Admir Josafá Arrais de Matos

Crescimento, Germinação, Conidiação e Resistência a Luz Ultravioleta de Linhagens de *Metarhizium anisopliae*

Orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do título de Mestre em Biologia

Campinas - S.P.
1983

M428c
4891/BC

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

UNICAMP

COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: ADMIR JOSAFÁ ARRAIS DE MATOS

Nº de Identificação: 785007

Endereço para Correspondência: Depto. de Genética e Evolução - IB - UNICAMP

Curso: Genética

Nome do Orientador: Prof.Dr. João Lucio de Azevedo

Título da Dissertação ou Tese: Crescimento, Germinação, Conidiação e Resistência a luz ultravioleta em linhagens de Metarhizium anisopliae.

Data proposta para a Defesa: 02/03/1983.

(O Aluno deverá assinar um dos 3 ítens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

07/02/83 — Data

assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

/ / — Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

/ / — Data

assinatura do aluno

De acôrdo

Orientador

Prof.Dr. João Lucio de Azevedo

Endereço Telegráfico: UNICAMP - Telex: (019) 1150 - Endereçamento Postal: 13.100 - Fones: PABX - 31-4555 - Cidade Universitária - Barão Geraldo Campinas - São Paulo

IMESP

ADMIR JOSAFÁ ARRAIS DE MATOS

CRESCIMENTO, GERMINAÇÃO, CONIDIAÇÃO E RESISTÊNCIA A LUZ ULTRAVIOLETA DE LINHAGENS DE *Metarhizium anisopliae*.

ORIENTADOR: Dr. João Lúcio de Azevedo.

Tese apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do
título de Mestre em Biologia

Campinas - S.P.

.1983.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Classif. T
Autor M428c
V. Ex.
Tombo BC/ 4891

Aos meus filhos:

Rogerio, Gerson e Gianina

dedico

PENSAMENTO

"Uma vida misteriosa invade toda a Natureza - vida que sustenta os inumeráveis mundos através da imensidade toda. Encontra-se ela no ser microscópico que flutua na brisa do verão; é ela que dirige o vôo das andorinhas, e alimenta as pipilantes avezinhas de rapina; é ela que faz com que os botões floresçam, e as flores frutifiquem".

E. G. White

AGRADECIMENTOS

Agradeço as pessoas e instituições que contribuiram para a concretização desse trabalho, que são as seguintes:

Ao Professor Dr. João Lúcio de Azevedo, como orientador de tese insigne, e pela amizade e compreensão.

Ao Professor Dr. Cláudio Luiz Messias, como orientador de programa, pelas valiosas sujestões e apoio irrestrito.

Ao Professor Dr. Ivanhoé R. Baracho pelo interesse demonstrado em todos os momentos e amizade sincera.

Ao Professor Dr. Aquiles Piedrabuena, pelo auxílio na análise estatística e prontidão em todas as circunstâncias.

Ao técnico de laboratório e amigo, Juverland Lugli, pela presteza e paciência demonstradas.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Genética da UNICAMP.

A minha esposa, Maria Ângela, pela compreensão, carinho e paciência demonstrados.

Aos meus pais, irmãos e sogros, pelo interesse e incentivo com que sempre me acompanharam.

Ao Instituto de Biologia da UNICAMP, pelas facilidades nas pesquisas.

A EMBRAPA, pelo apoio financeiro através do Programa de Controle Biológico por fungos - Programa Nacional de Controle Biológico de Cigarrinhas das Pastagens.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro ao Programa Integrado de Genética.

Ao Instituto Adventista São Paulo, pelo apoio, e facilidades nos horários.

Ao Instituto Adventista de Ensino, pelo apoio financeiro.

A Deus, pela vida, saúde, esperança e condições satisfatórias para os estudos e trabalhos, meu louvor especial, minha honra e glória.

ÍNDICE

Página

1. Prólogo. 03
2. Introdução. 05
3. Revisão de Literatura. 07
   3.1. Descrição do Fungo. 07
   3.2. O Ciclo Parassexual em *M. anisopliae*. 10
   3.3. Nutrição e Outros Fatores atuando em *M. anisopliae*. .. 10
4. Material e Métodos. 21
   4.1. Linhagens Utilizadas. 21
   4.2. Meios de Cultura e Soluções Utilizadas. 22
   4.3. Esterilização de Vidraria. 26
   4.4. Temperatura e Tempo de Incubação. 26
   4.5. Tamanho dos Conídios. 26
   4.6 Porcentagem de Conídios Binucleados :..... 26
   4.7. Taxa de Germinação. 27
   4.8. Morfologia das Colônias. 27
   4.9. Produção de Conídios. 28
   4.10. Resistência a Luz Ultravioleta. 29
5. Resultados. 30
   5.1. Tamanho dos Conídios. 30
   5.2. Porcentagem de Conídios Binucleados 33
   5.3. Taxa de Germinação. 34
   5.4. Morfologia das Colônias. 35
   5.5. Produção de Conídios. 41
   5.6. Resistência a Luz Ultravioleta. 43
6. Discussão. 56
   6.1. Tamanhos dos Conídios. 56

6.2. Porcentagem de Conídios Binucleados 57
6.3. Taxa de Germinação. 58
6.4. Morfologia das Colônias. 60
6.5. Produção de Conídios. 61
6.6. Resistência a Luz Ultravioleta. 62
7. Conclusões. 65
8. Resumo. 66
9. Sumary. 67
10. Literatura Citada. 68

ANEXO I - LISTA DE TABELAS

TABELA PÁGINA

I. Medidas do comprimento e da largura dos conídios de 7 linhagens de *M. anisopliae* em µm. 31

II. Comparação da média, desvio padrão e variância de 7 linhagens de *M. anisopliae*, considerando-se o comprimento e a largura dos conídios (µm). 32

III. Análise de variância das larguras de conídios de 7 linhagens de *M. anisopliae*. 32

IV. Análise de variância dos comprimentos de conídios de 7 linhagens de *M. anisopliae*. 33

V. Porcentagem de conídios binucleados em 7 linhagens de *Metarhizium anisopliae* 33

VI. Taxa de germinação em diferentes tempos e meios de 7 linhagens de *M. anisopliae* (em decimal). 34

VII. Análise de variância da taxa de germinação em diferentes tempos e meios de 7 linhagens de *M. anisopliae*. 35

VIII. Tamanho médio (cm^2) das colônias de 7 linhagens em 3 meios e em 7 dias a 28^oC de *M. anisopliae*. 40

IX. Análise de variância do tamanho das colônias de 7 linhagens de *M. anisopliae*. 41

X. Produção de conídios por cm^2 em 7 dias a 28^oC em 3 meios (nº conídios x $10^6/cm^2$) de *M. anisopliae*. 42

XI. Análise estatística sobre a produção de conídios por cm^2 em 7 dias a 28^oC em 3 meios de *M. anisopliae*. 42

XII. Porcentagem de sobrevivência de *M. anisopliae* a luz ultravioleta. 43

XIII. Resistência a luz ultravioleta, (LD_{50} e LD_{95}), em minutos de 7 linhagens de *M. anisopliae*. 52

XIV. Limite inferior e superior da resistência a luz (LD_{50}), em minutos de linhagens de *M. anisopliae*. 53

XV. Comparação das 7 linhagens de *M. anisopliae* quanto ao comprimento, largura e volume dos conídios, tamanho das colônias, porcentagem de germinação e produção de conídios, LD_{50}, LD_{95} e porcentagem de conídios binucleados.. 64

ANEXO II - LISTA DE FIGURAS

FIGURA PÁGINA

1. "Cortador de Colônia", instrumento de lâminas paralelas de 1 mm de distância. 28
2. Colônia de linhagem a *M. anisopliae*, crescida em MC, em 10 dias, a 28°C, cortada por um "cortador de colônia", para a contagem dos conídios produzidos (E6). 29
3. Colônia da linhagem F84 de *M. anisopliae*, crescida no meio Y_pS_s, durante 10 dias a 28°C. 36
4. Colônia da linhagem E9 de *M. anisopliae*, crescida no meio Y_pS_s, durante 10 dias a 28°C. 37
5. Colônia da linhagem E9 de *M. anisopliae*, crescida no meio completo, durante 10 dias a 28°C. 37
6. Colônia da linhagem E6 de *M. anisopliae*, crescida no meio Y_pS_s, durante 10 dias a 28°C. 38
7. Colônia da linhagem Mal02, de *M. anisopliae*, crescida no meio Y_pS_s, durante 10 dias a 28°C. 38
8. Colônia da linhagem Mal02 de *M. anisopliae*, crescida no meio mínimo, durante 10 dias a 28°C. 38
9. Curva de sobrevivência da linhagem A4, de *M. anisopliae*. . 44
10. Curva de sobrevivência da linhagem A19, de *M. anisopliae*. . 45
11. Curva de sobrevivência da linhagem E6, de *M. anisopliae*. . 46
12. Curva de sobrevivência da linhagem E9, de *M. anisopliae*. . 46
13. Curva de sobrevivência da linhagem F84, de *M. anisopliae*.. 48
14. Curva de sobrevivência da linhagem Mal02, de *M. anisopliae*. 49
15. Curva de sobrevivência da linhagem V14, de *M. anisopliae*.. 50

16. Curvas de sobrevivência das 7 linhagens de M. *anisopliae* 51
17. Comparação da resistência de 7 linhagens de M. *anisopliae*, a luz ultravioleta 54

1. PRÓLOGO

O objetivo deste estudo foi comparar várias linhagens de *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin, usando-se meios de cultura, tempos e radiações diferentes e estudando-se a germinação, o tamanho e a forma das colônias, o número de conídios produzidos, o tamanho dos mesmos, porcentagem de conídios binucleados e resistência, com propósito de fornecer uma contribuição para o conhecimento da variabilidade natural existente, o que é importante como subsídio para estudos genéticos em andamento.

O *Metarhizium anisopliae*, é largamente utilizado no controle biológico de insetos; portanto é de interesse aplicado, economicamente significativo, pois causa doenças em insetos que atacam plantações, constituindo-se numa excelente alternativa para o combate a estas pragas.

Embora as perspectivas sejam alvissareiras, os fungos, como qualquer ser vivo, sofrem influências ambientais, que muitas vezes limitam ou favorecem sua germinação, crescimento, esporulação e patogenicidade. Fatores que podem afetar geneticamente e fisiológicamente os fungos são particularmente: luz, temperatura, radiações, pH, salinidade, nutrição e umidade.

Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas dentro do Instituto de Biologia da UNICAMP, como produção de enzimas, obtenção de mutantes vantajosos, trabalhos de campo e outros que no final, num quadro geral, poderão indicar a melhor linhagem, ou a que reune melhores condições para realizar um controle biológico efetivo. Há também outras universidades brasileiras, e institutos, se preocupando com estes estudos, que são de grande importância pois somos um país voltado sensivelmente para a Agricultura, e assim qualquer tentativa de diminuir os efeitos danosos de pragas agrícolas são prioritários.

2. INTRODUÇÃO

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, é entomopatógeno e há algum tempo vem sendo utilizado no controle biológico, sendo portanto de grande importância econômica, para a Agricultura, especialmente no combate as cigarrinhas, insetos da ordem Homoptera, família Cercopidae, que atacam pastagens e cana de açúcar. Assim, esse fungo convenientemente estudado e utilizado, pode substituir com vantagens os defensivos agrícolas usuais.

O *M. anisopliae* é um Fungo classificado como Imperfeito, por não possuir o ciclo sexual; contudo a ocorrência de outro ciclo, o parassexual, possibilita a obtenção de recombinantes, o que associado aos fenômenos de mutação, podem tornar esse fungo útil na pesquisa científica e também possibilitar o desenvolvimento racional de programas de melhoramentos genético..

Nas condições estudadas no presente trabalho, verificou-se a variabilidade de linhagens quanto a germinação, crescimento, esporulação e resistência a luz ultravioleta. Verificou-se a variabilidade também quanto ao tamanho dos conídios, morfologia das colônias e outros aspectos estudados.

É possível que as linhagens que apresentarem melhores características, como: germinação mais precoce, um crescimento mais rápido, maior resistência, menor exigência nutricional, aliadas a outros fatores, possam ser preferidas no controle biológico.

Os resultados encontrados poderão ser úteis na escolha das linhagens que reunam melhores características para o controle de pragas, mantendo com segurança o equilíbrio biológico nos ecossistemas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Descrição do Fungo

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, é um Deuteromiceto pertencente a ordem Moniliales, família Moniliaceae.

Segundo *PETCH (1931)* e *KENDRICK (1971)*, foi *METSCHNIKOFF*, em *1879*, quem classificou este fungo pela primeira vez como *Entomophthora anisopliae* na praga do milho, *Anisopliae austriaca*, um besouro, sendo que, em 1880, o mesmo autor deu-lhe o novo nome de *Isaria destructor*. Este fungo foi descrito com os mais diversos nomes por vários autores (*DELACROIX, 1893, VUILLEMIN, 1904*), sendo contudo classificado como *Metarhizium anisopliae* por *SOROKIN* em 1883.

A espécie M. *anisopliae*, apresenta conídios desde cilíndricos até ovalados e suas colônias podem ser de coloração verde sépia ou branco amarelada. As colônias são circulares quando conídios são inoculados em meio sólido.

METSCHNIKOFF (1879), descreveu esporos de *Entomophora anisopliae* com 4,8 µm de comprimento. *SOROKIN (1883)*, na descrição de novo gênero *Metarhizium*, referiu-se a esporos de 4,8

x 1,6 µm.

Os conídios se apresentam de dois tipos conforme a variedade encontrada. Conídios curtos são características da variedade minor (*M. anisopliae* var. *anisopliae*); esta apresenta conídios de 3,5 a 9,0 µm de comprimento. Conídios longos são típicos da variedade major (*M. anisopliae* var. *major*) que tem conídios com 9,0 a 18,0 µm de comprimento. *TULLOCH, (1976)* mostrou que as diferenças entre essas formas justificam uma separação varietal entre elas, propondo então a combinação das formas já anteriormente propostas por *JOHNSTON (1915)* que descreveu a forma major, verde brilhante, com esporos de 11,9 x 3,0 µm, e a forma minor, verde clara, com esporos de 3,5 x 2-3,0 µm. Ele indicou que muitos isolados de insetos e em culturas novas, fortes e vigorosas, produzem esporos de dimensões maiores e que estas variações em longa e curta são devidas as diferenças fisiológicas. Aliás, *FRIEDERICHS (1920)*, também havia descrito a existência de uma forma de esporos longa de *M. anisopliae* com conídios de 9-14,0 µm de comprimento e uma pequena com conídios de 6-8,0 µm; posteriormente sugeriu o nome "orycto-phagum" para os de forma longa de esporo.

AZEVEDO e *MESSIAS (1981)*, mediram conídios de oito diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*, sendo sete deles da variedade *minor (anisopliae)* e o outro, da variedade *major* e encontraram para a variedade *minor (anisopliae)*, comprimento entre 5,38 e 6,28 µm e largura entre 2,22 e 2,56 µm; para a variedade *major* o comprimento verificado foi de 10,98 µm e a largura de 3,59 µm. Também foi observado o volume dos conídios que para a variedade *anisopliae*, foi entre 14,39 e 21,55 μm^3; para a variedade *major* foi de 74,10 μm^3.

TINLINE (1971), observou que os conídios são uninucleados, não importando o tamanho. Durante a germinação os núcleos

se dividem e um migra para o tubo germinativo, enquanto o outro permanece no conídio.

VEEN (1967) e *ZACHARUK (1970)*, observaram também que os conídios de *M. anisopliae* são uninucleados, uma característica bastante importante para estudos genéticos. No entanto, alguns conídios tem mais que um núcleo, sugerindo estarem em germinação *(TINLINE e col. 1971)*.

MESSIAS, AZEVEDO, CONTI e *SOUZA (1978)*, observando após coloração por Giemsa, os núcleos dos conídios, verificaram a ocorrência de conídios com um e dois núcleos, numa porcentagem de 95% para uninucleados e 5% para binucleados. Observando ainda *M. anisopliae*, var. *minor*, afirmaram que o microorganismo macroscopicamente (colônia), apresenta-se com produção de micélio branco e conídios amarelos quando jovens, passando a verdes com o tempo. Os conídios quando maduros se desprendem em placas, do micélio. As hifas apresentam-se septadas exibindo grande variação de tamanho dos septos bem como, apresentando-se com um núcleo ou dois por septo. Dos septos partem estruturas que inicialmente são finas e que se constituirão em conidióforos e nestes ocorre um núcleo; com o tempo estas estruturas tornam-se mais volumosas, o núcleo se divide e um núcleo filho passa para os conídios que vão se formando a partir deste conidióforo; os conídios assim formados permanecem em cadeias.

M. anisopliae tem ação parasita em mais de 200 espécies de insetos *(GOSSWALD, 1938, VEEN, 1968)* e seu papel na natureza pode ser considerado como o de um patógeno não específico, cuja atividade pode ser localmente intensa sobre determinadas espécies particulares quando as condições ambientais são favoráveis.

BALAZY (1966) na Polônia, *MOORE (1971)* na Carolina

do Norte, entre outros, encontraram *M. anisopliae* em casca de árvores.

3.2. O Ciclo Parassexual em *M. anisopliae*

Pontecorvo e Roper, descreveram em 1952 um novo processo de recombinação em fungos, o ciclo parassexual. Muitos fungos já possuem o ciclo parassexual bem definido e caracterizado como pode ser visto na revisão de *AZEVEDO (1976)*.

SERMONTI (1956, 1959, 1969), *BURNETT (1975)* e *MACDONALD (1976)*, demonstraram que o ciclo parassexual pode ter valor aplicado, possibilitando a recombinação em fungos economicamente importantes e que não apresentam o ciclo sexual.

Em *M. anisopliae*, *TINLINE* e *NOVIELLO (1971)*, descreveram a heterocariose. *MESSIAS (1979)* e *MESSIAS* e *AZEVEDO (1980)* verificaram a ocorrência do ciclo parassexual em *Metarhizium anisopliae*, evidenciando a obtenção de recombinantes que poderiam possuir qualidades desejáveis para o controle biológico de insetos; salientando a importância do ciclo na exploração do vigor híbrido do armazenamento da variabilidade em diplóides, além de outros problemas de ordem genética.

Esse ciclo foi confirmado por *AL-AIDROSS (1980)* e *RIBA, GLANDAST, JOANA* e *FERRON (1980)*, parecem ter também isolado recombinantes mitóticos estáveis do tipo "intermediário" de *Metarhizium anisopliae* (Metsch,), por hibridação de biótipos selvagens.

3.3. Nutrição e Outros Fatores *atuando* em *M. anisopliae*

Com relação à temperatura, *SHAERFFENBERG (1959)*, citou *NOTINI* e *MATHLEIN*, que se referiram como sendo 10°C o mínimo para permitir o cresimento de *Metarhizium* e verificou em sua experiên-

cia que esse achado foi confirmado. *LATCH (1965)*, refere-se a temperatura ótima para o crescimento de *M. anisopliae* como sendo entre 25°C a 30°C; imediatamente abaixo de 7°C e imediatamente acima de 35°C, o cresimento torna-se mais difícil.

VILLACORTA (1978), observou que vários isolados de *M. anisopliae*, a temperatura ótima foi de 28°C sendo que imediatamente acima de 30°C o desenvolvimento é bastante afetado e abaixo de 7°C praticamente não há crescimento.

SANTOS (1978), verificou que a temperatura de 37°C inibe o crescimento do fungo, tornando os conídios inviáveis após 96 horas de incubação.

AQUINO (1974), manteve culturas de *Metarhizium anisopliae* em garrafas de Roux contendo meio de arroz e em tubos de ensaio com meio de batata dextrose agar (BDA), durante 6 meses, sob temperaturas que variavam desde 3°C até 10°C, verificando que tanto as culturas mantidas sob congelamento como as que permaneceram a 8°C durante 6 meses, apresentaram paralização no crescimento do fungo. Quando foram repicadas para BDA tiveram crescimento normal sem perda de esporulação e virulência do fungo, ficando comprovado o poder de latência dos esporos de *Metarhizium* durante este período.

DOBERSKI e TRIBE (1980), deduziram pelos experimentos realizados e revisão bibliográfica, que a atividade de *M. anisopliae* pode ser limitada pela temperatura durante meses frios do ano quando condições de umidade podem ser particularmente desfavoráveis para infecção em hospedeiro e subsequente produção conidial.

DOBERSKI (1981), verificou em estudos de laboratório que a temperatura, bem como a umidade tem influência na patogenicidade de *Metarhizium anisopliae*.

Com relação aos requisitos nutricionais *HUBER (1958)*, *LIHNELL (1944)*, afirmaram que o *M. anisopliae* é um microorganismo pouco exigente, podendo desenvolver-se em meios de cultura bastante diferenciados, utilizando-se como fonte de carbono: amido, glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose, e quitina.

MARCHIONATTO (1942), cultivou o fungo *M. anisopliae* em batata dextrose ágar, obtendo colônias cotonosas, brancas e compactas que se mantiveram estéreis por vários dias.

ADAMEK (1965), cita que um ótimo meio para se cultivar o fungo *M. anisopliae* é aquele com ph 6,5-7,0, contendo 4% de glicose, 3% de extrato de milho e 4% de extrato de levedura, sendo que o crescimento foi aumentado com adição de 0,2% de tween 80, mas foi inibido por concentrações mais altas.

EVLAKHOVA (1966), verificou que um meio nutriente contendo grãos de milho, cevada, trigo, batata ou abóbora fervida em água por uma hora na proporção de 0,5 Kg/3ℓ de água, juntamente com 1% de açúcar granulado, 0,1% de nitrato de sódio ou potássio, mostrou-se bom para o crescimento de *M. anisopliae* e outros fungos, inoculados a 22-26°C.

MOURA COSTA e *MAGALHÃES (1974)*, utilizaram farinha de arroz, verificando que a melhor concentração era: 5% de farinha de arroz, 1% de ágar-ágar em pó e 100 ml de água destilada, ajustando o ph para 6,0.

VILLACORTA (1977), descreveu um meio de cultura para *M. anisopliae*, onde grãos de arroz eram cozidos e esterilizados, após o que as garrafas que os continham, eram agitadas para permitir a granulação do arroz.

BASTOS (1976), utilizou para produção de *Metarhizium*,

garrafas de Roux, contendo 100g de arroz e 160ml de água destilada, sendo autoclavadas durante 25 minutos à temperatura de 120°C, para esterilização e cozimento do arroz. Após o resfriamento, inoculava as garrafas assépticamente com suspensões de esporos em água estéril utilizando um atomizador tipo "De Vilbiss". Em seguida, mantinha as garrafas à temperatura ambiente do laboratório por 15 dias obtendo boa esporulação. Os esporos eram removidos mediante uma lavagem superficial do meio de cultura, com 300ml de uma solução de espalhante adesivo a 0,025% em água destilada esterilizada. As suspensões de esporos obtidas eram distribuídas assépticamente em frascos de vidro. Esta metodologia desenvolvida permitiu a obtenção e acondicionamento do fungo entomógeno, *M. anisopliae*, em larga escala.

SANTOS (1978), notou que a germinação dos conídios de *M. anisopliae* era mais rápida em meio de arroz, do que em meio completo e de batata.

BASTOS, MATTA e FIGUEREDO (1976), visando substituir o ágar-ágar na composição dos meios de cultura utilizados para produção de *M. anisopliae*, em larga escala e obter melhor esporulação, ensaiaram os seguintes meios com respectivas composições: farinha de milho + farinha de trigo, farinha de arroz + farinha de trigo, farinha de milho + ágar, farinha de arroz + ágar. Após 8 dias verificaram que a esporulação foi sempre melhor nos meios em que a farinha de trigo entrou na composição.

Vários métodos de preservação tem sido ensaiados com finalidade de conservar o fungo *M. anisopliae*, por um longo período, livre de contaminação e ao mesmo tempo, sem perder a viabilidade e patogenidade. O método de preservação de fungos em água foi ensaiado pela primeira vez por CASTELLANI em 1939, o qual con-

servou vários fungos de interesse médico, durante um período de 12 meses, sem que estes perdessem suas características morfológicas e fisiológicas. *FIGUEREDO (1967)*, comprovou a excelência do método de *CASTELLANI* para fungos fitopatogênicos e *BASTOS, FIGUEREDO* e *MATTA (1976)*, verificaram após uso do método de *CASTELLANI*, para conservação de *M. anisopliae*, que os mesmos mantiveram sua viabilidade durante um período de 26 meses, enfatizando que em todos os testes, os aspectos morfológicos e fisiológicos da cultura conservada em água, não apresentaram diferenças quando comparadas com a cultura original. Quanto a patogenicidade, observaram que no período de 9 dias registrou-se uma mortalidade de insetos na ordem de 75%, comprovando-se desta maneira seu poder patogênico.

Com relação à luz, *BASTOS* e *MATTA (1976)* canalisaram sua influência sobre a esporulação de *Metarhizium* verificando que a melhor a esporulação ocorreu na temperatura de 25°C. Nas temperaturas 10°C, 15°C e 35°C houve uma total inibição de esporulação e na ausência de luz a esporulação foi drasticamente reduzida, sendo melhor no regime de luz alternada. Os resultados concordam com os encontrados por *STEINHAUS (1970)* e aproximam-se dos citados por *VEEN (1968)*. *MATTA* e *OLIVEIRA (1978)*, pelos resultados obtidos, concluiram que: o fator luz acha-se associado positivamente com a esporulação de *M. anisopliae*, após inoculação, e que para uma esporulação mais abundante, houve necessidade de luminosidade mínima constante de 144 horas.

SANTOS (1978), observou que a luz contínua aumenta a esporulação de *M. anisopliae*, enquanto o escuro total favorece o desenvolvimento micelial do mesmo, mantendo-se a luz alternada, intermediária aos outros dois tratamentos. A produção de conídios do fungo por área de placa de Petri foi de $2,0 \times 10^9$ conídios.

Quanto à caracterização genética, estudos visando a caracterização de diferentes isolados deste fungo tem sido conduzidos por métodos eletroforéticos pela produção de esterase e fosfatase. *DE CONTI, MESSIAS, SOUZA* e *AZEVEDO (1980)*, verificaram a ocorrência de cinco padrões eletroforéticos para esterase em onze isolados de diferentes regiões brasileiras; com relação a fosfatase, um único padrão eletroforético foi observado.

Com relação à estudos de indução de variabilidade em *M. anisopliae* por meio de agentes mutagênicos, *MESSIAS, AZEVEDO, CONTI* e *SOUZA, (1978)*, utilizando-se de uma determinada fonte de luz ultravioleta inviabilizaram 95% dos conídios com um tempo de exposição de 13 minutos, já *SANTOS (1978)*, com outra fonte obteve sobrevivência de 1 a 5% com 2,40 minutos. Também, irradiando conídios da linhagem E9 selvagem de *M. anisopliae*, var. *minor*, com uma fonte de luz ultravioleta, *MESSIAS (1979)*, obteve mutantes morfológicos e auxotróficos. Os morfológicos obtidos apresentaram-se bastante estáveis. Conseguiu também mutantes deficientes nutricionais para a síntese de aminoácidos e vitaminas. Verificou que a luz ultravioleta foi eficiente na obtenção de mutantes auxotróficos, e a freqüência com que estes apareceram foi em torno de 0,28% que dá um baixo rendimento quando comparados com aqueles obtidos em *Aspergillus nidulans*, um mutante em 200 colônias analisadas *(PONTECORVO, ROPER, HEMMONS, MACDONALD* e *BUFTON 1953)*.

SANTOS (1978), verificou que a radiação ionizante como os raios γ, são efetivos em causar morte a conídios de uma linhagem de *M. anisopliae*, e que poderia ser empregado para a obtenção de mutantes.

OKINO, SILVA, SANTOS, MESSIAS e *AZEVEDO (1978)* submeteram, *M. anisopliae*, *A. niger* e *A. nidulans*, a diferentes do-

sagens de raios gama com o objetivo de serem determinadas suas curvas de sobrevivência a esse agente mutagênico. As curvas de sobrevivência obtidas indicaram que para cada espécie e linhagem, diferentes dosagens devem ser utilizadas para produção de uma letalidade ótima e para indução de mutantes. Luz ultravioleta foi também usada em *M. anisopliae* e tal mutagênico revelou que sua utilização é potencialmente favorável para indução de mutantes e para programas de melhoramento genêtico.

Sugere *MESSIAS (1979)*, que outros mutagênicos, tantos físicos como químicos, poderiam ser estudados, para se ter um melhor resultado na obtenção de mutantes.

CADATAL e *GABRIEL (1970)*, observaram a influência de inseticidas e fungicidas sobre o desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* e concluiram que o methidathion, carbaryl, endosulfan, endrin e fenitrothion inibem o crescimento e esporulação do fungo nas concentrações recomendadas para aplicações de campo e os inseticidas chlorfenvinphos, lindane, diazinon e DDT afetaram parcialmente o desenvolvimento do fungo. *ALVES (1978)*, também estudou a influência de inseticidas e fungicidas. Na concentração de 10 ppm, os produtos oxicloreto de cobre, vamidothiom, monocrotophos e omethoate não afetaram o crescimento do patógeno. Na dosagem de 100 ppm os defensivos que não afetaram o crescimento foram: oxicloreto de cobre, dimethoate, vamidothion e omethoate; na dosagem de 1.000 ppm o oxicloreto de cobre e o omethoate não apresentaram efeito negativo sobre o *M. anisopliae* sendo que o omethoate favoreceu o desenvolvimento do patógeno.

KELLER (1978), analisou um inibidor da síntese de quitina, usando no controle de algumas pragas, o Dimilin (diflubenzuron), constatando inibição do crescimento de *M. anisopliae*.

A partir de um diplóide de *M. anisopliae*, var. *minor*, *MESSIAS (1979)* obteve haploidização com a formação de setores típicos induzidos pela adição de 100 µg/ml de 1,4 - dicloro 2,5 dimetoxibenzeno (cloroneb), o qual segundo *AZEVEDO* e *col. (1977)* tem a propriedade de evidenciar setores haplóides.

ALVES, CARVALHO e *CARVALHO, (1980)*, testaram a toxidade de vários inseticidas, verificando que todos eles apresentavam efeito esporostático.

CAMARGO e *GABRIEL, (1980)*, estudaram a sensibilidade do *M. anisopliae* em relação a vários herbicidas, medindo diariamente o tamanho das colônias, concluindo que os produtos testados foram altamente tóxicos a *M. anisopliae*.

CARNEIRO, SILVA e *ALVES, (1980)*, avaliaram os efeitos tóxicos de vários herbicidas e inseticidas, verificando após 13 dias de incubação que os defensivos afetaram o crescimento dos fungos.

SANTOS (1978), ensaiou os fungicidas Cloroneb e Vitavax, notando que são pouco eficientes sobre *M. anisopliae*, sendo que com adição de 4 µg/ml de Benlate há inibição do crescimento do fungo. A freqüência de mutação a este fungicida é de 2,35 mutantes em 10^6 conídios. O caráter resistência não apresenta efeito danoso ao fungo; provavelmente, mais de um gene está envolvido na resistência ao fungicida.

KUCERA (1980), discutiu a ação de enzimas e sua importância para os fungos entomógenos, enfatizando especialmente a protease do *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Galleria mellonella*.

AL-AIDROOS e *SEIFERT, (1980)*, fizeram estudos enzimáticos em *M. anisopliae* e puderam correlacionar a habilidade em

degradar amido com virulência, contudo o mesmo não pôde ser feito para as linhagens que degradavam bem amostras de proteinas. *ROSATO, MESSIAS e AZEVEDO (1981)*, analizaram a produção de enzimas extracelulares, testando 11 isolados de diferentes regiões do Brasil e verificaram que, em geral, os isolados da mesma região tem semelhante produção enzimática. Um dos objetivos do estudo, também foi o de relacionar a atividade de algumas enzimas com o processo patogênico, principalmente as que são capazes de degradar quitina, lipídios e proteínas, que são os maiores componentes do tegumento de insetos. Essas enzimas poderiam atuar na penetração da cutícula, bem como na subsequente invasão no corpo do inseto pelo fungo.

DURIEZ-VANCELLE, FARGUES, ROBERT e POPEYE (1981), fizeram um estudo enzimático comparativo dos fungos entomopatôgenos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*, verificando pela comparação das amostras enzimáticas, diferenças inespecíficas e intra-específicas entre os isolados dos Fungos.

FARGUES, DURIEZ, POPEYE, ROBERT e BIGUET (1981), caracterizaram imunológicamente os Hyphomicetes entomopatogênicos, *Beauveria* e *Metarhizium*, admitindo ser muito útil este método para caracterização de candidatos ao controle biológico de insetos pestes.

AL-AIDROOS e ROBERTS (1978), apresentaram que uma linhagem de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, um fungo imperfeito, matou 76% das larvas de *Culex pipiens* dentro de 5 dias após administração de esporo. Uma linhagem mutante espontânea foi selecionada, cuja LD_{50} era menor que 1/2 da linhagem selvagem, e LT_{50} foi de um dia (Faster). Este mutante apresentou inicialmente, densa esporulação, rápida germinação in vitro, e aumentada produção de destruxinas. Isto é provavelmente pelo menos uma das característi-

cas adicionais relatada para a mutação para hipervirulência.

VENTURA (1981) objetivando o controle biológico e a possibilidade de aplicação do fungo *Metarhizium anisopliae* em larga escala, implicando no seu contato direto com homens e animais, inoculou camundongos com *M. anisopliae*, por via intraperitonial, intravenosa, subcutânea, intramuscular, ingestão e inalação, verificando não haver evidências clínicas e patológicas nos animais testados.

AZEVEDO e *MESSIAS (1977)*, afirmaram que as linhas de pesquisas conduzidas no Brasil, a respeito dos fungos entomógenos, envolvem aspectos genéticos, meios de cultura, origem de cepas, conservação do fungo, longevidade, viabilidade de esporos, patogenicidade, métodos de produção massal, estudos fisiológicos, renovação de matrizes, custo de produção, estudos de natureza bioquímica, dosagem (LD_{50}), comparação de diferentes isolados, persistência no solo, eficiência na aplicação, ação contra várias espécies de insetos, ação contra inimigos naturais, número e época de aplicações do fungo, relação com outras pragas, levantamento de espécies, biologia, flutuação, inimigos naturais, metodologias, avaliações econômicas e estudo dos hospedeiros.

FERRON (1978), após exaustiva revisão da literatura publicada sobre o *Metarhizium anisopliae*, expressa o significativo progresso feito no campo da patologia de fungos em insetos, e as potencialidades dos fungos entomógenos como um meio de controle biológico contra pestes de insetos e vetores de doenças humanas e animais. Países como Brasil, Canadá, Checoslováquia, França, Alemanha, Inglaterra, Japão, Polônia e os Estados Unidos, tem desenvolvido muitos programas de pesquisa e são concernentes a aspectos

teóricos ou problemas práticos, além dos métodos de aplicação de semelhantes preparações na planta. Os resultados obtidos até o presente momento, particularmente no Brasil onde o uso de preparações de Metaquino, que contêm conídios de *Metarhizium anisopliae*, introduzido na agricultura prática, demonstrando que fungos entomófagos oferecem possibilidades reais no controle de pragas. Em certos casos individuais eles oferecem soluções para problemas considerados críticos ou insolúveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens Utilizadas

Foram utilizadas neste trabalho 7 linhagens de *Metarhizium anisopliae*, obtidas do banco de germoplasmas de fungos entomopatogênicos da Universidade Estadual de Campinas, abaixo relacionadas.

A4 - *M. anisopliae*, var. *anisopliae*, isolada na Bahia em *Mahanarva posticata*.

A19 - *M. anisopliae*, var. *anisopliae*, isolada na Bahia em *Deois schach*.

E6 - *M. anisopliae*, var. *anisopliae*, isolada no Espírito Santo em *Deois flavopicta*.

E9 - *M. anisopliae* var. *anisopliae*, isolada no Espírito Santo em *Deois flavopicta*.

Ma102 - *M. anisopliae*, var. *anisopliae*, isolada nos U.S.A. em *coleoptera*.

V14 - *M. anisopliae*, var. *anisopliae*, isolada nos U.S.A. em *coleoptera*.

F 84 - *M. anisopliae*, var. *anisopliae*, isolada nos U.S.A. em *co-*

Leoptera.

4.2. Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

4.2.1. Meio mínimo (*PONTECORVO* e *col. 1953*) (MM)

$NaNO_3$	6,0 g
KCl	0,5 g
KH_2PO_4	1,5 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,5 g
$FeSO_4.7\ H_2O$	traços
$ZnSO_4$	traços
Glicose	10,0 g
Água destilada	1.000 ml
Ágar em pó	15,0 g

O pH foi ajustado para 6,5 antes da esterilização com NaOH ou HCl. Foi autoclavado a 120°C por 15 minutos.

4.2.2. Meio completo (*PONTECORVO* e *col. 1953*) (MC)

Foi acrescentado ao meio mínimo:

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

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH ou HCl.

4.2.3. Solução de vitaminas

Ácido p-aminobenzóico	10 mg
Piridoxina	50 mg
Aneurina	10 mg
Ácido Nicotínico	100 mg
Biotina	0,2 mg
Riboflavina	100 mg
Água destilada	100 ml

Após esterilização em banho-maria, a solução foi guardada em frasco escuro com gotas de clorofórmio, no refrigerador a 4°C.

4.2.4. Hidrolisado de ácido nucléico de leveduras

Foram colocados 2 g de ácido nucléico de leveduras em 15 ml de solução normal de NaOH.

Foram colocados 2 g de ácido nucléico de leveduras em 15 ml de solução normal de HCl.

Ambas as soluções foram aquecidas por 20 minutos a 100°C. Após misturadas, filtradas e pH ajustado para 6,0, a mistura foi conservada no refrigerador a 4°C sobre clorofórmio.

4.2.5. Meio de batata

Infusão de batatas	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 ml

O pH foi ajustado para 6,5; a esterilização foi a 120°C por 15 minutos em autoclave.

4.2.6. Meio de arroz

Grãos de arroz integral	30 g
Água destilada	1000 ml

O pH foi ajustado para aproximadamente 6,8 e depois esterilização e cozimento por 20 minutos a 120°C.

4.2.7. Y_pS_s (Emerson)

Extrato de levedura	4,0 g
Amido solúvel (Difco)	15,0 g
K_3PO_4	1,0 g
M_gSO_4	0,5 g

Ao meio sólido foi acrescentado ágar (2%)

Água destilada	1000 ml

O pH foi ajustado para 7,0 após o que foi esterilizado por 20 minutos, a 120°C.

4.2.8. Solução de tween 80

Foram adicionados 0,1 ml de tween 80 em 99,9 ml de água destilada. Após agitação a solução foi distribuída em tubos de ensaio na quantidade de 2,5 ml. A seguir os tubos foram autoclavados e conservados no refrigerador.

4.2.9. Solução de salina

NaCl	8,5 g
Água destilada	1000 ml

Distribuiu-se em frascos (9 ml por frasco) e auto-

clavou-se.

4.2.10. Solução corante de Giemsa

Foram dissolvidos 1 g de Giemsa em 54 ml de glicerina a quente, depois de esfriar, adicionou-se 84 ml de metanol (PA) e filtrou-se, finalmente aqueceu-se em banho-maria.

4.2.11. Solução fixadora

Solução de álcool absoluto, ácido acético glacial e ácido lático na proporção 6:1:1.

4.2.12. Tampão fosfato

$Na_2PO_4.12\ H_2O$	8,95 g
KH_2PO_4	1,13 g
H_2O dest. q.s.q.	1000 ml
pH ajustado	7,0

Foi aquecido rapidamente para dissolver e esfriado imediatamente. A seguir, guardado no refrigerador.

4.2.13. Solução de albumina (*ROBINOW e CATEN, 1969*)

Adicionou-se 5% de clara de ôvo a água destilada esterilizada. Manteve-se a solução no refrigerador, em frasco escuro.

4.2.14. Soluções de álcool etílico

Estas soluções foram utilizadas para hidratação do material, nas seguintes concentrações: 50%, 70% e 95%. Realizou-se a diluição com água destilada.

4.3. Esterilização de Vidraria

Toda a vidraria foi lavada e depois colocada em forno de 180°C por duas horas.

4.4. Temperatura e Tempo de Incubação

Usou-se a temperatura ambiente, a princípio no repique das linhagens e depois sempre a temperatura de 28°C. A incubação, foi por um período de 12 h, 18 h e 24 h para verificação da taxa de germinação. O período de 7, 8, 10 e 13 dias foi usado para observar o crescimento, morfologia das colônias, produção de conídios, aparecimento de mutantes e outros.

4.5. Tamanho dos Conídios

Das 7 linhagens de *M. anisopliae*, foram tomadas de culturas jovens, crescidas em MM, conídios que foram suspensos em gôtas numa lâmina, sem coloração. As medidas foram efetuadas com o auxílio de um microscópio óptico, usando-se uma ocular milimetrada previamente calibrada em mícrons. Para cada conídio, foram efetuadas duas medidas. Uma delas do comprimento, e a outra, da largura. Para cada linhagem foram medidos 50 conídios em diferentes campos do microscópio.

5.6 Porcentagem de Conídios Binucleados

Foram preparadas lâminas das 7 linhagens de *M. anisopliae*. Tomaram-se conídios provenientes de culturas jovens de MM, que foram espalhados numa lâmina úmida com albumina. Depois de secos foram submetidos a uma solução fixadora por 10 minutos, após o que, hidratados em soluções de Álcool Etílico a 95%, 50% e

H_2O destilada respectivamente. Depois sofreram hidrólise em HCl 1N a frio durante 5 minutos e em seguida a quente por 6 minutos. Os conídios foram lavados em solução Tampão Fosfato por 5 vezes e depois corados por 10 a 15 minutos com 5 ml de solução Tampão Fosfato e 9 gôtas de solução de Giemsa. Depois da lâmina lavada com água destilada para se retirar o excesso de corante e seca, foi levada ao microscópio óptico sob imersão, quando se examinou o número de núcleos de 500 conídios em diferentes campos microscópicos.

4.7. Taxa de Germinação

Suspensões de conídios das 7 linhagens, obtidos de MM e inoculados por 8 dias, foram preparadas em solução de Tween 80. Através de hematímetro estimou-se o número de conídios por ml. Diluições convenientes em salina foram efetuadas para se obter aproximadamente 100 conídios por placa, e distribuídas em placas contendo aproximadamente o mesmo volume dos meios: completo, mínimo e Y_pS_s e incubadas por 12 h, 18 h e 24 h, a temperatura de 28°C. As placas foram examinadas sob microscópio óptico nos tempos referidos para a verificação dos conídios que haviam germinado. Foram observados 500 conídios para cada linhagem, meios e tempos.

4.8. Morfologia das Colônias

Após crescimento de colônias das linhagens A4, A19, E6, E9, F84, Mal02 e V14 em tubos contendo meios: completo, mínimo e Y_pS_s, por 8 dias a 28°C, com o auxílio de um fio de platina, conídios foram transferidos e inoculados puntiformemente no centro de placas com aproximadamente o mesmo volume dos mesmos meios, segundo suas respectivas origens e mantidos a 28°C.

Depois de 7 dias foram observadas macroscópicamente a

morfologia das colônias e com o auxílio de uma régua, mediram-se o diâmetro das colônias. Foram examinadas 9 colônias em cada meio nas respectivas linhagens.

4.9. Produção de Conídios

Utilizando-se das colônias analisadas quanto à morfologia, procedeu-se à verificação do número de esporos produzidos em MC, MM e Y_pS_s. Com o auxílio de um "cortador de colônia", (Fig. nº 1 e 2), instrumento com lâminas paralelas de 1 mm de distância, cortaram-se 2 diâmetros de cada colônia, cujos conídios foram suspensos em Tween 80 após agitação, foi avaliado o número de conídios em hematímetro. A suspensão foi diluída convenientemente em salina e inoculada em meio completo. Após 8 dias procedeu-se a contagem das colônias.

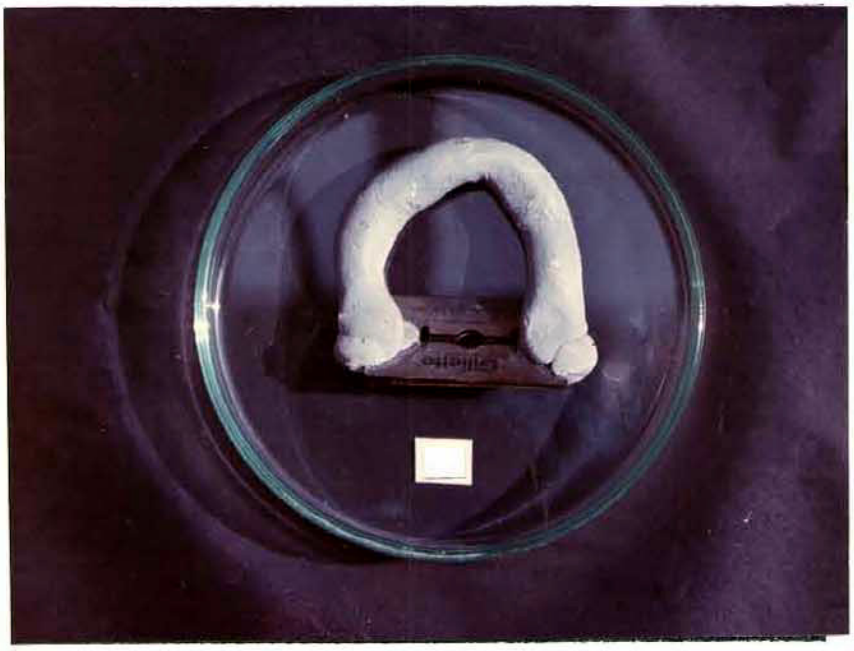


Figura - 1. "Cortador de colônia", instrumento de lâminas paralelas de 1 mm de distância.

UNICAMP

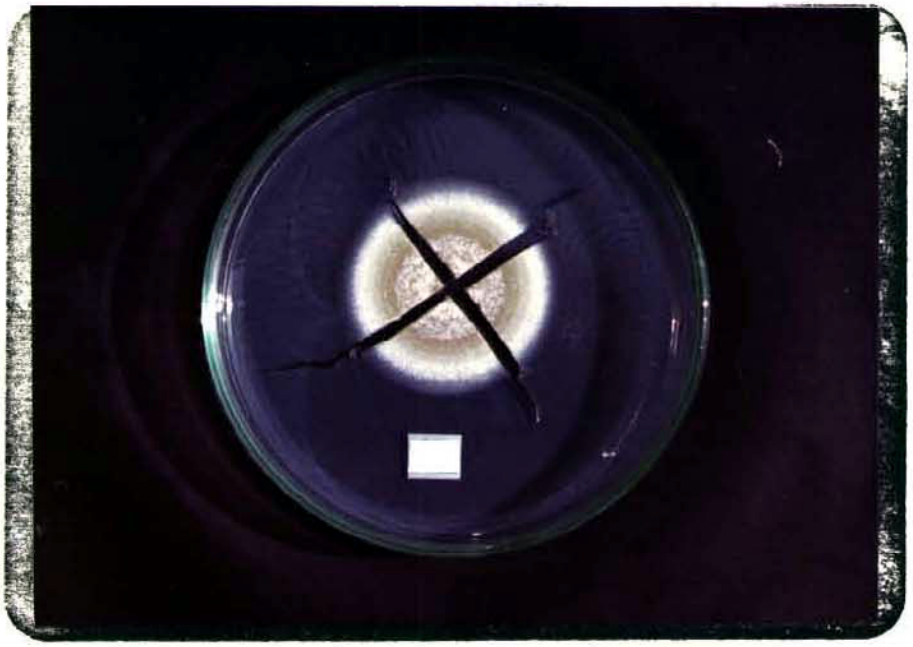


Figura - 2. Colônia da linhagem de *M. anisopliae*, crescida em MC, em 10 dias, a 28°C, cortada por um "cortador de colônia", para a contagem dos conídios produzidos (E6).

4.10. Resistência a Luz Ultravioleta

Esporos das 7 linhagens de *M. anisopliae*, foram transferidos para solução de Tween 80, estimando-se o número de conídios por ml através de hematímetro ao microscópio. Em seguida as soluções foram diluídas em salina e colocadas em placas de Petri esterilizadas, e efetuaram-se irradiações, mantendo-se as suspensões irradiadas a uma distância de 15 cm da fonte de ultravioleta (2.537 Å). Após cada tempo de irradiação, semeou-se 0,1 ml por cada placa com MC. As placas foram incubadas e, após 8 dias, procedeu-se a contagem do número de colônias. Considerando-se o número de colônias sobreviventes, calculou-se a LD_{50} e LD_{95} utilizando-se a metodologia proposta por *BARACHO e ROSIN (1977)*. Com os dados obtidos pode-se comparar as linhagens e construir curvas de sobrevivência.

5. RESULTADOS

5.1. Tamanho dos Conídios

Em cada linhagem, foram tomadas duas medidas: comprimento e largura, que se encontram na Tabela I. Na Tabela II, encontram-se a média, o desvio padrão e variância de cada linhagem quanto ao comprimento e a largura dos conídios medidos em mícron.

Tabela I. Medidas do comprimento e da largura dos conídios de 7 linhagens de *M. anisopliae* em µm. C = comprimento L = largura.

A4		A19		E6		E9		F84		Mal02		V14	
C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L
05.805602	4190005	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	2894402	4190005	8056002	9028
03.805602	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	7732002	4190007	7408002	4190
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
06.773202	4190005	8705603	4190005	2894402	4190006	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
05.321802	4190005	2570002	4190007	8380002	4190004	2570002	4190007	8380002	4190004	2570002	4190007	8380002	4190
05.773202	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	7408002	4190007	7408002	9352
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	3218002	4190
07.740802	4190005	7732002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2246002	4190006	2894002	9028
05.805602	4190005	2894402	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	4190
05.805602	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	7408002	4190007	7408002	9352
05.805602	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	3218002	4190
06.289402	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
05.321802	4190005	2570002	4190007	3218002	4190005	3218002	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	4190
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190006	2894402	4190006	2570002	4190007	2570002	4190
03.676002	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
05.321802	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
06.289402	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
05.805602	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
05.805602	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
04.838002	4190005	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
09.676002	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
06.289402	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
05.805602	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
06.289402	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
06.773202	4190005	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190
06.289402	4190005	8396002	4190006	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
07.257002	4190005	8396002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	9352
04.838002	4190005	1922002	4190006	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
07.257002	4190005	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	9352
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
05.321802	4190005	2570002	4190007	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
05.321802	4190005	2570002	4190007	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
07.740802	4190005	2570002	4190007	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4514
07.257002	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
07.257002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
05.321802	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
05.321802	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
07.740802	4190005	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4514
07.257002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
09.676002	4190005	7408002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4514
06.289402	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
02.419007	4190005	2570002	4190007	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4514
05.321802	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
07.257002	4190005	2570002	4190007	7408002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
09.676002	4190005	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4190004	8380002	4514
06.289402	4190005	7408002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
04.838002	4190005	3396002	4190006	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
04.838002	4190005	2894402	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	9352
06.773202	4190005	2894402	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	4190006	7732002	9352
07.257002	4190005	2570002	4190007	3218002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	4190005	8056002	9352
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
01.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
08.224602	4190005	2570002	4190007	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
05.805602	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
03.805602	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
05.321802	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
06.773202	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
08.224602	4190005	2570002	4190007	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
05.805602	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
03.805602	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
05.321802	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
06.773202	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
08.224602	4190005	2570002	4190007	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
05.805602	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
03.805602	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
05.321802	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
06.773202	4190005	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
08.224602	4190005	2570002	4190007	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894402	4190006	2894002	9028
04.838002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190
07.257002	4190005	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190007	2570002	4190

Tabela II. Comparação da média, desvio padrão e variância de 7 linhagens de *M. anisopliae*, considerando-se o comprimento e a largura dos conídios (µm).

Linhagens		Média	Desvio Padrão	Variância
A4	C	6,376484	1,356788	1,840875
	L	2,573181	0,6941777	1,4818827
A19	C	6,985972	1,333582	1,778441
	L	2,554464	0,3914588	0,1532400
E6	C	6,182964	0,8017855	0,6428599
	L	2,196452	0,3123173	0,0975421
E9	C	6,386160	0,6483502	0,4203579
	L	2,428676	0,2290188	0,05244963
F84	C	6,531300	0,6647209	0,4418539
	L	2,544788	0,25550699	0,06506064
Ma102	C	7,121536	1,508023	2,274133
	L	2,515760	0,3524163	0,1241973
V14	C	5,757220	1,067363	1,139264
	L	2,438352	0,8848793	0,7830113

A Tabela III e a Tabela IV, apresentam a análise de variância entre as larguras e comprimentos.

Tabela III. Análise de variância das larguras de conídios de 7 linhagens de *M. anisopliae*.

Análise de Variância	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Linhagens	6	5,1467	0,8578	3,417 **
Medidas	343	86,1118	0,2511	
TOTAL	349	91,2585		

Tabela IV. Análise de variância dos comprimentos de conídios de 7 linhagens de *M. anisopliae*.

Análise de Variância	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Linhagens	6	65,0160	10,84	8,884 **
Medidas	343	418,3514	1,22	
TOTAL	349	483,3674		

Observou-se pela análise estatística efetuada, que houve diferenças significativas entre os comprimentos e as larguras. Portanto as linhagens, no experimento e nas condições realizadas são diferentes entre si no tamanho de seus conídios.

5.2. Porcentagem de Conídios Binucleados

Em 500 conídios analisados, depois dos núcleos estarem corados (item 5.6.), foi encontrada a taxa de conídios binucleados, para as 7 linhagens. (Tabela V).

Tabela V. Porcentagem de conídios binucleados em 7 linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

A4	2,2
A19	2,2
E6	4,0
E9	4,5
F84	4,5
Ma102	3,1
V14	3,5

5.3. Taxa de Germinação

Após o cálculo da taxa de germinação, comparou-se as 7 linhagens entre si, em 3 meios de culturas diferentes e em 3 tempos diferentes, cujos resultados estão na Tabela VI, que resume os resultados de 500 observações para cada linhagem, segundo o item 4.7.

Tabela VI. Taxa de germinação em diferentes tempos e meios de 7 linhagens de *M. anisopliae* (em decimal).

	12 h			18 h			24 h		
Linhagens	MC*	Y_pS_s**	MM***	MC	Y_pS_s	MM	MC	Y_pS_s	MM
A4	0,96	0,96	0,95	0,97	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00
A19	0,97	0,96	0,98	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00
E6	0,96	0,97	0,98	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
E9	0,89	0,96	0,91	0,95	1,00	0,97	0,99	1,00	1,00
F84	0,78	0,94	0,56	0,90	0,95	0,79	0,93	0,98	0,84
Ma102	0,85	0,94	1,00	0,96	0,98	1,00	0,99	1,00	1,00
V14	0,87	0,89	0,90	0,90	0,92	0,93	0,95	0,96	0,96

*MC = Meio completo **Y_pS_s = Meio de Emerson ***MM = meio mínimo

A Tabela VII apresenta a análise de variância da taxa de germinação. Como o quadrado médio do resíduo é baixo, testou-se o F contra a interação Linhagens x Meios, para compensar o efeito de repetição. Verificou-se que o F foi significativo para as linhagens, tempos e não para os meios, nas condições em que foram realizados os experimentos.

Tabela VII. Análise de variância da taxa de germinação em diferentes tempos e meios de 7 linhagens de *M. anisopliae*.

C. de Variação	G.L.	S.Q	Q.M.	F(c/Resíduo)	F (c/L x M)
Linhagens	6	3801,7247	633,62078	55,82025867	5,0548 **
Meios	2	348,55135	174,27565	15,35320837	1,3902
Tempos	2	2211,55235	1105,77618	97,41585874	8,8213 **
Linh x Meios	12	1504,21921	125,35160	11,0431333	
Linh x Tempos	12	78,31465	6,52622	0,5749421421	
Meios x Tempos	4	35,83055	8,95764	0,7891435976	
Linh x Meios x Tempos (Resíduo)	24	272,42619	11,35109		
TOTAL	62	8252,619			

Para a análise estatística, utilizou-se a transformação *arco seno* $\sqrt{taxa.}$ Quanto a análise estatística das linhagens:

$F = \frac{633,6208}{125,3516} = 5,05$. Para o teste de Tukey a 5%, N1=6 e N2=12:

$A = 4,75 \frac{\sqrt{125,3516}}{\sqrt{9}} = 17,7270$

Quanto a análise estatística dos tempos:

$F = \frac{1105,7762}{125,3516} = 8,82$

Para o teste de Tukey a 5%, N1=2 e N2=12:

$A = 9,2116$.

Pela análise realizada, verificou-se que há diferenças entre as linhagens e os tempos, mas não houve variação significativa na germinação quando foram comparados os 3 meios de cultura.

5.4. Morfologia das Colônias

Nas observações macroscópicas das colônias, verificou-se que todas apresentam formas circulares, e conídios regular-

mente distribuídos pela superfície.

As linhagens A4, A19 e V14 possuem após 7 dias, uma parte central verde, cerca de metade da colônia e a periferia toda com predominância micelial. Depois de alguns dias mais, elas vão se tornando mais escuras em toda a superfície. As linhagens E6 e E9 são as que apresentam visualmente maior área coberta de conídios, também verdes escuros, a princípio no centro e na porção intermediária e escurecendo ainda mais com o tempo, a exemplo da A4 e A19. A linhagem Mal02, um tanto micelial a princípio, mas logo uma coloração amarela toma conta de quase toda a superfície e com o tempo também vai se escurecendo. A linhagem F84, visualmente a mais micelial de todas, predominância de micélio por toda a superfície e poucas áreas escuras com conídios as vezes por baixo da abundância micelial. (Figuras 3-8).

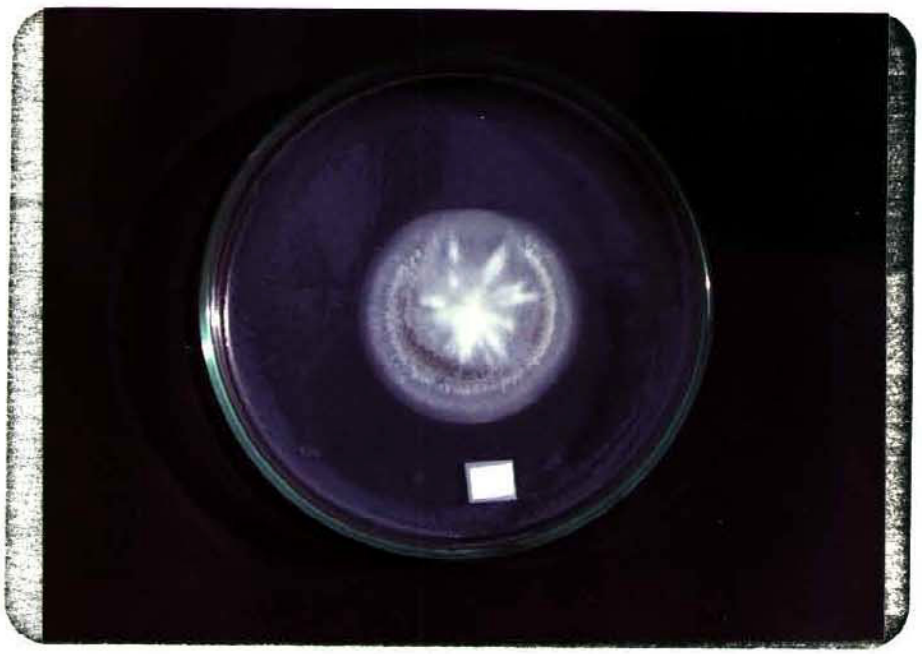


Figura 3. Colônia da linhagem F84 de *M. anisopliae*, crescida no meio Y_pS_s, durante 10 dias a 28°C.

Figura - 4. Colônia da linhagem E9 de M. *anisopliae*, crescida no meio Y_pS_s, durante 10 dias a 28°C.

Figura - 5. Colônia da linhagem E9 de M. *anisopliae*, crescida no meio completo, durante 10 dias a 28°C.

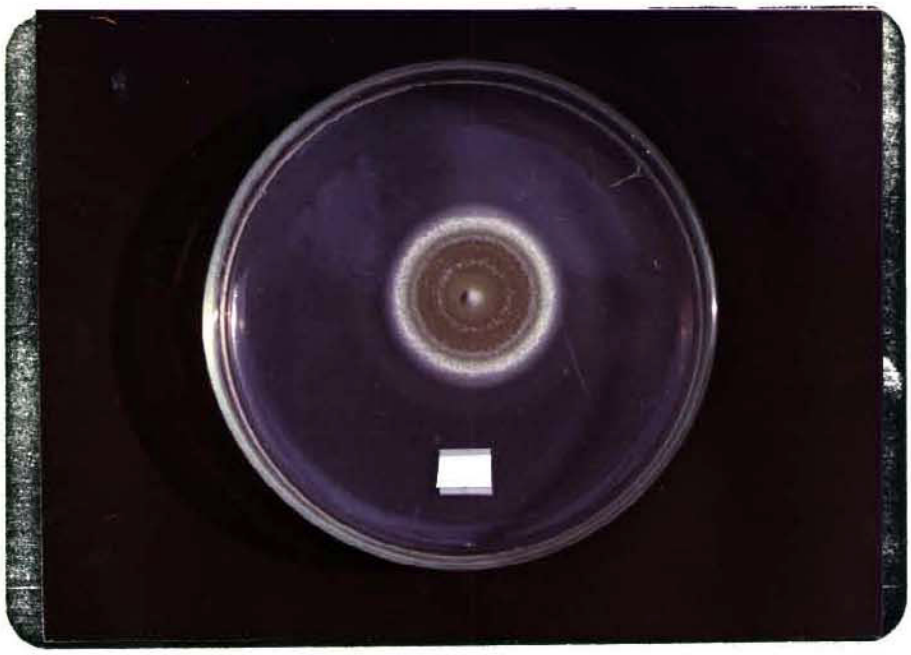


Figura - 16. Colônia da linhagem E6 de M. *anisopliae*, crescida no meio Y_pS_s, durante 10 dias a 28°C.

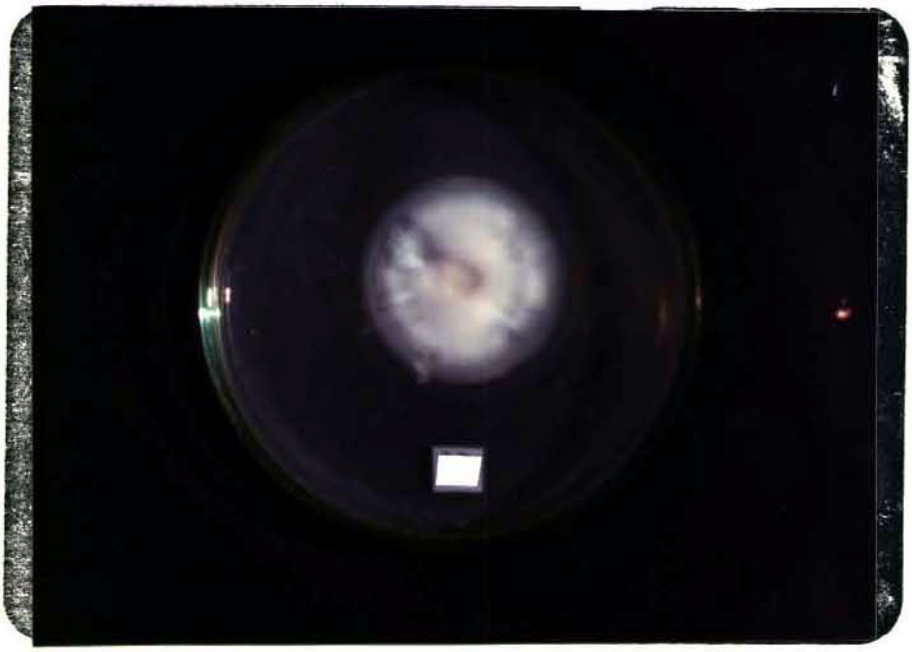


Figura - 17. Colônia da linhagem Mal02, de M. *anisopliae*, crescida no meio Y_pS_s, durante 10 dias a 28°C.

Figura - 8. Colônia da linhagem Mal02 de M. *anisopliae*, crescida no meio mínimo, durante 10 dias e 28°C.

Quanto ao tamanho das colônias, a Tabela VIII apresenta os resultados, que são frutos de 9 medidas do diâmetro médio das 7 linhagens em 3 meios e em 7 dias de crescimento, a 28°C.

Tabela VIII. Tamanho médio (cm^2) das colônias de 7 linhagens em 3 meios e em 7 dias a 28°C de *M. anisopliae*.

Linhagens	A4			A19			E6			E9		
Meios / Repetições	MC	Y_pS_s	MM	MC	Y_pS_s	MM	MC	Y_pS_s	MM	MC	Y_pS_s	MM
1	9,00	5,30	3,80	8,04	5,30	3,80	8,04	3,80	3,80	9,00	5,30	3,80
2	8,04	5,30	3,80	8,04	5,30	3,80	8,04	3,80	3,80	9,00	5,30	3,80
3	7,07	7,07	3,14	6,15	6,61	3,14	6,61	6,61	3,14	6,16	6,61	3,14
4	7,07	5,30	3,14	6,61	6,15	3,14	5,73	6,61	2,54	7,55	7,55	3,14
5	8,04	4,90	3,14	7,07	7,07	3,14	4,91	7,07	3,14	7,55	6,61	3,14
6	8,04	5,30	4,52	7,07	4,09	4,15	8,04	5,30	4,91	9,62	4,91	3,14
7	4,52	2,84	4,52	7,07	4,09	4,15	9,62	4,91	4,91	9,00	5,30	3,14
8	5,30	3,80	2,27	4,15	3,14	2,84	5,30	4,15	2,01	5,30	4,15	2,27
9	7,07	7,07	2,27	7,07	4,15	2,27	5,30	4,15	2,01	7,07	2,01	2,54
Média	7,13	5,21	3,40	6,81	6,81	3,38	6,84	5,16	3,36	7,81	5,30	3,12

Linhagens	F64			Ma102			Y14		
Meios / Repetições	MC	Y_pS_s	MM	MC	Y_pS_s	MM	MC	Y_pS_s	MM
1	9,65	7,07	4,91	8,04	7,07	4,91	7,07	6,15	4,91
2	9,65	7,07	4,91	8,04	7,07	4,91	7,07	6,15	4,91
3	9,65	9,00	3,14	7,07	8,55	5,30	4,91	4,91	1,33
4	4,15	9,00	6,15	6,15	8,04	5,30	4,91	4,91	1,33
5	9,00	7,07	6,15	6,61	3,14	3,46	4,91	4,91	2,84
6	7,07	7,07	3,14	8,55	6,61	4,91	7,55	3,80	1,77
7	7,07	7,07	2,54	8,04	6,61	4,91	4,91	3,80	1,54
8	8,55	5,30	4,52	8,04	5,73	3,80	4,91	3,80	1,33
9	8,04	5,30	4,52	7,55	5,30	3,46	2,27	2,54	1,54
Média	8,09	7,11	4,44	7,57	6,46	4,55	5,39	4,55	2,39

A Tabela IX apresenta a análise estatística sobre as medidas das áreas das colônias.

Tabela IX. Análise de variância do tamanho das colônias de 7 linhagens de *M. anisopliae*.

Causas de variação	G.L	S.Q.	Q.M.	F	
Linhagens	6	4,118155	0,686359	29,9632	**
Meios	2	21,929366	10,964683	478,6661	**
L x M	12	0,799826	0,066652	2,9097	
Linhagens x Meios	20	26,847347	1,342367		
Resíduo	168	3,848333	0,022907		
TOTAL	188	30,695681	0,163275		

Pela análise estatística realizada, verificou-se que há diferenças entre as linhagens e os meios a 1%. Foi utilizada na análise a raiz quadrada das áreas. A linhagem V14 apresentou a menor área, F84 e Mal02 as maiores, sendo que as demais tiveram tamanhos intermediários.

5.5. Produção de Conídios

A Tabela X sumariza os resultados encontrados segundo o método do ítem 4.9.; portanto é média de 2 cortes de cada colônia, considerando-se nove colônias.

Tabela X. Produção de conídios por cm^2 em 7 dias a 28°C em 3 meios (nº conídios x $10^6/cm^2$) de *Metarhizium anisopliae*.

Linhagens	MC	$Y_p S_s$	MM
A4	2,41	4,38	2,21
A19	2,60	4,35	1,39
E6	6,91	12,93	3,80
E9	5,54	12,88	2,36
F84	0,29	0,34	0,15
Mal02	2,07	4,09	1,36
V14	3,61	6,72	3,13

A Tabela XI apresenta a análise estatística para a produção de conídios.

Tabela XI. Análise estatística sobre a produção de conídios por cm^2 em 7 dias a 28°C em 3 meios de *Metarhizium anisopliae*.

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M	F
Linhagens	6	127,6770	21,2795	5,8977 **
Meios	2	74,1006	37,0503	10,2687 **
Linhagens x Meios	12	43,2972	3,6081	
TOTAL	20	245,0748		

Verificou-se pela análise, que houve diferença entre os meios quanto à produção de conídios de acordo com o experimento realizado. As linhagens que mais produziram conídios foram E9 e E6,

depois V14, seguidas por A4, A19 e Mal02. A linhagem F84 foi a menos produtiva. Quanto aos meios, houve predominância de esporulação no Y_pS_s, seguido pelo MC e depois MM.

5.6. Resistência a luz ultravioleta

A Tabela XII sumariza a porcentagem de sobrevivência de *M. anisopliae*, à luz ultravioleta, utilizando-se do método relatado no ítem 4.10.

Tabela XII. Porcentagem de sobrevivência de *M. anisopliae* a luz ultravioleta.

Tempo de irradiação (minutos)	% de Sobrevivência						
	A4	A19	E6	E9	F84	Mal02	V14
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	83,3	80,5	90,4	89,3	77,0	81,8	90,2
2	58,8	61,0	79,0	80,5	65,0	68,6	79,0
4	31,5	27,2	51,1	65,0	41,7	45,0	52,0
8	9,3	2,7	20,0	29,1	19,9	4,6	19,0
10	3,5	0,8	8,1	12,1	10,0	2,3	7,2
12	1,5	0,3	3,5	8,7	4,2	1,2	2,7
15	0,2	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	1,7

Com base nos dados da Tabela XII, constituiram-se curvas de sobrevivência a luz ultravioleta das 7 linhagens estudadas.

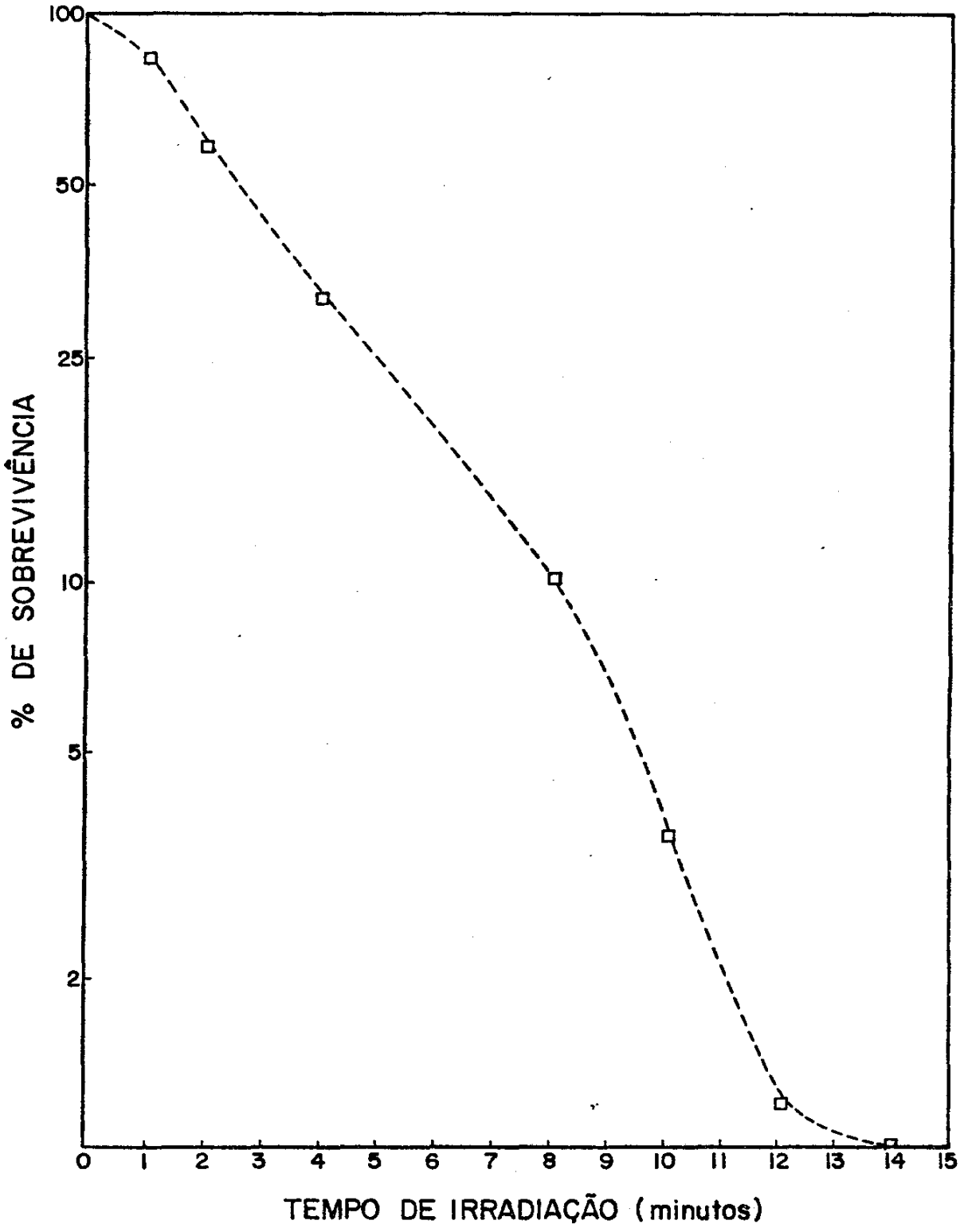


Figura - 9. Curva de sobrevivência da linhagem A4, de *Metarhizium anisopliae*.

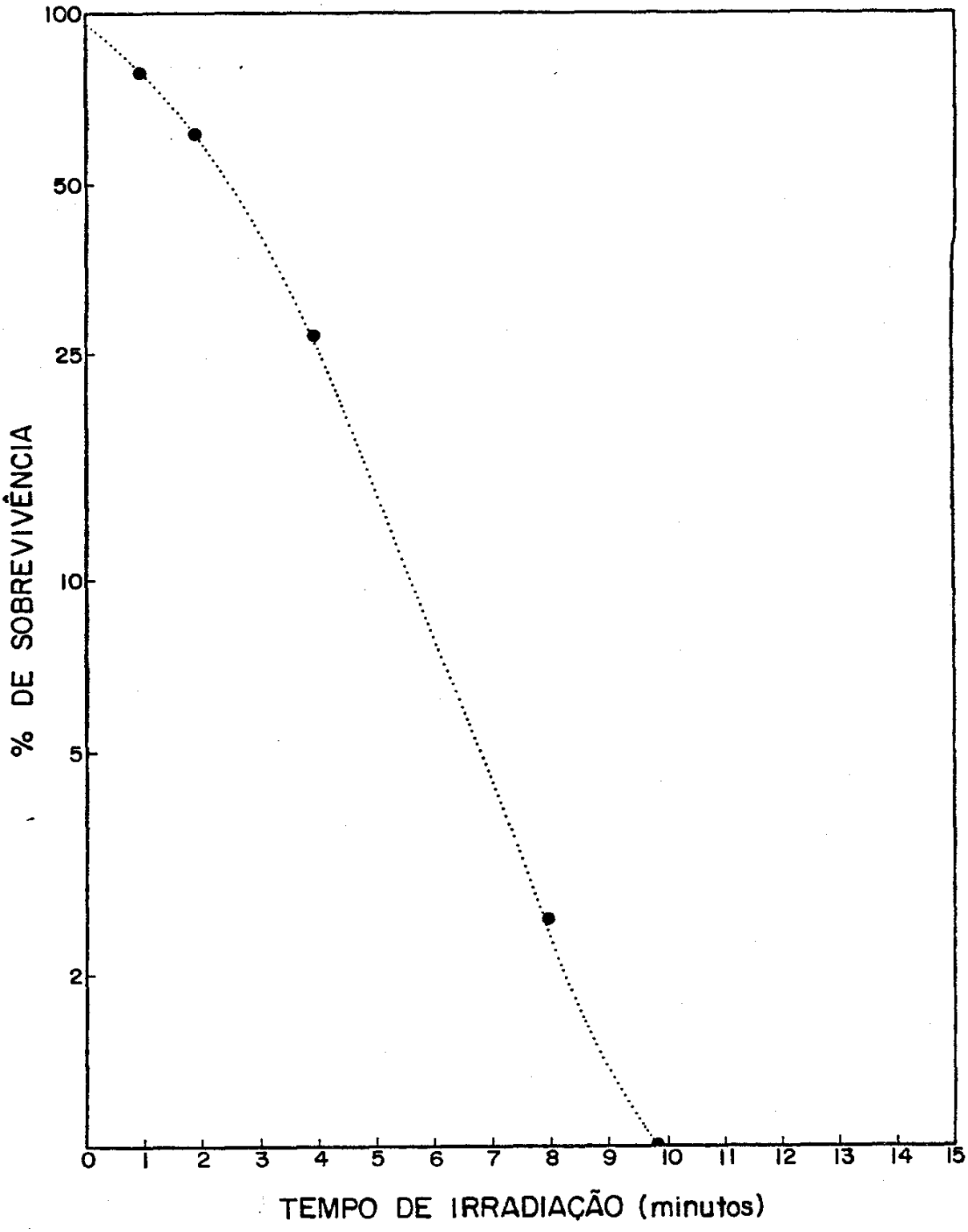


Figura - 10. Curva de sobrevivência da linhagem A19, de *Metarhizium anisopliae*.

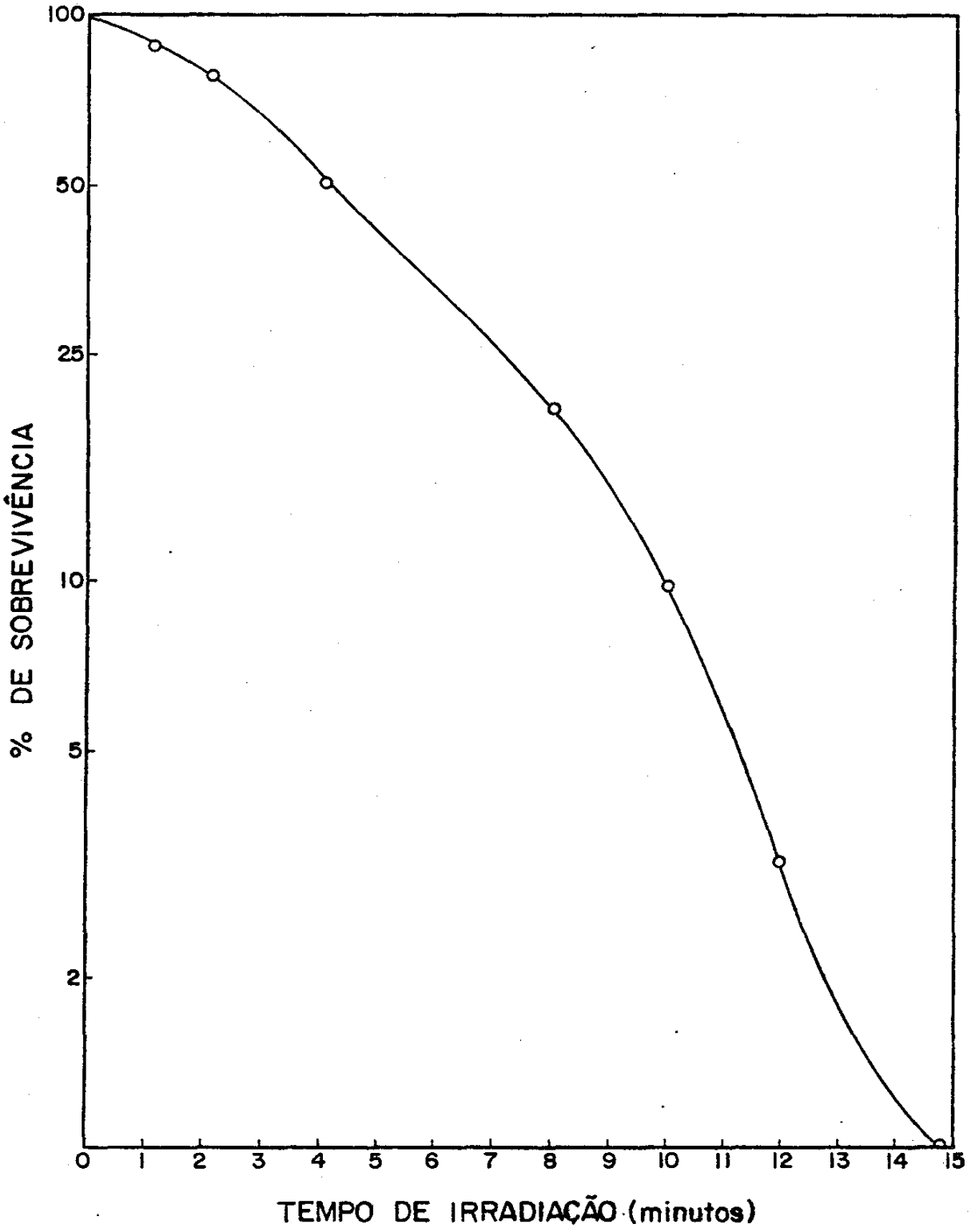


Figura - 11. Curva de sobrevivência da linhagem E6, de *Metarhizium anisopliae*.

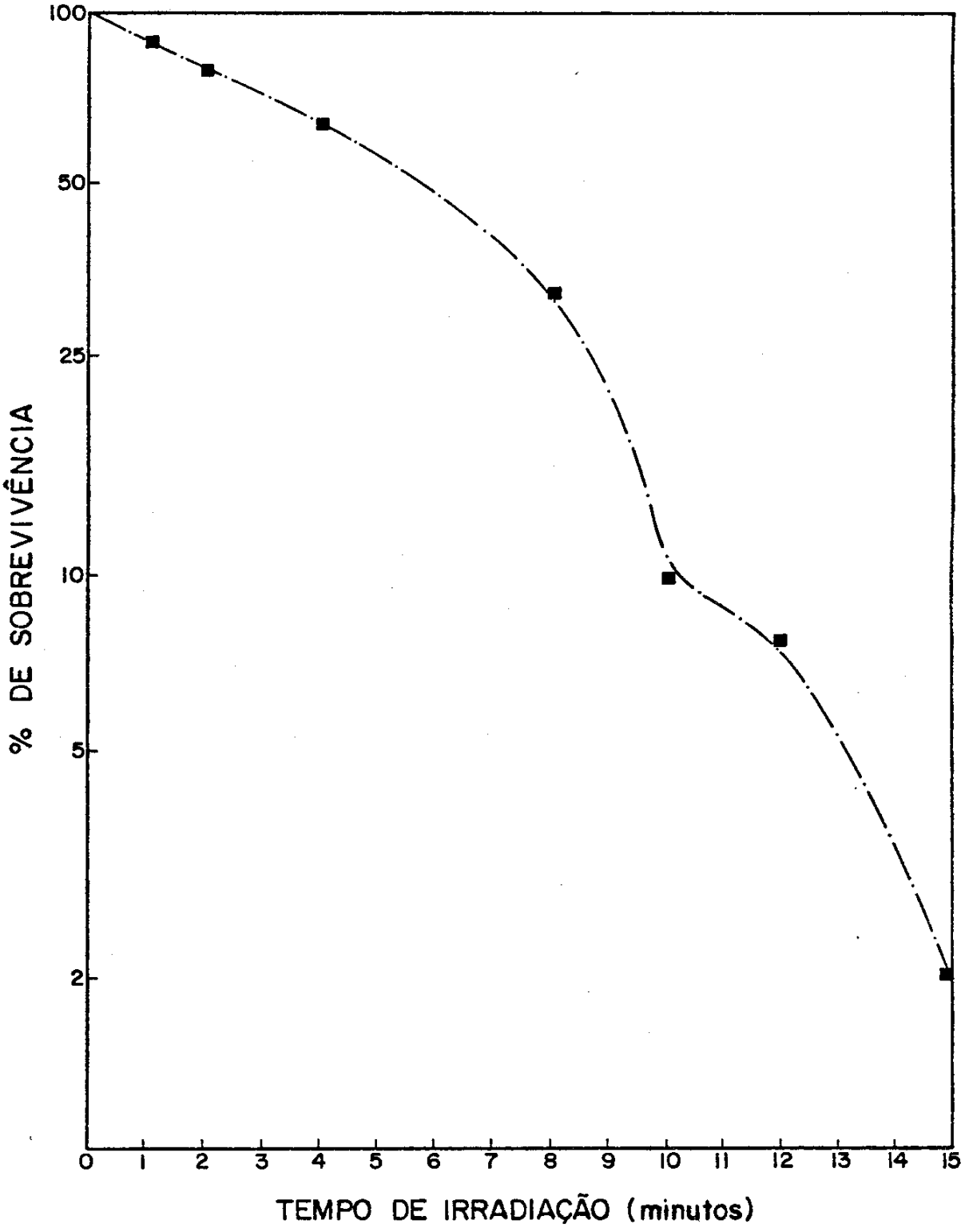


Figura - 12. Curva de sobrevivência da linhagem E9, de *Metarhizium anisopliae*.

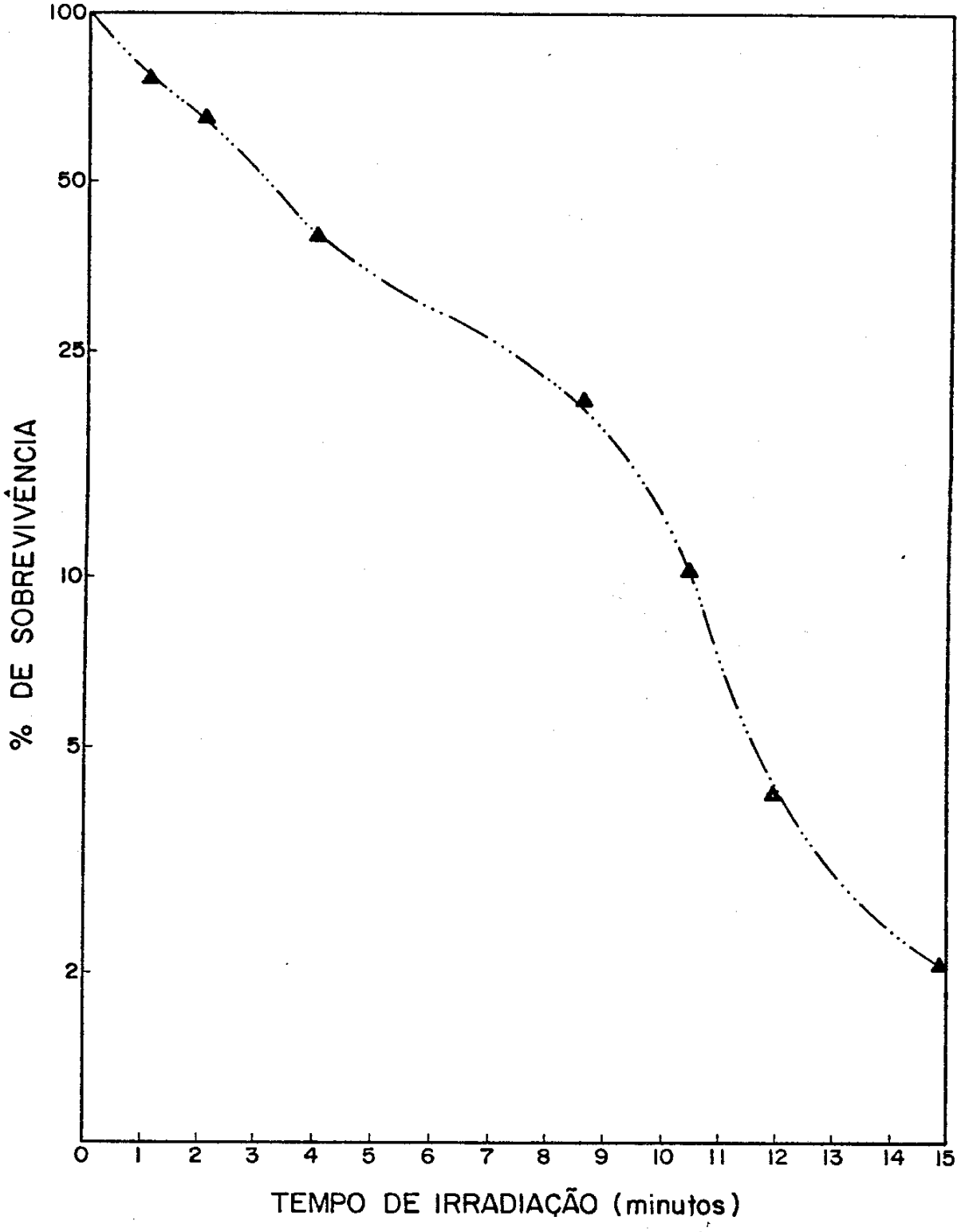


Figura - 13. Curva de sobrevivência da linhagem F84, de *Metarhizium anisopliae*.

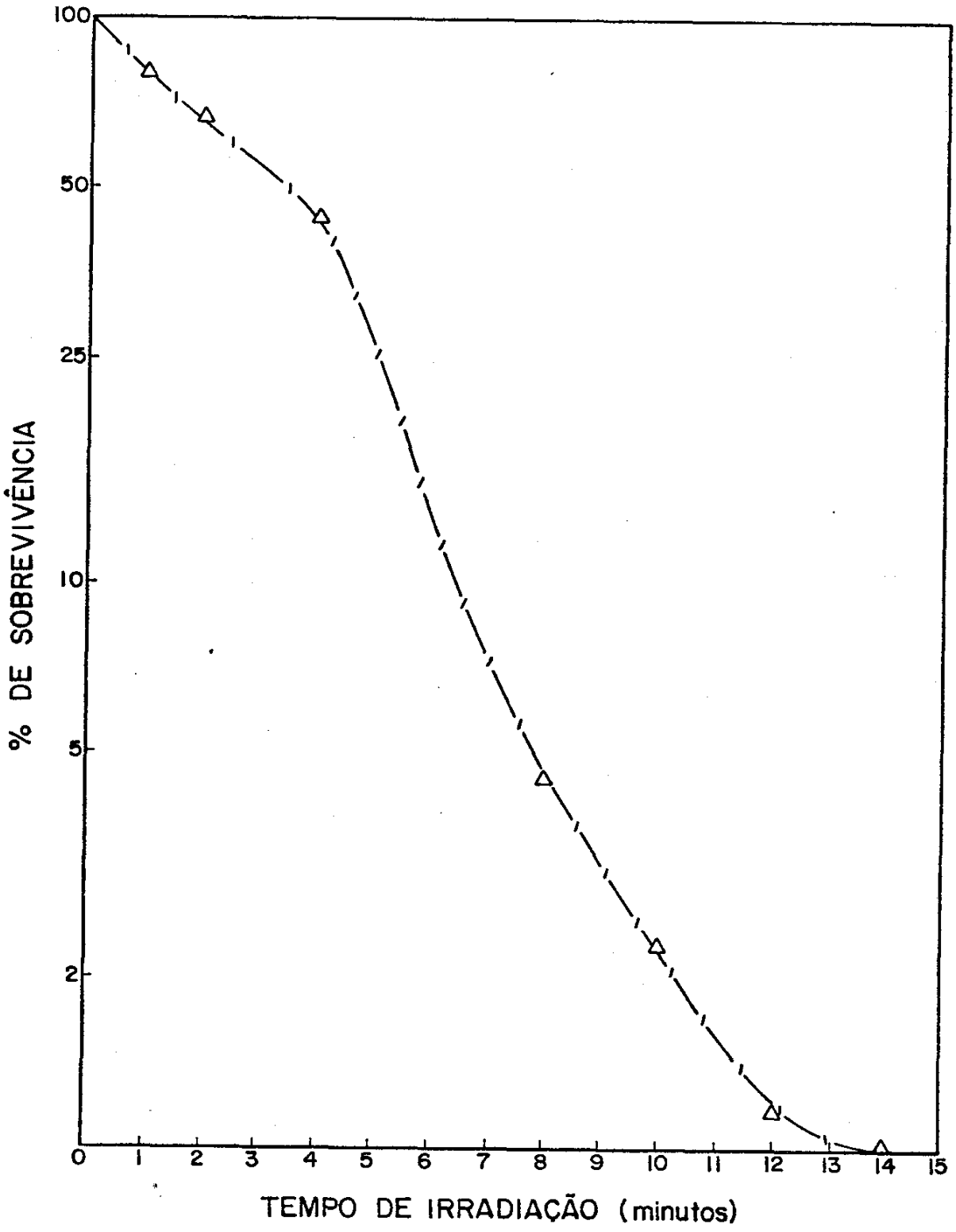
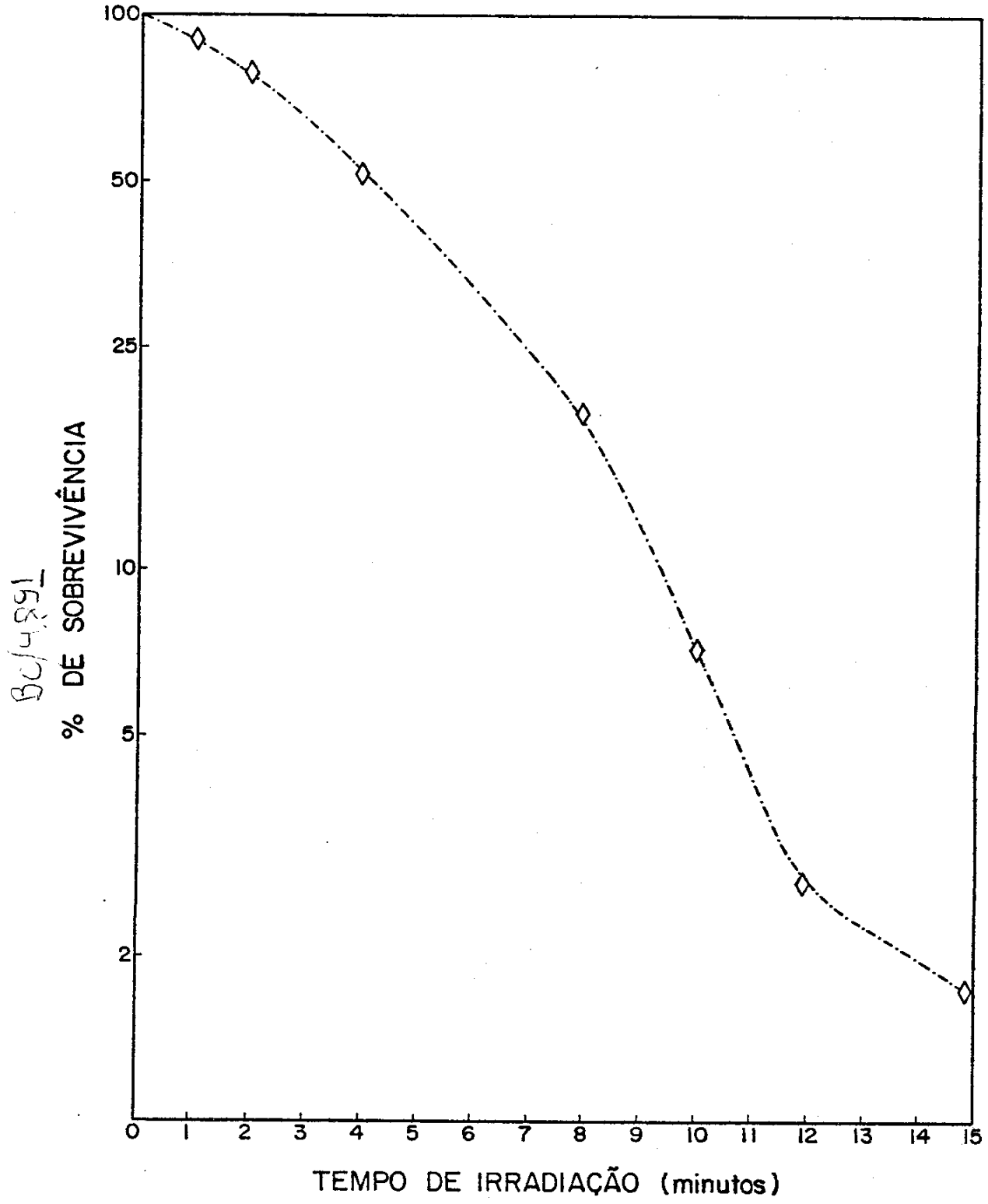


Figura - 14. Curva de sobrevivência da linhagem Ma102, de *Metarhizium anisopliae*.



BC/4891

Figura - 15. Curva de sobrevivência da linhagem V14, de *Metarhizium anisopliae*.

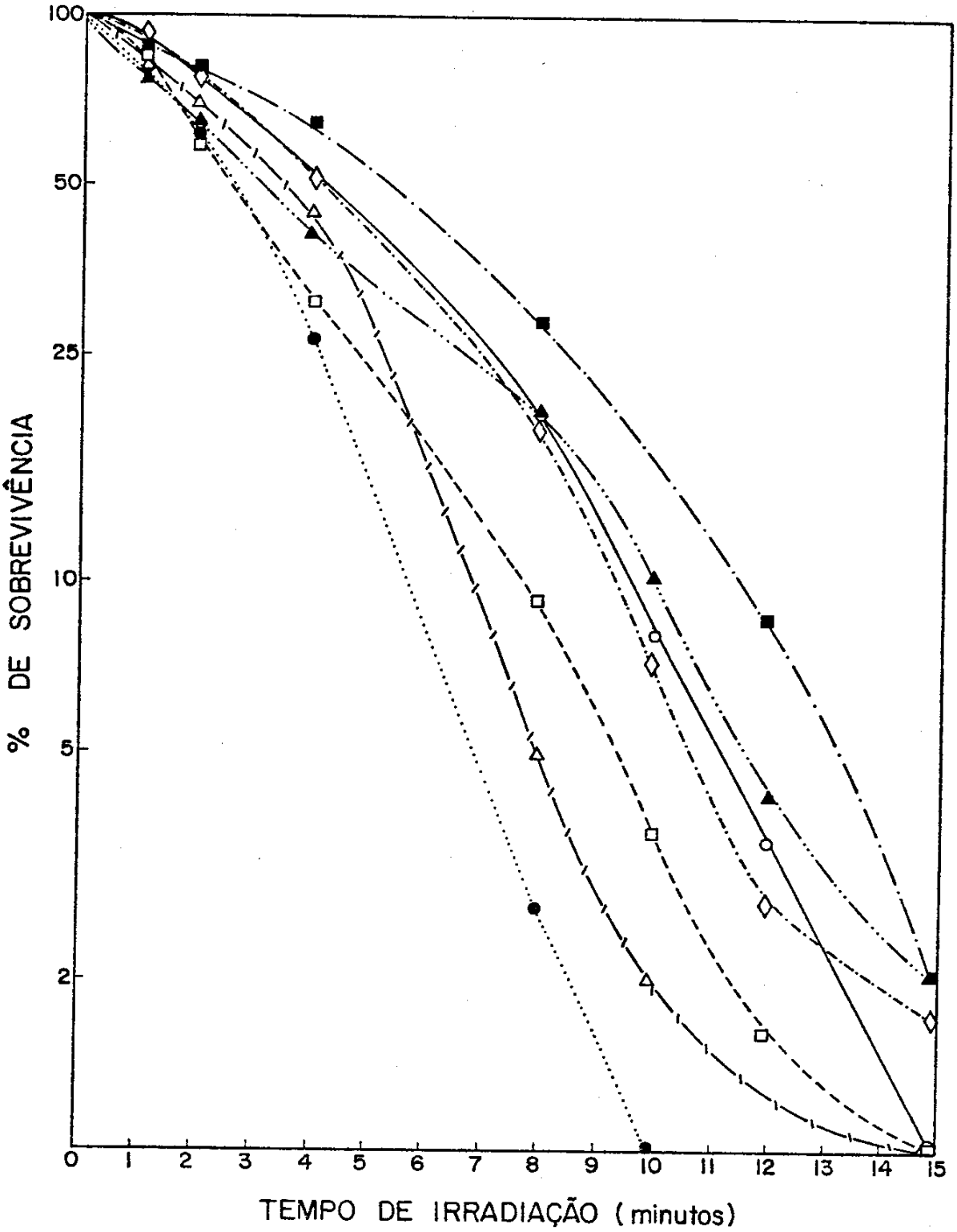


Figura - 16. Curvas de sobrevivência das 7 linhagens de *M. anisopliae*.

A4 --- ◇
A19 ... ●
E6 —— ○
E9 ——·— ◆
F84 ——·..— ▲
Ma102 ——/—— △
V14 ——·—·—·— ◇

A Tabela XIII, apresenta a LD_{50} e LD_{95}. Os calculos foram efetuados, utilizando-se da metodologia de *BARACHO* e *ROSIN* (*1977*).

Tabela XIII. Resistência a luz ultravioleta, , (LD_{50} e LD_{95}), em minutos de 7 linhagens de *M. anisopliae*.

Linhagens	LD_{50}	LD_{95}
A4	2,6	9,5
A19	2,2	7,0
E6	4,0	11,3
E9	4,8	12,3
F84	3,5	11,8
Mal02	2,9	8,1
V14	4,1	10,6

Valendo-se ainda da metodologia citada anteriormente, calculou-se os limites inferior e superior da LD_{50}, para se verificar quais linhagens diferem quanto a resistência a luz. Os dados estão na Tabela XIV.

Tabela XIV. Limite inferior e superior da resistência a luz (LD_{50}), em minutos de linhagens de *M. anisopliae*.

Linhagens	Limite Inferior	Limite Superior
A4	2,2	3,0
A19	1,8	2,5
E6	3,0	4,9
E9	3,4	6,5
F84	2,5	4,5
Mal02	2,2	3,5
V14	3,8	4,5

Com os dados das Tabelas XIII e XIV, construiu-se um gráfico, comparando a resistência a luz ultravioleta, obedecendo os limites e a média (LD_{50}). (Figura 17).

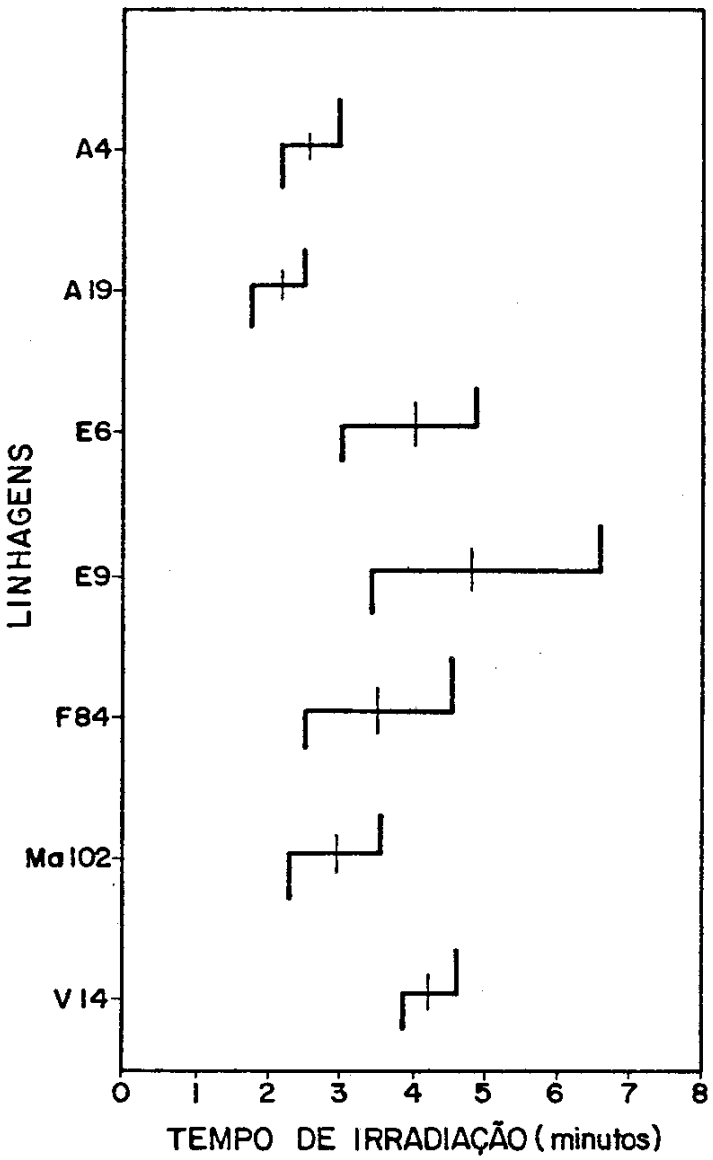


Figura 17. Comparação da resistência de 7 linhagens de *M. anisopliae*, a luz ultravioleta.

Pela observação da Figura 17, pode-se concluir que a linhagem que teve a menor resistência foi A19. As linhagens E6, E9 e V14, tiveram resistências semelhantes a luz ultravioleta constituindo-se nas linhagens de maior resistência. As demais foram intermediárias.

6. DISCUSSÃO

6.1. Tamanhos dos Conídios

Pelos dados colhidos e análise estatística efetuada (item 5.1), pode-se verificar que houve diferenças significativas entre os tamanhos dos conídios, considerando-se o comprimento e a largura.

Houve correlação entre comprimento e largura em algumas linhagens, mais precisamente: A4 (-0,3950), E6 (0,3041) e V14 (-0,3378), já nas outras linhagens: A19 (0,2456), E9 (0,1866), F84 (0,0704) e Mal02 (0,0198), não houve correlação. Verificou-se portanto, correlação positiva entre o comprimento e largura dos conídios em uma linhagem, negativa em duas e não correlação na maioria (quatro linhagens).

Os resultados quanto ao tamanho dos conídios (comprimento e largura), concordam com *TINLINE* e *col.* (*1971*) e *AZEVEDO* e *MESSIAS* (*1981*).

Calculou-se o volume dos conídios baseando-se em cilindro, cujos resultados estão na Tabela XV, que se aproximam dos encontrados por *AZEVEDO* e *MESSIAS* (*1981*). Todavia é imprecisa esta determinação do volume, conforme afirmação dos pesquisadores cita-

dos, uma vez que os conídios tem a forma bastante irregular, variando desde quase cilíndricos até quase esféricos, e também por serem grosseiras as medidas em microscópio óptico.

Utilizando um "coulter chanelizer", *AZEVEDO* e *MESSIAS (1981)*, obtiveram medidas mais refinadas para o volume e sugerem que possivelmente o tamanho de diferentes isolados ou entre haplóides e diplóides, esteja relacionado com o número de núcleos contidos por esporo.

O experimento realizado evidenciou que as linhagens que tiveram conídios de menor volume (E6, E9 e V14), produziram mais esporos que as outras quatro com maior volume. A mesma correlação também pode ser observada quanto a resistência a luz ultravioleta (LD_{50}). (Tabela XV). Pode ser que o tamanho dos conídios esteja também relacionado com a patogenicidade a insetos, produção de enzimas e origem dos isolados, conforme sugerem: *SILVA, MESSIAS* e *BARACHO (1982)* e *ROSATO, MESSIAS* e *AZEVEDO (1981)*.

6.2. Porcentagem de Conídios Binucleados

O fungo *M. anisopliae* apresenta-se com conídios uninucleados; contudo cerca de 5% são binucleados. (*TINLINE* e col. *1971; VEEN, 1967, ZACHARUK, 1970; MESSIAS, 1979*).

Os conídios com 2 núcleos, como é sugerido por alguns pesquisadores, devem estar em processo de germinação, ou então são resultado de anastomose.

As diferenças entre tamanhos e volumes de esporos de

diferentes isolados ou entre haplóides e diplóides podem ser influenciados pelo número de núcleos contidos por esporo, portanto o volume maior dos conídios deve ser mais freqüente em binucleados, ou os conídios destes isolados apresentam maior quantidade de material genético.

Pelos resultados encontrados (item 5.2), parece haver relação entre o volume dos conídios, a porcentagem de conídios binucleados e a resistência a luz ultravioleta (Tabela XV).

6.3. Taxa de Germinação

No item 5.3, verificou-se que as linhagens são diferentes quanto a taxa de germinação e quanto ao tempo também, mas não se observaram diferenças significativas quanto aos 3 meios de cultura utilizados. As linhagens que tiveram a melhor taxa de germinação, considerando-se a taxa média de 3 tempos e nos 3 meios, foram A19 e E6 e as mais tardias neste experimento foram F84 e V14.

A germinação de conídios depende entre outras coisas da temperatura, umidade, concentração de nutrientes, maturidade do conídio, metabolismo endógeno tempo de incubação e composição e textura da membrana. O esporo é um reduto celular, e contêm material de reserva não usualmente apreciáveis. Sendo que a atividade metabólica do esporo é muito pequena em contraste com uma célula vegetativa, as respostas internas aos fatores ambientais podem ser totalmente diferentes. A água é essencial para certas atividades enzimáticas, para iniciar outras mudanças químicas e para aumentar o volume do esporo em germinação. Quando a temperatura estiver perto do ótimo, a atividade enzimática e a taxa de germinação são aumentadas. A germinação portanto é o resultado da ação de todos os fatores influenciáveis, operando ao mesmo tempo (TOMKINS

1929; YARWOOD, 1936; BRODIE e *NEUFELD, 1942; SNOW, 1948* e *LILY* e *BARNET, 1951*).

Existem muitos fatores, físicos e químicos que podem afetar negativamente (antagonismo), evitando ou retardando consideravelmente a germinação, ou podem também afetar positivamente (sinergismo), aumentando ou acelerando a germinação, podendo ser considerados como estimuladores da germinação. (*WAARD, 1971; MELIN, 1955* e *1959; GOGALA, 1970; BROWN* e *MERRILL, 1973; FRIES, 1966; OORT, 1974* e *BARNET, 1951*).

No experimento realizado no presente trabalho, tentando minimizar os fatores ambientais, para que se pudesse melhor comparar a germinação das linhagens, todas as culturas provenientes de MM, eram de mesma idade, foram incubadas à mesma temperatura, umidade e iluminação e obervadas em 3 tempos, 12 h, 18 h e 24 h.

Pelos dados estatísticos e nas condições do experimento, não houve possivelmente influência dos meios de cultura na germinação, pelo menos para a maneira como foi conduzido o experimento.

As linhagens A4, A19, E6, E9 e Mal02, foram as mais precoces, tomando-se 12 horas como referência. Para avaliar melhor este aspecto, haveria necessidade de se considerar tempos inferiores a 12 horas, pois em todos os casos, mais de 75% dos esporos já haviam germinado em 12 horas de incubação, tanto que, de 12 horas para 18 horas, não houve variação significativa na taxa de germinação, apenas havendo diferenças estatísticamente significativas em 24 horas, quando a taxa de germinação aproxima-se do seu clímax.

SANTOS (1978), demonstrou que a germinação em meios líquidos completos, batata e arroz, era diferente e que a maioria

dos conídios (quase a totalidade), já havia germinado antes das 12 horas de incubação em todos os meios.

AL-AIDROOS e *SEIFERT (1980)*, relacionaram o tempo de germinação do esporo com virulência e metabolismo de carboidratos das linhagens.

6.4. Morfologia das Colônias

A morfologia das colônias é caracteristicamente circular, em meio sólido, bem regular, algumas são bastante miceliais, outras já esporulam mais abundantemente. Macroscópicamente, é possível identificar algumas linhagens, quando selvagens, observando o aspecto da colônia, tonalidade (coloração), distribuição de conídios e outras características.

Houve no experimento, diferenças significativas quanto ao tamanho das colônias (item 5.4), mas nem sempre esteve relacionado com a produção de conídios, nem com a porcentagem de germinação.

A razão para o formato circular das colônias, ainda não está muito bem explicada. Numa população há rotação da hifa nos dois sentidos com predominância de um deles. Alguns autores, como *MADELIN* e *col. (1978); TRINCI, SAUNDERS, GOSRANI* e *CAMPBELI (1979)*, sugerem que este fenômeno deve ser causado pela rigidez do substrato. Pode ser que haja algum gene, não caracterizado regulando o sentido de rotação e a própria rotação fazendo com que todas as colônias sejam sempre circulares. Há evidências de que, repicagens sucessivas podem modificar a morfologia das colônias.

Quanto a coloração, fatores genéticos e ambientais determinam esta característica.

O tamanho da colônia está relacionado com a herança e especialmente a nutrição, umidade, temperatura e outros elementos físicos e químicos. No experimento realizado, verificou-se que houve diferenças quanto ao tamanho das colônias utilizando-se meios de cultura diferentes.

Os fatores que afetam o crescimento tem sido descritos, também para a germinação. *COLIN RUSS (1940), CLAYTON (1942), TOMKINS (1929), MACARA (1943), SNOW (1948)* e outros pesquisadores mais recentemente tem verificado que o meio de cultura, seguramente é o fator mais importante no crescimento da colônia, seguido de umidade. Durante a germinação, possivelmente esgotam-se as reservas nutritivas e o fungo tem que se valer do substrato para prosseguir seu crescimento.

6.5. Produção de Conídios

Pelos resultados encontrados no item 5.5, observou-se, que houve diferenças entre as linhagens e entre os meios quanto a produção de conídios. Algumas linhagens tiveram boa esporulação, outras intermediárias e pelo menos uma delas, teve baixa esporulação. Quanto aos meios, houve predominância no Y_pS_s, seguido pelo MC e depois MM.

Mantendo-se as mesmas condições externas, temperatura, umidade, meio de cultura, luz e outros, pode-se acreditar que as diferenças entre as linhagens sejam principalmente de ordem genética. A diferença entre os meios, evidenciou a importância das condições externas na esporulação.

BASTOS e *MATTA (1976); MATTA* e *OLIVEIRA (1978)* e *SANTOS (1978)*, concluiram que o fator luz também acha-se relacionado positivamente com a esporulação de *M. anisopliae*, após inoculação, e

para uma esporulação mais abundante, houve necessidade de luminosidade mínima constante de 144 horas, após a inoculação. Outras pesquisas também enfatizam a temperatura como fator determinante na esporulação.

Assim como há fatores estimulantes, outros contudo inibem uma abundante esporulação. Foi verificado, por exemplo, o efeito de repicagens em meio de arroz, na patogenicidade, morfologia e produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (*MURAYAMA, ALVES e ALMEIDA, 1982*). Foi verificado que mudanças morfológicas e atenuação da virulência ocorreram após a 8ª. repicagem. A partir da 6ª. repicagem, verificaram aqueles pesquisadores, que o tamanho e a forma dos esporos foram alterados, bem como a esporulação foi retardada, sendo esta sensívelmente menor. Muitos outros fatores que afetam a germinação afetam a produção de esporos.

A esporulação é um aspecto muito importante na avaliação comparativa dos vários fungos, e na escolha dos que melhor se prestam para controle biológico. Entre as linhagens e nas condições de laboratório estudadas, E6 e E9, seriam as mais vantajosas quanto a produção de conídios, conforme comparação na Tabela XV.

6.6. Resistência à luz ultravioleta

Pelos dados do item 5.6, verificou-se que as linhagens diferem entre si, quanto a resistência a radiação. As três linhagens dentre as estudadas que mais se destacaram por apresentarem maior resistência, LD_{50}, foram E6, E9 e V14. Foram as linhagens que também mais esporularam. Estas linhagens, pela comparação com a porcentagem de conídios binucleados, variaram de 3 a 5%.

Quanto as medidas do tamanho dos conídios, essas linhagens estiveram também entre as menores.

Pode haver alguma relação entre a resistência a luz ultravioleta, o tamanho do conídio, número de binucleados, esporulação e até mesmo patogenicidade.

Alguns outros fatores, também parecem influenciar a resistência a luz ultravioleta, como por exemplo a origem dos isolados.

CORREA (1982), ensaiou diferentes isolados provenientes de solos de Ibituina e Pau D'alho (Estado de S. Paulo) que diferem pela textura, e obteve diferentes resistências, quando submetidas à luz ultravioleta.

A resistência à radiações é muito útil a um fungo usado como agente controlador, que provoca doenças em insetos, porque, quando aplicado, há um período em que pode ficar sobre o solo, a vegetação ou sobre o corpo dos insetos, quando então recebe as radiações solares que poderão ser letais ou dificultar a ação do fungo. A radiação pode provocar modificações no DNA, que na maioria das vezes, inviabiliza o microorganismo.

Tabela XV. Comparação das 7 linhagens de M. *anisopliae* quanto ao comprimento, largura e volume dos conídios, tamanho das colônias, porcentagem de germinação e produção de conídios, LD_{50} e LD_{95} em relação a luz ultravioleta e porcentagem de conídios binucleados.

Linhagens	Comprim. dos conídios (µm).	Largura dos conídios (µm).	Volume dos conídios $(\mu m)^3$	Área das colônias (cm^2)-7 dias - 28°C.	Produção de conídios x 10^6 por Mm^2 - 7 dias - 28°C.	Produção de conídios x 10^7 por colônia 7 dias - 28°C.	Porcentagem de germinação em 3 meios e 3 tempos.	Porcentagem de germinação em 12 horas e 3 meios.	Porcentagem de conídios binucleados.	LD50 (minutos).	LD95 (minutos).
A4	6,38	2,57	22,12	5,25	3,0	15,7	98,6	95,9	2,2	2,6	9,5
A19	6,99	2,55	23,86	5,10	2,8	14,3	99,4	97,0	2,2	2,2	7,0
E6	6,18	2,20	15,61	5,12	7,9	40,5	99,0	97,0	4,0	4,0	11,3
E9	6,39	2,43	19,73	5,41	7,0	37,9	97,3	92,2	4,5	4,8	12,3
F84	6,53	2,55	22,15	6,55	0,3	2,0	87,5	75,9	4,5	3,5	11,8
Ma102	7,12	2,52	23,61	6,19	2,5	15,5	98,5	92,9	3,1	2,9	8,1
V14	5,76	2,44	17,92	4,11	4,5	18,5	92,5	88,7	3,5	4,1	10,6

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se concluir:

1. Que existe variabilidade entre as linhagens para tamanho de conídios, taxa de germinação, morfologia e crescimento das colônias e produção de conídios.
2. Os meios de cultura usados influiram na produção de conídios, mas não em sua germinação.
3. As linhagens produziram grande maioria de conídios uninucleados e houve diferenças na porcentagem de conídios binucleados, contudo a mesma não ultrapassou a 5%.
4. As linhagens com conídios de menor volume, produziram mais esporos e tiveram maior resistência a luz ultravioleta.

8. RESUMO

Estudou-se o crescimento, germinação e conidiação nos meios completo, mínimo e Y_pS_s e resistência a luz ultravioleta em linhagens de *Metarhizium anisopliae* (A4, A19, E6, E9, F84, Mal02 e V14; variedades *anisopliae*), um fungo entomopatogênico muito utilizado no controle biológico de pragas. O propóstito foi o de fornecer uma contribuição para o conhecimento da variabilidade natural existente, o que é importante como subsídio para estudos genéticos em andamento.

Inicialmente houve uma descrição do fungo, do seu ciclo parassexual, de seus requerimentos nutricionais e outros fatores que atuam neste microorganismo. A seguir relatou-se os materiais e os métodos empregados bem como os resultados encontrados na pesquisa.

Pode-se concluir, baseado nos resultados, que existe variabilidade entre as linhagens para tamanho de conídios, taxa de germinação, morfologia e crescimento das colônias e produção de conídios. Os meios de cultura usados influiram na produção, mas não em suas taxas de germinação e as linhagens com menor volume de conídios, produziram mais esporos e tiveram maior resistência a luz ultravioleta.

9. SUMMARY

It was studied the growth, germination and conidiation in the mediuns complete , minimal and Y_pS_s and resistance to ultraviolet light in strains of *Metarhizium anisopliae* (A4, A19, E6, E9, F84, Mal02 and V14; varieties *anisopliae*), a fungus used very much in the biological control of plagues with the purpose of supplying a contribution to the knowledge of the natural variability thereof, which is important as a subsidy to the genetic studies at course.

In the begining there was a description of the fungus, of its parassexual cicle, of its nutritional requeriments and other things that act in this microorganism. Next there was a description of the materials and methods used as well as the results found in the research.

Based on the results, you may conclude that there is an extensive variability among the strains for the sizes of conidials, rate of germination, morphology and growth of colonials and production of conidials. The mediuns of culture used, influenced in the production, but not in its rates of germination, and its strains with less volume of conidials, produced more spores and showed more resistance to the ultraviolet light.

10. LITERATURA CITADA

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

AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of a parassexual cycle in the Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal Genetics Cytology* 22: 309-314.

AL-AIDROOS, K., e ROBERTS, D. W., 1978. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae. *Canadian Journal Genetics Cytology* 22: 211-219.

AL-AIDROOS, K. e SEIFERT, A. M., 1980. Polysaccharide and Protein Degradation, Germination and Virulence against Mosquitoes in the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 36: 29-34.

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

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

AQUINO, M. L. N., 1974. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. *Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronomicas*, Recife, 72: 1-26.

AZEVEDO, J. L., 1976. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phitopathologica*, 2: 3-15.

AZEVEDO, J. L. e MESSIAS, C. L., 1977. Potencialidade do controle biológico de insetos por fungos. Trabalho apresentado no curso "Genética e Melhoramento de Plantas", ministrado no Instituto de Genética, ESALQ/USP, Piracicaba. 19 p.

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

AZEVEDO, J. L.; SANT'ANA, E. P. e BONATELLI Jr., R. 1977. Resistance and Mitotic instability to chloroneb and 1, 4 - oxathiin in *Aspergillus nidulaus*. *Mutation Research*, 48: 163-172.

BALAZY, S., 1966. Living organisms as regulators of population density of bark beetles in spruce forest with special reference to entomogenous fungi. *Poznanskie Towarzystwo Przyjaciol Nauk. Wydzial Nauk Rolniczych i Lesnyk. Prace Komisji Nauk Rolnizych i Komisji Nauk Lesnych*, 21: 3-50.

BARACHO, I. R. e ROSIN, R. T., 1977. Tabelo por la kalkulado de MD_{95}, e en fungoj. *Sciença Revuo*, Jugoslavio, 28: 223-225.

BASTOS, C. N., 1976. Metodologia para produção e acondicionamento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em larga escala. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, Salvador, 15: 1-4.

BASTOS, C. N.; FIGUEIREDO, J. M. e MATTA, E. A. F., 1976. Utilização do método de Castellani para conservação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, Salvador, 15: 12-13.

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

BASTOS, C. N.; MATTA, E. A. F. e FIGUEIREDO, J. M., 1976. Esporulação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, em meios de cultura de diferentes composições. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, Salvador, 15: 9-11.

BRODIE, H. J. e NEUFELD, C. C., 1942. The development and structure of the conidia of *Erysiphe Polygoni* DC. and their germination at low humidity, *Canadian Journal Research*, 20: 41-61.

BROWN, T. S. e MERRILL, W., 1973, Germination of basidiospores of *Fomes Applanatus*. *Phytopathology*, 63: 547-550.

BURNETT, J. H., 1975. *Mycogenetics*. London, John Wiley and Sons. 375p.

CADATAL, T. D. e GABRIEL, B. P., 1970. Efect of chemical pesticides on the development of fungi pathogenic to some rice insects. *Philippine Emtomologist*, Los Baños, 1: 379-395.

CAMARGO, L. M. P. C. A. e GABRIEL, D., 1980. Efeito de alguns herbicidas sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1833. *In: Resumos do VI Congresso Brasileiro de Entomologia*, Campinas, p. 348-349.

CARNEIRO, J. S.; SILVA, L. A. T. e ALVES, S. B., 1980. Efeito de

alguns defensivos "in vitro" sobre *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *In: Resumos do VI Congresso Brasileiro de Entomologia*, Campinas.

CASTELANI, A., *1939*. Viabilidade of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24: 226-270.

CLAYTON, C. N., *1942*. The germination of fungos spores in relation to controlled humidity. *Phytopathology*, 32: 921-943.

COLIN-RUSS, A., *1940*. A contribution to the study and control of mould growth in leather and other materials. *Journal of the International Society of Leather Trades Chemists*, 24: 395.

CORRÊA, G. S., *1982*. 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.

DE CONTI, E.; MESSIAS, C. L.; SOUZA, H. L. M. e AZEVEDO, J. L., *1980*. Eletrophoretic variation in esterases and phosphatase in eleven Wild-typ strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, 36: 293-294.

DELACROIX, M. G., *1893*. *Oospora destructor*, champignon produisant sur les insects la muscardine verts. Bulletin de la Societe Micologique de France, 9: 260-264 Apud: Petch, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transactions British Mycological Society*, 16: 55-75.

DOBERSKI, S. W., *1981*, Estudos de laboratório comparativo sobre 3 fungos patogênicos de *Elm Bark Beetle Scolytus*: Efect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, Metar-

hizium anisopliae and Paecilomyus farinosus. Journal of Invertebrate Pathology, 137: 195-200.

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

DURIEZ-VANCELLE, T.; FARGUES, J.; ROBERT, P. H. e POPEYE, R. 1981. Estude enzimatique comparee de champignous entomopathogenes des genres *Beauveria et Metarhizium. Mycopathologia*, 75: 109-126.

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

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

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

FIGUEREDO, M. B., 1967. Estudos sobre a aplicação do mêtodo de Castellani para conservação de fungos patôgenos em plantas. *O Biôlogo*, São Paulo, 33: 9-13.

FRIEDERICHS, K., 1920. Über die Pleophagie des ensektenpilzes *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektenionskrankheiten*, 50: 335-356.

FRIES, N., 1966. Chemical factors in the germination of spores of Basidiomycetes. *In The Fungus Spore.* M. F. Madelin (Ed.) Butterworths.

GOGOLA, N., 1970. Einflusz der natürlichen cytokinine von *Pinus silvestris* und andeser Wuchsstoffe auf das myzelwachstum von *Boletus Edudis var. Pinicolus. O Esterreichische Botanische Zeitschrift,* 188: 321-333.

GOSWALD, K., 1938. Über den insektentötenden Pilz *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. Bisher Bekanntes and eigene Versuche. *Arbeiten aus der biologischen Reichsanstalt für Laud un Forstwirtschalt.* Berlin, 22: 339-452.

HUBER, J., 1958. Untersuchungen zur Physiologie insektentötender Pilze. *Archiv fur Mikrobiologie,* 29: 257-276.

JOHNSTON, J. R., 1915. The entomogenous fungi of Porto Rico. *Puerto Rico Board of Commissioners of Agriculture Bulletin,* 10: 1-13.

KELLER, S. 1978. Investigations on the influence of Dimilin (diflubenzuron) on the growth and germination of the conidia. *Schadlingskunde, Pflanzenschutz, Unweltschutz,* Berlin, 51: 86-83.

KENDRICK, W. B., 1971. Taxonomy of fungi imperfecti. Toronto Univ. Press, 309 p.

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

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

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

LILY, G. V., e *BARNETT, H. L, 1951.* Physiology of the fungi. First edition. New York, Mc Graw - Hill Book. 46 p.

MACARA, T. J. R., 1943. Dried meat, II, The growth of moulds on dried meat. *Journal of the Society of Chemical Industry,* 62: 104.

MAC DONALD, K. D., 1976. 2nd international symposium of Genetics of industrial Microorganisms. New York Academic Press, 636 p.

MADELIN, M. F., TOOMER, D. K. e *RYAN, J., 1978.* Spiral growth of fungus colonies. *Journal of General Microbiology,* 106: 73-80.

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

MATTA, E. A. F. e *OLIVEIRA, M. Z. A., 1978.* Efeito do inseticida Malatol 50E no crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Sorokin "in vitro". *Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia,* Bahia, 76 p.

MELIN, E., 1955. Nyare undersökningar överskogsträdens mykorrhizasvampas och det fysiologiska växelspelet mellan dem och trädeus rötter. *Acta Universitatis Uppsala,* 3: 1-29.

MELIN, E., 1959. Mycorrhiza, in *Handbuch der Pflanzenphy Siologie,* vol. II, W. Ruhland (Ed.), Springer Verlag, Berlin.

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

MESSIAS, C. L. e *AZEVEDO, J. L, 1980.* Parassexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae. Transations British Micological Society*, 75: 473-477.

MESSIAS, C. L,; AZEVEDO, J. L.; CONTI, J. E. e *SOUZA, H. M. L; 1978.* Aspectos Biológicos e Indução de Mutantes em *Metarhizium anisopliae. Resumo do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso de Entomologia*, Bahia. 69 p.

METSCHNIKOFF, E., 1879. Zur Lehre Uber Insektenkraukheiten zoologisher Anzeiger, 3: 44-47. Apud: Petch, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transations British Mycological Society*, 16:55-75.

MOORE, G.E., 1971. Mortality factors caused by pathogenic bacteria and fungi of the Southre pine beetle in North Carolina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17: 28-27.

MOURA COSTA, M.D. e *MAGALHÃES, C. D., 1974.* 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.

MURAYAMA, M.Y; ALVES, S.B e *ALMEIDA; L. C., 1982.* Efeito de replicagens em meio de arroz na patogenicidade, morfologia e produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, 3: 5.

OKINO, L,A.; SILVA, J.C.; SANTOS, A.L.L.; MESSIAS, C. L., e *AZEVEDO, J. L., 1978.* Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopiae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. *"O SOLO"* 70 : 32-36.

OORT, A, J, P. 1974. Ativaction of spore germination in *Lactarius* species by volatile compounds of *Ceratacystis fagacearum.* Koni-

nkl, Nederl. Akademie Van Westeuschappen-Amsterdam. Reprinted from Proceedings, series c, 77, nº 4, *Mycology*.

PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transactions British Mycological Society*, 16: 55-75.

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

RIBA, G.; GLANDAST, A.; JOANA, A.M.R. e *FERRON, P. 1980*. Isolamento de Recombinês mitotiques stables de type "intermediáire" chez *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) par hybridation de biotypes Sanvages. C.R. Acad. SC. *Parisit*, 291 (20 Octobre 1980) Sêrie 0-657.

ROSATO, Y.B.; MESSIAS, A.L. e *AZEVEDO, J. L. 1981*. Production of Extracellular Enzimes by Isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38: 1-3.

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

SERMONTI, G., 1956. Completamentary gen which effect penicillin Yields. *Journal of General Microbiology*, 15: 559-608.

SERMONTI, G., 1959. Genetics of penicillin production, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 8: 950-966.

SERMONTI, G., 1969. Genetcs of antibiotic producing microorganisms. *London Willy Inter-Science*, 389 p.

SHAERFFENBERG, B., 1959. Zur biologie und okologic des insektentötenden Pilzes *Metarhizium anisopliae*. *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, 44: 262-271.

SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L. e BARACHO, I.R., 1982. Conídios e produção de algumas enzimas extracelulares de *Metarhizium anisopliae* proveniente de insetos e meio de cultura. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, 3: 14-15.

SNOW, D., 1948. The germination of mould spores at controlled humidities. *The Annuar Applied Biological*, vol. nº 36.

SOROKIN, N., 1883. Les parasites des plantes, de L'Homme et des animaux (em russo). Rastiel'nye parazity celonekaizivot nyh Band, 11: 268-290. Notes ou eutomogenous fungi. *Transactions British Mycological Society*, 16: 55-75.

STEINHAUS, E.A., 1970. Principles of insect pathology. New York, Mac Graw Hill, 678 p.

TINLINE, R. D. e NOVIELLO, C., 1971. Heterokaryosis in the Entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, 63: 701-712.

TOMKINS, R. G., 1929. Studies on the growth of moulds. *Proceedings of the Royal Society of London.* Série B: 105-375.

TRINCI, P.J.; SAUNDERS, P.T.; GOSRANI, R. e CAMPBELL, K.A.S., 1979. Spiral grow of mycelial and reproductive hyphal. *Transactions British Mycological Society*, 73: 283-292.

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

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

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

VENTURA, J.A., 1981. Testes de segurança na utilização do *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorokin. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*. 2: 11.

VILLACORTA, A., 1977. Technique for the mass culture of the entomophagous fungus *Metarhizium anisopliae* (metsch.) Sorokin granular form. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 5: 101-104.

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

VUILLEMIM, P., 1904. Les Isaria du genre Penicillium. Bulletim de la Societé Micologique de Frence, 20: 214-221. Apude: Pecht, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transaction British Mycological Society*, 16: 55-75.

YARWOOD, C. E., 1936. The tolerance of *Erysiphe poligoni* and certain other powdery mildeus to low humidity. *Phytopathology*, 26: 845-859.

WAARD, M. A., 1971. Effect of systemic and non - systemic compounds on the in vitro germination of powdery mildew conidia. *Mededelingen Fakulteit Landboww - Wetenschappen Gent*, 36 nº 1.

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