

INFLUÊNCIA DE ALGUNS FATORES NO CRESCIMENTO,

GERMINAÇÃO E PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE

Metarrhizium anisopliae **(Metsch.) Sorokin**

ALDA LUIZA LOUREIRO DOS SANTOS

Instituto de Tecnologia de Alimentos

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo
Outubro - 1978

*"Je crois invinciblement que
la Science et la Paix triompheront
de l'ignorance et de la guerre,
que les peuples s'entendront, non
pour détruire, mais pour édifier".*

LOUIS PASTEUR

ii.

A meus pais

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho e, em especial:

- Ao Professor *Dr. João Lúcio de Azevedo*, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, além do estímulo e amizade, capacitando-me a "seguir em frente".
- Ao Professor *Dr. João Rubens Zinsly*, pela primeira chance de contato com a Genética e Melhoramento de Plantas.
- Aos colegas *Isaias Olívio Geraldi* e *Issao Shirose*, na resolução dos problemas estatísticos.
- Ao colega *João Maria de Figueirêdo*, pelo apoio e estímulo no início deste trabalho.
- Ao Professor *Dr. Evôneo Berti Filho*, pela revisão dos originais.
- Ao colega *Cláudio Luiz Messias*, pelas sugestões e bibliografias cedidas.
- À Professora e amiga de sempre *Maria Salete Séber*, pela correção ortográfica.
- Ao amigo *Luiz Carlos Veríssimo*, funcionário da Biblioteca Central da ESALQ, pela paciência e presteza de atendimento.
- Aos técnicos dos laboratórios do Instituto de Ge

nética da ESALQ/USP, Srs. Antonio Rocha Campos, Salvador Peixe, Luiz Próspero e Rodolfo Fulini, pela amizade e auxílio.

- Ao Departamento de Genética, na pessoa de seu Diretor Dr. Ernesto Paterniani, pelas facilidades técnicas concedidas.
- Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pelas muitas facilidades, assim como aos técnicos de laboratório da Seção de Fitoecologia e ao desenhista Sérgio Gregório pelo grande auxílio.
- À Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista, na pessoa de seu Diretor Eng^o Agr^o Aracynio Tortolero de Araujo, pela ajuda financeira.
- Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos, na pessoa de seu Diretor Dr. Ágide Gorgatti Neto, pelas facilidades concedidas.
- À amiga Mara Sini Rossin Beekendorff, pela ajuda na revisão dos originais.
- Ao Sr. Cleusval Bissi, pela datilografia.
- Aos meus amigos de todos os momentos, especialmente Eduardo Amaral Batista, Luiz Mauro Barbosa, Maria Regina de Melo Cruz, Dr. Max Vieira de Lira, Yara Strufaldi De Vuono e à minha "mana" Olívia Marcia Nagy Arantes.
- Ao Márcio, pela compreensão e incentivo.

.iv.

Aos meus Pais *Olimpio e Terezinha*, pelo investimento que fizeram, acreditando e transmitindo a a coragem, a confiança, a "cabeça erguida" e o imenso amor.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Controle biológico	6
3.1.1. Importância	6
3.1.2. Organismos usados	9
3.1.2.1. Vírus	10
3.1.2.2. Bactérias	14
3.1.2.3. Fungos	17
3.2. Aspectos biológicos de <i>Metarrhizium anisopliae</i>	28
3.2.1. Classificação	28
3.2.2. Descrição	28
3.2.3. Meios de cultura	34
3.2.4. Patogenicidade	36
3.2.4.1. Fatores que afetam a patogênese	36
3.2.4.2. Processo de patogênese	42
3.3. Utilização de <i>Metarrhizium anisopliae</i> no controle biológico de insetos	49
3.3.1. Faixa de hospedeiros	49
3.3.2. Situação no Brasil	55

4. MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1. Linhagens utilizadas	63
4.2. Meios de cultura e soluções usadas	64
4.2.1. Meio completo	64
4.2.2. Meio de arroz	64
4.2.3. Meio de batata	65
4.2.4. Solução de vitaminas	65
4.2.5. Hidrolisado de ácido nucleico de levedura	66
4.2.6. Solução salina	66
4.2.7. Solução de Tween	66
4.3. Esterilização e temperatura de incubação	67
4.4. Efeito da temperatura na germinação	67
4.5. Produção de conídios	68
4.6. Efeito da luz	69
4.6.1. Na taxa de crescimento	69
4.6.2. Na produção de conídios	70
4.7. Germinação em diferentes meios de cultura	71
4.8. Curvas de sobrevivência	72
4.8.1. Raios gama	72
4.8.2. Luz ultravioleta	73

4.9. Resistência a fungicidas	74
4.9.1. Determinação dos níveis de resistência.	74
4.9.2. Isolamento de mutantes resistentes a Benlate	75
4.9.3. Concentração mínima inibitória para os mutantes resistentes a Benlate	76
4.9.4. Tipo de efeito dos fungicidas Benlate e Vitavax sobre <i>M. anisopliae</i>	77
5. RESULTADOS	79
5.1. Números de colônias obtidas após incubação de conídios de <i>M. anisopliae</i> em diferentes temperaturas	79
5.2. Produção de conídios da linhagem A de <i>M. anisopliae</i>	80
5.3. Medidas dos diâmetros de colônias da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> submetidas a diferentes intensidades de luz	81
5.4. Número de conídios produzidos pela linhagem A de <i>M. anisopliae</i> quando submetida a diferentes intensidades luminosas	87
5.5. Germinação de conídios da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> a partir de inoculação em diversos meios de cultura	90
5.6. Números, porcentagens relativas e curvas de sobrevivência de conídios da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> após tratamentos com raios γ e luz ultravioleta (U.V.)	95

5.7. Determinação da taxa de crescimento das linhagens A, C, K e E ₆ de <i>M. anisopliae</i> pela inoculação de conídios em meio de cultura contendo diversas concentrações de fungicidas	99
5.8. Número de mutantes e frequência de mutação da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> para resistência ao fungicida Benlate	106
5.9. Média dos diâmetros de alguns mutantes da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> resistentes a Benlate em várias concentrações desse fungicida...	107
5.10. Número de colônias obtidas após inoculação das linhagens A, C, K e E ₆ de <i>M. anisopliae</i> em concentrações inibitórias dos fungicidas Vitavax e Benlate...	108
6. DISCUSSÃO	110
6.1. Efeito da temperatura	110
6.2. Produção de conídios da linhagem A de <i>M. anisopliae</i>	112
6.3. Efeito de diferentes intensidades luminosas sobre o crescimento e esporulação de <i>M. anisopliae</i> ...	113
6.4. Germinação em diferentes meios de cultura....	116
6.5. Utilização de raios gama e luz ultravioleta como agentes mutagênicos para <i>M. anisopliae</i>	117
6.6. Resistência a fungicidas	118
7. CONCLUSÕES	123
8. SUMMARY	125
9. LITERATURA CITADA	127

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
I - Números de colônias obtidas após incubação de conídios da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> a 28°C e 37°C	79
II - Números de conídios produzidos em amostras de 7mm de diâmetro. (Nº de conídios x 10 ⁴ /ml)	81
III - Diâmetros em centímetros de colônias submetidas durante incubação à luz contínua, alternada e escuro total	82
IV - Total de crescimento das colônias da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> entre o 3º e 7º dia de incubação sob luz contínua, alternada e escuro total	84
V - Análise de variância da taxa de crescimento das colônias de <i>M. anisopliae</i> submetidas a diferentes intensidades de luz	85
VI - Teste de Tukey para o caráter taxa de crescimento em diferentes intensidades de luz	86
VII - Médias dos números de conídios produzidos em cinco placas submetidas durante incubação à luz contínua, luz alternada e escuro total (Nº de conídios x 10 ⁴ /ml)	88
VIII - Número e porcentagem de conídios germinados num total de 50 conídios, em 12 horas, da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> por inoculação em meio completo líquido	91

IX - Número e porcentagem de conídios germinados num total de 50 conídios, em 12 horas, da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> por inoculação em meio de arroz líquido	92
X - Número e porcentagem de conídios germinados num total de 50 conídios, em 12 horas, da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> por inoculação em meio de batata líquido	93
XI - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> ao tratamento com raios γ (fonte de ^{60}Co)	96
XII - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> ao tratamento com luz U.V.	96
XIII - Diâmetro em centímetros de colônias das linhagens A, C, K e E ₆ de <i>M. anisopliae</i> após 4 dias de incubação em meio de cultura contendo diversas concentrações do fungicida Cloroneb. Média de 2 repetições	100
XIV - Diâmetro em centímetros de colônias das linhagens A, C, K e E ₆ de <i>M. anisopliae</i> após 4 dias de incubação em meio de cultura contendo diversas concentrações do fungicida Vitavax. Média de 2 repetições	102
XV - Diâmetro em centímetros de colônias das linhagens A, C, K e E ₆ de <i>M. anisopliae</i> após 4 dias de incubação em meio de cultura contendo diversas concentrações de fungicida Benlate. Média de 2 repetições	104

TabelaPágina

XVI - Número de mutantes e frequência de mutação da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> para resistência ao fungicida Benlate na concentração de 8 µg/ml em 2 x 10 ⁶ conídios inoculados por placa	106
XVII - Média dos diâmetros em centímetros de colônias de 5 mutantes da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> resistentes a 8 µg/ml de Benlate em várias concentrações desse fungicida	107
XVIII - Média dos números de colônias das linhagens A, C, K e E ₆ de <i>M. anisopliae</i> obtidas após inoculação em meio de cultura contendo as concentrações de 256 µg/ml e 512 µg/ml do fungicida Vitavax e 4 µg/ml do fungicida Benlate, em 8 e 15 dias de incubação	108

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
01 - Curvas de crescimento da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> submetida a diferentes intensidades de luz	83
02 - Curvas da produção de conídios da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> submetida a diferentes intensidades de luz	89
03 - Curvas da germinação de conídios da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> nos meios completo, de batata e de arroz líquidos	94
04 - Curva de sobrevivência da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> à radiação gama	97
05 - Curva de sobrevivência da linhagem A de <i>M. anisopliae</i> à luz ultravioleta	98
06 - Curva de sobrevivência das linhagens A, C, K e E ₆ de <i>M. anisopliae</i> ao fungicida Cloroneb	101
07 - Curva de sobrevivência das linhagens A, C, K e E ₆ de <i>M. anisopliae</i> ao fungicida Vitavax	103
08 - Curva de sobrevivência das linhagens A, C, K e E ₆ de <i>M. anisopliae</i> ao fungicida Benlate	105

1. RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar a influência de alguns fatores como temperatura, luz, agentes mutagênicos e alguns fungicidas sobre o crescimento, germinação e produção de conídios do fungo entomógeno *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin.

Verificou-se que a temperatura de 37°C inibe a germinação de conídios tornando-os inviáveis se os mesmos forem expostos por mais de 96 horas nesta temperatura; que a luz contínua tem influência sobre a produção de conídios aumentando-a bastante em relação à luz alternada e ao escuro total, sendo que este último favoreceu o desenvolvimento micelial. Foi feito também o cálculo da produção de conídios por área de placa de Petri, ou seja, 6.358,5 mm².

Observou-se, ainda, que as radiações gama e ultravioleta podem ser utilizadas como agentes mutagênicos. Nas dosagens de 32 KR e 2'40", respectivamente, obteve-se 1-5% de

sobrevivência. Foi, também, estudada a resistência de quatro linhagens de *M. anisopliae* a três fungicidas, sendo observada efetividade maior de um deles, o Benlate, que inibe o fungo na dosagem de 4 µg/ml. A frequência de mutação espontânea do fungo ao Benlate foi de 2,35 mutantes por 10⁶ conídios.

2. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa um lugar de destaque entre os possuidores dos maiores rebanhos bovinos do mundo. Entretanto, o desfrute está em desacordo com o volume devido a diversos problemas dentre os quais, o pasto é um dos mais importantes, sendo o ataque de pragas ao mesmo, o fator prioritário (FRANCO, 1970).

As cigarrinhas, insetos da ordem Homoptera família Cercopidae, atacam as pastagens e constituem-se em um dos sérios problemas para a pecuária em diversas regiões do país.

No tocante ao cultivo da cana-de-açúcar, o prejuízo causado pelo inseto nas áreas mais infestadas, como os Estados de Pernambuco e Alagoas, foi e é, ainda, incalculável, não só pela extensão da área infestada como também pela intensidade de infestação.

Há vários defensivos que são utilizados no controle das cigarrinhas, principalmente os gêneros *Zulia*, *Mahanarva*, *Deois* e *Aeneolamia*; entretanto, tem se verificado que os mesmos já não têm uma ação eficaz por terem causado o aparecimento de raças resistentes do inseto, além de já se ter constatado a grande ação tóxica dos mesmos sobre animais e o próprio homem. Ademais, o uso de inseticidas em plantações de cana-de-açúcar e em pastagens, que ocupam grandes áreas, torna-se uma medida anti-econômica de controle de pragas.

Assim, visando a preservação da ecologia e minimização dos gastos, tem-se partido para a utilização do controle microbiológico, utilizando-se microrganismos entomófagos dentre os quais, o fungo *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, mostrou-se o mais eficaz contra as cigarrinhas. Em nossas condições, várias observações isoladas não surtiram ainda resultados convincentes pois além da utilização do fungo estar regionalizada, no Estado de Pernambuco, observou-se que se desconhecem muitos aspectos de sua biologia, apresentando o mesmo problemas de crescimento em relação a determinadas condições climáticas e baixa produção de substâncias, resultantes de seu metabolismo, tóxicas aos insetos.

Dessa forma, este trabalho se propõe a estudar uma linhagem de *M. anisopliae*, a qual está sendo usada nos experimentos de campo que estão sendo feitas em alguns Institutos de Pesquisa no Brasil, em alguns aspectos biológicos como

crescimento em temperaturas elevadas, produção de esporos, efeito de diferentes intensidades de luz no crescimento e produção de conídios e a determinação do meio de cultura no qual o fungo melhor se desenvolva.

Como já se tem feito a produção de conídios deste fungo em larga escala para distribuição aos lavradores e aplicação em campo, vai ser necessário o melhoramento genético do mesmo a fim de que se obtenha uma linhagem com características favoráveis além de altamente patogênica. Assim, visando futuros estudos genéticos de *M. anisopliae*, este trabalho se propõe a estudar, também, a sua sobrevivência à radiação gama e à luz ultravioleta que poderão ser utilizadas como mutagênicos e a resistência a fungicidas na determinação dos níveis de resistência, no isolamento de mutantes resistentes e na natureza do efeito desses fungicidas sobre o fungo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Controle biológico

3.1.1. Importância

Uma agricultura avançada e racional visa, entre outras coisas, a obtenção de uma maior produtividade por unidade de área e a sanidade da safra. Dentre as técnicas agrícolas, o uso de produtos químicos, como os inseticidas, difundiu-se enormemente, para se atingir as finalidades citadas. Entretanto, ficou evidenciado que o uso cada vez maior desses produtos tem aspectos negativos; a poluição do ambiente por defensivos químicos pode alterar todo o complexo biótico da natureza, afetando então plantas e animais, incluindo o próprio homem.

CAMERON (1963) chama a atenção para o fato de que o uso indiscriminado de produtos químicos afeta negativamente não apenas a população humana, mas também aqueles orga-

nismos que naturalmente auxiliam na redução de pragas que assolam lavouras de importantes culturas para o homem. Assim, um produto químico utilizado de maneira não racional contra uma determinada praga pode ser, por outro lado, muito eficiente contra inimigos naturais dessa praga que então, livre dos mesmos, vai se multiplicar melhor e mais rapidamente, resultando em um inesperado aumento de sua população.

Por outro lado, pode ocorrer que o uso de um produto químico favoreça a população de um inseto que era considerado praga secundária. Essa praga poderá se elevar à categoria de praga importante quando seus inimigos naturais forem reduzidos ou eliminados pelo uso de produtos que os atinjam inadvertidamente. Além disso, existe também o perigo, durante o manejo desses produtos, de toxidez ao homem e aos animais. Com freqüência são publicados nos jornais casos de intoxicação e, inclusive mortes, causadas por resíduos de pesticidas encontrados no leite e em outros alimentos.

Por fim, muitas vezes, não são necessários produtos químicos para controlar uma determinada praga. Entretanto, a facilidade de aquisição e seus efeitos imediatos, advindos também do próprio sistema de divulgação, contribuem para o excessivo e indiscriminado uso desses produtos químicos.

Segundo *FRANZ (1961)*, devido à progressiva deterioração do ambiente terrestre pelo uso dos produtos quími-

cos, à periculosidade do manejo dos mesmos, ao perigo que oferecem aos animais, ao problema de atingirem também insetos úteis, cada vez mais está sendo dado valor ao controle biológico, o qual tem recebido grande e entusiástica acolhida nos últimos setenta anos, havendo-se obtido grandes êxitos e resultados práticos em mais de sessenta países, em todo o mundo.

DE BACH (1968) define o controle biológico, sob o ponto de vista ecológico, como a ação de parasitos, predadores ou patógenos, para manter a densidade da população de outro organismo a uma taxa mais baixa do que aquela que existiria na sua ausência. Salienta ainda, que a meta do controle biológico aplicado é a manutenção de um organismo em um nível tal, que ele seja incapaz de causar danos econômicos.

Segundo o mesmo autor, a grande maioria das pragas é constituída por insetos e a quase totalidade deles possui inimigos naturais; como consequência, o controle biológico de insetos tem grande valor aplicado e é, também importante por não deixar resíduos, ser mais específico, ser mais permanente e não provocar desequilíbrio no ecossistema.

O controle biológico tem suas raízes nos estudos de doenças de insetos. O primeiro patógeno de insetos de que se tem notícia foi um fungo do gênero *Cordyceps* que atuava sobre abelhas e, em 1826, *KIRBY* incluiu um capítulo sobre a enfermidade dos insetos no famoso tratado "An Introduction

to Entomology". Em 1835, AGOSTINHO BASSI mostrou que o fungo *Beauveria bassiana* causava uma doença no bicho-da-seda que foi chamada de "muscardina". Em 1870, LUIS PASTEUR salvou da ruína a indústria francesa da seda ao obter, com sucesso, o controle de uma doença causada por fungo no bicho-da-seda (DE BACH, 1968).

Assim, as atenções que foram concentradas inicialmente sobre os insetos úteis, como abelhas e bicho-da-seda, nos estudos fundamentais sobre a natureza de doenças de insetos, gradualmente se estenderam para espécies de insetos considerados pragas e assim, nasceu o controle biológico de pragas por doenças causadas por microrganismos.

STEINHAUS (1949) cita que a patologia de insetos é vital para vários estudos de aspectos entomológicos, incluindo-se entre outros o controle biológico, a ecologia de insetos, a entomologia econômica, a morfologia e a histologia, a fisiologia de insetos, etc.

3.1.2. Organismos usados

O controle biológico de pragas pode ser feito através do uso de agentes microbianos como fungos, bactérias e vírus, como também pelo uso de insetos entomófagos, parasitos ou predadores.

DE BACH (1968) em uma revisão sobre o assunto, salienta que se conhecem, atualmente, inúmeros insetos que são úteis no controle biológico. Cita que os insetos podem atuar tanto como parasitos como predadores podendo, portanto, ser usados no controle biológico e, em muitos casos, com grande sucesso. Cita também, que nematóides e protozoários podem ser úteis, tendo-se já, obtido sucesso no controle de pragas com o uso desses organismos.

De acordo com esse autor, outra arma biológica com vários registros de sucesso é o uso de microrganismos tais como fungos, bactérias e vírus, sendo que já foram encontrados 1.165 microrganismos associados com insetos, sendo muitos destes patógenos. Este total inclui espécies e variedades de bactérias, vírus, rickettsias e fungos. Diz que, de modo geral, os microrganismos atacam os insetos por: (1) infecção oral quando o microrganismo é ingerido com o alimento; (2) invasão através do integumento intacto; (3) invasão parenteral por trauma do integumento e (4) infecção no ovo dos insetos.

Na presente revisão será abordado o uso de microrganismos (vírus, bactérias e fungos) no controle biológico de insetos.

3.1.2.1. Vírus

Segundo revisões feitas por *DE BACH (1968)*,

BIRD (1953) e BIRD e BURK (1961, apud CAMERON, 1963) conhecem-se, atualmente, cerca de 250 infecções causadas por vírus em, aproximadamente, 175 insetos e aracnídeos. Destas, cerca de 170 são poliedroses nucleares, 30 poliedroses citoplasmáticas, 35 granuloses e 8 que não parecem estar associadas a qualquer dessas classes. Citam que a maioria dos hospedeiros dos vírus são Lepidópteros, havendo também outras ordens que são infectadas por esses agentes.

Esses autores dizem que são os estados imaturos de larva e pupa são altamente suscetíveis; os adultos podem conter o vírus, porém normalmente sobrevivem ao ataque. Em geral, os vírus de insetos apresentam um alto grau de especificidade apesar de alguns autores se referirem a casos de infecções sucessivas cruzadas.

CAMERON (1963) cita que em muitos casos onde os vírus foram recomendados como uma medida de controle, mostraram uma vantagem distinta qual seja, sua extrema virulência e especificidade.

De acordo com *BIRD (1953)* os vírus não previnem os danos inteiramente mas, sozinhos ou em combinação com parasitos, podem controlar a população de insetos a um nível tal que não haja danos de importância econômica. Cita, entre tanto, que os vírus têm uma ação lenta, sendo uma desvantagem no caso de produção de flores e algumas outras culturas, signi

ficando que um controle de ação mais rápida para atingir o pe ríodo crítico de crescimento deve ser encontrado.

DE BACH (1968) fez uma excelente revisão sobre o uso e ação dos vírus no controle biológico de insetos, da qual foram tiradas as informações que se seguem até o final deste ítem.

Quando o ácido nucleico viral entra na célula hospedeira suscetível ele pode: (1) embora não comprovadamente, integrar-se no material genético da célula, multiplicando-se simultaneamente com o material genético do hospedeiro; (2) multiplicar-se na célula de forma moderada para preservar a integridade da célula hospedeira ou causar uma condição de infecção crônica, sem sintomas externos; (3) multiplicar-se um pouco mais rapidamente, tendo completo controle genético da célula, causando virose aguda e morte (virose típica) e (4) permanecer estático na célula com potencial para causar qualquer dos três fenômenos acima.

As poliedroses caracterizam-se pela presença de corpos inclusos nos tecidos infectados, conhecendo-se dois tipos gerais: a nuclear na qual o vírus se multiplica no núcleo das células infectadas e a citoplasmática, na qual o vírus se multiplica no citoplasma de tais células. Muitas das viroses poliédricas nucleares parecem ser altamente específicas, enquanto que outras podem causar infecções em duas ou mais espécies de insetos. Crê-se que, de maneira freqüente,

a infecção está latente nos insetos e que o vírus oculto pode permanecer no inseto por muitas gerações até que, por alguma causa, seja posto em atividade. As poliedroses citoplasmáticas, em geral, não são tão fulminantes como as nucleares, sendo que, nos casos mais conhecidos, a infecção está limitada ao epitélio do intestino.

Os tecidos mais afetados pela granulose são o adiposo, a epiderme e, freqüentemente, a matriz traqueal e as células do sangue, sendo a doença causada pelo acúmulo de corpos granulares inclusos chamados "cápsulas", cada uma das quais contendo uma partícula de vírus.

Nem todos os vírus capazes de causar infecção se manifestam nos insetos pela presença de corpos inclusos, como é o caso do vírus sigma de *Drosophila melanogaster*, cujo sintoma é a modificação da sensibilidade das moscas infectadas ao dióxido de carbono. O vírus é transmitido pelos gametas sem seguir segregação mendeliana, sendo um exemplo de efeito materno.

Alguns autores acreditam que o vírus pode sobreviver no hospedeiro várias gerações sem causar sintomas visíveis e que, sob influência de certos estimulantes, pode ser ativado causando infecção. Já foi relatada uma série de fatores capazes de transformar uma virose latente em uma forma aguda de enfermidade, salientando-se entre eles o calor, frio, umidade excessiva, superpopulação, agentes químicos, luz ul-

travioleta e qualidade do alimento.

3.1.2.2. Bactérias

STEINHAUS (1968) divide arbitrariamente as bactérias associadas com insetos em certas categorias ou grupos: (1) bactérias não entomógenas geralmente presentes no meio ambiente externo do inseto; (2) bactérias regular ou ocasionalmente presentes no canal alimentar de insetos sãos; (3) patógenos não formadores de esporos e (4) patógenos formadores de esporos de vários tipos.

BUCHER (1960) agrupou as bactérias patogênicas de insetos em: patógenos obrigatórios, patógenos formadores de esporos cristalíferos, patógenos facultativos e patógenos potenciais.

STEINHAUS (1949) pesquisou o modo de ação das bactérias na patogenicidade dos insetos mostrando que elas produzem, pelo menos, quatro substâncias tóxicas aos mesmos. São elas: um corpo para-esporal cristalino e proteináceo; uma molécula dializável pequena, termo-estável e solúvel; uma fosfólise C e uma outra fosfólise não identificada.

FALCON (1971) diz que todas as bactérias formadoras de esporos produzem endosporos que permitem ao organis-

mo persistir em estado dormente fora do hospedeiro; através da ingestão por um hospedeiro suscetível, os esporos germinam no intestino. Cita que em patógenos obrigatórios do gênero *Bacillus*, as células vegetativas produzidas pela germinação entram na hemocele do hospedeiro onde se multiplicam com rapidez, destroem certos tecidos e logo preenchem a maior parte da cavidade interna do hospedeiro. Esse estágio de infecção é chamado "septicemia". Antes da morte do hospedeiro são formados esporos de paredes grossas que aparecem como manchas brancas através do integumento do inseto, derivando-se daí o nome de "doença leitosa". Depois da morte, o hospedeiro se desintegra e os esporos são liberados para o solo.

STEINHAUS (1968) diz que a maioria das espécies de insetos suscetíveis a bactérias são Lepidópteros, mas certos Dípteros, Himenópteros e Coleópteros também podem ser suscetíveis quando recebem grandes doses de esporos. Observa-se que entre as espécies mais suscetíveis que se conhecem estão aquelas que pertencem aos gêneros *Bombyx*, *Anagasta*, *Colias*, *Pieris*, *Thaumetopoea*, *Hyphantria*, *Protoparce*, *Plodia* e *Plutella*.

O mesmo autor cita que as bactérias mais importantes e interessantes usadas no controle biológico de insetos são aquelas que quando esporulam formam cristais de proteína tóxica. Esses cristais são altamente tóxicos para certos insetos, principalmente para alguns Lepidópteros, porém

parecem ser inócuos para outras formas de vida.

A bactéria melhor conhecida nesse grupo é o *Bacillus thuringiensis*, isolada por BERLINER, em 1911, a partir de lagartas de *Anagasta kuhniella*, conhecendo-se atualmente três variedades dessa bactéria: *B. thuringiensis* variedade *thuringiensis*, *B. thuringiensis* variedade *soto* e *B. thuringiensis* variedade *alesti*.

ANGUS (1955) diz que no *B. thuringiensis*, é a toxina e não a bactéria em si que causa a doença sendo o organismo, através do seu cristal, mais ativo como um produto químico do que por causar a infecção. Cita, entretanto, que sob condições ideais no intestino para a germinação do esporo, a bactéria pode atacar o epitélio e ter acesso à hemocele. Segundo HEIMPEL e ANGUS (1958) em alguns insetos tanto o esporo como a toxina parecem ser necessários para causar doença. Os autores acham difícil assegurar o uso e especificidade das bactérias no controle biológico devido à ocorrência de diferentes variedades e linhagens entre as bactérias entomógenas.

HEIMPEL (1967) numa revisão sobre *B. thuringiensis* variedade *thuringiensis* cita que este organismo tem sido ensaiado, com sucesso, contra mais de 187 espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera e Coleoptera. Esse mesmo autor cita que BURGERSON (1965) propôs as nomenclaturas de alfa, beta, gama e ro, para as toxinas pro-

duzidas por *B. thuringiensis*.

STERN e col. (1968) citam que as formulações comerciais de *B. thuringiensis* (Biotrol XK, Biotrol BTP, Dipel e Thuricide HPC líquido) têm efeito sobre diversas espécies de insetos.

Uma revisão feita pela *NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE* (1969) cita que o *B. thuringiensis* pode ser propagado rapidamente num meio artificial de composição comum, incluindo uma mistura balanceada de sais, uma fonte de proteína e, algumas vezes, uma vitamina, podendo ser produzido em fermentadores de vários tamanhos ou grandes dornas que comportam 12.000 galões de meio. Após incubação a 30°C por 14 dias, os esporos são concentrados a vácuo ou por centrifugação inicial dos mesmos. Relata ainda que a bactéria pode ser aplicada em suspensões aquosas, emulsões oleosas ou pós bacterianos misturados com argila, sendo a escolha dos materiais dependente dos insetos alvos.

3.1.2.3. Fungos

O primeiro e mais significativo experimento de destruição de insetos por microrganismos, mais precisamente pelo fungo *Metarrhizium anisopliae*, foi realizado pelo russo *METSCHNIKOFF*, em 1879. Este pesquisador demonstrou ser este

fungo capaz de infectar larvas de *Anisoplia austriaca*.

BAIRD (1958) revendo 265 artigos sobre o controle de insetos por fungos entomógenos, incluindo 28 espécies ou grupos de insetos estudados, constatou que em 41 casos houve sucesso no controle. Porém, nenhum destes fungos listados são usados comercialmente hoje.

Quando se considera as publicações feitas no período de 1960 a 1970, verifica-se que as observações foram realizadas tanto no que se refere a estudos de laboratório como a estudos de campo. Os estudos em laboratório incluem ensaios de infectividade, aspectos bioquímicos relacionados com doenças de insetos, histologia, fisiologia de fungos, estudos de patologia, micotoxinas, bioquímica de fungos, fatores físicos que afetam os fungos e controle integrado. Nos estudos de campo as observações concentravam-se em torno de: correlação do fungo com mortalidade, distribuição da doença, estudo em gaiolas e controle integrado, aplicação e avaliação.

Segundo *CAMERON (1963)* os fungos entomógenos pertencem a vários gêneros em muitos dos quais as espécies são saprofíticas. Vários são indubitavelmente patogênicos e alguns têm características que os fazem valiosos como agentes controladores quando são bem conhecidos física e fisiologicamente. Cita que não há evidência na literatura de que os fungos patógenos de insetos constituam perigo para animais superiores ou plantas. Entretanto *ROBERTS (1973)*, cita que pro-

duto Nutrilite (Buena Park, California) têm causado doenças em vertebrados, em testes realizados por muitos anos com *Beauveria bassiana* e *M. anisopliae*. Verificou também, que *Conidiobolus coronatus* tem causado infecção no homem e em cavalos.

MÜLLER - KÖGLER (1967) levantou a literatura até 1963 e verificou a potencialidade de fungos no controle biológico de insetos.

Infelizmente, apesar da grande variedade de fungos, nem sempre os que são patogênicos em laboratório o são em condições de campo. Além deste, vários outros problemas surgem com relação ao patógeno; a maioria dos fungos entomógenos tem sido produzida sob certas condições ideais em grande quantidade porém, em certos casos, perdem a sua patogenicidade.

Por outro lado, as condições ambientais, segundo DIOMANDE (1969), têm grande influência sobre o fungo e, devido ao fato das mesmas não se reproduzirem a contento no campo, o uso do fungo nessas áreas tem sido descontínuo e, às vezes, impraticável.

Segundo MacLEOD e col. (1966) outros fenômenos que podem levar ao insucesso qualquer projeto para o controle biológico de insetos por microrganismos podem ser considerados: germinação, perda da esporulação, falta de resistência a temperaturas elevadas, dormência e viabilidade.

KOIDSUMI (1957) encontrou substâncias inibidoras de fungos, constituídas por ácidos graxos saturados, possivelmente ácido caprílico, em exúvias de insetos. Observou que tratando-se *Tenebrio* com solvente, a invasão foi facilitada.

Segundo *ROBINSON (1966)*, a hifa dos fungos entomógenos pode desenvolver-se na superfície do inseto e penetrar na cutícula imediatamente, sendo que enzimas estão envolvidas neste processo. Algumas destas enzimas têm sido estudadas "in vitro" como: quitinases, proteases e lipases, em fungos como *Entomophthora*, *Cordyceps militaris*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Aspergillus flavus*. No entanto, algumas espécies de *Entomophthora* spp., *B. bassiana* e *M. anisopliae* não produzem quitinase na presença de proteínas, sendo que lipases e proteases são constitutivas.

O mesmo autor cita ainda, que a grande diferença entre os fungos capazes e incapazes de parasitar insetos parece residir no fato destes últimos não poderem penetrar no exoesqueleto do hospedeiro. Dessa maneira, a camada exocuticular serve de defesa ao inseto.

Os esporos de fungos apresentam um metabolismo bastante ativo durante a germinação. Segundo *BURGES e HUSSEY (1971)*, a produção de enzimas e toxinas é bastante importante na indução de doenças em insetos. Entre as toxinas isoladas destacam-se a aflatoxina produzida pelo *Aspergillus flavus* a

qual mostrou ser tóxica não só para os insetos mas também para mamíferos, pássaros, microrganismos e plantas.

LEOPOLD e SAMŠIŇÁKOVÁ (1970) cultivaram *B. bassiana* sob condições estacionárias e submersas, detectando a presença de quitinase, celulase, proteases e lipases após vários períodos de crescimento. Verificaram que a maior atividade de quitinase e celulase foi encontrada no micélio com 4 a 5 dias de idade, enquanto que as quantidades máximas de proteases e lipases foram formadas após 6 a 7 dias de cultivo do fungo.

Outras substâncias tóxicas produzidas por fungos entomógenos "in vitro" são conhecidas como "destruxinas" A e B, produzidas por *M. anisopliae* ou *Oospora destructor*, citadas por KODAIRA (1961, 1962) e ROBERTS (1969) beauvericina por *B. bassiana* e cordicepina por *C. militaris*. De acordo com ROBERTS e YENDOL (1971), a beauvericina é tóxica a mosquito, assim como as destruxinas de *M. anisopliae* em meio de cultura.

GOLDBLAT (1969) cita que *A. flavus* produz uma toxina, a aflatoxina, bastante tóxica para insetos, mas que também o é para o homem cuja ação carcinogênica tem sido demonstrada por diversos autores.

Segundo DE BACH (1968) e MÜLLER-KÖGLER (1967) a maioria dos fungos que infectam insetos não o fazem por ingestão, mas por penetração na cavidade do corpo através do inttegumento. Isto requer condições de temperatura e umidade adequadas. Uma vez no interior do inseto o fungo prolifera,

invade os tecidos e produz uma grande quantidade de hifas. Na maioria dos casos, o fungo emite seus conidióforos para o exterior, de onde se desenvolvem os corpos frutíferos, capacitando sua disseminação para outros hospedeiros. O inseto infectado geralmente seca, adquirindo um aspecto mumificado chegando, freqüentemente, a cobrir-se com conídios que capacitam o fungo a sobreviver em períodos de condições adversas do meio ambiente ou na ausência do hospedeiro.

Sem dúvida, cada grupo de fungos entomógenos tem suas peculiaridades e sua associação característica com o inseto hospedeiro.

MADÉLIN (1966) e BURGÉS e HUSSEY (1971) estudando *Paecilomyces farinosus*, mostraram que neste fungo existe uma estrutura desenvolvida a partir das hifas e denominada por eles de apressório, a qual seria responsável pela fixação do fungo sobre o inseto e posterior penetração da cutícula. No mecanismo de penetração estão envolvidas forças físicas e produção de enzimas.

DAVID (1968) verificou que esta camada (epicuticular) contém vários lipídios, muitos dos quais ainda não caracterizados. Tratando-se esta camada com abrasivos e solventes polares, a resistência ao ataque dos fungos foi reduzida.

Além desses fatores, outros ainda devem ser exi

gidos do patógeno tais como: dispersão, viabilidade, potencial de inóculo e virulência.

Quanto à disseminação, *HIRST e col. (1967)* citam alguns fungos entomógenos cujos esporos são facilmente disseminados pelo vento, característica essa considerada ótima. Entretanto, a luz solar, bem como condições de umidade e temperatura, podem matar o esporo durante o transporte.

Segundo *VEEN (1968)* e *FERRON e DIOMANDE (1969)* a virulência é bastante discutida nos diferentes isolados de fungos entomógenos, ocorrendo variação dentro de uma mesma espécie ou linhagem, a qual tem sido interpretada de várias formas pelos pesquisadores. Os fatores que geralmente são responsabilizados são: heterocariose e/ou recombinação somática pela anastomose de hifas contendo núcleos de diferentes genótipos e fusão de núcleos dando diplóides e posterior permuta mitótica ou haploidização. Em condições de cultivo, estocagens ou repicagens sucessivas podem alterar a virulência constituindo, portanto, um entrave no controle biológico aplicado.

MASERA (1957) cita que a temperatura afeta tanto a germinação como o desenvolvimento dos fungos entomógenos "in vitro". No geral, o limite para o desenvolvimento está entre 5°C e 35°C e a temperatura ótima entre 20°C e 30°C.

O ótimo para a germinação do esporo é bem demonstrado pelo desenvolvimento do micélio. *YENDOL (1968)* ve-

rificou que em três espécies de *Entomophthora* a germinação foi muito restrita em relação ao desenvolvimento micelial.

Segundo MacLEOD e col. (1966) o potencial de controle pode ser limitado pela umidade por dois motivos: primeiro, altas umidades são necessárias para muitos fungos para que germinem e causem doença; segundo, a umidade é necessária para a distribuição do patógeno que é, usualmente, produzido sobre cadáveres dos insetos somente em altas umidades. Além disso, a umidade afeta a longevidade dos esporos assim como a germinação, uma vez que muitos fungos só germinam com umidade em torno de 90% ou mais. Entretanto, o requisito para umidade alta não é restrito, como mostrou o autor, no primeiro estágio de desenvolvimento, uma vez que só se faz necessária 48 horas após a infecção.

A luz parece afetar tanto a longevidade como a esporulação após a morte do hospedeiro. Isso foi demonstrado por MADELIN (1968) com *P. farinosus* e *C. militaris*, verificando que a luz é essencial para a produção de esporos.

Segundo MÜLLER - KÖGLER (1967) a luz solar, possivelmente o espectro ultravioleta, é conhecido como um "mata dor" de esporos podendo ser, talvez, um dos fatores responsáveis pelo fracasso de possíveis tentativas de controle.

O potencial de inóculo, como outro fator, é também muito importante, uma vez que há necessidade de se saber

o número mínimo de esporos capaz de entrar em contato com o hospedeiro e causar doença. Esses valores são bem discutidos por HIDALGO - SALVATIERRA e BERRIOS (1972).

KODAIRA (1961) cita que as doenças de insetos causadas por fungos são geralmente chamadas "muscardinas" e várias centenas de fungos parasitas de insetos são conhecidos. Reportou que existem mais de 15 espécies de fungos causadores de muscardinas, sendo os principais: *B. bassiana* (Bals.) Vuill. (muscardina branca), *Isaria farinosa* (DISKS) Fr. (muscardina amarela), *Spicaria pralina* (MAUBL.), AOKI (muscardina verde), *Aspergillus oryzae* WEHMER, *A. flavus* LINK, *A. ochraceus* e *Stenigmatocystis japonica* AOKIH (doença da kojikabi) e *Oospora destructor* (METCH) DELAC (muscardina preta).

MADELIN (1966) fez uma revisão de literatura desde 1963 até 1966 e arranjou-a de acordo com os grupos de fungos com potencialidade para o controle biológico, na qual inclui Ficomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos, verificando a existência de um paralelismo amplo entre diferentes modos de parasitismo dos membros destes grupos.

ROBERTS e YENDOL (1971) organizaram uma lista das espécies de fungos mais utilizadas no controle biológico, incluindo as espécies: *B. bassiana*, *B. tenella*, *M. anisopliae*, *P. farinosus*, *Spicaria rileyi*, *Entomophthora* e *Coelomomyces indiana*. Além desses pode-se ainda citar os gêneros *Lange-*

nidium e *Hirsutella*. Entretanto, a maioria das publicações é feita para *Metarrhizium*, *Beauveria* e *Aspergillus* pois são os mais comuns na natureza.

Segundo *ROBERTS* (1973) todos os membros do gênero *Coelomomyces* são patógenos de insetos aquáticos, principalmente mosquitos, exercendo sempre uma pressão sobre *Anopheles*, ocorrendo infecção em torno de 50%. No entanto, a infecção em laboratório não tem sido obtida com muitas espécies, além da cultura desse fungo não ter sido ainda bem estudada.

UMPHLETT e *HUANG* (1973) isolaram *Langenidium* de mosquito, mostrando ser um promissor patógeno de larvas desses insetos. *ROBERTS* (1973) observou que a introdução desse fungo em recipientes com larvas apresentou controle muito bom à população de *Culex*. O maior problema com este fungo é a produção de zoosporos em meio artificial, germinação dos esporos de resistência, falta de tolerância para a água salobra e segurança para outros organismos.

DE BACH (1968) cita que os fungos do gênero *Entomophthora* existem como patógenos de alguns tipos de insetos por todo o mundo, sendo seus mais importantes hospedeiros os gafanhotos, pulgões, lagartas de *Lepidopteros* e larvas de mosquitos. O gênero *Conidiobolus coronatus* é mencionado como um patógeno de vertebrados e é um membro de *Entomophthorales*. Observações feitas por este autor indicam que muitos desses fungos não podem se desenvolver em animais de sangue quente

mas testes formais de segurança são necessários.

Segundo CAMERON (1963) alguns fungos entomógenos, especialmente espécies de *Entomophthora*, formam esporos de resistência enquanto que os outros, incluindo muitas formas assexuais, persistem como um pseudo-esclerócio de onde surgem os esporos.

MÜLLER - KÖGLER e SAMŠIŇÁKOVÁ (1970) citam que *B. bassiana* e *B. tenella* são freqüentemente isoladas de insetos mortos e moribundos coletados na natureza, sendo a produção de esporos desse fungo facilmente conseguida. Segundo ROBERTS (1973) os esporos de *B. bassiana* têm apresentado resultados satisfatórios contra insetos que atacam folhas.

Segundo FRANZ (1961) o uso de *B. bassiana* no controle biológico de insetos tornou-se valioso quando se verificou que aplicações permanentes de hidrocarbonetos clorados aumentavam grandemente a tolerância do besouro *Leptinotarsa decemlineata* (Say) a inseticidas.

McCOY e col. (1972) citam que *Hirsutella thomsonii* tem sido estudada para controle de traças, apesar de ter sido verificado o ataque desse fungo a *Phyllocopteneta oleivora*, praga de citros, na Flórida. Verificaram que este fungo é produzido facilmente.

O gênero de fungo *Metarrhizium* será abordado

com detalhes nos próximos ítems.

3.2. Aspectos biológicos de *Metarrhizium anisopliae*

3.2.1. Classificação

O fungo é um Deuteromiceto pertencente à 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*, sendo que, em 1880, o mesmo autor deu-lhe o novo nome de *Isaria destructor*. Citam que este fungo foi descrito com os mais diversos nomes por vários autores (*DE-LACROIX, 1893; VUILLEMIN, 1904*) sendo, contudo, classificado como *Metarrhizium anisopliae* por *SOROKIN* em 1883.

3.2.2. Descrição

BARON (1968) descreve o fungo *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. como tendo um corpo de frutificação semelhante a um esporodóquio agregado a hifas intimamente entrelaçadas, contendo uma massa compacta de conidióforos num "estroma" plano ou em forma de disco; os conidióforos simples

ou, mais freqüentemente, ramificados profusamente e parecidos com o modelo de penicilia, resultam em células esporogênicas chamadas fiálides; as fiálides cilíndricas e hialinas afinam-se para um ápice estreito; os fialosporos são não septados, cilíndricos, hialinos ou levemente pigmentados, produzidos em cadeias e aderidos agregados a colunares altos. As colunas verdes de esporos surgindo de um micélio branco dão ao fungo uma aparência de aderência na cultura.

BARNETT (1960) cita que os conidióforos formam uma camada de esporulação; as fiálides são simples, em pares ou espiraladas; os conídios são produzidos em cadeias basipétalas, compactados em cadeias, ovóides a cilíndricos, unicelulares, hialinos ou levemente pigmentados e verde-olivas em massas. Cita que o fungo é parasítico em insetos ou saprofítico no solo.

VEEN (1967) e *ZACHARUK (1970a)* demonstraram através da microscopia eletrônica que os conídios de *M. anisopliae* são uninucleados, característica bastante importante para estudos genéticos.

TINLINE (1971) observou que todos os conidióforos são inicialmente uninucleados, sendo todos os núcleos de conídios provenientes de um mesmo conidióforo e resultantes de divisão de um núcleo inicial. Os conídios maduros apresentam-se tipicamente uninucleados mas, aparentemente, dividem-se

dos durante a germinação. Neste ponto, um núcleo filho migra para o tubo de germinação enquanto o outro permanece no conídio.

ZACHARUK (1970b) verificou que conídios binucleados são resultantes da variação temporal existente entre a germinação do núcleo filho e a subsequente migração para o tubo de germinação. As células das hifas são uninucleadas mas, algumas delas contêm, ocasionalmente, dois ou mais núcleos, possivelmente devido à anastomoses e migrações, comuns em conídios. MESSIAS e col. (1978) observaram após coloração por Giemsa, a ocorrência de conídios com um e dois núcleos, numa porcentagem de 95% para uninucleados e 5% para binucleados.

ZACHARUK (1970c) descreveu a estrutura dos conídios de *M. anisopliae* antes e durante a germinação no integumento de larvas vivas de Coleópteros. Observou que um conídio contém um grande citosomo lipídico e um pequeno semelhante a uma gotícula de óleo e várias mitocôndrias pequenas, no endoplasma denso, ligadas por um plasmalema, o qual é envolvido por uma parede de três camadas, havendo pouco retículo endoplasmático. Na formação do tubo germinativo, os citosomos são transformados em dois grandes vacúolos, os quais eventualmente fundem-se, enquanto há um aumento considerável na quantidade de retículo endoplasmático e mitocôndrias. Uma 4ª. camada celular da parede secretada nas áreas de formação do tubo germinativo torna-se a sua parede primária, sendo o con-

teúdo do conídio usado durante o crescimento do tubo germinativo, deixando o conteúdo das outras 3 camadas da parede conidial com somente umas poucas membranas vesiculares.

HAMMIL (1972) fez um estudo sobre as fiálides de *M. anisopliae* definindo-as como células conidiogênicas que produzem pelo menos o seu primeiro conídio entre a extensão apical da célula, o qual é liberado pela ruptura da parede celular. Observou que as fiálides deste fungo são geralmente cilíndricas e levemente intumescidas antes de afilem rapidamente para um estreito ápice conidiogênico de, no máximo, 1 μ m. Após um conídio prévio ter sido delimitado por um septo, ele move-se para fora do colo da fiálide e o próximo conídio começa a formar-se. As organelas penetram nos conídios e os mesmos são delimitados por septos, continuando o processo.

MARCHIONATTO (1942) verificou que as hifas de *M. anisopliae* exteriores ao inseto são hialinas, enquanto as internas são arroxeadas, sendo os asterigmas agrupados em forma de fiálides. Cita que os esporos são cilíndricos, medindo 8-9 x 2 1/2 - 3 μ , verdes e moniliformes, dispendo-se as cadeias em colunas compactas.

JOHNSTON (1915) refere-se a duas formas de *M. anisopliae* quanto ao tamanho dos conídios, sendo as mesmas denominadas como *M. anisopliae* var. *major*, com conídios de 3,0 a 11,9 μ de comprimento e a forma *M. anisopliae* var. *mi-*

nor com conídios de 2 - 3,0 a 3,5 μ de comprimento.

FRIEDERICH (1930, apud TULLOCH, 1976) também notou uma forma longa de conídios de *M. anisopliae* medindo de 9,0 a 14 μ e uma forma curta com 6,0 a 8,0 μ de comprimento.

KAMAT e col. (1952, apud TULLOCH, 1976) citam que o comprimento conidial de *M. anisopliae* varia de acordo com o meio de cultura usado; sugerindo que a diferença entre as formas *major* e *minor* é fisiológica, tendo encontrado comprimentos de 5 - 7,6 x 2,5 - 3,5 μ em nutriente agar e 8-14 x 3-4,5 μ em arroz.

BARON (1968) verificou linhagens com esporos pequenos, de 5 - 7 x 2,5 - 3 μ , e linhagens com esporos maiores medindo de 10 - 14 x 3 - 4 μ .

BALFOUR - BROWNE (1960) verificou que os conídios de *M. anisopliae* variam em tamanho nas diferentes linhagens, sendo essa variação de 4,8 - 14 x 1,6 - 8 μ . Cita que foram observadas duas formas, uma de esporófito largo com esporos de 9 - 14 μ e uma outra de esporófito pequeno com esporos de 5 - 8 μ de comprimento. Verificou que larvas de *Eritrea* foram afetadas pela forma de esporulação pequena com esporos medindo 4 - 6 x 1,5 - 2 μ .

URS e GOVINDU (1971) obtiveram grande esporulação de *M. anisopliae* num meio contendo 40 ml de mel-peptona

(6 ml de mel, 1 g de peptona, 100 ml de água) e 100 g de ceva da e agitado vigorosamente.

TINLINE (1971) observou que a variação de tamanho dos conídios não leva a um aumento do número de núcleos por conídio, pois encontrou somente um núcleo em cada conídio de ambas as formas, embora a variedade *major* se comportasse como poliploide quanto ao conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA).

FARGUES e col. (1975) fizeram um estudo comparado, por imuno-eletroforese, de extratos somáticos e metabólicos de quatro linhagens criptogâmicas entomopatogênicas de *M. anisopliae* distinguindo três tipos imunológicos, confirmando o estreito parentesco antigênico de duas linhagens do mesmo tipo pelas suas atividades enzimáticas após eletroforese. Citam que não notaram diferenças imunológicas importantes entre a linhagem de esporos pequenos (*minor*) e a de esporos grandes (*major*).

TULLOCH (1976) cita que as formas de tamanho de conídios de *M. anisopliae* não podem ser separadas somente por razões morfológicas, sendo necessárias medidas de conídios de 80 culturas do fungo. Diz, ainda, que a diferença entre essas formas justifica uma separação varietal propondo a combinação das formas de *JOHNSTON* (1915) em duas variedades dentro de *M. anisopliae*, a variedade tipo aplicável à forma de conídios curtos e a variedade *major* à forma longa de conídios.

3.2.3. Meios de cultura

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

ADAMĚK (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 leveduras, sendo que o crescimento aumentou com adição de 0,2% de tween 80, mas foi inibido por concentrações mais altas. Os esporos obtidos dessa forma causaram 50% de mortalidade em *Galleria mellonella* em condições de laboratório.

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/3 l 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, quando incubados a 22 - 26°C.

HIDALGO-SALVATIERRA e BERRIOS (1972) utilizaram o meio de Sabouraud Dextrose Agar juntamente com extrato de leveduras para determinar o LC₅₀ de *M. anisopliae*.

MARQUES e VILAS BOAS (1973) utilizaram um meio de arroz cozido na proporção de 100 g de arroz para 100 ml de água, a fim de produzir esporos para aplicação em campo, obten

do 4.654 kg de massa (arroz + esporos de fungo) em 18.616 garrafas de Roux.

AQUINO (1974) comparou a eficiência do substrato de arroz, composto de 50 g de arroz e 80 ml de água, com o de batata - dextrose - ágar e o de amido (goma de mandioca), verificando ser o primeiro altamente mais favorável à frutificação e desenvolvimento de *M. anisopliae*. A maior eficiência do meio de arroz foi comparada através da superior produção de esporos do fungo em um menor espaço de tempo. Os resultados do amido foram negativos, uma vez que o crescimento, sob todos os aspectos, do fungo, em mandioca, foi inferior ao de BDA e muito mais ainda, em relação ao arroz.

MOURA COSTA e MAGALHÃES (1974) citam que era usado, no Instituto Biológico da Bahia, meio de arroz cozido puro em água na mais diversas concentrações, para a produção de esporos de *M. anisopliae*, verificando que o mesmo tinha as seguintes desvantagens: à medida que se diminuía a concentração de arroz, mais difícil se tornava o manuseio devido à inconsistência do meio de cultura e, usando-o em concentrações mais baixas havia falta de homogeneidade do arroz em grão no meio solidificado. Para resolver esse impasse, resolveram utilizar a farinha de arroz, obtida com auxílio de um moinho e posteriormente passada em peneira de malhas finas. Verificaram que a melhor concentração deste novo meio era: 5% de farinha de arroz, 1% de ágar-ágar em pó e 100 ml de água desti

lada, ajustando o pH para 6,0.

BARNES e col. (1975) cultivaram *B. bassiana* e *M. anisopliae* em meio de cultura líquido contendo várias fontes de peptona comercial para determinar o efeito das mesmas na esporulação e crescimento dos fungos, obtendo diferentes respostas. Observaram que triptona, casitona e extrato de levedura foram efetivos para o crescimento micelial de *Metarrhizium* sendo o último, entretanto, o mais efetivo na produção de esporos. Citam que selatona e peptona (Bacteriológica) não foram efetivas nem para a esporulação nem para o crescimento de qualquer dos dois fungos.

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. Esse meio era inoculado com arroz contendo o fungo o qual, produzido dessa forma, pode ser usado no controle biológico de *Spodoptera frugiperda* em milho, *Diatraea saccharalis* e cigarrinhas em cana-de-açúcar e pastagens.

3.2.4. Patogenicidade

3.2.4.1. Fatores que afetam a patogênese

BALFOUR-BROWNE (1960) determinou que alguns

dos fatores que afetam a patogenicidade de *M. anisopliae* em relação ao inseto são: condição do inseto, estágio de desenvolvimento do inseto, sendo alguns mais resistentes que outros, e virulência da linhagem do fungo.

BICHUK (1962) pesquisou o efeito de diferentes condições de solo no desenvolvimento da infectividade de *M. anisopliae* em *Bothynoderos (Cleonus) punctiventris*, verificando o comportamento do fungo quando a umidade do solo era de 6,8 - 12,5% sem irrigação e 13,8 - 19,9% com irrigação, sendo a temperatura a 20 cm de profundidade de 6,2° a 25°C. Cita que a infecção máxima ocorreu a 16 - 20 cm de profundidade em um ano e a 21 - 25 cm em outro ano. Em geral, o fungo desenvolveu-se melhor em solo quente e úmido.

CLERK e MADELIN (1965) verificaram que a longevidade de conídios de *B. bassiana*, *P. farinosus* e *M. anisopliae* decresce à medida que a temperatura de armazenamento é aumentada de 8°C para 25°C, sendo também reduzida pela exposição à luz. Citam que os dois primeiros perderam rapidamente a habilidade de germinar mais em altas umidades de armazenamento do que em baixas. Em contraste, os conídios de *M. anisopliae* sobrevivem mais tempo em altas e baixas umidades e menos em umidades médias próximas de 45% de umidade relativa. Entretanto, se os esporos forem lavados com água destilada ou agentes molhantes, esse nível muda para 65% de umidade relativa. Observaram ainda, que o efeito desfavorável da umidade foi reduzi-

do ou suprimido em esporos estocados em atmosfera enriquecida com CO₂ ou isenta de oxigênio.

MASERA (1957) cita que *Metarrhizium* é estritamente aeróbico, sendo capaz de crescer em todos os solos em um pH de 2 a 10.

AQUINO (1974) evidencia que para o uso de fungos entomógenos no controle biológico de insetos-praga é da maior importância o conhecimento do poder de latência de seus propágulos, os quais poderão ser submetidos às mais diversas condições de ambiente no decorrer das operações de conservação, transplante e aplicação no campo.

BELL e HAMALLE (1974) ensaiaram 14 espécies e 6 linhagens de fungos para viabilidade após seus esporos terem sido estocados em sílica-gel, em tubos de ensaio, a -20°C, verificando que três espécies patogênicas a insetos, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *S. rileyi*, retiveram sua patogenicidade após três anos de estocagem, quando ensaios de laboratório foram conduzidos com insetos hospedeiros. Evidenciaram ainda, que após um ano de estocagem, o fungo *M. anisopliae* foi o mais patogênico dos três a *Heliothis zea*.

AQUINO (1974) comprovou a viabilidade dos esporos de *Metarrhizium* após 8 meses em água esterilizada sendo obtida, também, a conservação do fungo por dois anos em estado latente. O autor inoculou esporos deste fungo em solo es-

terilizado e colocado sob três condições diferentes: (1) no campo, recebendo luz direta do sol; (2) à sombra, com iluminação indireta do sol e (3) em ausência total de luz, verificando que houve morte dos esporos apenas no solo exposto diretamente ao sol.

O potencial de inóculo, como um outro fator, é muito importante, sendo o número de esporos capaz de entrar em contato com o hospedeiro e causar doença. Estes valores são bem discutidos por VEEN (1968) que estima um LD₅₀ de 150.000 conídios de *M. anisopliae*, para causar a morte de *Schistocerca gregaria* do 2º instar.

HIDALGO-SALVATIERRA e BERRIOS (1972) determinaram que a 5a. fase larval de *Hypsipyga grandella* Zeller é suscetível ao fungo *M. anisopliae*, verificando um LC₅₀ de $3,6 \times 10^7$ esporos.

AQUINO e col. (1975) citam que as alterações morfogênicas das colônias de *M. anisopliae*, como formação de micélio hialino ou pseudo-pigmentação das colônias, podem reduzir ou anular a produção de conídios, sendo que as frutificações normais se apresentam com aspectos de esporodóquio formado por numerosos conidióforos aglomerados. Observaram, em preparações microscópicas, que as formas micelianas hialinas são constituídas por raros conidióforos hipertrofiados e solitários, originados ao lado de numerosas hifas estéreis, não devendo ser desprezada a hipótese de que elas também são causa-

das pela elevação de temperatura ou efeito de luminosidade ou ainda, antibiose provocada por organismos invasores. A pseudo-pigmentação das colônias ocorre esporadicamente no reverso das mesmas aos 8 a 30 dias de idade, quando em incubação a temperaturas abaixo de 27°C . Esse escurecimento é, geralmente, ocasionado pela formação de hifas diferenciadas, densamente aglomeradas, que constituem um pseudo-plentênquima de cor castanha escura, formado de células irregulares que não afetam a esporulação.

Segundo COCHRANE (1958) a temperatura afeta o crescimento, germinação dos esporos, reprodução e, na verdade, todas as atividades dos fungos, sendo a temperatura "ótima" dependente das condições específicas de tempo e método de mensuração. Cita ainda, que a maioria dos fungos cresce, ao menos um pouco, a 25°C ou 30°C , sendo o seu micélio, entretanto, facilmente morto por temperaturas elevadas ou em temperaturas pouco acima do seu máximo para crescer.

Segundo LATCH (1965) o mecanismo de patogenicidade do *M. anisopliae* pode ser influenciado por fatores ambientais como temperatura, umidade e pH. Verificou que a temperatura ótima está ao redor de $25 - 30^{\circ}\text{C}$, temperatura na qual ele atinge o máximo de patogenicidade.

JOHNPULE (1938, apud VEEN, 1968) verificou que exposições de esporos de *M. anisopliae* a temperaturas de 50°C ou mais, por 5 minutos, inibiram a germinação. Os esporos pos

suem um ponto termal de morte comparativamente baixo e somente quando a temperatura decresce para 48°C ou menos é que as condições favoráveis para a germinação de esporos são obtidas. Verificou que temperaturas de 42°C não são letais aos esporos do fungo.

BALFOUR-BROWNE (1960) verificou que a morte de *Pyrausta nubilalis* por *M. anisopliae* acontecia em apenas quatro dias quando, tanto em condições de laboratório como em campo, a umidade era saturada e a temperatura de 25°C. Esse autor determinou a temperatura mínima para o fungo como sendo de 10°C, a ótima em torno de 25°C e a máxima entre 32° e 34°C.

DIOMANDE (1969) observou que larvas de *O. monoceros* morreram três semanas após terem sido inoculadas com pequenas quantidades de conídios de *M. anisopliae* a uma temperatura de 28°C. Cita que a incidência da doença nos insetos foi máxima entre 25° e 30°C, sendo que a 35°C o crescimento do fungo foi inibido e abaixo de 25°C a infecção progrediu vagarosamente até causar 100% de mortalidade.

Os dados acima estão de acordo com os reportados por MASERA (1957) o qual cita que altas temperaturas, entre 25° e 29°C, são importantes na patogenicidade por acelerar o processo de infecção, enquanto que a umidade não teve efeito marcante. Entretanto, WALSTAD e ANDERSON (1971) verificaram que este fungo requer umidade próxima a 92,5% e temperatura entre 15°C e 25°C para germinação do esporo, desenvol-

vimento micelial e esporulação.

AQUINO (1974) manteve culturas de *Metarrhizium* em garrafas de Roux contendo meio de arroz e em tubos de ensaio contendo batata dextrose agar (BDA) durante 6 meses, sob temperaturas que variaram desde 3°C até 10°C, verificando que tanto as culturas mantidas sob congelamento como as que permaneceram a 8°C durante 6 meses, paralisaram o 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 *Metarrhizium* durante este período.

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

3.2.4.2. Processo de patogênese

BALFOUR-BROWNE (1960) descreveu o fungo *M. anisopliae* como sendo constituído de uma hifa hialina, a qual penetra a quitina do inseto por secreção de enzimas tóxicas e entra na cavidade do corpo. Após a perda de atividade e subsequente morte do inseto, geralmente em poucos dias, os tecidos são invadidos e as hifas espalham-se através do corpo;

o cadáver torna-se duro e quebradiço. Eventualmente, o fungo rompe o envoltório do inseto formando almofadas alvacentas (esporodóquio) as quais tornam-se verdes com a produção de conídios.

MacCAULEY e col. (1968) citam que os primeiros sintomas da doença "muscardina verde" foram observados à temperatura de 20°C em *Limonius californicus* e *Ctenicera acripennis* em 4 a 5 dias e, em *Hypolithus bicolor* entre 8 a 10 dias após a inoculação com *M. anisopliae*, não sendo notada nenhuma penetração na via digestiva. Em seguida à morte do hospedeiro, o fungo se desenvolve rapidamente, o que foi verificado pela invasão do tecido interno e órgãos na seguinte sequência: corpos de gordura, sistema digestivo e túbulos de Malpighi, hipoderme e sistema nervoso, músculos e traquéia, dando a impressão de ruptura da cutícula por pressão mecânica na saída do corpo do hospedeiro. Após a emergência, a esporulação se deu em 24 horas.

Os autores acima sugeriram alguns fatores implicados na morte de insetos parasitados pelo fungo como: ação histolítica, bloqueio mecânico do intestino pelo micélio, produção de toxinas e modificações patológicas na hemolinfa, considerando os dois últimos mais importantes.

ZACHARUK (1970b) cita que a abundância de mitocôndrias, dictiossomas, ribossomos e retículo endoplasmático nas células apressoriais, sugere um alto nível de atividade

de metabólica secretora. A camada de gordura do integumento do hospedeiro desaparece no ponto de contato com a apressoria, indicando a possível utilização dessa camada pelo patógeno. Observou que existe uma substância mucóide envolvendo a parede das células apressoriais que parece ser secretada por essas células para servir como um adesivo.

ZACHARUK (1970c) apresentou evidência ultraestrutural de 4 estágios do desenvolvimento fúngico na penetração típica do integumento de larvas de Elateridae por *M. anisopliae*: (1) penetração da epicutícula por uma "estaca" produzida pela apressoria e a formação de uma penetração achatada sub-epicuticular; (2) penetração lateral de hifas e de corpos hifais irregulares com endoplasma eletro-denso (Tipo I); (3) penetração de corpos hifais regulares com endoplasma menos eletro-denso (Tipo II), a partir daqueles de Tipo I e sua proliferação; (4) penetração da procutícula até a hipoderme por corpos hifais do Tipo II.

O autor evidencia que apesar da penetração da epicutícula do hospedeiro pelo fungo ser facilitada inicialmente por pressão mecânica, ela é, primariamente, enzimática e que a penetração da procutícula se dá por separação mecânica das lâminas e fibrilas cuticulares, facilitadas por ação enzimática. A penetração começou três dias após a inoculação e foi completada em seis dias.

ZACHARUK (1971) observou que o *M. anisopliae*

desenvolve-se através de estágios estruturais dentro do corpo do inseto após penetração no integumento: a hifa de penetração dá origem aos corpos hifais, os quais tornam-se distribuídos através da cavidade do corpo e dão origem a hifas secundárias em todas as partes do corpo; o 3º estágio consiste de células com abundância de nutrientes armazenados e poucas inclusões metabolicamente ativas. Este último é chamado de estágio de clamidosporo, o qual parece poder manter a viabilidade fúngica no corpo do hospedeiro por períodos extensos, antes da esporulação superficial.

ZACHARUK (1973) verificou que após a formação da apressoria secundária, um novo aparato fúngico pode desenvolver-se através da nova cutícula na cavidade do corpo do hospedeiro, o qual não parece ser afetado pelas enzimas histolíticas do inseto devido à substância mucóide que envolve o fungo no espaço ecdisial.

SCHABEL (1976) alimentou *Hylobius pales* com uma quantidade pequena de esporos de *M. anisopliae*, sob condições que excluíram qualquer possibilidade de contaminação integumental, obtendo alta mortalidade, sendo que, quanto maior a dose de esporos, maior a porcentagem de mortalidade. Verificou que seções histológicas revelaram que o fungo invadiu o hospedeiro pela cavidade bucal, não havendo evidência de germinação e penetração dentro do trato intestinal. Os esporos retiveram sua viabilidade após passagem pelo intestino mesmo

estando presentes bactérias e leveduras.

KODAIRA (1962) cita que, em trabalhos seus anteriores, havia observado que 17 linhagens de 9 espécies de fungos que atacam insetos produzem substâncias tóxicas no meio de cultura e também no sangue desses insetos. *Oospora destructor* (outra classificação dada para *M. anisopliae*, segundo VEEN, 1968) e *Aspergillus ochraceus*, entre os fungos acima citados, produzem as substâncias tóxicas L-prolil-L-leucina anidrido e L-prolil-L-valina-anidrido, nos períodos iniciais de cultivo, obtidas a partir dos filtrados do meio de cultura sendo, entretanto, de baixa toxicidade aos insetos. Neste trabalho o autor isolou duas novas substâncias tóxicas, sendo uma com P.F. entre 188 e 185°C e a outra com P.F. de 234°C, as quais chamou de destruxinas A e B, obtidas a partir de filtrados de culturas de *O. destructor* (Metsch.) DELAC.

Segundo ROBINSON (1966) o fungo *M. anisopliae* apresenta um mecanismo bastante ativo, que está estreitamente relacionado com sua patogenicidade ao inseto. A patogenicidade está, também, relacionada com produção de toxinas e enzimas que produz, sem contudo se conhecer os diferentes tipos de infecção, pois estes variam com o inseto infectado.

Segundo ROBERTS (1966) a produção de toxinas de *M. anisopliae* poderia ocorrer quando o fungo fosse colocado para crescer em meio de cultura contendo tanto uma fonte de nitrogênio orgânico como inorgânico. Observou que a produ

ção de substâncias tóxicas não estava diretamente relacionada à quantidade de micélio produzida nos diferentes meios de cultura usados, havendo uma elevação eventual do pH em todos eles devida, provavelmente, à ação dos materiais liberados por lise da hifa. Notou que os valores de ED₅₀ ou seja, porcentagem de inativação dos insetos, foram pouco afetados por trocas no pH, o qual variou de 3 até quase 8, sendo que os ED₅₀ mais baixos precederam ou coincidiram com o pico dos pesos secos em todos os casos. Como não houve aumento de toxina após a lise das células, o autor concluiu que o princípio tóxico é uma exotoxina e que hifas intactas crescendo no hospedeiro poderiam liberar toxinas no mesmo.

De acordo com *MADELIN (1968)* a penetração do fungo no inseto é efetuada através da enzima quitinase, secretada pelo próprio fungo. Cita que *HUBER (1958)* demonstrou a ação da quitinase em culturas artificiais com vários fungos, dentre eles o *M. anisopliae*.

ROBERTS (1969) observou que as destruxinas A e B, produzidas pelas linhagens de *M. anisopliae* estudadas, tenderam a sobrepor-se nos procedimentos cromatográficos, sendo a maioria das destruxinas obtidas constituídas de misturas. A detecção de compostos diferentes das destruxinas nas culturas, as quais causaram morte imediata de *Galleria*, revelaram que o ED₅₀ encontrado anteriormente pelo mesmo autor (1966) não detecta, especificamente um único composto ou classe de

compostos. Verificou que os efeitos tóxicos desses compostos foram intensos somente por um curto período de tempo, imediatamente após a injeção dos mesmos nos insetos, sendo possível que os efeitos dos compostos sejam mais intensos se o fungo estiver crescendo em contato com o hospedeiro.

SAMŠIŇÁKOVÁ (1973, apud *FRIGO*, 1977) relacionou a atividade enzimática com a virulência de *Metarrhizium*. O autor verificou uma secreção celular de quitinase, lipase e proteases, encontradas em 11 espécies estudadas e as comparou com a capacidade de mortalidade em lagartas de *G. mellonella*. *MASERA* (1957) verificou também, que o fungo produz carboidrases, além das enzimas citadas acima.

CRISAN (1971) verificou que a digestão dos esporos de *M. anisopliae* no intestino de larvas de mosquito, é responsável pela liberação de toxinas fúngicas encapsuladas. O começo dos sintomas de intoxicação e subsequente morte da larva está correlacionado com o número total de esporos digeridos pela mesma. A necessidade que tem o inseto alvo de ingerir e digerir os esporos ativamente antes que a intoxicação possa ocorrer sugere que os métodos utilizando a patogenicidade ao invés da toxicidade de *M. anisopliae* são mais promissores para o seu uso no controle biológico de insetos. Cita que *ROBERTS* (1967) demonstrou a inabilidade de esporos mortos induzirem micotoxicoses.

ZACHARUK (1974) observou que toxinas produzi-

das por *M. anisopliae* e *Pseudomonas aeruginosa* no espaço ecdi-sial de um inseto são absorvidas através da cutícula e modifi-cam as células epidérmicas em dois tipos estruturalmente dife-rentes. Cita que as toxinas fúngicas parecem ser as princi-pais responsáveis pela formação de células claras e as toxi-nas bacterianas pela separação da cromatina em fibrilas nes-sas mesmas células, a fusão dos seus núcleos em grandes cor-pos nucleares e pelas trocas dos conteúdos citoplasmáticos de células escuras.

3.3. Utilização de *Metarrhizium anisopliae* no controle bio-lógico de insetos

3.3.1. Faixa de hospedeiros

MASERA (1957) estudou a patogenicidade e as características culturais e bioquímicas de *M. anisopliae* obser-vando que o mesmo era patogênico quando inoculado ou ingerido pelo bicho-da-seda, mas não por contato. Verificou a patoge-nicidade do fungo em *Tenebrio molitor* e *G. mellonella*.

VEEN (1968) cita que *M. anisopliae* tem como hos-pedeiro mais de 200 espécies de insetos, muitos dos quais são habitantes do solo. FARGUES e col. (1975) reafirmaram este fato assinalando que o fungo foi encontrado em, pelo menos, 204 espécies hospedeiras de insetos pertencentes a 43 famí-

lias e 7 ordens: Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Coleoptera.

HOLT (1961, apud URS e GOVINDU, 1971) cita que *M. anisopliae* foi encontrado infectando 43 espécies de insetos em várias partes do mundo. Baseados neste e em outros trabalhos, URS e GOVINDU (1971) verificaram o efeito do fungo sobre alguns insetos, obtendo infecção em *Oryctes rhinoceros* LINN (Coleoptera), *Poecillocerus pictus* F. (Orthoptera), *Bombyx mori* LINN e *Heliothis obsoleta* (HUBNER) (Lepidoptera).

BALFOUR e BROWNE (1960) verificaram o ataque de *M. anisopliae* a larvas de *Eritrea* sob condições de temperatura e umidade elevadas.

METCALFE (1971) conclui que *M. anisopliae* é um dos agentes controladores mais importantes de *S. saccholariola*.

HUGER (1966) e FANDIALAN e IBAÑEZ (1966) observaram sintomas de infecção causada por *M. anisopliae* em *O. rhinoceros*, praga que ataca os coqueiros, e utilizaram-no como agente controlador deste inseto com sucesso.

ZACHARUK e TINLINE (1968) ensaiaram, em laboratório, os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* contra Elateridae, verificando ser o último o mais eficiente dos dois, causando maior infecção em ovos e larvas do que em pupas e adultos. A infecção seguiu-se à aplicação direta dos esporos na cutícula, ao contato com solo infestado com esporos e à alimentação

as larvas com sementes de trigo inoculadas, sendo verificado o seu aumento em temperaturas entre 16° e 28°C. Notaram ainda, que a morte dos insetos, evidenciada pelo crescimento típico do fungo do lado externo do corpo do hospedeiro, foi maior nas fêmeas do que nos machos.

GOYER e BENJAMIN (1971) verificaram a morte de adultos de *Hyllobius rhizophagus* Millers, agente causal de deterioração e morte de *Pinus banksiana* Lamb., em 7 - 10 dias após terem entrado em contato com *M. anisopliae*.

SABA (1970) verificou que *M. anisopliae* infectava uma alta porcentagem de larvas, pupas e adultos de *Diabrotica balteata* LeConte, praga do pepino, sendo que a doença permaneceu endêmica na população, reaparecendo de maneira explosiva quando as condições eram ideais para o crescimento do fungo.

JAQUES e col. (1968) estimaram a taxa de mortalidade de larvas de *Pseudexentera mali*, praga da maçã e *Operophtera brumata*, mariposa de inverno, em solo de pomar onde formam casulas e pupas e em vermiculite tratada com *M. anisopliae*, *B. bassiana* e o nematoide DD₁₃₆. Observaram que o primeiro fungo reduziu a sobrevivência a menos de 5% em muitos testes, o 2º fungo teve pouco efeito sobre os insetos e o nematõide foi pouco menos efetivo que *M. anisopliae*.

BELL e HAMALLE (1970) conseguiram 100% de mor-

talidade de *Chalcodermus aeneus* 14 dias após o tratamento com 111×10^9 esporos por grama de substrato de *M. anisopliae* e 186×10^9 esporos por grama de substrato de *B. bassiana*, sendo somente o último patogênico às formas adultas do inseto. Num pequeno teste de campo, verificaram que *M. anisopliae* matava 88% dos insetos testados em 7 dias.

BELL e HAMALLE (1971) testaram as concentrações de 0,4; 1,6; 6,3 e 25×10^6 esporos de *M. anisopliae* por grama de solo em *C. aeneus*, infectados anteriormente pela bactéria *Serratia marcescens*, a qual também causa doença nestes insetos. Verificaram que a dosagem mais baixa do fungo foi a mais efetiva, evidenciando que entre 0,4 e $1,6 \times 10^6$ esporos não há incompatibilidade entre o fungo e a bactéria. MACLEOD e col. (1966) já haviam sugerido que o antagonismo entre dois patógenos no corpo do inseto deve reduzir a eficiência dos mesmos individualmente, e MASERA (1936, apud BELL e HAMALLE, 1971) verificou que o fungo *B. bassiana* matava uma quantidade menor de insetos, em laboratório, quando era combinado com a bactéria *Serratia* do que quando testado sozinho.

BERRIOS e HIDALGO-SALVATIERRA (1971) citam que *H. grandella* Zeller é uma séria praga das plantações de cedro e nos bosques tropicais e subtropicais, não se conhecendo medida eficaz de controle da mesma. Dessa forma, investigaram o efeito de *M. anisopliae* sobre esses insetos em ensaios de laboratório, obtendo 50% de morte dos mesmos com uma con-

centração de $1,2 \times 10^7$ esporos viáveis por mililitro.

WALSTAD e ANDERSON (1971) verificaram que a aplicação no campo de *M. anisopliae* nas quantidades de 35, 43 e 80 lb/acre resultou em 60, 77 e 100% de mortalidade para *H. pales*, enquanto que nenhum inseto controle morreu. Concluem que o fungo é um bom controlador do inseto sendo necessárias, entretanto, grandes dosagens de esporos, sendo o controle biológico dessa praga importante devido às restrições ao uso de inseticidas clorados.

SCHABEL (1976) alimentou *H. pales* com uma quantidade pequena de conídios de *M. anisopliae*, sob condições tais que excluía qualquer possibilidade de contaminações no integumento, obtendo resultados de alta mortalidade em 12 dias, sendo que com o emprego de doses maiores houve 90% de morte entre o 8º e 16º dia após o tratamento. Seções histológicas revelaram que o fungo invadiu o inseto pela cavidade bucal, não havendo evidência de germinação e penetração pelo trato intestinal. Verificou que os esporos retiveram sua viabilidade pois, após terem sido re-isolados do intestino germinaram em 20 horas.

GUAGLIUMI (1968, 1971) constatou controle satisfatório de *M. anisopliae* sobre *Mahanarva posticata*, *M. fimbriolata*, *Aeneolamia selecta selecta* e *A. selecta transversa*, o mesmo acontecendo com AQUINO (1974) que verificou a patoge-

nicidade deste fungo tanto para a cigarrinha da cana-de-açúcar como a dos capinzais, sendo o mesmo eficiente no controle dessas pragas.

BELL e col. (1972) verificaram o efeito dos fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *S. rileyi* sobre as larvas do besouro *D. balteata* LeConte, o qual ataca as raízes da batata doce, milho e outros vegetais, em três substratos diferentes: solo argilo-arenoso, areia de dumas costeiras e areia similar lavada em água para remover sais solúveis. Observações feitas a partir do 4º dia indicaram que a taxa de mortalidade larval causada por *Beauveria* e *Metarrhizium* aumentava significativamente, sendo que a patogenicidade deste último não diferiu nos diferentes substratos havendo, entretanto, uma interação significativa entre substrato e tempo.

TEDDERS e col. (1973) verificaram que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e o nematóide *Neoplectana dutkyi* podem ser utilizados no controle de larva de *Curculio caryae*, mediante testes feitos em laboratório e em campo onde, neste último, constataram a morte de insetos em 20 dias. Citam, entretanto, que a efetividade dos patógenos variou com o isolado, a técnica de cultura e o método de aplicação.

FERRON e col. (1975) e FERRON e ROBERT (1975) estudaram a suscetibilidade de *O. rhinoceros* e *Acanthoscelides obtectus* aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *B. tenella*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *S. rileyi*, verifi-

cando a morte dos primeiros somente quando inoculados com esporos de *M. anisopliae*. Utilizaram linhagens deste fungo dos tipos *major* e *minor*, observando uma definida suscetibilidade das formas adultas do inseto às linhagens do tipo *major* somente. Citam que a infecção em *A. obtectus* foi observada com a concentração de esporos, de todos os fungos, em torno de 5×10^6 esporos/ml a 1×10^9 esporos/ml.

3.3.2. Situação no Brasil

Os insetos que vêm sendo pesquisados em controle biológico com o fungo *Metarrhizium anisopliae* atualmente, no Brasil, são aqueles conhecidos com o nome de cigarrinhas, tanto das pastagens como da cana-de-açúcar, ou sejam: *Zulia entrecariana*, *Mahanarva posticata*, *Mahanarva fimbriolata*, *Deois sach*, *Deois flavopicta* e outras, pertencentes à ordem Homoptera, família Cercopidae (LEPAGE e MONTE, 1942; GUAGLIUMI, 1970).

Esses insetos atacam, principalmente, os capins: *Panicum maximum* (Colonião), *Digitaria decumbens* (Pangola), *Panicum purpuracens* (Angola) e *Brachiaria decumbens* (Brachiaria comum) (Boletim do Instituto Biológico da Bahia, 1975).

Segundo LEPAGE e MONTE (1942) e GUAGLIUMI (1970) os ataques mais intensos dessas pragas foram verificados nas épocas de umidade mais intensa, ocasião em que os insetos fi-

cam mais ativos. Os estragos são produzidos pela ativa sucção de grande número de adultos, que ficam na parte superior da planta, e de ninfas, na parte inferior junto ao solo. A planta não resiste à contínua sucção, começa a demonstrar depauperamento, caracterizando-se pela descoloração das folhas devido a uma intoxicação sistêmica, causada pela introdução de toxinas do inseto no momento de sucção da seiva. Como consequência, a planta apresenta-se com raias longitudinais amarello-pálidas, assumindo depois uma coloração marrom-avermelhada, chegando à secagem da folha e até à morte da planta.

Os autores descreveram alguns aspectos biológicos, observando que a postura é feita no solo, junto às touceiras, podendo ficar os ovos durante muito tempo sem eclosão, ativando-se na época do início das chuvas, sendo facilmente notado o aumento da população do inseto nessa época. Seu aparecimento coincide com a vegetação mais luxuriante, tendo as cigarrinhas maior quantidade de alimento à sua disposição, especialmente as ninfas, que necessitam de seiva abundante para a produção de espuma. Citam que a espuma produzida é, aparentemente, um produto dos tubos de Malpighi e excretada pela extremidade abdominal, sendo mantida pelo suco que as ninfas retiram do vegetal. O inseto tem a necessidade de mantê-la, pois que não poderá viver sem a umidade que ela produz parecendo, entretanto, que a secreção espumosa também é uma defesa contra inimigos naturais, falta de umidade do ambiente e defesa aos próprios inseticidas.

GUAGLIUMI (1968), analisando os métodos de controle até então usados para as cigarrinhas, concluiu que o uso de produtos tóxicos já estava causando um sério desequilíbrio biológico entre os fatores positivos e negativos que regulam as relações recíprocas dos insetos úteis e dos insetos daninhos à cana-de-açúcar, com vantagem quase sempre dos últimos que, não mais controlados pelos inimigos naturais, frequentemente podem transformar-se em verdadeiras calamidades.

GUAGLIUMI (1970) assinalou a invasão de *A. selecta* nas plantações de cana-de-açúcar nos Estados de Alagoas e Pernambuco, verificando que o surto foi dominado e limitado pelo fungo entomógeno *Empusa* sp., o qual matou até 90-95% dos adultos presentes.

GUAGLIUMI (1971) cita que a cana-de-açúcar "queimada" pelos adultos da cigarrinha apresenta dois tipos de danos econômicos: um no campo, com a redução da tonelada/ha de cana produzida e outro na usina, devido à diminuição do teor de sacarose nos colmos moídos, observando-se uma redução de 30 - 35% no conteúdo de sacarose na cana atacada.

Com esses dados pode-se imaginar o que significa, economicamente, o prejuízo causado à indústria açucareira nordestina pelas cigarrinhas, o qual pode alcançar e superar a terceira parte do valor total da safra e isto sem contar que os canaviais muito atacados podem chegar ao ponto de não pagar o custo do corte da própria cana, devendo ser abandonados

e destruídos. *GUAGLIUMI (1971)* cita que 300 mil ha são cultivados com cana no Estado de Pernambuco e no Estado de Alagoas essa área é de 120 mil ha.

Com o fim de reduzir o surto de cigarrinhas das raízes na cana e no capim pangola, sem recorrer ao uso de inseticidas e sem interferir com o fungo *Empusa* que ataca preferencialmente os adultos, *GUAGLIUMI (1970)* foi o primeiro pesquisador a instalar no Brasil um experimento com *M. anisopliae*. Aplicou o fungo no campo na razão de 500 - 1000 g de esporos em 400 a 500 l de água por ha, diretamente sobre o colmo infestado da cana, para facilitar seu contato com as ninfas debaixo da espuma e sobre a folhagem das canas jovens.

GUAGLIUMI (1971 e 1972) resume os dados obtidos em experimentos de campo com *M. anisopliae* em: (a) depois de 15 a 20 dias de aspersão dos esporos, a mortalidade das ninfas e dos adultos pode superar a 80% nas áreas diretamente alcançadas pela suspensão de esporos; (b) depois de 1 mês encontrou-se até 60 - 65% de ninfas e adultos mortos como consequência da nova esporulação do fungo nos insetos atacados primeiramente; (c) a média de mortalidade de ninfas e adultos, observada depois de 30 a 60 dias desde a aplicação do fungo em 26 áreas de dispersão, foi de 35%, com porcentagens de 40 a 50, especialmente entre as ninfas; (d) ninfas e adultos mortos pelo fungo aparecem, desde a segunda geração do fungo, a vários metros de distância das áreas tratadas inicialmente, sen

do esta expansão favorecida pelo vento e pela atividade dos adultos; (e) o fungo segue atuando e expandindo-se em maior ou menor escala durante todo o ano, superando as fases críticas do verão, do corte da cana e da queima da folhagem, para aumentar outra vez com a chegada das novas chuvas que provocam um aumento nas populações das cigarrinhas; (f) o uso do fungo é compatível com o uso de inseticidas, havendo-se demonstrado como complementar dos mesmos; (g) por tratar-se de um fungo entomógeno é inócuo para a maioria dos animais de sangue quente, não acarretando problemas desagradáveis para outras plantas, animais ou para o homem, nem interfere na micro e macro-fauna benéfica dos parasitas e predadores.

GUAGLIUMI (1972) conclui, após realizar vários trabalhos com *M. anisopliae*, que o fungo está se tornando um importante fator limitante da cigarrinha no Estado de Pernambuco, da mesma maneira que é comprovada no sul do país, devendo-se continuar outras "áreas de dispersão" do fungo em maior número possível.

MARQUES e VILAS BOAS (1973) apresentam como resultados da utilização do fungo *M. anisopliae* no controle da cigarrinha da folha, *M. posticata*, que, após utilização de 40 garrafas de Roux contendo arroz mais esporos, diluídos em 400 litros de água, sendo aplicada 1 garrafa/ha por via terrestre e 30 garrafas/80 litros de água por pulverização aérea, obteve-se de 30 a 40% de mortalidade para ninfas e 20 a 30% para

adultos. Assinalam que o fungo foi encontrado parasitando ninfas e adultos de cigarrinha em áreas vizinhas ou relativamente distantes daquelas que receberam a suspensão de esporos. Observaram que além das cigarrinhas foram encontrados, nos canais de Pernambuco, outros insetos daninhos à cana-de-açúcar parasitados pelo fungo, ou sejam: *Diatraea* spp., *Metamasius hemipterus*, *S. frugiperda* e outros de menor importância.

AQUINO e col. (1975) desenvolveram uma nova técnica de multiplicação de *Metarrhizium* obtendo um produto sob a forma de pó que foi denominado Metaquino, tornando prática e viável a utilização desse agente biótico em larga escala, pois, obtiveram melhoria na germinação do fungo, à temperatura de 7°C as massas esporicas foram conservadas sem prejuízo da germinação e virulência do entomógeno e, em experimentos de campo, registraram uma mortalidade da ordem de 53% para adultos e 65% para ninfas.

Como pode-se verificar pela revisão apresentada, somente a partir de 1970 é que se iniciou com GUAGLIUMI os primeiros trabalhos, no Brasil, com o fungo entomógeno *M. anisopliae*. No entanto, até hoje, os estudos têm sido praticamente sobre o fungo, no sentido de multiplicação e distribuição deste em áreas experimentais, bem como para alguns agricultores e estudo da região onde os experimentos têm apresentado resultados positivos.

Existem, atualmente no Brasil, vários laboratórios empenhados no estudo de fungos entomógenos. Nestas instituições desenvolvem-se trabalhos relacionados com os fungos *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. tenella*, *Nomuraea* e outros.

Segundo AZEVEDO e MESSIAS (1977) pode-se separar em dois aspectos as linhas de pesquisa que estão sendo conduzidas nestas instituições, sendo um relacionado com estudos a respeito do fungo e outro relacionado com estudos sobre a interação fungo-inseto parasitado.

A primeira pode ser dividida em dois aspectos a saber: estudos básicos e estudos experimentais em campo. Como estudos básicos considera-se: 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 e estudos de natureza bioquímica.

Na área experimental são considerados: dosagem (LD_{50}), observação dos diferentes isolados em regiões variadas, persistência no solo, eficiência na aplicação, ação contra várias espécies de insetos, ação contra inimigos naturais, número de aplicações necessárias para maior eficiência bem como épocas de aplicação e ação do fungo sobre outras pragas.

Com relação aos insetos diretamente ligados pode-se citar: levantamento de espécies, biologia, flutuação, inimigos naturais, metodologia utilizada para levantamento,

dados econômicos, resistência de variedades de pragas, plantas hospedeiras e estudos de ordem genética do hospedeiro.

Segundo AQUINO (1974), AQUINO e col. (1975) e AZEVEDO e MESSIAS (1977) essas observações isoladas não surtiram ainda resultado, apesar da cigarrinha no Estado de Pernambuco, esteja sendo controlada pelo fungo *M. anisopliae*. Isto constitui-se, no entanto, num fato isolado, regionalizado, sendo que tentativas de repetição do mesmo não têm sido conseguidas por pesquisadores de outras regiões. Parece que as condições microclimáticas são as responsáveis por esse fracasso já que a região Pernambucana possui condições de temperatura e umidade ideais para o desenvolvimento do fungo e da doença por ele causada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens utilizadas

A linhagem de *Metarrhizium anisopliae* utilizada neste trabalho foi cedida pelo Instituto Biológico da Bahia recebendo a denominação de A. Esta linhagem tem sido empregada nos ensaios de controle biológico, no campo, contra a cigarrinha das pastagens e da cana-de-açúcar por diversas Instituições. Além da linhagem A, para o ensaio de resistência a fungicidas, foram também utilizadas as linhagens C, K e E₆ cedidas, respectivamente, pelo Dr. Claudio Luiz Messias (UNICAMP), Dr. Kamal Elkadi (CEPLAC) e Dr. José Ayres Ventura (EMCAPA, Espírito Santo).

4.2. Meios de cultura e soluções usadas

4.2.1. Meio completo (*PONTECORVO e col., 1953*)

Nitrato de sódio	6,0 gramas
Fosfato dihidrogenado de potássio.	1,5 gramas
Cloreto de potássio.	0,5 gramas
Sulfato de magnésio - 7 H ₂ O	0,5 gramas
Sulfato de ferro e sulfato de zinco.	traços
Glicose	10 gramas
Peptona	2,0 gramas
Caseína hidrolisada.	1,5 gramas
Extrato de leveduras	0,5 gramas
Solução de vitaminas	1,0 ml
Ácido nucleico de leveduras.	2,5 ml
Água destilada	1 litro

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4%; quando sólido foram adicionados 15 gramas de ágar por litro.

4.2.2. Meio de arroz (Modificado a partir do meio proposto por *AQUINO, 1974*)

Farinha de arroz	15 gramas
Glicose	10 gramas
Água destilada	1 litro

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4% quando

sólido foram adicionadas 15 gramas de ágar por litro.

4.2.3. Meio de batata (BATATA-DEXTROSE)

Infusão de batatas	200 gramas
Dextrose	20 gramas
Água destilada	1 litro

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 4%.

4.2.4. Solução de vitaminas

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

A solução foi esterilizada em vapor fluente por 3 dias consecutivos e guardada em frasco escuro, sob clorofórmio, no refrigerador.

4.2.5. Hidrolisado de ácido nucleico de levedura

Foram colocados 2 gramas de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1N de NaOH e 2 gramas de ácido nucleico de leveduras em 15 ml de solução 1N de HCl. As soluções foram aquecidas por 20 minutos a 100°C, misturadas, e o pH foi ajustado para 6,0. A mistura foi filtrada em seguida, sendo o volume completado para 40 ml e a preparação foi guardada em refrigerador sob clorofórmio.

4.2.6. Solução salina

Cloreto de sódio	8,5 gramas
Água destilada	1 litro

Foram preparados frascos com 9 ml desta solução e esterilizados em autoclave por 15 minutos, à pressão de 1 atmosfera.

4.2.7. Solução de Tween

Foi adicionado Tween 80 à água destilada, numa concentração de 0,1% (v/v). Foram colocados 2,5 ml em tubos de ensaio, autoclavados e conservados em refrigerador.

4.3. Esterilização e temperatura de incubação

Todos os meios de cultura e soluções utilizadas no presente trabalho (a menos que esteja especificado de maneira diversa) foram esterilizados em autoclave à pressão de 1 atmosfera por 15 minutos.

Em todos os experimentos (exceto naqueles onde se estuda o efeito de diferentes temperaturas) a temperatura de incubação foi de 28°C.

4.4. Efeito da temperatura na germinação

Suspensão de conídios, obtidos de colônias incubadas oito dias em placas de Petri contendo meio completo, foi preparada em solução de Tween. Através de hematímetro estimou-se o número de conídios em cerca de $10^6 - 10^7$ por mililitro. Desta suspensão foram feitas diluições convenientes, de modo a se obter uma concentração aproximada de 100 conídios por placa de Petri. Aliquotas contendo esse número de conídios foram semeadas em 15 placas de Petri, sendo duas delas incubadas a 28°C e as restantes incubadas a 37°C, sendo retiradas duas a duas, a partir de 24 h desta temperatura e passadas para 28°C. No quinto dia de incubação a 37°C as últimas cinco placas foram retiradas e incubadas a 28°C.

Após 5 dias de incubação, efetuou-se tanto a contagem das colônias das placas mantidas a 28°C como daquelas retiradas diariamente de 37°C e transferidas para 28°C.

4.5. Produção de conídios

De uma suspensão de conídios preparada como descrito no item 4.4., foram retiradas alíquotas de 1 ml e semeadas em cinco placas de Petri, contendo meio completo e mantidas em estufa sem iluminação a 28°C.

Após oito dias de incubação cortou-se o meio de cultura dessas placas contendo o fungo em crescimento com o auxílio de um furador de rolha esterilizado, obtendo-se dois discos de 7 mm de diâmetro por placa.

Cada disco foi colocado separadamente em um tubo de ensaio contendo 2,5 ml de Tween 80. Após agitação durante 1 minuto, retirou-se alíquotas de cada tubo das quais o número de conídios foi estimado por hematímetro.

A seguir, retiraram-se alíquotas de 0,1 ml de cada tubo, as quais foram semeadas em 10 placas de Petri, contendo meio completo, para verificar qual a produção de conídios desse fungo.

Após oito dias de incubação, retiraram-se, no-

vamente, dois discos de 7 mm, por placa, seguindo-se o mesmo procedimento descrito acima, sendo os conídios contados em he matímetro, a fim de confirmar os valores de produção de conídios obtidos anteriormente. Com esses dados pode-se calcular a produção de conídios por área da placa de Petri, ou seja, 6.358,5 mm².

4.6. Efeito da luz

4.6.1. Na taxa de crescimento

Foi preparada uma suspensão de conídios como descrita no item 4.4. Fez-se a semeadura desses conídios com o auxílio de um fio de platina, molhando-o na suspensão e inoculando-o no centro da placa de Petri contendo meio completo.

Foram utilizadas quinze placas de Petri, sendo cinco delas colocadas sob luz contínua, cinco sob luz alternada e cinco em escuro total.

A luminosidade total foi obtida através de três lâmpadas incandescentes de 60 W e quatro lâmpadas fluorescentes, ficando as mesmas a uma altura de 60 cm da bancada onde se situaram as placas. A luminosidade alternada foi obtida co brindo-se as placas, que ficaram na mesma bancada, com tecido preto a cada 12 horas. O escuro total foi obtido embrulhan do-se as placas com papel alumínio e colocando-as em estufa com

temperatura controlada. Tanto a bancada quanto a estufa foram si
tuadas numa mesma sala onde existia um sistema de ar condicio
nado a fim de manter a temperatura a 28°C.

Efetuar^{am}-se medições diárias dos diâmetros das
colônias a partir do terceiro, até o sétimo dia de incubação.

4.6.2. Na produção de conídios

De uma suspensão de conídios, preparada como des
crito no item 4.4., foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e se-
meadas em placas de Petri, contendo meio completo.

Foram utilizadas quinze placas de Petri sendo
cinco delas colocadas sob luz contínua, cinco sob luz alterna
da e cinco em escuro total, nas mesmas condições descritas no
Ítem anterior.

Após o terceiro dia de germinação e, diariamen
te, até o sétimo dia, foram retiradas duas amostras de cada
placa. Essas amostras constituíam-se em discos de meio de
cultura, contendo o fungo em crescimento, obtidos com o auxí-
lio de um furador de rolha, de 7 mm de diâmetro.

Cada disco foi colocado, separadamente, em um
tubo de ensaio contendo 2,5 ml de Tween 80. Após agitação dos
tubos durante 1 minuto, retiraram-se alíquotas e o número de

conídios foi estimado usando-se um hematímetro.

4.7. Germinação em diferentes meios de cultura

Foram preparadas suspensões de conídios de colônias incubadas por oito dias em meio completo, de acordo com o ítem 4.4., sendo o número de conídios estimado em hematímetro. Aliquotas de 0,1 ml foram colocadas em tubos contendo 10 ml de meio de cultura, resultando na concentração adequada para se obter 50 conídios por campo de microscópio.

Foram usados três meios de cultura líquidos: - meio completo, batata-dextrose e meio de arroz, os quais foram distribuídos em quinze tubos de ensaio, sendo cinco tubos contendo 10 ml de cada meio de cultura.

A partir da primeira hora de incubação a 28°C, retiraram-se alíquotas dos tubos contendo os diversos meios de cultura e efetuou-se a contagem dos conídios germinando, em lâminas de microscópio, de um total de 50 conídios por tubo.

As contagens foram feitas até 12 horas após a inoculação, a fim de verificar se havia algum efeito dos diferentes meios de cultura, na germinação dos conídios.

4.8. Curvas de sobrevivência

4.8.1. Raios gama

De suspensão de conídios preparada como descrito no item 4.4., retiraram-se alíquotas de 1 ml que foram colocadas em frascos de 30 ml com tampa de baquelite contendo 9 ml de solução salina completando, assim, o volume dos mesmos para 10 ml.

Foram usados cinco frascos sendo um para cada dosagem usada ou 20, 40, 60, 80 e 100 KR. O controle foi feito com um frasco semelhante contendo 1 ml da mesma suspensão em 9 ml de salina e mantido à mesma temperatura, ou seja, 28°C.

A irradiação foi obtida através da fonte ^{60}Co do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

Os seis frascos contendo os conídios foram irradiados, tendo sido mantida uma distância de 29 cm entre os tubos da fonte. A taxa de irradiação usada foi de 984 KR por hora e os tempos de irradiação para as cinco dosagens foram de 1,2; 2,4; 3,7; 4,9 e 6,1 minutos.

Diluições convenientes foram feitas, sendo semeado 0,1 ml em, pelo menos, duas placas de Petri, contendo meio completo, por tratamento e controle.

Após incubação por oito dias a 28°C, foi feita

a contagem das colônias. A porcentagem de sobrevivência foi determinada considerando as diluições e, como 100% de sobrevivência, o número de conídios viáveis estimados na amostra sem tratamento.

4.8.2. Luz ultravioleta

Suspensão de conídios preparada como descrito no ítem 4.4., foi diluída (1:10) em solução salina, colocada em placa de Petri, esterilizada e irradiada nos tempos de 1/2; 1; 2; 4 e 8 minutos com luz ultravioleta de ondas curtas (2.537 Å), a uma distância de 10 cm das placas. Antes do início da irradiação, foram retiradas alíquotas de 1 ml da suspensão, sendo convenientemente diluídas em salina e feita semeadura em meio completo. Após a irradiação, nos tempos citados acima, o processo foi repetido sendo semeadas, no mínimo, três placas por tratamento.

Após oito dias de incubação a 28°C, foram feitas contagens das colônias desenvolvidas, nas placas semeadas. A determinação da porcentagem de sobrevivência nos tempos de irradiação foi feita tomando como 100% o número de conídios viáveis estimados na amostra sem irradiação.

4.9. Resistência a fungicidas

4.9.1. Determinação dos níveis de resistência

Foram usados os fungicidas Carboxin (*Vitavax* 75 PM: 5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxatiin-3-carboxanilido), *Clo-roneb* (Demosan 65 W: 1,4-dicloro-2,5-dimetoxibenzeno) e *Benomyl* (*Benlate*: metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbamato), para verificar seu efeito na sobrevivência das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae*.

Pesaram-se 10 mg dos fungicidas *Vitavax* e *Clo-roneb* com 75% de princípio ativo e 20 mg do fungicida *Benlate* com 50% de princípio ativo e colocou-se os mesmos em tubos de ensaio. Adicionou-se a esses tubos 1 ml de Metanol p.a. para dissolver os fungicidas e completou-se o volume com 9 ml de água destilada e esterilizada.

Foram feitas diluições apropriadas dos fungicidas *Cloroneb* e *Vitavax*, a fim de se obter em 20 ml de meio de cultura as concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1.024 µg por mililitro. Para o fungicida *Benlate* foram usadas as concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2 e 4 µg por mililitro, pois em um teste preliminar, verificou-se que nas concentrações acima de 4 µg por mililitro o fungo não apresentava crescimento.

Em tubos de ensaio, contendo 20 ml de meio com

pleto adicionaram-se quantidades de fungicida apropriadas para as concentrações desejadas e, após agitação, verteu-se em placas de Petri, devidamente esterilizadas. Foram usadas duas placas de Petri para cada concentração, num total de 58 placas para cada linhagem.

Como testemunha foram usadas oito placas de Petri contendo meio completo sem fungicida.

Foram preparadas suspensões de conídios das quatro linhagens de *M. anisopliae* citadas anteriormente, como descrito no item 4.4., as quais, após solidificação do meio nas placas, foram inoculadas com o auxílio de um fio de platina como descrito no item 4.6.1., sendo disposta, cada linhagem, equidistantemente na placa de Petri. No controle, a inoculação foi feita no centro da placa.

As medidas dos diâmetros dos halos de crescimento foram feitas no 49 dia de incubação.

4.9.2. Isolamento de mutantes resistentes a Benlate

Em tubos de ensaio, contendo 20 ml de meio completo, foram adicionadas quantidades do fungicida Benlate, a partir de uma concentração inicial descrita no item acima, a fim de se obter a concentração de 8 µg por mililitro. Depois de agitado, o conteúdo desses tubos foi vertido em placas de

Petri, tendo sido utilizadas 10 placas.

De uma suspensão de conídios da linhagem A de *Metarrhizium anisopliae* preparada como descrito no item 4.4. foram retiradas alíquotas de 0,1 ml contendo 2×10^6 conídios e semeadas nas placas uniformemente, com o auxílio de uma alça de Drigalsky.

Após oito dias de incubação, efetuou-se a contagem das colônias nas placas contendo o fungicida, sendo calculada também, a frequência de mutação dessa linhagem para resistência a Benlate.

4.9.3. Concentração mínima inibitória para os mutantes resistentes a Benlate

Cinco mutantes resistentes a 8 µg por mililitro de Benlate, obtidos como descrito no ítem acima, e que apresentavam bom crescimento nessa concentração, foram ensaiados para se determinar qual a sua concentração mínima inibitória.

Foram preparadas concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 µg por mililitro do fungicida Benlate seguindo o procedimento descrito no ítem 4.9.1.

As suspensões de conídios dos mutantes e da

linhagem A de *M. anisopliae* foram preparadas e inoculadas em placas de Petri, contendo meio completo, juntamente com o fungicida, de acordo com o ítem 4.4. e 4.9.1., respectivamente.

Os controles constituíam-se da linhagem A inoculada no centro das placas citadas acima e, da sua inoculação em duas placas de Petri, contendo meio completo sem fungicida, na qual foram repicados também os cinco mutantes.

Após oito dias de incubação efetuou-se a medição dos diâmetros das colônias nas diversas concentrações.

4.9.4. Tipo de efeito dos fungicidas Benlate e Vitavax sobre *M. anisopliae*

Placas contendo meio completo juntamente com os fungicidas Vitavax e Benlate, nas concentrações de 256 µg por mililitro e 512 µg por mililitro para o primeiro e 4 µg por mililitro para o segundo, foram preparadas como descrito no ítem 4.9.1.

De suspensões de conídios das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae*, preparadas como descrito no ítem 4.4., foram feitas diluições convenientes, de modo a se obter uma concentração aproximada de 150 conídios por placa de Petri. Foram retiradas alíquotas de 0,1 ml e semeadas nas placas de Petri citadas acima, tendo sido utilizadas duas placas com ca

da concentração para cada linhagem, num total de 24 placas.

Após oito e quinze dias de germinação foi feita a contagem de conídios germinados.

5. RESULTADOS

5.1. Números de colônias obtidas após incubação de conídios de *M. anisopliae* em diferentes temperaturas

A Tabela I sumariza os números de colônias obtidas após incubação a 28°C e 37°C, conforme descrito no item 4.4.

Tabela I - Números de colônias obtidas após incubação de conídios da linhagem A de *M. anisopliae* a 28°C e 37°C.

	37°C	28°C	37°C → 28°C*				
			D i a s				
			1	2	3	4	5
Médias	0	98	84,0	42,5	10,0	0,0	0,0
Porcentagens	0	100	85,7	43,3	10,2	0,0	0,0

*As placas incubadas a 37°C foram sendo retiradas diariamente e colocadas a 28°C.

Pode-se notar pela Tabela que a 28°C o fungo germina muito bem, havendo-se obtido o número esperado de colônias, sendo as mesmas de tamanho bem grande.

A temperatura de 37°C realmente, como já visto na revisão de literatura, inibe a germinação dos conídios, não tendo sido verificado crescimento algum nas placas mantidas a essa temperatura.

Com o fim de verificar se o efeito da temperatura era fungicida ou fungistático transferiu-se, diariamente, duas placas mantidas a 37°C para a temperatura de 28°C. Observou-se crescimento de colônias nas placas retiradas até o terceiro dia de incubação a 37°C, sendo o mesmo decrescente, com colônias bem menores que as anteriores e, a partir do quarto dia de retirada, obteve-se 0% de germinação após cinco dias a 28°C.

5.2. Produção de conídios da linhagem A de *M. anisopliae*

A Tabela II sumariza os números de conídios obtidos conforme o procedimento descrito no item 4.5.

Tabela II - Números de conídios produzidos em amostras de 7mm de diâmetro. (Nº de conídios x 10⁴/ml).

Amostra nº	Contagens		Médias das contagens	
	1a.	2a.	1a.	2a.
1.1.	100	315	69,5	242,5
1.2.	39	170		
2.1.	177	190	174,0	182,5
2.2.	171	175		
3.1.	77	325	81,5	420,0
3.2.	86	515		
4.1.	83	160	99,0	215,0
4.2.	115	270		
5.1.	121	305	111,5	210,0
5.2.	102	115		
		TOTAL	535,5	1270,0
		MÉDIA	107,1	254,0

5.3. Medidas dos diâmetros de colônias da linhagem A de *M. anisopliae* submetidas a diferentes intensidades de luz

A Tabela III sumariza as medidas dos diâmetros das colônias provenientes de placas incubadas sob luz contínua, luz alternada e escuro total, de acordo com o procedimento descrito no Ítem 4.6.1. A Figura 1 evidencia as curvas obtidas nos diferentes tratamentos.

Tabela III - Diâmetros em centímetros de colônias submetidas durante incubação à luz contínua, alternada e escuro total.

Dias	L u z					
	Contínua			Escuro		
	Repetições	Média	Alternada	Repetições	Média	Repetições
3	0,8 0,9 0,6 0,9 0,6	0,76	1,5 1,2 0,8 0,9 1,10	1,2 0,9 1,3 1,1 0,9	1,08	
4	1,2 1,1 0,9 1,1 1,0	1,06	1,3 1,5 1,8 1,6 1,55	1,3 1,5 1,8 1,3 1,5	1,48	
5	1,8 1,7 1,6 1,7 1,5	1,66	2,2 2,3 1,9 2,0 2,10	2,2 1,9 2,5 2,0 2,0	2,32	
6	2,2 2,2 2,0 2,5 1,9	2,16	2,5 2,8 2,4 2,5 2,55	2,5 2,5 2,9 2,5 2,7	2,62	
7	2,3 2,1 2,5 2,1 2,2	2,24	3,2 2,7 2,7 2,8 2,85	3,1 2,8 3,2 2,8 2,9	2,96	

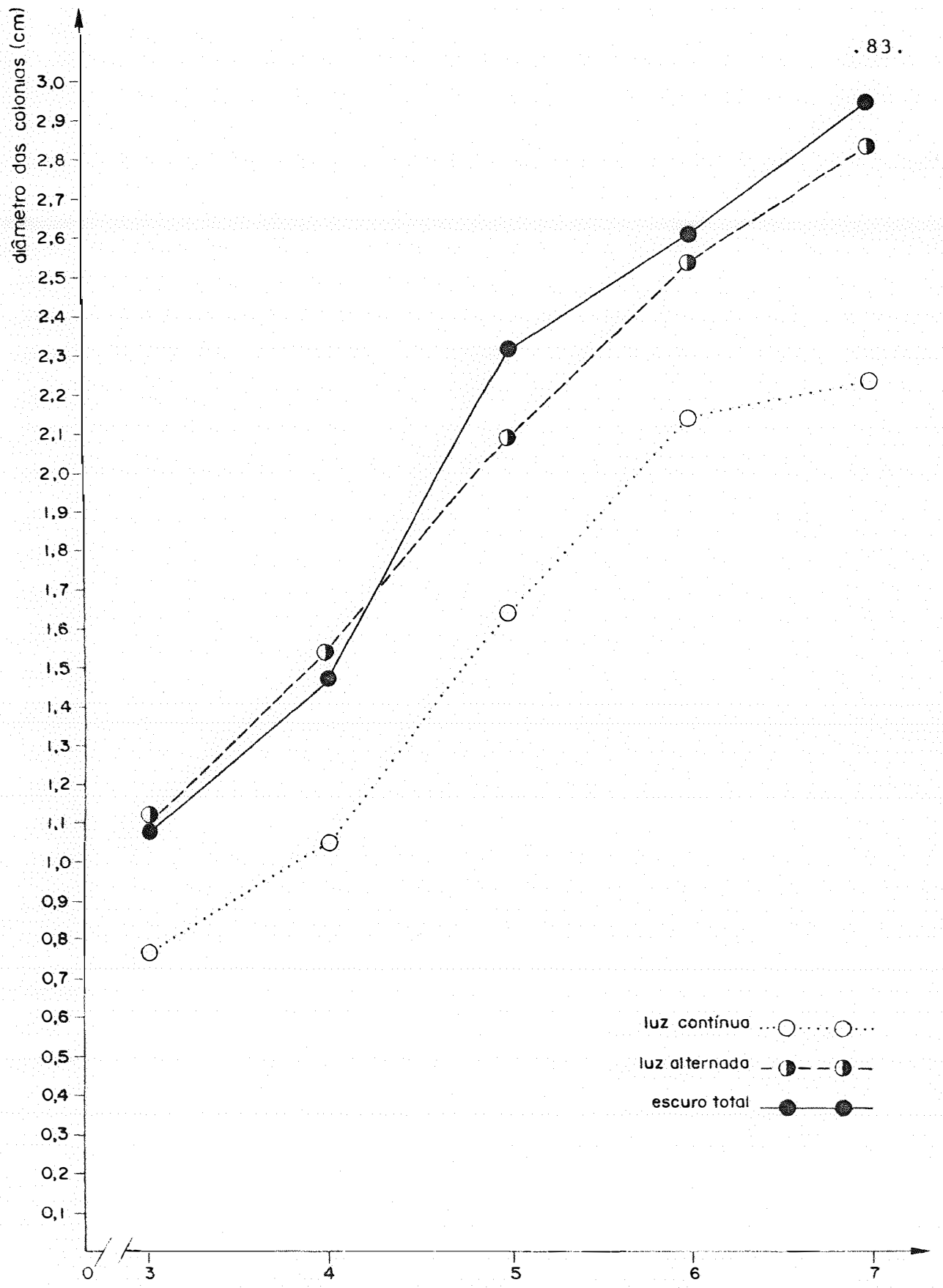


Fig. 1 - Curvas de crescimento da linhagem A de *M. anisopliae* submetida a diferentes intensidades de luz

Tabela IV - Total de crescimento das colônias da linhagem A de *M. anisopliae* entre o 3º e 7º dia de incubação sob luz contínua, alternada e escuro total*.

Repetições	L u z		Escuro
	Contínua	Alternada	
1	1,5	1,7	1,9
2	1,2	1,5	1,9
3	1,9	1,9	1,9
4	1,2	1,9	1,7
5	1,6		2,0
TOTAL	7,4	7,0	9,4
MÉDIA	1,48	1,75	1,88

*Diferença de crescimento em centímetros entre o 3º e 7º dia de incubação. Ver Tabela III.

Como foi perdida uma das repetições do tratamento com luz alternada, aplicou-se o teste F de acordo com a fórmula proposta por *PIMENTEL GOMES, 1963*, para o caso de experimentos com uma parcela perdida.

Tabela V - Análise de variância da taxa de crescimento das colônias de *M. anisopliae* submetidas a diferentes intensidades de luz.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F.
Tratamentos	2	0,414	0,207	4,5*
Resíduo	11	0,506	0,046	
Total	13	0,920		

Como o teste F deu significativo ao nível de 5% de probabilidade, isso quer dizer que existem, provavelmente, diferenças entre tratamentos para a taxa de crescimento. Para testar se os tratamentos diferiam foi usado o teste de Tukey.

Tabela VI - Teste de Tukey para o caráter taxa de crescimento em diferentes intensidades de luz.

Tratamentos	Médias (cm)	Tukey 5%
Escuro	1,88 ⁺	a
Luz alternada	1,75 ⁺⁺	ab
Luz contínua	1,48 ⁺	b

+ Média de 5 repetições.

++ Média de 4 repetições.

$$\Delta_1 = \text{D.M.S.} = 0,37$$

$$\Delta_2 = \text{D.M.S.} = 0,39$$

Δ_1 = Comparação de médias com mesmo número de repetições.

Δ_2 = Comparação de médias com número diferente de repetições.

Os resultados do teste de Tukey mostraram que as médias acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, enquanto que as médias de letras diferentes diferem entre si a esse nível.

Isto significa que a taxa de crescimento da linhagem A de *M. anisopliae*, além de ter sido maior no escuro do que nos outros dois tratamentos, foi estatisticamente semelhante ao tratamento com luz alternada, sendo diferente estatisticamente do tratamento com luz contínua. Este último, por sua vez, não difere estatisticamente do tratamento com luz alternada para o caráter taxa de crescimento.

Há uma forte evidência, portanto, de que o escuro propicia melhor crescimento do fungo do que a luz contínua, havendo uma evidência fraca de que a luz alternada interfere nesse caráter, não sendo possível detectar essa ação estatisticamente, podendo ser essa interferência devido ao acaso.

5.4. Número de conídios produzidos pela linhagem A de *M. anisopliae* quando submetida a diferentes intensidades luminosas

A Tabela VII sumariza o número de conídios obtidos de acordo com procedimento descrito no ítem 4.6.2. A Figura 2 mostra as curvas da produção de conídios obtidas de

acordo com os dados.

Tabela VII - Médias dos números de conídios produzidos em 5 placas submetidas durante incubação à luz contínua, luz alternada e escuro total (Nº conídios $\times 10^4$ /ml).

Dias	L u z		Escuro
	Contínua	Alternada	
3	0,6	0,0	0,0
4	23,4	7,0	0,0
5	120,0	30,2	4,0
6	131,0	134,0	12,2
7	124,6	152,0	16,0

Verifica-se que o número de conídios produzidos sob luz contínua foi superior àquele produzido sob luz alternada e escuro total, sendo essa produção iniciada logo no 3º dia, enquanto que para os outros dois tratamentos foi somente a partir do 4º e 5º dia, respectivamente.

Apenas após o 6º dia de contagem é que a produção de conídios sob luz alternada igualou-se à de luz contínua, fato que está bem evidenciado na Figura 2.

A produção de conídios sob escuro total foi bem

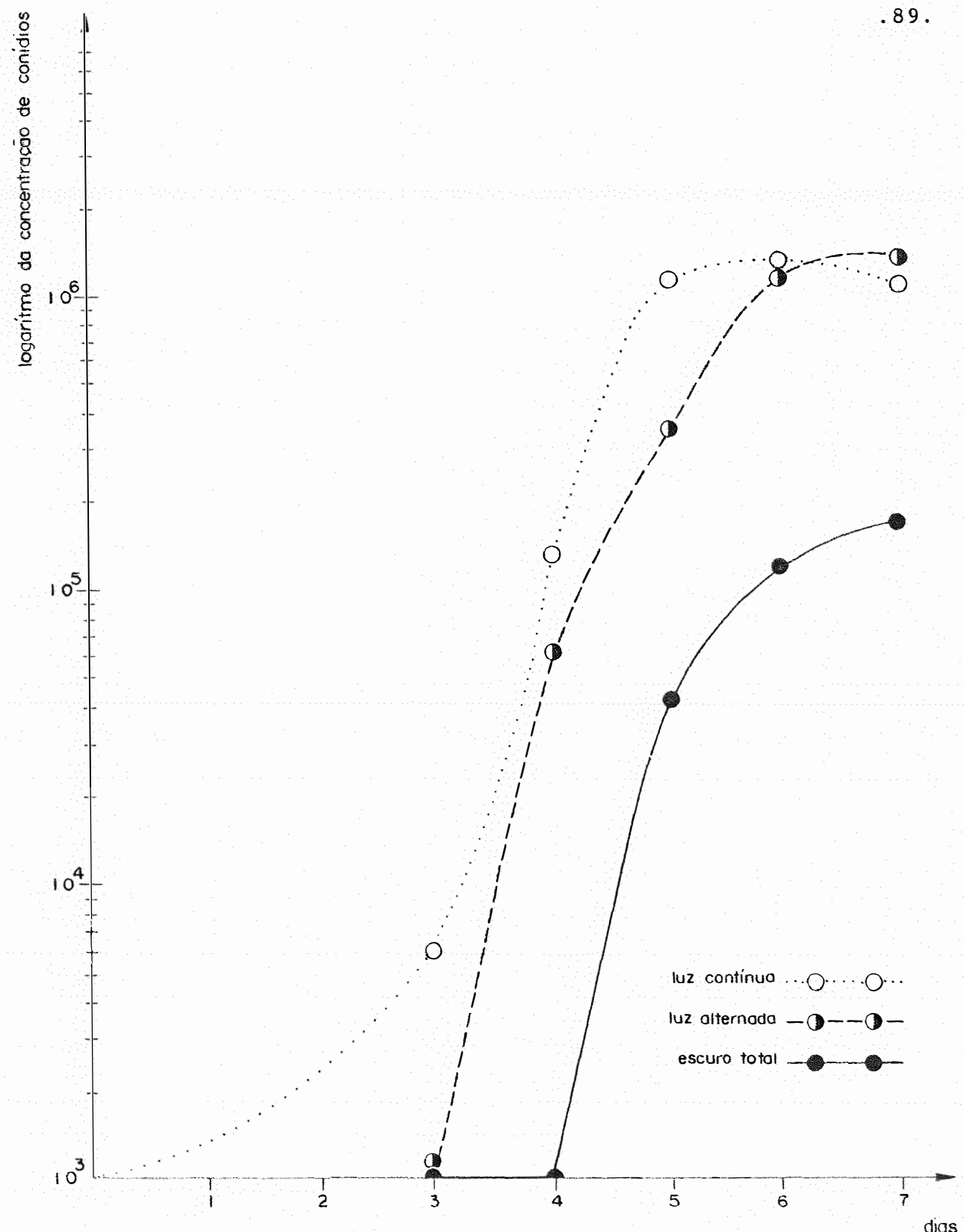


Fig. 2 - Curvas da produção de conídios da linhagem A de *M. anisopliae* submetida a diferentes intensidades de luz

inferior aos dois tratamentos com luz, além dos conídios sã
começarem a ser produzidos a partir do 59 dia. Por outro la
do, nas placas submetidas a esse tratamento observou-se uma
grande produção de micélio branco e cottonoso, enquanto que
nos outros dois tratamentos não se verificou este fato, indi-
cando que a luz parece ter grande influência na produção de
esporos e que sua ausência estimula o desenvolvimento negati-
vo do fungo.

5.5. Germinação de conídios da linhagem A de *M. anisopliae* a partir de inoculação em diversos meios de cultura

De acordo com o ítem 4.7. foi feita a contagem
e calculadas as porcentagens de germinação de conídios, as quais
estão sumariadas nas Tabelas VIII, IX e X, sendo os três trata-
mentos evidenciados na Figura 3.

Tabela VIII - Número e porcentagem de conídios germinados num total de 50 conídios, em 12 horas, da linhagem A de *M. anisopliae* por inoculação em meio completo líquido.

Horas nº	Nº de conídios germinando					Total de conídios germinando (5 tubos)	Porcentagem de germinação
	T u b o s						
	1	2	3	4	5		
01	2	4	7	5	6	24	9,6
02	9	5	5	5	6	30	12,0
03	4	7	7	8	4	30	12,0
04	14	8	6	8	5	41	16,4
05	13	10	12	10	11	56	22,4
06	12	16	15	12	14	69	27,6
07	15	16	20	25	33	109	43,6
08	32	22	24	22	31	133	53,2
09	38	44	32	41	40	195	78,0
10	45	48	46	49	42	220	88,0
11	48	50	49	49	47	243	97,2
12	49	50	50	47	50	246	98,4

Tabela IX - Número e porcentagem de conídios germinados num total de 50 conídios, em 12 horas, da linhagem A de *M. anisopliae* por inoculação em meio de arroz líquido.

Horas nº	Nº de conídios germinando					Total de conídios germinando (5 tubos)	Porcentagem de germinação
	T u b o s						
	1	2	3	4	5		
01	1	2	2	2	2	9	3,6
02	3	3	4	4	1	15	6,0
03	4	9	9	3	5	30	12,0
04	19	20	19	16	19	93	37,2
05	34	29	29	32	36	160	64,0
06	40	43	40	43	35	201	80,4
07	48	47	44	42	45	226	90,4
08	50	49	47	45	45	236	94,4
09	49	49	47	48	50	243	97,2
10	48	49	49	44	48	238	95,2
11	50	50	50	50	48	248	99,2
12	50	50	50	50	49	249	99,6

Tabela X - Número e porcentagem de conídios germinados num total de 50 conídios, em 12 horas, da linhagem A de *M. anisopliae* por inoculação em meio de batata líquido.

Horas nº	Nº de conídios germinando					Total de conídios germinando (5 tubos)	Porcentagem de germinação
	T u b o s						
	1	2	3	4	5		
01	2	1	1	1	1	6	2,4
02	2	0	2	4	3	11	4,4
03	5	4	7	8	6	30	12,0
04	9	6	3	5	7	30	12,0
05	6	12	11	8	7	44	17,6
06	11	13	15	15	18	72	28,8
07	19	26	22	18	22	107	42,8
08	33	29	25	26	33	146	58,4
09	42	46	47	49	47	231	92,4
10	46	46	49	49	49	239	95,6
11	49	48	49	48	47	241	96,4
12	50	49	50	50	49	248	99,2

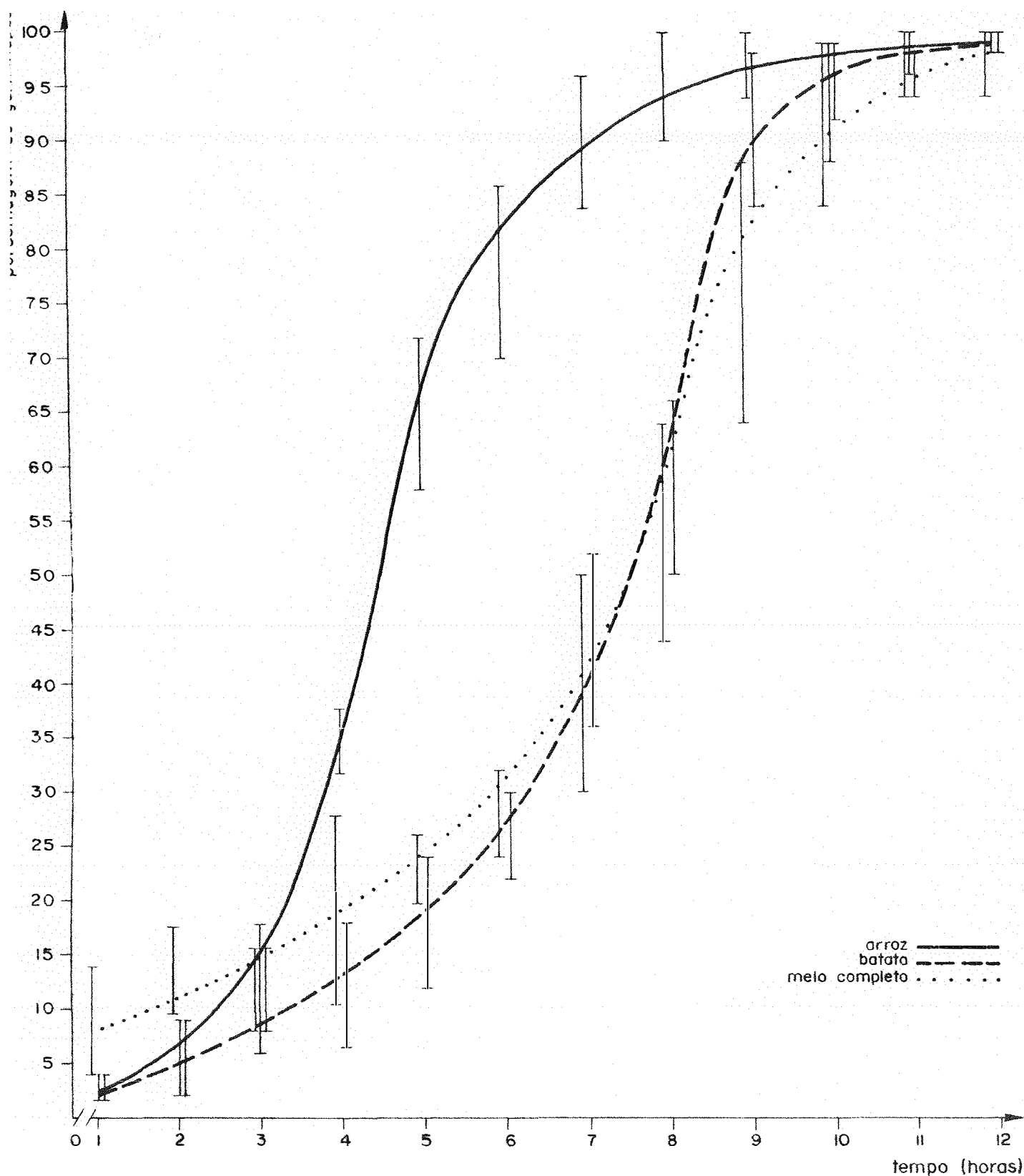


Fig. 3 - Curvas da germinação de conídios da linhagem A de *M. anisopliae* nos meios completo, de batata e de arroz líquidos

Observa-se pelos dados apresentados nas Tabelas VIII, IX e X que o meio de arroz foi o melhor dos três meios testados para a germinação de conídios de *M. anisopliae*, verificando-se uma alta porcentagem de germinação já a partir da 3a. hora após a inoculação.

Os meios de batata e completo tiveram efeito semelhante na germinação dos conídios, verificando-se a partir da 10a. hora após a inoculação, porcentagens bem próximas daquelas apresentadas em meio de arroz.

5.6. Números, porcentagens relativas e curvas de sobrevivência de conídios da linhagem A de *M. anisopliae* após tratamentos com raios γ e luz ultravioleta (U.V.)

Os tratamentos com os mutagênicos γ e U.V. foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens 4.8.1. e 4.8.2., respectivamente.

Os resultados dos números e porcentagens relativas dos conídios sobreviventes estão sumariadas nas Tabelas XI e XII, respectivamente. As Figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, as curvas de sobrevivência aos raios γ e à luz U.V.

Tabela XI - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem A de *M. anisopliae* ao tratamento com raios γ (fonte de ^{60}Co).

Dosagem (KR)	Conídios viáveis/ml		Porcentagem relativa de sobrevivência	
	1a. Repetição	2a. Repetição	1a. Repetição	2a. Repetição
0	$3,40 \times 10^7$	$1,86 \times 10^6$	100,00	100,00
20	$1,02 \times 10^7$	$2,82 \times 10^5$	29,98	15,14
40	$2,96 \times 10^5$	$3,25 \times 10^4$	0,87	1,74
60	$5,80 \times 10^4$	$5,51 \times 10^3$	0,17	0,15
80	$6,63 \times 10^8$	$1,20 \times 10^2$	0,0025	0,0098
100	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela XII - Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem A de *M. anisopliae* ao tratamento com luz U.V.

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml	Porcentagem relativa de sobrevivência
0	$1,21 \times 10^7$	100,00
1/2	$1,39 \times 10^7$	114,90
1	$1,28 \times 10^7$	105,70
2	$1,30 \times 10^6$	10,70
4	$1,40 \times 10^5$	1,15
8	$2,80 \times 10^2$	0,0023

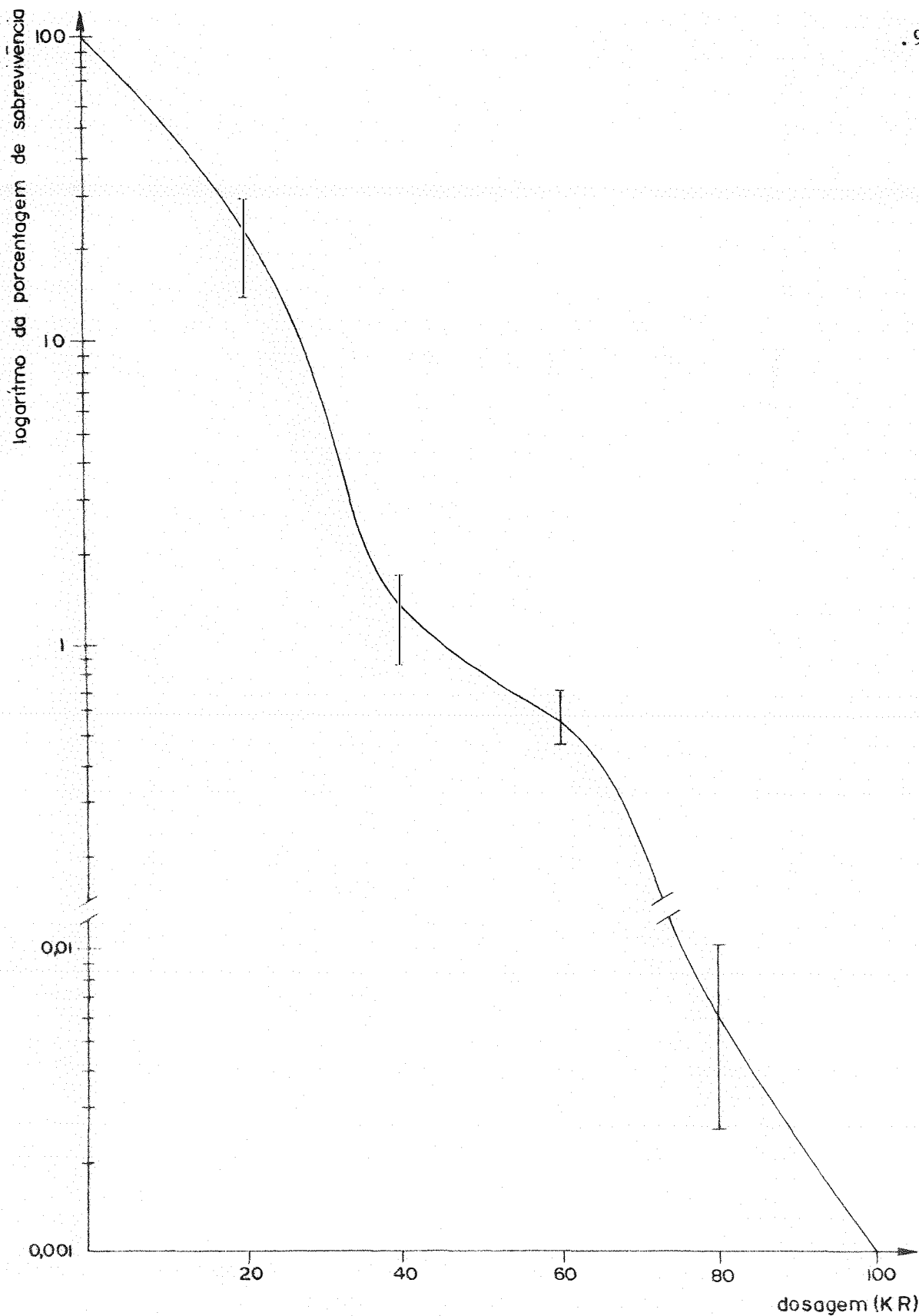


Fig. 4 - Curva de sobrevivência da linhagem A de *M. anisopliae* à radiação gama

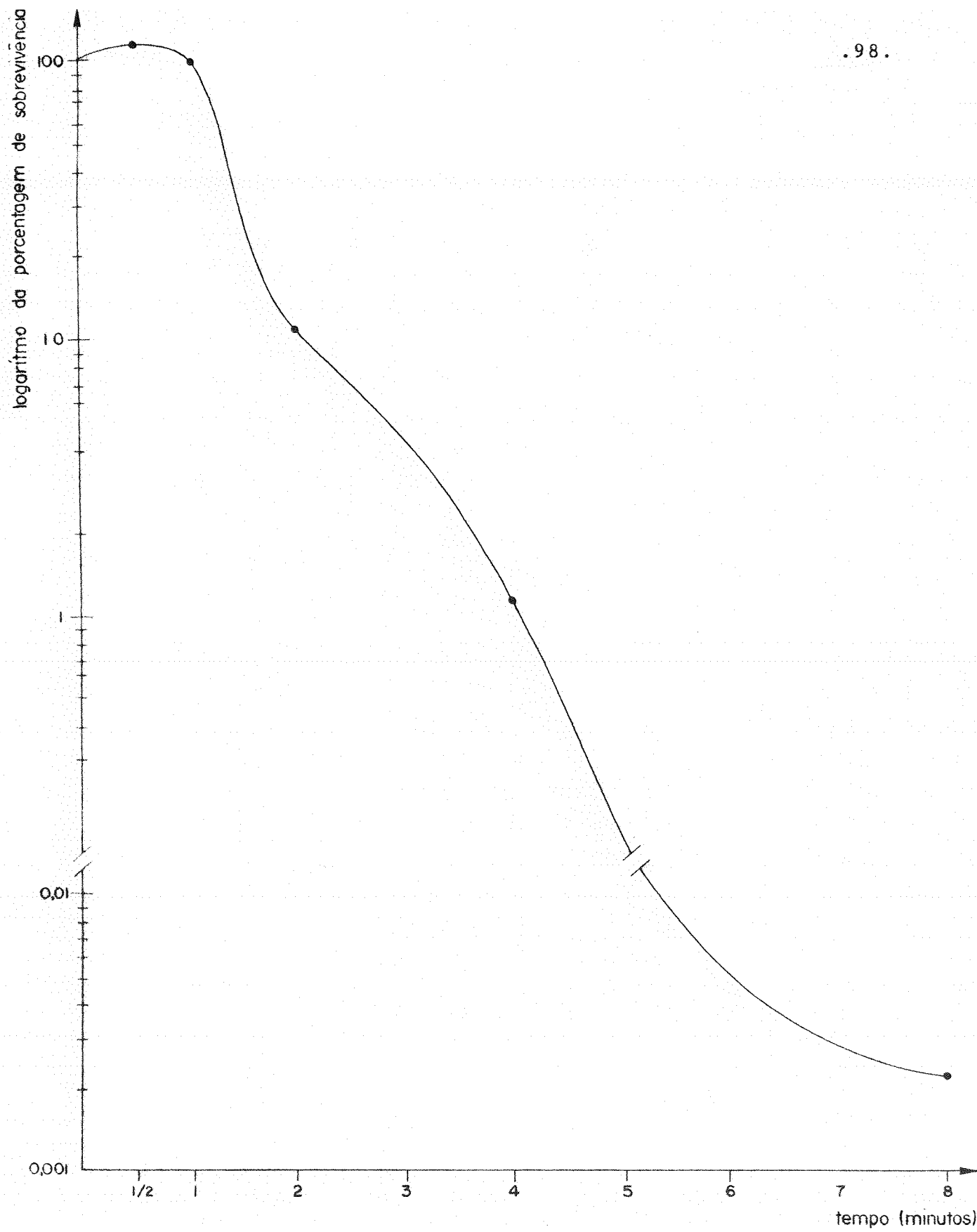


Fig. 5 - Curva de sobrevivência da linhagem A de *M. anisopliae* à luz ultravioleta

Pelos dados da Tabela XI e da Figura 4 observa-se que para se obter de 1 - 5% de sobrevivência deve-se efetuar a radiação com raios γ na dosagem de 32 KR.

Com os dados da Tabela XII e da Figura 5 deduz-se que deve-se efetuar a irradiação com luz ultravioleta durante 2'40" para se obter de 1 - 5% de sobrevivência.

5.7. Determinação da taxa de crescimento das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* pela inoculação de conídios em meio de cultura contendo diversas concentrações de fungicidas

De acordo com o procedimento descrito no Ítem 4.9.1. foram observados os resultados que estão sumariados nas Tabelas XIII, XIV e XV, com relação ao crescimento das linhagens A, C, K e E₆ em diversas concentrações dos fungicidas Cloroneb, Vitavax e Benlate, respectivamente. Os diâmetros foram obtidos após quatro dias de incubação, pois verificou-se que a partir deste período não houve variação significativa dos mesmos.

As Figuras 6, 7 e 8 mostram as curvas de sobrevivência dessas linhagens aos três fungicidas.

Tabela XIII - Diâmetro em centímetros de colônias das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* após 4 dias de incubação em meio de cultura contendo diversas concentrações do fungicida Cloroneb. Média de 2 repetições.

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	L i n h a g e n s			
	K	A	C	E ₆
0	1,70	1,40	1,55	1,55
2	1,35	1,25	1,15	1,05
4	1,36	1,20	1,15	1,00
8	1,30	1,30	0,83	0,65
16	1,13	1,30	0,90	1,20
32	0,96	1,16	0,66	0,80
64	0,80	1,10	1,00	0,80
128	0,80	0,85	0,85	0,80
256	0,65	0,60	0,50	0,50
512	0,40	0,60	0,30	0,10
1024	0,10	0,35	0,35	0,20

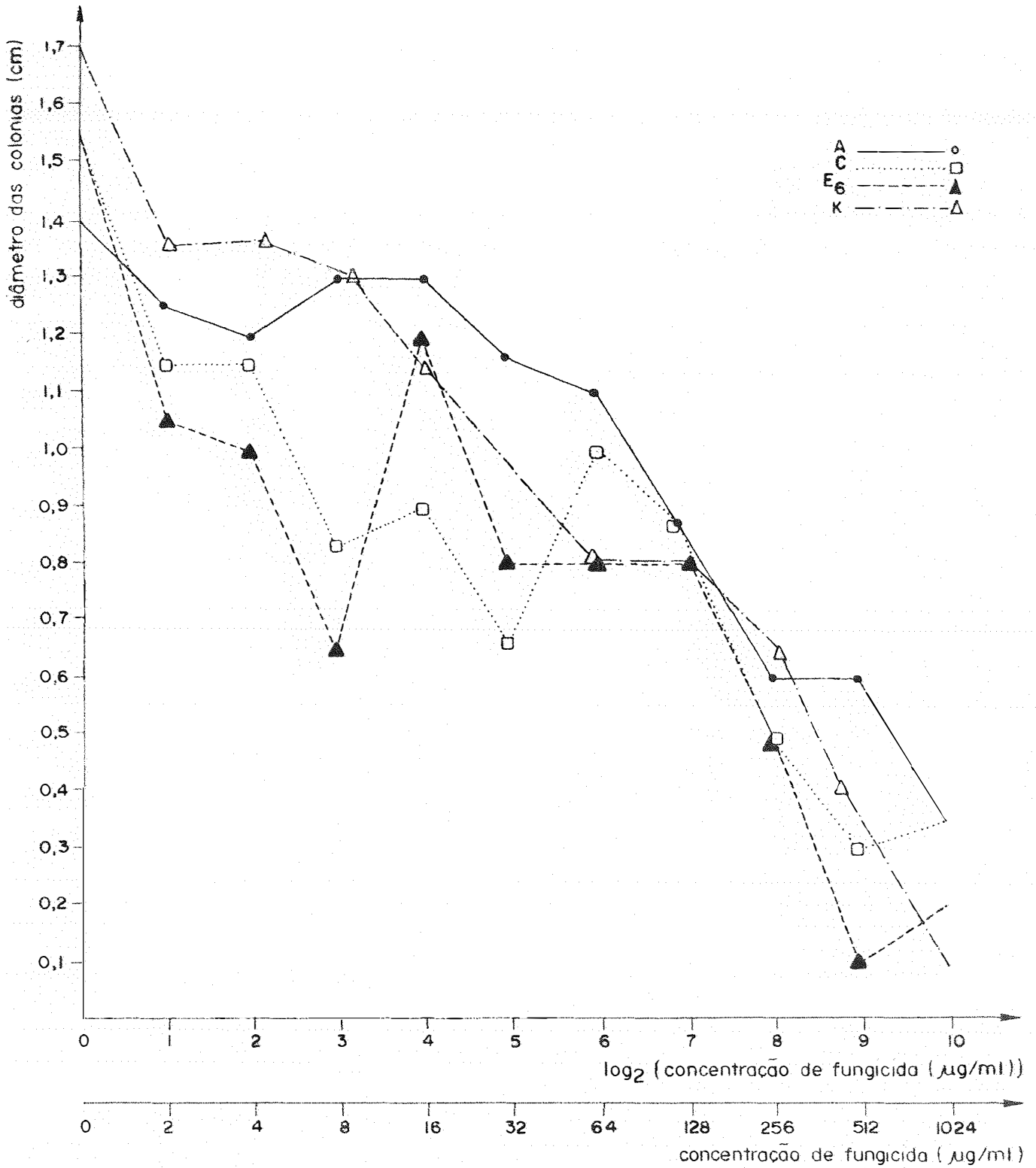


Fig. 6 - Curva de sobrevivência das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* ao fungicida Chloroneb

Tabela XIV - Diâmetro em centímetros de colônias das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* após 4 dias de incubação em meio de cultura contendo diversas concentrações do fungicida Vitavax. Média de 2 repetições.

Dose ($\mu\text{g/ml}$)	L i n h a g e n s			
	K	A	C	E ₆
0	1,75	1,10	1,50	1,40
2	1,70	1,35	1,50	1,45
4	1,70	1,20	1,45	1,45
8	1,70	0,90	1,35	1,30
16	1,10	1,20	1,50	1,50
32	1,10	1,30	1,40	1,35
64	0,90	0,85	1,00	0,80
128	0,30	0,30	0,40	0,20
256	0,00	0,00	0,00	0,00
512	0,00	0,00	0,00	0,00
1024	0,00	0,00	0,00	0,00

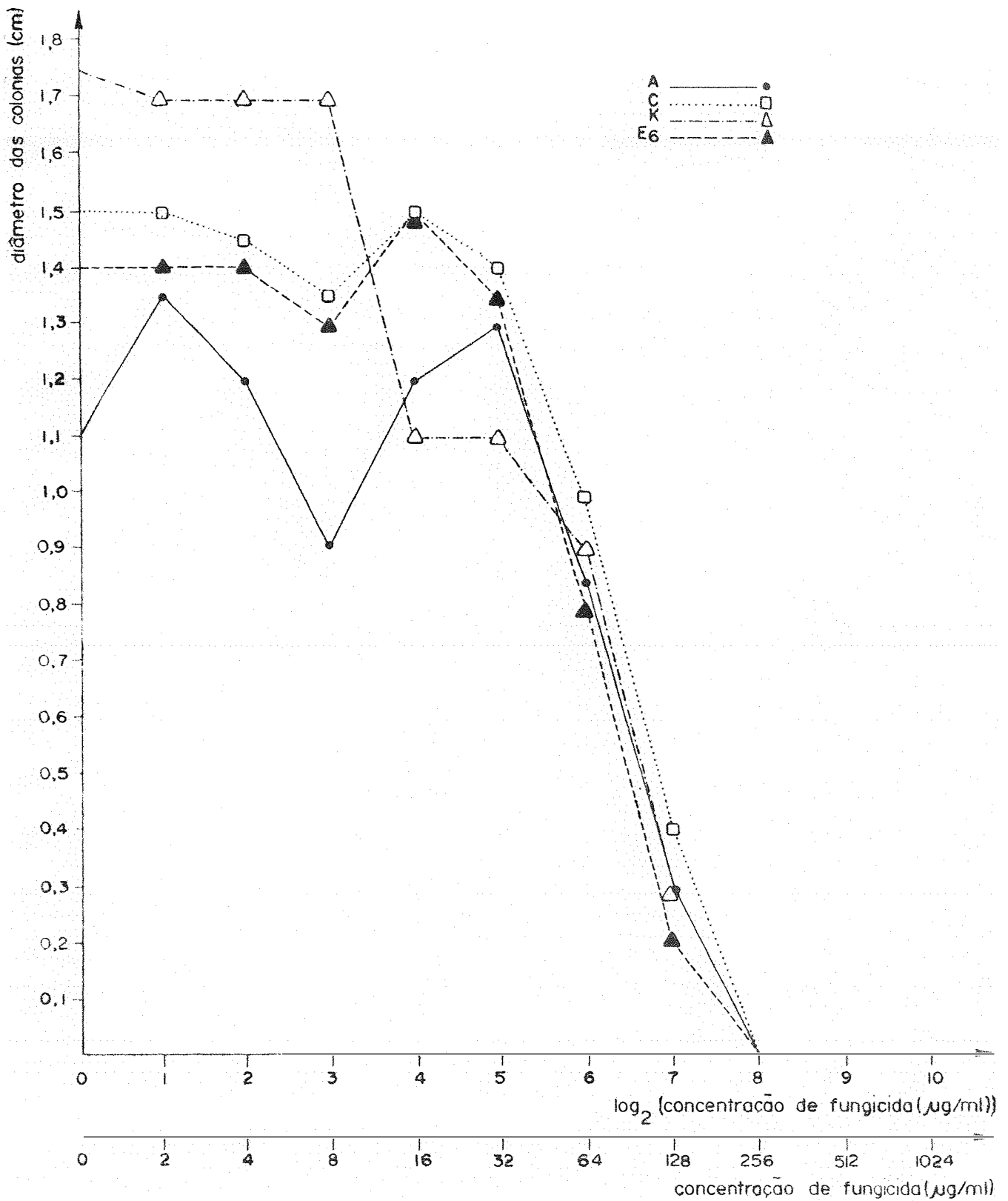


Fig. 7 - Curva de sobrevivência das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* ao fungicida Vitavax

Tabela XV - Diâmetro em centímetros de colônias das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* após 4 dias de incubação em meio de cultura contendo diversas concentrações de fungicida Benlate. Média de 2 repetições.

Dose (µg/ml)	L i n h a g e n s			
	K	A	C	E ₆
0	1,60	1,50	1,30	1,50
0,1	1,60	1,50	1,45	1,50
0,2	1,70	1,55	1,35	1,40
0,4	1,45	1,60	1,50	1,30
0,6	1,80	1,40	1,40	1,40
0,8	1,65	1,55	1,50	1,40
1,0	1,25	1,35	1,10	1,35
1,5	1,15	1,25	1,35	1,00
2,0	0,05	0,10	0,25	0,15
4,0	0,00	0,00	0,00	0,00

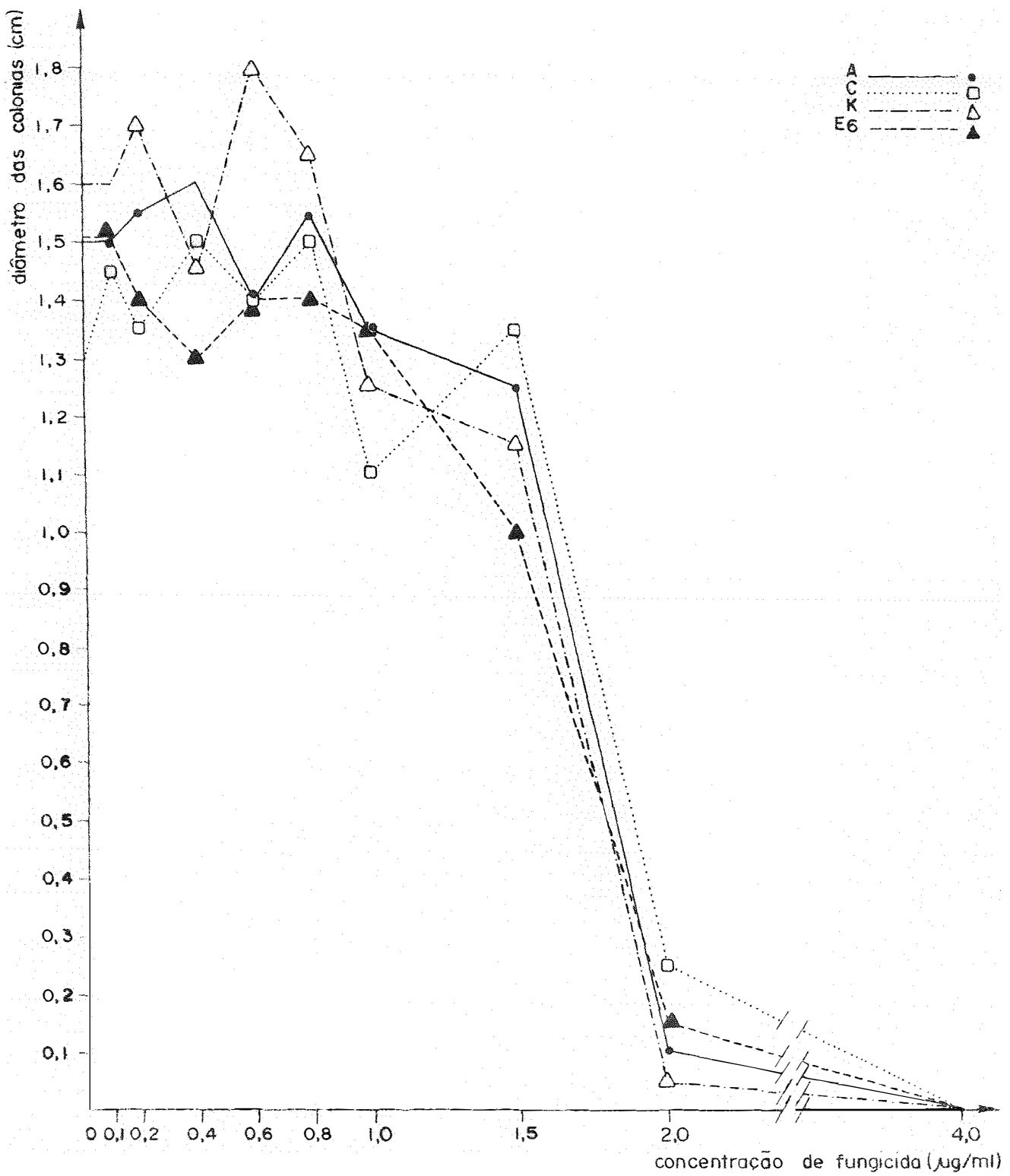


Fig. 8 - Curva de sobrevivência das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* ao fungicida Benlate

5.8. Número de mutantes e frequência de mutação da linhagem A de *M. anisopliae* para resistência ao fungicida Benlate

A Tabela XVI sumariza os mutantes resistentes ao fungicida Benlate e a sua frequência de mutação de acordo com o método descrito no item 4.9.2.

Tabela XVI - Número de mutantes e frequência de mutação da linhagem A de *M. anisopliae* para resistência ao fungicida Benlate na concentração de 8 µg/ml em 2×10^6 conídios inoculados por placa.

Placa nº	Número de colônias em 8 µg/ml Benlate
01	3
02	4
03	8
04	9
05	6
06	6
07	3
08	5
09	1
10	2
	TOTAL 47
	MÉDIA 4,7

FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO: 2,35 MUTANTES EM 10^6 CONÍDIOS

5.9. Média dos diâmetros de alguns mutantes da linhagem A de *M. anisopliae* resistentes a Benlate em várias concentrações desse fungicida

De acordo com o procedimento descrito no item 4.9.3., foram observados os resultados que estão sumariados na Tabela XVII com relação ao crescimento de alguns mutantes da linhagem em diversas concentrações do fungicida Benlate.

Tabela XVII - Média dos diâmetros em centímetros de colônias de 5 mutantes da linhagem A de *M. anisopliae* resistentes a 8 µg/ml de Benlate em várias concentrações desse fungicida.

Concentrações	Mutantes					Linhagem original
	Ben ₁	Ben ₂	Ben ₃	Ben ₄	Ben ₅	
0	1,85	1,40	1,55	1,85	2,10	1,85
2	1,70	1,70	1,55	1,85	1,65	1,30
4	1,75	1,75	1,45	1,60	1,80	0,00
8	1,75	1,35	1,35	1,75	1,90	0,00
16	1,55	1,75	1,65	1,60	1,65	0,00
32	1,15	1,10	1,15	0,55	0,40	0,00
64	1,50	1,20	1,20	0,40	0,75	0,00
128	1,50	1,00	1,50	0,50	0,60	0,00
256	0,60	0,85	0,90	0,00	0,00	0,00
512	0,50	0,55	0,70	0,00	0,00	0,00
1024	0,45	0,50	0,90	0,00	0,00	0,00

5.10. Número de colônias obtidas após inoculação das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* em concentrações inibitórias dos fungicidas Vitavax e Benlate

A Tabela XVIII sumariza os números de colônias obtidas das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* de acordo com método descrito no item 4.9.4.

Tabela XVIII - Média dos números de colônias das linhagens A, C, K e E₆ de *M. anisopliae* obtidas após inoculação em meio de cultura contendo as concentrações de 256 µg/ml e 512 µg/ml do fungicida Vitavax e 4 µg/ml do fungicida Benlate, em 8 e 15 dias de incubação.

Concentrações (µg/ml)	L i n h a g e n s							
	K		A		C		E ₆	
	8	15	8	15	8	15	8	15
0	130,0	130,0	130,0	130,0	115,0	115,0	92,5	92,5
Benlate 4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Vitavax 256	0,0	137,0	0,0	100,0	0,0	132,0	0,0	3,0
Vitavax 512	0,0	21,0	0,0	0,0	0,0	61,5	0,0	3,5

Verifica-se pelos dados apresentados anteriormente que, após 8 dias de incubação, não houve crescimento de nenhuma linhagem em qualquer das concentrações dos dois fungicidas testados.

Somente após 15 dias de incubação é que houve crescimento de colônias nas duas concentrações do fungicida Vitavax observando-se, portanto, que o mesmo tem efeito fungistático sobre as 4 linhagens de *M. anisopliae* testadas. Apesar do número de colônias obtidas com a concentração de 512 µg/ml de Vitavax ter sido bem menor em 15 dias, esse fungicida não pode ser recomendado para estudos de campo onde se visa o isolamento de lotes nos quais se vai aplicar o fungo.

Comparando-se o crescimento das linhagens K, A, C e E₆ de *M. anisopliae* verifica-se que a última apresentou, após 15 dias, um número de colônias menor do que todas as outras, nas concentrações de 256 e 512 µg/ml de Vitavax, parecendo ser a menos resistente a esse fungicida.

O fungicida Benlate é realmente o mais efetivo pois, mesmo após 15 dias de incubação, não se verificou o crescimento de qualquer das 4 linhagens do fungo.

6. DISCUSSÃO

6.1. Efeito da temperatura

Como se verifica pela Tabela I, a linhagem A de *Metarhizium anisopliae* comportou-se diferentemente quando incubada a 28°C e 37°C, observando-se crescimento apenas nas placas incubadas a 28°C.

Estes resultados estão de acordo com as obtidas pelos autores BALFOUR-BROWNE (1960), MASERA (1957) e DIOMANDÉ (1969), os quais mostraram que a temperatura ótima para o crescimento do fungo está entre 25°C e 30°C e a máxima entre 32°C e 34°C.

Verifica-se que as placas re-incubadas a 28°C, após terem permanecido durante 24, 48 e 72 horas a 37°C, apresentaram um número menor e decrescente de colônias em relação às obtidas a 28°C, enquanto que as placas mantidas por 96 e 120 horas a 37°C, mesmo após cinco dias de re-incubação a

28°C, não apresentaram crescimento algum.

JOHNPULLE (1938, apud VEEN, 1968) verificou que até 42°C, não há morte dos esporos mas que exposições de esporos a 50°C por 5 minutos eram suficientes para inibir a germinação. Concluiu que os esporos parecem ter um ponto termal de morte relativamente baixo. No presente trabalho, entretanto, verificou-se que a temperatura de 37°C, nas condições utilizadas, por 96 horas ou mais, já é suficiente para causar a morte dos esporos.

O conhecimento desse dado para a linhagem A de *M. anisopliae* é importante por ser esta a linhagem utilizada em experimentos de controle biológico em regiões do Brasil cuja média anual de temperatura é alta.

Assim, para um controle mais efetivo, poder-se ia pensar no isolamento de linhagens já resistentes à temperatura existentes na natureza ou um melhoramento genético do fungo por indução, através de agentes mutagênicos, de mutantes com maior resistência a temperaturas elevadas. Deve-se objetivar ainda, as diferentes regiões do Brasil onde se deve rá aplicar o fungo, a fim de aplicar nas mesmas, linhagens de *M. anisopliae* adaptadas à temperatura de cada uma delas.

6.2. Produção de conídios da linhagem A de *M. anisopliae*

De acordo com os dados obtidos na Tabela II, efetuou-se o cálculo do número de conídios por área da placa de Petri. Dessa forma, para a primeira contagem, o total de conídios por 6358,5 mm² foi de 1,77 x 10⁸ e para a segunda foi 4,19 x 10⁸.

Observa-se que a produção de conídios por área da placa de Petri foi um pouco maior que a primeira devido, provavelmente, ao fato da cultura estar estocada antes de se efetuar a primeira parte do experimento. Uma cultura estocada durante algum tempo leva, geralmente, de quatro a cinco dias para entrar na log fase; na segunda contagem a cultura já havia revigorado, dando uma maior produção de conídios. Portanto, para produção industrial, deve-se partir de culturas novas.

Os cálculos de produção de conídios por área de placa de Petri, podem ser extrapolados para áreas maiores onde se visa a produção em grande escala para aplicação em campo, podendo-se saber, de acordo com a área, portanto, qual a quantidade de meio de cultura que deverá ser utilizado para se obter um determinado número de conídios.

Seria interessante fazer este teste em outras linhagens de *M. anisopliae*, selecionar a linhagem com maior

produção de conídios e tentar o melhoramento genético da mesma visando o aumento da produção, através de mutações espontâneas ou induzidas.

6.3. Efeito de diferentes intensidades luminosas sobre o crescimento e esporulação de *M. anisopliae*

Neste ítem serão considerados os resultados sumariados nas Tabelas III, IV, V, VI e VII e figuras 1 e 2.

Pelas Tabelas III, IV, V e VI e figura 1, pode-se verificar que o crescimento das colônias mantidas no escuro total foi maior do que nos outros dois tratamentos, sendo que a esse crescimento deve-se adicionar o desenvolvimento micelial muito grande, ficando as colônias com micélio branco, abundante e de aspecto cotonoso.

As colônias submetidas à luz alternada ficaram intermediárias entre os outros dois tratamentos, sendo que a taxa de crescimento das colônias mantidas sob luz contínua foi bem menor, assim como o desenvolvimento micelial.

Através da análise estatística, verificou-se que o crescimento no escuro total foi estatisticamente semelhante ao tratamento com luz alternada e diferente estatisticamente do tratamento com luz contínua.

Esses dados concordam com os de *MÜLLER - KÖGLER* (1967), o qual observou que a porcentagem de germinação do fungo, nas primeiras 24 horas de germinação, foi mais elevada no escuro do que na luz.

Pela Tabela VII e Figura 2 verificou-se que a produção de esporos de *M. anisopliae* ocorre em condições contrárias às do experimento anterior, ou seja, a produção de conídios foi bem maior sob luz contínua do que sob luz alternada ou escuro total.

CHENG e CHEN (1962) observaram que a luz é favorável à esporulação e *VEEN* (1968) verificou que a frutificação foi melhor na luz difusa do que na obscuridade.

MATTA e OLIVEIRA (1978) estudaram a influência da luz contínua e escuro total verificando que o fator luz é fundamental na esporulação e que, para uma esporulação mais abundante, há necessidade de uma luminosidade mínima constante de 144 horas após a inoculação.

Segundo *COCHRANE* (1958) a luz é absolutamente requerida para a formação de vários tipos de ôrgãos reprodutivos em certas espécies como: esporóforos em *Agaricus*, peritécios, apotécios de Gasteromycetes, de picnídios, de esporângios nos Mucorales e de conídios nos Murorales e Fungos Imperfeitos tendo, em geral, a luz visível, o efeito de aumentar

o número de estruturas reprodutivas formadas. Cita que para o fungo *Fusarium* sp. que, como o *Metarrhizium*, esporula pobremente no escuro e forma uma zona de esporos após mesmo uma breve exposição à luz, a explicação deste fenômeno é difícil. Diz que pode-se propor, entretanto, que a luz inibe o crescimento micelial e que o estímulo à esporulação resulta da repressão do crescimento vegetativo.

Observa-se que os dados obtidos nos dois experimentos realizados complementam-se. Sob luz contínua há pouco desenvolvimento micelial enquanto há grande produção de conídios já desde o 3º dia após inoculação. Sob luz alternada há um desenvolvimento micelial um pouco maior, com produção de conídios um pouco menor, mantendo-se sempre intermediária. Sob escuro total há um grande desenvolvimento micelial com muito pouca produção de conídios e somente a partir do 5º dia.

O meio de cultura utilizado nestes experimentos foi o meio completo por se visar posteriores estudos genéticos do fungo, sendo este o meio usado para tanto. Entretanto, para a produção industrial de *M. anisopliae* deve-se recomendar o meio de arroz aliado à melhor intensidade de luz para esporulação.

Dessa forma, um estudo posterior a ser feito, seria a determinação do comprimento de onda ideal para a maior esporulação do fungo.

6.4. Germinação em diferentes meios de cultura

Como se verifica pelas Tabelas VII, IX e X e Figura 3, o meio de arroz foi o melhor substrato para ocorrer a germinação mais rápida dos esporos da linhagem A de *M. anisopliae*.

AQUINO (1974) comprovou a superioridade do meio de arroz em relação ao de batata-dextrose e o de amido, na frutificação e desenvolvimento do fungo num menor espaço de tempo. MARQUES e VILAS BOAS (1973) já haviam verificado o bom crescimento e esporulação do fungo nesse meio e outros autores como VILLACORTA (1977) e MOURA COSTA e MAGALHÃES (1974), utilizaram esse meio para o cultivo do fungo com sucesso.

Entretanto, os dados dos trabalhos citados acima referem-se mais ao crescimento e esporulação obtidos sempre em 15 dias de cultivo, não havendo informações sobre a relação germinação/tempo.

Os dados sobre o tempo de germinação de *M. anisopliae* poderão ter aplicação nos estudos genéticos onde se visa a obtenção de mutantes através de mutagênicos químicos, os quais poderão ser usados, apenas algumas horas, após a inoculação do fungo (6-12 horas), quando se terá certeza de que o DNA já sofreu replicação.

MESSIAS e Col. (1978) estudaram diversas linha

gens de *M. anisopliae* quanto ao tamanho de conídios, número de núcleos por conídio e indução de mutantes pela luz ultravioleta verificando, após coloração por Giemsa, uma porcentagem de 95% para uninucleados e 5% para binucleados.

Dessa forma, uma próxima etapa desse trabalho seria, juntamente com os dados de germinação do fungo, contar o número de núcleos durante a germinação dos conídios, a fim de determinar o tempo de divisão nuclear de *M. anisopliae*.

6.5. Utilização de raios gama e luz ultravioleta como agentes mutagênicos para *M. anisopliae*

Verifica-se pelas Tabelas XI e XII e Figuras 4 e 5 que tanto a luz ultravioleta como a radiação gama foram bastante efetivas no que se refere a causar mortalidade em esporos do fungo. Embora isso fosse esperado com relação aos raios gama que são radiações ionizantes, nem sempre a luz ultravioleta é tão efetiva, pois muitas vezes a pigmentação dos esporos interfere com a penetração da mesma. Neste caso, no entanto, os resultados mostraram que ambos, luz ultravioleta e raios gama, são efetivos em causar a morte de esporos, e, conseqüentemente, em induzir mutações em *M. anisopliae*. Embora um estudo de indução de mutação com esses dois agentes não tenha sido conduzido, pode-se dizer que eles poderão ser

utilizados, com sucesso, em estudos genéticos de obtenção de mutantes como, aliás, já vem sendo feito com a luz ultravioleta (MESSIAS, comunicação pessoal).

6.6. Resistência a fungicidas

Foi estudada a sobrevivência de *Metarrhizium anisopliae* aos fungicidas Cloroneb Vitavax e Benlate, cujos dados obtidos podem ser verificados nas Tabelas XIII, XIV e XV e Figuras 6, 7 e 8.

Os fungicidas Cloroneb e Vitavax foram ensaiados nas concentrações de 0-1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ observando-se para o primeiro, crescimento das quatro linhagens do fungo até a maior concentração, significando alta resistência. Em relação ao segundo, verificou-se que a concentração inibitória para o *M. anisopliae* é de 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ou seja, a partir dessa concentração não foi observado crescimento de qualquer das linhagens do fungo.

Com relação ao fungicida Benlate, verificou-se que a partir de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ não há mais crescimento em qualquer das linhagens ensaiadas.

MACHROWICZ (1967) observou que os fungicidas Captan, Ferban, Felan, Tiran e Zineb inibiram tanto o cresci

mento de *M. anisopliae* como de *Fusarium sambicimem* var. *minus* e *Spicaria farinosa*, enquanto que os inseticidas Ekatin e Meta systox inibiram somente o crescimento de *M. anisopliae*. Verificaram ainda que Simazin estimulou o crescimento dos três fungos.

ALVES (1978) verificou que na dose de 10 ppm o oxiclureto de cobre, namidothion, monocrotophos, dimethoate e omethoate não afetaram o crescimento de *M. anisopliae*, enquanto que o oxiclureto de cobre, monocrotophos e omethoate favoreceram o patógeno; para a dose de 100 ppm, os defensivos que não afetaram o crescimento do fungo foram oxiclureto de cobre, dimethoate, vamidothion e omethoate, enquanto o oxiclureto de cobre favoreceu o desenvolvimento do patógeno; para a dose de 1000 ppm, o oxiclureto de cobre e methomyl não apresentaram efeito negativo sobre o fungo, sendo que o omethoate favoreceu o crescimento do patógeno.

MATTA e OLIVEIRA (1978) estudaram a compatibilidade do fungo *M. anisopliae* com o inseticida Malatol 50E, verificando que não houve ação letal do mesmo sobre o fungo, assim como não houve perda de viabilidade ou patogenicidade do mesmo submetido aos diversos tratamentos.

O conhecimento do efeito de inseticidas sobre *M. anisopliae* é importante no controle integrado (organismos e produtos químicos) de pragas.

Os dados de resistência de *M. anisopliae* a fungicidas são importantes quando, em experimentos de campo, se visa o isolamento de lotes adjacentes, nos quais se irá aplicar o fungo e o inseticida que controlam uma determinada praga. Usando o fungicida ao qual o fungo é suscetível pode-se ter a garantia de que o mesmo não passará para o lote que foi tratado com inseticida e, dessa forma, obter resultados reais da efetividade do controle químico e biológico. Além disso, nos casos onde se vai aplicar, juntamente com o fungo entomógeno, fungicidas para proteção da planta contra doenças, o mesmo deverá ser resistente a eles para que ocorra o controle das pragas.

Nos experimentos realizados no presente trabalho, observa-se que o fungicida Benlate é o mais efetivo dos três, sendo que o Vitavax, apesar de controlar o crescimento do fungo, só o faz em altas concentrações, tornando anti-econômica a sua utilização. Entretanto, para que o fungicida Benlate pudesse ser recomendado como realmente efetivo, era necessário saber se ocorriam mutações espontâneas de *M. anisopliae* para resistência ao mesmo e qual a sua frequência.

Assim, como se pode observar pela Tabela XVI, a frequência de mutação espontânea da linhagem A de *M. anisopliae* a Benlate é de $2,35 \times 10^6$ mutantes/ml em 2×10^6 conídios semeados por placa, sendo a mesma considerada normal.

Cinco dos mutantes obtidos foram semeados em diversas concentrações de Benlate para verificar qual a sua concentração mínima inibitória.

Observa-se pela Tabela XVIII que os mutantes designados *Ben*₁, *Ben*₂ e *Ben*₃ apresentaram crescimento até 1024 µg/ml; os mutantes *Ben*₄ e *Ben*₅ cresceram até 128µg/ml. Com esses dados verifica-se que, pelo menos dois genes estão envolvidos na determinação de resistência alta e baixa, parecendo que para *Ben*₁, *Ben*₂ e *Ben*₃ um mesmo gen está envolvido, enquanto que para *Ben*₄ e *Ben*₅ já seria outro gen.

Apesar desses mutantes da linhagem A de *M. anisopliae* terem o gene para resistência a Benlate, parece que ele não confere menor taxa de crescimento ao fungo, ou seja, não tem efeito danoso pois a 0 µg/ml, a taxa de crescimento é semelhante à da linhagem original, como pode ser visto na Tabela XVIII.

Portanto, como o desenvolvimento do fungo não é alterado, a resistência a Benlate torna-se uma marca genética valiosa para linhagens aplicadas em campo e cuja disseminação se deseja medir; dessa forma, nos re-isolamentos que fossem feitos poder-se-ia identificá-la através da marca para resistência, sem o perigo de confundi-la com outra linhagem de *M. anisopliae*.

É possível, entretanto, que outras marcas gené

ticas, além dessa, devam ser usadas porque, com o tempo, aparecerá resistência em outras linhagens de *M. anisopliae*.

As marcas genéticas para resistência a Benlate poderiam ser utilizadas, também, em estudos básicos de genética desse fungo.

TUYL (1977) diz que existem vários fungos sensíveis a Benlate com a resistência ao mesmo variando de níveis baixos a altos citando, ainda, exemplos de mutações para resistência ao fungicida, as quais têm sido utilizadas para estudos genéticos.

7. CONCLUSÕES

Os principais objetivos do presente trabalho foram: estudo de alguns aspectos biológicos de *metarrhizium anisopliae* como crescimento em temperaturas elevadas, produção de conídios, efeitos de diferentes intensidades de luz no crescimento e produção de conídios e determinação do meio de cultura, no qual o fungo melhor se desenvolva e estudo da sobrevivência do fungo à radiação gama e à luz ultravioleta e resistência a fungicidas.

De acordo com os resultados obtidos, podem-se tirar as seguintes conclusões:

a) A temperatura de 37°C inibe o crescimento do fungo, tornando os conídios inviáveis após 96 horas de incubação;

b) 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 é de $2,0 \times 10^9$ conídios;

c) A germinação dos conídios de *M. anisopliae* é mais rápida em meio de arroz do que em meio completo ou meio de batata;

d) Os fungicidas Cloroneb e Vitavax são pouco eficientes sobre *M. anisopliae*, sendo que com adição de $4 \mu\text{g/ml}$ de Benlate há inibição do crescimento do fungo. A frequência 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.

8. SUMMARY

The present work was carried out aiming the study of some factors as temperature, visible light, mutagenic agents and fungicides affecting growth, germination and conidia production of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin.

The results have shown that at the temperature of 37°C there was no conidia germination and if conidia were maintained at this temperature for 96 hours they were unable to germinate when transferred to 28°C. Continuous visible light increased conidia production but mycelial growth was favoured in total darkness. It was also possible to estimate the conidia production per Petri dishes area.

Gama and ultraviolet radiation can be utilized as mutagenic agents for *M. anisopliae* in the dosis of 32 KR and 2'40" respectively which give 1 - 5% survival.

Four strains of *M. anisopliae* were studied in relation to its resistance to three fungicides. Benlate was the most effective fungicide used, inhibiting the fungus growth at the concentration of 4 µg/ml. Spontaneous mutation frequency of *M. anisopliae* to Benlate was 2,35 mutants/10⁶ conidia.

9. LITERATURA CITADA

ALVES, S.B., 1978. Efeito fungitóxico "in vitro" de defensivos sobre patógenos de insetos. Piracicaba, ESALQ/USP. 66p. (Tese de Doutorado).

ANGUS, T.A., 1955. General characteristics of certain insect pathogens related to *Bacillus cereus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2:111-121.

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

AQUINO, M.L.N., V.A.L.B. CAVALCANTI, R.C. SENA e G.F. QUEIROZ, 1975. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarrhizium anisopliae*. *Boletim Técnico da CODECAP*, 4:1-31.

AZEVEDO, J.L. e C.L. MESSIAS, 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. 19p.

BAIRD, R.B., 1958. Use of fungous diseases in biological control of insects. *Proceedings of International Congress of Entomology*, 4:689-692.

BALFOUR-BROWNE, F.L., 1960. The green muscardine diseases of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in eritrea. *Proceedings of Royal Entomological Society of London, Ser. A.*, 35:65-74.

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

BARNETT, H.L., 1960. *Illustrated genera of imperfecti fungi*. Minneapolis, Burgess Publishing Company. 225p.

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

- BELL, J.V. e R.J. HAMALLE, 1970. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15:447-450.
- BELL, J.V. e R.J. HAMALLE, 1971. A bacterium and a dipterous parasite in wild populations of cowpea curculio larvae: effects of treatment with spores of *Metarrhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17:256-259.
- BELL, J.V. e R.J. HAMALLE, 1974. Viability and pathogenicity of entomogenous fungi after prolonged storage on silica gel at -20°C . *Canadian Journal of Microbiology*, 20:639-642.
- BELL, J.V., R.J. HAMALLE e J.A. ONSAGER, 1972. Mortality of larvae and pupae of the banded cucumber beetle in soil and sand following topical application of fungus spores. *Journal of Economic Entomology*, 65:605-606.
- BERRIOS, F. e O. HIDALGO-SALVATIERRA, 1971. Studies on the shootborer *Hypsipyra grandella* Zeller. VI. Susceptibility of the larvae to the fungus *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. *Turrialba*, 21:214-219.

- BICHUK, Yu.P., 1962. Effect of the conditions of the soil medium on the development of muscardine fungi infecting the sugar beet weevil. *All-Union Sugar Beet Science Research Institute*. 308p.
- BIRD, F.T., 1953. The use of virus disease in the biological control of the european pine sawfly, *Neodiprion sertifer* (Geoffr.). *Canadian Entomologist*, 85:437-446.
- BIRD, F.T. e J.M. BURK, 1961. Artificially disseminated virus as a factor in controlling the european spruce sawfly, *Diprion hercyniae* (Htg.), in the absence of introduced parasites. *Canadian Entomologist*, 93:228-238.
- Apud: CAMERON, J.W.M., 1963. Factors affecting the use of microbial pathogens in insect control. *Annual Review of Entomology*, 8:265-286.
- BOLETIM INFORMATIVO DO INSTITUTO BIOLÓGICO DA BAHIA, 1975.
- BUCHER, G., 1960. Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2:172-195.
- BURGES, H.D. e N.W. HUSSEY, 1971. *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press. 861p.

CAMERON, J.W.M., 1963. Factors affecting the use of microbial pathogens in insect control. *Annual Review of Entomology*, 8:265-286.

CHENG, W.Y. e C.B. CHEN, 1962. Preliminary studies on Green Muscardine fungus. *Report of Taiwan Sugar Experimental Station*, 29:72-73. Apud: VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie, due a *Metarrhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland*, 68:1-77.

CLERK, G.C. e M.F. MADELIN, 1965. The longevity of three insect parasitizing hyphomycetes. *Transactions British Mycological Society*, 48:193-209.

COCHRANE, V.W., 1958. *Physiology of fungi*. New York, John Wiley and Sons, Inc. 524p.

CRISAN, E.V., 1971. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarrhizium* spores in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17:260-264.

DAVID, W.A.L., 1968. *Insects physiology*. New York, American Elsevier, p.17-35.

- DE BACH, P., 1968. *Control biologico de las plagas de insectos y malas hierbas*. México, D.F. Compañía Editorial Continental S.A. 949p.
- DELACROIX, M.G., 1893. *Oospora destructor*, champignon produisant sur les insectes la muscardine verte. *Bulletin de la Société Micologique de France*, 9:260-264. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transactions British Mycological Society*, 16:55-75.
- DIOMANDE, T., 1969. Contribution to the study of the development of the green muscardine fungus *Metarrhizium anisopliae* on *O. monoceros* larvae. *Bulletin of Institute Fondam Afrique Noire, Sér. A*, 31:1381-1405.
- EVLAKHOVA, A., 1966. Mass culture of entomopathogenic fungi. *Zashchita Rastenij Mosk.*, 11:43.
- FALCON, L.A., 1971. Use of bacteria for microbial control. In: BURGESS, H.D. e N.W. HUSSEY, Eds. *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press. 86lp.
- FANDIALAN, V.C. e E.A. IBÁÑEZ, 1966. A preliminary report on the study of the biological control of the coconut black beetle (*Oryctes rhinoceros* L.) with special reference to the use of microbial organisms. *Philippine Journal of Plant Industry*, 31:125-135.

- FARGUES, J., T. DURIEZ, J. ANDRIEU, R. POPEYE e P. ROBERT, 1975. Étude immunologique comparée de souches de *Metarrhizium anisopliae* (Delacr.) Sien champignon hyphomycète entomopathogène. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Sér. D.*, 281:1781-1784.
- FERRON, P. e T. DIOMANDÉ, 1969. Sur la spécificité à l'égard des insectes de *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Fungi imperfecti), en fonction de l'origine des souches de ce champignon. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Sér. D.*, 268:331-332.
- FERRON, P. e P.H. ROBERT, 1975. Virulence of entomopathogenic fungi (Fungi imperfecti) for the adults of *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 25:379-388.
- FERRON, P., P.H. ROBERT e A. DEOTTE, 1975. Susceptibility of *Onyctes rhinoceros* adults to *Metarrhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 25:313-320.
- FRANCO, H.F., 1970. Comportamento do mercado internacional de carnes. *Conselho Nacional de Desenvolvimento da Pecuária*. 280p.
- FRANZ, J.M., 1961. Biological control of pest insects in Europe. *Annual Review of Entomology*, 6:183-200.

- FRIEDERICHS, K., 1930. *Die Grundfragen and Gesetzmässigkeiten der Land-und Fortwirtschaftlichen Zoologie*. Berlin. 463p.
Apud: TULLOCH, M., 1976. The genus *Metarhizium*.
Transactions British Mycological Society, 66:407-411.
- GOLDBLAT, L.A., 1969. Aflatoxin. In: *Food science and technology*. London, Academic Press. 472p.
- GOYER, R.A. e D.M. BENJAMIN, 1971. Infection of a pine root weevil, *H. rhizophagus*, by two muscardine fungi. *Journal of Economic Entomology*, 64:562.
- GUAGLIUMI, P., 1968. As cigarrinhas dos canaviais no Brasil. I. Contribuição: Perspectivas de uma luta biológica nos Estados de Pernambuco e Alagoas. *Brasil Açucareiro*, 72: 34-43.
- GUAGLIUMI, P., 1970. A cigarrinha das pastagens ataca a cana-de-açúcar no nordeste do Brasil. *Brasil Açucareiro*, 76:89-91.
- GUAGLIUMI, P., 1971. Lucha integrada contra las cigarrinhas (Homopt: Cercopidae) en el noroeste del Brasil. *Revista Peruana de Entomologia*, 14:361-368.

- GUAGLIUMI, P., 1972. Resultados preliminares da luta biológica contra a "cigarrinha-da-folha" e da cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco. *Brasil Açucareiro*, 80:49-51.
- HAMMIL, T.M., 1972. Electron microscopy of phialoconidiogenesis in *Metarrhizium anisopliae*. *American Journal of Botany*, 59:317-326.
- HEIMPEL, A.M., 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annual Review of Entomology*, 12:287-322.
- HEIMPEL, A.M. e T.A. ANGUS, 1958. The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. *Canadian Journal of Microbiology*, 4:531-541.
- HIDALGO-SALVATIERRA, O. e F. BERRIOS, 1972. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* Zeller (Lep., Pyralidae). XII. Determination of the LC_{50} of *Metarrhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin spores on fifth instar larvae. *Turrialba*, 22:435-438.
- HIRST, J.M., O.J. STEDMAN e G.W. HURST, 1967. Long-distance spore transport: vertical sections of spore clouds over the sea. *Journal of General Microbiology*, 48:357-377.

- HOLT, W.R., 1961. *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, infecting larvae of the black turpentine beetle. *Journal of Insect Pathology*, 3:93-102. Apud: URS, N.V.R.R. e H.C.
- GOVINDU, 1971. *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, and its host range. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 44:317-320.
- HUBER, J., 1958. Untersuchungen zur Physiologie insektentötender Pilze. *Archiv für Mikrobiologie*, 29:257-276. Apud: MADELIN, M.F., 1968. Fungal parasites of invertebrates. I. Entomogenous fungi. In: *The fungi*. AINSWORTH, G.C. e A.S. SUSSMAN, Eds., 3:227-238. New York, Academic Press.
- HUGER, A.M., 1966. Studies on microbial factors to restrict populations of the Indian rhinoceros beetle *Oryctes rhinoceros* in S.E. Asia and the S. Pacific. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 58:89-95.
- JAQUEZ, R.P., H.T. STULTZ e F. HUSTON, 1968. The mortality of the pale apple leafroller and winter moth by fungi and nematodes applied to soil. *The Canadian Entomologist*, 100:813-818.
- JOHNPULLE, A.L., 1938. Apud: VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie, due a *Metarrhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland*, 68:1-77.

- JOHNSTON, J.R., 1915. The entomogeneous fungi of Porto Rico. *Puerto Rico Board of Commissioners of Agriculture Bulletin*, 10:1-33.
- KAMAT, M.N., M.K. PATEL e G.W. DHANDE, 1952. Occurrence of the green muscardine fungus on *Pyrrilla* species in Bombay. *Current Science*, 21:317. Apud: TULLOCH, M., 1976. The genus *Metarrhizium*. *Transactions British Mycological Society*, 66:407-411.
- KENDRICK, W.B., 1971. *Taxonomy of fungi imperfecti*. University of Toronto Press. 309p.
- KODAIRA, Y., 1961. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworms, *Bombyx mori*. *Journal of the Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University*, 5:1-68.
- KODAIRA, Y., 1962. Studies on the new toxic substances to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. *Agricultural and Biological Chemistry*, 26:36-42.
- KOIDSUMI, K., 1957. Antifungal action of cuticular lipids in insects. *Journal of Insect Physiology*, 1:40-41.

- LATCH, G.C.M., 1965. *Metarrhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8:384-396.
- LEOPOLD, J. e A. SAMŠIŇÁKOVÁ, 1970. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15:34-42.
- LEPAGE, H.S. e O. MONTE, 1942. As cigarrinhas do capim "Kikuio". *O Biológico*, 8:225-259.
- MACHROWICZ, I., 1967. Effect of some plant protection chemicals on the development of some fungi in pure culture. *Zeszyty naukowe wyzszej Szkoly rolniczej w Szczecinie*, Sër. 3, 24:179-184.
- MacLEOD, D.M., J.W.M. CAMERON e R.S. SOPER, 1966. The influence of environmental conditions on epizootics caused by entomogeneous fungi. *Revue Roumaine de Biologie et Botanique*, 11:125-134.
- MADELIN, M.F., 1966. Fungal parasites of insects. *Annual Review of Entomology*, 11:423-448.

- MADELIN, M.F., 1968. Fungal parasites of invertebrates.
I. Entomogeneous fungi. In: *The fungi*. AINSWORTH, G.C. e
SUSSMAN, A.S. Eds., 3: 227-238. New York, Academic Press.
- MARCHIONATTO, J.B., 1942. Nota sobre la "muscardina verde"
(*Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sor.). *Revista de His-
tória Natural*, 1942-1943:12-14.
- MARQUES, E.J. e A.M. VILAS BOAS, 1973. Contribuição ao estu-
do da cultura e aplicação de *Metarrhizium anisopliae*
(Metsch.) no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva
posticata* Stal) no nordeste do Brasil. *Anais da 1ª Reunião
Anual da Sociedade Entomológica do Brasil*, Viçosa, MG. p.70.
- MARSCHALL, K.J., 1970. Introduction of a new virus disease of
the coconut rhinoceros beetle in Western Samoa. *Nature*,
London, 225:288.
- MASERA, E., 1936. Contributo allo studio della virulenza e
pathogenicità di alcuni entomomiceti. In: *Insect pathology*.
STEINHAUS, E.A., 1963, Ed., vol.2, p.247. New York,
Academic Press. Apud: BELL, J.V. e R.J. HAMALLE, 1971. A
bacterium and dipterous parasite in wild populations of
cowpea curculio larvae: effects of treatment with spores of
Metarrhizium anisopliae. *Journal of Invertebrate Pathology*,
17:256-259.

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

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

MATTA, E.A.F. da e M.Z.A. de OLIVEIRA, 1978. Efeito da luz na esporulação do fungo *Metarrhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., "in vitro". *Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia*, Bahia. p.75.

McCAULEY, V.J.E., R.Y. ZACHARUK e R.D. TINLINE, 1968. Histopathology of green muscardine in larvae of four species of elateridae (Coleoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 12:444-459.

McCOY, C.W., A.J. HILL, R.F. KANAVAL, 1972. A liquid medium for the large-scale production of *Hirsutela thompsonii* in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 19: 370-374.

MESSIAS, C.L., J.L. AZEVEDO, E. de CONTI e H.M.L. de SOUZA, 1978. Aspectos biológicos e indução de mutantes em *Metarrhizium anisopliae*. Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia. p.69.

METCALFE, J.R., 1971. Observation on the ecology of *Saccharosydne saccharivora* (Westw.) (Hom., Delpacidae) in Jamaican-sugar-cane fields. *Bulletin of Entomological Research*, 60:505-597.

METSCHNIKOFF, E., 1880. Zur Lehre über Insektenkrankheiten. *Zoologischer Anzeiger*, 3:44-47. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on entomogeneous fungi. *Transactions British Mycological Society*, 16:55-75.

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

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

MÜLLER-KÖGLER, E.A. e A. SAMŠIŇÁKOVÁ, 1970. Zur Massenkultur des insektenpathogenen Pilzes *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. *Experientia*, 26:1400.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1969. Microbial control of insects. In: *Principles of plant and animal pest control*. Vol.3. 395p.

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

PIMENTEL GOMES, F., 1963. *Curso de estatística experimental*. 2a. Edição, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP. 384p.

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

ROBERTS, D.W., 1966. Toxins from the entomogeneous fungus *Metarrhizium anisopliae*. I. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. *Journal of Invertebrate Pathology*, 8:212-221.

ROBERTS, D.W., 1967. Some effects of *Metarrhizium anisopliae* and its toxins on mosquito larval. In: *Insect pathology and microbial control*. P.A. van der LAAN, Ed., p.243-246. North-Holland, Amsterdam. Apud: CRISAN, E.V., 1971. Mechanism responsible for release of toxin by *Metarrhizium* spores in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17:260-264.

ROBERTS, D.W., 1969. Toxins from the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae*: isolation of destruxins from submerged cultures. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14:82-88.

ROBERTS, D.W., 1973. Means for insect regulation fungi. *Annals New York Academy of Science*, 217:76-83.

ROBERTS, D.W. e W.G. YENDOL, 1971. Use of fungi for microbial control of insects. In: *Microbial control of insects and mites*. BURGESS, H.D. e HUSSEY, N.W., Eds., p.125-149. New York, Academic Press. 86lp.

ROBINSON, R.K., 1966. Studies on penetration of insect integument by fungi. *Pest Articles and New Summaries*, Sect. B, 12:131-142.

- SABA, F., 1970. Parasites, predators, and diseases in a rearing culture of *Diabrotica balteata*. *Journal of Economic Entomology*, 63:1674.
- SCHABEL, H.G., 1976. Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarrhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27:377-383.
- SAMŠIŇÁKOVÁ, A., 1973. Apud: FRIGO, S.M., 1977. Considerações sobre o controle biológico de insetos pelo *Metarrhizium anisopliae*. Aspectos biológicos do fungo. Trabalho apresentado no curso "Tópicos em Genética" do Instituto de Genética - ESALQ/USP, Piracicaba, 25p.
- SOROKIN, N., 1883. Les parasites des plantes, de l'Homme et des animaux (Em russo). *Rastiel'nye parazity čelovekai-životnyh Band*, 11:268-290. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on entomogeneous fungi. *Transactions British Mycological Society*, 16:55-75.
- STEINHAUS, E.A., 1949. *Principles of insect pathology*. New York, McGraw Hill Book Company, Inc. 757p.
- STEINHAUS, E.A., 1968. Enfermedades microbianas de los insectos. In: DE BACH, P. *Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*. México, DF., Compañía Editorial Continental. 949p.

STERN, V.M., V. SEVACHERIAN, A. MULLER e J. RYAN, 1968.

Effect of naled, trichlorfon, and *Bacillus thuringiensis* on three species of Lepidopterous larvae attacking alfalfa in California. *Journal of Economic Entomology*, 61:1324-1327.

TEDDERS, W.L., D.J. WEAVER e E.J. WEHUNT, 1973. Pecan weevil:

suppression of larvae with the fungi *Metarrhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and the nematode *Neoaplectana dutkyi*. *Journal of Economic Entomology*, 66:723-725.

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

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

TUYL, J.M. van, 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland*, 77:136p.

UMPHLETT, C.J. e C.S. HUANG, 1973. Experimental infection of mosquito larvae by a species of the aquatic fungus *Langenidium*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15:10-16.

- URS, N.V.R.R. e H.C. GOVINDU, 1971. *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, and its host range. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 44:317-320.
- VEEN, K.H., 1967. A technique for monospore cultures and the determination of nucleus numbers in *Metarrhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9:276-278.
- VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie, due à *Metarrhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Nederland*, 68: 1-77.
- VILLACORTA, A., 1977. Technique for the mass culture of the entomophagous fungus *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin in 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 *Metarrhizium anisopliae* Sorok. *Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia*, Bahia. p.70.
- VUILLEMIM, P., 1904. Les Isaria du genre *Penicillium*. *Bulletin de la Société Micologique de France*, 20:214-221. Apud: PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transactions British Mycological Society*, 16:55-75.

- YENDOL, W.G., 1968. Factors affecting germination of *Entomophthora conidia*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 10:116-121.
- YOUNG, E.C., 1974. The epizootiology of two pathogens of the coconut palm rhinoceros beetle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 24:82-92.
- WALSTAD, J.D. & ANDERSON, R.F., 1971. Effectiveness of *Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae* as control agents for the pales weevil. *Journal of Economic Entomology*, 64:322-323.
- WEST, E.J. & BRIGGS, J.D., 1968. In vitro toxin production by the fungus *Beauveria bassiana* and bioassay in greater wax moth larvae. *Journal of Economic Entomology*, 61:684-687.
- ZACHARUK, R.Y., 1970a. Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15:63-80.
- ZACHARUK, R.Y., 1970b. Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and apleria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15:81-91.

- ZACHARUK, R.Y., 1970c. Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). III. Penetration of the host integument. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15:372-396.
- ZACHARUK, R.Y., 1971. Fine structure of the fungus *Metarrhizium anisopliae* infecting three species of larvae elateridae (Coleoptera). IV. Development within the host. *Canadian Journal of Microbiology*, 17:525-529.
- ZACHARUK, R.Y., 1973. Penetration of the cuticular layers of elateride larvae (Coleoptera) by the fungus *Metarrhizium anisopliae*, and notes on a bacterial invasion. *Journal of Invertebrate Pathology*, 21:101-106.
- ZACHARUK, R.Y., 1974. Ultrastructural pathology of the epiderms of molting elaterid larvae (Coleoptera) with a fungus and a bacterium in the ecdysial space. *Journal of Invertebrate Pathology*, 23:13-21.
- ZACHARUK, R.Y. e R.D. TINLINE, 1968. Pathogenicity of *Metarrhizium anisopliae* and other fungi, for five elaterids (Coleoptera) in Saskatchewan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 12:294-309.