

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SOLAR NA
VIABILIDADE DE CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch.)
SOROKIN**

GENTIL SANCHES CORRÊA

Engenheiro Agrônomo

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Lucio de Azevedo

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia, **ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:**
Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro, 1983

.iii.

Aos meus pais
e irmãos

O F E R E Ç O

À Raquel, minha esposa
e Diego, meu filho

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

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

- Ao Dr. *João Lucio de Azevedo*, pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos, além do estímulo e amizade, capacitando-me para novos trabalhos.
- Ao Dr. *Claudio Luiz Messias*, pelas críticas construtivas, sugestões bibliográficas cedidas.
- Ao Dr. *Flávio Cesar Almeida Tavares*, pelo apoio e estímulo no início deste trabalho e pelas facilidades técnicas concedidas.
- À Dra. *Aline Ap. Pizzirani Kleiner*, pela compreensão, humildade e incentivo no início deste trabalho.
- À Professora e amiga de sempre *Anna Célia Pascolat Hellmeister*, pela correção ortográfica.
- Ao amigo *Luiz Carlos Veríssimo*, funcionário da Biblioteca da ESALQ, pela bondade e presteza no atendimento.
- Ao Dr. *Paulo Roberto de Camargo e Castro*, pela paciência e humildade na orientação da "mecânica deste trabalho".
- Ao Dr. *Antonio Roque Vechen*, pela análise dos solos ensaiados.
- Ao Professor *José Carlos Matyis*, pela identificação dos fungos existentes nos solos ensaiados.

- Aos técnicos dos laboratórios do Instituto de Genética da ESALQ/USP, em especial aos Srs. *Antonio Rocha Campos* e *Luiz Próspero*.
- Ao Dr. *José Carlos Ometto* do Departamento de Física da ESALQ/USP pela orientação no cálculo da energia emitida pela fonte de luz ultravioleta.
- Ao amigo *Alfredo José Ferraz de Mello*, pela parte datilográfica.

Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	4
2.1. Controle biológico.	4
2.1.1. Fungos e fatores abióticos que afetam o controle microbiológico.	4
2.2. Alguns aspectos do fungo entomopatogênico <i>M.</i> <i>anisopliae</i>	13
2.2.1. Caracteres gerais.	13
2.2.2. Biologia.	20
2.2.3. Fungistase.	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.	28
3.1. Linhagens utilizadas.	28
3.2. Meios de cultura e soluções usadas.	29
3.2.1. Meio completo (PONTECORVO e col., 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973).	29
3.2.2. Meio de MARTIN.	30
3.2.3. Solução de vitaminas.	30
3.2.4. Ácido nucléico de levedura hidrolizado	31
3.2.5. Solução de oligoelementos.	31
3.2.6. Solução salina.	32
3.2.7. Solução de tween.	32
3.3. Esterilização e incubação.	33
3.4. Curvas de sobrevivência.	33
3.4.1. Luz ultravioleta.	33
3.5. Caracterização dos solos.	35
3.5.1. Solos da Série Ibitiruna.	35

3.5.2. Solos da Série Pau D'Alho.	35
3.6. Isolamento dos fungos existentes no solo.	36
3.7. Fonte de luz ultravioleta.	37
3.8. Determinação da viabilidade de germinação de <u>co</u> nídios na superfície do solo após radiação com luz ultravioleta.	37
3.9. Efeito da ultravioleta na germinação de <u>coní</u> dios em tempos acumulados na superfície do <u>so</u> lo.	38
3.10. Efeito da ultravioleta em condições naturais na germinação de conídios na superfície do <u>so</u> lo.	39
3.11. Efeito do solo na germinação de conídios de <i>M.</i> <i>anisopliae</i>	40
4. RESULTADOS.	41
4.1. Números, porcentagens relativas e curvas de <u>so</u> brevivência de conídios de linhagens de <i>M. ani</i> <i>sopliae</i> após tratamento com luz ultravioleta (U.V.).	41
4.2. Determinação da viabilidade de germinação de <u>co</u> nídios semeados na superfície do solo após <u>ra</u> diação com luz ultravioleta.	50
4.3. Efeito da luz ultravioleta na germinação de <u>co</u> nídios de <i>M. anisopliae</i> após diferentes tempos de radiação na superfície do solo.	50
4.4. Efeito da radiação solar na germinação de <u>coní</u> dios de <i>M. anisopliae</i> na superfície do solo após 45 dias de exposição.	50
4.5. Efeito do solo na germinação de conídios de <i>M.</i> <i>anisopliae</i>	61
4.6. Isolamento dos fungos existentes no solo.	63
5. DISCUSSÃO.	64
5.1. Efeito da luz ultravioleta na sobrevivência de <u>coní</u> dios de linhagens de <i>M. anisopliae</i>	64

5.2. Germinação de conídios semeados na superfície do solo após radiação com luz ultravioleta.	66
5.3. Efeitos cumulativos da radiação ultravioleta na germinação de conídios das linhagens E ₆ e E ₉ de <i>M. anisopliae</i> semeados no solo.	67
5.4. Efeito da radiação solar direta na germinação de conídios das linhagens E ₆ e E ₉ de <i>M. anisopliae</i> semeados no solo.	68
5.5. Efeito do solo na germinação de conídios das linhagens E ₆ e E ₉ de <i>M. anisopliae</i>	71
6. CONCLUSÕES.	73
7. LITERATURA CITADA.	75

INFLUENCIA DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA E SOLAR NA VIABILIDADE DE
CONÍDIOS DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) SOROKIN

GENTIL SANCHES CORRÊA

Prof. Dr. João Lucio de Azevedo
ORIENTADOR

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo verificar a influência de alguns fatores ambientais, como radiação solar e radiação ultravioleta, sobre a viabilidade e germinação de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Foram ensaiados dois tipos de solo, um arenoso da Série Ibitiruna e um argiloso da Série Pau D'Alho, e cinco linhagens do fungo designadas por A₁₉, K, M, E₆ e E₉ todas elas coletadas de insetos parasitados. A radiação ultravioleta foi obtida de uma fonte que emite ondas curtas equivalente a 2.537 Å. Para o isolamento do fungo no solo foi utilizado o método da diluição em placas contendo meio de cultura de Martin. Verificou-se que o solo arenoso, apresentou-se mais eficaz em manter a viabilidade dos conídios do que o solo ar

giloso; verificou-se também que os conídios, sob radiação direta do sol na superfície do solo apresentaram maior porcentagem de mortalidade. Observou-se ainda que, além da influência da luz ultravioleta na germinação dos conídios, o próprio solo também afetou a germinação e desenvolvimento do fungo, independentemente da luz; os solos esterilizados propiciaram uma maior sobrevivência dos conídios que os solos não esterilizados; verificou-se, também que os solos apresentaram textura arenosa, maior quantidade de macroporos e superfície rugosa, eram mais eficazes em manter a viabilidade dos conídios em relação aos de textura argilosa, com maior porcentagem de microporos e superfície mais lisa.

INFLUENCE OF ULTRAVIOLET AND SOLAR RADIATION ON THE
VIABILITY OF CONIDIA OF *Metarhizium*
anisopliae (METSCH.) SOROKIN

GENTIL SANCHES CORRÊA

Prof. Dr. João Lucio de Azevedo
ADVISER

SUMMARY

The present work was carried out aiming to study the influence of some environmental factors as such as Solar radiation and Ultraviolet radiatio, on conidia viability and germination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Two types of soil were used: a sandy soil from Ibitiruna Serie and a clay one from Pau D'Alho Serie. Were used also five strains of the fungus called A₁₉, K, M, E₆ and E₉, all of them collected from infected insects. The ultraviolet radiation was obtained from a source that sends ou short wave equivalent to 2,537 Å. For the isolation of the fungus from the soil was used the plating dilution method on Martin's culture media. It was verified that

sandy soils were more effective in keeping the viability of conidia than clay soils; it was also observed that the conidia under the direct solar radiation on soil surface showed a higher mortality. It was still observed that along the influence of ultraviolet radiation on the germination of conidia, also the soil affected the fungus germination and their development, independent of light. The sterilized soils offered a higher conidia survival than non-sterilized soils; it was also verified that soils showing sandy texture, large amount of macroscopore and a hard surface, were more effective in keeping the viability of conidia if compared to soils with a great percentage of microscopore and softer surface.

1. INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de defensivos químicos, como agentes controladores das cigarrinhas, pode proporcionar o aparecimento de formas resistentes, principalmente ao BHC, intensivamente utilizado para o controle da cigarrinha *Mahanarva posticata*; por outro lado, já se tem constatado a ação tóxica dos inseticidas sobre animais e o próprio homem. Além disso, sabe-se que a utilização desses defensivos químicos provocam desequilíbrio ecológico por proporcionar a mortalidade de outros insetos considerados inimigos naturais, além de, ocasionalmente, mostrar-se medida anti-econômica.

Por isso visando evitar o desequilíbrio ecológico

co, o perigo dos inseticidas e, principalmente, diminuir os custos do controle químico, atualmente, está ocorrendo uma tendência para o controle biológico, utilizando-se do próprio inimigo natural como controlador do inseto-praga, como por exemplo, o controle microbiano, onde são utilizados fungos, bactérias, vírus e protozoários.

Um dos elementos utilizados para o controle das cigarrinhas da cana-de-açúcar é o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, que vem sendo utilizado eficientemente em grande escala, principalmente nos estados de Alagoas e Pernambuco, para controlar insetos da Ordem Homoptera, família Cercophidae, entre os quais *Mahanarva posticata*.

Atualmente, já existem laboratórios denominados setoriais que produzem grande quantidade de conídio do fungo para utilização dos agricultores, bem como alguns laboratórios privados que já estão comercializando os conídios na forma de inseticida biológico.

Visando verificar a ação de alguns fatores ambientais no desenvolvimento deste fungo entomopatogênico, estudou-se, neste trabalho, o efeito da radiação ultravioleta na germinação dos conídios de *M. anisopliae* em meio de cultura; a viabilidade dos conídios expostos à radiação ultravioleta e à radiação solar, quando colocados na superfície de solo

.3.

arenoso e argiloso além do efeito da esterilização desses so
los na germinação do fungo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Controle Biológico

2.1.1. Fungos e fatores abióticos que afetam o con trole microbiológico

Os fungos foram os primeiros microrganismos estudados como capazes de infectar insetos. No entanto, a pesar de grande variedade de fungos, nem sempre as que são patogênicas em laboratório o são em condições de campo. Além destes, vários outros problemas surgem em relação ao patógeno, como por exemplo a grande maioria dos fungos entomopatogênicos têm sido produzidos sob certas condições ideais em grande quantidade e, em certos casos, têm sua virulência diminuída.

Na utilização de fungos para controle microbiológico é importante conhecer a influência das condições ambientais sobre o fungo, devido ao fato de os mesmos não se reproduzirem a contento no campo, tornando seu uso, às vezes, impraticável. Por outro lado, outros fenômenos podem levar ao insucesso qualquer projeto para controle microbiológico de insetos por microrganismos tais com a germinação, perda de esporulação, falta de resistência a temperaturas elevadas, efeito fungistático do solo, tipo de solo e falta de resistência à luz ultra violeta.

CAMERON (1963) citou que os fungos entomopatogênicos pertencem a vários gêneros em muitos dos quais as espécies saprófitas. Vários são, indubitavelmente, patogênicos e alguns têm características que os fazem valiosos como agentes controladores quando são bem conhecidos biologicamente e fisiologicamente. Entretanto se faz necessário verificar se o fungo destinado a controlar populações de determinada praga não se constitua em perigo para animais superiores ou plantas, pois já foi verificado que certos produtos à base de microrganismos têm causado doenças em vertebrados.

Com relação aos fatores que podem afetar o controle microbiológico, MAC LEOD e col. (1966) verificaram que o potencial de controle pode ser limitado pela umidade

por dois motivos: primeiro, altas umidades são necessárias para muitos fungos para que germinem e causem doenças; segundo, a umidade é necessária para a distribuição do patógeno que é usualmente produzido sobre cadáveres de insetos somente em altas umidades. Além disso, a umidade afeta a longevidade dos esporos assim como a germinação, uma vez que muitos fungos só germinam com umidade em torno de 90% ou mais. Entretanto, o requisito para umidade alta não é restrito no primeiro estágio de desenvolvimento, uma vez que esta só se faz necessária após 48 horas da infecção.

A virulência é muito discutida nos diferentes isolados de fungos entomopatogênicos ocorrendo variação dentro de uma mesma espécie ou linhagem, que tem sido interpretada de várias formas pelos pesquisadores como observou FERRO (1975). Este autor diz que os fatores que geralmente têm sido responsabilizados são: heterocariose e/ou recombinação somática pela anastomose de hifas. No interior dessas hifas que contêm vários núcleos e diferentes genótipos pode haver fusão destes núcleos dando diplóides e posterior permuta mitótica ou haploidização. Em recombinações de cultivo, estocagem ou repicagens sucessivas, podem alterar a virulência constituindo, portanto, entraves no controle microbiológico aplicado.

A temperatura afeta tanto a germinação como o

desenvolvimento, a reprodução e, na verdade, todas as atividades dos fungos.

No geral, o limite para o desenvolvimento está entre 5°C e 30°C (COCHRANE, 1958). Desta forma, a temperatura é um importante fator limitante no crescimento dos fungos. Alguns fungos termófilos multiplicam-se bem a 50°C, porém, não, a 65°C. Na camada superficial do solo, a temperatura atinge níveis apreciáveis e a incubação de placas a 37°C mostra a adaptação de fungos como *Aspergillus* e *Tricho*derma. Por outro lado, a incubação a 60°C mostra principalmente *Mucor*, *Penicillium* e *Cladosporium*, cuja abundância aumenta com a profundidade. Essas observações ecológicas sugerem uma seleção dentro do perfil de acordo com o ótimo de temperatura (MAZERA, 1957).

Segundo LATCH (1965), o mecanismo de patogenicidade é muito influenciado pela temperatura, verificando que a temperatura ótima para os fungos entomopatogênicos na qual eles atingem o máximo de patogenicidade, é ao redor de 25-30°C. Em condições de laboratórios como em campo, BALFOUR (1960) verificou que a morte de *Pyrausta nubilalis* por fungos entomopatogênicos acontecia em apenas quatro dias a uma temperatura ao redor de 28°C. No caso de *M. anisopliae*, esse autor determinou a temperatura mínima como sendo 10°C, a ótima

em torno de 25°C e a máxima entre 32°C e 34°C.

Quando os conídios dos fungos entomopatogênicos são aplicados diretamente no solo, ocorre maior infectibilidade de insetos que estão em contato com o solo, principalmente as larvas e as pupas, porém, quando a temperatura estiver entre (ZACHARUK, 1968).

SANTOS (1978) verificou que a temperatura de 37°C, por 96 horas ou mais, já é suficiente para causar a morte dos conídios de *M. anisopliae*. A autora cita ainda que o conhecimento desse dado é muito importante para o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, por ser este gênero de fungo muito aplicado em experimentos de controle microbiológico, em regiões do Brasil, cuja média anual de temperatura é alta e para um controle mais efetivo, poder-se-ia pensar no isolamento de linhagens já resistentes à temperatura existente na natureza ou mutagênicas de mutantes com maior resistência a temperaturas elevadas. Conclui ainda que deve-se objetivar as diferentes regiões do Brasil onde se deverá aplicar o fungo, a fim de aplicar nos mesmos, linhagens de *M. anisopliae* adaptadas à temperatura de cada uma delas.

O pH é outro fator de importância ecológica. Muitos fungos desenvolvem-se mesmo em extremos de acidez. Em cultura, é demonstrável a pronta capacidade de crescer de

pH 2,0 até 9,0 ou acima. Assim os fungos dominam solos de pH baixo onde a população de bactérias e actinomicetos são praticamente inexistentes o que evita a concorrência (FREIRE, 1975).

Pela mesma razão, a calagem reduz e os fertilizantes ácidos ou formadores de ácidos aumentam a população fúngica, porém, a reação é frequentemente resultado da acidificação e não de nutrientes, como é o exemplo da aplicação de sulfato de amônio.

SANTÓS (1978) observou que sob luz contínua há pouco desenvolvimento micelial enquanto há grande produção de conídios já desde o 3º dia após a inoculação. Sob luz alternada há um desenvolvimento micelial um pouco maior, com produção de conídios um pouco menor. Sob escuro total há um grande desenvolvimento micelial com muito pouca produção de conídios e somente a partir do 5º dia. Observou também que a luz ultravioleta é bastante efetiva em causar mortalidade em conídios do fungo citando também que a luz ultravioleta provoca mutação.

Em solos arenosos como argilosos existem inibidores voláteis que podem impedir a germinação de esporos. A viabilidade de germinação de conídios decresce vagarosamente em solos irradiados, no entanto, aumenta quando se intro

duz no solo outros organismos e aumenta ainda mais quando se acrescenta nitrogênio no solo. CHAMBERS (1969) concluiu que a sobrevivência dos conídios depende do nitrogênio disponível do que da competição e antagonismo de outros microrganismos.

Por outro lado, (ENGLANDER e col., 1979) verificaram que o uso de luz ultravioleta à temperatura de 28°C no solo suplementado com o β -sitosterol resultou em alta produção de clamidosporos do fungo *Phytophthora cinnamomi* ocorrendo maior produção ainda quando a incubação ocorreu no dia claro. No entanto, quando se observou, em condições naturais de campo, após a aplicação do fungicida Benomyl, não houve nenhuma alteração na microflora do solo. Contudo, o fungicida Thiram reduziu a população de fungo para 1/6 no dia seguinte ao tratamento, mas a taxa normal foi restabelecida após 6 dias da aplicação. Segundo OKU e col. (1979), em condições de laboratório nenhum fungicida afeta a microflora do solo. Quanto à radiação ultravioleta sobre o solo, o autor cita que a uma temperatura de 10°C houve maior sobrevivência de conídios sob radiação contínua de 2750 Å.

Trabalhando com *Fusarium moniliforme*, BOLKAN (1979) observou que os conídios tiveram baixa sobrevivência no solo que apresentava ausência de hospedeiros numa tempera

tura inferior a 18°C e uma umidade de 5%. Por outro lado, os conídios livres geralmente sobrevivem melhor em solos contendo umidade por volta de 10% chegando a ser viáveis por 12 meses quando a temperatura variava de 18°C a 22°C. No senti do de ensaiar a viabilidade de germinação no solo, o autor correlacionou a mesma com a germinação na ausencia de nutrientes exógenos. Verificou que num total de 18 fungos diferentes, quatro foram nutricionalmente independentes, porem, nao germinaram no solo, devido a fungistase deste e, principalmente, devido à existência de substâncias inibitórias voláteis no solo. Isto levou o autor a concluir que a fungistase do solo é uma consequência da não disponibilidade de nutrientes requeridos para a germinação de esporos e que esta condição é mantida pela contínua competição dos nutrientes que devem estar à disposição e que são necessários para a germinação de muitos esporos.

LOOCKOOD (1974) ensaiou a viabilidade de germinação de 19 fungos em relação à fungistase do solo, comparando a germinação em solos esterilizados em autoclave e solos em condições naturais. Verificou que a germinação foi muito maior em solos esterilizados do que em condições naturais. Quanto à perda de glicose, o autor observou que ocorreu muito mais rapidamente em solos naturais e que foi muito vagarosamente em solos esterilizados em autoclave. Por ou-

tro lado, os conídios individuais, quando lançados ao solo, podem servir como nutrientes de microsubstrato e estimulam o rápido crescimento de bactérias e outros microrganismos do solo, resultando na produção de suficientes substâncias tóxicas impedindo a germinação de outros fungos.

YODER (1973) observou que a germinação de muitos fungos no solo está restrita à qualidade dos nutrientes existentes e que a fungistase, da maioria dos solos, pode ser atribuídos à falta de nutrientes essenciais em tais solos ou à rápida perda de nutrientes essenciais endógenos pela competição dos organismos do solo, ainda que alguns acreditem que substâncias inibitórias são as responsáveis. Quando os solos foram esterilizados, observou o autor que a germinação dos conídios era muito eficiente e constante. Contudo, em solos não esterilizados, o crescimento do micélio iniciava-se após algumas horas e, posteriormente, era destruído. Observou também, que a germinação dos conídios era muito superior em solos esterilizados que em solos não esterilizados.

CHAVES e col. (1981) observaram que o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* tem seu potencial de sobrevivência no solo, na forma de conídios, por um período de 90 dias e que $1,46 \times 10^6$ conídios viáveis por grama de solo é suficiente para manter este microrganismo de uma maneira saprofítica, pelo mesmo período. Cita ainda, o autor que o efei-

to adverso de bactérias contidas nos solos resulta numa possível ação fungistática destas sobre o fungo. Por outro lado, observaram que é necessário desenvolver um meio de cultura seletivo para estudar a biologia desse fungo para estimar a população no solo sem a interferência de outros fungos competitivos.

2.2. Alguns aspectos do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*

2.2.1. Caracteres gerais

Segundo GUAGLIUMI e Col. (1974), o "fungo muscardino verde" foi descoberto por METSCHNIKOF, em 1879, infectando larvas do besouro do trigo *Anisopliae austriaca* Hbst. Estudando a doença, o autor achou viável a utilização de fungos no controle artificial de insetos. Inicialmente, METSCHNIKOF propôs o nome *Entomophthora anisopliae*; posteriormente, por sugestão do botânico CIENKOWSKY, o fungo foi chamado *Isaria destructor*; depois de uma série de controvérsias, com a proposição de diversos sinônimos, prevaleceu o nome inicial, por se tratar de um fungo imperfeito, sendo atualmente conhecido por *M. anisopliae* (Metsh) SOROKIN, 1883.

O fungo *M. anisopliae* (Metsh) SOROKIN, apre-

senta uma formação semelhante a um esporodóquio agregado a hifas intimamente entrelaçadas, contendo uma massa compacta de conidióforos num "estroma" plano ou em forma de disco; os conidióforos simples ou, mais frequentemente, ramificados e parecidos com o modelo de penicília, resultam em células conidiogênicas chamadas filíades; as filíades cilíndricas e hialinas afilam-se para um ápice estreito (BARON, 1968). Por outro lado, HAMMIL (1972) fez um estudo sobre as filíades de *M. anisopliae* definindo-as como células conidiogênicas que produzem pelo menos o seu primeiro conídio entre a extensão apical da célula, o qual é liberado pela ruptura da parede celular. Observou que as filíades deste fungo são geralmente cilíndricas e levemente entumescidas antes de afilem rapidamente para um estreito ápice conidiogênico de no máximo 1 μ m. Após um conídio prévio ter sido delimitado por um septo, ele move-se para fora do colo da filíade e o próximo conídio começa a formar-se. As organelas penetram nos conídios e os mesmos são delimitados por septos, continuando o processo.

AZEVEDO e MESSIAS (1981) analisaram oito diferentes isolados de *M. anisopliae*, sendo sete deles da variedade *minor* (*anisopliae*), e o outro da variedade *major* e verificaram as diferenças existentes entre os tamanhos e volumes entre uma e outra variedade. Os autores verificaram que a va-

riedade *major* apresentou conídios cujas medidas e respectivo volume são bem maiores que o dos isolados das outras variedades de *M. anisopliae*. Observaram também que existe diversidade no volume e medidas dos conídios de diferentes isolados selvagens, sendo que E_9 e M apresentam os mesmos volumes de conídios, enquanto que A_4 e A_1 apresentam em média, conídios maiores. Quanto à sobrevivência dos conídios, SANTOS (1978) verificou que a temperatura de 37°C inibe a germinação, tornando-os inviáveis se os mesmos foram expostos por mais de 96 horas a esta temperatura; que a luz contínua tem influência sobre a produção de conídios, aumentando-se bastante em relação à luz alternada e ao escuro total, sendo que este último favoreceu o desenvolvimento micelial. Observou-se, ainda, que as radiações gama e ultravioleta podem ser utilizadas como mutagênicos.

CAMARGO (1981) observou a patogenicidade do *M. anisopliae* no controle da lagarta do girassol, *Chlosyne lacinia saundersii*, verificando que este fungo entomopatogênico tem também ação sobre outros insetos, além da cigarrinha da cana-de-açúcar e cigarrinha das pastagens. O autor verificou que houve morte em 100% de lagartas testadas, num prazo de 48 horas.

Para uma melhor segurança na utilização do *M.*

anisopliae, em larga escala, objetivando principalmente o controle microbiológico das cigarrinhas das pastagens, o qual implica o contato direto deste fungo com homens e animais domésticos, bem como outros artrópodes de importância na agricultura, VENTURA (1981) usou camundongos inoculados com *M. anisopliae*, por via intraperitônea, intravenosa, subcutânea, intra muscular, ingestão e inalação. O autor cita que não houve evidências clínicas nos animais testados e que as análises histopatológicas dos tecidos inoculados mostraram reação inflamatória inespecífica, com exudatos de macrófagos e neutrófilos, não se tendo observado a germinação dos conídios, nem o desenvolvimento do fungo.

Por outro lado, AZEVEDO e col. (1982) analisaram a ultra estrutura de protoplastos de *M. anisopliae* verificando que a análise das micrografias eletrônicas revelou que existem semelhanças morfológicas entre protoplastos obtidos em *M. anisopliae* e aqueles obtidos em *Aspergillus nidulans* por GIBSON (1972). Citam também que os protoplastos, liberados após 1 hora de tratamento com mistura lítica, mostraram alta densidade ribossômica e apresentaram alguns protoplastos que, algumas vezes, apresentavam-se rugosos.

MESSIAS e col. (1982) verificaram o tamanho de conídios e a produção de enzimas amilase, lipase e proteases da linhagem E₉ de *M. anisopliae* originária de cigarrinha

de pastagens *Deois* sp e de meio de cultura sólido. Observaram que os Índices Enzimáticos de amilase, lipase e protease são diferentes e que, conforme a fonte de origem de linhagem, há variação de Índice Enzimático com aumento significativo para amilase, lipase do isolado proveniente de inseto. Em relação ao tamanho de conídios, o valor permitiu concluir que a linhagem, quando isolada diretamente do inseto, mostra conídios com menor comprimento do que quando provenientes de subculturas. Esses dados, concluem os autores, sugerem que a produção de enzimas extracelulares diminui quando o fungo é passado em subcultura, e isso poderia ter implicações na diminuição da patogenicidade do fungo.

ROSATO e col. (1981) verificaram a produção de enzimas extracelulares em isolados de *M. anisopliae* procedentes de diferentes regiões geográficas do Brasil. Usando-se substratos específicos foram ensaiadas as produções de amilase, lipase, quitinase e protease nos dez isolados, provenientes de Pernambuco (C), Bahia (A₄; A₆; A₈; A₁₉; A₂₀; A₂₁), Espírito Santo (E₆ e E₉) e São Paulo (K). Verificaram que no geral os isolados de uma mesma região apresentam Índices Enzimáticos similares, embora Índices similares também tenham ocorrido em isolados geograficamente distintos.

SILVA e col. (1982) verificaram que a atividade

de enzimática da amilase, lipase, protease e quitinase produzida por *M. anisopliae* pode estar relacionada com a virulência das linhagens, visto que mutantes da linhagem E₉, que não produziam amilase e lipase, apresentaram virulência inferior que a selvagem para *Rhodnius prolixus*. Isto sugere que a alteração na produção dessas enzimas extracelulares parece estar relacionada com a virulência das linhagens. Por outro lado, MESSIAS e col. (1982) observaram que a produção das enzimas amilase, lipase e protease da linhagem E₉ de *M. anisopliae*, originária da cigarrinha de pastagem *Deois sp*, apresentou Índice Enzimático para amilase, lipase e protease diferentes e conforme a fonte de origem da linhagem (meio de cultura ou inseto) havia variação do Índice Enzimático, com aumento significativo para amilase e lipase do isolado proveniente do inseto. Esses autores verificaram ainda que a produção de enzimas extracelulares diminui quando o fungo é passado em subcultura e isso poderia ter implicação na diminuição da patogenicidade.

CONTI e col. (1980) observaram que onze linhagens selvagens de *M. anisopliae* sendo A₄, A₆, A₈, A₁₉ e A₂₀ originadas do Estado da Bahia, K originada do Estado de São Paulo, C originada do Estado de Pernambuco e E₆ e E₉ do Estado de Espírito Santo, apresentaram-se homogêneas quando testadas eletroforéticamente para a fosfatase e heterogêneas

quando testadas em relação à esterase, podendo-se distinguir 5 tipos diferentes.

Quanto à patogenicidade, DAOUST e col. (1982) verificaram o comportamento quanto ao potencial de virulência de 52 linhagens de *M. anisopliae* originadas de nove países diferentes e isoladas de insetos pertencentes a 4 gêneros diferentes, incluindo Lepidoptera, Orthoptera, Homoptera e Coleoptera. Observaram que as linhagens do fungo entomopatogênico de *M. anisopliae*, quando utilizadas contra o *Culex pipiens* apresentaram uma variabilidade de virulência que variou de 0 a 100%, sendo que as mais virulentas pertenciam à linhagem *M. anisopliae*, variedade *anisopliae*, originadas da Áustria, Austrália e Brasil enquanto que as linhagens *M. anisopliae* variedade *major* foram quase que avirulentas. Por outro lado, SILVEIRA e col. (1982) observaram o mecanismo de infecção produzido pelo fungo *M. anisopliae* no hospedeiro *Deois sp* onde, após 120 horas da inoculação, o desenvolvimento se dá inicialmente na hemolinfa, tomando em seguida glândulas salivares, musculatura e tubo digestivo e com a evolução da infecção verificou-se a desagregação muscular. Notaram também que a colonização ocorre na parte anterior do hospedeiro e onde o progresso evolui observaram a presença de hifas emergentes à superfície com a formação de conidióforos e que os insetos hospedeiros morreram após 144 horas.

ROBERTS e col. (1982) analisaram o efeito de várias formulações sobre a virulência de conídios de *M. anisopliae* no controle de larvas de

Esses autores verificaram que os componentes da formulação mais prejudiciais para a virulência foram farelo de trigo, torta de diatomáceas e dois diluentes de Caolinita onde houve uma queda de virulência em torno de 100% em relação aos conídios não formulados. Por outro lado, observaram que um diluente derivado de óleo de rícino aumentou significativamente a virulência dos conídios com relação ao controle de larvas *Culex pipiens*. Observaram ainda que a virulência era maior quando se misturava o diluente pouco antes da aplicação em relação a formulações previamente preparadas.

2.2.2. Biologia

Atualmente são conhecidas mais de 200 espécies de insetos muitos dos quais são habitantes do solo, que são hospedeiros do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. Em ensaios de laboratório, utilizando esse fungo, ZACHARUK (1968) verificou que houve maior infecção em ovos e larvas de *Elate*
ridae do que em pupas e adultos. Observou o autor que a infecção seguiu-se à aplicação direta dos conídios na cutícula,

ao contato com o solo infestados com esporos e a alimentação das larvas com sementes de trigo infectada, sendo verificado o seu aumento em temperaturas entre 16°C e 28°C. O autor cita ainda que a morte dos insetos, evidenciada pelo crescimento típico do fungo do lado externo do corpo do hospedeiro, foi maior nas fêmeas do que nos machos.

Por outro lado, verificaram que a aplicação no campo de *M. anisopliae* nas quantidades de 35, 43 e 80 lb/acre resultou em 60, 77 e 100% de mortalidade para *H. pales*, enquanto que nenhum inseto controle morreu. Quanto a *Mahanarva posticata*, *Mahanarva fimbriolata*, *Aeneolomia selecta* GUAGLIUMI (1971) constatou controle satisfatório, e mesmo acontecendo com a cigarrinha-das-pastagens.

Na verdade conhece-se muitas espécies de insetos que são hospedeiros do *M. anisopliae* e já foram registrados insetos da ordem Homoptera que atacam raízes de certas espécies de plantas na Inglaterra. HANEL (1981) desenvolveu uma técnica para medir a virulência do fungo patogênico *M. anisopliae* (Metsh) SOROKIN, contra formigas da espécie *Nasutitermes exitiosus*, verificando que a LD₅₀ foi de 0,67 x 10⁵ conídios/ml.

Outros insetos nocivos à cigarrinha foram tes

tados com relação à patogenicidade do *M. anisopliae*, como por exemplo *Hoplocampa testudinia*, praga da macieira, *Oti~~o~~rhy~~n~~chus meridionalis*, importante praga dos moranguinhos, o grilo *Teleogryllus commodus* que ataca terrivelmente as pastagens da Austrália, onde foi observada uma mortalidade em torno de 81% (AUDEMARD e col., 1981).

MÜLLER-KÖGLER (1967) levantou a literatura até 1963 e verificou a potencialidade de fungos no controle microbiológico de insetos. Infelizmente, apesar da grande variedade de fungos, nem sempre o que são patogênicos em laboratório o são em condições de campo. Além destes, vários outros problemas surgem em relação ao patógeno; a maioria dos fungos entomopatogênicos tem sido produzida sob certas condições ideais em grande quantidade, porém, em certos casos, perdem a sua patogenicidade.

Por outro lado, as condições ambientais, como já foi citado, têm influência sobre o fungo e, podem influenciar na germinação do mesmo no campo, ficando o uso do fungo às vezes prejudicado.

A hifa do fungo entomopatogênico pode desenvolver-se na superfície do inseto e penetrar na cutícula ime

diatamente, envolvendo enzimas neste processo. Algumas destas enzimas têm sido estudadas "in vitro" como: quitinases, proteases e lipases. A grande diferença entre fungos capazes de parasitar insetos parece residir no fato de estes últimos não poderem penetrar no exoesqueleto do hospedeiro que lhe serve de defesa, ROBINSON (1966).

Como se sabe, os conídios de fungos apresentam um metabolismo bastante ativo durante a germinação e a produção de enzimas é bastante importante na indução de doenças em insetos. Entre as toxinas isoladas destacam-se a aflatoxina produzida pelo *Aspergillus flavus*, tóxica não só para os insetos mas também para mamíferos, pássaros, microrganismos e plantas.

Segundo DE BACH (1968), a maioria dos fungos que infecta insetos não o faz por ingestão, mas por penetração na cavidade do corpo através do integumento. Isto requer condições de temperatura e umidade adequadas. Uma vez no interior do inseto, o fungo prolifera, invade os tecidos e produz uma grande quantidade de hifas. Na maioria dos casos, o fungo emite seus conidióforos para o exterior de onde se desenvolvem os corpos frutíferos, capacitando sua disseminação para outros hospedeiros. O inseto infectado geralmente seca, adquirindo um aspecto mumificado, chegando frequentemente a cobrir-se de conídios que capacitam o fungo a so-

breviver em períodos de condições adversas do meio ambiente ou na ausência de hospedeiros. Pode-se dizer também que a contaminação de insetos ocorre através do integumento, quando os insetos se deslocam de um lugar para outro, no meio ambiente em que vivem.

GUAGLIUMI (1974) afirmou que o processo infectivo que leva o inseto a morrer desenvolve-se através de uma primeira fase de germinação de esporos e da penetração das hifas no corpo do hospedeiro; de uma segunda fase, com a invasão dos tecidos, por parte do micélio do fungo até causar a morte do inseto; finalmente, a terceira fase se caracteriza pela esporulação e o início de um novo ciclo infeccioso. Desta maneira, o processo evolutivo da micose é bastante visível nos insetos adultos, menos, porém também visível, nas ninfas; a sintomatologia é parecida a que foi observada por vários autores em diferentes insetos. Por exemplo, quando o fungo começa a penetrar nos tecidos do inseto, este perde o apetite, diminui sua irritabilidade e reduz pouco a pouco seus movimentos inclusive deixando de se alimentar. Seus últimos estágios larvais podem ficar alguns dias inertes antes de morrer.

Considerando o fungo *Paecilomyces farinosus*, HUSSEY (1971) mostrou que existe uma estrutura envolvida a

partir das hifas denominadas de apressório, o qual seria responsável pela fixação do fungo sobre o inseto e posterior penetração da cutícula por mecanismos físicos e enzimáticos. No entanto, é importante lembrar que, além desse fator, outros como: dispersão, viabilidade potencial de inóculo e virulência, devem ser exigidos do patógeno. No caso, por exemplo, dos conídios serem facilmente disseminados pelo vento, característica esta considerada ótima, é importante lembrar que a luz solar bem como condições de umidade e temperatura podem matar o conídio durante o transporte. No caso da temperatura, a germinação é afetada, como já foi citado, sendo que o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* apresenta a temperatura ótima para o desenvolvimento entre 25°C e 30°C.

2.2.3. Fungistase do solo

Vários métodos existem para a avaliação da flora fúngica do solo, cada um com vantagens e desvantagens. O mais usado, inclusive feito neste trabalho, é o da contagem por diluição e semeadura com meios de cultura em placas.

A fungistase do solo é uma consequência da não disponibilidade de nutrientes que a germinação de esporos requer e este estado é mantido pela contínua competição por minuto dos nutrientes que devem estar à disposição e se-

rem requeridos para a germinação de muitos esporos. Por outro lado, LOOCKOOD (1961) observou que os esporos individuais de fungo no solo servem como nutrientes de microsubstrato e estimulam o rápido crescimento de outros microrganismos do solo sobre a sua superfície ou suas adjascências; e, que isto resulta na produção de suficientes substâncias fungistáticas para impedir a germinação do fungo. O mesmo autor verificou que conídios de 17 fungos de germinação sem nutrientes exógenos foram incubados sobre solos esterilizados. Cita o autor, que a germinação ocorreu em todos os fungos ensaiados enquanto que nos solos não esterilizados germinaram apenas 2 de todos os fungos ensaiados.

KO e col. (1978) ensaiaram 18 fungos para verificar a viabilidade de germinação no solo correlacionando com a germinação na ausência de nutrientes exógenos. Apenas quatro fungos não germinaram no solo devido à fungistase que foi considerada devido à forte difusão imposta pela atividade microbiológica do solo e pela existência de substâncias voláteis oriundas de metabolismo microbiológico. Desta forma, em qualquer trabalho visando à utilização de solo deve-se considerar a presença de fungitoxina e bacterotoxinas no mesmo. Já foram isoladas de muitos solos pequenas quantidades de tricotecim que tinham efeito estimulador sobre o crescimento micelial do *Fusarium oxysporum* var. *cubense*, porém

em altas concentrações tinham um efeito inibidor do crescimento micelial do mesmo fungo.

Uma técnica para estudo ecológico da fungis-
tase do solo foi elaborada por CHINN (1953) que consistia na
técnica da lâmina para estudar ecologicamente o comportamen-
to dos fungos, tanto qualitativa como quantitativamente,
em solos esterilizados e não esterilizados. Observou o au-
tor que, em solos esterilizados, a germinação dos conídios
era muito eficiente e constante enquanto, em solos não este-
rilizados, o crescimento do micélio iniciava-se após algumas
horas e logo em seguida era destruído, assim como a germina-
ção dos conídios era muito superior em solos esterilizados
que em solos não esterilizados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

As linhagens de *M. anisopliae* utilizadas neste trabalho foram obtidas no Setor de Genética de microrganismos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba e laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade de Campinas, gentilmente cedidas pelo Dr. Cláudio Luiz Messias. Estas linhagens têm sido empregadas nos ensaios de controle biológico, no campo, contra as cigarrinhas das pastagens e da cana-de-açúcar. São elas: A₁₉, isolada parasitando o hospedeiro *Mahanarva posticata* em Salvador, Bahia, E₆ e E₉, isoladas do hospedeiro *Deois flavopicta* em Vitória, Espírito Santos, K,

em Jaú, São Paulo pelo Dr. K. El-Kadi e M isolada do hospedeiro *Deois* sp em Manaus, Amazonas.

As amostras de solo utilizadas para ensaiar as diversas linhagens foram obtidas no campo onde se cultivava cana-de-açúcar e em campo onde se encontravam gramíneas principalmente da espécie *Brachiaria decumbens*. Estes solos foram cedidos pelo Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

3.2. Meios de cultura e soluções usadas

3.2.1. Meio completo (PONTECORVO e col., 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973).

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,0 g
Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Extrato de leveduras	0,5 g

Solução de vitaminas.	1,0 g
Ácido nucléico de leveduras hidrolizada .	2,5 ml
Ágar.	15 g
Água destilada.	1000 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.2. Meio de MARTIN

KH_2PO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Glicose.	10 g
Peptona.	5 g
Solução aquosa de rosa bengal a 1:3000..	100 ml
Solução de oligoelementos.	1 ml
Água destilada.	1000 ml
Estreptomicina.	1:10000

3.2.3. Solução de vitaminas

Ácido nicotínico.	100,0 mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	10,0 mg
Biotina.	0,2 mg
Piridoxina.	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg

Tiamina.	50,0 mg
Água destilada esterilizada.	100,0 ml

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

3.2.4. Ácido nucléico de levedura hidrolizado

Foram hidrolizados 2 g de ácido nucléico de leveduras em 15 ml de HCl 1N por 20 minutos a 100°C. O processo foi repetido com a mesma quantidade de ácido nucléico de levedura em NaOH 1N. Os dois hidrolizados foram misturados, o pH ajustado para 6,0 com NaOH 4% e então filtrados. O volume foi ajustado para 40 ml e a solução foi guardada em frasco escuro com clorofórmio a 4°C.

3.2.5. Solução de oligoelementos

Molibdato de potássio.	0,05 g
Borato de sódio.	0,05 g
Perclorato de ferro	1 gota (1%)
Nitrato de cobalto.	0,05 g
Sulfato de cálcio.	0,05 g

Sulfato de cobre.	0,05 g
Sulfato de zinco.	0,05 g
Sulfato de manganês	0,05 g
Água destilada.	1000 ml

A solução foi guardada em frasco escuro e colocada no refrigerador a 4°C.

3.2.6. Solução salina

Solução de cloreto de sódio 0,89% em água destilada sendo a seguir distribuída em frascos (9 ml).

Os frascos desta solução foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, à pressão de uma atmosfera.

3.2.7. Solução de tween

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

3.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura, as soluções e os solos foram sempre esterilizados em autoclave por 15 minutos a uma atmosfera de pressão. Os meios e as soluções foram estocados em temperatura ambiente com exceção daqueles que estão assinalados e que foram estocados no refrigerador a 4°C.

A temperatura de incubação foi de 28°C, exceto nos experimentos onde se fez necessária a temperatura ambiente. A estufa incubadora foi uma B.O.D. (Fanen).

3.4. Curvas de sobrevivência

3.4.1. Luz ultravioleta

Suspensão de conídios, obtidos de colônias incubadas oito dias em placa de Petri contendo meio completo, foi preparada em solução de Tween, estimado seu número na suspensão, em hematímetro para dar cerca de 10^6 conídios/mL.

A suspensão diluída na concentração de 1:10 foi colocada em placa de Petri esterilizada e irradiada com luz ultravioleta (2.537 Å) em tempos crescentes de exposição

(1, 2, 4 e 8 minutos). A fonte de radiação ficou a uma distância de 14 cm do material a ser irradiado. Após a radiação de cada tempo, a suspensão sofreu diluições adequadas em solução salina, e 0,1 ml foi semeado em placas de Petri com meio completo. Paralelamente repetiu-se o processo com os conídios não irradiados. Foram semeados no mínimo três placas por tratamento.

Após oito dias de incubação a 28°C, fez-se a contagem das colônias desenvolvidas e estimou-se o número de conídios sobreviventes por ml para cada tempo de tratamento. A determinação da porcentagem de sobrevivência nos tempos de radiação. Foi feita tomando como 100% o número de conídios viáveis estimados na amostra sem radiação. O processo acima foi repetido duas vezes para cada linhagem, sendo que a curva de sobrevivência obtida foi feita com a porcentagem de sobrevivência média dos dois ensaios.

Para uniformização dos resultados, os conídios de todas as linhagens foram coletados de colônias com 12 dias de incubação. As radiações foram feitas em câmaras escuras, e a semeadura se dava imediatamente após o tratamento. Esta técnica foi utilizada para cinco linhagens de *M. anisopliae*.

3.5. Caracterização dos solos

3.5.1. Solos da Série Ibitiruna

O solo ensaiado neste trabalho foi retirado de uma profundidade (0-30 cm), horizonte A₁. Esses solos da Série Ibitiruna exibem relevo normal, alto, suavemente ondulado, muito longo e uniforme. Estão muito sujeitos à erosão cuja ação frequentemente se traduz por perdas que atingem inclusive o horizonte A₂. Uma amostra deste solo foi levada ao Departamento de Solos, Geologia e Fertilizantes para conveniente caracterização como mostra abaixo. A composição de vegetação neste solo era gramíneas do gênero *Brachiaria*.

Esse solo pertence a Série Ibitiruna areia fina, expondo as características morfológicas seguintes: cinza escuro; areia fina; maciço; friável; não plástico; não pegajoso; macrosporos raros; raízes finas e abundantes; pH 5,2. Após análise verificou-se que este solo apresentava % limo - 4,7%, argila - 5,5%, C orgânico - 0,87%, C/N - 11%. A tensão de umidade foi 6,6% a 1/2 atm e 4,7% a 15 atm.

3.5.2. Solos da Série Pau D'Alho

Este solo foi retirado de uma profundidade de 0-15 cm. O relevo é excessivamente forte ondulado. São so

los geralmente rasos, com profundidade muito variável. Os derrames de eruptivas básicas constituem o material de origem destes solos. A decomposição de vegetação deste solo era de cana-de-açúcar. Após caracterização física e química verificou-se que o mesmo é: pardo avermelhado escuro; argila; blocos sub-angulares pequeno a médio; ligeiramente duro; friável; plástico, pegajoso, raízes finas, abundantes; pH - 5,6. As análises químicas revelaram: % Limo - 45,0; % C orgânico - 1,67 %; C/N - 9; A tensão de umidade foi de 18,4 % a 1/2 atm. e 14,1 % a 15 atm.

3.6. Isolamento dos fungos existentes no solo

Foi utilizado o método de diluição e semeadura em placas contendo meio de Martin. Diluições do solo (1:10) foram preparadas, pesando 10 gramas do solo e colocados em 90 ml de água. Após 20 minutos no agitador a solução foi diluída convenientemente de 1:100 até 1:100.000, transferindo-se 1 ml da suspensão para tubos com 9 ml de solução salina. Foi semeado 0,1 ml de cada diluição em placas de Petri contendo meio de Martin e distribuídos uniformemente com alça de Drigalsky. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 10 dias. Esse processo foi repetido para ambos os solos duas vezes. A classificação dos fungos foi feita no Departamento de Fitopatologia da Escola Superior

de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP.

3.7. Fonte de luz ultravioleta

A luz ultravioleta foi obtida de uma fonte que emite radiações de luz de ondas curtas equivalentes a 2.537 \AA . Esta lâmpada foi cuidadosamente estudada para se calcular a energia emitida pela mesma em energia por área e por tempo de exposição no Departamento de Física e Meteorologia da ESALQ/USP. Assim observou-se que esta fonte, emitindo radiações numa superfície de 1 cm^2 durante o tempo de 1 minuto, produzirá uma transferência de $104,5 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{min.}^{-1}$.

A incidência média da luz na superfície do solo para um comprimento de onda equivalente a 2.537 \AA é $0,0021 \text{ cal.cm}^{-2}.\text{min.}^{-1}$.

3.8. Determinação da viabilidade de germinação de conídios na superfície do solo após radiação com luz ultravioleta

De suspensão de conídios preparada como descrito no item 3.4.1., 1 ml da solução de "tween" contendo os conídios já devidamente contados, foram diluídos 7 ml de solu

ção de salina, volume este necessário para deixar a quantidade de solo ensaiada adequadamente umedecida. A quantidade de solo ensaiada foi de 20 gramas que foi colocada em placas de Petri e esterilizadas por 20 minutos à pressão de 1 atmosfera. Com uma pipeta de 10 ml foi devidamente distribuída a suspensão de conídios por toda a superfície do solo na placa de Petri. Após a distribuição dos conídios, a placa foi irradiada à uma distância de 14 cm da fonte de luz ultravioleta de ondas curtas (2.537 \AA) por um tempo de 2,40" (dois minutos e quarenta segundos). Após 8 dias de incubação à temperatura ambiente foi preparada diluição do solo 1:10, pesando-se 10 g de solo e colocando em 90 ml de água destilada num erlenmeyer de 250 ml. Após 20 minutos no agitador repetiu-se o mesmo método descrito no item 3.5. As linhagens ensaiadas neste método foram A₁₉, E₆, E₉, K e M e os solos foram os dois já mencionados. Repetiu-se duas vezes o ensaio para cada linhagem.

3.9. Efeito da luz ultravioleta na germinação de conídios em tempos acumulados na superfície do solo

De suspensão de conídios preparados como descrito no item 3.8., foram preparadas 9 placas de Petri contendo 20 gramas de solo esterilizado cada uma. Uma das pla-

cas não foi irradiada sendo portanto considerada como tempo zero. As demais placas foram irradiadas nos tempos de 2' 40"; 5' 20"; 8'; 10' 40"; 13' 20"; 16'; 18' 40" com luz ultravioleta de ondas curtas (2.537 \AA), a uma distância de 14 cm das placas. Para cada tempo foi isolado o fungo através do método de diluição e semeadura em placas de Petri contendo meio de Martin como descrito no ítem 3.6. Foram ensaiadas as linhagens E_6 e E_9 em ambos os solos.

3.10. Efeito da ultravioleta em condições naturais na germinação de conídios na superfície do solo

Pelo mesmo método da diluição e semeadura em placas de Petri contendo o meio de Martin foram preparadas 10 placas contendo solo (20 g) devidamente esterilizado. Uma das placas serviu de testemunha não sendo irradiada. As demais placas foram colocadas em lugar adequado para que pudessem receber a radiação solar nos intervalos de 7 horas da manhã às 17 horas da tarde. As placas ficaram nestas condições durante 45 dias sendo que o isolamento do fungo foi realizado após exposição do 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º, 30º e 45º dias. Os ensaios foram realizados para as linhagens E_6 e E_9 em ambos os solos com três repetições para cada linhagem.

3.11. Efeito do solo na germinação de conídios de *M. anisopliae*

Coletados os conídios, após 10 dias de incubação, foram colocados em 2,5 ml de solução "tween", desagregados, e estimado o número através do hematómetro. Após a contagem, a dispersão foi diluída num frasco de 250 ml contendo cerca de 200 ml de meio completo previamente fundido e resfriado a uma temperatura de 45°C. Lâminas de microscópio muito limpas e esterilizadas foram mergulhadas com uma pinça esterilizada na mistura de conídios com o meio de cultura. O solo utilizado foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a pressão de uma atmosfera. Este solo foi colocado num recipiente contendo 14 cm de diâmetro por 8 cm de altura. A lâmina foi enterrada verticalmente cerca de 0,5 cm após a solidificação do meio na lâmina, com uma espátula adicionou-se solo até cobrir por completo a lâmina. Foram elaboradas 4 lâminas e as observações foram realizadas a partir de 10, 16, 40 e 48 horas, respectivamente. A contagem foi realizada baseando-se em 50 esporos observados aleatoriamente. Com este método foram ensaiadas as linhagens E₆ e E₉ em ambos os solos esterilizados, e em solos não esterilizados.

4. RESULTADOS

4.1: Números, porcentagens relativas e curvas de sobrevivência de conídios de linhagens de *M. anisopliae* após tratamento com luz ultravioleta (U.V.)

Os ensaios com luz ultravioleta (U.V.) foram realizados conforme os procedimentos descritos no item 3.4:

1.

Os resultados dos números e porcentagens relativas dos conídios sobreviventes estão registrados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 e 5, respectivamente. As Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 mostram, respectivamente, as curvas de sobrevivência à luz U.V.

Tabela 1. Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem A₁₉ de *M. anisopliae* ao tratamento com luz U.V.

Tempo (min)	1a. Repetição		2a. Repetição		Média
	conídios viáveis/ml	% sobrevivência	conídios viáveis/ml	% sobrevivência	
0	22,1x10 ⁴	100,00	27,15x10 ⁴	100,00	100,00
1	15,15x10 ⁴	68,50	15,27x10 ⁴	56,26	62,38
2	3,5x10 ⁴	16,06	3,9x10 ⁴	14,36	15,21
4	1,1x10 ³	0,45	1,8x10 ³	0,66	0,53
8	0,28x10 ²	0,012	0,52x10 ²	0,019	0,015

Tabela 2. Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem E₆ de *M. anisopliae* ao tratamento com luz U.V.

Tempo (min)	1a. Repetição		2a. Repetição		Média
	conídios viáveis/ml	% sobrevivência	conídios viáveis/ml	% sobrevivência	
0	4,45x10 ⁵	100,00	1,05x10 ⁵	100,00	100,00
1	2,57x10 ⁵	57,80	1,10x10 ⁵	105,00	81,40
2	14,82x10 ⁴	33,80	3,5x10 ⁴	33,33	33,30
4	2,25x10 ³	0,50	1,9x10 ³	1,80	1,15
8	36,2x10 ²	0,081	2,9x10 ²	0,028	0,054

Tabela 3. Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem E₉ de *M. anisopliae* ao tratamento com luz U.V.

Tempo (min)	1a. Repetição		2a. Repetição		Média
	conídios viáveis/ml	% sobrevivência	conídios viáveis/ml	% sobrevivência	
0	2,12x10 ⁵	100,00	0,95x10 ⁵	100,00	100,00
1	1,32x10 ⁵	62,30	0,85x10 ⁵	89,50	75,90
2	1,17x10 ⁴	5,53	2,77x10 ⁴	29,20	17,30
4	1,05x10 ³	0,49	2,67x10 ³	2,81	1,65
8	8,07x10 ²	0,0038	3,12x10 ²	0,033	0,018

Tabela 4. Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem K de *M. anisopliae* ao tratamento com luz U.V.

Tempo (min)	1a. Repetição		2a. Repetição		Média
	conídios viáveis/ml	% sobrevivência	conídios viáveis/ml	% sobrevivência	
0	1,9x10 ⁵	100,00	1,97x10 ⁵	100,00	100,00
1	1,06x10 ⁵	55,00	2,05x10 ⁵	103,00	79,00
2	3,05x10 ⁴	18,40	8,48x10 ⁴	42,90	30,65
4	1,35x10 ³	0,71	16,2x10 ³	8,20	4,45
8	0,4x10 ²	0,02	0,42x10 ²	0,021	0,011

Tabela 5. Número e porcentagem relativa de conídios sobreviventes da linhagem M de *M. anisopliae* ao tratamento com luz U.V.

Tempo (min)	1a. Repetição		2a. Repetição		Média
	conídios viáveis/ml	% sobrevi vência	conídios viáveis/ml	% sobrevi vência	
0	$120,72 \times 10^4$	100,00	$31,1 \times 10^4$	100,00	100,00
1	$22,77 \times 10^4$	18,86	$20,24 \times 10^4$	65,32	42,09
2	$9,47 \times 10^4$	7,84	$18,42 \times 10^4$	59,43	33,68
4	$9,8 \times 10^3$	0,81	$19,37 \times 10^3$	6,25	3,53
8	$2,0 \times 10^2$	0,016	$5,1 \times 10^2$	0,16	0,088

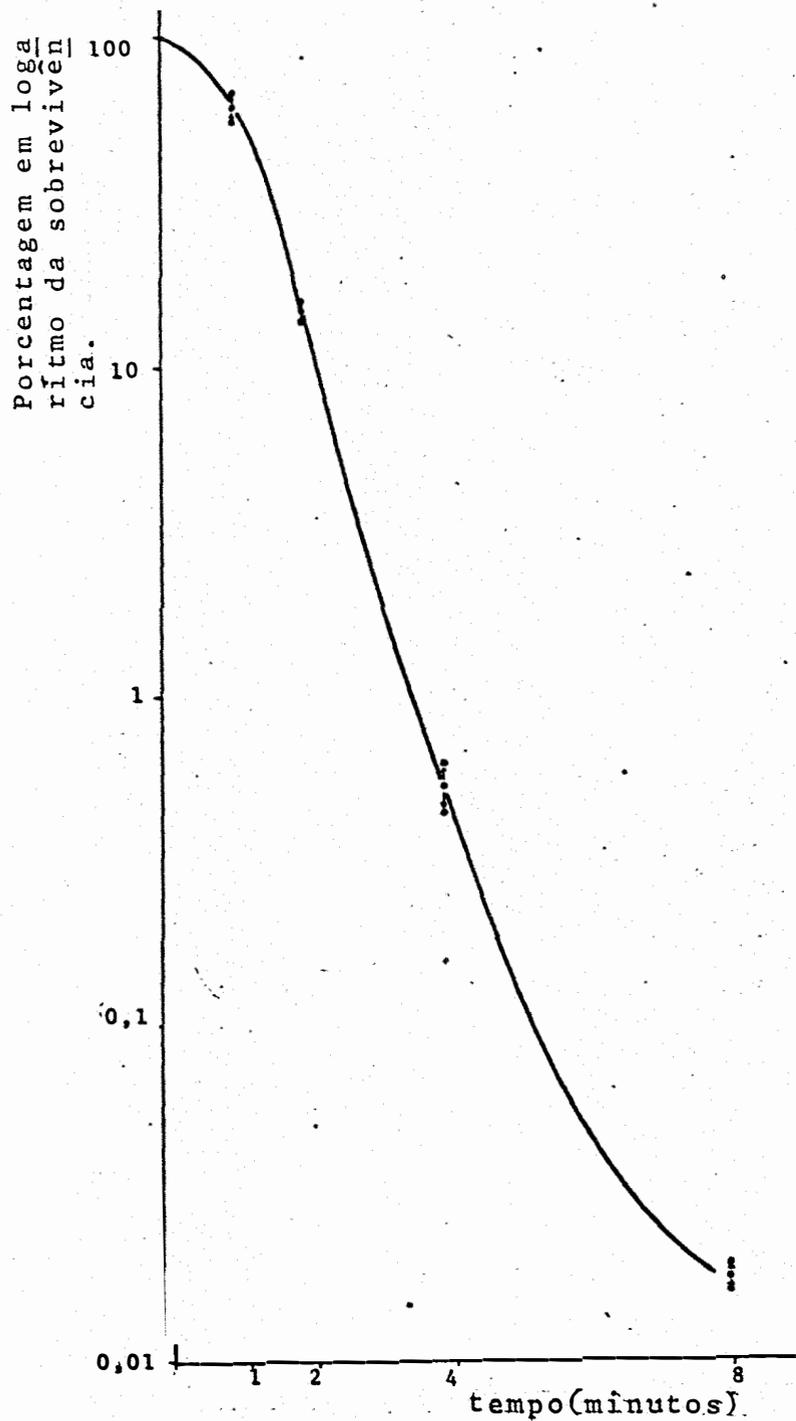


Figura 1. Curva de sobrevivência da linhagem A₁₉ de *M. anisopliae* à luz ultravioleta.

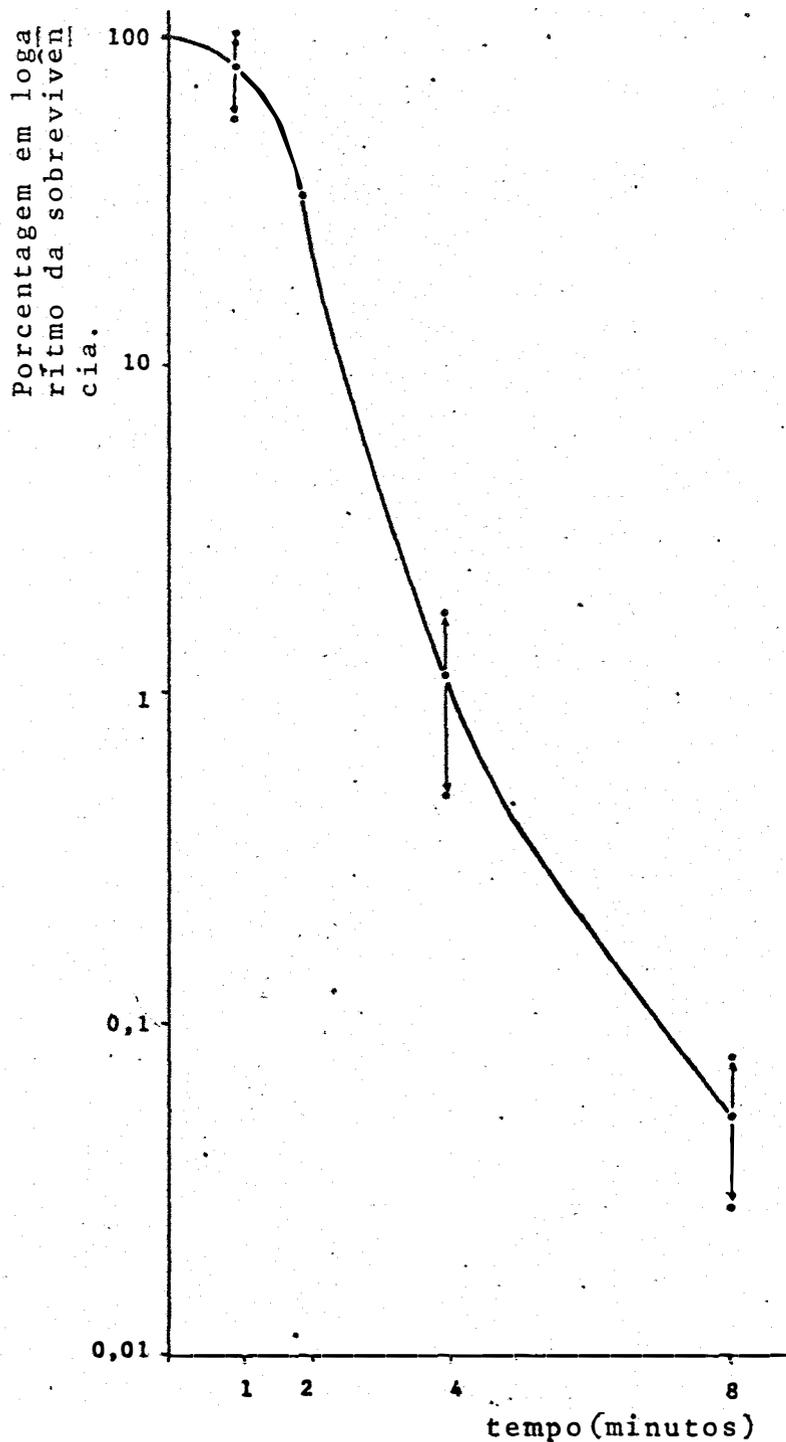


Figura 2: Curva de sobrevivência da linhagem E₆ de *M. anisopliae* à luz ultra violeta.

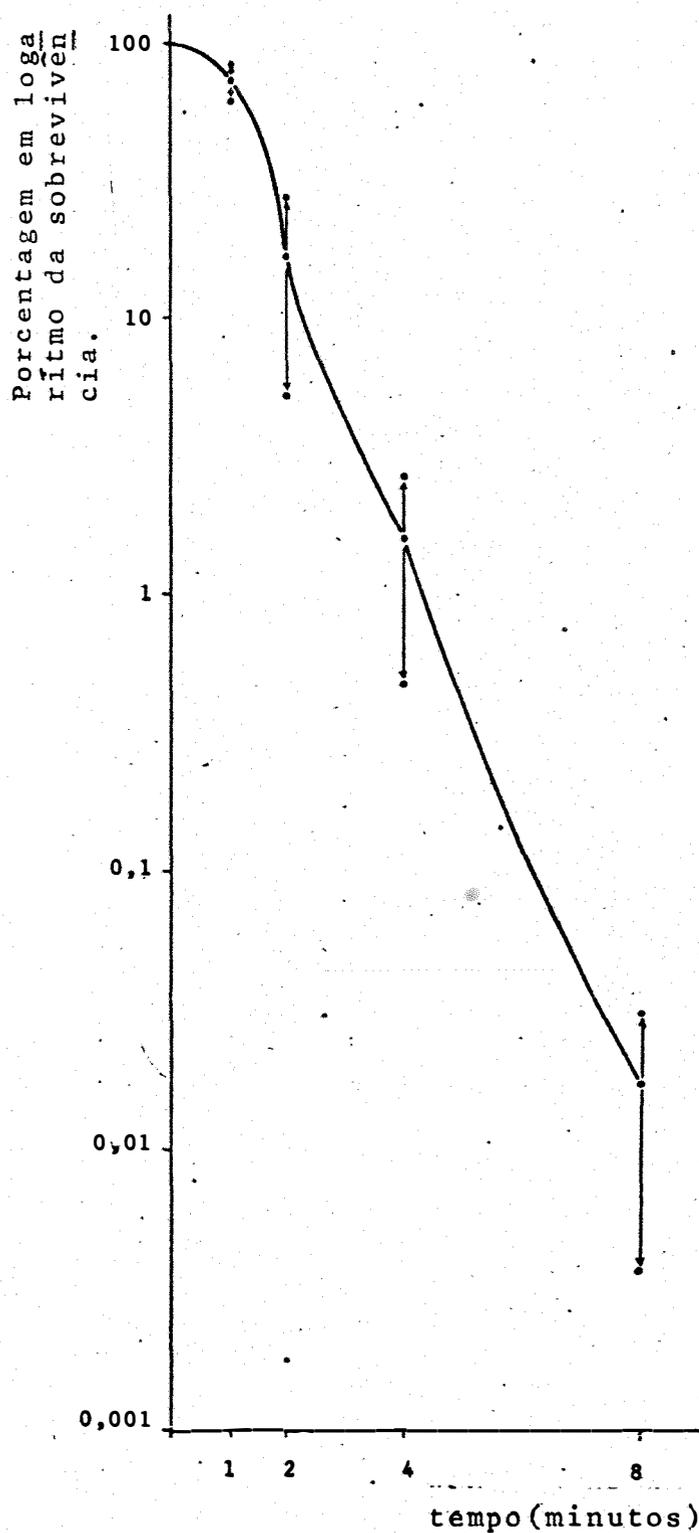


Figura 3. Curva de sobrevivência da linhagem E₉ de *M. anisopliae* à luz ultravioleta.

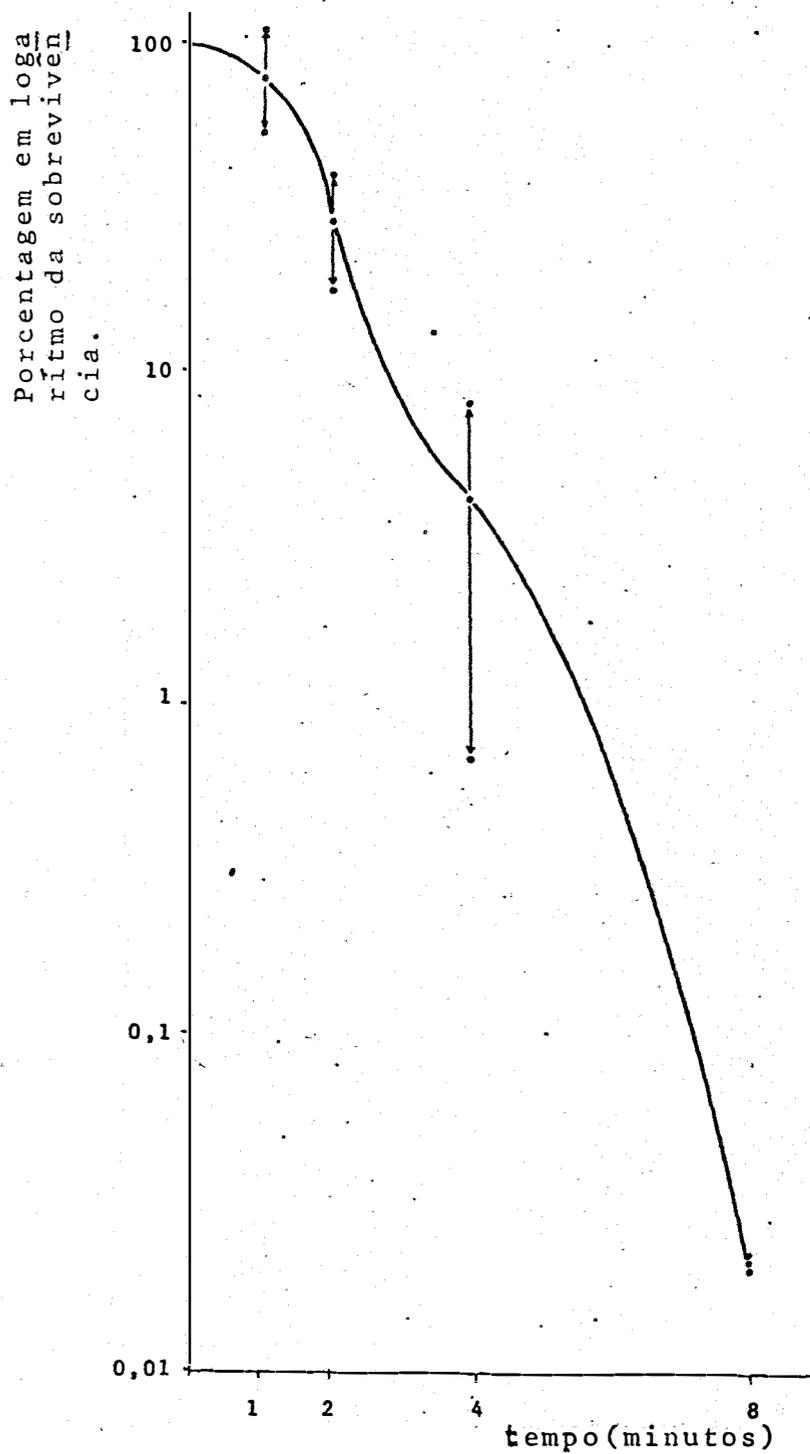


Figura 4. Curva de sobrevivência da linhagem K de *M. anisopliae* à luz ultravioleta.

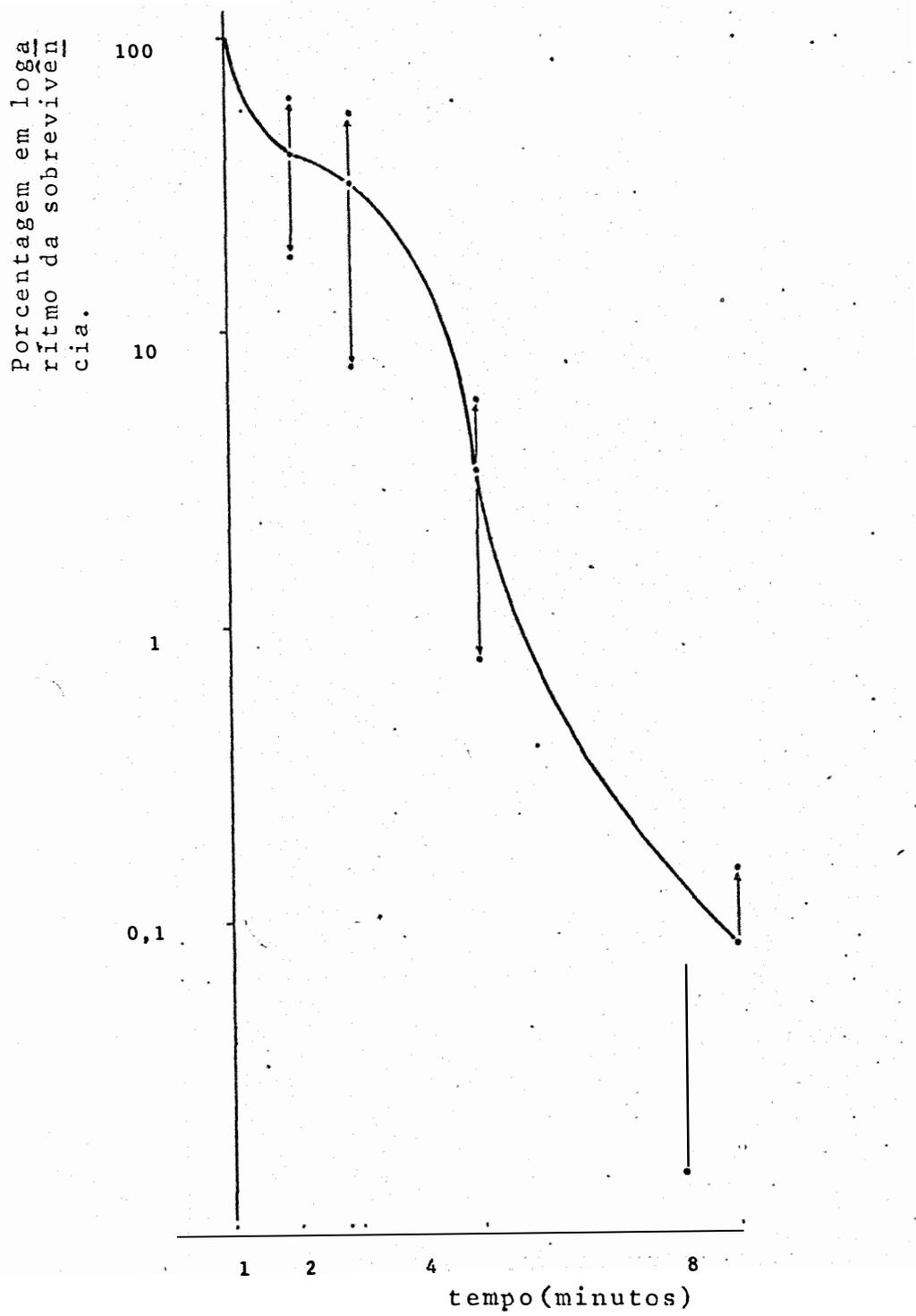


Figura 5. Curva de sobrevivência da linhagem M de *M. anisopliae* à luz ultravioleta.

4.2. Determinação da viabilidade de germinação de conídios semeados na superfície do solo após radiação com luz ultravioleta

Conforme procedimento descrito no item 3.8. foi determinada a viabilidade de germinação de conídios na superfície do solo após 2'40" de radiação com luz ultravioleta de energia de $104,5 \text{ cal cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$. O ensaio foi realizado para as linhagens A₁₉, E₆, E₉, K e M para ambos os solos e os resultados estão sumarizados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

4.3. Efeito da luz ultravioleta na germinação de conídios de *M. anisopliae* após diferentes tempos de radiação na superfície do solo

As Tabelas 8, 9, 10 e 11 sumarizam os resultados obtidos após radiação com luz ultravioleta em tempos acumulados de acordo com o procedimento descrito no item 3.9, para as linhagens E₆ e E₉ em ambos os solos.

4.4. Efeito da radiação solar na germinação de conídios de *M. anisopliae* na superfície do solo após 45 dias de exposição

As Tabelas 12, 13, 14 e 15, sumarizam os resultados obtidos segundo procedimento descrito no item 3.10, após 45 dias de exposição à radiação natural do solo.

Tabela 6. Determinação da viabilidade de germinação de conídios de *M. anisopliae* na superfície do solo Ibitiruna após radiação com luz U.V.

Linhagem	Nº de conídios		Nº de conídios		% Sobrevivência	
	Contagem (Hematímetro)	Não Irradiado	Irradiado	Irradiado	Não Irradiado	Irradiado
A ₁₉	3,36x10 ⁷	6,2x10 ⁴	3,1x10 ⁴	100	50,00	
E ₆	4,2x10 ⁷	18,37x10 ⁴	9,32x10 ⁴	100	54,00	
E ₉	5,36x10 ⁷	12,32x10 ⁴	8,4x10 ⁴	100	68,18	
K	3,38x10 ⁷	10,32x10 ⁴	5,5x10 ⁴	100	53,29	
M	3,37x10 ⁷	6,5x10 ⁴	3,06x10 ⁴	100	47,07	

Obs: Resultado é média de duas repetições

Tabela 7. Determinação da viabilidade de germinação de conídios de *M. anisopliae*, na superfície do solo Pau D'Alho após radiação com luz U.V.

Linhagem	Nº de conídios		Nº de conídios		% Sobrevivência	
	Contagem (Hematímetro)	Não Irradiado	Irradiado	Não Irradiado	Irradiado	
A ₁₉	$3,36 \times 10^7$	$5,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$		100	24,52
E ₆	$4,2 \times 10^7$	$14,75 \times 10^4$	$7,98 \times 10^4$		100	54,10
E ₉	$5,36 \times 10^7$	$18,24 \times 10^4$	$8,75 \times 10^4$		100	47,97
K	$3,38 \times 10^7$	$2,9 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$		100	37,93
M						

Obs: Resultado é média de duas repetições

Tabela 8. Efeito da luz ultravioleta na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₆ na superfície do solo Pau D'Alho.

Tempo	1a. Repetição		2a. Repetição		3a. Repetição		% Média
	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	
0	11,5x10 ³	100	13,2x10 ³	100	12,6x10 ³	100	100
2'40"	6,7x10 ³	58,26	7,1x10 ³	53,78	6,8x10 ³	53,96	55,3
5'20"	5,2x10 ³	45,21	5,7x10 ³	43,18	5,0x10 ³	39,68	42,69
8'	4,3x10 ³	37,39	4,7x10 ³	35,60	4,0x10 ³	31,74	34,91
10'40"	3,2x10 ³	27,82	3,8x10 ³	28,78	3,3x10 ³	26,19	27,59
13'20"	2,6x10 ³	22,60	3,0x10 ³	22,72	2,8x10 ³	22,22	22,51
16'	2,0x10 ³	17,39	2,4x10 ³	18,18	2,2x10 ³	17,46	17,67
18'40"	1,17x10 ³	10,17	1,19x10 ³	9,01	2,0x10 ³	15,87	11,68

Tabela 9. Efeito da luz ultravioleta na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linha gem E₉ na superfície do solo Pau D'Alho.

Tempo	1a. Repetição		2a. Repetição		3a. Repetição		% Média
	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	
0	8,2x10 ⁴	100	9,1x10 ⁴	100	8,6x10 ⁴	100	100
2'40"	3,1x10 ⁴	37,80	4,4x10 ⁴	48,35	4,8x10 ⁴	55,81	47,32
5'20"	2,9x10 ⁴	35,38	3,6x10 ⁴	39,56	4,6x10 ⁴	53,48	42,80
8'	2,8x10 ⁴	34,41	3,1x10 ⁴	34,06	3,9x10 ⁴	45,34	37,93
10'40"	2,5x10 ⁴	30,48	2,3x10 ⁴	25,27	3,0x10 ⁴	34,88	30,04
13'20"	2,0x10 ⁴	24,39	2,1x10 ⁴	23,07	2,6x10 ⁴	30,23	25,89
16'	1,1x10 ⁴	13,41	1,9x10 ⁴	13,07	1,9x10 ⁴	22,09	16,19
18'40"	0,9x10 ⁴	10,97	1,1x10 ⁴	12,08	1,3x10 ⁴	15,11	12,72

Tabela 10. Efeito da luz ultravioleta na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₆ na superfície do solo Ibitiruna.

Tempo	1a. Repetição		2a. Repetição		3a. Repetição	
	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação
0	13,2x10 ⁴	100	11,6x10 ⁴	100	12,8x10 ⁴	100
2'40"	6,1x10 ⁴	46,21	5,9x10 ⁴	50,86	5,8x10 ⁴	45,31
5'20"	5,9x10 ⁴	44,69	5,4x10 ⁴	46,55	5,1x10 ⁴	39,84
8'	5,xx10 ⁴	40,90	5,1x10 ⁴	43,98	5,0x10 ⁴	39,06
10'40"	4,9x10 ⁴	27,12	4,8x10 ⁴	41,37	4,9x10 ⁴	38,28
13'20"	4,8x10 ⁴	36,36	3,9x10 ⁴	33,62	3,8x10 ⁴	29,68
16'	4,4x10 ⁴	33,33	3,8x10 ⁴	32,75	3,7x10 ⁴	28,90
18'40"	4,1x10 ⁴	31,10	3,4x10 ⁴	29,31	3,1x10 ⁴	24,21
						28,20

Tabela 11. Efeito da luz ultravioleta na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₉ na superfície do solo Ibitiruna.

Tempo	1a. Repetição			2a. Repetição			3a. Repetição		
	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	% Média
0	18,21x10 ⁴	100	12,2x10 ⁴	100	12,9x10 ⁴	100	100	100	100
2'40"	8,69x10 ⁴	47,72	5,32x10 ⁴	43,60	5,11x10 ⁴	39,61	43,64	43,64	43,64
5'20"	8,1x10 ⁴	44,48	4,9x10 ⁴	40,16	4,7x10 ⁴	36,43	40,35	40,35	40,35
8'	7,4x10 ⁴	40,63	4,7x10 ⁴	38,52	4,6x10 ⁴	35,65	38,26	38,26	38,26
10'40"	7,0x10 ⁴	38,44	4,2x10 ⁴	34,42	4,0x10 ⁴	31,00	34,62	34,62	34,62
13'20"	5,2x10 ⁴	28,55	4,0x10 ⁴	32,78	3,7x10 ⁴	28,68	30,00	30,00	30,00
16'	4x8x10 ⁴	26,35	3,2x10 ⁴	26,22	3,1x10 ⁴	24,03	25,53	25,53	25,53
18'40"	3,9x10 ⁴	21,41	3,1x10 ⁴	25,40	3,0x10 ⁴	23,25	23,35	23,35	23,35

Tabela 12. Efeito da radiação solar na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₆ na superfície do solo Ibitiruna

Tempo Dias	1a. Repetição		2a. Repetição		3a. Repetição	
	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação
0	2,47x10 ⁴	100	3,01x10 ⁴	100	2,96x10 ⁴	100
1	2,2x10	89,06	2,81x10	93,35	2,71x10	91,55
2	1,85x10	74,89	2,63x10	87,37	2,40x10	81,08
3	1,55x10	62,75	2,01x10	66,77	2,01x10	67,90
4	0,87x10	35,22	1,71x10	56,81	1,86x10	62,83
5	0,77x10	31,17	1,70x10	56,47	1,65x10	55,74
6	0,97x10	39,67	0,69x10	22,92	1,61x10	54,39
7	0,09x10	36,43	0,70x10	56,47	1,64x10	55,40
30	0,49x10	19,83	0,55x10	18,27	0,9x10.	30,40
45	0,34x10	13,76	0,41x10	13,62	0,30x10	10,13
						12,50

Obs: A porcentagem de sobrevivência para a linhagem E₆, após 45 dias em condições de sombra foi de 65,20 no solo da Série Ibitiruna.

Tabela 13. Efeito da radiação solar na germinação de conídios de *M. anisopliae*, na linhagem E₉ na superfície do solo Ibitiruna

Tempo Dias	1a. Repetição		2a. Repetição		3a. Repetição		
	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	% Média
0	2,56x10 ⁴	100	2,91x10 ⁴	100	3,36x10 ⁴	100	100
1	2,20x10 ⁴	85,93	2,70x10 ⁴	92,78	2,09x10 ⁴	62,20	80,30
2	1,90x10 ⁴	74,21	2,65x10 ⁴	91,06	2,65x10 ⁴	78,86	81,37
3	1,54x10 ⁴	60,15	1,73x10 ⁴	59,45	2,02x10 ⁴	60,11	59,90
4	1,01x10 ⁴	39,45	1,72x10 ⁴	59,10	1,71x10 ⁴	50,89	59,10
5	0,91x10 ⁴	35,54	1,69x10 ⁴	58,07	1,72x10 ⁴	51,19	48,26
6	0,81x10 ⁴	31,64	0,65x10 ⁴	22,33	1,70x10 ⁴	50,59	34,85
7	0,90x10 ⁴	35,15	0,62x10 ⁴	21,30	1,51x10 ⁴	44,94	33,79
30	0,43x10 ⁴	16,79	0,51x10 ⁴	17,52	0,49x10 ⁴	14,58	16,29
45	0,31.10 ⁴	12,10	0,29x10 ⁴	9,96	0,40x10 ⁴	11,90	11,32

Obs: A sobrevivência da linhagem E₉ no solo da Série Ibitiruna após 45 dias em condições de sombra foi de 62,03%.

Tabela 14. Efeito da radiação solar na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₆ na superfície do solo Pau D'Alho.

Tempo Dias	1a. Repetição		2a. Repetição		3a. Repetição	
	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação
0	3,01x10 ⁴	100	2,21x10 ⁴	100	3,34x10 ⁴	100
1	2,79x10 ⁴	92,69	2,01x10 ⁴	90,95	2,89x10 ⁴	86,52
2	2,75x10 ⁴	91,36	1,93x10 ⁴	87,33	2,69x10 ⁴	80,53
3	1,99x10 ⁴	66,11	1,90x10 ⁴	85,97	2,63x10 ⁴	78,74
4	1,70x10 ⁴	56,47	1,02x10 ⁴	46,15	1,71x10 ⁴	51,19
5	1,69x10 ⁴	63,12	0,91x10 ⁴	41,17	1,70x10 ⁴	50,89
6	1,71x10 ⁴	56,81	0,85x10 ⁴	38,46	1,2x10 ⁴	35,09
7	1,01x10 ⁴	33,35	0,80x10 ⁴	36,19	1,02x10 ⁴	30,53
30	0,78x10 ⁴	25,91	0,39x10 ⁴	17,64	0,71x10 ⁴	21,25
45	0,39x10 ⁴	12,95	0,19x10 ⁴	8,59	0,41x10 ⁴	12,27

Obs: A sobrevivência da linhagem E₆ no solo da Série Pau D'Alho, após 45 dias em condições de sombra foi de 50,8%

Tabela 15. Efeito da radiação solar na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₉ na superfície do solo Pau D'Alho.

Tempo Dias	1a. Repetição			2a. Repetição			3a. Repetição		
	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	Nº de Conídios	% de Germinação	% Média
0	2,98x10 ⁴	100	3,12x10 ⁴	100	2,37x10 ⁴	100	100	100	100
1	2,72x10 ⁴	91,27	2,91x10 ⁴	93,26	2,10x10 ⁴	88,60	88,60	91,04	91,04
2	2,69x10 ⁴	90,26	2,69x10 ⁴	86,21	1,91x10 ⁴	80,59	80,59	85,68	85,68
3	2,64x10 ⁴	88,59	2,65x10 ⁴	84,93	1,8x10 ⁴	75,94	75,94	83,15	83,15
4	2,01x10 ⁴	67,44	2,0x10 ⁴	64,10	1,76x10 ⁴	71,72	71,72	67,75	67,75
5	1,72x10 ⁴	57,71	1,91x10 ⁴	61,21	1,36x10 ⁴	57,38	57,38	68,76	68,76
6	1,37x10 ⁴	45,97	1,89x10 ⁴	60,57	1,71x10 ⁴	72,15	72,15	59,36	59,36
7	1,39x10 ⁴	46,64	1,35x10 ⁴	43,26	1,29x10 ⁴	54,27	54,27	48,05	48,05
30	0,68x10 ⁴	22,81	0,81x10 ⁴	25,96	0,71x10 ⁴	29,95	29,95	26,24	26,24
45	0,29x10 ⁴	9,73	0,41x10 ⁴	13,14	0,31x10 ⁴	13,08	13,08	11,98	11,98

Obs: A sobrevivência da linhagem E₉ no solo da Série Pau D'Alho após 45 dias em condições de sombra foi de 52,37%.

4.5. Efeito do solo na germinação de conídios de *M. anisopliae*

As Tabelas 16, 17, 18 e 19, mostram respectivamente, os resultados de ensaios com solos Ibitiruna e Pau D'Alho, conforme procedimento descrito no item 4.11.

Tabela 16. Efeito do solo Ibitiruna na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₆.

Tempo Horas	1a.Repetição % Germinação		2a.Repetição % Germinação	
	Solo Esterilizado	Solo Natural	Solo Esterilizado	Solo Natural
10	70-73	3	69-71	2
16	80-84	2	75-80	3
40	85-90	3	82-85	0
48	93	5	95	4

Tabela 17. Efeito do solo Ibitiruna na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₉.

Tempo Horas	1a.Repetição % Germinação		2a.Repetição % Germinação	
	Solo esterilizado	Solo Natural	Solo esterilizado	Solo Natural
10	60-65	1	55-60	0
16	70-75	2	70	3
40	80	1	80-85	2
48	90-95	3	95	0

Tabela 18. Efeito do solo Pau D'Alho na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₆.

Tempo Horas	1a.Repetição % Germinação		2a.Repetição % Germinação	
	Solo esterilizado	Solo Natural	Solo esterilizado	Solo Natural
10	40-45	0	30-35	0
16	45-50	0	40	0
40	55	1	45-50	2
48	60-65	2	55	0

Tabela 19. Efeito do solo Pau D'Alho na germinação de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₉.

Tempo Horas	1a.Repetição % Germinação		2a.Repetição % Germinação	
	Solo Esterilizado	Solo Natural	Solo Esterilizado	Solo Natural
10	40	1	40-45	0
16	45-50	1	50	2
40	55-60	0	50-55	0
48	65	1	60	1

4.6. Isolamento dos fungos existentes no solo

Os principais gêneros encontrados nos solos foram gentilmente isolados pelo Prof. José Carlos Matyis do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP. Dentre estes, os gêneros encontrados no solo arenoso foram: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Alternaria* e *Fusarium*. No solo argiloso foram isolados: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Rhisopus*, *Absidia*, *Phytium*, *Choetonium*, *Botrytis*, *Fusarium*.

Como pode-se verificar, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Fusarium* foram encontrados em ambos os solos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito da luz ultravioleta na sobrevivência de conídios de linhagens de *M. anisopliae*

Conforme as Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 e figuras 1, 2, 3, 4 e 5 verificou-se que a luz ultravioleta apresenta propriedades letais aos conídios das linhagens ensaiadas, pois, em todos os casos, após 8 minutos de radiação, a porcentagem bem como o número de conídios viáveis por ml é muito baixa. Verificou-se também que as curvas de sobrevivência das linhagens ensaiadas mostraram haver diferenças das mesmas quanto à sensibilidade para o comprimento de onda utilizado (2.537 Å). Do mesmo modo, esta mesma característica foi observada em outras linhagens (SILVEIRA, 1983). Assim, o caráter resistência à radiação solar pode vir a ser melhora

do também por recombinação através do ciclo parassexual recentemente determinado (MESSIAS e AZEVEDO, 1980) ou por fusão de protoplasto (SILVEIRA, 1983). Por outro lado, os resultados apresentados mostraram que a luz ultravioleta poderia ser utilizada como um bom agente mutagênico no sentido da obtenção de mutantes, como foi verificado por MESSIAS (1979); MESSIAS e AZEVEDO (1980) e AL-AIDROOS (1980) e vem sendo realizado por MESSIAS e col. (1982), onde foi obtida uma série de mutantes morfológicos para a síntese de um aminoácido e várias vitaminas, com as linhagens F₈₄ e V₁₄ de *M. anisopliae*. Verificou-se também que esses dados são muito semelhantes aos obtidos por SANTOS (1978) o qual observou que a radiação ultravioleta foi bastante eficiente em causar mortalidade nos conídios.

Assim, para um controle mais eficiente, poder-se-ia pensar no isolamento de linhagens mutantes resistentes à radiação ultravioleta visto que os trabalhos e experimentos com o fungo *M. anisopliae*, com o objetivo de controle microbiológico estão sendo incrementados em várias regiões do Brasil, principalmente no Nordeste.

5.2. Germinação de conídios semeados na superfície do solo após radiação com luz ultravioleta

Verificou-se pelos resultados das Tabelas 6 e 7 que todas as linhagens ensaiadas apresentaram um decréscimo quanto à viabilidade de germinação, após a radiação. No solo da Série Ibitiruna, a média de sobrevivência foi em torno de 54% enquanto que o solo da Série Pau D'Alho apresentou uma porcentagem de sobrevivência em torno de 37%.

Considerando as características morfológicas e químicas de ambos os solos, pode-se sugerir que no solo da Série Ibitiruna houve maior resistência para as cinco linhagens ensaiadas, possivelmente, devido à textura do referido solo, que é bastante arenoso em relação ao solo da Série Pau D'Alho. AQUINO (1974) obteve resultados semelhantes quando verificou que conídios do fungo *M. anisopliae*, semeados no solo e colocados recebendo luz direta do solo, apresentaram elevado índice de mortalidade em relação aos conídios que não receberam luz direta do sol.

Quanto à matéria orgânica, esta tem influência na germinação dos conídios agindo como microsubstrato, sendo que quanto maior o teor de matéria orgânica do solo, maior índice de sobrevivência ocorrerá, como verificou OLIVEIRA (1981). Possivelmente, nesse experimento a matéria or

gânica não teve qualquer efeito, visto que os solos ensaiados foram esterilizados. Verificou-se também que o pH deve ter influenciado muito pouco, visto que MASERA (1957) observou que o fungo *M. anisopliae* é capaz de crescer em solos que tenham pH entre 2.0 e 10.0.

5.3. Efeitos cumulativos da radiação ultravioleta na germinação de conídios das linhagens E₆ e E₉ de *M. anisopliae* semeados no solo

Verificou-se, pelos dados das Tabelas 8, 9, 10 e 11, que realmente a radiação ultravioleta tem efeitos cumulativos em relação a sobrevivência de conídios na superfície do solo. Pode-se verificar que, com 18 minutos e 40 segundos de radiação contínua, a média de sobrevivência para as linhagens E₆ e E₉ no solo da Série Ibitiruna foi de 25,77% e no solo Série Pau D'Alho foi de 12,20%. Esses dados confirmam os resultados anteriores em relação à natureza de ambos os solos, demonstrando que realmente o solo arenoso apresenta propriedades que oferecem maior proteção aos conídios semeados. Possivelmente isso possa ser explicado considerando-se as características morfológicas de ambos os solos, isto é, os solos argilosos apresentam superfície mais lisa que os arenosos, fazendo com que um maior número de conídios fi-

que diretamente exposto a radiação ultravioleta, ocorrendo conseqüentemente maior índice de mortalidade. Considerando-se a propriedade, verifica-se que nos solos arenosos predominam maior quantidade de macroporos em relação aos solos argilosos, proporcionando maior proteção, contra a radiação. FREIRE (1975) observou que os solos argilosos retêm com maior tensão o mesmo volume de água que o solo arenoso, diminuindo, portanto, o teor de oxigênio livre do solo argiloso, dificultando a germinação do fungo.

5.4. Efeito da radiação solar direta na germinação de conídios das linhagens E₆ e E₉ de *M. anisopliae* semeados no solo

Pelos resultados das Tabelas 12, 13, 14 e 15, verificou-se também que a radiação solar tem influência na viabilidade de germinação de conídios semeados na superfície do solo. Isto está de acordo com os dados de AQUINO (1974), que obteve resultados semelhantes, observando que os conídios do fungo *M. anisopliae*, semeados no solo, apresentavam maior índice de mortalidade quando recebiam luz direta do sol em relação aos conídios que não recebiam luz direta.

Observou-se também que a mortalidade dos coní

dios que ficaram sem receber radiação solar foi bem menor em relação aos conídios que receberam radiação solar direta. Isto sugere que a viabilidade de germinação de conídios, quando semeados no solo, tende a diminuir mais rapidamente quando a luz do sol atinge diretamente o solo e de uma forma mais suave quando o solo não recebe luz direta do sol.

MÜLLER-KÖGLER (1967) mostrou que a radiação solar, possivelmente o espectro ultravioleta, é letal para os esporos, podendo ser talvez um dos fatores responsáveis pelo fracasso de possíveis tentativas de controle como foi verificado por AQUINO (1974). Embora pouco se saiba sobre o assunto, alguns ensaios já foram realizados com resultados negativos talvez devido à propriedade letal do espectro ultravioleta da radiação solar (AZEVEDO, comunicação pessoal).

Esses resultados concordam com os de MÜLLER-KÖGLER (1967), o qual observou que a porcentagem de germinação, nas primeiras 24 horas, foi mais elevada no escuro que na luz. Por outro lado, SANTOS (1978), verificou que a produção de conídios de *M. anisopliae* foi bem maior sob luz contínua do que sob luz alternada ou escuro total.

MATTA e OLIVEIRA (1978) estudaram a influência da luz contínua e escuro total, verificando que o fator

luz é fundamental na conidiação e que, para uma esporulação mais abundante, há necessidade de uma luminosidade mínima, constante, de 144 horas após a inoculação.

Observou-se que os dados obtidos em ambos os solos, com as respectivas linhagens, complementam-se. Sob luz direta do sol decresceu a viabilidade de germinação proporcionalmente ao tempo de exposição. Em condições de sombra, o decréscimo na porcentagem de germinação também é verificado, porém de uma maneira mais lenta, como pode-se observar. Possivelmente, a causa da maior mortalidade dos conídios, quando submetidos à exposição direta da luz solar, além dos fatores morfológicos do solo e luminosidade, é importante observar também a temperatura. Segundo BALFOUR-BROWNE (1960), MASERA (1957) e DIOMANDÉ (1969) a temperatura ótima para o crescimento do fungo de *M. anisopliae* está entre 25°C e 30°C e a máxima entre 32°C e 34°C.

SANTOS (1978) verificou que a temperatura de 37°C, nas condições de 96 horas ou mais, já era suficiente para causar a morte dos conídios. Assim, um trabalho visando a um melhoramento genético de linhagens selvagens de *M. anisopliae* através do isolamento de mutantes mais resistentes à temperatura e à ação letal da luz ultravioleta, pode ser de elevada importância para trabalhos de controle bioló

gico utilizando este fungo.

5.5. Efeito do solo na germinação de conídios das linhagens E_6 e E_9 de *M. anisopliae*

Conforme as Tabelas 16 a 19, verificou-se que as linhagens E_6 e E_9 de *M. anisopliae* mostraram o mesmo tipo de comportamento reagindo diferentemente em relação aos dois tipos de solos. Observou-se, comparando-se as Tabelas, que no solo argiloso ocorreu maior porcentagem de germinação, sendo que a quantidade de conídios foi a mesma para ambos os solos. Nas mesmas Tabelas acima verificou-se que a viabilidade de germinação, quando o ensaio ocorre em solos esterilizados, porém, a germinação decresce muito, chegando às vezes se tornar ausente, quando o experimento é realizado em solos não esterilizados.

CHINN (1965) verificou resultados semelhantes quando estudou o comportamento dos fungos quantitativa e qualitativamente, em solos esterilizados e não esterilizados, notando que nos solos não esterilizados os conídios germinavam após algumas horas de semeados e posteriormente eram destruídos.

CHAVES e col. (1981) verificaram que *M. aniso*

pliae tem seu potencial de sobrevivência no solo na forma de conídios, por um período mínimo de 90 dias. Estabeleceram também que $1,46 \times 10^6$ conídios viáveis por grama de solo são suficientes para manter estes microrganismos de uma maneira saprofítica, pelo mesmo período. Portanto, verifica-se que é muito importante considerarmos esses fatos para qualquer ensaio de controle biológico visto que existe uma interdependência entre o microrganismos e o ambiente do solo.

Esses resultados estão de acordo com os de LOOCKOOD (1969) quando testou a viabilidade da germinação de 19 fungos em relação ao solo, comparando a germinação em solos esterilizados em autoclave e em solos não esterilizados, verificando que a germinação foi muito maior em solos esterilizados do que em condições naturais.

6. CONCLUSÕES

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

a. Os solos argilosos são menos eficazes em relação aos arenosos para manter a viabilidade dos conídios sob radiação ultravioleta.

b. O tempo de exposição dos conídios, na superfície do solo, à radiação ultravioleta é proporcional à porcentagem de mortalidade em ambos os solos.

c. A viabilidade de germinação dos conídios foi afetada tanto em solo esterilizado como em solo natural,

porém, decresceu mais pronunciadamente no solo natural.

d. A viabilidade de germinação de conídios semeados na superfície do solo, em condições de campo, tende a diminuir proporcionalmente ao tempo de exposição à radiação solar.

e. Os conídios semeados em condições de campo recebendo exposição direta da luz solar apresentam maior taxa de mortalidade com relação aos conídios em condições de sombra.

7. LITERATURA CITADA

- AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 22:309-314.
- AQUINO, M.L.N., 1974. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. *Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas*, Recife, 72:1-26.
- AUDEMARD, H.; DREVET, C., 1981. A new pest of strawberry, *Otiorhynchus meridionalis*. *Phytoma*, 329:15-17.
- AZEVEDO, J.L.; CHACEL, N.M.; TIMO, P., 1981. Resistência à luz ultravioleta e mutantes de *Metarhizium anisopliae*. Resumos do VIII Reunião da Genética de Microrganismos. p.1.

AZEVEDO, J.L. e COSTA, S.O.P., 1973. Exercícios práticos de Genética, ed. USP. 288p.

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

AZEVEDO, J.L.; CHACEL, N.M. e KITAJIMA, E.W., 1982. Ultra-estrutura de protoplastos de *Metarhizium anisopliae*. Comunicação referente ao controle biológico apresentada na IX^a Reunião de Genética de Microrganismos. Brasília.

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

BOLKAN, H.A.; DIANESE, J.C.; CUPERTINO, F.P., 1979. Survival and colonization potential of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in soil. *Phytopathology*, 12:1298-1301.

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

- CAMARGO, M.P.A., 1981. Patogenicidade de *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no controle da largarta-de-girassol, *Chlosyne lacinia* Jaundersii Doubleday e Hewintron, em laboratório. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, nº 2. p.9.
- CAMERON, J.W.M., 1963. Factors affecting the use of microbial pathogens in insect control. *Annual Review of Entomology*, 8:265-286.
- CHAMBERS, S.C., 1969. Relative effects of soil nitrogen and soil organisms on survival of *Ophiobolus graminis*. *Australian Journal Biology Science*, 104:74-78.
- CHAVES, G.M.; OLIVEIRA, D.P.; LOURES, G.E., 1981. Estudo comparativo da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes tipos de solo. *Revista Theobroma*, 11:233-239.
- CHINN, S.H.F., 1953. A slide technique for the study of fungi and actinomycetes in soil with special reference to *Helminthosporium sodivum*. *Canadian Journal of Botany*, 31:718-724.
- COCHRANE, V.W., 1958. *Physiologi of fungi*. New York, John Wiley and Sons, Inc. 524p.

CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L., 1980.

Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*.

Experientia, 36:293-294.

DAOUST, A.; ROBERTS, D.W., 1982. Virulence of natural and

insect-passaged strains of *M. anisopliae* to mosquito

larval. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40:107-117.

DE BACH, P., 1968. Control biológico de las plagas de

insectos y malas hierbas. Mexico, D.F. Compañía Editorial

Continental S.A. 949p.

DIOMANDE, T., 1969. Contribution to the study of the

development of the green muscardine fungus *M. anisopliae* on *O. monoceros* larvae. *Bulletin of Institute Fondan*

Afrique Noire, Serv., 31:1381-1405.

ENGLANDER, L.; TURBITT, W., 1979. Increased chlamidospore

production by *Phytophthora cinnamomi* using sterols and

near-ultraviolet light. *Phytopathology*, 69:813-816.

FERRON, P., ROBERT, P.H. e DEOTTE, A., 1975. Susceptibility

of *Orytes rhinoceros* adults to *M. anisopliae*. *Journal of*

Invertebrate Pathology, 25:313-320.

FREIRE, J.R.J., 1975. Microbiologia do Solo. Apostila. 234p. Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Porto Alegre.

GUAGLIUME, P., 1969. Las "cigarrinhas dos canaviais" in Brasil (III^o Contribución). Aspectos generales del problema con especial referencia a *Mahanarva posticata* en los Estados de Pernambuco y Alagoas. *Turrialba*, 19:321-330.

GUAGLIUMI, P., 1971. Lucha integrada contra las cigarrinhas (Homopt: Cercopidae) en el nordeste del Brasil. *Revista Peruana de Entomologia*, 14:361-368.

GUAGLIUMI, P.; MARQUES, J.E.; VILASBOAS, M.A., 1974. Contribuição ao estado da cultura de *Metarhizium anisopliae* no controle da "cigarrinha-da-folha" *Mahanarva posticata* (Stal) no nordeste do Brasil. *Boletim Técnico do CODECAP*. 52p.

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

- HÄNEL, H., 1981. A bioassay for measuring the resistance of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (fungi imperfecti) against the termite *Nasutitermes exitiosus* (Hill), Isoptera, Termitidae. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 92:9-18.
- KO, W.H.; CHOW, F.K., 1978. Soil fungistasis: role of volatile inhibitors in two soils. *Journal of General Microbiology*, 104:75-78.
- LATCH, G.C.M., 1965. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8:384-396.
- LIST, R.J. Smithsonian Meteorological Tables. Sixth Edition. Revised, 1981. p.145-148.
- LOOCKWOOD, J.L., 1974. Quantitative of a leaching model system for soil fungistasis. *Phytopathology*, 65:460-465.
- LOOCKWOOD, J.L.; LINGAPRA, B.T., 1961. The nature of the Widespread soil fungistasis. *Journal of General Microbiology*, 26:473-485.

- LOOCKWOOD, J.L.; STEINER, G.W., 1969. Soil fungistasis: Sensitivity of spores in relation time and size. *Phytopathology*, 8:1084-1092.
- MAC LEOD, D.M., CAMERON, J.W.M. e SOPER, R.S., 1966. The influence of environmental conditions on epizootics caused by entomogeneous fungi. *Revue Roumdeine the Biologie et Botanique*, 11:125-134.
- MARTIN, J.P., 1950. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, 69:215-232.
- MASERA, E., 1957. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, a parassita del baco da seta. *Annali della Sperimentazione Agraria*, 11:281-295.
- MATTA, E.A.F. da e OLIVEIRA, M.Z.A., 1978. Efeito da luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, "in vitro". *Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia*, Bahia. p.75.
- MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus* Link. Piracicaba, ESALQ/USP. 75p. Tese de Doutorado.

- MESSIAS, C.L. e AZEVEDO, J.L., 1980. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society, 75:473-477.
- MÜLLER-KÖGLER, E.A., 1967. Nebenwirkungen insekten-pathogener Pilze auf Mensch und Wirbeltiere: Aktuelle Fragen. *Entomophaga*, 12:429-441.
- OKU, H.; OKI, K.; SHIRAIISHI, T.; SATO, K.; OUCHI, S., 1979. Effect of fungicides, benomyk and thiran on soil microflora and some soil inhabitant fungi. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University*, 54:1-8.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MACDONALD, K.D. e BUFTON, A.W.J., 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5:141-238.
- ROBERTS, E.W., WARD, G.M.; DAOUST, R.A., 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. *Journal of Invertebrate*
- ROBINSON, R.K., 1966. Studies on penetration of insect integument by fungi. *Pest Articles and New Summarizer Sect. B.*, 12:131-142.

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

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

SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L. BARACHO, I.R., 1982. Variação de Índice Enzimático para algumas enzimas extra-celulares de *Metarhizium anisopliae* proveniente do inseto e meio de cultura. *Ciência e Cultura* 34:759 (Suplemento).

SILVA, J.C.; MESSIAS, C.L.; PIEDRABUENA, A.E., 1982. Virulência de alguns mutantes de *Metarhizium anisopliae* em *Rhodius prolixus*. *Ciência e Cultura* 35:760.

SILVEIRA, G.A.R.; MESSIAS, C.L., 1982. Infecção de *Deois* sp. por *Metarhizium anisopliae*. Tempo de penetração e colonização. *Ciência e Cultura* 34:760.

- SILVEIRA, W.E., 1983. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Mets.) Sorokin. Tese apresentada à ESALQ/USP para obtenção do grau de Mestre. 153p.
- TANADA, Y., 1964. Epizootiologia de las enfermedades de insectos. (In De BACH). Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas, 1964. 929p. 647-676.
- VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie, due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. *Mededelingem Landbourwhogeschool Wageningen, Netherland*, 68:1-77.
- VENTURA, J.A., 1981. Testes de segurança na utilização do *Metarhizium anisopliae*. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, nº 2. p.11.
- YODER, D.L.; LOCKWOOD, J.L., 1973. Fungal spore germination on natural and sterile soil. *Journal of General Microbiology*, 74:107-117.
- ZACHARUK, R.Y. e R.D. TINLINE, 1968. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and other fungi, for five elaterids (Coleoptera) in Saskatchewan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 12:294-309.