

**EFEITO DAS RADIAÇÕES GAMA E ULTRAVIOLETA
EM ISOLADOS DE *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN,
1883 E SUA UTILIZAÇÃO VISANDO O CONTROLE
DA *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794)**

LUIZ CARLOS DE ALMEIDA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: **Dr. Ricardo Bohrer Sgrillo**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia, área de concentra-
ção: Energia Nuclear na Agricultura.

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO — BRASIL -----
JUNHO - 1983

Aos meus pais,
ã minha esposa Maria Lúcia,
aos meus filhos: Fernando e Débora

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, com especial atenção:

Ao Prof. Dr. Ricardo Bohrer Sgrillo, do Departamento de Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura ESALQ/USP, pela orientação, amizade e incentivo;

Ao IAA/PLANALSUCAR - Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar, ao CENA - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, à ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", e à CNEN - Comissão Nacional de Energia Nuclear;

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves, Prof. Dr. Raul Machado Neto, Dr. Paulo Sérgio Machado Botelho, Dr. Newton Macedo e Dr. Frederico Maximiliano Wiendl, pela colaboração, participação e apoio;

Aos colegas Nilton Degaspari, Julio Marcos Melges Walder, Saul Hermano Risco Briscoño, José Ribeiro de Araújo, Janê Borges Pinheiro e Roseli Negreti, pelas colaborações prestadas;

Aos técnicos João dos Santos Pinto, Pedro Roberto Cancian e Sebastião Moreira Nunes, pela colaboração na exe

cução dos trabalhos de campo;

Às secretárias Sonia Aparecida Fachini, Raquel Peixoto Acioli e Elizabeth Carvalho Cilindri, pela colaboração na revisão, summary, bibliografia e confecção datilográfica.

À bibliotecária chefe da COSUL, Ana Maria Zaia Gheller e ao estimado amigo Sr. José Zurita Fernandes.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1. Utilização do <i>Metarhizium anisopliae</i> no controle de insetos	7
3.2. Fatores que interferem na produção do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	11
3.3. Caracterização de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
3.4. Aplicação do <i>Metarhizium anisopliae</i> em condições de campo	18
4. METODOLOGIA	21
4.1. Material	21
4.1.1. Isolados do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	21
4.1.2. Meio de cultura	23
4.1.3. Inseto utilizado	23
4.1.4. Equipamentos	23
4.2. Métodos	27
4.2.1. Zimogramas para α -esterase dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	27

4.2.2.	Déterminação do efeito da radiação <u>ga</u> ma sobre os diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	27
4.2.3.	Determinação do efeito da radiação ultravioleta sobre os diferentes iso lados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
4.2.4.	Efeito "in vitro" do <i>Metarhizium ani</i> <i>sopliae</i> sobre ovos da broca da cana- de-açúcar, <i>Diatraea saccharalis</i>	31
4.2.5.	Determinação da patogenicidade do <i>Me</i> <i>tarhizium anisopliae</i> sobre ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> de diferentes idades	34
4.2.6.	Efeito "in vitro" de diferentes dosa gens do <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre larvas de <i>Diatraea saccharalis</i>	36
4.2.7.	Método para avaliar a aplicação de <i>Metarhizium anisopliae</i>	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1.	Zimogramas para α -esterase dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	44
5.2.	Determinação do efeito da radiação gama so bre diferentes isolados de <i>Metarhizium aniso</i> <i>pliae</i>	46

5.3.	Determinação do efeito da radiação ultravioleta sobre os diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	55
5.4.	Efeito "in vitro" do <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre ovos da broca da cana, <i>Diatraea saccharalis</i>	70
5.5.	Determinação da patogenicidade do <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> de diferentes idades	77
5.6.	Efeito "in vitro" de diferentes dosagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre larvas de <i>Diatraea saccharalis</i>	81
5.7.	Método para avaliar a aplicação de <i>Metarhizium anisopliae</i>	85
6.	CONCLUSÕES	92
7.	SUMMARY	94
8.	LITERATURA CITADA	98

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Denominação dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> , procedências, hospedeiro original e datas de coleta	22
2	Descrição das colônias dos diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizados, que se desenvolveram a 26°C e fotoperíodo de 16 horas de luz	24
3	Distribuição dos diversos tratamentos de inoculação do <i>Metarhizium anisopliae</i> em ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> , nos respectivos experimentos	33
4	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado SPL-3F, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística	47
5	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-2, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística	48

Tabela	Página
6 Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-5, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística	49
7 Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-7, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística	50
8 Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-17, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística	51
9 Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-28, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística	52
10 Dados médios, transformados em $\text{Arc Sen } \sqrt{\%/100}$, da porcentagem de viabilidade de conídios dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> , sob diferentes doses de radiação gama e resultados do confronto das médias pelo teste de Tukey a 5% .	53

Tabela		Página
11	Resultados da análise de regressão linear entre a porcentagem média de viabilidade de conídios e a dose de radiação gama para os diversos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	54
12	Razão de viabilidade dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> nas diversas doses de radiação gama, utilizando-se como padrão o isolado SPL-3F	56
13	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado SPL-3F, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística ..	58
14	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-2, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística ..	59
15	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-5, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística ..	60

Tabela	Página	
16	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-7, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística ..	61
17	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-17, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística ..	62
18 *	Porcentagem de viabilidade de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> isolado PL-28, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística ..	63
19	Dados médios, transformados em $\text{Arc Sen } \sqrt{\%/100}$, da porcentagem de viabilidade de conídios dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> , sob diferentes tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados do confronto das médias pelo teste Tukey a 5%	65
20	Resultados da análise de regressão linear entre a porcentagem média de viabilidade de conídios e o tempo de exposição à radiação ultravioleta	

Tabela	Página
para os diversos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	66
21 Razão de viabilidade dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> nos diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta, utilizando-se como padrão o isolado SPL-3F	67
22 Dados da DE-50 dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> para radiação gama, ultravioleta e a relação entre ambas	69
23 Dados de viabilidade de ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> , nos diversos tratamentos do experimento 1, inoculados por imersão com <i>Metarhizium anisopliae</i>	71
24 Viabilidade de ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> , inoculados por gota com <i>Metarhizium anisopliae</i> no experimento 2	72
25 Viabilidade de ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> , inoculados por gota com <i>Metarhizium anisopliae</i> no experimento 3	73

Tabela	Página
26	Desenvolvimento larval de <i>Diatraea saccharalis</i> , provenientes de ovos inoculados com <i>Metarhizium anisopliae</i> nos respectivos tratamentos 75
27	Resultados obtidos nos tratamentos: Testemunha, T-1 (produto técnico) e T-2 (produto formulado) de acordo com a idade da postura (em dias), no momento da inoculação, para os parâmetros: <u>t</u> tal de ovos, <u>t</u> tal de ovos viáveis, porcentagem de viabilidade e porcentagem de viabilidade <u>cor</u> rigida 78
28	Porcentagem de mortalidade acumulada e <u>corrigi</u> da de larvas e pupas de <i>Diatraea saccharalis</i> inoculadas com <i>Metarhizium anisopliae</i> , <u>pa</u> ra os diversos tratamentos 82
29	Resultados da análise de regressão linear da mortalidade corrigida de <i>Diatraea saccharalis</i> , em função dos dias após a inoculação de <i>Metarhizium anisopliae</i> e as LT-70 e LT-50 para os diversos tratamentos 83
30	Porcentagem média de ovos viáveis de <i>Diatraea saccharalis</i> , transformada em $\sqrt{x + 0,5}$, que

Tabela	Página
receberam a aplicação de <i>Metarhizium anisopliae</i> , nas diferentes posições nos respectivos tratamentos e resultados da análise estatística	86
31 Número médio de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> encontrados na suspensão aplicada (SA), na face ventral (FV) e na face dorsal (FD), logo após a aplicação do fungo em condições de campo, nos diversos tratamentos.....	88
32 Número médio de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> encontrados em uma superfície de 0,25 cm ² de BDA, nas diversas posições e sequências de caminhamto para as diversas dosagens	89
33 Porcentagem de viabilidade dos ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> , sob diferentes dosagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> , quando colocados nas faces Ventral (V) e Dorsal (D) das folhas de cana-de-açúcar	91

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Câmara de irradiação, equipada com lâmpada ultravioleta (2.537 Å). a) placas de Petri com meio BDA, onde foram inoculados conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> . b) bulbo da lâmpada .	26
2	Esquema da disposição das 10 placas com BDA, nas linhas de cana-de-açúcar, para avaliar a deposição de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	42
3	Zimogramas para α -esterase dos diferentes isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i>	45
4	Perfil das razões de viabilidade e zimogramas dos diversos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> , submetidos à radiação gama, tomando-se como padrão o isolado SPL-3F	57
5	Perfil das razões de viabilidade e zimogramas dos diversos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> , submetidos à radiação ultravioleta, tomando-se como padrão o isolado SPL-3F	68

Figura		Página
6	Porcentagem de viabilidade de ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> , em função do número de conídios de <i>Metarhizium anisopliae</i> inoculados	76
7	Porcentagem de viabilidade e mortalidade de ovos de <i>Diatraea saccharalis</i> , de diferentes idades, submetidos à inoculação com <i>Metarhizium anisopliae</i> , para os tratamentos T-1 (produto técnico) e T-2 (produto formulado), utilizando-se concentrações semelhantes	80
8	Equações das retas de mortalidade corrigida para larvas e pupas de <i>Diatraea saccharalis</i> , em função das dosagens de <i>Metarhizium anisopliae</i> para o 6º e 9º dias após a inoculação ..	84

EFEITO DAS RADIAÇÕES GAMA E ULTRAVIOLETA EM ISOLADOS DE
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN, 1883 E SUA UTILIZAÇÃO
VISANDO O CONTROLE DA *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794)

Luiz Carlos de Almeida

Dr. Ricardo Bohrer Sgrillo
Orientador

1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito das radiações gama e ultravioleta em isolados do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, e a utilização deste patógeno visando o controle da broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabr.).

Foram conduzidos diversos experimentos nos laboratórios de: Controle Biológico do IAA/PLANALSUCAR - Araras-SP, Entomologia da ESALQ/USP e Radioentomologia do CENA-ESALQ/USP - Piracicaba-SP.

Através dos padrões eletroforéticos, os isolados foram reunidos em 2 grupos com zimogramas semelhantes: grupo 1 (SPL-3F, PL-2, PL-5 e PL-17) e grupo 2 (PL-7 e PL-28).

Com estes isolados, estudou-se o efeito da ra

radiação gama, utilizando-se uma fonte de Co-60, empregando-se doses de 25 a 800 krad. Através dos valores da DE-50 de cada isolado, determinou-se que a ordem crescente de resistência à radiação gama foi: PL-17, PL-5, SPL-3F, PL-2, PL-7 e PL-28.

Da mesma forma, foi avaliado o efeito da radiação ultravioleta (2.537 Å) na viabilidade dos conídios, empregando-se tempos de 20 a 90 segundos de exposição. Calculando-se as DE-50 dos isolados determinou-se que a ordem crescente de resistência à radiação ultravioleta foi: PL-17, PL-28, PL-7, SPL-3F, PL-5 e PL-2.

Com os dados da DE-50 dos diversos isolados, para os dois tipos de radiação, determinou-se que o efeito de 1 segundo da radiação ultravioleta equivale ao efeito de 2,41 krad da radiação gama.

Para determinar o efeito de doses de conídios viáveis de *M. anisopliae* para o controle de ovos da broca da cana, em condições de laboratório, foram utilizadas quatro dosagens, aplicadas nas posturas por imersão e por gota. Analisando a viabilidade dos ovos, sete dias após a inoculação, determinou-se que as doses da ordem de 10^6 conídios por postura apresentaram aproximadamente 100% de eficiência no controle.

A patogenicidade do *M. anisopliae* foi estabelecida para ovos de *D. saccharalis*, de diferentes idades quando inoculados uma única vez, com concentrações semelhantes do ingrediente ativo para dois produtos: técnico e formulado.

Através dos resultados obtidos, concluiu-se que

50% dos ovos podem ser colonizados pelo fungo com 3,72 dias de idade para o produto técnico e 3,48 dias para o produto formulado, e que os ovos com idade de 1 a 3 dias apresentaram taxa de mortalidade superior a 79% para os dois produtos.

Estudou-se também o efeito de diferentes dosagens de *M. anisopliae* sobre larvas da broca da cana, em condições de laboratório. A mortalidade das larvas e pupas de *D. saccharalis* apresentaram nos diversos tratamentos uma correlação positiva com o tempo, após a inoculação do fungo.

Através das equações lineares obtidas, estimou-se a LT-50 para cada dose do fungo. Analisando a mortalidade em função das dosagens, determinou-se que a LD-50 para larvas e pupas de *D. saccharalis* foi de $1,1 \times 10^5$ conídios/larva no 6º dia e de $5,5 \times 10^4$ conídios/larva no 9º dia após a inoculação do fungo.

Para avaliar a aplicação do *M. anisopliae* em condições de campo, foram realizados 2 ensaios, no primeiro efetuou-se uma aplicação direcionada da suspensão de conídios sobre posturas da broca da cana e no segundo, a pulverização foi realizada sobre posturas previamente colocadas nas folhas da cana. As dosagens utilizadas foram de 100, 200 e 300 g de conídios/ha. Pelos resultados obtidos nestes ensaios, verificou-se que a massa foliar da cana-de-açúcar dificultou a deposição dos conídios sobre as posturas de *D. saccharalis*.

2. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar ocupa atualmente uma posição de destaque entre todas as culturas existentes no Brasil, principalmente após o incentivo de desenvolvimento que tem ocorrido no principal programa para obtenção de combustível, a partir da bioconversão de energia, como alternativa para vencer a crise energética.

Para vencer este desafio é preciso transpor uma série de barreiras, e entre estas, destacam-se os problemas fitossanitários que se constituem em fatores limitantes da produção agrícola e rendimento industrial.

Na Região Centro-Sul do Brasil, a *Diatraea sac*charalis (Fabr., 1794) constitui-se na praga que ocasiona os maiores danos econômicos na cana-de-açúcar. O método de con

trole mais utilizado e recomendado para a principal praga da cana-de-açúcar no Brasil atualmente é o Controle Integrado, porém o programa baseia-se principalmente, no Controle Biológico, com a utilização dos seus inimigos naturais, através da criação massal dos parasitos *Apanteles flavipes* (Cam., 1891), *Metagonistylum minense* Towns., 1926 e *Paratheresia claripalpis* Wulp., 1896, uma vez que já foi comprovado que o controle químico é inviável, face aos baixos índices de eficiência obtidos, além de que a utilização de inseticidas pode comprometer a população de predadores e parasitos, que exercem um controle natural eficiente nas diversas fases do inseto, podendo provocar um desequilíbrio biológico e conseqüentemente, um aumento na incidência da broca.

Na busca de novos agentes biológicos controladores da broca da cana, ALMEIDA e ALVES (1982) efetuaram bioensaios visando provar a patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e obtiveram 100% de controle para larvas de *D. saccharalis*, possibilitando a utilização deste patógeno para incrementar o controle biológico desta importante praga.

No Nordeste do Brasil, o fungo *M. anisopliae* é largamente utilizado no controle da cigarrinha da folha, *Mahanarva posticata* (Stal, 1855).

Este fungo é também utilizado no controle das cigarrinhas das pastagens, principalmente para as espécies *Deois flavopicta* (Stal, 1854), *Zulia entreciana* (Berg., 1879)

e *Aeneolamia selecta* (Wlk., 1868), visando a preservação do ambiente e inimigos naturais.

Apesar da larga utilização do *M. anisopliae* nos programas de controle biológico de diversas pragas, existe também a necessidade de avaliar a eficiência destes isolados, estabelecer parâmetros de comparação entre eles, caracterizando-os e selecionando-os com vista a sua utilização.

As radiações gama e ultravioleta podem ser utilizadas em estudos de melhoramento de patógenos. Com relação ao *M. anisopliae*, diversos autores como TINLINE e NOVIELLO (1971), SANTOS (1978) e OKINO et alii (1978), determinaram doses destas radiações visando a produção de mutantes.

Existe um grande interesse em se estabelecer o efeito da radiação ultravioleta sobre patógenos e a equivalência com outras radiações, uma vez que esta radiação segundo ROBERTS e CAMPBELL (1977) e ALVES (1980) é o principal componente atuante da luz solar, responsável pela instabilidade dos fungos em condições de campo.

A presente pesquisa teve por objetivo determinar o efeito das radiações gama e ultravioleta sobre isolados de *M. anisopliae*, caracterizar os isolados, determinar a patogenicidade do fungo sobre ovos e larvas de *D. saccharalis* e desenvolver uma metodologia para avaliar a aplicação deste fungo em condições de campo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Utilização do *Metarhizium anisopliae* no controle de insetos

Os problemas fitossanitários constituem fatores limitantes à produção e a qualidade dos produtos agrícolas em todas as culturas. Para vencer esta barreira, diversas medidas têm sido pesquisadas e empregadas. Dentre estas, o controle biológico de insetos por fungos entomopatogênicos vem tendo grande importância.

ROBERTS e YENDOL (1971) afirmam que existem mais de 36 diferentes gêneros de fungos que possuem espécies que causam doenças a insetos.

Segundo BALFOUR-BROWNE (1960), entre os microor

ganismos entomopatogênicos, o mais estudado e utilizado em programas de controle é o *M. anisopliae*. A primeira experiência significativa com este fungo foi realizada no ano de 1880, quando Metschnikoff constatou e isolou *M. anisopliae* de besouros parasitados da espécie *Anisopliae austriaca* (Hbst.) e passou a produzir e utilizar este fungo no combate a outros insetos como *Cleonus punctiventris* Germ., praga da beterraba.

DE BACH (1968) citou em seu trabalho, que no ano de 1897 Koebele fez os primeiros trabalhos práticos com o fungo *Metarhizium* sp. nos Estados Unidos.

O fungo *M. anisopliae*, segundo FARGUES et alii (1975) pode atacar cerca de 204 espécies de insetos. No Brasil, este patógeno vem sendo utilizado, com bons resultados, para o controle de cigarrinhas da cana-de-açúcar no Nordeste e cigarrinhas das pastagens na região Centro-Sul.

Segundo MARQUES (1981) a área total de cana tratada por este fungo em 1980, pelo IAA/PLANALSUCAR, abrangendo os Estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, foi de 101.105 hectares, conseguindo mortalidade de 23% de ninfas e 40% de adultos na população de *M. posticata*, constituindo-se no principal método de controle desta praga.

O *M. anisopliae* é também utilizado para o controle das cigarrinhas das pastagens dos gêneros *Deois* e *Zulia*, apresentando resultados bastante controvertidos, provavelmente, por não se considerar detalhes como utilização de isolados a partir de material proveniente da região, assim como,

formulações e dosagens adequadas.

Assim, PACHECO e BERNARDES (1976) testando 3 dosagens de *M. anisopliae* contra *Z. entreriana* no Espírito Santo não obtiveram resultados positivos, pela falta de umidade na época de aplicação do fungo. SILVA e MAGALHÃES (1980) trabalhando com 2 isolados de *M. anisopliae* nas quantidades de 1.000, 500 e 250 g de massa fúngica/ha, na formulação pó seco, para o controle de *Deois incompleta* (Walk.) não obtiveram resultados satisfatórios, porém não informaram no trabalho a quantidade de conídios existentes nas diversas doses empregadas.

Por outro lado, VEIGA (1979) obteve excelentes resultados no controle de *A. selecta* em Pernambuco, atingindo níveis de 65 a 96% de eficiência.

VENTURA e MATIOLI (1980) relataram uma epizootia de *M. anisopliae* em condições naturais, sobre os generos *Zulia* e *Deois* no Estado de Espírito Santo.

Sobre a patogenicidade do *M. anisopliae* em outros grupos de insetos no Brasil, VENTURA et alii (1980) fazem referência ao controle de *Metamasius hemipterus* (Linn.) em condições de laboratório, obtendo uma mortalidade de 97,7%. PEREIRA et alii (1981) referiram-se ao controle de larvas de *Musca domestica* Linn. com uma mortalidade de 56%, causada pelo *M. anisopliae*.

NAVES (1981 b) testando a patogenicidade do *M. anisopliae* sobre percevejos da soja obteve mortalidade de 70 a

100% para adultos e ninfas de 2ª e 4ª instares de *Nezara viridula* (Linn.). Para *Piezodorus guildini* (West.) a mortalidade foi de 80% para adultos, 40% para ninfas de 1ª estágio e 100% para ninfas de 3ª estágio.

Em São Paulo, MACEDO et alii (1977) em trabalho de campo, comprovaram a eficiência do *M. anisopliae* no controle da cigarrinha da raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Stal) praga da cana-de-açúcar.

ALVES (1982) aplicou 100 g de conídios de *M. anisopliae*, isolado SPL-3F, por hectare, apresentando 6×10^9 conídios/grama e obteve um controle de 60% de adultos de *D. flavopicta*.

A primeira referência sobre o *M. anisopliae* colonizando *Diatraea* spp., foi feita por GUAGLIUMI et alii (1974) em áreas de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento com o fungo para o controle de cigarrinhas. Posteriormente, ALMEIDA e ALVES (1982) efetuaram biotestes, visando determinar a patogenicidade do *M. anisopliae* para *D. saccharalis*. Os autores obtiveram uma mortalidade da ordem de 100% para larvas da broca da cana, quando inoculadas por "rolamento", em uma quantidade de 10^6 conídios por larva, caracterizando o *M. anisopliae* como um possível agente controlador e sugerindo o seu uso em programas de controle biológico.

3.2. Fatores que interferem na produção do fungo *Metarhizium anisopliae*

Durante a fase de produção de fungos entomopatógenos, inúmeros fatores podem interferir na qualidade e quantidade dos conídios, principalmente quando o patógeno é produzido massalmente.

Muitos trabalhos foram desenvolvidos nestes últimos anos, com o objetivo de esclarecer a atuação dos parâmetros básicos necessários para a produção destes fungos.

Assim, GUAGLIUMI et alii (1974) produziram em média 15 a 20 g de conídios de *M. anisopliae* utilizando 100 g de arroz como substrato e obtiveram um máximo de até 25 g de conídios.

VILLACORTA (1975) recomendou a técnica para produção massal do fungo *M. anisopliae* em grãos de arroz, por outro lado, BARNES et alii (1975) estudaram o crescimento e esporulação do *M. anisopliae* em meio líquido com várias fontes de peptona, visando facilitar e aumentar a produção de conídios.

VILLACORTA (1978) determinou o efeito da temperatura e nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *M. anisopliae*, utilizando-se da técnica do "crescimento radial", observando que a temperatura ótima de desenvolvimento do fungo foi de 28°C, sendo que temperaturas acima de 30°C prejudicaram o desenvolvimento, e abaixo de 7°C inibiram o

crescimento.

MATTA e OLIVEIRA (1978 a) realizaram estudos para determinar o efeito da luz na esporulação do *M. anisopliae*, e demonstraram que existe uma correlação positiva entre estes parâmetros e que é necessário um fotoperíodo mínimo de 144 horas após a inoculação.

ALVES (1980) avaliou em seu trabalho, o controle microbiano de insetos e afirmou que os fatores físicos como temperatura, luz e umidade podem afetar sensivelmente a produção e também a qualidade dos fungos.

ALVES et alii (1980 a) estudaram o efeito de luz de diferentes cores sobre o desenvolvimento de *M. anisopliae* e determinaram que os conídios produzidos sob efeito da luz azul apresentaram-se mais patogênicos quando testados em larvas de *Galleria mellonella* (Linn.).

MARQUES et alii (1981) elaboraram um manual com orientações técnicas para produção do fungo entomógeno *M. anisopliae*, apresentando a metodologia de produção, custo das instalações, equipamentos e pessoal necessários para inoculação média de 500 unidades/dia, utilizando o arroz como substrato.

TAVEIRA NEVES e VIEGAS (1981) estudaram a influência da temperatura na patogenicidade de *M. anisopliae* utilizando 5 isolados diferentes, concluindo que o fungo resiste perfeitamente a -10°C por longo período, entretanto, perde sua patogenicidade quando submetido a bruscas mudanças de

temperatura e morre quando conservado por alguns dias a temperatura de 40°C.

Por outro lado, VIEGAS e TAVEIRA NEVES (1981) estudaram também a influência da luminosidade e da temperatura no desenvolvimento de *M. anisopliae* em condições de laboratório, e concluíram que existem cepas com esporulação normal na ausência de luz e com a mesma patogenicidade, e também que a temperatura pouco influenciou no crescimento micelial e na esporulação, variando entre 15 a 30°C.

ALVES et alii (1983) determinaram os efeitos da luz e temperatura no desenvolvimento e esporulação do isolado SPL-3F de *M. anisopliae* e concluíram que a temperatura de 28°C e fotoperíodo de 16 horas de luz foram as mais favoráveis.

Segundo ALVES (1980), o efeito das radiações sobre os patógenos pode ser estimulante, não afetar ou ser prejudicial, dependendo do tipo de microorganismo, da fase de desenvolvimento e da quantidade de radiação empregada.

TINLINE e NOVIELLO (1971) realizaram a irradiação do fungo *M. anisopliae* com luz ultravioleta, visando a produção de mutantes.

Posteriormente, SANTOS (1978) estudou a influência de diversos fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *M. anisopliae* e observou que as radiações gama e ultravioleta podem ser utilizadas como agentes mutagênicos, empregando-se 32 krad de radiação gama e um tempo de

exposição igual a 2 minutos e 40 segundos de radiação ultravioleta, sendo que a sobrevivência dos conídios para as doses empregadas variou de 1 a 5%.

OKINO et alii (1978) estudaram a sobrevivência de *M. anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama e ultravioleta e determinaram que os raios gama são mais efetivos em causar letalidade no fungo *M. anisopliae*, pois doses maiores que 20 krad causaram mortalidade de conídios superior a 90%. Com relação a luz ultravioleta esta mostrou-se apropriada para estudos genéticos e de melhoramento, utilizando-se de 0,5 a 8 minutos de exposição a esta radiação.

ZIMMERMANN (1982 a) estudou em condições de laboratório, o efeito da luz solar na viabilidade de conídios de *M. anisopliae*, expondo o fungo a uma luz solar artificial.

Através dos resultados, determinou-se que foram necessários 1 hora e 40 minutos de irradiação para inviabilizar 50% dos conídios, incubando-os após a irradiação a 25°C e no escuro, por um período de 24 horas. Quando se utilizou um período de 48 horas, nas mesmas condições anteriores, o tempo de irradiação para inviabilizar 50% dos conídios foi de 2 horas e 45 minutos.

Com respeito a outros fatores, ALVES (1978) estudou o efeito tóxico de defensivos "in vitro" sobre patógenos de insetos e observou que os microorganismos se comportaram diferentemente em relação aos inseticidas. Para o fungo *M. anisopliae*, com excessão do Parathion ethyl a 10.000 ppm,

todos os demais defensivos apresentaram ação fungistática so
bre os conídios.

MATTA e OLIVEIRA (1978 b) verificaram a compati
bilidade do fungo M. anisopliae com o inseticida Malatol 50E,
visando diminuir o custo operacional e também utilizar esta
associação dos produtos principalmente nas áreas de focos de
cigarrinhas das pastagens, evitando a disseminação da praga
e estabelecendo a dispersão do fungo. Os autores concluíram
que não houve perda de viabilidade e patogenicidade dos coní
dios, utilizando-se baixas concentrações dos produtos.

HADDAD e MESSIAS (1979) determinaram a influên
cia de espalhantes adesivos e inseticidas na germinação e de
envolvimento de M. anisopliae, e entre os produtos testados
o Novapal e Sandovit foram os que apresentaram melhores resul
tados, sendo os mais compatíveis com o fungo.

CORREIA et alii (1979) estudaram os efeitos de
M. anisopliae associado ao Malathion para o controle das ci
garrinhas das pastagens e concluíram que a interação torna-se
benéfica e eficiente quando se utiliza o inseticida em subdo
sagens.

Com relação a compatibilidade do fungo a herbi
cidas, ALVES et alii (1980 b) avaliaram o efeito de diversos
produtos utilizados em cana-de-açúcar e pastagens sobre o fun
go M. anisopliae e concluíram que apenas o herbicida Picloram
+ 2,4 D permitiu o desenvolvimento do fungo, porém reduziu a
sua esporulação.

CARNEIRO et alii (1980) também avaliaram o efeito de herbicidas e inseticidas sobre *M. anisopliae*, e determinaram que o crescimento do fungo foi menos afetado por Ambush, Furadan e Gesatop, enquanto que Ronstar e Carbaril inibiram a esporulação e o DMA-6 não permitiu o crescimento das colônias.

3.3. Caracterização de isolados de *Metarhizium anisopliae*

Na maioria dos casos a classificação de fungos entomopatogênico é baseada em critérios morfológicos.

FERRON (1978) salientou em seu trabalho a necessidade de estabelecer novas técnicas para a caracterização e seleção de "strains" de fungos patogênicos a insetos.

MESSIAS et alii (1978) estudaram também alguns aspectos biológicos de 11 isolados de *M. anisopliae* visando o controle biológico das cigarrinhas das pastagens, agrupando-os em 5 padrões eletroforéticos e através da radiação ultravioleta como agente mutagênico, obtiveram mutantes para produção de vitaminas e aminoácidos.

Posteriormente, MESSIAS e AZEVEDO (1981) realizaram a caracterização e separação de linhagens haplóides e diplóides de *M. anisopliae*, citando este tipo de informação de extrema importância para estudos de biologia, genética e utilização do mesmo no controle biológico de insetos. Estes autores estudaram 20 isolados, sendo 17 haplóides e 3 diplóides, provenientes de reprodução parasexual. A caracterização

foi avaliada pelo tamanho dos conídios, produção de amilases, sistema de eletroforese, produção de quitinase, lipases, proteases, produção de conídios, resistência a ultravioleta e outros inibidores de crescimento em diferentes meios de cultura. Esta caracterização permitiu comprovar a alta variabilidade que ocorre dentro da espécie e conseqüentemente a grande potencialidade existente para o melhoramento genético de *M. anisopliae*.

ALVES (1982) realizou a caracterização, padronização e produção de 9 isolados de *M. anisopliae* provenientes de diferentes regiões do Brasil, através das características morfológicas das colônias, produção, viabilidade e tamanho dos conídios e bioensaios com *G. mellonella* e *D. saccharalis*, elaborando um perfil para cada isolado, baseando-se no padrão eletroforético e nas características biológicas estudadas. O isolado SPL-3F foi adotado como padrão para os testes de patogenicidade e agressividade, correspondendo a 1.000 unidades padrão de potência (UP) em *G. mellonella*, equivalentes a 54% de mortalidade em cigarrinha *D. flavopicta*.

SOZA GÓMEZ (1983) também realizou estudos de caracterização e padronização de 11 isolados de *M. anisopliae*, procurando selecionar os mais produtivos e patogênicos, visando a sua utilização no controle microbiano de insetos. A caracterização fundamentou-se em produção, tamanho dos conídios, aspectos morfológicos, crescimento das colônias, produção em meio de arroz e resistência à luz ultravioleta (2.537 Å). Os

insetos utilizados nos bioensaios foram *D. saccharalis*, *G. mellonella* e *Tenebrio molitor* Linn., concluindo que a linhagem SPL-52T apresentou menor suscetibilidade à radiação ultravioleta, maior produção de conídios em BDA e arroz e alta virulência para os 3 insetos testados.

3.4. Aplicação do *Metarhizium anisopliae* em condições de campo

De uma maneira geral, tem-se dado ênfase aos estudos de dosagens, determinação de raças e épocas de aplicação, porém pouco tem sido realizado sobre métodos para avaliar a aplicação de fungos.

Assim, SMITH e BOUSE (1981) apresentaram em seu trabalho, muitas considerações sobre a aplicação de patógenos, especificamente para bactérias e vírus e salientaram que, apesar dos programas de controle microbiano de insetos terem apresentado um avanço nos últimos anos, provavelmente menos que 1% das pesquisas são relacionadas com a tecnologia de aplicação.

Entretanto, este aspecto deve ser abordado com maior importância, uma vez que, tratando-se de um controlador biológico, o conhecimento de sua distribuição e deposição são parâmetros importantes para aprimorar sua eficiência.

Quanto a aplicação em campo, WALSTAD et alii (1970) pesquisaram a persistência do fungo *M. anisopliae* so

bre vários substratos naturais e concluíram que os conídios não germinaram em solo natural e humus, embora permanecessem viáveis por uma semana. Apesar dos conídios perderem sua viabilidade em condições de campo, no laboratório permaneceram viáveis por um período de quatro meses. Porém, segundo FERON (1978) os conídios de *M. anisopliae* expostos em solos não estéril, pelo período de 7 a 40 dias, germinaram quando transferidos para um meio estéril em condições de laboratório.

OLIVEIRA (1979) estudou a sobrevivência de *M. anisopliae* em 5 amostras de solo, utilizando-se 3 diferentes forrageiras e determinou que os efeitos da rizosfera sobre a população de *M. anisopliae* e outros microorganismos foram mais negativos em solos cujas plantas apresentaram-se em período de floração.

Posteriormente, CORRÊA (1982) estudou o efeito da luz ultravioleta na germinação de conídios de *M. anisopliae* em dois tipos de solos diferentes, e concluiu que em solos arenosos a sobrevivência dos conídios do fungo é maior do que em solos argilosos.

Segundo ROBERTS e CAMPBELL (1977) em condições de ambiente apropriado tais como: alta umidade (90 a 100%), temperatura moderada (24 a 30°C), ausência de luz ultravioleta, o solo pode ser um excelente habitat para o *M. anisopliae*. Neste mesmo trabalho, os autores trabalharam com conídios do fungo em suspensões, expostos sob luz solar direta e luz solar filtrada através de vidro, e indicaram que o elemento

responsável pela mortalidade dos conídios foi absorvido pelo vidro, sendo provavelmente a luz ultravioleta.

ALVES (1980) cita em seu trabalho a luz solar como a responsável pela instabilidade dos fungos em condições de campo, sendo a luz ultravioleta o principal componente atuante.

VILLACORTA e PIZZAMIGLIO (1981) trabalharam com o isolado CM-14 para *D. flavopicta*, sob diferentes concentrações de conídios e uma viabilidade média de 85%, e concluíram que a DL-50 estimada foi de 10^7 conídios/ml. Com estes dados foi possível estimar que para aplicações a alto volume, são necessários aproximadamente 4 a 5 kg de conídios por hectare.

NAVES (1981 a) trabalhando com o isolado E-9 de *M. anisopliae* sobre cigarrinhas das espécies *D. flavipicta* e *Z. entreciana* verificou uma alta mortalidade destes insetos nas áreas tratadas com o fungo.

BARBOSA et alii (1977) estudaram a flutuação populacional da cigarrinha da cana, *M. posticata*, e determinaram que o controle médio anual por *M. anisopliae* foi cerca de 31,30% em adultos e 7,70% em ninfas.

ALVES et alii (1982) avaliaram a capacidade de dispersão do *M. anisopliae* durante a fase de epizootia do fungo em cigarrinhas da folha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata*, no estado de Alagoas, e concluíram que durante esta fase foram produzidos 4,9 kg de massa de conídios por hectare em função das formas biológicas coletadas.

4. METODOLOGIA

4.1. Material

4.1.1. Isolados do fungo *Metarhizium anisopliae*

Os isolados do fungo foram obtidos no laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

A denominação dos isolados de *M. anisopliae* foi proposta por ALVES (1982), e suas procedências, hospedeiros e datas de coleta são apresentadas na TABELA 1.

Os isolados foram purificados em 3 repicagens sucessivas e produzidos sobre meio de cultura a 26°C e período de 16 horas, cuja descrição das colônias encontra-se

Tabela 1: Denominação dos isolados de *Metarhizium anisopliae*, procedências, hospedeiro original e datas de coleta.

Denominação	Procedência	Hospedeiro original	Data de coleta
SPL-3F	Estância Umbu Indaiatuba-SP	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)	15.03.81
PL-2	Sumauma Maceió-AL	<i>Mahanarva fimbriolata*</i> (Stal)	20.05.80
PL-5	Santa Tereza Goiania-PE	<i>Mahanarva fimbriolata*</i> (Stal)	16.04.81
PL-7	Usina Pumati Joaquim Nabuco-PE	<i>Mahanarva posticata</i> (Stal)	07.05.81
PL-17	Fazenda Santa Cruz Campos-RJ	<i>Mahanarva posticata</i> (Stal)	22.05.81
PL-28	Fazenda Santa Cruz Campos-RJ	<i>Mahanarva posticata</i> (Stal)	25.06.81

(*) Fungo obtido em tubos de cultura.

tra-se na Tabela 2.

4.1.2. Meio de cultura

O meio de cultura empregado foi o BDA mais antibiótico, utilizando-se 200 g de batata, 15 g de dextrose e 0,5 g de Acromicina por litro.

4.1.3. Inseto utilizado

Utilizaram-se ovos e larvas de *D. saccharalis*, obtidas no laboratório de Controle Biológico do IAA/PLANALSU CAR, Araras-SP.

As larvas utilizadas foram sempre de último instar ou também chamadas de pré-pupas.

4.1.4. Equipamentos

- Irradiador Gama (fonte de Cobalto - 60), modelo GAMMABEAM 650, com atividade de 10.149 Ci em abril de 1982.

- Estufa incubadora para BOD modelo 095E, marca FANEM, com regulagem de temperatura e fotoperíodo.

- Câmara asséptica de fluxo vertical, marca VECO, modelo VLFS-09, que proporciona condições de assepsia na transferência dos meios de cultura, isolamentos e inoculação dos conídios.

Tabela 2: Descrição das colônias dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* utilizados, que se desenvolveram a 26°C e fotoperíodo de 16 horas.

Isolados	Características morfológicas das colônias
SPL-3F	rasa com esporulação normal
PL-2	rasa com centro pouco elevado, esporulação normal
PL-5	rasa com centro pouco elevado, esporulação normal
PL-7	pulvinada, com esporulação regular
PL-17	rasa com centro pouco elevado, esporulação normal
PL-28	pulvinada, com esporulação normal

- Câmara de Neubauer e microscópio utilizados na contagem do número de conídios nas suspensões de água com espalhante adesivo.

- Microscópio estereoscópico, marca WILD, para contagem dos ovos de *D. saccharalis*.

- Balança METTLER, modelo H-10, utilizada na pesagem de conídios do fungo.

- Câmara de Irradiação ultravioleta que, consiste de uma caixa de papelão com as dimensões de 37 cm de largura, 45 cm de comprimento e 35 cm de altura, equipada com lâmpada germicida G15-T8, com emissão de radiação de 2.537 Å de comprimento de onda. A distância do bulbo da lâmpada às placas irradiadas é de 30 cm, conforme Figura 1.

- Outros materiais: peneiras Tyler USS com malhas de 0,210 mm e 0,297 mm, placas de Petri, alça de platina, alça de Drigallsky, balões volumétricos, pipetas, erlenmeyer, pinças, becker, pipeta automática de duplo estágio modelo Pipemat de 10 microlitros, papel sulfite, algodão, álcool, água destilada, Agral, tubos de cultura, instrumental para eletroforese α -esterase, papel filtro e pulverizador costal JACTO, bico D2.

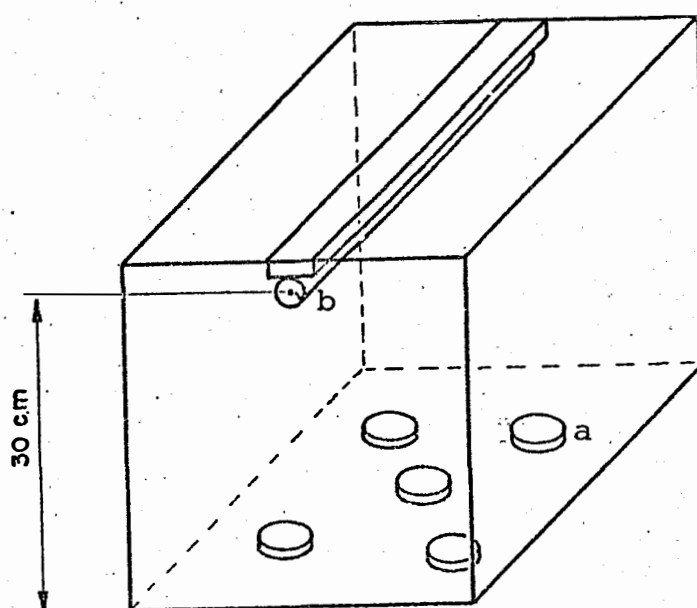


Figura 1: Câmara de irradiação, equipada com lâmpada ultravioleta (2.537 Å). a) placas de Petri com meio BDA, onde foram inoculados conídios de *Metarhizium anisopliae*. b) bulbo da lâmpada.

4.2. Métodos

4.2.1. Zimogramas para α -esterase dos isolados de *Metarhizium anisopliae*

Os zimogramas foram obtidos com a colaboração do Dr. Raul Machado Neto, do Departamento de Zoologia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

Foram utilizados 80 mg de conídios, provenientes de culturas puras, macerados em 2 ml de água deionizada, mantendo-os a uma temperatura próxima de 0°C. A amostra foi centrifugada a 2.000 rpm, durante 3 minutos. Com o sobrenadante foi preparada uma solução de sacarose a 10% e 100 microlitros desta solução foram transferidos para o tubo contendo gel de poliacrilamida (7,5%), sob uma voltagem de 1,5 mV/tubo.

A revelação de iso-enzimas de α -esterase foi realizada em solução de α -naftil acetato e "fast blue", em tampão fosfato ph 6,0 e lavadas posteriormente com solução de etanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 5:1:5, respectivamente, sendo então, esquematizadas as bandas eletroforéticas.

4.2.2. Determinação do efeito da radiação gama sobre os diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Os isolados de *M. anisopliae* utilizados no ensaio para determinar a atuação da radiação gama (emissor Co-60) na viabilidade dos conídios foram: SPL-3F, PL-2, PL-5, PL-7, PL-17 e PL-28.

Após a purificação dos diferentes isolados, os conídios foram transferidos para placas com BDA, em uma quantidade equivalente a 2 alças de platina/placa, acrescentando 10 microlitros de uma solução de água esterilizada e Agral à 1%.

O fungo foi distribuído na placa através de uma alça de Drigallski, sendo preparadas 2 placas para cada isolado e para cada dose de radiação.

A irradiação foi realizada no Setor de Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba-SP.

Os tratamentos equivalentes às doses de radiação gama testadas foram: 25 krad, 50 krad, 100 krad, 200 krad, 400 krad e 800 krad, colocando-se as placas a uma distância de 24 cm das fontes no eixo central à uma taxa de dose de 310,5 krad/hora e testemunha.

Após a irradiação, as placas foram colocadas em uma sala com temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas.

Cada placa foi dividida em 3 setores para contagem dos conídios germinados e não germinados, constituindo assim, 6 repetições (6 setores) para cada dose tratada.

A contagem dos conídios foi realizada 24 horas

após a irradiação com auxílio de um microscópio, contando-se separadamente os conídios germinados e não germinados, até que o número de um deles atingisse 200, encerrando-se assim, a contagem da repetição.

Posteriormente, foi calculada a porcentagem de viabilidade dos conídios para análise de variância e confronto das médias pelo teste Tukey.

Os dados de porcentagem de viabilidade dos conídios foram correlacionados com as respectivas doses de radiação gama, para determinar a dose equivalente que causou mortalidade em 50% dos conídios dos isolados de *M. anisopliae* (DE-50).

Através dos valores médios de porcentagem de viabilidade, transformados em $\text{Arc Sen } \sqrt{\%/100}$, dos isolados e utilizando-se como padrão • isolado SPL-3F, determinou-se a razão de viabilidade dos isolados, empregando-se a fórmula:

$$\text{Razão de viabilidade} = \frac{\text{viabilidade do isolado em teste}}{\text{viabilidade do isolado padrão SPL-3F}} \times 1.000$$

4.2.3. Determinação do efeito da radiação ultravioleta sobre os diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Os isolados de *M. anisopliae* utilizados no en

saio para determinar a atuação da radiação ultravioleta na viabilidade dos conídios foram: SPL-3F, PL-2, PL-5, PL-7, PL-17 e PL-28.

A metodologia de inoculação dos conídios dos isolados foi idêntica ao ensaio anterior, com 5 placas ou repetições para cada tratamento.

A irradiação foi realizada no Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

Os tempos de exposição dos conídios a radiação foram de: 0, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75 e 90 segundos, utilizando-se uma câmara de irradiação conforme a Figura 1. Após a irradiação, as placas foram mantidas a uma temperatura de 28°C e fotoperíodo de 12 horas.

A contagem dos conídios foi realizada utilizando-se a mesma metodologia empregada para a radiação gama.

Calculou-se a posteriormente, a porcentagem de viabilidade dos conídios para análise de variância e confronto das médias pelo teste Tukey.

Os dados de porcentagem de viabilidade dos conídios foram correlacionados com os respectivos tempos de irradiação ultravioleta, para determinar a DE-50 dos isolados.

A razão de viabilidade dos isolados para a radiação ultravioleta foi determinada utilizando-se a mesma metodologia empregada para a radiação gama.

4.2.4. Efeito "in vitro" do *Metarhizium anisopliae* sobre ovos da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*

O bioensaio desenvolveu-se no laboratório de Controle Biológico do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP.

As posturas de *D. saccharalis* com um dia de idade, obtidas em papel sulfite, foram recortadas individualmente com 1 cm² de área e após a contagem dos ovos, foram acondicionadas em caixas plásticas forradas com papel filtro e algodão umedecidos com água destilada.

Para separação dos conídios do isolado SPL-3F, foi utilizada uma peneira Tyler-USS com malha de 0,210 mm. Posteriormente, para o preparo da suspensão, colocou-se um peso conhecido de conídios em um balão volumétrico de 50 ml, completando-se o volume com água destilada e espalhante Agral na proporção de 2 gotas por litro.

Neste bioensaio foram desenvolvidos 3 experimentos. No experimento 1, a inoculação foi feita por imersão e nos experimentos 2 e 3 por gota, colocadas sobre a postura.

As testemunhas foram tratadas com água destilada, mais espalhante Agral, na mesma proporção indicada no preparo das suspensões.

Nos experimentos 1 e 2 partiu-se de duas suspensões de conídios, de concentrações aproximadas de 6×10^7 coní

dióios/ml e 2×10^6 conídios/ml. A primeira dosagem foi empregada nos tratamentos T-1 (imersão) e T-3 (gota) e a segunda, nos tratamentos T-2 (imersão) e T-4 (gota).

No experimento 3 empregou-se a dosagem $5,2 \times 10^6$ conídios/ml no tratamento T-5 e a dosagem $2,5 \times 10^5$ conídios/ml no tratamento T-6. Objetivando o emprego de uma medida mais prática, estas dosagens foram transformadas em número de conídios por postura e os respectivos tratamentos, com suas concentrações correspondentes acham-se na Tabela 3.

Foram utilizados dois tipos de posturas: tratadas segundo metodologia utilizada pelo IAA/PLANALSUCAR (conforme DEGASPARI et alii, 1981) e não tratadas, para verificar a ação dos anticontaminantes na germinação dos conídios de *M. anisopliae*.

O número de posturas variou para cada experimento, sendo 15 (uma por caixa) para o experimento 1; 20 (quatro por caixa) para o experimento 2 e 25 (uma por caixa) para o experimento 3.

No terceiro experimento, após a determinação de ovos viáveis, 97 larvas vivas foram coletadas e colocadas em tubos com dieta de HENSLEY e HAMMOND (1968), modificada pelo IAA/PLANALSUCAR, conforme DEGASPARI et alii (1981), para acompanhamento do desenvolvimento larval. O mesmo procedimento se teve com a testemunha.

A quantidade média de conídios para cada tratamento foi determinada pela contagem de 10 campos, com 3 repe

Tabela 3: Distribuição dos diversos tratamentos de inoculação do *Metarhizium anisopliae* em ovos de *Diatraea saccharalis*, nos respectivos experimentos.

Variáveis	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3					
Posturas	tratadas ^a	não tratadas	tratadas ^a	não tratadas	não tratadas	não tratadas				
Tratamentos	T-1	T-2	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6		
Conídios/ postura	$2,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$
Tipo de inoculação	imersão	imersão	imersão	gotas	gotas	gotas	gotas	gotas	gotas	
Número	15	15	15	20	20	20	20	25	25	

a = lavagem dos ovos, respectivamente pela ordem em: formol (0,2%), água destilada e sulfato cúprico (1,0%), por dois minutos em cada solução.

tições, em lâmina de Neubauer.

Após a inoculação, as posturas foram mantidas em câmara FANEM, modelo 095E, com temperatura média de 27°C e fotoperíodo de 12 horas.

Sete dias após, foi feita a contagem dos ovos viáveis, através das lagartas presentes na caixa.

A porcentagem de viabilidade de ovos foi corrigida pela fórmula de Schneider e Orelli, citada em NAKANO et alii (1981), modificada onde:

$$\begin{array}{l} \text{\% viabilidade} \\ \text{de ovos} \end{array} = 100 - \frac{\begin{array}{l} \text{\% viabilidade} \\ \text{de ovos da} \\ \text{testemunha} \end{array} - \begin{array}{l} \text{\% viabilidade} \\ \text{de ovos do} \\ \text{tratamento} \end{array}}{\begin{array}{l} \text{\% viabilidade de ovos} \\ \text{da testemunha} \end{array}} \times 100$$

4.2.5. Determinação da patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* sobre ovos de *Diatraea saccharalis* de diferentes idades

O bioensaio desenvolveu-se no laboratório de Controle Biológico do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP.

O fungo entomopatôgeno, isolado SPL-3F, utilizado foi obtido em dois laboratórios. O primeiro, identificado no experimento como produto técnico, proveio da Seção de Patolo

gia de Insetos da ESALQ/USP e o segundo, identificado como produto formulado cujo nome comercial é Biomax 20%, originou-se do laboratório LABORMAX.

Foram recortados papéis contendo 30 posturas da broca da cana, não tratadas, com 1 cm² de área, e após a contagem dos ovos, os papéis foram colocados individualmente em caixas plásticas forradas com papel filtro e algodão umedecidos com água destilada.

Esta atividade foi repetida durante 4 dias consecutivos, totalizando 120 posturas, com idade variando de 1 a 4 dias (4 lotes de 30 posturas). Ovos de cada idade foram subdivididos em 3 lotes com 10 posturas cada e catalogadas como: Testemunha, T-1 (produto técnico) e T-2 (produto formulado).

Os ovos foram mantidos em câmara climatizada FANEM, modelo 095E, com temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 horas.

O produto técnico foi uniformizado em peneira Tyler USS, com malha de 0,210 mm, sendo posteriormente pesados 10 mg de conídios para o tratamento T-1. Para o tratamento T-2 (produto formulado) foram pesados 50 mg de produto comercial, sendo transferidos para um balão volumétrico e o volume de 50 ml completado com água destilada, mais espalhante Agral, na proporção de 2 gotas/litro.

As suspensões foram agitadas por 15 minutos, com a finalidade de individualizar os conídios de *M. anisopliae* e

promover uma melhor homogeneização do meio.

Em seguida, procedeu-se a inoculação de todas as posturas, colocando-se uma gota de aproximadamente 50 microlitros da suspensão para os respectivos tratamentos. A testemunha foi tratada com a solução de água destilada mais espalhante Agral, utilizada no preparo das suspensões dos tratamentos T-1 e T-2.

A quantidade média de conídios para cada tratamento foi determinada através da contagem de 10 campos com 3 repetições em lâmina de Neubauer, sendo de $1,25 \times 10^7$ e $1,08 \times 10^7$ conídios/ml para T-1 e T-2, respectivamente.

As observações das larvas eclodidas para determinação da porcentagem de viabilidade dos ovos foram feitas 8 dias após a obtenção das posturas.

Os resultados de viabilidade dos ovos para cada tratamento e para as posturas dos diversos dias foram corrigidos pela fórmula de Schneider e Orelli modificada, utilizada no bioensaio anterior.

4.2.6. Efeito "in vitro" de diferentes dosagens do *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Diatraea saccharalis*

O bioensaio desenvolveu-se no laboratório de Controle Biológico do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP.

As larvas da broca da cana, *D. saccharalis*, fo

ram retiradas da dieta e selecionadas pela cor (branco leitosa) e pouca mobilidade, para se ter uma população mais homogênea possível de larvas de último ínstar ou pré-pupas.

Em seguida, foram colocadas individualmente em caixas plásticas e encaminhadas para inoculação.

Os conídios do isolado SPL-3F foram separados em peneira Tyler-USS, com malha de 0,297 mm, sendo então pesados e transferidos para um balão volumétrico, cujo volume de 25 ml foi completado com uma solução de água destilada mais espalhante Agral. Através desta suspensão padronizada de conídios, foram feitas 4 diluições sucessivas, reduzindo de 10 vezes a quantidade de conídios por diluição.

O experimento constou de 6 tratamentos, sendo que em 5 deles foram "inoculadas" 100 larvas, através de uma gota da suspensão, proporcionando o rolamento e contato destas com os conídios do fungo. Na testemunha, as larvas receberam uma gota de solução de água destilada mais espalhante.

A quantidade média de conídios, determinada pela contagem de 4 campos, com 3 repetições em lâmina de Neubauer foi de: $0,87 \times 10^6$, $0,86 \times 10^5$ e $1,12 \times 10^4$ conídios/gota para os tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. Para os tratamentos 4 e 5, a quantidade de conídios foi superior a esperada, talvez por falhas na diluição.

As brocas permaneceram isoladas em caixas plásticas, onde se colocou apenas algodão umedecido em água destilada para favorecer o desenvolvimento do *M. anisopliae*.

Em seguida, foram transferidas para uma câmara climatizada FANEM, modelo 095E, com temperatura controlada de 27°C e fotoperíodo de 12 horas.

Observou-se diariamente, o desenvolvimento das larvas e pupas, acompanhando suas mortalidades e presença do fungo ou a emergência dos adultos.

Através destas observações, foram determinadas as mortalidades acumuladas, sendo posteriormente, corrigidas pela fórmula de Schneider e Orelli modificada, utilizada no bioensaio anterior. Com os valores obtidos, foi feita a regressão linear da mortalidade acumulada corrigida em função dos dias subsequentes à inoculação do fungo. Foram também determinadas as equações de retas pelo método de BLISS (1935) e com estas, a LD-50 para os 6º e 9º dias após a inoculação.

4.2.7. Método para avaliar a aplicação de *Metarhizium anisopliae*

Os experimentos desenvolveram-se na Estação Experimental Central-Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP.

O fungo utilizado foi o *M. anisopliae*, isolado SPL-3F, a 20% (formulação comercial).

O trabalho constou de 2 ensaios, no primeiro efetuou-se uma aplicação direcionada da suspensão de conídios sobre posturas da broca da cana e no segundo, na aplicação da suspensão, procurou-se retratar a situação de campo.

No primeiro experimento, utilizaram-se tiras de papel sulfite (11 x 4 cm) com uma das extremidades coladas sobre caixas plásticas com 5 cm de diâmetro (suporte) e dobradas na parte superior livre, onde foram fixadas as posturas de *D. saccharalis*, com um dia de idade e número conhecido de ovos, ao que convencionou-se chamar de unidade.

Assim, simulou-se as possíveis posições das posturas que ocorrem no campo sobre as folhas de cana, com as seguintes localizações: horizontal superior (S) e inferior (I) e vertical lateral (L).

Cada unidade foi disposta em 4 situações diferentes, guardando um espaço de 0,50 m entre si, formando um conjunto. As posições das unidades no conjunto em função do sentido da aplicação foram as seguintes: lateral a favor (1), lateral a direita (2), lateral a esquerda (3) e lateral contra (4).

Este conjunto foi repetido por 5 vezes, totalizando 20 unidades para cada dosagem utilizada.

A aplicação foi realizada com um pulverizador costal JACTO, com bico D2 cônico.

As dosagens aplicadas foram: 100 g de conídios/ha (T-1), 200 g de conídios/ha (T-2), 300 g de conídios/ha (T-3) e Testemunha, utilizando-se 90 litros de água por hectare.

Após a aplicação do fungo, as posturas foram individualizadas em caixas plásticas, forradas com papel filtro, umedecidas e mantidas em câmara climatizada a temperatura de

27°C e fotoperíodo de 14 horas.

Sete dias após, foi observada a viabilidade dos ovos para as diversas posições das posturas nos respectivos tratamentos.

O segundo experimento foi realizado em cana soca da variedade NA56-79, com 5 meses de idade. O delineamento experimental foi em blocos com 4 repetições, sendo os seguintes tratamentos por bloco: 100 g de conídios/ha (T-4), 200 g de conídios/ha (T-5), 300 g de conídios/ha (T-6) e Teste munha. Cada parcela constituiu-se numa faixa composta de 2 linhas de cana com 10 metros, espaçadas de 1,40 m entre si, com 4 m de bordadura no sentido da linha.

A aplicação foi realizada sobre as folhas na linha de cana com um pulverizador costal a pressão constante (45 libras/polegada²), com dois bicos D2 cônicos, espaçados de 0,50 m entre si, utilizando-se uma vazão média de 135 litros/ha.

Neste experimento, foram feitas observações de quantidade de conídios do fungo, nas seguintes condições: na suspensão empregada, na deposição por área e por face da folha (ventral e dorsal).

A quantidade de conídios na suspensão para cada tratamento foi estimada coletando-se amostras nos bicos do pulverizador, antes e após a aplicação para cada parcela. Com as amostras homogeneizadas foram feitas contagens do número de conídios em lâmina de Neubauer.

Para a determinação da deposição por área, foram distribuídas nas linhas de cada parcela, a cada 2 metros de distância, na altura do palmito da cana, caixas plásticas de 5 cm de diâmetro (aproximadamente 20 cm^2) contendo BDA.

Foram anotadas as seguintes posições para a superfície de BDA exposta a aplicação, considerando a linha de cana e o sentido do caminhar como pontos de referência (1 a 10): para cima (C), para baixo (B), para a esquerda (E) e para a direita (D), conforme a Figura 2.

A quantidade de conídios depositada nas faces do limbo foliar foi determinada fixando-se ao acaso, papéis sulfite retangulares de 5 cm x 2 cm, nas posições ventral e dorsal da folha conjuntamente, em número de 5 repetições por parcela.

Imediatamente após a aplicação, estes papéis foram retirados e recortados (aproximadamente 1 cm^2) e depositados em frascos contendo 50 ml de água destilada mais espalhante Agral, visando a retirada dos conídios depositados sobre o papel sulfite. Após a homogeneização da suspensão, foram feitas contagens do número de conídios em lâmina de Neubauer.

Para observar a ação do fungo sobre ovos de *D. saccharalis*, posturas da broca da cana com 3 dias de idade, previamente contadas, foram colocadas em papel sulfite de 5 cm x 2 cm e distribuídas nas folhas de cana em número de 10 posturas por parcela, adotando-se a mesma metodologia descrita para a determinação da deposição de esporos no papel sulfi

te.

Após a aplicação do fungo, as caixas plásticas com BDA foram retiradas, tampadas e mantidas em câmara climatizada a 27°C por 20 horas, sendo posteriormente, conservadas em geladeira ($\pm 5^\circ\text{C}$) até a contagem de conídios, que foi feita em 5 campos de $0,25\text{ cm}^2$ por caixa, utilizando-se um microscópio.

Após a aplicação, as posturas foram retiradas e individualizadas em caixas plásticas, umedecidas e mantidas em câmara climatizada a 27°C e posteriormente, verificou-se a viabilidade dos ovos 7 dias após.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Zimogramas para α -esterase dos isolados de *Metarhizium anisopliae*

Os zimogramas para α -esterase dos 5 isolados são apresentados na Figura 3.

Através dos padrões eletrofóricos, os isolados foram reunidos em 2 grupos com zimogramas semelhantes: o primeiro grupo constituído pelos isolados SPL-3F, PL-2, PL-5 e PL-17 e o segundo grupo representado pelos isolados PL-7 e PL-28.

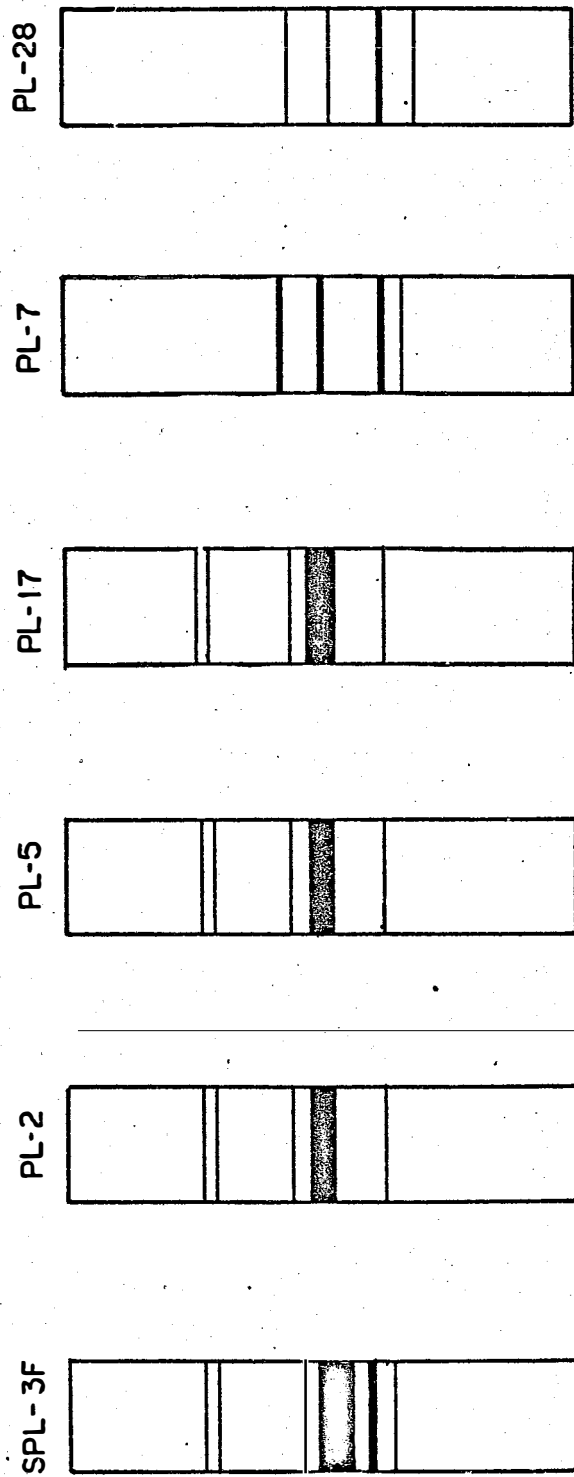


Figura 3: Zimogramas para α -esterase dos diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

5.2. Determinação do efeito da radiação gama sobre diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Os dados de porcentagem de viabilidade de conídios de *M. anisopliae* dos isolados testados, nas diversas doses de radiação gama e os resultados da análise estatística e confronto das médias são apresentados nas Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9, pelas quais, pode-se observar que ocorreu uma diminuição da viabilidade dos conídios a medida que se aumentou a dose de radiação gama.

Os dados de porcentagem de viabilidade dos 5 isolados foram agrupados para cada dose e com os dados transformados foram feitas as análises de variância e confronto das médias, cujos resultados encontram-se na Tabela 10, pelos quais, observa-se uma diferença significativa na germinação dos conídios para as doses utilizadas nos diversos isolados testados.

Os resultados da análise de regressão linear entre a porcentagem de viabilidade e a dose de radiação gama utilizada, assim como os valores da DE-50 de cada isolado são apresentados na Tabela 11, através dos quais, determinou-se que a ordem crescente de resistência à radiação gama foi: PL-17, PL-5, SPL-3F, PL-2, PL-7 e PL-28. Estes dados de sobrevivência de conídios são diferentes dos apresentados por SANTOS (1978) e OKINO et alii (1978), devido talvez, a metodologia de irradiação empregada, pois neste último trabalho os

Tabela 4: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado SPL-3F, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística.

Rep. Doses (Krad)	I	II	III	IV	V	VI	Média	Média transf. Arc Sen $\sqrt{\%/100}$	Tukey
	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00
25	86,96	87,72	88,49	84,39	83,68	85,47	86,12	68,16	b
50	77,82	79,68	76,33	74,63	77,22	75,18	76,81	61,23	c
100	10,31	11,50	10,71	11,11	11,50	12,28	11,23	19,57	d
200	4,76	4,31	5,66	5,66	4,76	5,21	5,06	12,98	e
400	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
800	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			

F tratamentos = 6.511,86** C.V. = 1,99 $s(\bar{m}) = 0,41$ d.m.s.* = 1,70

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 5: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-2, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística.

Rep.	I	II	III	IV	V	VI	Média	Média transf. Arc Sen $\sqrt{\frac{x}{100}}$	Tukey
Doses (Krad)									5%
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00	a
25	93,02	94,79	91,74	90,09	88,49	87,72	90,97	72,68	b
50	74,63	74,35	77,52	79,68	77,82	77,22	76,87	61,25	c
100	8,67	9,50	9,09	11,89	12,66	10,71	10,42	18,79	d
200	2,91	3,38	2,44	2,44	2,91	2,44	2,75	9,53	e
400	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
800	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			

F tratamentos = 2.944,34** C.V. = 3,12% $s(\bar{m}) = 0,64$ d.m.s.* = 2,67

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 6: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-5, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística.

Rep. Doses (Krad)	I	II	III	IV	V	VI	Média	Média transf. Arc Sen $\sqrt{\%/100}$	Tukey 5%
	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00
25	90,01	88,49	87,72	87,72	89,28	86,96	88,36	70,07	b
50	74,63	78,43	78,12	62,69	62,89	63,49	70,04	56,97	c
100	7,41	8,26	6,54	13,04	13,79	12,28	10,22	18,46	d
200	1,96	2,44	0,99	2,44	1,96	2,44	2,04	8,13	e
400	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
800	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			

F tratamentos = 992,43** C.V. = 5,52% $s(\bar{m}) = 1,20$ d.m.s.* = 4,57

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 7: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-7, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística.

Doses (Krad)	Rep.						Média transf.		Tukey
	I	II	III	IV	V	VI	Média	Arc Sen $\sqrt{\%/100}$ 5%	
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00	a
25	94,79	92,59	90,91	90,50	90,09	89,69	91,43	73,07	b
50	71,68	73,80	70,92	80,64	84,74	79,68	76,91	61,42	c
100	35,90	35,06	35,90	36,51	35,27	36,71	35,89	36,80	d
200	6,98	5,66	8,70	8,26	7,83	8,26	7,61	15,98	e
400	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
800	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

F tratamentos = 1.230,63** C.V. = 3,69% s(\bar{m}) = 0,84 d.m.s.* = 3,48

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 8: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-17, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística.

Rep. Doses (Krad)	I	II	III	IV	V	VI	Média	Média transf. Arc Sen $\sqrt{\%/100}$	Tukey 5%
	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00
25	89,69	89,28	86,96	88,10	91,32	88,11	88,91	70,58	b
50	66,44	65,36	63,69	64,31	64,72	66,44	65,16	53,82	c
100	7,83	6,54	7,41	9,09	8,26	6,98	7,68	16,07	d
200	2,44	2,91	1,96	2,44	1,48	1,96	2,20	8,48	e
400	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			
800	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			

F tratamentos = 8.321,72** C.V. = 1,96% $s(\bar{m}) = 0,38$ d.m.s.* = 0,61

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 9: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-28, sob diversas doses de radiação gama e resultados da análise estatística.

Doses (Krad)	Rep.										Média transf.		Tukey 5%
	I	II	III	IV	V	VI	Média	Arc Sen $\sqrt{\frac{\%}{100}}$	Média	Arc Sen $\sqrt{\frac{\%}{100}}$			
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00	90,00	a	
25	97,56	97,09	97,09	91,74	92,59	91,32	94,56	94,56	76,95	76,95	76,95	b	
50	89,28	86,58	90,09	88,89	88,49	89,28	88,77	88,77	70,44	70,44	70,44	c	
100	34,64	33,55	37,30	35,27	34,85	35,69	35,22	35,22	36,39	36,39	36,39	d	
200	16,32	11,89	15,25	10,31	11,50	12,28	12,92	12,92	21,01	21,01	21,01	e	
400	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
800	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

F tratamentos = 1.228,51** C.V. = 3,44% s(\bar{m}) = 0,83 d.m.s.* = 3,44

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 10: Dados médios, transformados em $\text{Arc Sen } \sqrt{\%/100}$, da porcentagem de viabilidade de conídios dos isolados de *Metarhizium anisopliae*, sob diferentes doses de radiação gama e resultados do confronto das médias pelo teste de Tukey a 5%.

Isolados	Doses (Krad)			
	25	50	100	200
SPL-3F	68,16 a	61,23 b	19,57 b	12,98 b
PL-2	72,68 bc	61,25 b	18,79 b	9,53 a
PL-5	70,07 ab	56,97 ab	18,46 ab	8,13 a
PL-7	73,07 bc d	61,42 b	36,80 c	15,98 c
PL-17	70,58 ab	53,82 a	16,07 a	8,48 a
PL-28	76,95 d	70,44 c	36,39 c	21,01 d
F trat.	10,26**	25,50**	246,54**	102,87**
C.V.	3,24	4,47	6,12	9,65
s (\bar{m})	0,95	1,11	0,61	0,50
d.m.s.*	4,10	4,77	2,62	2,15

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 11: Resultados da análise de regressão linear entre a porcentagem média de viabilidade de confídios e a dose de radiação gama para os diversos isolados de *Metahizium anisopliae*.

Parâmetros Isolados	F	Coeficiente de correlaçã r	Coeficiente		DE-50 (krad)
			angular	linear	
			b	a	
SPL-3F	15,06**	-0,913	-0,51	94,28	86,40
PL-2	15,74**	-0,916	-0,53	96,30	86,60
PL-5	16,69**	-0,921	-0,53	93,61	82,85
PL-7	65,32**	-0,978	-0,49	98,80	100,46
PL-17	14,63**	-0,911	-0,52	92,11	80,36
PL-28	31,69**	-0,956	-0,48	102,15	109,10

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

autores determinaram que a irradiação em meio líquido foi mais eficiente em causar a letabilidade em linhagens haplóides de *Aspergillus nidulans*, quando comparada a meio sólido, o que também deve ser válido para a espécie *M. anisopliae*.

Com os dados da Tabela 10, calculou-se a razão de viabilidade dos isolados para cada dose de radiação utilizada, cujos resultados encontram-se na Tabela 12. Estes dados foram plotados em gráfico, conforme a Figura 4, pela qual observa-se que ocorreram semelhanças nas respostas dos isolados com zimogramas afins, e que a sensibilidade dos conídios à radiação gama está diretamente associada ao padrão eletroforético do isolado.

5.3. Determinação do efeito da radiação ultravioleta sobre os diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*

Os dados de porcentagem de viabilidade de conídios de *M. anisopliae* dos diferentes isolados utilizados para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta são apresentados nas Tabelas 13, 14, 15, 16, 17 e 18.

Analogamente aos resultados obtidos no experimento com radiação gama, também ocorreu uma diminuição gradual da viabilidade dos conídios à medida que se aumentou o tempo de exposição à radiação ultravioleta.

Com os dados transformados da porcentagem de viabilidade dos isolados para cada tempo de exposição foram

Tabela 12: Razão de viabilidade dos isolados de *Metarhizium anisopliae* nas diversas doses de radiação gama, utilizando-se como padrão o isolado SPL-3F.

Isolados	Doses (Krad)			
	25	50	100	200
SPL-3F	1.000	1.000	1.000	1.000
PL- 2	1.066	1.000	960	734
PL- 5	1.028	930	943	626
PL- 7	1.072	1.003	1.880	1.231
PL- 17	1.035	879	821	653
PL- 28	1.129	1.150	1.859	1.618

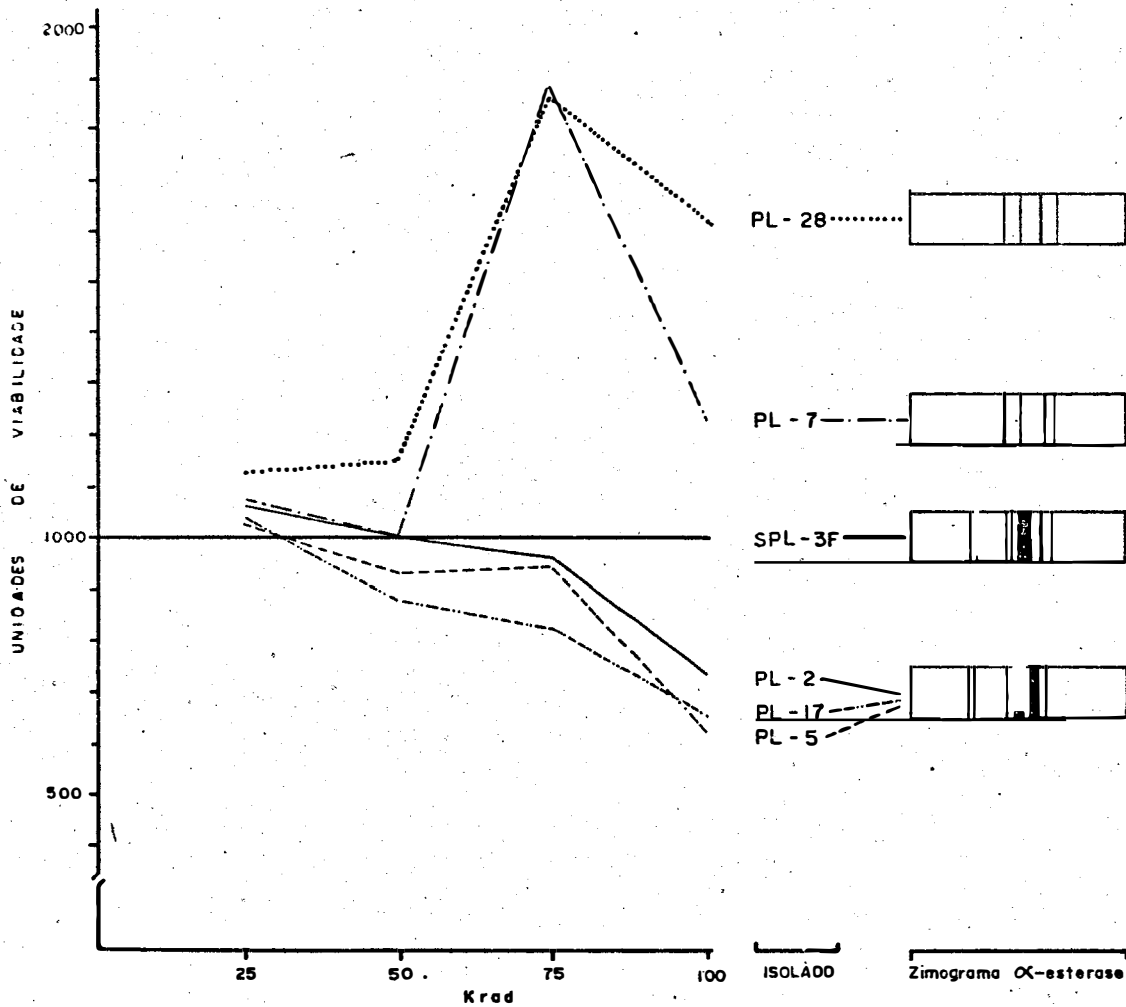


Figura 4: Perfil das razões de viabilidade e zimogramas dos diversos isolados de *Metarhizium anisopliae*, submetidos à radiação gama, tomando-se como padrão o isolado SPL-3F.

Tabela 13: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado SPL-3F, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Rep. Doses (seg)	Média transf. Tukey									
	I	II	III	IV	V	Média	Arc Sen $\sqrt{\frac{s}{100}}$	5%		
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00	h		
20	98,52	98,52	99,01	98,04	99,00	98,62	83,30	g		
30	96,62	97,56	97,09	96,15	96,62	96,81	79,74	g		
35	94,79	92,59	91,74	90,91	93,02	92,61	74,29	f		
40	89,28	90,09	88,10	88,49	89,68	89,13	70,76	f		
45	72,20	68,03	66,66	67,34	68,96	68,64	55,95	e		
50	53,33	37,50	34,64	36,10	35,48	39,41	38,84	d		
55	17,35	14,89	12,66	19,03	15,61	15,91	23,46	c		
60	4,76	3,85	2,44	3,38	4,76	3,84	11,22	b		
65	3,85	2,91	2,44	3,38	3,85	3,29	10,40	b		
75	2,44	1,48	2,91	1,96	1,47	2,05	8,16	ab		
90	0,99	0,50	0,50	0,99	0,50	0,70	4,71	a		

F tratamentos = 1.796,71** C.V. = 3,82% s (\bar{m}) = 0,78 d.m.s.* 3,81

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 14: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-2, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Doses (seg)	Rep.					Média	Média transf. Arc Sen $\sqrt{\%/100}$	Tukey
	I	II	III	IV	V			
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00	l
20	96,15	96,62	96,15	97,08	96,62	96,52	79,27	k
30	92,16	91,32	91,32	90,50	89,68	90,99	72,55	j
35	87,34	86,21	85,47	86,58	86,96	86,51	68,43	i
40	78,12	79,68	79,68	77,82	77,52	78,56	62,43	h
45	67,34	66,00	64,52	63,90	64,93	65,34	53,93	g
50	62,30	65,14	59,88	59,70	59,35	61,27	51,52	f
55	28,82	28,06	24,81	27,80	25,37	26,97	31,28	e
60	13,79	12,66	11,50	12,28	11,11	12,27	20,49	d
65	6,98	6,10	6,54	7,41	6,54	6,71	15,01	c
75	3,38	2,44	4,31	1,96	2,44	2,91	9,72	b
90	1,48	1,00	1,96	1,00	1,00	1,29	6,45	a

F tratamentos = 4.618,42** C.V. = 2,05% $s(\bar{m}) = 0,43$ d.m.s.* 2,08

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 15: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-5, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Doses (seg)	Rep.					Média transf.		Tukey
	I	II	III	IV	V	Média	Arc Sen $\sqrt{\%/100}$ 5%	
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00	k
20	95,69	96,61	95,69	95,24	96,15	95,88	78,30	j
30	91,32	92,16	90,09	90,50	89,28	90,67	72,24	i
35	85,11	84,39	85,11	84,39	83,68	84,54	66,85	h
40	78,43	78,12	76,92	77,52	76,63	77,52	61,70	g
45	69,20	68,26	66,44	66,66	66,89	67,49	55,24	f
50	62,50	61,35	61,16	60,42	60,61	61,21	51,48	e
55	19,68	20,95	20,00	23,66	22,48	21,35	27,51	d
60	11,11	13,42	15,25	12,66	13,04	13,10	21,19	c
65	6,54	7,83	5,66	4,31	5,66	6,00	14,11	b
75	3,38	4,76	2,91	2,44	3,38	3,37	10,52	a
90	1,96	2,91	2,44	1,96	1,96	2,25	8,59	a

F tratamentos = 4.538,55** C.V. = 2,05 s(m) = 0,43 d.m.s.* = 2,07

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 16: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-7, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Rep. Doses (seg)	I	II	III	IV	V	Média	Média transf. Arc Sen $\sqrt{\%/100}$	Tukey
	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00
20	95,24	93,46	92,59	95,69	94,79	94,35	76,32	j
30	90,50	92,16	91,32	91,74	90,00	91,14	72,70	i
35	85,47	84,03	82,99	81,97	79,36	82,76	65,50	h
40	77,22	74,63	74,91	75,76	73,26	75,16	60,11	g
45	35,48	32,20	33,77	31,74	31,66	32,97	35,04	f
50	12,28	11,11	11,89	13,42	12,28	12,20	20,43	e
55	9,90	7,83	6,10	7,41	5,66	7,38	15,69	d
60	3,85	4,31	2,91	3,38	4,31	3,75	11,14	c
65	2,91	2,44	3,38	2,91	1,96	2,72	9,45	bc
75	1,48	1,96	2,44	1,96	1,48	1,86	7,81	b
90	0,99	0,50	0,50	1,48	0,50	0,79	4,97	a

F tratamentos = 3.655,71** C.V. = 2,98% $s(\bar{m}) = 0,52$ d.m.s.* = 2,54

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 17: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-17, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Doses (seg)	Rep.					Média transf.		Tukey
	I	II	III	IV	V	Média	Arc Sen $\sqrt{\%/100}$	
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00	e
20	75,47	76,33	76,04	69,93	66,88	72,93	58,70	d
30	40,11	33,77	40,11	37,88	35,89	37,55	40,28	c
35	5,66	5,21	4,76	1,96	3,84	4,29	11,78	b
40	1,47	0,50	0,99	4,30	1,96	1,84	7,35	ab
45	0,99	0,50	0,99	1,47	0,50	0,89	5,30	ab
50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	4,05	a

F tratamentos = 573,59** C.V. = 9,91% s(\bar{m}) = 1,38 d.m.s.* 6,18

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

As doses superiores a 50 segundos de exposição apresentaram % de viabilidade igual a zero

Tabela 18: Porcentagem de viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* isolado PL-28, obtidas para diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados da análise estatística.

Rep. Doses (seg)	I	II	III	IV	V	Média	Média transf. Arc Sen $\sqrt{\%/100}$	Tukey
	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	90,00
20	97,09	96,62	95,69	98,04	97,56	97,00	80,11	g
30	92,16	94,79	89,28	90,50	90,09	91,36	72,91	f
35	66,89	62,69	61,54	67,34	62,30	64,15	53,23	e
40	32,88	36,71	33,77	35,89	30,31	33,91	35,60	d
45	18,70	13,79	9,50	11,50	8,67	12,43	20,46	c
50	5,66	4,31	8,26	5,66	8,67	6,51	14,66	c
55	1,96	3,38	1,48	2,44	1,48	2,15	8,32	b
60	0,99	0,50	0,50	1,48	0,50	0,79	4,97	ab
65	0,50	0,50	0,50	0,99	0,50	0,60	4,38	a

F tratamentos = 1.599,59** C.V. = 4,82 $s(\bar{m}) = 0,83$ d.m.s.* = 3, 93

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

As doses superiores a 65 segundos de exposição apresentaram % de viabilidade

igual a zero.

feitas as análises de variância e confronto das médias, cujos resultados são apresentados na Tabela 19, pelos quais, observa-se uma diferença significativa na germinação dos conídios para os tempos de radiação utilizados.

Os resultados da análise de regressão linear entre a porcentagem de viabilidade dos conídios com os respectivos tempos de exposição à radiação ultravioleta e os valores da DE-50 dos isolados são apresentados na Tabela 20. Pelos valores da DE-50 verificou-se que a ordem crescente de resistência foi: PL-17, PL-28, PL-7, SPL-3F, PL-5 e PL-2.

Os resultados da DE-50 são próximos aos obtidos por SOZA GÓMEZ (1983) utilizando outros isolados, porém são diferentes dos resultados de OKINO et alii (1978) quando irradiaram os conídios em uma solução fisiológica, mascarando desta forma, a interação da radiação sobre os conídios.

Com os dados da Tabela 19 calculou-se a razão de viabilidade para a radiação ultravioleta, cujos resultados são apresentados na Tabela 21. Os dados foram plotados em gráfico, conforme a Figura 5, onde observa-se que ocorreu uma semelhança no perfil da razão de viabilidade dos isolados que apresentaram padrões eletroforéticos afins, ou seja: PL-2 com PL-5 e PL-17 com PL-28.

Com os dados da DE-50 para radiação gama e ultravioleta dos diferentes isolados, foi determinada a relação entre estes dois tipos de radiação, conforme a Tabela 22, encontrando-se em média que o efeito de um segundo de radiação

Tabela 19: Dados médios, transformados em $\text{Arc Sen } \sqrt{\%/100}$, da porcentagem de viabilidade de conídios dos isolados de *Metarhizium anisopliae*, sob diferentes tempos de exposição à radiação ultravioleta e resultados do confronto dos médios dias pelo teste Tukey a 5%.

Isolados	Tempo (seg)										
	20	30	35	40	45	50	55	60	65	75	90
SPL-3P	83,30 d	79,74 c	74,29 d	70,76 d	55,95 d	38,64 d	23,46 c	11,22 b	10,40 b	8,16 a	4,71 a
PL-2	79,27 bc	72,55 b	68,46 c	62,42 c	53,93 d	51,52 e	31,28 e	20,49 c	15,01 c	9,72 ab	6,45 a
PL-5	78,30 bc	72,24 b	66,85 c	61,70 c	55,24 d	51,48 e	25,71 d	21,19 c	14,11 c	10,52 b	8,59 b
PL-7	76,32 b	72,70 b	65,50 c	60,11 c	35,04 c	20,43 c	15,69 b	11,14 b	9,45 b	7,81 a	4,97 a
PL-17	58,70 a	37,78 a	11,78 a	7,35 a	5,30 a	4,05 a	-	-	-	-	-
PL-28	80,11 c	73,02 b	53,23 b	35,60 b	20,46 b	14,66 b	8,32 a	4,97 a	4,38 a	-	-
F trat.	162,99**	574,54**	1.125,07**	1.258,48**	790,56**	423,77**	180,02**	161,52**	84,96**	5,04**	14,58**
C.V.	2,02	2,07	2,71	3,03	4,49	7,21	7,26	8,81	9,63	14,08	16,86
s (\bar{m})	0,69	0,63	0,69	0,67	0,76	0,97	0,69	0,54	0,46	0,57	0,47
d.m.s.*	3,01	2,75	3,00	2,94	3,30	4,25	2,92	2,30	1,94	2,31	1,69

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

Tabela 20: Resultados da análise de regressão linear entre a porcentagem média de viabilidade de conídios e o tempo de exposição à radiação ultravioleta para os diversos isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Parâmetros Isolados	F	Coeficiente de correlação r	Coeficiente angular b	Coeficiente linear a	DE-50 (seg)
SPL-3F	37,29**	-0,888	-1,58	125,49	47,66
PL-2	54,21**	-0,919	-1,48	122,17	48,73
PL-5	51,02**	-0,914	-1,47	121,26	48,41
PL-7	36,78**	-0,887	-1,53	114,21	41,91
PL-17	106,19**	-0,956	-2,29	103,16	23,20
PL-28	52,34**	-0,916	-1,98	120,26	35,52

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Tabela 21: Razão de viabilidade dos isolados de *Metathizium anisopliae* nos diversos tempos de exposição à radiação ultravioleta, utilizando-se como padrão o isolado SPL-3F.

Isolados	Tempo de exposição (seg)											
	20	30	35	40	45	50	55	60	65	75	90	
SPL-3F	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
PL-2	952	910	921	882	964	1.326	1.333	1.826	1.443	1.191	1.369	
PL-5	940	906	900	872	987	1.325	1.096	1.888	1.357	1.289	1.824	
PL-7	833	912	882	849	626	526	669	993	909	957	1.055	
PL-17	705	474	158	104	95	104	-	-	-	-	-	-
PL-28	962	916	716	503	366	377	355	443	421	-	-	-

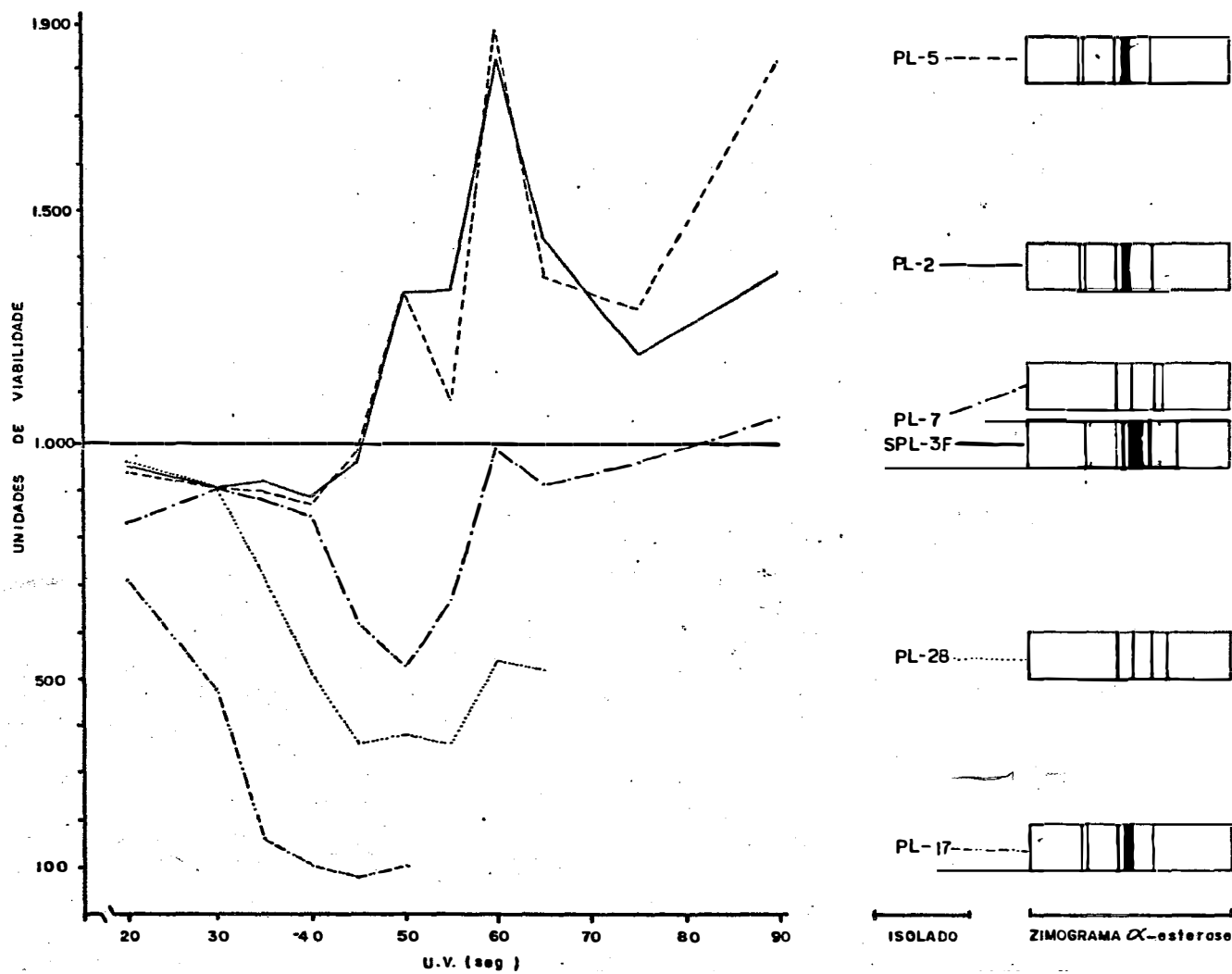


Figura 5: Perfil das razões de viabilidade e zimogramas dos diversos isolados de *Metarhizium anisopliae*, submetidos à radiação ultravioleta, tomando-se como padrão o isolado SPL-3F.

Tabela 22: Dados da DE-50 dos isolados de *Metahizium anisopliae* para radiação gama, ultravioleta e a relação entre ambas.

Isolados	DE-50		RELAÇÃO	
	radiação gama (Krad)	radiação ultravioleta (seg)	radiação gama (Krad)	ultravioleta (seg)
SPL-3F	86,40	47,66	1,813	
PL-2	86,60	48,73	1,982	
PL-5	82,85	48,41	1,711	
PL-7	100,46	41,91	2,397	
PL-17	80,36	23,20	3,463	
PL-28	109,10	35,52	3,071	
Média \pm s (\bar{m})	90,96 \pm 4,61	40,90 \pm 4,11	2,41 \pm 0,29	

ultravioleta equivale ao efeito de 2,41 krad de radiação ga
ma.

5.4. Efeito "in vitro" do *Metarhizium anisopliae* sobre ovos da broca da cana, *Diatraea saccharalis*

Os dados de viabilidade corrigida dos ovos de *D. saccharalis* quando inoculados com *M. anisopliae* são apre-
sentados nas Tabelas 23, 24 e 25.

Na Tabela 23 (experimento 1), pôde-se observar que o fungo *M. anisopliae* inoculado por imersão apresentou um controle eficiente para as posturas não tratadas, enquanto que para as posturas tratadas houve uma certa proteção con-
tra a germinação dos conídios, o que interferiu na coloniza-
ção do fungo. Este fato observado, já era esperado pela efi-
ciência do tratamento químico para assepsia dos ovos, utili-
zado pelo IAA/PLANALSUCAR. Para posturas não tratadas, a
viabilidade corrigida de ovos dos tratamentos 1 e 2 foram de
7,09% e 8,00%, respectivamente, ocorrendo inclusive, a coloni-
zação do fungo em larvas que eclodiram, provocando como con-
sequência, sua morte.

Para o experimento 2, representado na Tabela 24, verificou-se que quando a quantidade de conídios inocula-
dos por gota aumentou na ordem de 10^6 , mesmo os ovos tratados foram colonizados por *M. anisopliae*, apresentando viabilidade baixa em todos os tratamentos.

Tabela 23: Dados de viabilidade de ovos de *Diatraea saccharalis*, nos diversos tratamentos do experimento I, inoculados por imersão com *Metathizium anisopliae*.

Tratamentos	Testemunha				T-1				T-2			
	Ovos		Ovos		Ovos		Ovos		Ovos		Ovos	
	tratados	não tratados	tratados	não tratados	tratados	não tratados	tratados	não tratados	tratados	não tratados	tratados	não tratados
Posturas	total	viáveis	total	viáveis	total	viáveis	total	viáveis	total	viáveis	total	viáveis
1	26	26	31	30	21	12	14	0	18	16	27	0
2	16	16	27	27	19	10	13	0	18	13	17	0
3	18	18	43	43	27	20	16	0	31	31	31	6
4	18	18	17	17	22	21	21	0	32	27	34	5
5	38	38	15	15	18	15	28	5	21	17	28	4
6	25	20	16	16	16	14	12	0	31	19	21	2
7	23	23	25	24	28	27	21	2	28	26	17	0
8	30	30	15	15	21	18	14	0	30	27	20	0
9	20	20	44	17	15	12	16	0	20	18	30	4
10	16	16	25	25	33	23	27	0	20	20	20	0
11	18	18	20	20	20	14	26	12	35	35	21	0
12	29	24	26	26	23	7	17	0	30	23	26	0
13	21	21	17	17	25	22	26	0	20	14	29	4
14	25	20	16	10	26	21	24	0	26	18	24	0
15	20	16	21	21	22	12	22	0	19	9	15	1
Total	338	324	358	323	336	248	297	19	379	313	360	26
Viabilidade	-	95,86	-	90,22	-	73,81	-	6,40	-	82,59	-	7,22
% Viabilidade corrigida (Schneider e Orelli)	-	100,00	-	100,00	-	77,00	-	7,09	-	86,16	-	8,00

T-1 = $2,6 \times 10^5$ confídios/postura T-2 = $1,5 \times 10^5$ confídios/postura

Tabela 24: Viabilidade de ovos de *Diatraea saccharalis*, inoculados por gota com *Metarhizium anisopliae* no experimento 2.

Caixa	Número de posturas	Testemunha				T-3				T-4			
		tratados		não tratados		tratados		não tratados		tratados		não tratados	
		total	viáveis	total	viáveis	total	viáveis	total	viáveis	total	viáveis	total	viáveis
1	4	98	92	98	98	81	3	116	2	82	9	86	3
2	4	93	93	111	110	87	9	83	0	104	0	99	0
3	4	71	69	89	86	90	0	90	1	85	2	91	0
4	4	90	89	103	101	81	0	72	0	94	1	119	2
5	4	73	72	74	69	91	1	67	0	98	4	91	1
Total	20	425	415	475	464	430	13	428	3	463	16	486	6
Viabilidade		-	97,65	-	97,68	-	3,02	-	0,70	-	3,45	-	1,23
* Viabilidade corrigida (Schneider e Orelli)													
		-	100,00	-	100,00	-	3,09	-	0,72	-	3,53	-	1,26

T-3 = $3,1 \times 10^6$ confídios/postura

T-4 = $1,0 \times 10^6$ confídios/postura

Tabela 25: Viabilidade de ovos de *Diatraea saccharalis*, inoculados por gota com *Metarhizium anisopliae* no experimento 3.

Tratamentos Posturas ^a	Testemunha		T-5		T-6	
	Ovos		Ovos		Ovos	
	Total	Viáveis	Total	Viáveis	Total	Viáveis
1	32	32	27	0	21	14
2	29	29	27	0	33	11
3	30	30	31	3	24	6
4	22	22	26	0	30	0
5	33	32	33	0	22	0
6	30	30	24	0	22	5
7	45	36	36	0	24	2
8	26	25	24	0	25	12
9	35	35	21	0	27	0
10	40	39	21	0	26	14
11	22	22	22	0	22	0
12	32	30	37	7	42	7
13	22	17	23	0	44	21
14	27	27	25	0	38	21
15	37	35	19	0	23	7
16	23	23	22	0	25	2
17	22	22	28	0	40	21
18	35	35	36	1	21	9
19	23	23	31	0	27	8
20	35	35	35	0	31	2
21	23	23	29	0	28	3
22	29	29	27	0	21	2
23	44	44	25	2	34	12
24	44	44	40	3	22	15
25	40	40	23	0	23	0
Total	780	759	692	16	705	194
Viabilidade		97,31		2,31		27,52
% Viabilidade corrigida (Schneider e Orelli)		100,00		2,37		28,28

(a) não tratadas

T-5 = $2,6 \times 10^5$ conídios/postura
T-6 = $5,2 \times 10^4$ conídios/postura

No experimento 3, Tabela 25, pôde-se verificar que $2,6 \times 10^5$ conídios/postura, quando inoculados por gota, apresentaram um excelente nível de controle. A concentração de $5,2 \times 10^4$ conídios/postura mostrou-se menos eficiente no controle.

Os resultados de viabilidade larval de brocas provenientes de posturas que receberam cerca de $5,2 \times 10^4$ conídios, estão apresentados na Tabela 26, mostrando que, apenas 20,64% das larvas conseguiram se desenvolver, sendo as demais mortas pela fungo. As viabilidades de ovos para os tratamentos 1 e 2, inoculados por imersão (Tabela 23), embora tenham sido quantidades de conídios próximas à utilizada no tratamento 5 (gota) (Tabela 25), demonstraram uma maior eficiência na inoculação por gota, quando comparada à por imersão, provavelmente pela melhor deposição dos conídios e maior umidade no segundo método.

As viabilidades dos ovos corrigidas pela teste munha em função da quantidade de conídios por postura, estão representadas na Figura 6, que mostra uma curva pela qual pode-se supor que a dosagem da ordem de 10^6 conídios de *M. anisopliae* por postura é a quantidade máxima para que ainda haja um incremento no controle de ovos da *D. saccharalis*.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por ZIMMERMANN (1982 b), que utilizou uma concentração de $1,0 \times 10^8$ conídios/ml de *M. anisopliae* e obteve para ovos de um dia de idade 84% de mortalidade para *Otiorhynchus sulcatus* Fabr. (Coleoptera:Curculionidae).

Tabela 26: Desenvolvimento larval de *Diatraea saccharalis*, provenientes de ovos inoculados com *Metarhizium anisopliae* nos respectivos tratamentos.

Testemunha			T-6		
Posturas ^a	Nº larvas utilizadas	Larvas que se desenvolveram	Posturas ^a	Nº larvas utilizadas	Larvas que se desenvolveram
1	10	10	1	10	0
2	10	8	2	8	4
3	10	10	3	4	3
6	10	10	6	3	1
8	10	10	8	9	0
19	7	5	10	7	2
21	10	10	12	3	0
22	10	10	13	10	1
23	10	10	15	6	0
25	10	9	17	8	0
			18	3	0
			19	8	5
			21	3	1
			23	5	1
			24	10	1
Total	97	92		97	19
Viabilidade		94,84		-	19,58
% Viabilidade Corrigida (Schneider e Orelli)		100,00			20,64

a = Os números das posturas correspondem aos originais dos respectivos tratamentos

T-6 = $5,2 \times 10^4$ conídios/postura

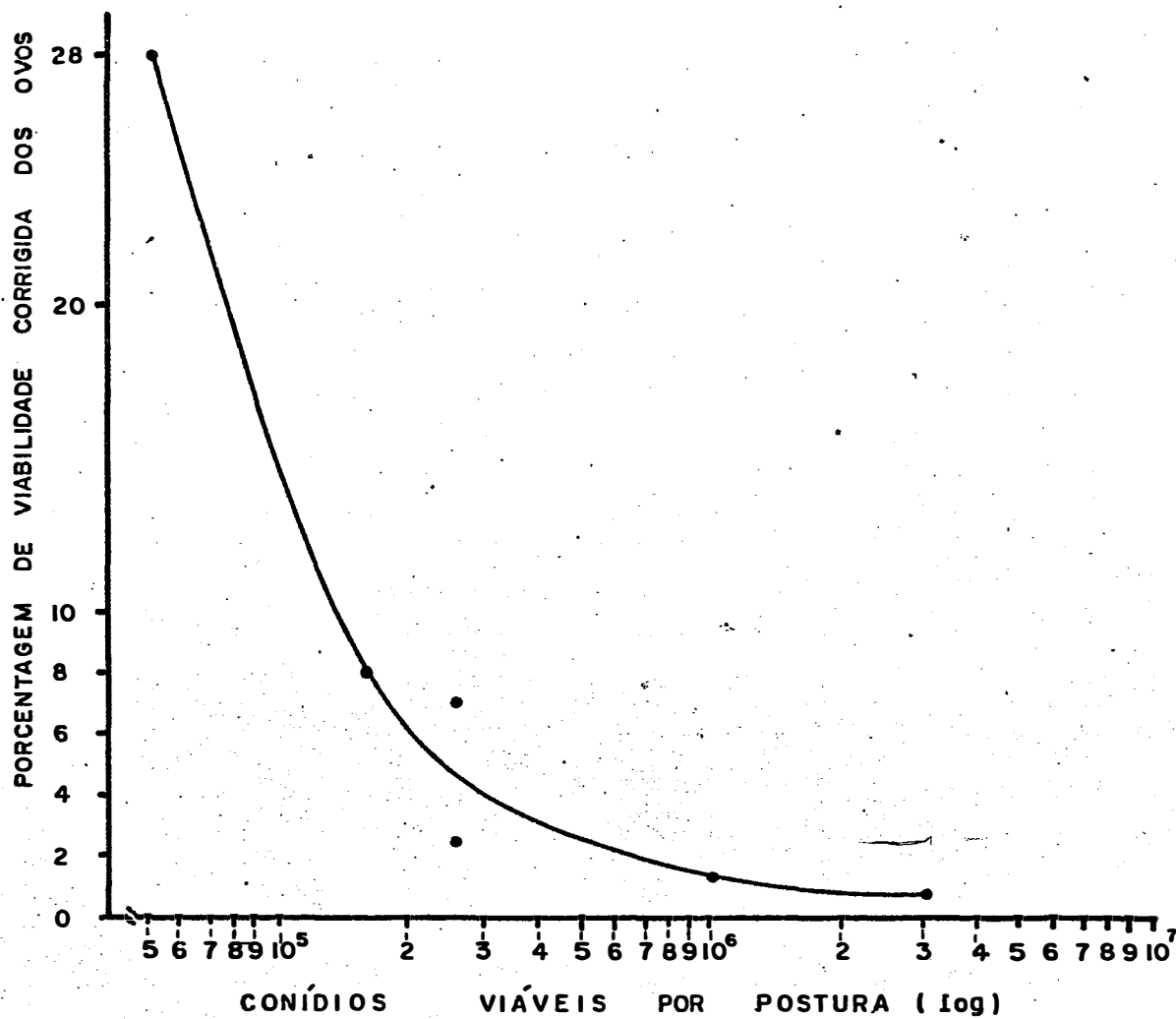


Figura 6: Porcentagem de viabilidade de ovos de *Diatraea saccharalis*, em função do número de conídios de *Metarhizium anisopliae* inoculados.

5.5. Determinação da patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* sobre ovos de *Diatraea saccharalis* de diferentes idades

Os resultados da viabilidade dos ovos para cada tratamento são apresentados na Tabela 27, onde observa-se que os ovos da broca, quando inoculados com 4 dias de idade foram relativamente menos colonizados pelo *M. anisopliae*.

Tal fato ocorreu pela eclosão rápida das larvas da broca nos dias subsequentes à inoculação, possivelmente não havendo tempo hábil para que o fungo colonizasse as posturas. Entretanto, as lagartas provenientes destas posturas foram mortas pelo fungo.

O número de lagartas eclodidas foi maior no tratamento com o produto formulado, demonstrando uma eficiência ligeiramente maior do produto técnico.

O fato de alguns ovos escaparem da ação do fungo pode ser explicado pela possível variação do número de conídios por ovo. Provavelmente, em alguns casos, esse número foi insuficiente para colonizá-lo a tempo de impedir a eclosão da larva.

Ainda na Tabela 27, verifica-se uma acentuada redução da viabilidade dos ovos inoculados com 3 dias de idade, possivelmente pelo aumento no tempo de contato para a colonização do fungo.

Observou-se também um controle eficiente para os

Tabela 27: Resultados obtidos nos tratamentos: Testemunha, T-1 (produto técnico) e T-2 (produto formulado) de acordo com a idade da postura (em dias), no momento da inoculação, para os parâmetros: total de ovos, total de ovos viáveis, porcentagem de viabilidade e porcentagem de viabilidade corrigida.

Idade da postura (dias)	Testemunha				T-1				T-2			
	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1
Total de ovos	301	323	293	253	432	449	466	399	377	343	390	310
Total de ovos viáveis	292	294	270	228	290	66	0	0	354	65	12	7
% Viabilidade	97,01	91,02	92,15	90,12	67,13	14,70	0,00	0,00	93,89	18,95	3,07	2,25
% Viabilidade Corrigida	100,00	100,00	100,00	100,00	69,20	16,15	0,00	0,00	96,78	20,82	3,33	2,49

dois tratamentos, sendo que para o tratamento 1, a mortalidade dos ovos inoculados com 1 e 2 dias de idade foi de 100%. Para o tratamento 2, a porcentagem de mortalidade dos ovos foi também bastante elevada. Entretanto, nas 10 repetições ocorreram tanto para ovos com um como para ovos com dois dias de idade, a eclosão de larvas em apenas uma postura, possivelmente devido a um menor número de conídios no momento da inoculação dos ovos com o fungo.

Os dados de viabilidade de ovos corrigidos em relação à testemunha, quando plotados em função da idade dos ovos em dias, para os tratamentos 1 (T-1) e 2 (T-2), são apresentados na Figura 7, onde se observa uma semelhança na ação dos produtos técnico e formulado.

Através das curvas obtidas para cada tratamento foi possível também estimar a idade máxima dos ovos para uma mortalidade de 50%, sendo de 3,72 dias para o produto técnico e de 3,48 dias para o produto formulado.

Ovos com idade de 1 a 3 dias apresentaram taxa de mortalidade variando de 100 a 79% para os dois produtos.

A eficiência de controle do *M. anisopliae* sobre os ovos de *D. saccharalis* com diversas idades, mostrou-se excelente, sendo que esta estendeu-se para as larvas recém eclodidas, quando aparentemente os ovos haviam escapado da ação do fungo.

Estes resultados concordam com os obtidos por ZIMMERMANN (1982 b), que estudando o efeito do *M. anisopliae* so

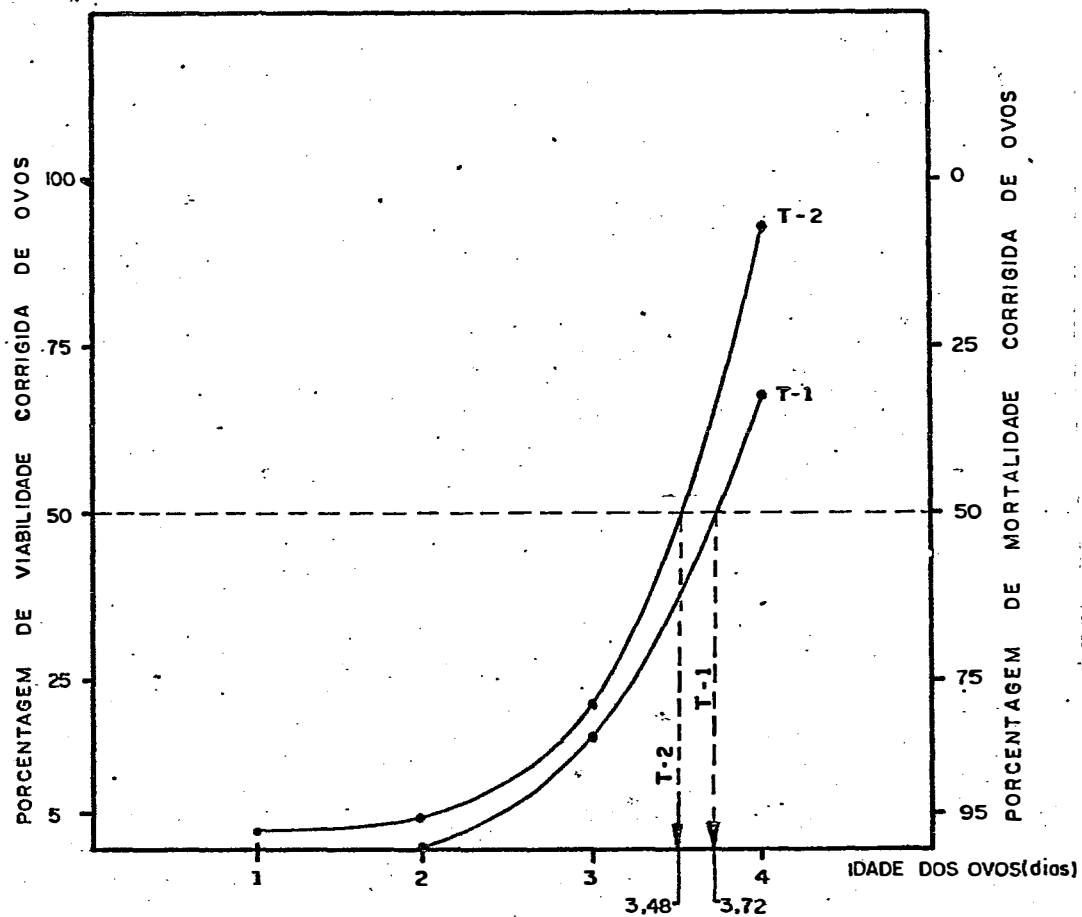


Figura 7: Porcentagem de viabilidade e mortalidade de ovos de *Diatraea saccharalis*, de diferentes idades, submetidos à inoculação com *Metarhizium anisopliae*, para os tratamentos T-1 (produto técnico) e T-2 (produto formulado), utilizando-se concentrações semelhantes.

bre ovos de *O. sulcatus* de diferentes idades, determinou que para doses de $1,0 \times 10^8$ conídios/ml, ovos com 1, 6 e 8 dias apresentaram respectivamente, 84%, 12% e 4% de mortalidade. As larvas de 1º ínstar eclodidas dos ovos tratados com o fungo também foram infectadas em cerca de 25%.

5.6. Efeito "in vitro" de diferentes dosagens de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Diatraea saccharalis*

Os dados de mortalidade acumulada das larvas e pupas da broca da cana pela ação do *M. anisopliae*, para os dias subsequentes, são apresentados na Tabela 28.

Os resultados da análise de regressão linear da mortalidade acumulada, corrigida em função do tempo, são apresentados na Tabela 29, pelos quais, se observa uma correlação positiva significativa ao nível de 1% de probabilidade, entre as variáveis testadas para os tratamentos 1, 2 e 3. Com a equação obtida para cada tratamento, foram estimadas as LT-70 e LT-50, mostrando que apenas o T-1 apresentou LT-50 dentro dos limites estabelecidos para as retas.

Pela determinação da LD-50, na Figura 8 obteve-se que, ao nível de 5% de probabilidade, 50% da população de larvas e pupas de *D. saccharalis* morreram com dosagens de $1,1 \times 10^5$ conídios/gota, variando entre $4,7 \times 10^4$ a $2,9 \times 10^5$ conídios/gota para o 6º dia. Para o 9º dia, a LD-50 foi de $5,5 \times 10^4$ conídios/gota, variando entre 2×10^4 a $1,6 \times 10^5$.

Tabela 28: Porcentagem de mortalidade acumulada e corrigida de larvas e pupas de *Diatraea saccharalis* inoculadas com *Metarhizium anisopliae*, para os diversos tratamentos.

Nº de conídios por gota	Código	% Mortalidade Acumulada e Corrigida para os 12 dias												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
0,87 x 10 ⁶	T-1	0,00	0,00	13,54	32,90	68,82	79,57	83,52	86,52	86,52	86,52	86,52	87,50	87,35
0,96 x 10 ⁵	T-2	0,00	0,00	3,12	13,83	29,00	43,01	43,96	52,81	53,93	55,06	55,06	55,68	56,32
1,12 x 10 ⁴	T-3	0,00	0,00	2,08	2,13	11,83	23,65	29,67	31,46	32,58	33,71	34,09	36,78	
Indeterminado	T-4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,40	7,69	5,62	5,62	5,62	5,62	4,60	
Indeterminado	T-5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	3,37	2,27	1,15	

Tabela 29: Resultados da análise de regressão linear da mortalidade corrigida de *Dia traea saccharalis*, em função dos dias após a inoculação de *Metarhizium anisopliae* e as LT-70 e LT-50 para os diversos tratamentos.

Nº de conídios por gota	Código	F	Coef. de		Coef. linear	Equação da reta	LT-70	LT-50
			correlação	angular				
			r	b	a			
0,87 x 10 ⁶	T-1	14,94**	0,807	7,02	18,60	$y = 18,60 + 7,02 x$	4,47	7,32
0,96 x 10 ⁵	T-2	36,65**	0,906	5,72	2,22	$y = 2,22 + 5,72 x$	9,13	12,63
1,12 x 10 ⁴	T-3	44,08**	0,920	4,08	-6,84	$y = -6,84 + 4,08 x$	13,91	18,81
Indeterminado	T-4	ns						
Indeterminado	T-5	ns						

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: Limites para y de 0-100%

x de 0-12 dias

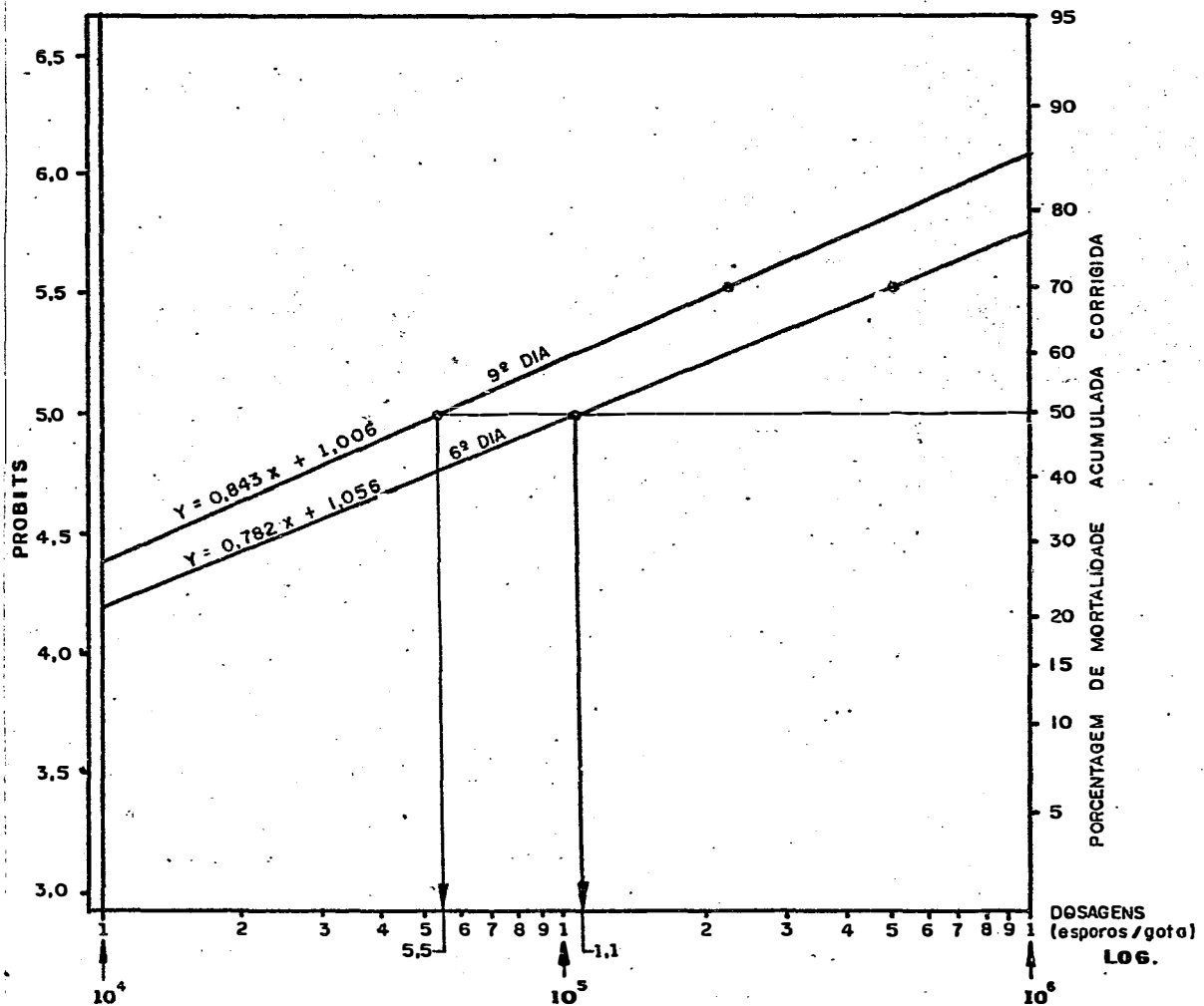


Figura 8: Equações das retas de mortalidade corrigida para larvas e pupas de *Diatraea saccharalis*, em função das dosagens de *Metarhizium anisopliae* para o 6º e 9º dias após a inoculação.

Apesar das dosagens serem representadas pelo número de conídios esperado para os diversos tratamentos, convém mencionar que a quantidade de conídios que atingiu as larvas na inoculação deve ter sido menor, devido a perda de conídios que escorreram com o assentamento da gota sobre a larva.

5.7. Método para avaliar a aplicação de *Metarhizium anisopliae*

Os resultados referentes ao primeiro experimento são apresentados na Tabela 30. Por estes dados, observa-se que ocorreu um controle dos ovos, principalmente na posição superior (S), que recebeu um maior número de conídios.

Com o aumento da dosagem nos tratamentos, os resultados de viabilidade dos ovos tornaram-se mais distintos, mostrando inclusive, que para a dosagem de 300 g de conídios/ha (T-3), as posturas que apresentaram menor porcentagem de viabilidade foram as que estavam nas posições superior (S) e lateral a favor da aplicação (1L).

As posturas colocadas na posição inferior foram as menos colonizadas pelo fungo, mostrando assim, que estas foram pouco atingidas pelos conídios do fungo, mesmo numa situação artificial onde não houve a participação da massa foliar da cana-de-açúcar para dificultar a deposição dos conídios.

Tabela 30: Porcentagem média de ovos viáveis de *Diatraea saccharalis*, transformada em $\sqrt{x + 0,5}$, que receberam a aplicação de *Metarhizium anisopliae*, nas diferentes posições nos respectivos tratamentos e resultados da análise estatística.

Posição	Testemunha	TRATAMENTOS		
		T-1 (100 g confídios/ha)	T-2 (200 g confídios/ha)	T-3 (300 g confídios/ha)
1 I	9,12	9,82 c	9,73 b	8,86 b
1 S	9,79	5,32 a	4,22 a	3,66 a
1 L	9,88	6,56 abc	6,81 ab	4,25 a
2 I	9,49	9,34 bc	9,12 b	9,68 b
2 S	9,50	6,17 ab	5,68 ab	3,91 a
2 L	10,02	8,55 a	9,95 b	5,26 b
3 I	9,70	9,09 bc	9,84 b	8,81 b
3 S	9,63	6,94 abc	4,98 ab	4,92 a
3 L	9,88	7,70 abc	6,39 ab	8,76 b
4 I	9,86	9,58 c	8,57 ab	6,73 ab
4 S	9,42	6,41 abc	6,54 ab	4,46 a
4 L	9,58	8,47 abc	8,76 ab	9,16 b
F	ns	8,03**	4,14**	10,03**
d.m.s.*	-	3,33	4,82	3,75
C.V.	5,73	19,55	29,38	22,28

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

OBS: As médias nos tratamentos seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si

I = Inferior

S = Superior

L = Lateral

1 = lateral a favor da aplicação

2 = lateral a direita da aplicação

3 = lateral a esquerda da aplicação

4 = lateral contra a aplicação

No segundo experimento, os resultados médios da quantidade de conídios de *M. anisopliae* obtidos na suspensão aplicada e também as quantidades encontradas nas faces ventral e dorsal da folha são apresentados na Tabela 31.

Pelos dados obtidos, observa-se que para a suspensão aplicada no campo, houve um aumento do número de conídios, proporcional as dosagens utilizadas nos tratamentos. Tal fato porém, não se repetiu quando se determinou o número de conídios nas faces ventral e dorsal da folha, havendo portanto, fortes indícios da existência de problemas neste tipo de aplicação, pois no experimento anterior, posturas nas quais se simulou a posição dorsal na folha da cana, apresentaram-se significativamente menos colonizadas pelo *M. anisopliae*, quando comparadas à posição superior. Como em condições de campo, as posturas encontram-se em meio a uma massa foliar bastante densa, esta com certeza protegem-nas, constituindo-se numa barreira que dificulta a deposição dos conídios do fungo, o que vem confirmar a suposição levantada no experimento anterior.

Os resultados do número médio de conídios obtidos em uma superfície de $0,25 \text{ cm}^2$ de BDA nas diversas posições são apresentados na Tabela 32. Por estes dados, observa-se que a maior quantidade média de conídios foi obtida para as caixas plásticas com BDA voltadas para cima. Os resultados foram semelhantes para as mesmas posições dos tratamentos, devido talvez, aos mesmos problemas de aplicação aborda

Tabela 31: Número médio de conídios de *Metarhizium anisopliae* encontrados na suspensão aplicada (SA), na face ventral (FV) e na face dorsal (FD), logo após a aplicação do fungo em condições de campo, nos diversos tratamentos.

Tratamentos	T-4	T-5	T-6
Amostras	100 g conídios/ha	200 g conídios/ha	300 g conídios/ha
SA (conídios/ml)	$2,3 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$
FV (conídios/cm ²)	$6,4 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$
FD (conídios/cm ²)	$3,8 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$

Tabela 32: Número médio de confídios de *Metarhizium anisopliae* encontrados em uma superfície de 0,25 cm² de BDA, nas diversas posições e sequências de caminhamento para as diversas dosagens.

Posições e sequências	Dosagens			T-6
	100 g confídios/ha	200 g confídios/ha	300 g confídios/ha	
	T-4	T-5	T-6	
C - 1	1.674	1.886	1.871	
D - 2	26	18	28	
B - 3	18	255	27	
E - 4	42	405	438	
C - 5	1.569	1.816	1.512	
B - 6	8	9	16	
E - 7	22	178	58	
C - 8	1.363	1.312	1.288	
D - 9	268	111	409	
B - 10	13	6	8	

B = para baixo

C = para cima

D = para direita

E = para esquerda

dos anteriormente.

Observando-se ainda na Tabela 32, os resultados médios de conídios obtidos para as posições laterais, pode-se supor que houve influência do vento ou de deriva, uma vez que, os números de conídios por área foram diferentes nestas condições.

Os resultados de viabilidade dos ovos que receberam a aplicação do *M. anisopliae* no campo são apresentados na Tabela 33, onde observa-se que não ocorreu colonização dos ovos pelo fungo.

Este fato deve-se ao baixo número de conídios que atingiram as posturas, aliado a idade dos ovos (3 dias de idade) no momento da aplicação do fungo, que tem grande influência sobre a colonização do *M. anisopliae*, como foi demonstrado no experimento anterior, realizado com ovos de diferentes idades.

Tabela 33: Porcentagem de viabilidade dos ovos de *Diatraea saccharalis*, sob diferentes dosagens de *Metarhizium anisopliae*, quando colocados nas faces ventral (V) e dorsal (I) das folhas de cana-de-açúcar.

Blocos e posições Dosagens	1		2		3		4	
	V	D	V	D	V	D	V	D
Testemunha	97,93	91,60	82,98	89,91	100,00	96,03	97,30	88,68
100 g conídios/ha (T-4)	97,30	87,18	95,57	97,00	99,11	97,85	88,71	93,88
200 g conídios/ha (T-5)	80,18	99,11	94,69	83,52	100,00	88,00	96,66	88,03
300 g conídios/ha (T-6)	96,55	98,60	97,39	84,61	97,97	99,36	87,83	95,49

6. CONCLUSÕES

1. Os isolados de *M. anisopliae* comportaram-se diferentemente sob a ação de radiação gama e ultravioleta;

2. Estabeleceu-se a relação entre radiação gama e ultravioleta, como sendo o efeito da dose de 2,41 krad de radiação gama Co-60, equivalente a 1 segundo de exposição dos conídios de *M. anisopliae* à radiação ultravioleta;

3. A ordem crescente de resistência dos isolados à radiação gama é: PL-17, PL-5, SPL-3F, PL-2, PL-7 e PL-28;

4. A ordem crescente de resistência dos isolados à radiação ultravioleta é: PL-17, PL-28, PL-7, SPL-3F, PL-5 e PL-2;

5. O fungo entomopatôgeno *M. anisopliae* apresenta "in vitro" alta eficiência no controle de ovos da broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis*;

6. As lagartas provenientes de ovos inoculados com *M. anisopliae* também são colonizadas pelo fungo;

7. Ovos de *D. saccharalis* com 1 a 3 dias de idade, inoculados com uma suspensão de aproximadamente $1,0 \times 10^7$ conídios/ml de *M. anisopliae* apresentam taxa de mortalidade superior a 79%;

8. O *M. anisopliae* apresenta "in vitro" elevada patogenicidade às larvas da broca da cana, sendo que as LDs-50 para o 6º e 9º dias foram de $1,1 \times 10^5$ e $5,5 \times 10^4$ conídios/larva, respectivamente;

9. As pupas provenientes de larvas inoculadas com *M. anisopliae* também são colonizadas pelo fungo;

10. As metodologias propostas são adequadas para se avaliar a aplicação de *M. anisopliae*, em condições de campo.

EFFECT OF GAMMA AND ULTRAVIOLET RADIATIONS IN ISOLATES OF
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN, 1883 AND ITS
UTILIZATION AIMING *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) CONTROL

Luiz Carlos de Almeida

Dr. Ricardo Bohrer Sgrillo
Adviser

7. SUMMARY

The objective of this work was to study the effects of gamma and ultraviolet radiations in isolates of *M. anisopliae* and the utilization of this pathogen, aiming the population control of the sugarcane borer, *D. saccharalis*.

Several experiments were carried out at the following laboratories: Biological Control IAA/PLANALSUCAR - Araras-SP, Entomology ESALQ/USP and Radioentomology CENA/ESALQ/USP - Piracicaba-SP.

Based on the eletrophoretic patterns, the isolates were separated in 2 groups with similar zimograms: group 1 (SPL-3F, PL-2, PL-5 and PL-17) and group 2 (PL-7 and PL-28).

The gamma radiation effects were studied in

these isolates, utilizing a source of Co-60, and doses going from 25 to 800 krad were applied. Using the DE-50 values for each isolate, the increasing order of resistance to gamma radiation was determined to be: PL-17, PL-5, SPL-3F, PL-2, PL-7 and PL-28.

In the same way, the ultraviolet radiation (2,537 Å) effect in the viability of spores was evaluated, using 20 to 90 seconds of exposure time. Using the DE-50 of the isolates, the increasing order of resistance to ultraviolet radiation was determined to be: PL-17, PL-28, PL-7, SPL-3F, PL-5 and PL-2.

The data of DE-50 for the several isolates for these two types of radiation showed that the effect of one second of ultraviolet radiation is equivalent to the effect of 2.41 krad of gamma radiation.

To determine the dosage effect of viable spores of *M. anisopliae* in the control of sugarcane borer eggs under laboratory conditions, four different concentrations were used, applied on egg masses by means of immersion or topical application.

Analysing the viability of the eggs, seven days after inoculation, it was determined that a dosage of about 10^6 spores per egg mass was close to 100% efficient in avoiding hatching.

The pathogenicity of *M. anisopliae* was established for different ages of *D. saccharalis* eggs inoculated in

a single application with similar concentrations of the active ingredient, for both technical and formulated products.

The results achieved showed that 50% of the eggs may be colonized by the fungus at the age of 3.72 days for the technical product and an age of 3.48 days for the formulated product. It was also observed the eggs with 1 to 3 days, presented a rate of mortality higher than 79% for both products.

The effect of different dosages of *M. anisopliae* on the larvae of sugarcane borer was also studied under laboratory conditions.

The mortality of *D. saccharalis* larvae and pupae in the several treatments presented a positive correlation with time after inoculation of the fungus.

The LT-50 for each dose of the fungus was estimated through the obtained linear equations.

The LD-50 for *D. saccharalis* larvae and pupae was determined, analysing the mortality in relation to the used dosages. These LD-50 values were of 1.1×10^5 spores/larvae 6 days after inoculation and 5.5×10^4 spores/larvae 9 days after inoculation.

To evaluate the application of *M. anisopliae* under field conditions, two experiments were carried out, the first consisting of a spore suspension application upon sugarcane borer egg masses, and the second consisting of a pulverization of spores upon egg masses previously placed on sugar

cane leaves. The dosages utilized were of 100, 200 and 300 g of spores/ha. The results obtained in both trials indicated that the deposition of spores on *D. saccharalis* egg masses was diffculted by the sugarcane foliar mass.

8. LITERATURA CITADA

ALMEIDA, L.C. e S.B. ALVES, 1982. Testes preliminares de dosagens do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., para o controle da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 99(2):35-38.

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

ALVES, S.B., 1980. Alguns fatores que afetam o controle microbiano de insetos. In: Vº Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, Itajaí-SC, p.215-264.

- ALVES, S.B., 1982. Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, ESALQ/USP, 95p. (Tese de Livre-Docente).
- ALVES, S.B.; L.C. FORTI; F.J. CIVIDANES, 1980 a. Influence of light color on some biological activities *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. an entomopathogenic fungus. Revista Brasileira de Entomologia. São Paulo, 24(2):123-125.
- ALVES, S.B.; R.L.O. REGITANO; J.L.G. CAMARGO, 1980 b. Avaliação da influência de alguns herbicidas utilizados em cana-de-açúcar e pastagens sobre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, 1883. Ecossistema. Espírito Santo do Pinhal, 5:21-24.
- ALVES, S.B.; S.H. RISCO B.; L.C. ALMEIDA, 1982. Evaluation of spore amounts of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. produced per hectare during the epizootic phase of the disease on sugarcane leafhopper, *Mahanarva posticata*. Entomology Newsletter. Araras, (13):7.
- ALVES, S.B.; S.H. RISCO B.; L.C. ALMEIDA, 1983. Influence of photoperiod and temperature in the development and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, IAA/PLANALSUCAR/ESALQ/USP. 6p. (trabalho apresentado ao Congresso International Society of Sugar Cane Technolo

gists, 18, La Habana, 1983).

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

BARBOSA, J.T.; G.M. RISCADO; M. LIMA Fº, 1977. Flutuação populacional da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* Stal (Hom., Cercopidae) e seus inimigos naturais em Campos-RJ, em 1977. Campos, IAA/PLANALSUCAR. COEST. 10p.

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

BLISS, C.I., 1935. The calculation of the dosage mortality curve. The Annals of Applied Biology. Cambridge, 22:134-167.

CARNEIRO, J.S.; L.A.T. SILVA; S.B. ALVES, 1980. Efeito de alguns defensivos "in vitro" sobre *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals) Wuill. In: 6º Congresso Brasileiro de Entomologia, Campinas. Campi-

nas, CECORT/CATI, 1980. p-350-351.

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

CORREIA, J.S.; M.C.V.D. FERRAZ; J.A. COSTA; E.A.F. da MATTA, 1979. Emprego do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, associado ao Malathion 50E no controle da cigarrinha das pastagens. Salvador, EPABA, 9p. (Comunicado Técnico, 22).

DE BACH, P., 1968. Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. 2.ed. México, D.F. Campaña Editorial Continental S.A., 949p.

DEGASPARI, N.; P.S.M. BOTELHO; J.R. ARAÚJO; S.M.S.S. ARAÚJO, 1981. Atividades desenvolvidas pelo PLANALSUCAR visando o controle da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*. In: VIº Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, João Pessoa-PB, p.158-186.

FARGUES, J.; T. DURIEZ; J. ANDRIEU; R. POPEYE; P.ROBERT, 1975. Étude immulogique compareé de souches de *Metarhizium anisopliae* (Delacr.) sien champignon hyphomycéte entomopathogéne. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academic

des Sciences, Ser.D: Sciences Naturelles, Montreuil, (281):
1781-1784.

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

GUAGLIUMI, P.; E.J. MARQUES; A.M. VILAS BOAS, 1974. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal.) no Nordeste do Brasil. Recife, CODECAP, 54p. (Boletim Técnico, 3).

HADDAD, C.R.B. e C.L. MESSIAS, 1979. Influência de espalhan-tes adesivos e de inseticida na germinação e desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae*. Boletim Controle Biológico de Cigarrinhas por Fungos. Piracicaba, (1):6-7.

HENSLEY, S.D. e A.M. HAMMOND JR., 1968. Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. Journal of Economic Entomology. College Park, 61(6):1742-1743.

MACEDO, N.; A.C. MENDES; P.S.M. BOTELHO; J.A. MAGRO, 1977. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da cigarrinha da raiz (*Mahanarva fimbriolata* Stal) na cultura

- da cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 90 (2):16-19.
- MARQUES, E.J., 1981. A cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal) (Hom.:Cercopidae) fator limitante na produção de açúcar no Nordeste do Brasil. In: VIº Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, João Pessoa-PB, p. 187-198.
- MARQUES, E.J.; A.M. VILAS BOAS; C.E.F. PEREIRA, 1981. Orientações técnicas para produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) em laboratórios setoriais. Boletim Técnico PLANALSUCAR. Piracicaba, 3(2):1-23.
- MATTA, E.A.F. da e M.Z.A. de OLIVEIRA, 1978 a. Efeito da luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, in vitro. Salvador, EPABA, 6p. (Comunicado Técnico, 10).
- MATTA, E.A.F. da e M.Z.A. de OLIVEIRA, 1978 b. Efeito do inseticida Malatol 50E no crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., in vitro. Salvador, EPABA, 8p. (Comunicado Técnico, 11).
- MESSIAS, C.L. e J.L. AZEVEDO, 1981. Caracterização e separação de linhagens haplóides e diplóides de *Metarhizium ani*

sopliae. In: 7º Congresso Brasileiro de Entomologia, Fortaleza-CE, p.120 (Resumo, T.117).

MESSIAS, C.L.; J.L. AZEVEDO; E. de CONTI; H.M.L. SOUZA, 1978. Aspectos biológicos e indução de mutantes em *Metarhizium anisopliae*. In: 3º Congresso Latinoamericano de Entomologia, e 5º Congresso Brasileiro de Entomologia, Ilhéus-Itabuna. Anais.

NAVES, M.A., 1981 a. Biossay para testes de virulência de cepas de *Metarhizium anisopliae* (Sorokin), nas cigarrinhas das pastagens (*Deois flavopicta* (Stal) e *Zulia entreciana* (Berg) (Homoptera: Cercopidae). In: 7º Congresso Brasileiro de Entomologia, Fortaleza-CE, p.278-279. (Resumo, T.252).

NAVES, M.A., 1981 b. Patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. ao percevejo da soja *Nezara viridula* (L.) e *Piezodorus guildini* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae). In: 2º Seminário de Pesquisa da Soja, Brasília, p.65-66. (Resumos)

NAKANO, O.; S. SILVEIRA NETO; R.A. ZUCCHI, 1981. Entomologia econômica. São Paulo, Livroceres, 314p.

OKINO, L.A.; J.C. SILVA; A.L.L. SANTOS; C.L. MESSIAS; J.L. AZEVEDO, 1978. Determinação da sobrevivência de *Metarhi*

zium anisopliae e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. O Solo. Piracicaba, 70(2):32-36.

OLIVEIRA, D.P., 1979. Sobrevivência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em rizosfera de gramíneas forrageiras. Viçosa, U.F.V., 54p. (Tese de Mestrado)

PACHECO, J.M. e M.G. BERNARDES, 1976. Ensaio de campo com o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, em três concentrações de esporos, visando o controle microbiológico das "cigarrinhas das pastagens" *Zulia entrecariana* Berg, no Norte do Estado do Espírito Santo, Brasil. In: 3º Congresso Brasileiro de Entomologia, Maceió-AL, p.51. (Resumo, 20).

PEREIRA, R.M.; S.B. ALVES; O. NAKANO; S. SILVEIRA NETO; G.C. BATISTA, 1981. Controle de larvas da mosca doméstica *Musca domestica* L., 1758, pelo fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: 7º Congresso Brasileiro de Entomologia, Fortaleza-CE, p.104. (Resumo, T.103).

ROBERTS, D.W. e A.S. CAMPBELL, 1977. Stability of entomopathogenic fungi. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America. College Park, 10(3):19-76.

- ROBERTS, D.W. e W.G. YENDOL, 1971. Use of fungi for microbial control of insects. In: BURGES, H.D. e N.W. HUSSEY, eds. Microbial control of insects and mites. New York, Academic Press. p.125-149.
- SANTOS, A.L.L., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, ESALQ/USP, 148p. (Tese de Mestrado).
- SILVA, A.B. e B.P. MAGALHÃES, 1980. Controle de cigarrinhas das pastagens *Deois incompleta* Walk. In: 6º Congresso Brasileiro de Entomologia, Campinas, p.169. (Resumo, 122).
- SMITH, D.B. e L.J. BOUSE, 1981. Machinery and factors that affect the application of pathogens. In: BURGES, H.D. ed. Microbial control of pests and plant diseases. New York, Academic Press. cap.35, p.635-653.
- SOZA GÓMEZ, D.R., 1983. Caracterização e padronização de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 provenientes de diferentes regiões do Brasil. Piracicaba, ESALQ/USP, 117p. (Tese de Mestrado).
- TAVEIRA NEVES, E. e E.C. VIEGAS, 1981. Influência da temperatura na patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)

- Sorokin. In: 7º Congresso Brasileiro de Entomologia, Fortaleza-CE, p.204-205. (Resumo T.191).
- TINLINE, R.D. e C. NOVIELLO, 1971. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. Mycologia. New York, 63:701-712.
- VEIGA, A.F.S.L., 1979. O fungo entomógeno - *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., como opção para o controle biológico das cigarrinhas das pastagens (Homoptera, Cercopidae) no Estado de Pernambuco. Boletim Controle Biológico de Cigarrinhas por Fungos. Piracicaba, (1):3-4.
- VENTURA, J.A.; R.J. ARLEU; S.R. RIBEIRO, 1980. Controle biológico do *Metamasius hemipterus* L., 1764 (Col.: Curculionidae) com o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: 6º Congresso Brasileiro de Entomologia, Campinas, p. 159. (Resumo, 115).
- VENTURA, J.A. e J.C. MATIOLI, 1980. Ocorrência de epizootias causadas por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Ecossistema. Espírito Santo do Pinhal, 5(1):92-95.
- VIEGAS, E.C. e E. TAVEIRA NEVES, 1981. Influência da luminosidade e da temperatura no desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em condições de laboratório.

In: 7º Congresso Brasileiro de Entomologia, Fortaleza-CE , p.30 (Resumo, T.29).

VILLACORTA, A., 1975. Técnica para cultura maciça do fungo entomófago *Metarhizium anisopliae* (Metsch.), em forma granulada. In: 2º Congresso Brasileiro de Entomologia, Pelotas, p.28. Anais.

VILLACORTA, A., 1978. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolamentos de *Metarhizium anisopliae* Sorok. In: 3º Congresso Latinoamericano de Entomologia e 5º Congresso Brasileiro de Entomologia, Ilhéus-Itabuna. Anais.

VILLACORTA, A. e M.A. PIZZAMIGLIO, 1981. Determinação da DL₅₀ de *Metarhizium anisopliae* (Metsch, Sorokin) isolamento CM-14 para *Deois flavopicta* (Stal, 1854). In: 7º Congresso Brasileiro de Entomologia, Fortaleza-CE, p.45 (Resumo, T.44).

WALSTAD, J.D.; R.F. ANDERSON; W.J. STAMBAUGH, 1970. Effects of environment conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). Journal of Invertebrate Pathology. New York, 16:221-226.

ZIMMERMANN, G., 1982 a. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium*