=4)	5,23ab
H2O (T=6)	5,64ab
MCL (T=4)	5,84ab
MCL (T=6)	6,27 b

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 1,03.

Calculou-se a seguir a porcentagem de aumento ocorrido em cada tratamento. Os resultados sobre o volume estão expressos em μm^3 .

Tabela 7- Porcentagem de aumento do volume médio de conídios da linhagem Pegro de *M. anisopliae* em zero, 4 e 6 horas em H2O e MCL, medidos em μm^3 .

Tempo	T=0	T=4		T=6	
Meio		H2O	MCL	H2O	MCL
Volume	25,41	30,40	35,32	34,87	40,02
% de Aumento		19,64	39,00	37,23	57,50

A respeito da quantidade de água em conídios colocados em fluxo laminar e estufa, os resultados estão na tabela a seguir.

Tabela 8- Porcentagem de água em conídios de 4 linhagens de *M.anisopliae* colocados em fluxo laminar (a temperatura de 32°C e velocidade do ar de 0,45 m/s) e estufa (a 70°C). Os dados que não estão indicados em porcentagem, são em miligramas.

Linhagens	Peso inicial			Peso no fluxo				Perda
	R	C+H2O	R+C+H2O	2h	4h	5h	7h	%(F)
E9	230	70	300	265	264	264	264	51,43
V14	220	80	300	266	265	265	265	43,75
Pegro	224	76	300	265	264	264	264	47,37
7	228	72	300	266	265	265	265	48,61
continuação...				Peso na estufa				Perda
				1h	2h	3h	21h	%(E)
E9				261	261	261	261	4,28
V14				263	263	262	262	3,80
Pegro				262	262	261	261	3,95
7				261	261	261	261	5,56
continuação...							Perda total	
							%(F + E)	
E9								55,71
V14								47,50
Pegro								51,32
7								54,17
R=Recipientes		C=Conídios		F=Fluxo			E=Estufa	

Com referência ao crescimento de colônias em diversos meios de cultura, os resultados estão nas tabelas a seguir.

Tabela 9- Tamanho de colônias (diâmetro) de 4 linhagens de *M.anisopliae* crescidas a 28°C em 9 meios diferentes durante 6 dias, medidas em centímetros.

Meios / Linhagens	MM	MM+C	MM+E	MM+P	MM+C+E
E9	1,8 1,7	2,5 2,4	2,7 2,6	2,8 2,5	2,8 2,9
7	1,7 1,5	2,3 2,3	2,9 1,6	1,8 1,9	2,0 2,5
V14	1,3 1,3	1,3 1,3	1,8 1,8	1,4 1,5	1,8 1,7
Pegro	1,9 1,8	2,0 2,2	2,9 3,0	2,3 2,3	2,6 2,7
continuação...		MM+C+P	MM+E+P	MM+2XMC	MM+C+E+P
E9		2,4 2,3	2,9 2,6	2,8 2,8	2,9 3,0
7		2,0 2,2	2,5 2,2	2,2 2,2	2,5 2,5
V14		1,7 1,4	1,8 1,8	2,1 2,0	2,0 1,8
Pegro		2,0 2,1	2,7 2,7	3,0 3,0	3,0 2,9

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela 10- Análise de variância para o tamanho de colônias de 4 linhagens de *M. anisopliae*, crescidas a 28°C em 9 meios diferentes durante 6 dias.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Meios	8	9,5804	1,1975	32,989**
Linhagens	3	6,0811	2,0270	55,840**
Meios X Linhagens	24	1,4634	0,0610	1,680
Meios, Linhagens	35	17,1249	0,4893	13,479**
Resíduo	36	1,3050	0,0363	
Total	71	18,4299		

** significativo ao nível de 1%

Como a interação linhagens X meios não é significativa, o esquema de análise modificado na tabela 11 da página 65, indicando que as linhagens se comportaram de maneira diferente em relação aos meios, fica sem efeito.

Tabela 11- Análise de variância (modificada) para o tamanho de colônias de 4 linhagens de *M.anisopliae*, crescidas a 28°C em 9 meios diferentes durante 6 dias

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	1	0,06		
Linhagens	3	9,58	3,19	175,47**
Resíduo(a)	21	0,05	0,02	
Parcelas	(7)	9,69		
Meios d.linhagem E9	8	2,11	0,26	3,30*
Meios d.linhagem 7	8	1,20	0,15	1,88
Meios d.linhagem V14	8	1,14	0,14	1,79
Meios d.linhagem Pegro 8	8	3,08	0,39	4,82**
Resíduo(b)	14	1,19	0,08	
Total	71	18,43		

* significativo ao nível de 5%

**significativo ao nível de 1%

Nas tabelas a seguir encontram-se as comparações feitas entre as médias do tamanho de colônias considerando-se as linhagens e os meios de cultura, utilizando-se o teste de Tukey.

Tabela 12- Comparação das médias do tamanho de colônias de 4 linhagens de *M. anisopliae* em 9 meios de cultura a 28°C.

Linhagens	Média do tamanho de 18 colônias, em cm (1)
E9	2,58a
Pegro	2,51ab
7	2,16 b
V14	1,66 c

(1)Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,39.

Tabela 13- Comparação da média do tamanho de colônias em 9 meios de cultura de 4 linhagens de *M.anisopliae* crescidas a 28°C durante 6 dias.

Meios de Cultura	Média do tamanho de 8 colônias, em cm (1)
MM+C+E+P	5,15a
MM+2%MC	5,02ab
MM+E	4,82 bc
MM+E+P	4,80 bc
MM+E+C	4,75 c
MM+P	4,12 d
MM+C	4,07 d
MM+C+P	4,02 d
MM	3,25 e

(1)Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,23

4.2- Germinação de conídios

Procurou-se verificar o tempo mínimo em que 85% dos conídios germinam e chamou-se de T_{Gm}. Os experimentos foram realizados com as linhagens E9 e Pegro em MM, MC e MM+E, tanto sólidos como líquidos. Os meios líquidos estiveram sob agitação à temperatura ambiente em várias concentrações de conídios. Os meios sólidos foram incubados a 28°C. De tempos em tempos observou-se as porcentagens de germinação conforme metodologia 3.5. Os resultados se encontram nas tabelas A1 a A24 no apêndice e resumidamente na tabela 14.

Tabela 14- Tempo mínimo de germinação (T_{Gm}) de conídios das linhagens E9 e Pegro, de *M.anisopliae* em MM, MC e MM+E, tanto sólidos como líquidos, dados em horas.

Meios/ Linhagens	MM	MML	MC	MCL	MM+E	MML+E
Pegro	11	12	8	9	8	9
E9	12	11	9	11	10	11

4.3- Inibição da germinação de conídios

Os resultados da inibição se encontram nas tabelas a seguir e foram obtidos segundo metodologia 3.6. Nas tabelas, L significa que os conídios foram lavados e foram inoculados em meio mínimo sem o inibidor, e I significa que os conídios estiveram em presença do inibidor.

Tabela 15- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem
 Pegro de *M.anisopliae* em MML+Glicerol (235 ml/l)
 à temperatura ambiente sob agitação em diversos
 tempos.

Meio/ Tempo	MM	MM+I	MM+I L 2h.	MM+I L 5h.	MM+I L 9h.	MM+I L 24h.
2	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,05	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
5	0,07	0,01	0,15	0,01	0,01	0,01
6	0,21	0,05	0,48	0,10	0,05	0,05
9	0,92	0,10	0,81	0,73	0,10	0,10
12	0,96	0,21	0,93	0,89	0,61	0,21
24	1,00	0,78	1,00	1,00	1,00	0,78
30	1,00	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00
I= em presença do inibidor L= lavado após x horas						

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela
 a seguir.

Tabela 16- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MML + Glicerol (235 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SS	QM	F
Meios	5	1,43	0,29	8,22**
Tempos	7	14,83	2,12	60,88**
Resíduo	35	1,22	0,03	
Total	47	17,48		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro em MML+Glicerol foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão na tabela a seguir.

Tabela 17- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem **Pegro** de **M.anisopliae** em MML + Glicerol (235 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Meio	Média da porcentagem de germinação em 8 tempos(i)
MM+I(L=2h)	0,88a
MM	0,87a
MM+I(L=5h)	0,73ab
MM+I(L=9h)	0,59 bc
MM+I(L=24h)	0,47 c
MM+I	0,46 c

(i) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,25.

Tabela 18- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML+Glicerol (235 ml/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.

Meio/ Tempo	MM	MM+I	MM+I L 2h.	MM+I L 5h	MM+I L 9h	MM+I L 24h.
2	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
5	0,05	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
6	0,10	0,01	0,04	0,00	0,00	0,00
9	0,19	0,03	0,18	0,07	0,03	0,03
12	0,60	0,10	0,60	0,60	0,19	0,10
24	1,00	0,78	1,00	1,00	1,00	0,78
30	1,00	0,89	1,00	1,00	1,00	1,00

I= em presença do inibidor

L= lavado após x horas

Foi realizada uma análise estatística, conforme a tabela a seguir

Tabela 19- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML+Glicerol (235 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos)

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Meios	5	0,50	0,10	12,65**
Tempos	7	16,00	2,29	286,50**
Resíduo	35	0,28	0,008	
Total	47	16,78		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 em MM+Glicerol foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão na tabela a seguir.

Tabela 20- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MM + Glicerol (235 ml\l à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Meios	Média da porcentagem de germinação em 8 tempos(1)
MM	0,67a
MM+I (L=2h)	0,60ab
MM+I (L=5h)	0,51 bc
MM+I (L=9h)	0,47 bc
MM+I (L=24h)	0,39 c
MM+I	0,36 c

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,15.

Tabela 21- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MML + Polietilenoglicol (178 g/l), à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.

Meio / Tempo	MM	MM+I	MM+I L 2h.	MM+I L 5h.	MM+I L 8h	MM+I L 24h
2	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
5	0,03	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
6	0,07	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
8	0,22	0,02	0,04	0,04	0,02	0,00
12	0,69	0,21	0,62	0,53	0,71	0,00
24	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	0,91
30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

I= em presença do inibidor

L= lavado após x horas

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir

Tabela 22- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MML+Polietilenoglicol (178 g/l), à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos)

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Meios	5	0,48	0,09	5,71**
Tempos	7	18,03	2,58	153,85**
Resíduo	35	0,59	0,017	
Total	47	19,10		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro em MML+Polietilenoglicol, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela 23- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MML+Polietilenoglicol (178 g\l), à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos)

Meios	Média da porcentagem de germinação em 8 tempos(1)
MM	0,66a
MM+I (L=2h)	0,59ab
MM+I (L=5h)	0,52abc
MM+I (L=8h)	0,50abc
MM+I	0,43 bc
MM+I (L=24h)	0,35 c

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,21.

Tabela 24- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML + Polietilenoglicol (178g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.

Meios / Tempo	MM	MM+I	MM+I L 2h.	MM+I L 5h.	MM+I L 8h.	MM+I L 24h
2	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,02	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00
5	0,03	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00
6	0,08	0,00	0,09	0,08	0,00	0,00
8	0,16	0,01	0,41	0,39	0,01	0,01
12	0,25	0,02	0,99	0,95	0,91	0,02
24	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	0,97
30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

I= em presença do inibidor

L= lavado após x horas

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir

Tabela 25- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em MML+Polietilenoglicol (178 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Meios	5	0,88	0,18	3,41**
Tempos	7	17,83	2,55	49,56**
Resíduo	35	1,80	0,05	
Total	47	20,51		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 em MML+Polietilenoglicol, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela 26- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML+Polietilenoglicol (178 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Meios	Média da porcentagem de germinação em 8 tempos(1)
MM+I(L=2h)	0,77a
MM+I(L=5h)	0,68ab
MM	0,60ab
MM+I(L=8h)	0,56ab
MM+I(l=24h)	0,40 b
MM+I	0,40 b

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,36.

Tabela 27- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML + m-Cresol (0,5ml/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.

Meios /	MM	MM+I	MM+I L 2h.	MM+I L 5h.	MM+I L 8h.	M+I L 24h.
Tempos						
2	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,25	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
8	0,52	0,05	0,07	0,05	0,05	0,05
12	0,83	0,15	0,21	0,23	0,43	0,15
24	1,00	0,48	0,64	0,82	1,00	0,48
30	1,00	0,71	1,00	1,00	1,00	1,00

I= em presença do inibidor

L= lavado após x horas

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela 28- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML+m-Cresol (0,5 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SS	QM	F
Meios	5	1,24	0,25	7,23**
Tempos	7	11,87	1,70	49,30**
Resíduo	35	1,21	0,03	
Total	47	14,32		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 em MML+m-Cresol, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela 29- Comparação das médias da porcentagem de germinação conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em MML+m-Cresol (0,5 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Meios	Média da porcentagem de germinação em 8 tempos(1)
MM	0,78a
MM+I(L=8h)	0,52ab
MM+I(L=5h)	0,44 b
MM+I(L=2h)	0,41 b
MM+I(L=24h)	0,37 b
MM+I	0,27 b

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,31.

Tabela 30- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem
 Pegro de *M.anisopliae* em MML+m-Cresol (0,5ml/l) à
 temperatura ambiente sob agitação em diversos
 tempos.

Meios / Tempos	MM	MM+I	MM+I L 2h.	MM+I L 5h.	MM+I L 8h.	MM+I L 24h.
2	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,63	0,09	0,10	0,02	0,09	0,09
12	0,89	0,21	0,21	0,30	0,50	0,21
24	1,00	0,47	0,71	0,89	1,00	0,47
30	1,00	0,79	0,97	1,00	1,00	1,00

I= em presença do inibidor

L= lavado após x horas

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela
 a seguir

Tabela 31- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem **Pegro** de *M.anisopliae* em MML+m-Cresol (0,5 ml\1) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SS	QM	F
Meios	5	1,30	0,26	10,72**
Tempos	7	13,09	1,87	77,26**
Resíduo	35	0,85	0,02	
Total	47	15,24		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem **Pegro** em MML+m-Cresol, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela 32- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MML+m-Cresol (0,5 ml\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Meios	Média da porcentagem de germinação em 8 tempos(1)
MM	0,83a
MM+I(L=8h)	0,53 b
MM+I(L=5h)	0,44 b
MM+I(L=2h)	0,40 b
MM+I(L=24h)	0,39 b
MM+I	0,33 b

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,26.

Tabela 33- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MML + Alcool éter + alquil-sulfato de sódio (10 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos.

Meios /	MM	MM+I	MM+I L 2h.	MM+I L 5h.	MM+I L 6h.	MM+I L 24.
Tempos						
2	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
5	0,03	0,02	0,05	0,02	0,02	0,02
6	0,04	0,03	0,17	0,03	0,03	0,03
8	0,06	0,03	0,21	0,03	0,03	0,03
12	0,49	0,12	0,70	0,19	0,13	0,12
24	1,00	0,64	1,00	1,00	0,83	0,64
30	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,96

I= em presença do inibidor			L= lavado após x horas			

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela 34- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem *Pegro* de *M.anisopliae* em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sódio (10,0 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Meios	5	0,46	0,09	5,34**
Tempos	7	13,81	1,97	115,37**
Resíduo	35	0,60	0,017	
Total	47	14,87		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem *Pegro* em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sódio, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela 35- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem **Pegro** de **M.anisopliae** em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sodio (10 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Meios	Média da porcentagem de germinação em 8 tempos(1)
MM+I(L=2h)	0,67a
MM	0,60ab
MM+I(L=5h)	0,52ab
MM+I(L=8h)	0,46ab
MM+I(L=24h)	0,41 b
MM+I	0,40 b

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,22.

Tabela 36- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML + Alcool éter + alquil-sulfato de sódio (10 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos

Meios /	MM	MM+I	MM+I L 2h.	MM+I L 5h	MM+I L 8h	MM+I L 24h.
Tempos						
2	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
5	0,08	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
6	0,09	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
8	0,27	0,03	0,10	0,10	0,03	0,03
12	0,53	0,12	0,53	0,91	0,70	0,12
24	1,00	0,87	1,00	1,00	1,00	0,87
30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

I= em presença do inibidor

L= lavado após x horas

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela 37- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sódio (10 g/l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SS	QM	F
Meios	5	0,35	0,07	3,65**
Tempos	7	16,25	2,32	119,63**
Resíduo	35	0,68	0,02	
Total	47	17,28		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sódio, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir

Tabela 38- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em MML+Alcool éter+alquil-sulfato de sódio (10 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Meios	Média da porcentagem de germinação em 8 tempos(1)
MM	0,69a
MM+I (L=5h)	0,64ab
MM+I (L=8h)	0,59ab
MM+I (L=2h)	0,58ab
MM+I (L=24h)	0,46ab
MM+ I	0,45 b

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,23.

Tabela 39- Porcentagem de germinação de conídios da linhagem
Pegro de *M.anisopliae* em MML+Cicloheximida (2g/l)
 à temperatura ambiente sob agitação em diversos
 tempos.

Meios / MM	MM+I	MM+I L 2h.	MM+I L 4h.	MM+I L 6h.	MM+I L 8h.	MM+I L 10h
Tempos						
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
8	0,15	0,00	0,29	0,27	0,10	0,00
10	0,27	0,00	0,39	0,29	0,24	0,11
12	0,48	0,00	0,41	0,32	0,25	0,18
24	0,95	0,33	0,79	0,76	0,58	0,51
30	1,00	0,39	0,89	0,88	0,75	0,74

I= em presença do inibidor

L= lavado após x horas

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela
 a seguir.

Tabela 40- Análise de variância da porcentagem de germinação de conídios da linhagem **Pegro** de *M.anisopliae* em MML+Cicloheximida (2 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Meios	6	1,28	0,21	10,65**
Tempos	7	8,77	1,25	62,66**
Resíduo	42	0,84	0,02	
Total	55	10,89		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem **Pegro** em MML+Cicloheximida, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela 41- Comparação das médias da porcentagem de germinação de conídios da linhagem **Pegro de M.anisopliae** em MML+Cicloheximida (2 g\l) à temperatura ambiente sob agitação em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos)

Meios	Média da porcentagem de germinação em 8 tempos(1)
MM	0,61a
MM+I(L=2h)	0,54ab
MM+I(L=4h)	0,50abc
MM+I(L=6h)	0,41abc
MM+I(L=8h)	0,33 bcd
MM+I(L=10h)	0,25 cd
MM+I	0,16 d

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,23.

4.4- Número de tubos germinativos

Conídios de diversas linhagens, numa concentração de 10^6 /ml, foram semeados em MM a 28°C e observados em diversos tempos de germinação e verificados quanto ao número de tubos germinativos. Foram analisados 250 conídios por tempo e linhagem. Nas tabelas a seguir:

NG= Número de conídios que não germinaram

TU= Número de conídios que germinaram através de um tubo germinativo.

TD= Número de conídios que germinaram através de dois tubos germinativos.

TT= Número de conídios que germinaram através de três tubos germinativos.

Tabela 42- Número de tubos germinativos de conídios de 4 linhagens de *M.anisopliae*, em MM a 28°C nos tempos de 4, 7 e 10 horas.

Tempos / Linhagens	4				7				10			
	NG	TU	TD	TT	NG	TU	TD	TT	NG	TU	TD	TT
E9	246	4	0	0	210	40	0	0	41	219	1	0
V14	231	18	1	0	40	208	2	0	45	182	23	2
Pegro	239	11	0	0	109	141	0	0	32	217	1	0
10	105	135	10	0	38	151	61	0	30	110	109	1

Foram testados vários inibidores conforme metodologia 3.7, para se verificar sua influência na expressão de tubos germinativos, cujos resultados se encontram nas tabelas a seguir.

Tabela 43- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em diferentes dosagens de benzeno (MML+Benzeno), durante 41 horas à temperatura ambiente.

Amostras	Dosagens	Germinação
A	50 ml/l	Germinou
B	100 ml/l	Germinou
C	200 ml/l	Germinou
D	1000 ml/l	Não Germinou

Os conídios da amostra D foram lavados e inoculados em MM sólido e observados. Após 12 horas ainda não tinham germinado. Após uma semana, os conídios produzidos pelas colônias foram reinoculados em MM sólido. Após 10 horas de observação, notou-se que não houve alteração quanto ao número característico de tubos germinativos.

Tabela 44- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em diferentes dosagens de polietilenoglicol (MM + Polietilenoglicol), durante 57 horas sob agitação à temperatura ambiente.

Amostras	Dosagens	Germinação
A	500 g/l	Germinou
B	1000 g/l	Não germinou
C	2000 g/l	Não germinou
D	3000 g/l	Não germinou

Os conídios da amostra B foram lavados e inoculados em MM sólido e observados durante 12 horas. Neste tempo, mais de 85% dos conídios haviam germinado e apresentavam o padrão característico de germinação da linhagem E9.

Tabela 45- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em diferentes dosagens de glicerol (MML + Glicerol), durante 70 horas sob agitação à temperatura ambiente.

Amostras	Dosagens	Germinação
A	100 ml/l	Germinou
B	500 ml/l	Germinou
C	1000 ml/l	Não germinou
D	2000 ml/l	Não germinou

Os conídios da amostra C foram lavados e inoculados em MM sólido e observados durante 12 horas. Notou-se que mais de 85% dos conídios tinham germinado, conservando o padrão de germinação da linhagem E9.

Tabela 46- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em diferentes dosagens de m-cresol (MML + m-cresol), durante 65 horas sob agitação à temperatura ambiente.

Amostras	Dosagens	Germinação
A	0,5 ml/l	Germinou
B	1,0 ml/l	Germinou
C	3,0 ml/l	Não germinou
D	5,0 ml/l	Não germinou

Os conídios das amostras C e D foram lavados e semeados em MM sólido e observados após 12 horas. Da amostra C, germinaram mais de 85% dos conídios e da amostra D, pouco menos de 85% sendo, cerca de 60% deles com um tubo germinativo e 40% com 2 ou 3 tubos. Após uma semana os conídios produzidos pelas colônias foram semeados em MM e observados após 4, 7 e 10 horas (ciclo 1), o mesmo ocorrendo nas semanas seguintes (ciclo 2 e 3).

Tabela 47- Número de tubos germinativos de conídios previamente tratados com m-cresol da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MM a 28°C em 3 ciclos durante 4, 7 e 10 horas.

Ciclos / Tempo	1				2				3			
	NG	TU	TD	TT	NG	TU	TD	TT	NG	TU	TD	TT
4	215	35	0	0	246	4	0	0	240	10	0	0
7	196	46	8	0	153	97	0	0	83	167	0	0
10	103	105	38	4	70	169	9	2	13	233	4	0

Tabela 48- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em diferentes dosagens de álcool éter + alquil-sulfato de sódio (MML + álcool éter + alquil-sulfato de sódio), durante 65 horas sob agitação à temperatura ambiente.

Amostras	Dosagens	Germinação
A	10 g/l	Germinou
B	50 g/l	Germinou
C	100 g/l	Germinou
D	300 g/l	Não germinou

Os conídios do frasco D foram lavados e semeados em MM sólido e observados durante 12 horas. Neste tempo mais de 85% dos conídios tinham germinado sendo, 40% deles com um tubo germinativo e 60% com dois ou mais tubos. Após uma semana, os conídios produzidos pelas colônias foram reinoculados em MM e observados. Notou-se que os conídios não mais aumentaram o número de tubos germinativos e voltaram a apresentar o mesmo padrão característico da linhagem E9.

Tabela 49- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em diferentes dosagens de clorofórmio (MML + Clorofórmio), durante 57 horas sob agitação à temperatura ambiente.

Amostras	Dosagens	Germinação
A	1 ml/l	Germinou
B	2 ml/l	Germinou
C	5 ml/l	Não germinou
D	10 ml/l	Não germinou

Os conídios do frasco C foram lavados e inoculados em MM sólido e observados após 12 horas. Não houve germinação de conídios neste período. Após uma semana, os conídios produzidos pelas colônias foram reinoculados em MM sólido e observados após 10 horas. Notou-se que não houve modificação do padrão de germinação da linhagem E9.

Tabela 50- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em diferentes tempos à temperatura de 37°C em MM sólido.

Amostras	Tempos	Germinação
A	10 h.	Não germinou
B	20 h.	Não germinou
C	48 h.	Germinou (50%)
D	60 h.	Germinou (85%)

As amostras A e B foram incubadas a seguir a 28°C e observadas após 12 horas. Observou-se que mais de 85% dos conídios haviam germinado, mantendo o padrão característico da linhagem E9.

Os resultados a seguir se referem às microcolônias selecionadas sob a lupa, que tinham tubos germinativos múltiplos, segundo a metodologia 3.7.

Tabela 51- Número de tubos germinativos de conídios de microcolônias selecionadas da linhagem 10 de *M.anisopliae*, sem e com pré-tratamento com m- cresol em MM a 28°C durante 16 horas.

Microcolônias sem pré-tratamento	NG	TU	TD	TT
1	2	2	56	40
2	3	1	72	24
3	1	0	60	39
4	0	0	58	42
Microcolônias com pré-tatamento	NG	TU	TD	TT
1	0	0	74	26
2	1	2	62	35
3	0	0	76	24
4	1	0	60	39

Tabela 52- Número de tubos germinativos de conídios de microcolônias selecionadas da linhagem E9 de *M. anisopliae*, sem e com pré - tratamento com m-cresol, em MM a 28°C durante 16 horas.

Microcolônias sem pré-tratamento	NG	TU	TD	TT
1	3	81	16	0
2	1	51	48	0
3	5	66	39	0
4	10	31	59	0
Microcolônias com pré-tratamento	NG	TU	TD	TT
1	21	44	34	1
2	13	16	71	0
3	10	12	73	0
4	14	35	51	0

Foi verificado o número de tubos germinativos de linhagens selvagens, mutantes e diplóides em MC. Os resultados se encontram nas tabelas A25 a A51 no apêndice. Na tabela a seguir foi feita uma comparação entre estas linhagens.

Tabela 53- Comparação do número de tubos germinativos de conídios de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *M.anisopliae* em 18 horas, à 28°C em MC.

Linhagens	Germinação	Coloração
E9	TDO > TU > NG = TD = TT	Verde
F84	TU > TD > TDO > NG = TT	Violeta
Y5	TDO > TU > NG = TD = TT	Amarela
B/vi	TDO > TU > TD = TT = NG	Branca
X/vi	TDO > TU > TD > TT = NG	Violeta
F84nic-	NG > TU > TDO = TD = TT	Violeta
F84tia-	TU > NG > TDO = TD = TT	Violeta
D5	TU > NG > TDO > TD = TT	Amarela
5	TDO > TU > TD = NG = TT	Amarela

NG- Número de conídios que não germinaram

TU- Número de conídios que germinaram através de um único tubo germinativo

TD- Número de conídios que germinaram através de dois tubos germinativos no mesmo polo.

TDO-Número de conídios que germinaram através de dois tubos germinativos mas em polos opostos.

TT- Número de conídios que germinaram através de três tubos germinativos

4.5- Crescimento de tubos germinativos

Após o crescimento das linhagens E9 e 10 de *M.anisopliae* por 4, 6, 12 e 18 horas em MC a 28°C, as placas foram abertas sob o microscópio, e com o auxílio de uma ocular micrométrica, os tubos germinativos foram medidos, dados em μm , conforme as tabelas a seguir.

Tabela 54- Crescimento de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* a 28°C nos tempos de 4, 6, 12 e 18 horas em MC.

Tempos /	4 horas			6 horas			12 horas			18 horas		
Tubos	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	3	0	0	3	0	0	80	0	0	80	13	0
	0	0	0	3	0	0	40	0	0	106	7	0
	0	0	0	4	0	0	53	13	0	53	0	0
	4	0	0	3	0	0	27	0	0	93	27	0
	0	0	0	0	0	0	67	0	0	133	0	0
	0	0	0	5	3	0	40	0	0	86	33	0
	0	0	0	0	0	0	53	0	0	100	27	0
	3	0	0	0	0	0	47	13	0	126	20	0
	0	0	0	3	0	0	67	7	0	93	27	20
	0	0	0	0	0	0	53	0	0	120	27	0
	3	0	0	0	0	0	60	0	0	133	33	0
	0	0	0	5	0	0	67	13	0	133	13	0
	0	0	0	3	0	0	60	7	0	80	0	0
	0	0	0	4	0	0	53	0	0	67	7	0
	0	0	0	4	0	0	40	7	0	120	0	0
	0	0	0	3	0	0	67	0	0	100	20	0
	3	0	0	0	0	0	14	0	0	140	0	0
	0	0	0	0	0	0	27	0	0	87	27	0
	0	0	0	3	0	0	33	0	0	113	13	0
	0	0	0	4	0	0	67	0	0	133	27	0

Os números 1, 2 e 3 representam respectivamente o primeiro, segundo e terceiro tubos germinativos em cada tempo dos conídios examinados. As medidas de cada tubo estão em μm .

Tabela 55- Crescimento de tubos germinativos de conídios da linhagem 10 de *M.anisopliae* a 28°C nos tempos de 4, 6, 12 e 18 horas em MC.

Tempos /	4horas			6horas			12 horas			18 horas		
Tubos	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	3	0	0	3	0	0	4	7	0	33	13	0
	0	0	0	4	3	0	0	0	0	80	53	13
	3	0	0	4	3	0	7	7	0	33	27	0
	3	0	0	0	0	0	33	13	0	47	7	0
	0	0	0	3	0	0	13	7	0	33	33	7
	3	0	0	3	0	0	80	0	0	106	40	27
	4	3	0	4	3	0	7	0	0	106	53	0
	0	0	0	4	0	0	40	33	0	27	13	0
	3	3	0	3	3	0	27	7	0	106	33	0
	0	0	0	0	0	0	13	11	0	67	27	0
	0	0	0	5	3	0	27	7	0	40	0	0
	3	0	0	3	0	0	20	7	0	67	13	0
	0	0	0	3	0	0	33	0	0	67	27	0
	0	0	0	3	3	0	27	7	0	40	27	0
	3	0	0	0	0	0	20	7	0	87	27	0
	0	0	0	0	0	0	13	0	0	53	27	0
	0	0	0	5	4	0	40	0	0	80	20	13
	3	0	0	0	0	0	33	20	0	33	27	0
	0	0	0	3	0	0	40	20	0	67	33	20
	0	0	0	4	3	0	53	27	0	60	40	0

Os números 1, 2 e 3 representam respectivamente o primeiro, segundo e terceiro tubos germinativos em cada tempo dos conídios examinados. As medidas estão em μm .

As observações sobre a germinação, crescimento e ramificações de tubos germinativos de conídios em *M.anisopliae* estão ilustradas na figura a seguir.

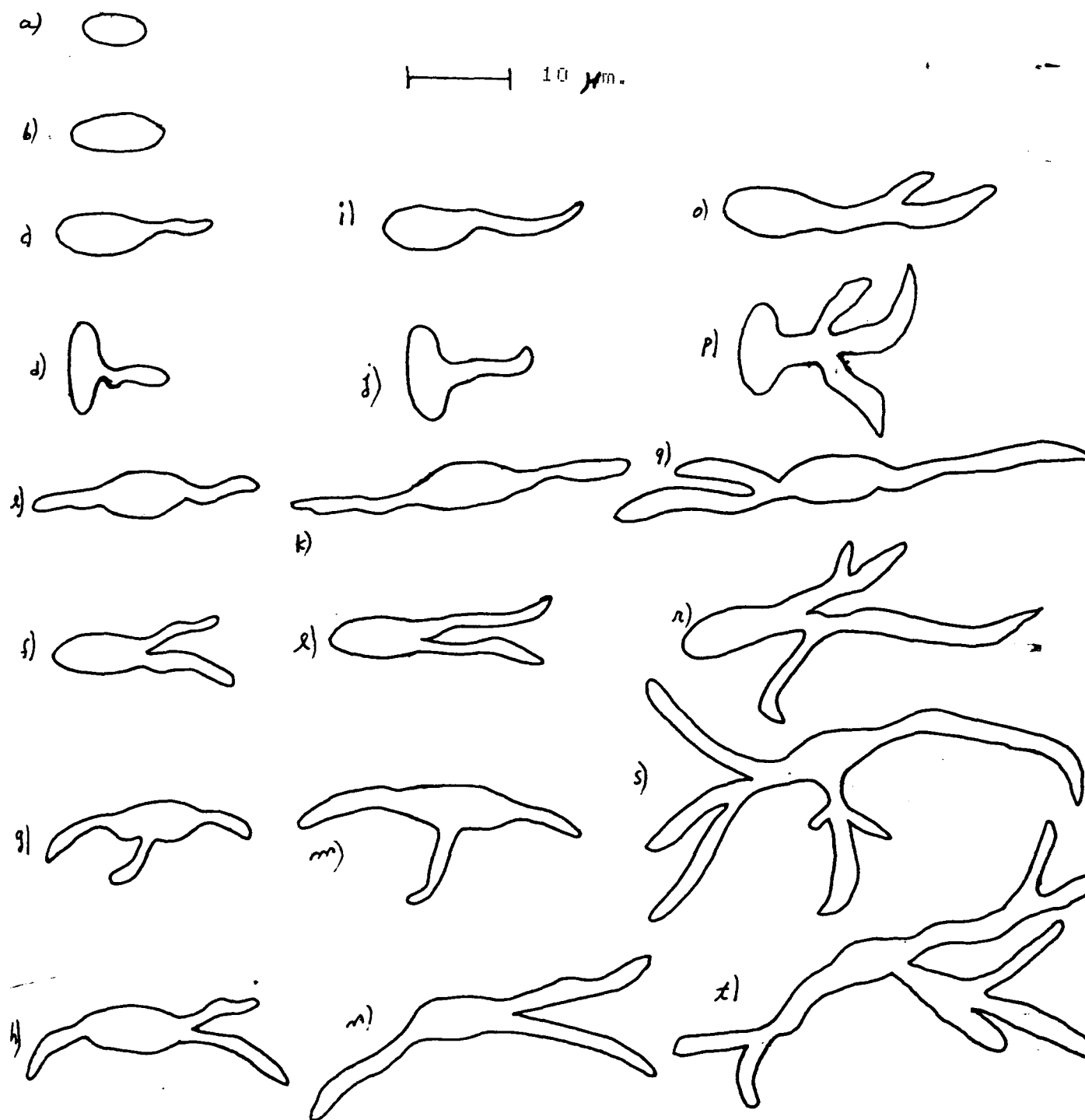


Figura 2- Germinação, crescimento e ramificação de tubos germinativos de conídios de M. anisopliae.

a) conídio não germinado; b) conídio pronto para germinar;
 c) germinação através de 1 tubo germinativo polar;
 d) germinação através de 1 tubo germinativo não polar;
 e) germinação através de 2 tubos germinativos em polos opostos; f) germinação através de 2 tubos germinativos no mesmo polo; g, h) germinação através de 3 tubos germinativos;
 i-n) crescimento dos tubos germinativos; o-r) crescimento dos tubos germinativos com ramificações secundárias.

5-DISCUSSÃO

5.1- Morfologia e fisiologia

Nos estudos iniciais do desenvolvimento de *M.anisopliae*, comparou-se o tamanho de colônias de 4 linhagens em 9 meios nutrientes diferentes. Conforme as tabelas 9-13, houve diferenças significativas entre as linhagens e entre os meios. As linhagens que mais cresceram foram E9 e Pegro. Pela observação da tabela 13, notou-se que os meios que incluíram extrato de levedura na sua composição foram mais favoráveis ao crescimento das colônias.

Em outro experimento não publicado, MM+E não apresentou diferenças significativas em relação ao MC, quanto ao tamanho de colônias. Nos experimentos sobre germinação, este meio foi também tão eficiente quanto ao MC, conforme a tabela 14.

Baseado nestes dados, pode-se então sugerir o MM+E como um meio basal para *M.anisopliae*, tendo em vista sua eficiência e economia. Em *Aureobasidium pullulans*, por

exemplo, a formação de tubo germinativo e desenvolvimento micelial subsequente foram induzidos apenas por extrato de levedura em meio líquido definido, segundo COOPER & GADD (1984).

Além do meio nutriente, a umidade é outro importante fator no desenvolvimento de fungos, porque influencia especialmente o tempo de dormência. O período latente para a germinação aumenta com o declínio de água do substrato. Sob condições de diminuída disponibilidade de água, há um aumento na fase *lag* e uma subsequente redução da taxa de crescimento acompanhada pela diminuição da respiração. Para alguns fungos, o limite de potencial de água segundo cálculos feitos através da fórmula de GRIFFIN (1981), é de 0,998 a 0,920 *aw* ou 99,8 a 92,0% r.h. (umidade relativa). Os conídios de *M.anisopliae* colhidos de MC sólido, em culturas de superfície, podem perder até 50% de seu peso, devido a perda de água por evaporação à temperatura ambiente, e quando submetidos a temperatura de 70°C em estufa, ocorre ainda uma perda adicional residual, em torno de 5%, conforme a tabela 8.

5.2- Germinação de conídios

Foram feitas sucessivas observações da germinação conidial em *M.anisopliae* para se estabelecer o tempo mínimo de germinação (T_{Gm}), bem como a concentração ideal de conídios no meio de cultura. Em meio líquido, a concentração em torno de 10⁸ conídios /ml, mostrou ser em alguns casos a mais adequada para a germinação, pelas observações das tabelas A2 e A24. Há evidências de que o efeito de inibição devido a concentração de conídios é maior em MM que em MC.

Os experimentos também permitiram sugerir 12 horas como o tempo mínimo para que 85% dos conídios tenham germinado (T_{Gm}), nas várias condições de cultivo, pelas observações das tabelas A1-A24 e resumidamente na tabela 14.

LEITE (1987), estudando a germinação em *M.anisopliae*, verificou que nas linhagens da variedade *major*, a germinação é mais tardia. Portanto, podem ocorrer diferenças quanto ao tempo mínimo de germinação (T_{Gm}) dentro da mesma espécie, envolvendo variedades diferentes. Contudo, dentro de uma mesma variedade, como no caso da variedade *anisopliae* parece não ocorrer diferenças significativas. Segundo SILVA (1985), não houve diferenças significativas na porcentagem de germinação de conídios em MC para as linhagens E9 e V14, nem para seus mutantes.

Nas primeiras horas a germinação conidial pode ser representada por uma função exponencial, tomando a germinação de conídios da linhagem E9 como modelo. Na figura 3 é representado o logaritmo da porcentagem de germinação de conídios em função do tempo. No intervalo entre 5 e 8 horas foi feito um ajuste por uma reta aplicando o logaritmo neperiano.

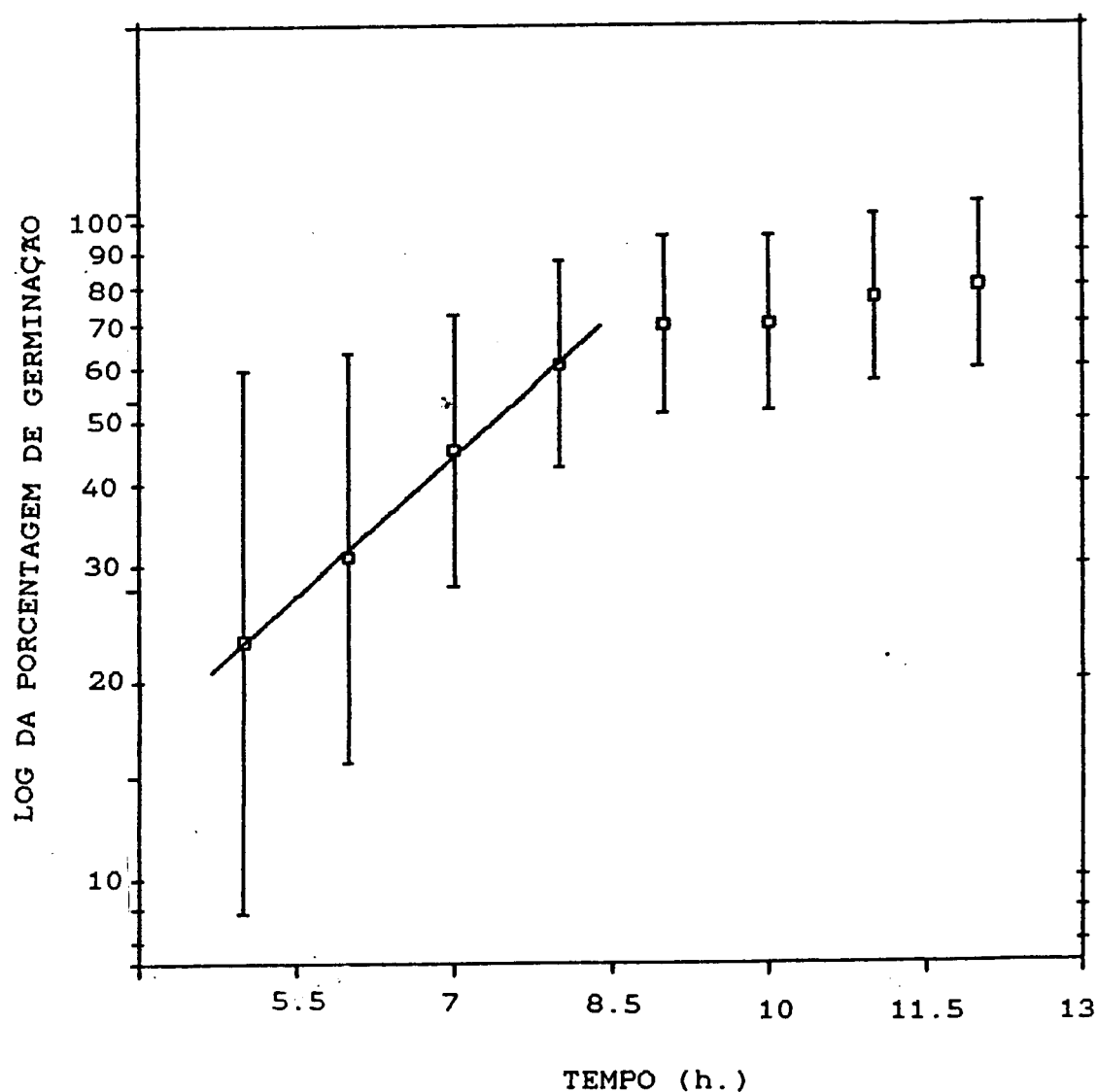


Figura 3 - Curva de germinação de conídios da linhagem E9 de

Quando os conídios de *Microspiza* são colocados em MCL, inicialmente há um aumento no volume, em mais de 50% em 6 horas, como ocorreu para a linha m. pro, conforme as tabelas 1-7. Ao estudar em conídios de *Trypoxys dinkera* em germinação, FULL & TRIACI (1971), verificaram que durante 10 horas de crescimento, o conídio aumentou 21% no diâmetro médio. Isto representa um aumento de 70% do volume e 40% da área superficial. Neste período, o conídio inicia a formação de um tubo germinativo, mas depois começa a crescer para o segundo e um terceiro tubo.

TURIAN (1985), refere que há mudanças internas e superficiais em conídios de *Microspiza*, quando eles são transferidos para a água. Há hidratação das proteínas citoplasmáticas e aumento do volume do sistema vacuolar, que contribuem para o aumento físico do conídio. Entre os principais eventos bioquímicos está a oxidação das reservas lipídicas para o principal fermentador de NAD(P)H₂. Há um aumento na atividade da oxidase citocromo e sintase citrônica, paralela ao consumo de O₂. Os ribossomos se reúnem em polissomos no conídio inativo, seguindo a ativa sintese proteica. Há uma organização estrutural no conídio para a distribuição dos materiais e organelas para o local ou locais citoplasmáticos onde haverá um prospectivo sítio de formação do tubo germinativo.

Na maioria dos fungos, a síntese de DNA total começa após o início da síntese de RNA e proteínas, mas antes ou ao mesmo tempo da emergência do tubo germinativo. Há evidências de que a síntese de proteína é obrigatória para a formação do tubo germinativo. Por exemplo; baixos níveis de cicloheximida (5 a 10 $\mu\text{g/l}$) efetivamente bloqueiam tanto a incorporação de precursores radioativos da proteína, como a formação do tubo germinativo (HOLLOMON, 1970 e INQUE & ISHIKAWA, 1970). O efeito inibidor na germinação é reversível, pois removida a cicloheximida, poucas horas depois surge o tubo germinativo. Em *M.anisopliae*, a cicloheximida inibiu a germinação de conídios nas concentrações utilizadas, segundo observações das tabelas 39-41.

Tem sido difícil determinar se a síntese de RNA é obrigatória para a germinação conidial. Já a síntese de DNA parece não ser essencial para a formação do tubo germinativo. Cerca de 40% dos conídios de *N.crassa* com tubo germinativo, tiveram síntese de DNA inibida com hidroxiurea (LDO, 1976). A observação de que síntese de DNA não é necessária para a formação de tubo germinativo, parece ser um fenômeno geral para a maioria dos fungos (VAN ETEN et alii, 1976).

A hipótese de que síntese de quitina não é requerida para iniciar a formação do tubo germinativo é suportada pela observação de que polioxina D, um inibidor competitivo de síntese de quitina não inibe a formação do tubo germinativo, mas sim sua elongação (ENDO & MISATO, 1969 e ENDO *et alii*, 1970).

5.3- Inibição da germinação de conídios

Foram utilizados vários inibidores da germinação de conídios de diversas naturezas, conforme a tabela 1. Nas concentrações utilizadas, glicerol, polietilenoglicol, m-cresol, álcool éter + alquil-sulfato de sódio e cicloheximida, retardaram a germinação em relação ao controle, conforme as tabelas 15-41. Os inibidores não inviabilizaram os conídios nas concentrações utilizadas, pois em todos os casos houve uma expressiva germinação, uma vez que os conídios foram diluídos. Em alguns casos os conídios germinaram mais sincronizadamente, diminuindo o período lag, quando depois colhidos para germinar na ausência do inibidor, isto é, apenas em meio de controle, conforme as tabelas 17, 26 e 35.

Para uma boa eficiência no estabelecimento e desenvolvimento do controle microbiológico por um fungo, é essencial que seus conídios germinem de maneira rápida e sincronizada, o que minimiza os efeitos de fatores adversos nos primeiros estágios como embebição, ação da luz ultravioleta e competição com microflora existente. Neste sentido, reveste-se de extrema importância métodos de armazenamento, formulações e pré-germinação controlada por meio de uma solução osmótica. Quanto a pré-germinação, pode-se utilizar osmocondicionadores como glicerol, álcool éter + alquil-sulfato de sódio e polietilenoglicol pelas razões expostas nas tabelas 15-41, 26 e 35. Quanto ao controle da

espera na barreira osmótica, os conídios mais lentos para germinar, tendem a alcançar os conídios mais rápidos.

O inibidor, álcool éter + alquil-sulfato de sódio é um produto que tem 50% de dispersibilidade, que pode ser útil na dispersão de conídios em trabalhos de campo. Os polietilenoglicóis são considerados mais inertes que outros solutos, entretanto os polímeros com peso molecular acima de 4000 são tão viscosos que podem interferir com o fornecimento de oxigênio. No presente trabalho, foi utilizado polietilenoglicol 4000. Glicerol pode ser considerado um bom candidato no processo de osmoregulação, uma vez que não induziu efeitos morfogênicos no fungo *M.anisopliae*. Glicerol foi considerado como o principal osmoregulador em estudos feitos por BEEVER & LARARY (1986) em *A.nidullans*. Em *N.crassa*, foi o menos tóxico segundo CHARLANG & HOROWITZ (1971). Muitos outros importantes estudos utilizando glicerol como osmoregulador em fungos têm sido feitos como os de NIEDERMEYER *et alii* (1977), ADLER *et alii* (1985) e LAERE *et alii* (1987).

Os critérios para a escolha de uma substância osmótica incluem que esta não deve ser tóxica nas condições de uso e deve evitar a germinação dos conídios sob tratamento por um período suficientemente longo, para deixá-los aptos para germinação subsequente. Para o sucesso do osmocondicionamento, há necessidade de se cuidar portanto, com o tamanho do inóculo, com o potencial osmótico, a

temperatura e a duração do tratamento. Um inóculo de 10^5 conídios/ml, um potencial osmótico em torno de 0,800 aw, uma temperatura de cerca de 10 a 20°C e um período de 3 a 4 dias, parecem ser as condições ideais. Deve ainda haver amplo suprimento de oxigênio, razão pela qual as culturas precisam ser mantidas sob aeração. Quando o trabalho se estender ao campo, as substâncias utilizadas como inibidoras, também não devem apresentar riscos aos que as manuseiam, nem ao ambiente.

Muitas hipóteses têm sido levantadas para explicar o mecanismo fisiológico do osmocondicionamento. LUARD (1982a e 1982b), reporta que os fungos filamentosos são hábeis para sobreviver e crescer em potenciais de água extremamente baixos, eles parecem manter constante ou até aumentar a turgescência sob tais condições, pela entrada ou síntese de um ou mais solutos de baixo peso molecular. Nesses estudos verificou-se que glicerol e solutos do meio parecem atuar como osmoreguladores tanto em *Penicillium chrysogenum* e *Chrysosporium fastidium*. Possivelmente o glicerol atue recolocando moléculas de água e mantendo a hidratação das proteínas. Observou-se que após um choque osmótico, houve inicialmente rápida perda de água e conseqüente diminuição do volume celular. Seguiu-se então um gradual retorno, usualmente ao volume ou turgescência inicial, dependendo do influxo de água e do aumento da concentração interna de substâncias osmoticamente ativas. Verificou-se também (1982c), que houve um aumento de prolina após um choque

hiperosmótico e diminuição após choque hipoosmótico em *Phytophthora cinnamomi*. Prolina parece substituir glicerol, como o principal soluto envolvido no ajustamento osmótico nesse fungo, concluindo então que o mecanismo de ajustamento osmótico pode variar de um fungo para outro, dependendo talvez do substrato natural que emprega e em particular da variação da taxa de carbono e nitrogênio.

BEEVER & LARACY (1986), apontaram glicerol e eritritol como os principais componentes osmoreguladores em *A.nidulans*. As mudanças no conteúdo de arabinitol indicaram que ele pode também atuar como componente osmoregulador, mas é apenas um componente secundário. Aminoácidos parecem não atuar como componentes osmoreguladores em *A.nidulans* ou em outros fungos ascomicetos, embora prolina tenha sido implicada em osmoregulação em muitos oomicetos e zigomicetos.

Além destas, outras evidências podem ser sugeridas para o mecanismo de osmoregulação como, ativação de esterases e fosfatases ácidas que participam na mobilização de reservas, aumento na capacidade de síntese de RNA e proteínas necessárias para rápida diferenciação e crescimento celular, aumento na permeabilidade de metabólitos a serem usados nos processos subsequentes de germinação e crescimento.

5.4- Número de tubos germinativos

Considerando as várias linhagens de *M.anisopliae* estudadas, há uma variabilidade natural quanto a exibição de tubos germinativos. Os resultados pareceram mostrar que as linhagens que apresentam uma velocidade maior nos primeiros estágios de germinação, têm também maior expressão de tubos germinativos nesse mesmo período, pelas evidências suportadas pelas observações das linhagens V14 e 10 em relação às demais na tabela 42.

O volume natural dos conídios, isto é, antes de serem colocados em meio de cultura, parecem não influir na produção de tubos germinativos múltiplos. Não foi possível fazer portanto uma correlação entre volume dos conídios e número de tubos germinativos. Pelas observações dos resultados apresentados por LUNA (1985), também não foi possível correlacionar, porcentagem de conídios binucleados e trinucleados e porcentagem de conídios com tubos germinativos múltiplos.

Alguns inibidores causaram efeitos morfogênicos em *M.anisopliae*, proporcionando o aparecimento de tubos múltiplos em maior número. Foram os casos de m-cresol e álcool éter + alquil-sulfato de sódio, conforme notas abaixo das tabelas 46 e 49. Os inibidores, benzeno, polietilenoglicol, glicerol, cloroformio e cicloheximida nas

concentrações utilizadas, não causaram efeitos morfológicos, após diluição. O cultivo em temperatura de 37°C por 60 horas, também não afetou este aspecto morfológico.

A substância m-cresol, além de causar inibição em *M. anisopliae*, nas concentrações utilizadas, quando os conídios eram lavados e recolocados em meio de cultura normal, sem o inibidor, apresentavam maior número de tubos ao germinarem. Os efeitos de m-cresol foram observados mesmo após 3 ciclos conidiais, produzindo assim modificações duradouras, conforme a tabela 47.

Nos experimentos que envolveram microcolônias originadas de conídios que apresentavam mais de um tubo germinativo, todos os conídios produzidos por estas colônias, não apresentaram necessariamente essa mesma característica no mesmo período. Havia conídios não germinados, germinados com 1 tubo e com 2 ou mais tubos germinativos, conforme as tabelas 51 e 52.. Estes resultados sugerem uma variabilidade natural entre os conídios quanto a germinação dentro de um determinado tempo. Repetindo o experimento (tabelas 51 e 52), mas tratando os conídios previamente com m-cresol, os conídios produzidos pelas microcolônias selecionadas, apresentaram uma proporção maior de tubos germinativos múltiplos. Os experimentos ressaltaram mais uma vez a ação duradoura do m-cresol sobre a germinação e também a característica natural da linhagem 10, que

produziu grande porcentagem de conídios com tubos germinativos múltiplos dentro de um determinado tempo.

Observando as tabelas A25-A51, notou-se que em MC, os mutantes Y5, B/vi e X/vi não apresentaram diferenças quanto ao número de tubos germinativos em relação a linhagem selvagem de origem. Já os mutantes F84nic- e F84tia-, apresentaram algumas diferenças, as quais foram mais acentuadas em F84nic-, em relação a linhagem selvagem F84. O mutante F84nic- se caracterizou por apresentar uma baixa porcentagem de germinação em 18 horas. Nos conídios que germinaram, houve predominância de um único tubo germinativo nesse tempo. Quanto aos diplóides, tendo em vista a formação dos tubos germinativos, pode-se observar que o diplóide 5 foi mais semelhante à linhagem E9 e o D5, mais semelhante a F84.

LUNA (1985), também verificou a germinação em linhagens mutantes. Pode-se inferir de seus resultados, que em geral, eles apresentam o mesmo padrão que as linhagens selvagens, embora às vezes apresente um número pouco menor de tubos germinativos, fato semelhante ao que ocorreu com os mutantes da linhagem F84. Talvez isto se deva à demora na entrada de substâncias exógenas do meio de cultura para suplementar a deficiência metabólica.

5.5-Crescimento de tubos germinativos

Quanto ao crescimento de tubos germinativos, os experimentos envolveram as linhagens E9 e 10 (tabelas 54 e 55). A linhagem E9 apresentou um crescimento maior que a linhagem 10 em 14 horas. No período entre 14 e 18 horas, a velocidade de crescimento da linhagem 10 foi maior, todavia não compensou o crescimento inicial. Outro aspecto observado foi que em 14 horas, o crescimento do 1º tubo da linhagem E9 representou cerca de 94% do crescimento total e o do 2º tubo 6%, enquanto que na linhagem 10 neste mesmo período, o crescimento do 1º tubo representou cerca de 74% do crescimento total, o do 2º tubo 26%. Em 18 horas, o crescimento do 1º tubo da linhagem E9 representou cerca de 86% do crescimento total, o do 2º tubo 13% e o crescimento do 3º tubo 1%, enquanto que o crescimento do 1º tubo da linhagem 10 neste mesmo período representou cerca de 66% do crescimento total, o do 2º tubo 30% e o crescimento do 3º tubo 4%. Talvez será útil nos próximos experimentos, tentar verificar a importância deste fato no controle microbiológico embora LEITE (1987), tenha verificado por exemplo que dentro da variabilidade natural, os conídios das linhagens V14 e 10 tenham produzido proporcionalmente mais tubos germinativos que a linhagem E9, necessariamente não apresentaram maior produção enzimática, nem maior virulência contra *Panstrongylus megistus* que a linhagem E9.

Em *M.anisopliae* , o crescimento dos tubos germinativos nas primeiras horas pareceu mostrar que é melhor representado por uma função exponencial, conforme as figuras 4 e 5 . Nas figuras é representado o logaritmo do crescimento em função do tempo. Foi feito um ajuste por reta aplicando o logaritmo neperiano.

Vários estudos em outros fungos têm mostrado que após um período de latência, o aumento da massa da colônia é muito bem representado por um modelo exponencial. Segundo QUINN & POWELL Jr (1985), alguns modelos recentemente propostos representam o crescimento do fungo baseado em componentes fisiológicos e morfológicos. Eles próprios propuseram um modelo matemático para o crescimento e esporulação em *Oidium begoniae* o qual foi construído baseado em vários modelos observados. O seu modelo pode ser usado em simulações por computadores através de um programa apresentado no appendix de seu artigo, o qual sugere-se também nos estudos do desenvolvimento em *M.anisopliae*.

McLEAN & PROSSER (1987), fizeram em 6 experimentos um interessante estudo sobre o desenvolvimento vegetativo e a taxa de extensão dos tubos germinativos, ângulos entre as ramificações e o diâmetro das hifas em vários intervalos de crescimento em *N.crassa* e sugerem uma excelente bibliografia sobre o assunto. COLE (1986), apresenta também uma excelente revisão sobre modelos de diferenciação celular em fungos. São abordados especialmente o crescimento da hifa, iniciação

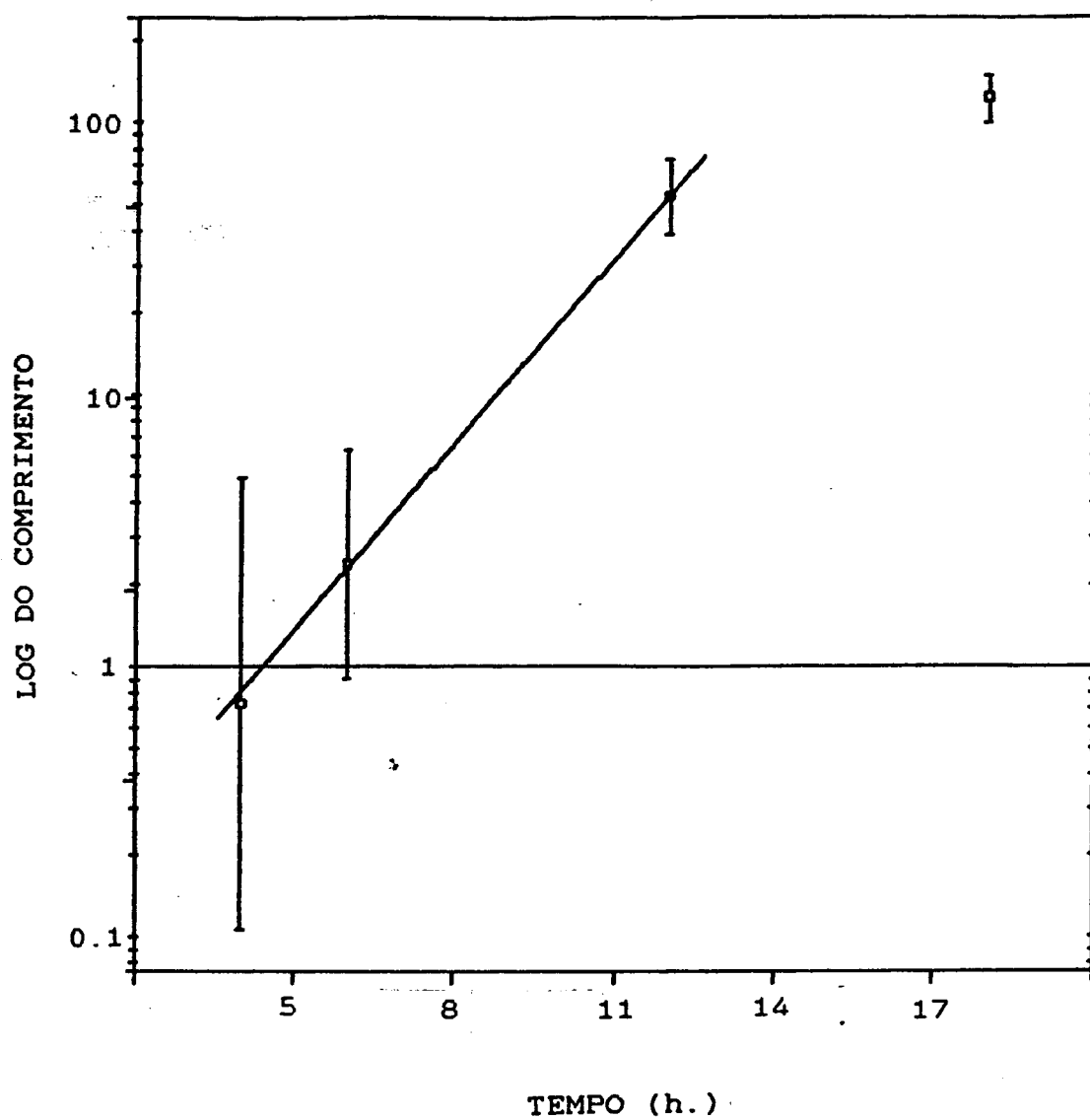


Figura 4- Curva do crescimento de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em MC, em 4, 6, 8 e 12 horas a 28°C.

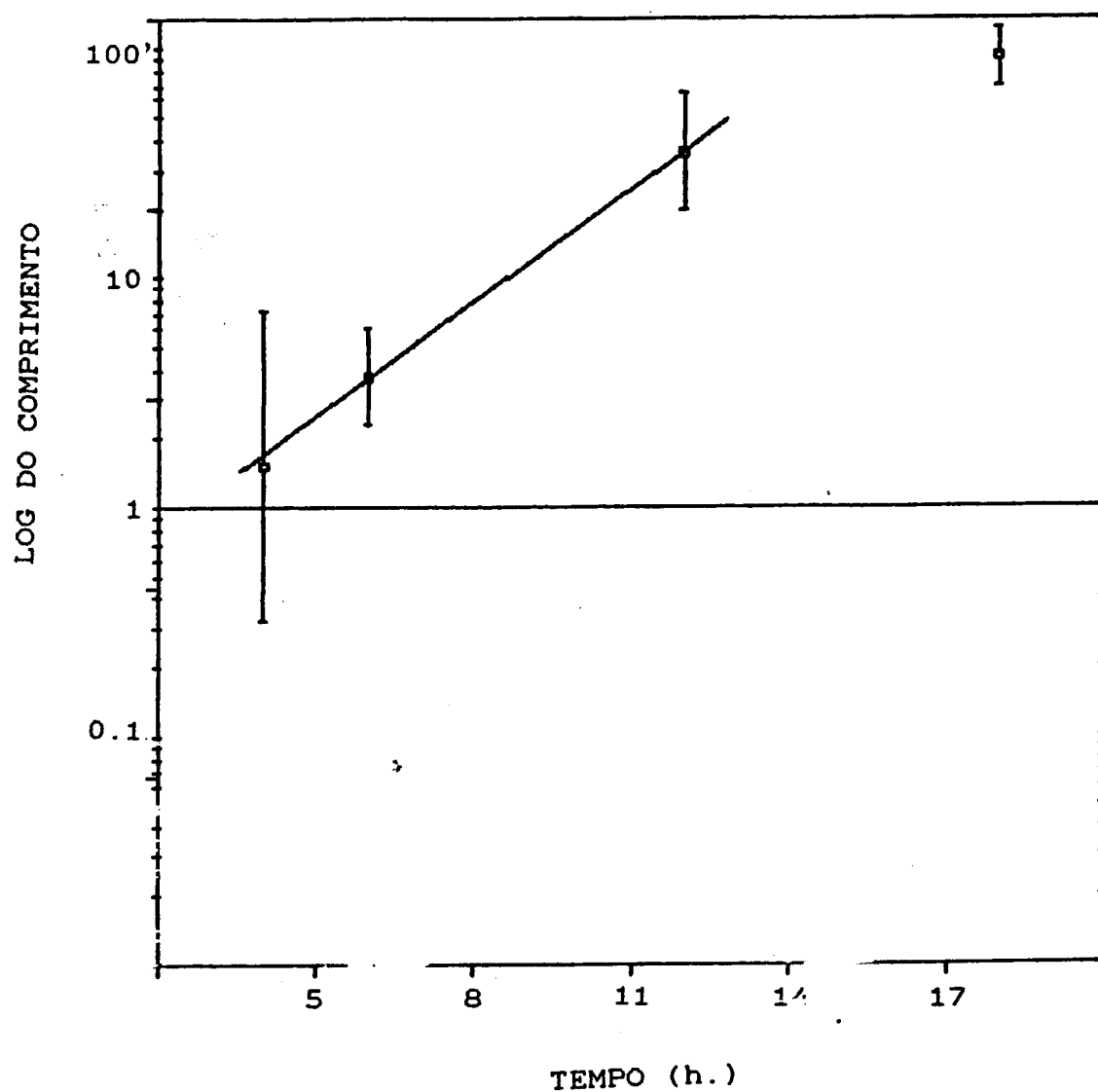


Figura 5 - Curva do crescimento de tubos germinativos de conídios da linhagem 10 de *M. anisopliae* em MC, em 4, 6, 8 e 12 horas a 28°C.

da conidiação, septação, secessão, conidiação e diferenciação da parede.

Em *M.anisopliae*, as fases do desenvolvimento compreendendo: germinação, crescimento vegetativo e conidiação, não apresentam diferenças drásticas em relação a outros fungos filamentosos. A germinação torna-se bem visível com o surgimento de um ou mais tubos germinativos. Durante esse desenvolvimento morfológico, ocorre uma série de atividades fisiológicas mediadas por enzimas que por sua vez são reguladas geneticamente. Há evidências de que fatores ambientais como temperatura, meio de cultura e outros, também influenciam o desenvolvimento desse fungo.

QUINN & POWELL Jr (1985), ao proporem um modelo matemático para o desenvolvimento de *Oidium begoniae*, afirmaram que se basearam em 3 componentes determinados geneticamente e 6 componentes que mudaram de acordo com as condições ambientais e fisiológicas. Os componentes determinados geneticamente foram: o número de tubos germinativos básicos ou principais, a unidade de crescimento da hifa (HGU) ou tamanho médio de um ramo e a periodicidade diurna de esporulação. Estes componentes não variaram, cultivando-se o fungo a 15 e 21°C. Os componentes, que variaram com a temperatura foram: O período latente de germinação, ramificação, esporulação, o tempo necessário para adquirir o último tubo germinativo e o número de conidióforos por HGU.

Em outros fungos, alguns trabalhos que procuram esclarecer melhor a questão da regulação do desenvolvimento são os de YELTON *et alii* (1983), em *A.nidulans*; AFANASIEVA *et alii* (1982) e EGASHIRA (1986), em *N.crassa*; MATSUBARA *et alii* (1981) e MATSUBARA & KURODA (1983 e 1985) em *Cochliobolus miyabeanus*; LINZ & ORLOWSKI (1987), em *Mucor recemosus*; KATAOKA *et alii* (1985), TODA *et alii* (1985), KURTZ & LINDQUIST (1986), PETKO & LINDQUIST (1986), em *S.cerevisiae*; LOOMIS & WHEELER (1982), HAMER & COTTER (1983) e PRESSE *et alii* (1986a e 1986b) , em *Dictyostelium discoideum*.

Segundo JULIANI *et alii* (1987), o conceito de diferenciação celular implica na existência de um programa genético, onde estão contidas as informações necessárias às mudanças de forma e função e que são expressas de uma maneira ordenada no tempo e no espaço. A diferenciação celular e a regulação da atividade gênica durante o desenvolvimento têm sido objeto de inúmeros estudos por parte de biólogos, mas até agora, não existe uma teoria capaz de unificar as diferentes hipóteses experimentais. A dificuldade é compreensível, dada a extrema complexidade do problema .

6-CONCLUSOES

1- O meio minimo acrescido de extrato de levedura, pode ser considerado um meio basal para a germinação e crescimento em *M.anisopliae*.

2- Conídios de *M.anisopliae*, produzidos em culturas de superficie em MM, podem perder em duas horas cerca de 50% de água por evaporação após sua colheita quando deixados em ambiente ventilado.

3- Conídios de *M.anisopliae*, produzidos em culturas de superficie em MM, quando incubados em MCL, podem aumentar seu volume em mais de 50% em 6 horas.

4- Em cerca de 12 horas, mais de 85% de conídios de *M.anisopliae*, variedade *anisopliae*, germinam, tanto em MM, MM+E ou MC, sólidos ou líquidos. Este tempo foi chamado de tempo minimo de germinação (T_{Gm}).

5- A germinação de conídios de *M.anisopliae* nas primeiras horas, pode ser representada por um modelo exponencial.

6- As concentrações de conídios em MML podem ter um efeito inibidor sobre a germinação. Uma concentração de 10^8 conídios/ml pode ser considerada como ideal em experimentos com germinação de conídios de *M.anisopliae* em meio mínimo líquido.

7- As substâncias glicerol, polietilenoglicol, m-cresol, benzeno, clorofórmio, álcool éter+alquil-sulfato de sódio e cicloheximida, inibiram a germinação de *M.anisopliae*, e em muitos casos, tornaram a germinação dos conídios mais sincronizada, diminuindo o tempo lag. O cultivo a temperatura de 37°C, também inibiu a germinação de conídios.

8- Dos inibidores testados, apenas m-cresol e álcool éter + alquil-sulfato de sódio produziram efeitos morfogênicos em *M.anisopliae*, aumentando a expressão de tubos germinativos múltiplos. Com m-cresol o efeito foi mais duradouro, persistindo por vários ciclos conidiais.

9- Há uma variabilidade natural quanto ao número de tubos germinativos de conídios de *M.anisopliae* dentro de um determinado tempo.

10- O número de tubos germinativos parece ser uma característica de cada linhagem de *M.anisopliae*, determinada geneticamente.

11- O crescimento de tubos germinativos em conídios de *M.anisopliae*, é melhor representado nas primeiras horas por um modelo exponencial.

12- Os mutantes Y5, X/vi e B/vi tiveram o mesmo padrão de germinação que a linhagem E9 de origem em MC.

13- A germinação de conídios de *M.anisopliae* e em fungos em geral, é um processo extremamente complexo, que segue um programa genético, o qual se expressa no tempo e no espaço, cuja regulação ainda carece de uma explicação mais plausível.

7- RESUMO

Estudou-se a germinação e alguns aspectos da morfologia e fisiologia de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN, utilizando-se meios de cultura de diversas composições e também substâncias inibidoras de diversas naturezas. Observou-se a formação e o crescimento de tubos germinativos em conídios de linhagens selvagens, mutantes e diplóides.

Verificou-se nos estudos iniciais que, quando os conídios de *M.anisopliae* produzidos em meio mínimo, em culturas de superfície, eram expostos a ambiente ventilado, perdiam cerca de 50 % de seu peso, pela evaporação da água em 6 horas. Verificou-se também que, quando conídios produzidos de igual modo eram inoculados em meio completo líquido, aumentavam seu volume em mais de 100 % em 6 horas.

Os estudos subsequentes mostraram que em 12 horas de incubação, mais de 85% de conídios germinaram nos vários meios testados, tanto sólidos como líquidos. Este tempo pode ser considerado como o tempo mínimo de germinação (T_{Gm}), para a variedade *anisopliae*. Os estudos também sugeriram que em meio líquido e à temperatura ambiente, uma concentração de 10⁸ conídios/ml, parece ser em algumas situações a mais indicada. Houve variabilidade quanto ao número de tubos germinativos em conídios de *M.anisopliae* num determinado

tempo. A germinação e o crescimento de tubos germinativos podem ser representados por um modelo exponencial. Considerando também os vários meios de cultura testados, o meio mínimo + extrato de levedura se mostrou um meio basal para a germinação de conídios e crescimento de colônias.

Foram ensaiadas várias substâncias inibidoras da germinação de conídios como, glicerol, polietilenoglicol, benzeno, clorofórmio, m-cresol, álcool éter + alquil-sulfato de sódio e cicloheximida, cujos efeitos permitiram em muitos casos um maior sincronismo na germinação. Algumas destas substâncias além de osmoreguladoras, também produziram efeitos morfogênicos, aumentando o número de tubos germinativos dentro de um determinado tempo. Com m-cresol, o efeito morfogênico foi mais duradouro.

Os mutantes da linhagem E9 não diferiram no modo de germinação quando comparados com a linhagem selvagem de origem, o mesmo não acontecendo com os mutantes de F84. A germinação de conídios dos diplóides, revelou cada um deles germinando de maneira diferente. O trabalho permitiu concluir que a germinação de conídios é um processo extremamente complexo, que segue um programa genético, o qual se expressa no tempo e no espaço e influenciado por diversos fatores ambientais.

8-SUMMARY

Were studied on the germination of the *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN, and several aspects the morphology and physiology, utilizing culture media of various compositions and also inhibiting substances of various natures. The formation and growth of germinative tubes were observed in conidia of wild strains, mutant and diploid.

The initial studies showed that when conidia the *M. anisopliae* produced in a minimum medium, in superficial cultures, were exposed to a ventilated environment they would loose 50% of their weight, by water evaporation in 6 hours. It was noticed also that when conidia produced in an equal manner were inoculated in a complete liquid medium they would increase their volume to more than 50% in 6 hours.

The subsequent studies showed that in 12 hours of incubation more than 85% of the conidia germinated in the various tested media, such as for solids, as for liquids. This length can be considered as the minimum time for germination (T_{Gm}), for the *anisopliae* variety. The studies also suggested that in a liquid medium at the environmental temperature, a concentration of 10^7 conidia/ml, it seems to

be in some situations the most indicated. There was variability as to the number of germinative tubes in *M. anisopliae* conidia in a determined period of time. The germination and growth of germinative tubes can be represented by an exponential model. Considering also the various tested culture media, the minimum + yeast extract demonstrated to be a basal medium for germination of conidia and growth of colonies.

Various inhibiting substances of the conidia germination were tested, as glycerol, poliethileneglycol, benzene, chloroform, m-cresol, alcohol ether + alquil-sulphate of sodium and cicloheximide, being that the effects served in many cases to increase sincronism in germination. Some of these substances, besides being osmoregulators, also produced morphogenic effects, increasing the number of germinative tubes within a certain period of time. With m-cresol the morphogenic effect lasted longer.

The mutants of strain E9 did not differ in the germination manner when compared to a wild origin, the same did not occur with the mutants F84. The germination of diploids conidia showed each one of them germinating in a different manner. It was concluded by the study that the germination of the conidia is an extremely complex process, following a genetic program, which express in time and space and it is influenced by several environmental factors.

9-BIBLIOGRAFIA

ABDEL-RAHIN, A. M. & ARBAB, H. A. Factors affecting spore germination in *Aspergillus niger*. *Mycopathologia*, 89: 75-79, 1985.

ADAMEK, L. Submerge cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). *Folia Microbiologica*, 10: 255-267, 1965.

ADLER, L; BLOMBERG, A & NILSSON, A. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*, 162: 300-306, 1985.

AFANASIEVA, T. P.; FILIPPOVICH, S. Yu.; SOKOLOVSKY, V. Yu & KRITSKY, M. S. Developmental regulation of NAD⁺ kinase in *Neurospora crassa*. *Archives of Microbiology*, 133: 307-311, 1982

AL-AIDROOS, K & ROBERTS, D. W. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increase virulence toward mosquito larvae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 20: 211-219, 1978

AL-AIDROOS, K & SEIFERT, A. M. Polysaccharide and protein degradation, germination, and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36: 29-34, 1980.

ALVES, S. B. Efeito tóxico de defensivos "in vitro" sobre patógenos de insetos. Piracicaba, ESALQ/USP, Tese de doutoramento, 66p., 1978.

ALVES, S. B. & MORAES, S. A. Influência da luz sobre o crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* (Bals.). *Ecossistema*, 4: 43-50, 1979.

ALVES, S. B.; CARVALHO, S. M. & CARVALHO, A. O. R. Avaliação da toxicidade de alguns inseticidas sobre o *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Revista de agricultura*, Piracicaba, 55: 133-138, 1980a.

ALVES, S. B.; FORTI, L. C. & CIVIDANES, J. Influence of light color on some biological activities of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin an entomogenic fungus. *Revista Brasileira de Entomologia*, 24:123-125, 1980b

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

ALVES, S. B. ; RISCO, S. H. & ALMEIDA, L. C. Influence of photoperiod and temperature on the development and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*, 97: 127-129, 1984.

ALVES, R. T. & ALVES, S. B. Determinação das exigências térmicas e hídricas do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883. In *Resumos do XI congresso Brasileiro de Entomologia , VIII Encontro de Mirmecologistas e I Encontro sobre Moscas-das-Frutas*, Campinas, Vol.I, p.242, 1987a.

ALVES, R. T. & ALVES, S. B. Utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 no controle biológico de pragas com base em climogramas. In: *Resumos do XI Congresso Brasileiro de Entomologia, VIII Encontro de Mirmecologistas e I Encontro sobre Moscas-das-Frutas*, Campinas, Vol.I, p. 243, 1987b.

ARMSTRONG, R. L.; WEST, T. P. & MAGGE, P. T. Protein synthesis in germinating *Saccharomyces cerevisiae* ascospores. *Canadian Journal of Microbiology*, 30: 345-352, 1984.

ARNOLD, K.; HERRMANN, A.; PRATSCH, L. & GAWRISCH, K. The dielectric properties of aqueous solutions of poly (ethylene glycol) and their influence on membrana structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 815: 515-518, 1985.

ARONSON, J. M. The cell wall. In: *The Fungi: An Advanced Treatise* (G. C. Ainsworth and A. S. Sussman, eds), Academic Press, New York, Vol 1: 49-76, 1965.

ARONSON, J. M. Cell wall chemistry, ultrastructure, and metabolism. In: *The Biology of Conidial Fungi*, COLE, G. T. & KENDRICK, B. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 2: 459-507, 1981.

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

AZEVEDO J. L. & MESSIAS, C. L. Tamanho de conídios em diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, 2: 5-8, 1981.

BALFOUR-BROWNE, F. L. The green muscardine diseases of insects, with special reference to an epidemic in a sward of locusts in Eritrea. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London, Series A General Entomology*, 35: 65-74, 1960.

BARNES, G. L.; BOETHEL, D. J.; EIKENBARY, R. D.; CRISWELL, J. T. & GENTRY, C. R. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. *Journal of Invertebrate Pathology*, 25: 301-305, 1975.

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

BARTINICKI-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annual Review of Microbiology, 22: 87-108, 1968.

BARTINICKI-GARCIA, S. & LIPPMAN, E. Inhibition of *Mucor rouxii* by Polyoxin D: Effects on chitin synthetase and morphological development. Journal of General Microbiology, 71: 301-309, 1972.

BARTINICKI-GARCIA, S. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. Symposium of the Society General Microbiology, 23, 245-267, 1973.

BASTOS, C. N. & MATTA, E. A. F. Influência da temperatura e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOKORIN. Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador, 15: 5-8, 1976a.

BASTOS, C. N. & MATTA, E. A. F. Influência da temperatura e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOKORIN. Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador, 15: 12-13, 1976b.

BATES, W. K. & WILSON J. F. Ethylene glycol-induced alteration of conidial germination in *Neurospora crassa*. Journal of Bacteriology, 117: 560-567, 1977.

BEEVER, R. E. & LARACY, E. P. Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 168: 1358-1365, 1986.

BETANCOURT, S.; TORRES-BAUZA, L.J. & VALLE, N. R. Molecular and cellular events during the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Micology*, 23: 207-218, 1985.

BOGUSLAWSKI, G. Effects of polymyxin B surfate and polymyxin B nonapeptide on growth and permeability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics* 199: 401-405, 1985.

BRAMBL, R. & GADE, W. Plant seed lectins disrupt growth of germinating fungal spores. *Physiologia Plantarum*, 64: 402-408, 1985.

BURNETT, J. H. & HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*; USA, Burgess Publishing Company, 90-91, 1972.

CAMARGO, L. M. C. A. & GABRIEL, D. Efeito de alguns herbicidas sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883. In: *Resumos de VI Congresso Brasileiro de Entomologia*, Campinas, 348-349, 1980.

CAMPBELL, C.K. Fine structure and physiology of conidial germination in *Aspergillus fumigatus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 393-402, 1971.

CHAFFIN, W. L. Effect of tunicamycin on germ tube and yeast bud formation in *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 131: 1853-1861, 1985.

CHARLANG, G. W. & HOROWITZ, N. H. Germination and growth of *Neurospora* at low water activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68: 260-262, 1971.

CHARLANG, G. & HOROWITZ, N. H. Membrane permeability and the loss of germination factor from *Neurospora crassa* at low water activities. *Journal of Bacteriology*, 117: 261-264, 1974.

CHARLANG, G. & WILLIAMS, N. P. Germination-defective mutant of *Neurospora crassa* that responds to siderophores. *Journal of Bacteriology*, 132: 1042-1044, 1977.

CHASE, A. R.; OSBORNE, L. S. & FERGUNSON, V. M. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Florida Entomologist* 69: 285-292, 1986.

CHAVEZ, E.; BRAVO, C. & HOLGUIN, J. A. Metabolite transport in mitochondria as a function of osmolarity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 253: 94-99, 1987.

CHENG, W. Y. & CHEN, C. B. Preliminary studies on green muscardine fungus. Report of Taiwan Sugar Experimental Station, 29: 73-83, 1962.

CHIEW, Y. Y.; SHEPHERD, M. G. & SULLIVAN, P. A. Regulation of chitin synthesis during germ-tube formation in *Candida albicans*. Archives of Microbiology, 125: 97-104, 1980.

COHEN, E.; ELSTER, I. & CHET, I. Properties and inhibition of *Sclerotium rolfsii* chitin synthetase. Pesticide science, 17: 175-182, 1986.

COLE, G. T. Conidiogenesis and conidiomatal ontogeny. In: Biology of conidial fungi COLE, G. T. & KENDRICK, B.; N. Y., Academic Press, 271-327, 1981.

COLE, G. T. Models of cell differentiation in conidial fungi. Microbiological Reviews, 50: 95-132, 1986.

COOPER, L. A. & GADD, G. M. The induction of mycelial development in *Aureobasidium pullulans* (IMI 45533) by yeast extract. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology 50: 249-260, 1984.

CORREA, G. S. Influência da radiação ultravioleta na germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no solo. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, 3: 8-9, 1982.

CORREA, G. S. Influência da radiação ultravioleta e solar na viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ-USP. Tese de Mestrado, 83p., 1983.

CORREA, G. S. Influência do herbicida Roundup na germinação e desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* na superfície do solo. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico, 5: 10-11, 1984.

CRACKOWER, S. H. B. The effects of griseofulvin on mitosis in *Aspergillus nidulans*. Canadian Journal of Microbiology, 18: 683-687, 1972.

DAOUST, R. A.; WARD, M. G. & ROBERTS, D. W. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 40: 228-236, 1982.

DAOUST, R. A. & ROBERTS, D. W. Prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of temperature and relative humidity on conidial variability and virulence against mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, 41: 143-150, 1983a.

DAOUST, R. A. & ROBERTS, D. W. Prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of growth substrate on conidial survival and virulence against mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology, 41: 161-170, 1983b.

DAOUST, R. A.; WARD, M. G. & ROBERTS, D. W. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41: 151-160, 1983.

DAOUST, R. A. & PEREIRA, R. M. Stability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on beetle-attracting tubers and cowpea foliage in Brazil. *Environmental Entomology*, 15: 1237-1243, 1986.

DAVIDSE, L. C. & FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-ylcarbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimycotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Cell Biology*, 72: 174-193, 1977.

DEANS, S. G. & SMITH, J. E. Effect of metabolic inhibitors on microcycle conidiation of *Aspergillus niger*. *Transactions of the British Mycological Society*, 72: 201-206, 1979.

DEY, P. H. & PRINSON, K. Plant cell walls. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 42: 265-339, 1984.

DILLON, R. J. & CHARNLEY, A. K. Invasion of the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* through the guts of germ-free desert locusts, *Schistocerca gregaria*. *Mycopathologia*, 96: 59-66, 1986a.

DILLON, R. J. & CHARNLEY, A. K. Inhibition of *Metarhizium anisopliae* by the gut bacterial flora of the desert locust, *Schistocerca gregaria*: Evidence for an antifungal toxin. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47: 350-360, 1986b.

DIOMANDE, T. Contribution à l'étude du développement de la muscardine verte à *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN (Fungi Imperfecti) des larves d'*Oryctes monoceros*. *Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire. Serie A, Sciences Naturelles*, 21: 1381-1405, 1969.

DOBERSKI, J. W. & TRIBE, H. T. Isolation of entomogenous fungi from Elm Bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 74: 95-100, 1980.

DOBERSKI, J. W. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37: 195-200, 1981.

DURIEZ-VAUCELLE, T.; FARGUES, J.; ROBERT, P. H. & POPEYE, R. Etude enzymatique comparée de champignons entomopathogènes des genres *Beauveria* et *Metarhizium*. *Mycopathologia*, 75: 109-126, 1981.

EBERHART, B. M. Inhibition of germ tube formation in *Neurospora*. *Journal of Bacteriology*, 130: 516-520, 1977.

EGASHIRA, T. Heterogeneity and developmental alteration of esterase isoenzymes in conidial germination of *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 132: 3473-3477, 1986

ENDO, A. & MISATO, T. Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyl-transferase in *Neurospora crassa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 37: 718-722, 1969.

ENDO, A.; KAKIKI, K. & MISATO, T. Feedback inhibition of L-glutamine D-fructose-6-phosphate aminotransferase by uridine diphosphate N-acetylglucosamine in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 103: 588-594, 1970.

EVILAKHOVA, A. Mass cultura of entomopathogenic fungi. • *Zashchita Rastenii Mask*, 11:43, 1966.

FARGUES, J. Etude des conditions d'infection des larves de Doryphores *leptinotarsa deCemlineata* say par *Beauveria bassiana* (Bals.) VUILL. (fungi Imperfecti). *Entomophaga*, 17: 319-337, 1972.

FARGUES, J. ; DURIEZ, T. ; ANDRIEV, S.; POPEYE, R. & ROBERT, P. Etude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (Delacr.) Siem, Champignon Hyphomycete entomopathogene. *Comptes Rendus Academie des Seances* Paris, Serie D, 281: 1781-1784, 1975.

FARGUES, J. Specificité des Champignons entomopathogènes imparfaits (hyphomycètes) pour les larves de Coléoptères (Scarabaeidae et Chysomelidae). *Entomophaga*, 21: 313-323, 1976.

FARGUES, J.; ROBERT, P. H. & VEY, A. Rôle du tégument et de la défense cellulaire des coléoptères hôtes dans la spécificité des souches entomopathogènes de *Metarhizium anisopliae* (Fungi Imperfecti). *Comptes Rendus Academie des Seances*, Paris, Serie D, 282: 2223- 2226, 1976.

FARGUES, J. & REMAUDIERE, G. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia*, 62: 31-37, 1977.

FARGUES, J.; DURIEZ, T.; POPEYE, R.; ROBERT, P. H. & BIGUET, J. Immunological characterization of entomopathogenic hyphomycetes *Beauveria* and *Metarhizium*. *Mycopathologia*, 75: 101-108, 1981.

FARGUES, J. F. & ROBERT, P. H. Effects of passaging through scarabeid hosts on virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 576-583, 1983.

FARGUES, P.; ROBERT, P. H. & VEY, A. Effect des destruxines A, B et dans la pathogenese de *Metarhizium anisopliae* chez les larves de coleopteres scarabeidae. *Entomophaga*, 30: 353-364, 1985.

FARKAS, V. Biosynthesis of cell walls of fungi. *Microbiological Reviews*, 43: 117-144, 1979.

FERRON, P. Etude en laboratoire des conditions écologiques favorisant le développement de la mycosé a *Beauveria tenella* du ver blanc. *Entomophaga*, 12: 257-293, 1967.

FERRON, P.; HURPIN, B. & ROBERT, P. H. Sur la spécificité de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Entomophaga*, 17: 165-178, 1972.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23: 409-442, 1978.

FINKELMAN, M. A. J. & VARDANIS, A. Synthesis of β -glucan by cell-free extracts of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 123-127, 1987.

GEMMA, J. N.; WASTI, S. S. & HARTMANN. Antagonism of entomogenous fungal extracts to the Dutch elm disease fungus, *Ceratocystis ulmi*. *Journal of the New York Entomological Society*, 93: 1109-1112, 1985.

GOODAY, G. W. Biosynthesis of the fungal Wall-machanisms and implications. *Journal of General Microbiology*, 99:1-11, 1977.

GOODAY, G. W. & TRINCI, A. P. J. Wall structure and biosynthesis in fungi. In: *The eukaryotic microbial cell*, GOODAY, G. W.; LLOYD, D. & TRINCI, A. P. J., LONDON, Combridge University Pres, 207-251, 1980.

GOPAL, P. K.; SULLIVAN, P. A. & SHEPHERD, M. G. Enzymes of n-acetylglucosamine metabolism during germ-tube formation in *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 128: 2319-2326, 1982.

GRIFFIN, D. M. Water and microbial stress. *Advances in Microbial Ecology* 5: 91-136, 1981.

GRUNER R. L. Sensibilisation des larves de *Phyllophaga pleei* BL. et de *P. patrueloides* FA. (Coleoptera: Scarabaeidae) à la micose à *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin au moyen d'une faible dose d'inseticide au d'un autre agent infectieux. *Annales de zoologie-Ecologie Animale*, Paris, 5: 335-349, 1973.

GULL, K. & TRINCI, A. P. J. Fine structure of spore germination in *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*, 68: 207-220, 1971.

HALL, R. Physiology of conidial fungi. In: *Biology of conidial fungi*, vol. 2., COLE, G. T. & KENDRICK, B. 417-457, 1981.

HAMER, J. E. & COTTER, D. A. The timing of ribonucleic acid synthesis during the germination of heat-activated *Dictyostelium discoideum* spores. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 1390-1398, 1983.

HAMMIL, T. M. Electron microscopy of phialoconidiogenesis in *Metarhizium anisopliae*. *American Journal of Botany*, 59: 317-326, 1972.

HAMMIL, T. M. Additional electron microscopy of phialoconidiogenesis in *Metarhizium anisopliae*: microtubules in phialidic necks. *Mycologia*, 69: 1058-1061, 1977.

HAMMIL, T. M. Conidiogenesis. In: *The fungal spores: morphogenetic controls*, TURIAN, G. & HOHL, T. R. ; London, Academic Press, 151-171, 1981.

HAROLD, M. F. Antimicrobial agents and membrane function. *Advances in Microbial Physiology*, 4: 45-104, 1970.

HOLLOMON, D. W. Ribonucleic acid synthesis during fungal spore germination. *Journal of General Microbiology*,

HOROWITZ, N. H.; CHARLANG, G.; HORN, G. & WILLIAMS, N. P. Isolation and identification of the conidial germination factor of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 127:135-140, 1976.

HOWARD, R. J. & AIST, J. R. Effects of MBC on hyphal tip organization, growth, and mitosis of *Fusarium acuminatum*, and their antagonism by D20. *Protoplasma*, 92: 195-210, 1977.

HOWARD, R. J. & AIST, J. R. Cytoplasmic microtubules and fungal morphogenesis: ultrastructural effects of methyl benzimidazole-2-ylcarbamate determined by freeze-substitution of hyphal tip cells. *Journal of Cell Biology*, 87:55-64, 1980.

HUBER, J. Untersuchungen zur physiologie insektentotender pilze. *Archiv fuer Mikrobiologie*, 29: 257-265, 1958.

HUXHAM, I. M. & LACKIE, A. M. A simple visual method for assessing the activation and inhibition of phenoloxidase production by insect haemocytes in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 94: 271-277, 1986.

IGNOFFO, C. M.; MAC INTOSH, A. H.; GARCIA, C.; KROHA, M. & JOHNSON, J. M. Effects of successive in vitro and in vivo passages on the virulence of entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Entomophaga*, 27: 371-378, 1982.

IMSHENETSKII, A. A.; LYSENKO, S. V.; KOZLOVA, T. M. & DEMINA, N. S. Effect of dehydration on survival; morphology and ultrastructure of the conidia of atmospheric and collection strains of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Mikrobiologiya*, 53: 489-494, 1984.

INDI, S.; WAKLEY, G. & STEBBINGS, H. Effects of glycerol and freezing on the appearance and arrangement of microtubules in three different systems: A freeze-substitution study. *Tissue & Cell*, 18, 331-339, 1986.

INGRAM, M. Micro-organisms resisting high concentrations of sugars or salts. *Symposium of the Society General Microbiology*, 7: 90-133, 1957

INOUE, H. & ISHIKAWA, T. Macromolecule synthesis and germination of conidia in temperature sensitive mutants of *Neurospora crassa*. *Japanese Journal of Genetics*, 45: 357-369, 1970.

ITO, E. T.; CIHLAR, R. L. & INDERLIED, C. B. Lipid synthesis during morphogenesis of *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology*, 152: 880-887, 1982.

JACOBS, C. W.; ROBERTS, R. L. & SZANISZLO, P.J. Reversal of multicellular-form development in a conditional morphological mutant of the fungus *Wangiella dermatitidis*. *Journal of General Microbiology*, 131: 1719-1728, 1985.

JULIANI, M. H.; GOMES, S. L. J.; MAIA, C. C. *Genética molecular do desenvolvimento em microorganismos*. In: *Genética Molecular e de Microorganismos*, COSTA, S. O. P., São Paulo, Editora Manole LTDA, 449-468, 1987.

KATAOKA, T.; POWERS, S.; CAMERON, S.; FUSANO, O.; GOLDFARB, M. BROACH, J. & WIGLER, M. Functional homology of mammalian and yeast Ras genes. *Cell*, **40**, 19-26, 1985.

KERWIN, J. L. Chemical control of the germination of asexual of *Entomophthora culicis*, a fungus parasitic on dipterans. *Journal of General Microbiology*, **128**: 2179-2186, 1982.

KINSKY, S. C. Alterations in the permeability of *Neurospora crassa* due to polyene antibiotics. *Journal of Bacteriology*, **82**: 889-897, 1961.

KINSKI, S. C. Effect of polyene antibiotics on protoplasts of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, **83**: 351-358, 1962a.

KINSKY, S. C. Nystatin binding by protoplasts and a particulate fraction of *Neurospora crassa*, and a basis for the selective toxicity of polyene antifungal antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **48**: 1049-1056, 1962b.

KUCERA, M. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria Mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 35: 304-310, 1980.

KUCERA, M. Partial purification and properties of *Galleria mellonella* larvae, proteolytic inhibitors acting on *Metarhizium anisopliae*, toxic protease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 43: 190-196, 1984

KURTZ, S. & LINDQUIST, S. Subcellular differentiation in sporulating yeast cells. *Cell*, 45: 771-779, 1986.

LAERE, A. V.; FRANÇOIS, A.; OVERLOOP, K.; VERBEKE, M. & GERVEN, L. V. Relation between germination, trehalose and the status of water in *Phycomyces blakesleeianus* spores as measured by proton-NMR. *Journal of General Microbiology*, 133: 239-245, 1987.

LAL, R. & SAXENA, D. M. Accumulation, metabolism and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiological Reviews*, 46: 95-127, 1982.

LATCH, G. C. M. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN, strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8: 384-396, 1965.

LEITE, B. Variabilidade de linhagens de *Metarhizium anisopliae* quanto a atividade enzimática, resistência a luz ultravioleta e virulência ao vetor da doença de Chagas *Panstrongylus megistus*. CAMPINAS, unicamp. Tese de Mestrado, 140p, 1987

LESTER, G. Inhibition of growth, synthesis and permeability in *Neurospora crassa* by phenethyl alcohol. *Journal of Bacteriology*, 90: 29-37, 1965.

LEVI, M.; SACCO, G. & TREZZI, F. Cellular events in growth and germination of giant conidia of *Neurospora crassa*. *European Journal of Cell Biology*, 22: 661-666, 1980.

LIHNELL, D. Grönmykos förarskeo au *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. II Fysiologiska undersökningar över grönmykoseus suamp. Ktat Vaxtskyodsanst, Ktockholm Meddel 43:59-90, 1944.

LINZ, J. E. & ORLOWSKI, M. Regulation of gene expression during aerobic germination of *Mucor racemosus* sporangiospores. *Journal of General Microbiology*, 133: 141-147, 1987.

LOO, M. Some required events in conidial germination of *Neurospora crassa*. *Developmental Biology*, 54: 201-213, 1976.

LOOMIS, W. F. & WHEELER, S. A. Chromatin-associated heat shock proteins of *Dictyostelium*. *Developmental Biology*, 90: 412-419, 1982.

LUARD, E. J. Accumulation of intracellular solutes by two filamentous fungi in response to growth at low steady state osmotic potential. *Journal of General Microbiology*, 128: 2563-2574, 1982a.

LUARD, E. J. Effect of osmotic shock on some intracellular solutes in two filamentous fungi. *Journal of General Microbiology*, 128: 2575-2581, 1982b.

LUARD, E. J. Growth and accumulation of solutes by *Phytophthora cinnamoni* and other lower fungi in response to changes in external osmotic potential. *Journal of General Microbiology*, 128: 2583-2590, 1982c.

LUGLI, J. & MESSIAS, C. L. Obtenção de mutantes de *Metarhizium anisopliae*. IN: Resumos SBG- 8ª Reunião de Genética de Microorganismos, Belo Horizonte, 14p, 1981.

LUGLI, J. & MESSIAS, C. L. Parassexualidade em diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae*. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, 3: 15-16, 1982.

LUNA, E. A. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN. Rio de Janeiro, UFRJ, Tese de Doutorado, 260p., 1985.

MACH, B. & SLAYMAN, C. W. Mode of action of tyrocidine on *Neurospora*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 124: 351-361, 1966.

MAC LEAN, K. M. & PROSSER, J. I. Development of vegetative mycelium during colony growth of *Neurospora crassa*. *Transactions of the British Mycological Society*, 88: 489-495, 1987.

MADELIN, M. F. Fungal parasites of invertebrates. I. Entomogenous fungi. In: *The Fungi*. AINSWORTH, G. C. & SUSSMAN, A. S. Eds. 3: 227-238. N. Y., Academic Press, 1968

MAGALHAES, B. P.; LEITE, L. G.; QUINTELA, E. D.; SANTOS, S. M. & ROBERTS, D. W. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, produzidos em diferentes substratos, sobre *Ceratomyxa arcuata*. In: *Resumos do XI Congresso Brasileiro de Entomologia, VIII encontro de Mirmecologistas e I Encontro sobre moscas-das-frutas*, Campinas, Vol. I, 187, 1987.

MARCHIONATTO, J. B. Nota sobre "la muscardina verde" *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Revista de História Natural*, 43: 12-14, 1942.

MARTIN, J. F. & NICOLAS, G. Physiology of spore germination in *Penicillium notatum* and *Trichoderma lignorum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 55: 141-148, 1970.

MASERA, E. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin a parasita del baco da seta. *Annali della Sperimentazione Agraria*, 11: 281-295, 1957.

MATSUBARA, M.; FURUYA, S. & KURODA, H. Physiological and biochemical studies on germinating fungal spores. V. Partial purification and characterization of trehalase in conidia of *Cochliobolus miyabeanus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 3723-3726, 1981.

MATSUBARA, M. & KURODA, H. Physiological and biochemical studies on germinating fungal spores. VI. Functional polysaccharide as an endogenous substrate in germinating conidia of *Cochliobolus miyabeanus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31: 2371-2377, 1983.

MATSUBARA, M. & KURODA, H. Physiological and biochemical studies on germinating fungal spores. VII. Chemical composition of cell walls in conidia of *Cochliobolus miyabeanus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 33: 1175-1180, 1985.

MATTA, E. A. F. & OLIVEIRA, M. Z. A. Efeito do inseticida malatol 50E no crescimento do fungo *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin, "in vitro". *Comunicado Técnico EPABA*, Salvador, 11, Sp., 1978.

MENDONÇA, A. F. & COSTA, L. C. C. Rendimento da linhagem PL191 de *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes substratos. In: Resumos do XI Congresso Brasileiro de Entomologia, VIII Encontro de mirmecologistas e I Encontro sobre moscas-das-frutas, Campinas, Vol.I, 248, 1987.

MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L.; De CONTI, E. & SOUZA, H. M. L. Aspectos biológicos e indução de mutantes em *Metarhizium anisopliae*. In: Resumos do III Congresso Latino-Americano de Entomologia, V Congresso Brasileiro de Entomologia, Salvador Bahia, 69p, 1978.

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

MESSIAS, C. L.; ROBERTS, D. W. & GREFIG, A. T. Pyrolysis-gas chromatography of the fungus *Metarhizium anisopliae*. An aid to strain identification. *Journal of Invertebrate Pathology*, 42: 393-396, 1983.

MESSIAS, C. L.; PUPIN, A. M. & DESTEFANO, R. H. R. Ácidos graxos e proteínas totais e sua utilização na caracterização de linhagens de *Metarhizium anisopliae*. In: Resumos XI Congresso Brasileiro de Entomologia, VIII. Encontro de mirmecologistas e I Encontro sobre moscas-das-frutas, Campinas, Vol.I, 249, 1987.

MIKHAILOVA, M. V.; FEOFILOVA, E. P.; ROZANTESEV, E. G.;
ARKHIPOVA, G. V. & SHIROKOVA, E. A. Influence of
cycloheximide and actinomycin D on the content of
phospholipids and neutral lipids of *Cunninghamella japonica*.
Mikrobiologiya, 53: 816-821, 1984.

MOOS, M. O. & BADI, F. Effect of rubratoxin B on
growth, metabolism and morphology of *Aspergillus niger*.
Transactions of the British Mycological Society, 74: 1-11,
1980.

MORRIS, G. J.; WINTERS, L.; COULSON, G. E. & CLARKE, K.
J. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and
viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of*
General Microbiology, 129: 2023-2034, 1983.

MOURA COSTA, M. D. & MAGALHAES, C. D. Um novo meio de
cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae*.
(Metsch.) Sorokin, parasita de cigarrinha das pastagens.
Boletim do Instituto Biológico da Bahia, 13: 57-60, 1974.

MULLER-KOGLER, E. A. Nebenwirkungen insektenpathogener
Pilze auf Mensch und Wirbeltiere: Aktuelle Fragen.
Entomophaga, 12: 429-441, 1967.

NAKASHIMA, H. Effects of respiratory inhibitors on
respiration, ATP contents, and the circadian rhythm of
Neurospora crassa. *Plant Physiology*, 76: 612-614, 1984.

NEWTON, B. A. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological Reviews*, 20: 14-27, 1956.

NIEDERMEYER, W.; PARISH, G. R. & MOOR, H. Reactions of yeast cells to glycerol treatment alterations to membrane structure and glycerol uptake. *Protoplasma*, 92: 177-193, 1977.

PERSSON, M.; HALL, L. & SODERHALL, K. Comparison of peptidase activities in some fungi pathogenic to arthropods. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44: 342-348, 1984.

PETKO, L. & LINDQUIST, S. Hsp 26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell*, 45: 885-894, 1986.

PIZZIRANI-KLEINER, A. A. & AZEVEDO, J. L. Characterization and genetical analysis of an *Aspergillus nidulans* strain that produces multinucleate conidia. *Transactions of the British Mycological Society*, 86: 123-130, 1986.

PONTECORVO, G., ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D. & BUFTON, W. F. C. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5: 141-238, 1953.

PRESSE, F.; BOGDANOVSKY-SEQUEVAL, D.; MATHIEU, M. & FELENBOK, B. Structural analysis a cysteine proteinase in *Dictyostelium discoideum*. *Molecular General Genetics*. 203: 324-332, 1986a.

PRESSE, F.; BOGDANOVSKY-SEQUEVAL, D.; MATHIEU, M. & FELENBOK, B. Analysis of the expression of two genes of *Dictyostelium discoideum* which code for developmentally regulated cysteine proteinases. *Molecular & General Genetics*, 203: 333-340, 1986b.

PUPIN, A. M.; MESSIAS, C. L. & ROBERTS, D. W. The use of fatty acids as an aid in the identification of *Metarhizium anisopliae*. *Society for Invertebrate Pathology. XVII Annual Meeting*, 66p., 1984.

QUINN, J. A. & POWELL Jr, C. C. Growth and sporulation of *Oidium begoniae*: development of a deterministic model. *Annals of Applied Biology*, 107: 163-178, 1985.

RAGA, A.; BATISTA FILHO, A.; WATANABE, K.; MACHADO, L. A.; CRUZ, B. P. B. & SUPLICY FILHO, N. Observações sobre o comportamento de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, cultivados em diferentes meios de cultura, sobre populações de *Cosmopolites sordidus* no campo. In: *Resumos do XI Congresso Brasileiro de Entomologia, VIII Encontro de Mirmecologistas e I Encontro sobre moscas-das-frutas*, Campinas, Vol. I, 192, 1987.

RAMARAJE, N. V. U.; GOVINDU, M. C. & SHASTRY, K. S. S.
The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi
Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of*
Invertebrate Pathology, 9: 398-403, 1967.

RAPPORT, A. I. & BEKER, M. E. Changes in the surface
charge of yeast cells during their dehydration and
rehydration. *Mikrobiologiya*, 54: 450-453, 1985.

RIBA, G.; BOUVIER-FOURCADE, I. & CAUDAL, A. Isoenzymes
polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina:
Hyphomycetes) entomogenous fungi. *Mycopathologia*, 96: 161-
169, 1986.

ROBERTS, D. W. Coelomyces, Entomophthora, Beauveria,
and Metarhizium as parasites of mosquitoes. *Miscellaneous*
Publications of Entomological Society of America, 7:
140-155, 1970.

ROBERT, A. & AL-AIDROOS, K. M. Acid production by
Metarhizium anisopliae: Effects on virulence against
mosquitoes and on detection of in vitro amylase, protease,
and lipase activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 45:
9-15, 1985.

ROBERTS, D. W. & CAMPBELL, A. S. Stability of
entomopathogenic fungi. *Miscellaneous Publications of the*
Entomological Society of America, 10: 19-76, 1977.

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

SANTOS, A. L. L. Influência de alguns fatores no
crescimento, germinação e produção de conídios de
Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin. Piracicaba,
ESALQ/USP. Tese de Mestrado, 148p, 1978.

SCHMIT, J. C.; FAHEY, R. C. & BRODY, S. Initial
biochemical events in germination of *Neurospora crassa*
conidia. In: *Spores. VII- American Society for*
Microbiology. GERHARD, P.; COSTILOW, R. N. & SADOFF, H. L.,
112-119, 1975.

SCHMIT, J. C. & BRODY, S. Biochemical genetics of
Neurospora crassa conidial germination. *Bacteriological*
Reviews, 40: 1-41, 1976.

SCHMIDT, E. L. Aliphatic acids as spore germination
inhibitors of wood-decay fungi in vitro. *Canadian Journal of*
Botanic, 63: 337-339, 1985.

SHABEL, H. G. Percutaneous infection of *Hylobius pales*
by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate*
Pathology, 27: 377-383, 1978.

SHEPHERD, M. G.; YIN, C. Y.; RAM, S. P. & SULLIVAN, P. A. Germ-tube induction in *Candida albicans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 26: 21-26, 1980.

SILVA, J. C. Virulência de mutantes ezoenzimáticos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e seus revertentes a *Rhodnius prolixus*. Campinas, UNICAMP, Tese de Doutorado, 161p., 1985.

SILVA, J. C. & MESSIAS, C. L. Virulence of and revertantes of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* toward *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48: 368-374, 1986.

SILVEIRA, W. D. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ-USP, Tese de Mestrado 153p, 1983.

SILVEIRA, N. S. S. Utilização de milho no cultivo em larga escala do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. In: Resumos de XI Congresso Brasileiro de Entomologia, VII Encontro de Mirmecologistas e I Encontro sobre moscas-das-frutas. Campinas, Vol. I, 250, 1987.

SINGER, S. J. The molecular organization of membranes. *Annual Review of Biochemistry* 43: 805-833, 1974.

STENLID, J. & HAGGABLOM, P. Macromolecular synthesis in germinating conidia and basidiospores of *Heterobasidion annosum*. Transactions of the British Mycological Society, 84: 227-234, 1985.

ST-LEGER, R. J. ; COOPER, R. M. & CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. Journal of Invertebrate Pathology, 47: 167-177, 1986a.

ST LEGER, R. J. ; CHARNLEY, A. K. & COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. Journal of Invertebrate Pathology, 47: 295-302, 1986b.

ST LEGER, R. J. ; CHARNLEY, A. K. & COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. Journal of Invertebrate Pathology, 48: 85-95, 1986c

ST LEGER, R. J. ; CHARNLEY, A. K. & COOPER, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 253: 221-232, 1987.

SULLIVAN, P. A. & SHEPHERD, M. G. Gratuitous induction by N-acetylmannosamine of germ-tube formation and enzymes for N-acetylglucosamine utilization in *Candida albicans*. Journal of Bacteriology, 151: 1118-1122, 1989.

SWARD, R. J. The structure of the spores of *Gigaspora margarita*. II. Changes accompanying germination. *New Phytol*, 88: 661-666, 1981.

TERENZI, H. F. & STORCK, R. Stimulation of fermentation yeast-like morphogenesis in *Mucor rouxii* by phenethyl alcohol. *Journal of Bacteriology*, 97: 1248-1261, 1969.

TINLINE, R. D. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, 63: 713-721, 1971.

TODA, T.; UNO, I.; ISHIKAWA, T.; POWERS, S.; KATAOKA, T.; BROEK, D.; CAMERON, S.; BROACH, J.; MATSUMOTO, K.; & WIGLER, M. In yeast, Ras proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*, 40: 27-36, 1985.

TRABULSI, L. R. *Microbiologia*. Livraria Atheneu, R. J., 355p, 1986.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66: 407-411, 1976.

TURIAN, G. Polarizing processes for germ tube outgrowth from monilioid fungal spores (*Neurospora* conidial model). *Proceedings of the Indian Academy of Sciences Plant Sciences*, 94: 165-173, 1985.

UBUKATA, M.; URAMOTO, M.; UZAWA, J. & ISONO, K. Structure and biological activity of neopeptins A, B and C, inhibitors of fungal cell wall glycan synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 257-265, 1985.

UYEDA, M. IKEDA, A.; MACHIMOTO, T. & SHIBATA, M. Effect of validamycin on production of some enzymes in *Rhizoctonia solani*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49: 3485-3491, 1985.

URS, R. N. V.; GOVINDU, H. C. & SHASTRY, K. S. S. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9: 398-403, 1967.

UTZ, J. P. Agentes antifúngicos. In: *Terapia Antimicrobiana*, KAGAN, B. M. Ed. interamericana, R.J. 138-144, 1982.

VAN ETEN, J. L.; DUNCLE, L.D. & KNIGHT, R. H. Nucleic acids and fungal spore germination. In: *The Fungal Spore: form and function*, WEBER, D. J. & HESS, W. M. N.YORK, JOHN WILEY & SONS, 243-300, 1976.

VANNINI, G. L. & BONORA, A. Phosfon D-membrane interaction in *Rhodotorula glutinis*: a possible mechanism of action of the growth retardant. *Cytobios*, 43: 7-21, 1985.

VENN, K. H. Oral infection of second instar nymphs of *Schistocerca gregaria* by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9: 276-278, 1966.

VEEN, K. H. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9: 276-278, 1967.

VEEN, K. H. Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Mendelingem, Nederland*, 68: 1-77, 1968.

VEY, A.; FARGUES, J. & ROBERT, P. H. Histological and ultrastructural studies of factors determining the specificity of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. for scarabeid larvae. *Entomophaga*, 27: 387-397, 1982.

VILLACORTA, A. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolamentos de *Metarhizium anisopliae*, Sorok. In: Resumos do Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia, 70p, 1978.

ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae. I. Dormant and germinating conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15: 63-80, 1970a.

ZACHARUK, R. Y. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae. II. Conidial germ tubes and appressoria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15: 81-91, 1970b.

YELTON, M. M.; HAMER, J. E.; SOUZA, E. R.; MULLANEY, E. J. & TIMBERLAKE, W. E. Developmental regulation of the *Aspergillus nidulans* trp C gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 7574-7580, 1983.

10- APENDICE

Tabela A1- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML, sob agitação, à temperatura ambiente em diversos tempos e concentrações.

Tempos/ Conc.	7		8		9		10		11		12		%G
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	
10 ⁷	8	120	15	120	30	143	48	137	45	99	64	90	22,9
10 ⁶	24	60	24	51	27	59	54	15	61	10	105	10	59,0
10 ⁵	51	57	30	40	37	2	45	2	125	2	100	1	78,9
10 ⁴	16	44	17	40	105	17	52	4	93	5	95	2	77,1
10 ³	10	40	15	40	45	15	40	5	69	3	73	1	70,8
10 ²	6	30	10	32	36	10	31	4	60	2	69	1	72,9
%G	24,7		25,6		53,2		61,8		78,9		82,8		

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A2- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de *M. anisopliae* em MML sob agitação a temperatura ambiente em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Concentrações	5	5937,62	1187,52	20,54**
Tempos	5	11287,29	2257,46	39,04**
Resíduo	25	1445,61	57,82	
Total	35	18670,52		

** significativo ao nível de 1%

7h---→ 28,5

8h---→ 31,4 85%-----→ 67,2 ± 23,3

9h---→ 54,3

10h--→ 64,4

Portanto, tempo mínimo de germinação,

11h--→ 68,6

(TGm) = 11horas.

12h--→ 74,2

Tabela A3- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MCL, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.

Tempos/ Conc.	6h		7h		8h		9h		10h		11h		%G
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	
10 ⁷	59	59	100	90	120	115	91	36	117	24	110	15	64,1
10 ⁶	54	60	113	33	242	80	130	63	91	27	126	16	73,0
10 ⁵	128	89	73	49	120	82	326	117	170	66	208	32	70,2
10 ⁴	79	62	80	49	119	62	136	61	98	45	50	10	66,0
10 ³	39	19	42	30	27	17	28	14	22	6	53	12	68,3
10 ²	42	25	39	30	32	18	30	15	29	8	52	10	67,9
%G	56,1		61,4		64,1		70,8		75,0		86,3		

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A4- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MCL, sob agitação à temperatura ambiente em diversos tempos e concentrações (após transformação arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Concentrações	5	46,27	9,25	0,59 NS
Tempos	5	1419,44	283,89	18,04 **
Resíduo	25	393,44	15,74	
Total	35	18,59		

NS= Não significativo ** significativo ao nível de 1%

6h-----→ 49,09

7h-----→ 51,55 85%-----→ $67,2 \pm 7,29$

8h-----→ 52,65

9h-----→ 56,29

10h-----→ 60,95 Portanto, tempo mínimo de germinação,

11h-----→ 67,58 (TGM)= 11 horas.

Tabela A5- Germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MML sob agitação, a temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.

Tempos/ Conc.	5h		7h		9h		10h		11h		12h		%G
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	
10 ⁷	0	100	3	100	5	96	17	129	51	48	64	27	22,0
10 ⁶	0	100	1	100	6	94	10	90	29	32	101	24	25,0
10 ⁵	0	100	2	81	5	45	28	120	48	41	99	6	31,7
10 ⁴	0	100	1	23	5	75	10	100	37	38	54	5	23,9
10 ³	0	100	0	100	8	20	48	38	43	35	67	6	35,7
10 ²	0	100	0	60	6	10	8	90	39	30	93	2	33,3
%G	0,0		1,5		9,4		17,6		52,4		87,2		

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não Germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A6- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MML sob agitação à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F
Concentrações	5	469,92	93,98	0,87 NS
Tempos	5	20957,81	4191,56	38,92 **
Resíduo	25	2692,46	107,70	
Total	35	24120,19		

NS= Não significativo ** significativo ao nível de 1%

5h----> zero

7h----> 6,0 85,0%----> 67,2 $\pm$ 25,1

9h----> 21,7

10h---> 24,4

11h---> 46,3

12h---> 70,9

Portanto, tempo mínimo de germinação,
(TGm) = 12 horas.

Tabela A7- Germinação de conídios da linhagem *Pegro* de *M.anisopliae* em MCL, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.

Tempos/ Conc.	5h		7h		9h		10h		
	G	N	G	N	G	N	G	N	%G
10^7	2	127	58	42	95	15	122	19	57,7
10^6	1	107	47	42	98	2	146	2	65,5
10^5	0	70	60	40	88	12	145	1	70,4
10^4	0	60	44	46	105	4	213	8	75,4
10^3	0	50	50	50	83	17	107	3	66,7
10^2	0	30	19	21	18	23	212	4	76,2
%G	0,7		53,5		87,0		96,2		

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A8- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MCL, sob agitação à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SS	QM	F
Concentrações	5	357,90	71,58	1,14 NS
Tempos	3	21005,45	7001,82	11,69 **
Resíduo	15	940,35	62,69	
Total	23	22303,69		

NS= Não significativo

** significativo ao nível de 1%

5h----> 2,1

7h----> 46,6 85,0%-----> 67,2 ± 31,1

9h----> 67,7

10h---> 79,8

Portanto, tempo mínimo de germinação,

(TGm)= 9 horas.

Tabela A9- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MM sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos.

Tempos/ Campos	5h		6h		7h		8h		9h		10h		11h		12h	
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N
1	0	13	3	50	1	10	3	1	2	4	22	9	10	3	30	4
2	0	2	4	55	1	8	1	8	2	10	30	10	9	0	15	1
3	1	11	4	50	3	18	3	5	7	11	23	9	18	4	24	0
4	0	14	4	50	2	10	4	10	10	13	25	10	26	3	18	1
5	0	2	5	74	2	12	0	2	6	16	32	16	18	9	20	1
6	0	8	4	71	4	26	6	9	9	18	37	8	20	5	10	1
7	0	3	4	51	4	18	3	51	7	18	33	10	42	9	13	2
8	0	3	2	60	7	17	5	13	12	18	29	11	50	7	13	1
9	0	1	1	18	6	22	3	9	14	25	39	10	14	2	6	1
10	1	10	4	46	9	15	5	12	11	21	36	10	9	4	4	0
VG	2,9		6,3		20,0		21,1		34,2		74,8		80,9		92,7	

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A10- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MM sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	QM	SQ	F
Campos	9	836,46	92,94	1,43 NS
Tempos	7	47500,05	6785,72	104,42 **
Residuo	63	4093,91	64,98	
Total	79	52430,43		

NS= Não significativo ** significativo ao nível de 1%

5h-----> 3,4

6h-----> 14,4

7h-----> 25,0 85,0%-----> 67,2 ± 25,7

8h-----> 29,7

9h-----> 35,0 Portanto, tempo mínimo de germinação,

10h-----> 59,8 (TGM)= 12 horas.

11h-----> 66,6

12h-----> 76,3

Tabela A11- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MC sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos.

Tempos/ Campos	5h		6h		7h		8h		9h		10h		11h		12h	
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N
1	0	2	2	8	10	7	11	3	13	16	15	7	51	32	24	4
2	1	1	0	2	8	9	10	4	15	0	5	1	25	3	23	1
3	0	2	2	9	3	5	18	5	8	2	35	2	28	2	26	1
4	6	46	1	8	5	6	14	2	7	1	24	2	5	0	26	1
5	10	38	1	8	6	3	17	8	8	1	27	3	71	4	25	1
6	11	36	8	10	7	13	48	6	3	0	9	3	34	2	16	0
7	11	30	3	8	5	8	20	9	7	1	6	0	58	2	44	0
8	19	77	2	1	1	1	12	7	8	6	6	2	82	4	25	1
9	19	92	2	2	3	1	16	4	4	2	2	0	85	4	25	1
10	12	48	3	3	4	7	8	3	1	1	3	1	74	6	33	1
%G	19,4		28,1		46,4		77,3		88,2		85,4		94,1		96,0	

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A12- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MC sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Campos	9	1113,76	123,75	0,99 NS
Tempos	7	32148,12	4592,59	36,74 **
Resíduo	63	7875,08	125,00	
Total	79	41136,96		

NS= Não significativo ** significativo ao nível de 1%

5h-----→ 23,0

6h-----→ 30,9 85,0%-----→ 67,2 ± 22,8

7h-----→ 45,0

8h-----→ 60,8 Portanto, tempo mínimo de germinação,

9h-----→ 70,0 (TGm)= 9 horas.

10h-----→ 70,4

11h-----→ 76,9

12h-----→ 80,0

Tabela A13- Germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MM sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos.

Tempos/ Campos	5h		6h		7h		8h		9h		10h		11h	
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N
1	0	83	2	68	4	56	11	64	12	86	23	44	30	10
2	0	91	1	26	4	63	24	49	9	30	43	6	23	8
3	0	88	1	45	6	47	21	64	10	13	30	1	31	2
4	2	28	0	29	8	50	25	95	20	11	54	6	24	2
5	0	68	2	50	9	38	20	126	23	30	46	4	41	1
6	2	47	3	54	12	25	21	27	23	23	40	8	26	2
7	0	64	1	29	5	61	17	27	25	11	66	6	11	2
8	1	80	2	33	12	23	18	34	31	41	33	13	17	1
9	0	95	2	51	6	28	17	23	28	47	65	2	9	1
10	0	103	2	21	7	15	15	30	31	14	31	10	13	2
%G	0,7		3,8		15,2		26,0		41,0		81,2		87,9	

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A14- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem *Pegro de M.anisopliae* em MM sólido à temperatura de 28°C em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	Gl	SQ	QM	F
Campos	9	1700,31	188,92	2,81 *
Tempos	6	39481,59	6580,27	97,84 **
Resíduo	54	3631,84	67,26	
Total	69	44813,74		

* Significativo ** significativo ao nível de 1%

5h----> 4,9

6h----> 10,7 85,0%-----> 67,2 + 25,5

7h----> 24,2

8h----> 32,8 ,
Portanto, tempo mínimo de germinação,

9h----> 43,1 (T_{Gm})= 11 horas.

10h---> 66,6

11h---> 70,8

Tabela A15- Germinação de conídios da linhagem **Pegro** de **M.anisopliae** em MC sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos.

Tempos/ Campos	5h		6h		7h		8h		9h		10h		11h	
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N
1	7	88	13	23	4	6	76	2	44	2	20	1	45	0
2	9	99	16	22	6	1	89	1	12	0	33	1	41	0
3	5	88	19	27	52	7	95	6	12	0	14	0	35	1
4	6	50	16	29	38	3	83	5	46	1	40	1	18	0
5	11	74	24	16	19	3	110	4	45	1	124	2	16	0
6	1	4	6	7	9	3	69	4	25	1	59	2	26	0
7	0	26	13	16	45	9	57	5	4	0	43	1	25	0
8	0	2	11	26	9	1	53	1	7	1	15	0	34	0
9	1	19	40	50	29	6	43	1	2	0	35	0	41	0
10	4	80	16	32	2	1	29	1	47	2	11	0	51	1
%G	7,7		41,2		85,2		96,0		98,0		98,3		99,4	

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A16- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MC sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Campos	9	456,83	50,76	1,19 NS
Tempos	6	46471,73	7745,29	182,01 **
Resíduo	54	2297,90	42,55	
Total	69	49226,45		

NS= Não significativo ** significativo ao nível de 1%

5h-----> 14,0

6h-----> 40,0 85,0%-----> 67,2 ± 26,3

7h-----> 63,7

8h-----> 78,9 Portanto, tempo mínimo de germinação,

9h-----> 82,7 (TGm)= 8 horas.

10h----> 84,2

11h----> 88,2

Tabela A17- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MM+E sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos.

Tempos/ Campos	5h		6h		7h		8h		9h		10h		11h		12h	
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N
1	4	55	0	2	33	33	3	3	34	16	92	6	27	1	15	1
2	3	48	1	2	46	20	5	5	38	13	40	8	26	1	41	2
3	7	61	1	3	44	25	9	5	53	18	46	10	47	7	51	1
4	5	40	0	2	47	25	5	2	45	11	41	6	43	3	43	1
5	5	50	1	3	47	34	9	3	25	7	42	8	55	1	52	2
6	3	23	3	7	61	29	7	1	12	9	61	2	58	4	56	2
7	2	5	4	17	59	32	6	3	28	2	102	8	126	3	56	2
8	3	54	6	19	52	27	10	3	4	3	124	10	47	3	34	1
9	3	10	12	21	23	25	10	5	1	2	86	16	52	4	80	2
10	2	12	21	36	21	19	4	4	7	5	116	12	52	1	29	1
%G	9,4		30,9		61,7		66,7		74,0		89,7		95,0		96,0	

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A18- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MM+E sólido, à temperatura de 28°C em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Campos	9	646,63	71,85	1,21 NS
Tempos	7	34135,33	4876,48	82,40 **
Resíduo	63	3728,24	59,18	
Total	79	38510,20		

NS= Não significativo ** significativo ao nível de 1%

5h-----→ 20,1

6h-----→ 26,1

7h-----→ 51,2 85,0%-----→ 67,2 ± 22,1

8h-----→ 54,6

9h-----→ 55,9

Portanto, tempo mínimo de germinação,

10h-----→ 70,9

(TGm)= 10 horas.

11h-----→ 77,3

12h-----→ 79,5

Tabela A19- Germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MM+E sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos.

Tempos/ Campos	5h		6h		7h		8h		9h		10h		11h	
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N
1	4	32	7	18	4	4	32	3	8	1	15	0	30	0
2	7	53	3	8	9	3	44	4	14	1	12	1	33	0
3	8	43	1	3	14	6	41	4	21	2	15	0	32	1
4	7	27	3	9	29	7	37	3	35	1	26	1	38	0
5	8	48	4	12	0	3	27	2	42	2	30	1	15	0
6	2	26	3	7	6	1	33	5	27	1	41	2	15	0
7	1	33	1	1	15	2	27	5	5	1	19	1	17	0
8	0	8	2	7	10	8	13	3	3	0	30	0	34	1
9	1	7	3	9	11	4	25	8	4	0	7	0	40	0
10	2	29	10	29	19	6	33	2	44	2	7	1	33	0
%G	11,6		26,4		72,7		80,9		94,9		96,7		99,3	

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A20- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de *M. anisopliae* em MM+E sólido, à temperatura de 28°C, em diversos tempos (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Campos	9	520,96	57,88	0,45 NS
Tempos	6	43402,26	7233,71	55,80 **
Resíduo	54	7000,08	129,63	
Total	69	50923,31		

NS= Não significativo ** significativo ao nível de 1%

5h----> 17,3

6h----> 32,0 85,0%-----> 67,2 + 26,7

7h----> 53,1

8h----> 70,4

Portanto, tempo mínimo de germinação,

9h----> 78,0

(T_{Gm}) = 8 horas.

10h---> 81,6

11h---> 88,0

Tabela A21- Germinação de conídios da linhagem **Pegro** de **M.anisopliae** em MML+E, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.

Tempos/ Conc.	5h		7h		9h		10h		%G
	G	N	G	N	G	N	G	N	
10^7	10	102	46	59	79	25	104	16	54,2
10^6	4	99	49	51	46	20	123	13	54,8
10^5	6	94	48	52	93	7	99	1	61,5
10^4	3	60	51	49	96	4	98	2	68,3
10^3	1	10	48	52	90	10	98	2	76,2
10^2	0	20	21	23	89	11	90	1	78,4
%G	5,9		47,9		86,5		94,6		

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A22- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem Pegro de *M.anisopliae* em MML+E, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Concentrações	5	290,85	68,17	2,02 NS
Tempos	3	15871,10	5290,37	156,40 **
Resíduo	15	507,39	33,83	
Total	23	16669,34		

NS= Não significativo ** significativo ao nível de 1%

5h-----> 12,2

7h-----> 43,8 85,0%-----> 67,2 ± 25,2

9h-----> 68,7

10h----> 78,8 Portanto, tempo mínimo de germinação,

(TGm)= 9 horas

Tabela A23- Germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML+E, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações.

Tempos/ Conc.	5h		7h		9h		10h		11h		%G
	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	
10 ⁷	2	99	43	67	81	52	97	41	101	20	53,7
10 ⁶	3	101	51	69	83	49	91	39	93	18	53,8
10 ⁵	2	71	51	61	79	32	91	37	81	13	58,7
10 ⁴	3	60	43	53	73	31	70	26	63	9	58,5
10 ³	2	32	32	34	61	21	53	10	49	5	65,9
10 ²	1	29	24	25	40	17	32	5	46	1	65,0
%G	3,2		44,1		67,2		73,3		86,8		

G= Número de conídios germinados

N= Número de conídios não germinados

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A24- Análise de variância da germinação de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em MML+E, sob agitação, à temperatura ambiente, em diversos tempos e concentrações (após transformação em arco seno radianos).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Concentrações	5	261,12	52,22	7,45 **
Tempos	4	12940,59	3235,15	461,59 **
Resíduo	20	140,18	7,00	
Total	29	13341,88		

** significativo ao nível de 1%

5h----> 10,8

7h----> 42,1 85,0%-----> 67,2 ± 21,4

9h----> 55,7

10h---> 60,8 Portanto, tempo mínimo de germinação,

11h---> 70,6 (TGm) = 11 horas.

Tabela A25- Número de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em 18 horas a 28°C em MC sólido.

Tipos de Germ./ Repetições	NG	TU	TD	TDO	TT
1	1	2	0	17	0
2	0	4	1	14	1
3	0	3	2	15	0
4	1	3	2	13	1
5	1	4	0	15	0
6	1	4	0	12	3
7	2	2	0	14	2
8	0	4	1	15	0
9	2	4	0	13	1
10	1	9	1	9	0

NG= Número de conídios não germinados

TU= Número de conídios germinados com 1 tubo

TD= Número de conídios germinados com 2 tubos no mesmo polo

TDO= Número de conídios germinados com 2 tubos opostos

TT= Número de conídios germinados com 3 tubos

Foi realizada uma análise estatística cujos resultados estão a seguir

Tabela A26- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tipos de germinação	4	32,76	8,19	3,10 **
Resíduo	45	28,14	0,63	
Total	49	60,90		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias do número de tubos germinativos de conídios da linhagem E9, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela A27- Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios da linhagem E9 de *M.anisopliae* em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Tubos	Média do número de tubos em 10 repetições(1)
TDO	3,76a
TU	2,06 b
NG	1,14 bc
TT	1,07 c
TD	1,04 c

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,95.

Tabela A28- Número de tubos germinativos de conídios de Y5
(mutante da linhagem E9) de *M.anisopliae*, em
18 horas, a 28°C em MC sólido.

Tipos de Germ./ Repetições	NG	TU	TD	TD0	TT
1	0	13	5	26	2
2	0	12	5	17	2
3	0	5	2	17	1
4	1	10	4	20	1
5	0	4	6	20	0
6	0	10	5	15	1
7	0	12	3	17	0
8	0	6	4	13	4
9	0	3	1	8	0
10	0	5	0	8	1

NG= Número de conídios não germinados

TU= Número de conídios germinados com 1 tubo

TD= Número de conídios germinados com 2 tubos no mesmo polo

TD0= Número de conídios germinados com 2 tubos opostos

TT= Número de conídios germinados com 3 tubos

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a
seguir.

Tabela A29- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de Y5 (mutante da linhagem E9) de *M.anisopliae* em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tipos de germinação	4	68,12	17,03	56,77 **
Resíduo	45	13,51	0,30	
Total	49	81,63		

** significativo ao nível de 1% .

O estudo comparativo das médias do número de tubos germinativos de conídios de Y5, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela A30 Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios de Y5, (mutante da linhagem E9) de *M.anisopliae* em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Tubos	Média do número de tubos em 10 repetições (1)
TDO	4,02a
TU	2,85 b
FD	1,92 c
IT	1,23 d
NG	0,76 d

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,65.

Tabela A31- Número de tubos germinativos de conídios de
B/vi (mutante da linhagem E9) de **M.anisopliae**
 em 18 horas, a 28°C em MC sólido.

Tipos de Germ./ Repetições	NG	TU	TD	TD0	TT
1	0	7	1	11	0
2	0	9	1	12	1
3	0	11	2	16	1
4	0	7	3	14	1
5	1	8	1	10	2
6	0	11	3	13	1
7	2	10	2	11	0
8	3	13	4	19	2
9	2	12	2	16	0
10	0	6	0	9	1

NG= Número de conídios não germinados

TU= Número de conídios germinados com 1 tubo

TD= Número de conídios germinados com 2 tubos no mesmo polo

TD0= Número de conídios germinados com 2 tubos opostos

TT= Número de conídios germinados com 3 tubos

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela
 a seguir.

Tabela A32- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de B/vi (mutante da linhagem E9) de M.anisopliae, em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tipos de germinação	4	59,41	14,85	92,95**
Resíduo	45	7,19	0,16	
Total	49	66,60		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias do número de tubos germinativos de conídios de B/vi, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela A33 Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios de B/vi (mutante da linhagem E9) de M.anisopliae, em 18 horas a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$)

Tubos	Média do número de tubos em 10 repetições (1)
TDO	3,67a
TU	3,13 b
TD	1,47 c
TT	1,14 c
NG	1,06 c

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,47.

Tabela A34- Número de tubos germinativos de conídios de X/vi (mutante da linhagem E9) de *M.anisopliae* em 18 horas, a 28°C em MC sólido.

Tipos de germ./ Repetições	NG	TU	TD	TD0	TT
1	0	6	2	9	1
2	0	9	4	15	1
3	1	7	2	11	0
4	2	9	1	12	1
5	1	5	1	9	2
6	1	6	2	10	0
7	0	7	2	10	1
8	1	9	3	11	1
9	0	8	0	7	0
10	0	11	1	11	0

NG= Número de conídios não germinados

TU= Número de conídios germinados com 1 tubo

TD= Número de conídios germinados com 2 tubos no mesmo polo

TD0= Número de conídios germinados com 2 tubos opostos

TT= Número de conídios germinados com 3 tubos

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A35- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de X/vi (mutante da linhagem E9) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Causas de variação	GL	SS	QM	F
Tipos de germinação	4	45,75	11,44	99,87 **
Resíduo	45	5,15	0,11	
Total	49	50,90		

** significativo ao nível de 1%

O cálculo comparativo dos tipos de tubos de número de tubos germinativos de conídios de X/vi, foi feito através do Teste de Tukey, e os resultados estão a seguir.

Tabela A36- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de X/vi (mutante da linhagem E9) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Tubos	Válua da média do número de tubos em 10 repetições (1)
TDO	1,30a
TU	2,85 b
TE	1,47 c
TT	1,05 d
NG	1,00 d

(1) Valores seguidos por mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

F, valor crítico de F para o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela A37- Número de tubos germinativos de conídios da linhagem F84 de *M.anisopliae*, em 18 horas a 28°C em MC sólido.

Tipos de Germ./ Repetições	NG	TU	TD	TD0	TT
1	0	7	10	3	0
2	2	13	3	2	0
3	1	7	8	4	0
4	1	10	7	2	0
5	0	9	9	2	0
6	1	14	4	1	0
7	1	7	5	7	0
8	0	7	7	6	0
9	3	9	4	3	1
10	2	11	4	2	1

NG= Número de conídios não germinados

TU= Número de conídios germinados com 1 tubo

TD= Número de conídios germinados com 2 tubos no mesmo polo

TD0= Número de conídios germinados com 2 tubos opostos

TT= Número de conídios germinados com 3 tubos

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A38- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios da linhagem F84 de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{X+0,5}$).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tipos de germinação	4	35,61	8,90	53,86 **
Resíduo	45	7,44	0,17	
Total	49	43,05		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias do número de tubos germinativos de conídios da linhagem F84, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela A39 Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios da linhagem F84 de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Tubos	Média do número de tubos em 10 repetições (1)
TU	3,12a
TD	2,53 b
TDO	1,87 c
NG	1,20 d
TT	0,81 d

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,48.

Tabela A40- Número de tubos germinativos de conídios de
 F84nic- (mutante da linhagem F84) de
M.anisopliae , em 18 horas, a 28°C em MC sólido.

Tipos de germ./ Repetições	NG	TU	TD	TD0	TT
1	13	4	0	3	0
2	13	6	1	0	0
3	13	7	0	0	0
4	17	3	0	0	0
5	13	6	0	1	0
6	17	3	0	0	0
7	15	5	0	0	0
8	13	6	1	0	0
9	11	8	0	1	0
10	10	10	0	0	0

NG= Número de conídios não germinados

TU= Número de conídios germinados com 1 tubo

TD= Número de conídios germinados com 2 tubos no mesmo polo

TD0= Número de conídios germinados com 2 tubos opostos

TT= Número de conídios germinados com 3 tubos

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela
 a seguir

Tabela A41- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de F84nic⁻ (mutante da linhagem F84) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tipos de germinação	4	70,75	17,19	178,13 **
Resíduo	45	4,47	0,10	
Total	49	75,22		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias do número de tubos germinativos de conídios de F84nic⁻, foi feito através do Teste de Tukey.

Tabela A42 Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios de F84nic⁻ (mutante da linhagem F84) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Tubos	Média do número de tubos em 10 repetições (1)
NG	3,73a
TU	2,48 b
TDO	0,93 -c
TD	0,91 c
TT	0,71 c

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,37.

Tabela A43- Número de tubos germinativos de conídios de
F84tia- (mutante da linhagem **F84**) de
M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido.

Tipos de germ./ Repetições	NG	TU	TD	TD0	TT
1	3	17	0	0	0
2	4	16	0	0	0
3	3	17	0	0	0
4	3	14	0	3	0
5	6	13	1	0	0
6	4	13	1	2	0
7	3	15	0	2	0
8	4	14	0	2	0
9	8	9	1	2	0
10	4	12	2	2	0

NG= Número de conídios não germinados

TU= Número de conídios germinados com 1 tubo

TD= Número de conídios germinados com 2 tubos no mesmo polo

TD0= Número de conídios germinados com 2 tubos opostos

TT= Número de conídios germinados com 3 tubos

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela a seguir.

Tabela A44- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios de F84tia⁻ (mutante da linhagem F84), de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Causas de variação	GL	SS	QM	F
Tipos de germinação	4	63,57	15,89	161,32 **
Resíduo	45	4,43	0,09	
Total	49	68,00		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias do número de tubos germinativos de conídios de F84tia⁻, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão a seguir.

Tabela A45 Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios de F84tia⁻ (mutante da linhagem F84) de M.anisopliae, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Tubos	Média do número de tubos em 10 repetições (1)
TU	3,80a
NG	2,14 b
TDO	1,26 c
TD	1,00 cd
TT	0,71 d

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,37.

Tabela A46- Número de tubos germinativos de conídios do
 diplóide D5 (F84nic- X Y5) de *M. anisopliae*, em
 18 horas, a 28°C em MC sólido.

Tipos de germ./ Repetições	NG	TU	TD	TDO	TT
1	7	11	1	1	0
2	3	16	0	1	0
3	3	11	1	5	0
4	6	12	0	2	0
5	10	8	0	2	0
6	9	8	0	3	0
7	0	15	0	5	0
8	3	15	0	2	0
9	3	16	0	1	0
10	5	12	0	3	0

NG= Número de conídios não germinados

TU= Número de conídios germinados com 1 tubo

TD= Número de conídios germinados com 2 tubos no mesmo polo

TDO= Número de conídios germinados com 2 tubos opostos

TT= Número de conídios germinados com 3 tubos

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela
 a seguir.

Tabela A47- Análise de variância do número de tubos germinativos de conídios do diplóide D5 (F84nic⁻ X Y5) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Tipos de germinação	4	54,82	13,71	72,60 **
Resíduo	45	8,50	0,19	
Total	49	63,32		

** significativo ao nível de 1%

O estudo comparativo das médias do número de tubos germinativos de conídios do diplóide D5, foi feito através do Teste de Tukey, cujos resultados estão na tabela a seguir.

Tabela A48 Comparação das médias do número de tubos germinativos de conídios do diplóide D5 (F84nic⁻ X Y5) de *M.anisopliae*, em 18 horas, a 28°C em MC sólido (após transformação em $\sqrt{x+0,5}$).

Tubos	Média do número de tubos em 10 repetições (1)
TU	3,57a
NE	2,22 b
TBO	1,68 c
TE	0,81 d
TT	0,71 d

(1) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

A d.m.s., pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi de 0,51.

Tabela A49- Número de tubos germinativos¹ de conídios do
 diplóide 5 (F84tia- X Y5) de *M.anisopliae*, em
 18 horas, a 28°C em MC sólido.

Tipos de germ./ Repetições	NG	TU	TD	TD0	TT
1	1	8	0	11	0
2	1	7	1	11	0
3	0	10	0	10	0
4	2	8	1	9	0
5	1	7	2	9	1
6	1	9	0	10	0
7	1	2	2	15	0
8	3	6	2	9	0
9	0	7	5	8	0
10	0	8	2	10	0

NG= Número de conídios não germinados

TU= Número de conídios germinados com 1 tubo

TD= Número de conídios germinados com 2 tubos no mesmo polo

TD0= Número de conídios germinados com 2 tubos opostos

TT= Número de conídios germinados com 3 tubos

Foi realizada uma análise estatística conforme a tabela
 a seguir.