

RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS E DEFENSIVOS  
AGRÍCOLAS EM *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

OFÉLIA CLEUSA ROSANTE GOMES

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Junho, 1982

Dedico:

aos meus pais, Alayde e Braulio

meus irmãos,

ao meu marido e amigo, José Leonício

e aos meus tesouros, Mauricio e Daniela

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação e ensinamentos oferecidos não sō neste trabalho, mas durante os cursos de graduação e pós graduação e também pelo incentivo e boa vontade.

À Granja Rezende S/A (Uberlândia, M.G.) na pessoa de seu presidente, Sr. Alfredo Júlio Rezende, em cujo Laboratório de Microbiologia este trabalho foi realizado.

Ao Dr. Hwang Min Hsiung e ao Dr. Márcio Danilo B. Coutinho (Supervisores técnicos), bem como a todos os funcionários do Laboratório, pela valiosa cooperação.

Ao Dr. Sérgio Bernardes, pelo auxílio na confecção dos gráficos.

Ao José Leonício, Wagner, Alice, Terezinha, Celso, João, Rosana, Carlos, Cláudia e a toda a família, pelo incentivo e colaboração.

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1. Controle biológico e integrado: Importância e agentes responsáveis.....	7
2.2. Controle integrado e compatibilidade com de- fensivos químicos.....	9
2.3. Genética de <i>M. anisopliae</i> .....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Linhagem utilizada.....	23
3.2. Materiais.....	23
3.2.1. Meio de cultura.....	23
3.2.2. Solução de tween.....	23
3.2.3. Sais de Metais.....	24
3.2.4. Defensivos.....	24
3.2.5. Outros materiais.....	28
3.3. Métodos.....	28
3.3.1. Esterilização.....	28
3.3.2. Preparo do Inóculo.....	28
3.3.3. Preparo das soluções de sais de metais e defensivos.....	29
3.3.4. Preparo das placas.....	29
3.3.5. Inoculação das placas.....	30
3.3.6. Incubação e parâmetros de avaliação...	30
3.3.7. Análise de setores.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Influência dos sais de metais no crescimento e esporulação do <i>M. anisopliae</i> .....	32
4.1.1. Acetato de Chumbo.....	32
4.1.2. Sulfato de Cobre.....	35
4.1.3. Sulfato de Zinco.....	41



	Página
4.1.4. Sulfato de Manganês.....	49
4.1.5. Bicloreto de Mercúrio.....	57
4.2. Influência dos defensivos no crescimento e <u>es</u> porulação do <i>M. anisopliae</i> .....	63
4.2.1. Malathion.....	63
4.2.2. Dimetoato.....	66
4.2.3. Decamethrina.....	69
4.2.4. Fenvalerate.....	71
4.2.5. Bihedonal.....	76
5. CONCLUSÕES.....	81
6. LITERATURA CITADA.....	83

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro das colônias (cm), após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de acetato de chumbo. Média de 4 repetições.....	33
Tabela 2. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro das colônias (cm), após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C em meio de cultura com concentrações crescentes de sulfato de cobre. Média de 4 repetições.....	36
Tabela 3. <i>M. anisopliae</i> - Variante Cu <sub>1</sub> - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa, após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de sulfato de cobre. Média de 4 repetições.....	38
Tabela 4. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro das colônias (cm), após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de sulfato de zinco. Média de 4 repetições.....	42
Tabela 5. <i>M. anisopliae</i> - Variante Zn <sub>1</sub> - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa, após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de ZnSO <sub>4</sub> . Média de 4 repetições.....	45

	Página
Tabela 6. <i>M. anisopliae</i> - Variante Zn <sub>2</sub> - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de ZnSO <sub>4</sub> . Média de 4 repetições.....	46
Tabela 7. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro das colônias (cm), após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de MnSO <sub>4</sub> . Média de 4 repetições.....	51
Tabela 8. <i>M. anisopliae</i> - Variante Zn <sub>1</sub> - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C em meio de cultura com concentrações crescentes de MnSO <sub>4</sub> . Média de 4 repetições.....	53
Tabela 9. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro das colônias (cm), após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de HgCl <sub>2</sub> . Média de 4 repetições.....	59
Tabela 10. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro das colônias (cm), após 5 e 10 dias, e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes do inseticida Malathion 50 CE. Média de 4 repetições.....	64
Tabela 11. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com doses crescentes do inseticida Dimethoate. Média de 4 repetições.....	67

	Página
Tabela 12. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes do inseticida Decamethrina. Média de 4 repetições.....	70
Tabela 13. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes do inseticida Fenvalerate. Média de 4 repetições.....	73
Tabela 14. <i>M. anisopliae</i> - Diâmetro (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes do herbicida Bihedonal.....	77

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (inoculação central) em presença de acetato de chumbo ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	34
Figura 2. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (semeadura) em presença de acetato de chumbo ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	34
Figura 3. Aspectos morfológicos das colônias de <i>M. anisopliae</i> (semeadura) em presença de sulfato de cobre ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	39
Figura 4. Aspectos morfológicos das colônias de <i>M. anisopliae</i> (inoculação central) em presença de sulfato de cobre ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	39
Figura 5. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> isoladas do Setor Cu <sub>1</sub> , nas concentrações em que houve crescimento após semeadura em meio com concentrações de 0, 100 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ de CuSO <sub>4</sub> .....	40
Figura 6. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> em presença de doses crescentes de ZnSO <sub>4</sub> (1000, 2000, 5000 e 10000 $\mu\text{g/ml}$ ).....	43
Figura 7. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> variante Zn <sub>1</sub> (inoculação central) em presença de ZnSO <sub>4</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	47
Figura 8. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> variante Zn <sub>1</sub> (semeadura) em presença de ZnSO <sub>4</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	47
Figura 9. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (inoculação central), variante Zn <sub>2</sub> em presença de ZnSO <sub>4</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	48
Figura 10. Aspecto morfológico das colônias de <i>M.</i>	

	Página
<i>anisopliae</i> variante Zn <sub>2</sub> (semeadura) em presença de ZnSO <sub>4</sub> (µg/ml).....	48
Figura 11. Representação gráfica do comportamento de <i>M. anisopliae</i> linhagem E <sub>6</sub> e do variante Mn <sub>1</sub> em presença de sulfato de manganês (MnSO <sub>4</sub> ), aos 10 dias de incubação a 27°C.....	50
Figura 12. Aspecto morfológico de <i>M. anisopliae</i> em presença de MnSO <sub>4</sub> (µg/ml).....	54
Figura 13. Aspecto das colônias de <i>M. anisopliae</i> , em presença de MnSO <sub>4</sub> , 6 dias após a inoculação nas concentrações de 5000 e 10000 (µg/ml)...	54
Figura 14. Colônias de <i>M. anisopliae</i> em presença de MnSO <sub>4</sub> nas concentrações de 1, 1000, 2000 e 5000 µg/ml, apresentando setores.....	55
Figura 15. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> Mn <sub>1</sub> (inoculação central) em presença de MnSO <sub>4</sub> (µg/ml).....	56
Figura 16. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> Mn <sub>1</sub> (semeadura) em presença de MnSO <sub>4</sub> (µg/ml).....	56
Figura 17. Representação gráfica do comportamento de <i>M. anisopliae</i> linhagem E <sub>6</sub> e do variante Mn <sub>1</sub> , em presença de sulfato de manganês (MnSO <sub>4</sub> ), aos 10 dias de incubação, a 28°C.....	58
Figura 18. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (inoculação central) em presença de HgCl <sub>2</sub> (µg/ml).....	61
Figura 19. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (semeadura) em presença de HgCl <sub>2</sub> (µg/ml).....	61
Figura 20. Representação gráfica do comportamento de	

	Página
<i>M. anisopliae</i> , linhagem E <sub>6</sub> em presença de diferentes sais minerais aos 10 dias de incubação a 28°C.....	62
Figura 21. Aspectos morfológicos das colônias de <i>M. anisopliae</i> (inoculação central) em presença de Malathion (µg/ml).....	65
Figura 22. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (semeadura) em presença de Malathion (µg/ml).....	65
Figura 23. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (inoculação central) em presença de Dimetoato (µg/ml).....	68
Figura 24. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (semeadura) em presença de Dimetoato (µg/ml).....	68
Figura 25. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (inoculação central) em presença de Decamethrina (µg/ml).....	72
Figura 26. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (semeadura) em presença de Decamethrina (µg/ml).....	72
Figura 27. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (inoculação central), em presença de Fenvalerate (µg/ml).....	75
Figura 28. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (semeadura), em presença de Fenvalerate (µg/ml).....	75
Figura 29. Aspecto morfológico das colônias de <i>M. anisopliae</i> (inoculação central), em presença de Bihedonal (µg/ml).....	78

- Figura 30. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (semeadura), em presença de Bihedonal ( $\mu\text{g/ml}$ )..... 78
- Figura 31. Representação gráfica do comportamento de *M. anisopliae* linhagem E<sub>6</sub> em presença de defensivos químicos, aos 10 dias de incubação a 28°C..... 80



## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi estudar a resistência da linhagem E<sub>6</sub> de *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin, à alguns sais minerais [MnSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> e Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>] e defensivos químicos (Malathion, Decamethrina, Fenvalerate, Dimethoate e Bihedonal), em diferentes concentrações.

Medidas de crescimento (diâmetro das colônias) e de germinação (número de colônias/placa) foram feitas com a finalidade de verificar a inibição pelas substâncias usadas.

Os resultados obtidos indicam que, dentre os sais, o HgCl<sub>2</sub> foi o mais tóxico ao fungo, seguindo-se pela ordem de inibição, CuSO<sub>4</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>.

Em alguns sais (MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> e CuSO<sub>4</sub>) apareceram setores que foram ensaiados em concentrações bem altas dos referidos sais, a fim de se verificar se eram variantes resistentes à dosagens mais altas. O variante isolado do meio de cultura com CuSO<sub>4</sub>, apresentou o mesmo comportamento que a linhagem original em relação ao efeito do sal. Os variantes isolados do MnSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> mostraram alta resistência ao respectivo sal.

Foram observadas diferenças morfológicas que

juntamente com outros processos, poderão ser utilizados para caracterização do fungo.

Quanto aos defensivos, todos inibiram o fungo , sendo que destes, o mais tóxico foi Decamethrina, que inibiu completamente o crescimento na concentração de 40 µg/ml , seguindo-se, pela ordem de inibição: Fenvalerate, Malathion , Dimethoate e Bihedonal.

### SUMMARY

This research was undertaken to study the resistance of the strain E<sub>6</sub> of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, to some mineral salts [MnSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> and Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>] and chemical defenses (Malathion, Decamethrina, Fenvalerate, Dimethoate and Bihedonal) in different concentrations.

- Growth and germination measurements (colony diameters and number of colonies/dish) were made in order to verify inhibition caused by the elements used.

The results obtained indicate that, among the salts, HgCl<sub>2</sub> was the most toxic for the fungus, being followed by - in order of inhibition - CuSO<sub>4</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>.

Sectors appeared in some of the salts (MnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>) which were tested in highly concentrated doses in order to verify if they were more resistant variants to large doses of the respective salts. The variant isolated from the culture medium with CuSO<sub>4</sub>, demonstrated the same behavior as the original strain in relation to the effects of the salt. The isolated variants of MnSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> demonstrated high resistance to the respective salt.

Morphologic differences were observed, which,

together with other processes, can be utilized for the characterization of the fungus.

As regards the defensives used, all of them inhibited fungus growth and esporulation. Among these defensives, Decamethrina was the most toxic, inhibiting growth in the concentration of 40  $\mu\text{g/ml}$ , being followed, in order of inhibition, by Fenvalerate, Malathion, Dimethoate e Bihedonal.

## 1. INTRODUÇÃO

Os problemas fitossanitários podem ser considerados como fatores limitantes da produção e produtividade, o que implica na necessidade de um controle eficiente das pragas e doenças.

Entre os métodos de controle, o mais usado é o controle químico, pois o efeito rápido e visível dos defensivos químicos contra as pragas e doenças e o desenvolvimento da moderna tecnologia, levaram à produção em massa destes produtos.

No entanto, o uso indiscriminado e/ou incorreto destes defensivos, por longo tempo, tem acarretado efeitos colaterais negativos, como resistência dos patógenos aos produtos químicos, desequilíbrio biológico (por diminuição dos inimigos naturais juntamente com as pragas) e poluição ambiental.

Por tudo isto, cada vez mais se procura usar o controle integrado, aliando-se os controles químico e biológico, e outras práticas agrícolas de modo a reduzir as populações das pragas e mantê-las a um nível tal, que não causem danos econômicos à cultura, e o que é muito importante, não provoquem distúrbios nos ecossistemas.

A maioria das publicações sobre controle biológico

gico por fungos, cita os gêneros *Entomophthora*, *Beauveria* e *Metarhizium*, que são os mais comumente encontrados na natureza.

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, é de reconhecida importância na luta biológica contra vários insetos. Entre eles, no Brasil, incluem-se as cigarrinhas, insetos da ordem *Homoptera*, família *Cercopidae*, cujos gêneros principais: *Zulia*, *Mahanarva*, *Deois* e *Aeneolamia*, ocorrem praticamente em todo o país, causando danos econômicos elevados às pastagens (diminuição da área de pastejo e capacidade de suporte dos pastos) e às culturas de cana-de-açúcar (redução da quantidade de cana colhida/ha e redução do teor de saca rose).

O *Metarhizium* já é produzido em escala industrial por órgãos estatais e firmas particulares, e vem sendo muito usado em controle biológico ou integrado, em pastagens e cana-de-açúcar. Além disso, são muitos os trabalhos de pesquisa com relação ao *Metarhizium*.

O objetivo deste trabalho é estudar o comportamento do fungo em questão, na presença de alguns defensivos químicos e sais de metais, visando-se obter informações quanto à seleção e dosagem destes produtos, bem como ao possível isolamento de mutantes resistentes à essas substâncias.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Controle biológico e integrado: importância e agentes responsáveis

Controle biológico é a ação de parasitas, predadores e patógenos, sobre as pragas, com a finalidade de manter sua população a um nível mais baixo que aquele que existiria na sua ausência, evitando assim danos econômicos. Tais agentes biológicos seriam introduzidos ou aplicados pelo homem. Quando estes agentes ocorrerem naturalmente, temos o controle biológico natural, e quando forem microorganismos, temos o controle microbiológico (BURGES e HUSSEY, 1971).

A maioria das pragas é constituída por insetos que possuem, quase sempre, inimigos naturais, os quais mantêm os níveis populacionais da praga em equilíbrio. Uma alteração destes níveis em favor do inimigo natural constitui um método de controle biológico (GALLO, 1970).

O controle microbiológico tem as vantagens de ser seletivo, inócua aos homens e animais, e não ser fitotóxico.

Os fungos são usados há muito tempo no controle biológico. STEINHAUS (1949) citado por BURGES e HUSSEY (1971) relata que em 1879, o russo METSCHNIKOFF conduziu o primeiro experimento importante na destruição de insetos pre

judiciais por microorganismos, infetando larvas de *Anisoplia austriaca* com o fungo *M. anisopliae*.

Segundo PRAMER (1965), ROBERTS e YENDOL (1971) e FERRON (1978), as espécies de fungos entomopatogênicos encontram-se distribuídas em todos os grupos de fungos verdadeiros: Ficomictos (*Entomophthora*, entre outros), Ascomictos (*Cordyceps*), Basidiomictos (*Septobasidium*) e Fungos Imperfeitos (*Aspergillus*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, etc).

Os fungos podem infectar os insetos não apenas através do trato intestinal, mas também pelos espiráculos e pela superfície do integumento, o que possibilita a infecção independentemente da atividade alimentar do inseto (FERRON, 1978).

Outro aspecto importante no controle por fungos é que um fungo entomopatôgeno possui muitos hospedeiros, como por exemplo, o *M. anisopliae*, cuja gama de hospedeiros excede 200 espécies de insetos (VEEN, 1968, citado por ROBERTS e YENDOL, 1971).

Como ocorre com outros agentes de controle biológico, os fungos podem ser usados de três modos diferentes no controle de insetos, dependendo das características do próprio fungo e do inseto envolvido.

- a). colonização: o fungo é introduzido na população de insetos, onde ele se estabelece permanentemente.
- b). inseticida microbiano: o fungo é aplicado várias vezes, quando necessário, como se faz com inseticidas químicos.
- c). controle integrado: sistema de manejo de pragas que utiliza técnicas selecionadas de modo a causar o mínimo possível de alteração nos agentes bióticos protetores (parasitas, predadores e patógenos), mas mantendo a população das pragas num nível que não cause danos econômicos. (ROBERTS e YENDOL, 1971).



A prática do controle integrado está cada vez mais difundida, pois o uso indiscriminado de defensivos químicos, vem acarretando sérios problemas ecológicos, e o uso isolado do controle biológico, muitas vezes não leva a resultados satisfatórios. (SMITH e REYNOLDS, 1966, AZEVEDO, 1979, e PASCOAL, 1979).

Além disso, o uso de certas técnicas agrícolas também pode ser antagônico aos agentes bióticos. O controle integrado, oferece pois, uma oportunidade de evitar a ruptura do sistema ecológico, restabelecendo o equilíbrio.

## 2.2. Controle integrado e compatibilidade com defensivos químicos

Em última análise, o controle integrado se resume na aplicação simultânea de agentes biológicos e químicos. É muito importante então, que se conheça com profundidade a ação destes defensivos sobre os organismos vivos junto aos quais vão atuar no combate às pragas, isto é, se eles têm efeitos antagônicos ou sinérgicos.

Muitos são os trabalhos de pesquisa desenvolvidos nesta área.

Já em 1950, FISCHER e GRIFFITHS, trabalhando em pomares de Citrus, na Flórida, concluíram que compostos à base de enxofre exerciam efeitos fungicidas nos fungos entomógenos *Myiophagus* sp Thaxter e *Hirsutella besseyi* Fischer.

HALL e DUNN, 1959, estudaram a ação dos inseticidas Parathion, Malathion, Demeton, Trithion e DDT e dos fungicidas Enxofre molhável, Dithane Z-78, Ferban, Bordeaux 5 - 5 - 50 e Captan sobre cinco espécies do fungo *Entomophthora*, que ataca um pulgão, praga de alfafa. A espécie mais importante, *Entomophthora exitialis*, foi a mais suscetível aos defensivos utilizados, seguida por *E. obscura*; a espécie menos afetada foi *E. coronata*.

DIRIMANOV e ANGELOVA (1962) citados por ROBERTS e CAMPBELL (1977), testaram 22 inseticidas em *Beauveria bassiana*. Concluíram que DDT, Diazinon, Dieldrin, e Toxafeno, se mostraram inofensivos, enquanto que Methylparathion, Parathion Systox e Malathion provocaram inibição, que foi mais severa com o Malathion.

EVLAKOVA (1964) relata um caso de sinergismo entre DDT e fungos, pois em doses de 0,025; 0,05; 0,1; 0,5 e 1%, o inseticida incrementou o crescimento e virulência de *B. bassiana* e *Aspergillus flavus*. O BHC não estimulou, e o isômero gama foi tóxico.

RAMARAJE et alii, 1967, testaram o efeito de Dimecron, Folidol, DDT, Malathion, Endrin e BHC a 0,04; 0,05; 0,06; 0,1 e 0,5% no desenvolvimento de *B. Bassiana* e *M. anisopliae*, tomando como parâmetro seu crescimento em meio líquido e sólido. O BHC 50% inibiu o crescimento de ambos os fungos em todas as concentrações, enquanto que Dimecron foi inócuo. Os outros inseticidas tiveram efeitos inibitórios diferentes sobre os dois fungos, em ordem decrescente para Endrin, Malathion, Folidol e DDT. *M. anisopliae* cresceu nas placas com 0,04% de Endrin, mas não cresceu nas outras. Os autores concluíram também que a ação dos inseticidas varia com seu tipo, concentração e fungo usado, bem como o tipo de meio de cultura empregado.

MACHROWICZ (1967) citado por ROBERTS e CAMPBELL (1977), trabalhando com *M. anisopliae* testou os inseticidas Metasystox e Ekatin, e ambos provocaram inibição de crescimento no fungo.

Em 1970, CADATAL e GABRIEL, ensaiaram três fungicidas e nove inseticidas "in vitro", sobre *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Entomophthora sp.* O BHC, DDT, Diazinon e Chlorfenvinphos pouco afetaram os fungos, mas Methidathion (Supracide), Carbaryl, Endosulfan, Endrim e Fenitrothion

inibiram a germinação e a esporulação, completa ou parcialmente.

FERRON (1971) testou misturas de quantidades crescentes de esporos de *B. tenella* e doses reduzidas de dois inseticidas organofosforados (Parathion e Trichloronate) em larvas de *Melolontha melolontha*, para verificar se essa mistura favorecia o desenvolvimento da micose. A adição de pequenas quantidades de Parathion ou Trichloronate, à baixas dosagens de esporos (que não conseguiam estabelecer a doença isoladamente), provocou um aumento real da doença. Na dosagem de  $10^6$  esporos/g, a mortalidade pelo fungo foi aproximadamente a mesma, com ou sem a adição do inseticida, mas o desenvolvimento da infecção foi mais rápido quando se usou esporos mais um dos inseticidas. Estes resultados possibilitam a realização de experimentos em campo, usando baixas dosagens de um inseticida com poder residual baixo, para favorecer o desenvolvimento da doença fúngica em populações naturais de larvas.

Em 1972, WILDING testou os efeitos dos fungicidas Benomyl, Dimethirimol e Triarimol, sobre o fungo *Cephalosporium aphidicola*, patógeno do pulgão *Aphis gossypii* Glover, parasita das Cucurbitaceas. Benomyl e Triarimol inibiram o desenvolvimento do fungo, "in vitro". "In vivo" nem Triarimol nem Dimethirimol afetaram o desenvolvimento do fungo no inseto, talvez porque os inseticidas se movimentam pelo xilema e os pulgões alimentam-se do floema, absorvendo assim, dosagens muito baixas dos fungicidas. Já o Benomyl, matou os insetos que se alimentaram das plantas. Este ensaio foi necessário, porque os fungicidas são muito usados em Cucurbitaceas para controlar o míldio (*Sphaerotheca fuliginea*). O autor aconselha então o uso de Triarimol e Dimethirimol para controle do míldio.

WANG e LEW (1972) citados por ROBERTS e CAMPBELL (1977) trabalharam com os fungos *M. anisopliae* e *Isaria*

*sinclarii* e testaram a ação de alguns defensivos sobre os referidos fungos. Os defensivos usados foram Aldrin, Aldrin + 2,4D + Atrazine, Heptachlor, Heptachlor + 2,4D + Atrazine, BHC e BHC + 2,4 -D + Atrazine, e em nenhum dos casos houve inibição, tanto para *M. anisopliae*, como para *I. sinclarii*.

SIKURA e ZHIGAEV (1972), misturaram Boverin (*B. bassiana*) com os inseticidas Carbaryl, Trichlorphon e Dimethoate, e utilizaram a mistura para pulverizar macieiras contra *Cydia pomonella* (L). Concluíram que a aplicação conjunta de Boverin e inseticidas, apresentou um índice de controle bem mais alto que o inseticida sozinho, além de permitir uma redução da quantidade do produto químico da ordem de dez vezes.

FARGUES (1973) estudou a sensibilidade de larvas do Coleóptero (*Leptinotarsa decemlineata*) submetidas à mistura de esporos de *B. bassiana* e doses reduzidas de DDT. A porcentagem de mortalidade foi maior com a mistura *Beauveria* DDT, mas a quantidade de indivíduos mortos pelo fungo, neste caso, não foi significativamente diferente de quantidade encontrada quando se usou apenas *Beauveria*. Isto significa que o DDT em doses reduzidas, não predispõe o hospedeiro ao ataque do fungo, a não ser quando o substrato de pupação (folhagem) é contaminado pelo inseticida.

GRUNER (1973) estudou a sensibilidade de larvas de *Phyllophaga pleei* BL. e *P. patrueloides* PA, (Col. Scarabaeidae), à sete linhagens do fungo *M. anisopliae*, isoladamente, e associado a doses reduzidas de Parathion e Trichloronate. As larvas dos dois insetos mostraram-se resistentes ao *M. anisopliae*. Com a adição do Parathion, houve um aumento de mortalidade, o mesmo não acontecendo com a adição de Trichloronate. Nos dois casos, após 3 meses, houve só um caso de patogenicidade. As larvas de *P. patrueloides* foram mais sensíveis ao *M. anisopliae*; a adição do Parathion, embora aumentando a mortalidade, não influenciou no desenvolvimento

da doença.

OLMERTH e KENNETH (1974) estudaram o efeito de nove fungicidas e quatorze acaricidas sobre os fungos *B. bassiana*; *Verticillium lecanii* e *Verticillium sp.* Os defensivos foram adicionados ao meio de cultura e posteriormente foram medidos os diâmetros das colônias. Todos os produtos causaram inibição em *Verticillium spp.*, com exceção do óleo (White Summer Oil), cuja inibição foi leve. Diferentes isolados de *Beauveria* e *Verticillium* mostraram variações quanto à sensibilidade aos fungicidas Captan, Dinocap, Oxidloreto de Cobre e Binapacryl, e aos inseticidas, Trichlorfon e Óleo Parafínico. A maior inibição foi causada pelos fungicidas Benomyl e Maneb, nas dosagens recomendadas e nas concentrações  $10^{-1}$  daquelas, para todos os isolados dos dois gêneros. Já Oxidloreto de Cobre e o Dinocap foram os menos ativos sobre todos os fungos, com exceção de *B. bassiana*. Entre os inseticidas, somente o Fluorsilicato de sódio, inibiu a germinação de esporos de *B. bassiana* nas dosagens recomendadas, enquanto que para o *Verticillium ssp* houve forte inibição com o Fluorsilicato de sódio, Chloropyrifos e Dichlorvos.

Também em 1974, SOPER et alii testaram a ação de fungicidas, inseticidas e reguladores de crescimento de insetos sobre algumas espécies de *Entomophthora*. Dentre os reguladores de crescimento de insetos usados o ENT 70459 e o ENT 70513 apresentaram inibição variando de fraca a completa, dependendo da espécie de *Entomophthora*. Os inseticidas usados foram Carbaryl, Azinphosmetil, Endosulfan, Oxydemeton methyl e Demeton, sendo que apenas este último foi compatível com *Entomophthora*. O fungo foi tolerante a um único fungicida, o Chlorothalonil.

KARADZHOV (1974) observou efeitos complementares entre *B. bassiana* e alguns inseticidas. Ele utilizou Boverin (esporos de *B. bassiana*) juntamente com Carbaryl, Methyl Parathion e Tetrachlorvinphos, contra *Carpocapsa*

*pomonella* (L). Observou que a mortalidade foi de 13% quando usava somente o fungo e de 95% na associação fungo + inseticida.

Diversos defensivos foram usados por IGNOFFO et alii (1975), num estudo sobre toxicidade com relação ao fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Sanson, que é usado no combate à lagarta *Anticarsia gemmatalis* em soja. Foram usadas vinte e cinco inseticidas, oito fungicidas e oito herbicidas, na dosagem recomendada pelo fabricante, metade e um décimo dessa dose. O ensaio foi conduzido "in vitro" usando SMA como meio de cultura. Os defensivos foram diluídos em água destilada. Discos de papel esterilizados foram mergulhados nessas soluções e colocados nos centros de placas inoculadas uma hora antes, com o fungo em questão. A avaliação foi feita pela medida do halo de inibição ao redor do disco de papel. Os autores concluíram que dos oito fungicidas ensaiados, apenas um, Lorvek (pyroxychlor), não inibiu o crescimento de *N. rileyi*. Os outros como Bravo (Chlorotalonil), Ferban (Dimetilditio-carbamato férrico), Duter (hidróxido de trifenil estanho), Fungisperse (Enxofre + zineb), Manzate (Maneb) e Dithane M 45 (Mancozeb) inibiram o crescimento do fungo mesmo a um décimo da dosagem recomendada. Dos vinte e cinco inseticidas testados, os que não causaram inibição foram DDT, Furadan, Endrin, Dimilin, Lannate, Guthion, Marlato, Mobil 9087, Sevin, Orthene Vydate e TH 6042. Os herbicidas que causaram inibição no fungo foram: Butoxone SB, Lorox, Premerge e Ronstar.

FARGUES (1975) estudou o comportamento de larvas de *Leptinotarsa decemlineata*, em cultura de batatas, para determinar se havia ou não efeito sinérgico quando o fungo *B. bassiana* era combinado com os inseticidas Azyphos Ethyl ou Carbaril à diferentes dosagens. Os tratamentos foram *Beauveria* em dosagem normal e reduzida, inseticida em dose normal e reduzida, *Beauveria* + inseticida à dosagens reduzidas e controle. Foram usadas larvas L<sub>3</sub> (jovens e velhas),

e larvas L<sub>4</sub>. De modo geral, o autor concluiu que não houve sinergismo entre *Beauveria* e os inseticidas testados. A idade das larvas influenciou, sendo que com as larvas mais velhas observou-se eficiência maior da combinação. Observou-se também que somente com os inseticidas, a mortalidade foi rápida; com o fungo, a mortalidade ocorreu durante toda a vida do inseto, mas sempre numa mesma faixa, e com a combinação dos dois produtos, não se obteve eficiência superior à dos componentes separados.

GARNAGA (1975), trabalhou com uma mistura de Boverin (esporos de *B. bassiana*) e Entobakterin (preparação de *Bacillus thuringiensis*) ambas misturadas com Trichlorphon; obteve mortalidade superior a 88% para *Plutella xylostella* (L) e em torno de 50% para larvas de *Maneistra brassicae* (L).

Em 1976, ZAYATS et alii relataram a obtenção de resultados muito bons no controle de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) usando a mistura de Boverin (*B. bassiana*) e o inseticida Trichlorfon.

O comportamento do fungo *N. rileyi* (Farlow) com relação à lagarta *A. gemmatalis*, retirada da soja que havia recebido tratamento com inseticidas, foi estudado por JOHNSON et alii (1976). Os inseticidas utilizados foram Benomyl, Benomyl-carbaryl e Benomyl-Parathion Methyl. Em todos os casos houve um retardamento no crescimento de *Nomurea* em pelo menos três semanas.

TORIBIO (1976) estudou o comportamento do fungo *Acrostalagmus aphidum*, fungo patogênico a pulgões, com relação ao fungicida Benomyl. Sementes de *Vigna sinensis* foram tratadas com Benomyl (4g/kg), e isso diminuiu a eficácia do fungo contra o pulgão preto, *Picturaphis brasiliensis*. Nas testemunhas a mortalidade devida ao *Acrostalagmus* foi de 96% contra 68% das mortalidades para sementes tratadas com Benomyl. Quando Benomyl, Propineb e Difolatan foram pulverizados sobre as plantas, a eficiência dos fungos foi ainda mais reduzida.

Em 1977, GORAL e LAPPA, estudando uma maneira de diminuir a população de *Leptinotarsa decemlineata* (Say), em cultura de batata, conseguiram êxito com a mistura de Boverin (*B. bassiana*) com Dilor e Trichlorphon. O uso de Boverin sozinho, teve efeito protetor semelhante, embora reduzido.

Também visando o controle de *Leptinotarsa decemlineata*, BAJAN et alii (1977), estudaram o comportamento dos fungos *B. bassiana*, *Paecilomyces farinosus* e chlorfenvinphos. O inseticida foi aplicado de maneiras diferentes, e as respostas foram também diferentes. Assim, em meio de cultura o chlorfenvinphos em concentrações de campo inibiu, embora não completamente, os fungos. A inibição relacionou-se diretamente com a dose usada. Outro modo de aplicação do inseticida, foi em vasos, cujo solo foi previamente inoculado com fungo. Neste caso, houve aumento de mortalidade de insetos adultos, mas não de pupas. Os fungos retirados dos solos tratados com o chlorfenvinphos mostraram-se mais patogênicos para larvas de *Galleria mellonella* (L) do que os solos não tratados.

WOSCIECHOWSKA (1977) estudou os efeitos de herbicidas sobre os fungos *P. farinosus*, *P. fumosoroseus* e *B. bassiana*. O autor usou os herbicidas Linuron e Monolinuron em dosagens de 0,06 a 0,1%, constatando inibição, enquanto que na dosagem de 0,01% houve estimulação do crescimento e desenvolvimento. Nas concentrações de campo Linuron reduziu a patogenicidade de *B. bassiana*, mas não afetou *Paecilomyces* spp enquanto que com Monolinuron os efeitos foram contrários.

Em 1977, ZIMMERMANN, estudou o efeito de fungicidas sistêmicos em três fungos que afetam pulgões: *Entomophthora aphidis*, *E. thaxteriana* e *E. virulenta*. Os resultados foram os seguintes:



- Calixin e Imugan — germinação completamente inibida
- Plantvax e Saprol — inibição forte
- Benomyl e Milstem — inibiu somente *E. aphidis*
- Cercobin M — foi pouco tóxico

Em 1978, MATTA e OLIVEIRA, trabalharam com Malatol 50E (Malathion 50%) testando seus efeitos sobre M.*anisopliae*. Os testes foram feitos "in vitro" e as dosagens usadas foram de 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6% observando-se que o fungo respondeu ao inseticida, sem perda de viabilidade e patogenicidade, nas concentrações mais baixas. Segundo estes autores, pode-se usar Malatol 50E + *Metarhizium* à nível de campo.

LOCH (1978) estudou o fungo *N. rileyi* (Farlow) com relação a alguns aspectos nutricionais e comportamentais em presença de dezesseis inseticidas, dezesseis fungicidas e oito herbicidas usados em cultura de soja. Os testes foram feitos "in vitro" com as dosagens de 10, 100 e 1000 ppm do princípio ativo e a avaliação foi feita através da medida dos halos de inibição formados. De modo geral, os produtos químicos afetaram mais a esporulação do que o crescimento micelial. Apenas um herbicida, o Dinoseb, inibiu crescimento micelial e esporulação. Dos fungicidas, apenas o Dodine e Chloroneb não afetaram o fungo nas três concentrações. Os inseticidas Phosalone, Toxafeno + Phosalone, ~~Endosulfan~~ Endosulfan e Camphechlor, inibiram esporulação, enquanto que o CGA 15.324, Parathion, Lindane e Fenitrothion, afetaram tanto esporulação como crescimento.

SANTOS (1978) e SANTOS e AZEVEDO (1982) estudaram a influência de alguns fatores como temperatura, luz, agentes mutagênicos e alguns fungicidas sobre o crescimento, esporulação e germinação de *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin. Os fungicidas usados foram Cloroneb, Vitavax e Benlate, sendo que este último inibiu o fungo na dosagem de 4 µg/ml. A

freqüência de mutação espontânea do fungo ao Benlate foi de 2,35 mutantes por  $10^6$  conídios. Dois tipos de mutantes puderam ser distingüidos, o primeiro causando altos níveis de resistência (1024  $\mu\text{g/ml}$ ) e o segundo, níveis menos elevados (128  $\mu\text{g/ml}$ ).

ALVES (1978) estudou a ação de 15 inseticidas e um fungicida sobre *B. thuringiensis* var *kurstacki* (Berliner, 1915), *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin e *Aspergillus* sp. Os defensivos foram adicionados ao meio de cultura nas dosagens de 10, 100 e 1000 ppm. Para o *B. thuringiensis*, o Methonil foi o menos tóxico, enquanto que Parathion Ethyl e Endosulfan foram os que apresentaram maior toxicidade. Na dosagem de 1000 ppm, o Oxicloreto de cobre, e o Omethoate não inibiram *M. anisopliae* sendo que este último chegou a favorecer o fungo. Na dosagem de 100 ppm, os citados acima mais Vamidothion e Dimethoate não afetaram o crescimento de *Metarhizium*. Para 10 ppm., todos os citados mais o Monocrothophos não inibiram o fungo, sendo que o Oxicloreto de cobre, Monocrothophos e Omethoate favoreceram o crescimento. Quanto ao *Aspergillus* sô não houve inibição de crescimento com o Omethoate, na dose de 1000 ppm. Na dosagem de 10 ppm. apenas Permetrin e Penthoate não afetaram o desenvolvimento do fungo.

Em 1978, KELLER testou o Dimilin (diflubenzuron), inibidor de síntese de quitina em insetos, sobre os fungos: *B. tenella*, *M. anisopliae* e algumas espécies de *Entomophthora* avaliando seus efeitos no crescimento e germinação de conídios para as duas últimas espécies. Concluiu que o produto, em determinadas concentrações inibiu levemente *B. tenella* e *M. anisopliae*, não afetando *Entomophthora*.

Em 1979, Schmitt estudou o efeito do fungicida Benomyl, em condições de lavoura de soja, sobre a incidência dos fungos *N. rileyi* e *Entomophthora* sp em lagartas de *A. gemmatalis* Hubner e *Plusia* spp. Concluiu que a incidência

destes fungos não foi fator decisivo para o controle das lagartas, e a aplicação do Benomyl não interferiu no aparecimento dos fungos. O vírus da poliedrose nuclear parece ter sido o agente controlador da doença neste experimento.

MESSIAS (1979), a partir de um diplóide de *M. anisopliae*, variedade minor, obteve haplóides com a formação de setores induzidos pela adição de 100 µg/ml de Clozoneb (1,4 - Dicloro - 2,5 - dimetoxibenzeno).

HADDAD e MESSIAS (1979), avaliaram a influência de espalhantes adesivos (Novapal e Sandovit) e o inseticida Sevin 80, sobre o fungo *M. anisopliae*. As concentrações usadas para os espalhantes foram 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5%. Os autores concluíram que o Novapal pode ser usado nas concentrações recomendadas pelo fabricante, uma vez que não afetou nem a germinação nem a esporulação, o mesmo não acontecendo com o Sandovit, que provocou redução no crescimento de 33,75%. Os estudos realizados com Sevin 80 demonstraram inibição no peso seco quando se utilizou 96 µg de inseticida/ml.

Em 1980, ALVES et alii estudaram o efeito fitotóxico dos inseticidas Arprocarb 50CE, Carbaryl 80 PM, Fenvalerate 20 CE e Trichlorphon 80 PS. Cada inseticida foi testado nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1% do i.a. em meio de BDA + Aureomicina. Concluíram que Arprocarb foi o mais tóxico e Trichlorphon o mais inócuo. Todos os inseticidas tiveram efeito esporostático.

Ainda em 1980, ALVES et alii, procuraram verificar o efeito de alguns herbicidas usados em pastagens e culturas de cana de açúcar, sobre o fungo *M. anisopliae*. Os herbicidas, testados nas concentrações de 1 e 2% p.a, foram Tordon 101 (2,4 - D + Picloran), U - 46 (2,4 - D ester), Banvel 450 F (Dicamba + 2 - 4 - 5, T) e DMA - 6 (2,4D amina). Apenas o Tordon permitiu o desenvolvimento do fungo, mas afetou a esporulação enquanto que os demais tiveram ação esporicida

sobre o fungo.

CAMARGO e GABRIEL, 1980 testaram a toxicidade de alguns herbicidas para o *M. anisopliae*. Os produtos testados foram: Tordon 101 (2,4-D + Picloran), Herbamina (2-4, D) e Banvel (Dicamba + 2, 4-D). As concentrações usadas foram 0,25; 0,5; 1,0 e 4,0% de p.a. Todos foram tóxicos ao fungo, sendo o Banvel o mais tóxico deles, pois não permitiu crescimento em nenhuma das concentrações. A Herbamina não inibiu o fungo apenas na concentração mais baixa, enquanto que o Tordon diminuiu muito o crescimento e esporulação do *M. anisopliae*.

CARNEIRO (1980) e CARNEIRO et alii (1981) avaliaram os efeitos tóxicos de alguns defensivos sobre *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Os seguintes produtos foram testados: Gesatop, DMA-6, Ronstar, Carbaril 80 PM, Ambush e Furadan, nas dosagens de 1%, 2% e 3% p.a. para os herbicidas, e nas dosagens mínima, média e máxima recomendada pelos fabricantes, para os inseticidas. Os defensivos apresentaram os mesmos efeitos para os dois fungos, e aqueles que menos afetaram o crescimento foram Ambush, Furadan e Gesatop. Houve inibição da esporulação com Ronstar e Carbaryl. Já o DMA-6 inibiu completamente o crescimento das colônias. Os fungos provenientes dos tratamentos que inibiram o crescimento ou a esporulação foram repicados para meio de cultura sem defensivos, onde cresceram normalmente, o que significa que houve apenas efeito esporostático. Os fungos provenientes dos tratamentos com DMA-6 não cresceram, demonstrando que o herbicida teve ação fungicida.

CASTRO et alii (1980) estudaram a compatibilidade de *M. anisopliae* a quatro defensivos químicos (herbicidas: Herbiflan, Laço e Round-up e inseticida Daconil). Utilizou-se meio de cultura de farinha de milho. Concluíram que o Herbiflan e o Round-up foram altamente compatíveis com o fungo, enquanto Daconil e Laço inibiram a germinação e o crescimento.

TEDDERS (1981) testou seis fungicidas (Triphenyltin hydroxide, Dodine, Zineb, Benomyl, Dinocap e Enxofre), usados na cultura de pecã contra os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, que são patogênicos ao gorgulho da pecã (*Curculio caryae*). Triphenyltin hydroxide foi o mais tóxico aos dois fungos, seguido por Benomyl, Zineb e Dodine. Os menos tóxicos foram Enxofre e Dinocap.

Em 1981, HALL estudou a compatibilidade de vários defensivos sobre o fungo *V. lecanii*, que ataca pulgões. Concluiu que alguns deles são compatíveis.

### 2.3. Genética de *M. anisopliae*

Os microrganismos do mesmo modo que os animais e plantas podem ser geneticamente melhorados, desde que haja variabilidade dentro da espécie, seja esta natural ou induzida por agentes físicos ou químicos.

Portanto a avaliação desta variabilidade natural, bem como o desenvolvimento de métodos eficientes de isolamento e caracterização de mutantes, são imprescindíveis quando se deseja aplicar um programa de melhoramento genético em determinada espécie.

A variabilidade dentro de uma espécie permite ainda, que se faça a caracterização de linhagens, baseando-se em mais de um parâmetro, o que torna fácil a identificação ou separação destas linhagens após aplicação conjunta, ou mesmo após aplicação de linhagens isoladas, mas em áreas onde o fungo já existia naturalmente, ou se havia estabelecido por aplicações anteriores. (AZEVEDO e MESSIAS, 1983, no prelo).

Inúmeros trabalhos mostram que diferentes isolados de *M. anisopliae* apresentam variação para características distintas, tais como: tamanho e tipo de conídios, padrões

eletroforéticos, curvas de cromatografia gasosa, produção de enzimas extracelulares, resistência a inibidores como luz ultravioleta, defensivos agrícolas, etc. (TULLOCH, 1976; TINLINE, 1971; MESSIAS *et al*, 1978; FARGUES *et al*, 1975; DE CONTI *et al*, 1980; ROSATO *et al*, 1981; AL AIDROOS e ROBERTS, 1981; ALVES, 1982; SANTOS, 1978; HADAD e MESSIAS, 1979; SANTOS e AZEVEDO, 1982).

A maioria dos estudos genéticos se faz através de mutantes isolados em laboratório e obtidos com o uso de agentes mutagênicos físicos ou químicos.

Em *M. anisopliae*, muitos mutantes têm sido obtidos, como por exemplo: mutantes auxotróficos, morfológicos e de coloração alterada de conídios (TINLINE e NOVIELLO, 1971; MESSIAS, 1979; MESSIAS e AZEVEDO, 1981; AL-AIDROS, 1980), mutantes resistentes e agentes inibidores (SANTOS, 1978; SANTOS e AZEVEDO, 1982), etc.

O isolamento deste mutantes, permitiu e determinação do ciclo parassexual em *M. anisopliae*. O ciclo parassexual é o único sistema de recombinação para fungos imperfeitos. Assim, estudos genéticos nestes fungos, só foram possíveis a partir de 1952, quando ROPER, trabalhando com *Aspergillus nidulans*, conseguiu obter diplóides estáveis após fusão de hifas, com o uso de mutantes morfológicos e nutricionais complementares. A partir daí, PONTECORVO e ROPER (1952) mostraram a existência de recombinação mitótica e haploidização, determinando assim, o ciclo parassexual no referido fungo.

A parassexualidade de *M. anisopliae* foi recentemente descoberta por MESSIAS e AZEVEDO (1980), usando marcas para auxotrofia e coloração alterada de conídios, e confirmada por AL-AIDROS (1980), que usou marcas para resistência.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagem utilizada

A linhagem de *Metarhizium anisopliae* utilizada neste trabalho, foi a linhagem E<sub>6</sub>, cedida pelo Dr. João Lúcio de Azevedo (Universidade de Brasília).

A linhagem E<sub>6</sub> é proveniente do estado do Espírito Santo e é uma das mais virulentas linhagens conhecidas.

#### 3.2. Materiais

##### 3.2.1. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o BDA (Batata Dextrose - ÁGAR), cujo preparo consiste em:

infusão de batata	-	200 g
dextrose	-	20 g
água destilada	-	1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8, utilizando-se NaOH 10%.

##### 3.2.2. Solução de tween

Foi preparada uma solução de tween 80 0,1% (v/v) em água destilada. A solução foi distribuída em tubos, esterilizada em autoclave à pressão de 1 atm por 15 minutos,

e conservada em refrigerador.

### 3.2.3. Sais de metais

Foram utilizados os seguintes sais de metais, todos fabricados pela Merck.

Sulfato de Manganês	$MnSO_4$
Sulfato de Cobre	$CuSO_4$
Sulfato de Zinco	$ZnSO_4$
Bicloreto de Mercúrio	$HgCl_2$
Acetato de Chumbo	$Pb(CH_3COO)_2$

As concentrações utilizadas, exceto nos casos especificados, foram as seguintes: 0, 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 2000, 5000 e 10000  $\mu g$  de sal por ml do meio de cultura.

### 3.2.4. Defensivos

Foram utilizados quatro inseticidas: Malathion 50E, Perfektion 40CE, Decis, 2,5 CE, Sumicidin 20 CE, e um herbicida: Bihedonal.

As dosagens utilizadas para todos os defensivos foram calculadas de modo a se enquadrarem na faixa recomendada pelos fabricantes e foram as seguintes: 0, 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 2000, 5000 e 10000  $\mu g$  do p.a./ml, com exceção do Decis, para o qual foram usados 0, 0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,0; 2,0; 5,0; 10; 20; 30 e 40  $\mu g$  p.a./ml.

As características destes produtos são as seguintes:

a) Malathion 50E (Agroceres S/A)

Nome técnico - Malathion

Grupo químico - fosforado

Nome químico - ditiofosfato de 0,0 - dimetil de S (etil - 1,2 - dicarboetoxi).



Fórmula bruta -  $C_{10} H_{19} O_6 PS_2$

Modo de ação - acaricida fraco e inseticida com ação de contato, ingestão, fumigação e profundidade.

Dosagem recomendada - 0,06 - 0,15% p.a  
0,4 - 1,0 l/ha

Concentração do produto - 50% Malathion

Pragas combatidas - pulgões, lagartas, cochonilhas sem ca  
rapaça, moscas das frutas, pulgas, piolhos, carrapa-  
tos, cigarrinhas, etc.

Efeito fitotóxico - algumas cucurbitáceas, como pepino ,  
abobrinha italiana e mamoeiro, são sensíveis ao pro-  
duto.

Toxicidade -  $DL_{50}$  - 1375 - 1500 mg/kg

Poder residual - 7 dias aproximadamente

b) Perfekthion (BASF Brasileira S.A - Indústrias Químicas)

Nome técnico - Dimetoato

Grupo químico - sistêmico fosforado

Nome químico - ditiofostato de 0,0 - dimetil S - (N-metil  
carbomóil- metila)

Fórmula bruta -  $C_5 H_{12} O_3 NPS_2$

Modo de ação - inseticida e acaricida com ação sistêmica,  
contato, fumigação (pouco importante). Parece ter ação  
de profundidade sobre os frutos.

Dosagem recomendada - 0,05 - 0,15% p.a. ou  
0,4 - 1,2 l/h

Concentração do produto - 41% Dimetoato

Pragas combatidas - lagartas, pulgões, trips , cigarri -  
nhas, moscas das frutas, algumas espécies de ácaros,  
etc.

Toxicidade - moderada, por via oral

DL<sub>50</sub>oral = 215 mg/kg

DL<sub>50</sub> dérmica - 150 - 1150 mg/kg

Poder residual - 14 dias aproximadamente

c) Decis EC 2,5 (HOECHST)

Nome técnico - Decametrina

Grupo químico - piretróide sintético.

Nome químico - (S) - α - ciano - m - fenoxibenzil - (1R ,  
3R) 3 - (2,2 dibromovinil) 2,2 dimetil ciclopropano  
carboxilato.

Fórmula bruta - C<sub>17</sub> H<sub>16</sub> NO<sub>3</sub> Br<sub>2</sub>

Modo de ação - inseticida com ação de contato e ingestão.

Dosagem recomendada - 0,2 l/ha

Concentração do produto - 2,5% Decametrina

Pragas combatidas - lagartas de modo geral, bicho mineiro,  
pulgões, tripsas, cigarrinhas, percevejos, vaquinhas,  
mosca das frutas, besouros, broca dos frutos, etc.

Toxicidade - 70 - 140 mg/kg (dose oral)

Poder residual - muito alto

d) Sumicidin 20 (IHARABRAS S.A. Indústrias Químicas)

Nome técnico - Fenvalerate

Grupo químico - piretróide sintético

Nome químico - alfa ciano - 3 fenoxibenzil - 2 - (4 cloro  
fenil) - 3 - Metilbutirato ou alfa ciano - m - fenoxi  
benzil - alfa - isopropil - p - clorofenilacetato.

Fórmula bruta - C<sub>25</sub> H<sub>22</sub> NO<sub>3</sub> Cl

Modo de ação - inseticida com ação de contato e ingestão.

Dosagem recomendada - 0,2 l p.a/ha

Concentração do produto - 20% Fenvalerate

Pragas combatidas - lagartas, bicho mineiro, broca dos frutos de tomateiro, pulgões, tripes, cigarrinhas, percevejos, vaquinhas, etc.

Toxicidade - DL<sub>50</sub> oral - 451 mg/kg

DL<sub>50</sub> dérmica - > 5000 mg/kg

Poder residual - bastante longo

e) Bihedonal (MERCK DO BRASIL)

Nome técnico - 2,4 , D + MCPA

Grupo químico - ácido fenoxiacético

Nome químico - ácido 2 - 4 - diclorofenoxiacético (2-4D).  
ácido 4 - cloro - 2 metil - fenoxiacético (MCPA).

Fórmula Bruta - C<sub>8</sub> H<sub>6</sub> O<sub>3</sub> Cl<sub>2</sub>

C<sub>9</sub> H<sub>9</sub> O<sub>3</sub> Cl

Modo de ação - ação hormonal sistêmica

Dosagem recomendada - 1 - 2% p.a.

Concentração do produto - 56,7% ácido livre.

Toxicidade - moderadamente tóxico por via oral. Não é absorvido em quantidades tóxicas pela pele.

Indicações de uso - controle de ervas de folhas largas , nas culturas de arroz, trigo, e outros cereais, cana de açúcar, café, pastagens, plantas aquáticas.

Estes dados foram obtidos de: ALBERTONI e DO NADIO (1968), CAMARGO (1968), GALLO (1970), MARICONI (1971), ELLIOT et alii (1978), INFORME AGROPECUÁRIO (1979), e boletins dos fabricantes dos produtos utilizados.

### 3.2.5. Outros materiais

Os equipamentos utilizados em laboratório para a realização deste trabalho, foram os seguintes:

- autoclave
- estufa para esterilização de materiais
- estufa bacteriológica (28°C)
- banho maria
- balança analítica
- balança digital
- fluxo laminar (tipo horizontal)
- microscópio

Quanto à vidraria em geral, foram utilizados placas de Petri, pipetas, provetas, lâminas e lamínulas, tubos de ensaio, câmara de Newbauer, alça de Drigalsky, erlenmeyers, alça de platina, etc.

## 3.3. Métodos

### 3.3.1. Esterilização

A esterilização do meio de cultura, solução de tween 0,1%, solução de sais de metais, foi feita em autoclave a 1 atm durante 15 minutos.

Os defensivos foram esterilizados em banho-maria a 100°C, por 15 minutos, durante 3 dias.

### 3.3.2. Preparo do Inóculo

O fungo *Metarhizium anisopliae*, linhagem E<sub>6</sub>, foi repicado do tubo original para placas de Petri com meio de cultura (BDA), onde cresceu e permaneceu puro. Destas placas foi retirado o inóculo, que foi suspenso em solução de twenn 80 0,1%. Procedeu-se em seguida à contagem dos esporos,

e às diluições necessárias a fim de se obter as duas concentrações desejadas; uma entre  $10^6$  -  $10^7$  esporos/ml que foi usada para inoculação no centro das placas e outra com  $10^3$  esporos/ml, da qual se retirou uma alíquota de 0,1 ml (100 esporos), para semeadura nas placas.

### 3.3.3. Preparo das soluções de sais de metais e defensivos

Para se testar a influência dos sais de metais e dos defensivos sobre o fungo, foram preparadas soluções com esses produtos, em diferentes concentrações conforme especificado abaixo.

Para os sais de metais e defensivos (com exceção do Decis), foram preparadas soluções aquosas, de modo a se obter 200.000 µg/ml. No caso dos defensivos, os cálculos foram feitos, baseados na concentração dos mesmos e de modo a se obter 200.000 µg p.a./ml.

- Estas soluções foram esterilizadas e a partir delas foram preparadas diluições em água destilada estéril. Destas diluições foram retiradas alíquotas tais que, acrescentadas à quantidades apropriadas de meio de cultura, forneceram as concentrações de 1; 5; 10; 100; 1000; 2000; 5000 e 10 000 µg/ml de meio cultura.

Com o inseticida Decis, foi seguido um outro esquema, devido à baixa concentração e baixa dosagem recomendada para uso do produto. As diluições foram feitas, neste caso, a partir de uma solução pura de Decis. Do mesmo modo, das diluições foram retiradas alíquotas, que acrescentadas ao meio de cultura, forneceram as seguintes concentrações: 0,01; 0,02 ; 0,05 ; 0,10 ; 0,20 ; 0,50 ; 1,0 ; 2,0 ; 5,0 e 10,0 µg p.a/ml meio cultura.

### 3.3.4. Preparo das placas:

O meio de cultura, após esterilização e corre-

ção do pH para 6,8, foi distribuído em frascos, na quantidade certa para cada tratamento, sendo que para cada um foram feitas 4 repetições. Quando o meio de cultura atingiu cerca de 40°C, foram acrescentados os sais e defensivos, e em seguida, verteu-se o meio para placas esterilizadas.

### 3.3.5. Inoculação das placas

O inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.3.2, e procedeu-se a dois tipos de inoculação: semeadura e inoculação no centro das placas.

A inoculação no centro das placas foi feita, molhando-se o fio de platina no inóculo contendo  $10^6$  a  $10^7$  esporos/ml e inoculando-se o centro das placas.

Para a semeadura foi utilizada diluição de  $10^3$  esporos/ml, e foram retiradas através de pipetas, alíquotas de 0,1 ml (em torno de 100 esporos/placas) que foram semeados e espalhadas com alça de Drigalsky. Foi feito um controle, procedendo-se do mesmo modo, mas com o meio de cultura livre de sais e defensivos. Tanto para os tratamentos, como para o controle, foram feitas quatro repetições.

### 3.3.6. Incubação e parâmetros de avaliação

As placas foram incubadas a  $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . No caso de semeadura, foram feitas leituras aos 3, 6 e 12 dias após a inoculação, contando-se o número de esporos germinados, representados por uma colônia. Nas tabelas aparecem as médias destes resultados, que foram aproximados para números inteiros.

Já no caso da inoculação central, foram feitas medições no diâmetro das colônias aos 5 e 10 dias, e os dados das tabelas representam as médias dos valores obtidos, sem aproximação.

### 3.3.7. Análise de Setores

No caso dos sais, alguns tratamentos apresentaram setores que foram isolados, purificados e estudados quanto à possibilidade de serem mutantes resistentes ao respectivo sal.

Para isto, seguiu-se a mesma metodologia anterior, isto é, os esporos dos setores foram semeados ou inoculados no centro de placas contendo meio de cultura mais os respectivos sais em concentrações altas. Procedeu-se do mesmo modo descrito nos itens anteriores.

Os sais e respectivas concentrações onde apareceram os setores, bem como as concentrações testadas, estão relacionadas abaixo:

$ZnSO_4$  (500  $\mu g/ml$ ) — 0, 100, 2000, 5000, 10000 e 20000  $\mu g/ml$

$CuSO_4$  (1000  $\mu g/ml$ ) — 0, 500, 1000, 2000 e 5000  $\mu g/ml$

$MnSO_4$  (1000  $\mu g/ml$ ) — 0, 10000, 20000, 30000 e 50000  $\mu g/ml$

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

##### 4.1. Influência dos sais de metais no crescimento e esporulação do *M. anisopliae*.

###### 4.1.1. Acetato de Chumbo

Pela Tabela 1, observamos que o fungo foi resistente ao acetato de chumbo, até a concentração de 2000  $\mu\text{g/ml}$ , com relação ao crescimento e esporulação.

No entanto, a esporulação foi retardada e inversamente proporcional à concentração, à partir de 1000 $\mu\text{g/ml}$ . Tanto na semeadura, como na inoculação no centro das placas, a partir do 3º dia, observou-se esporulação normal, semelhante à testemunha, até a concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Na concentração de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , o fungo iniciou a esporulação no 6º dia e com 2000  $\mu\text{g/ml}$ , só no 8º dia.

Quanto ao crescimento, não houve diferença notável de tamanho até 100  $\mu\text{g/ml}$ . A partir daí, o diâmetro das colônias diminuiu, tanto na semeadura, como na inoculação no centro da Placa (Figura 1).

Com relação ao aspecto morfológico, as colônias se apresentaram semelhantes até a concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Com 1000 e 2000  $\mu\text{g/ml}$ , as colônias apresentaram centro mais



Tabela 1 - *M. anisopliae* - Diâmetro das colônias (cm), após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de acetato de chumbo. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,58	5,60	98	98	98
1	2,52	5,53	90	90	90
5	2,52	5,54	89	89	89
10	2,52	5,50	86	86	86
50	2,54	5,56	85	85	85
100	2,50	5,36	86	86	86
1000	2,27	5,06	85	85	85
2000	1,42	3,98	85	85	85
5000	0	0	0	0	0
10000	0	0	0	0	0

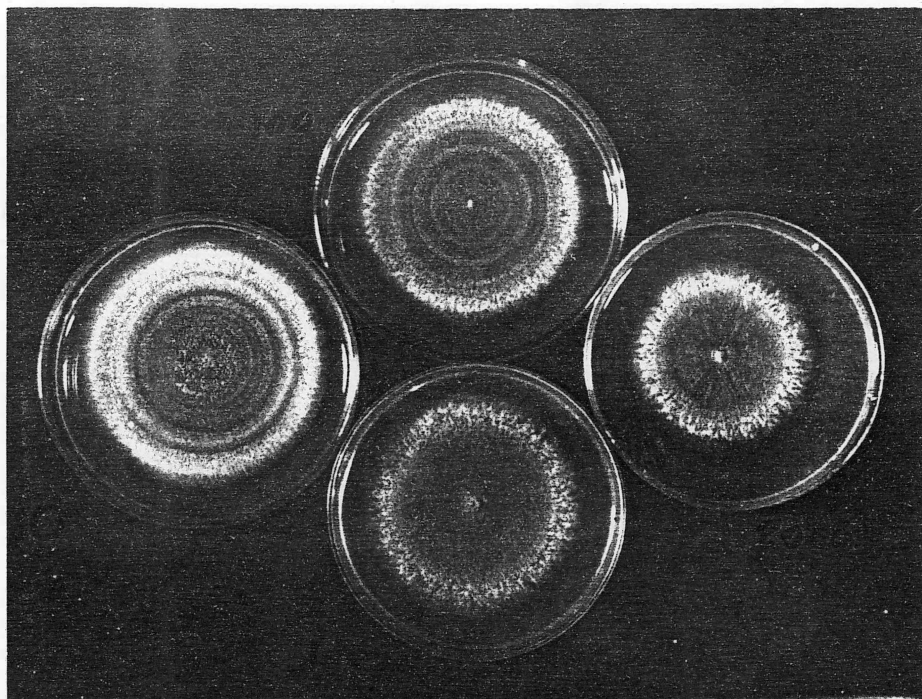


Figura 1. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (inoculação central) em presença de acetato de chumbo ( $\mu\text{g/ml}$ ).

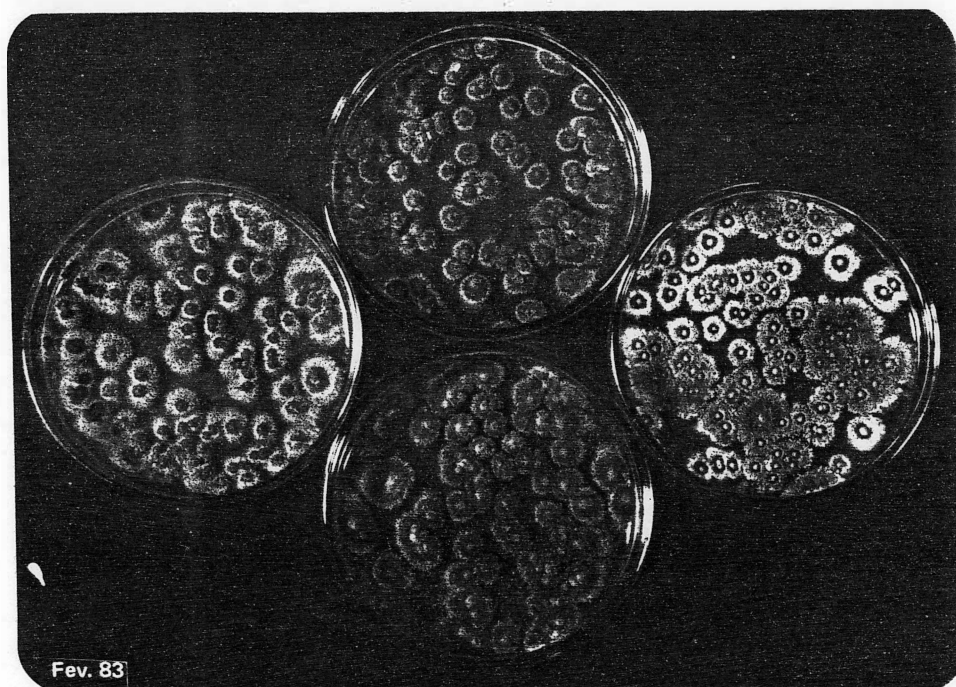


Figura 2. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (semeadura) em presença de acetato de chumbo ( $\mu\text{g/ml}$ ).

claro, e cor mais amarelada, bastante acentuada na concentração de 2000 µg/ml, tanto na frente como no reverso da placa. De modo geral, em todas as concentrações o reverso da placa se apresentou mais amarelo que na testemunha (Figura 2).

Este fenótipo diferente poderá ser usado para diferenciar *M. anisopliae* de outros fungos, quando se proceder a isolamentos de solos ou outros ambientes.

Esta característica, se demonstrada ser geral para outras linhagens de *M. anisopliae*, poderá ser utilizada juntamente com outros processos de caracterização, como os já descritos por De CONTI et aliis. (1980).

#### 4.1.2. CuSO<sub>4</sub>

Na Tabela 2, encontram-se os resultados obtidos experimentalmente e referentes à influência do CuSO<sub>4</sub> sobre o *M. anisopliae*.

Nota-se por estes dados, que concentrações maiores que 1000 µg/ml inibiram o crescimento do fungo, tanto na semeadura, como na inoculação no centro da placa.

Embora o *M. anisopliae* tenha esporulado em todas as concentrações, esta esporulação apresentou-se normal e semelhante à testemunha, apenas até a concentração de 100 µg/ml. Com a quantidade de 1000 µg/ml, houve diminuição da esporulação. Houve também um leve efeito esporostático do sal sobre o fungo, pois para a concentração de 1000 µg/ml, a esporulação foi iniciada no 5º dia, enquanto que nas demais havia esporos já no 3º dia de contagem.

Com relação ao aspecto morfológico, não houve diferenciação notável quando se comparou as colônias entre si e com a testemunha, a não ser na concentração mais alta, tanto na inoculação central como na semeadura.

Na concentração de 1000 µg/ml, houve diminuição do

Tabela 2 - *M. anisopliae* - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa, após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C em meio de cultura com concentrações crescentes de sulfato de cobre. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,58	5,60	98	98	98
1	2,50	5,54	96	96	96
5	2,44	5,28	97	97	97
10	2,56	5,52	93	93	93
50	2,52	5,58	92	92	92
100	2,64	5,48	89	89	89
1000	2,02	4,66	64	64	64
2000	0	0	0	0	0
5000	0	0	0	0	0
10000	0	0	0	0	0

tamanho das colônias, algumas delas se apresentando com centro bem mais claro, na semeadura. Estas mesmas colônias, no início do crescimento, assemelhavam-se a uma estrela, mas no fim do experimento, mostravam forma arredondada, semelhante à testemunha (Figura 3).

Com relação à semeadura e inoculação central, o diâmetro das colônias diminuiu muito na concentração de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , o que foi facilmente observado (Figura 4). Tal fato poderá trazer vantagens, pois devido a esse crescimento menor, poderemos colocar um número maior de colônias por placa. Isto é vantajoso quando se pretende fazer réplicas de colônias com diversas finalidades, como por exemplo, isolamento de mutantes. Outras substâncias, principalmente o desoxicolato de sódio, são usadas com essa finalidade, podendo ser substituídas pelo sal de cobre em questão (MAKINTOSH e PRITCHARD, 1963).

Na dosagem de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , na inoculação central, apareceu um setor ( $\text{Cu}_1$ ) que foi isolado, purificado e inoculado em concentrações mais altas (500, 1000, 2000 e 5000  $\mu\text{g/ml}$ ) para se observar se poderia ser um mutante resistente ao cobre. Não houve crescimento nas concentrações de 2000 e 5000  $\mu\text{g/ml}$ , como se observa pela Tabela 3. A Figura 5 mostra o aspecto do fungo nas concentrações em que houve crescimento. Isso mostra que esses setores e a linhagem original apresentam o mesmo comportamento em relação ao efeito do sal.

Podemos pois concluir que possivelmente esses setores isolados não são mutantes resistentes, comportando-se apenas como fenocópias ou então apresentam uma alta instabilidade.

Por outro lado, como muitos fungicidas cúpricos (cálda bordalesa, sulfato básico de cobre, cobres fixos) são muito usados em controle integrado, é necessário que se conheça o comportamento do fungo em relação a estes produtos.

ALVES, (1978), estudou a ação do oxiclureto de

Tabela 3 - *M. anisopliae* - Variante Cu<sub>1</sub> - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias / placa, após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C , em meio de cultura com concentrações crescentes de sulfato de cobre. Média de 4 repetições.

Concentração µg /ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,00	5,95	90	90	90
500	1,82	5,57	71	73	73
1000	0,87	4,07	66	68	68
2000	0	0	0	0	0
5000	0	0	0	0	0

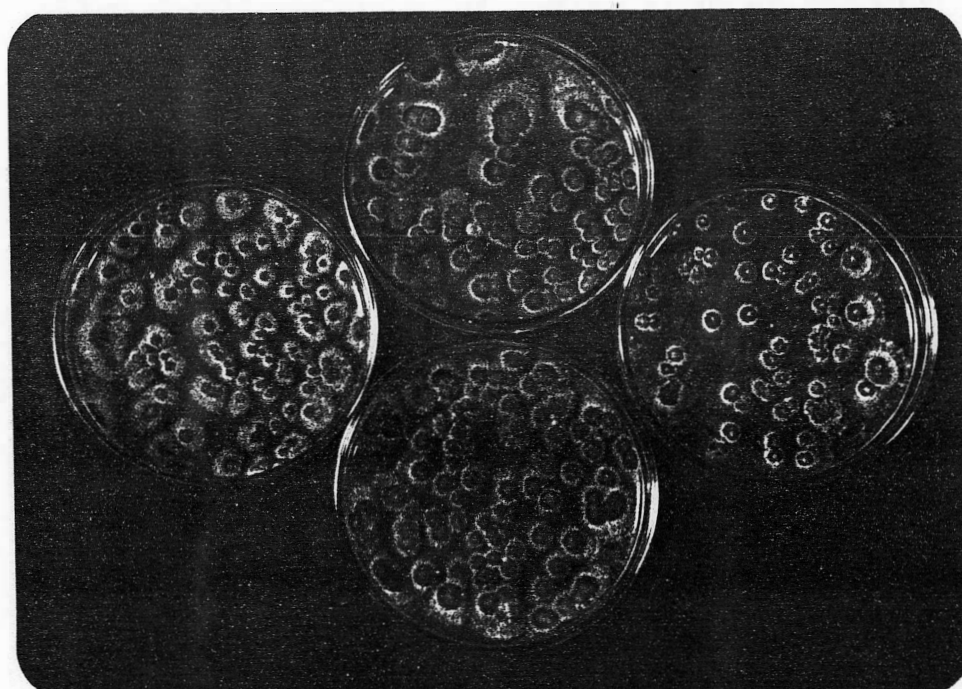


Figura 3. Aspectos morfológicos das colônias de *M. anisopliae* (semeadura) em presença de sulfato de cobre ( $\mu\text{g/ml}$ )

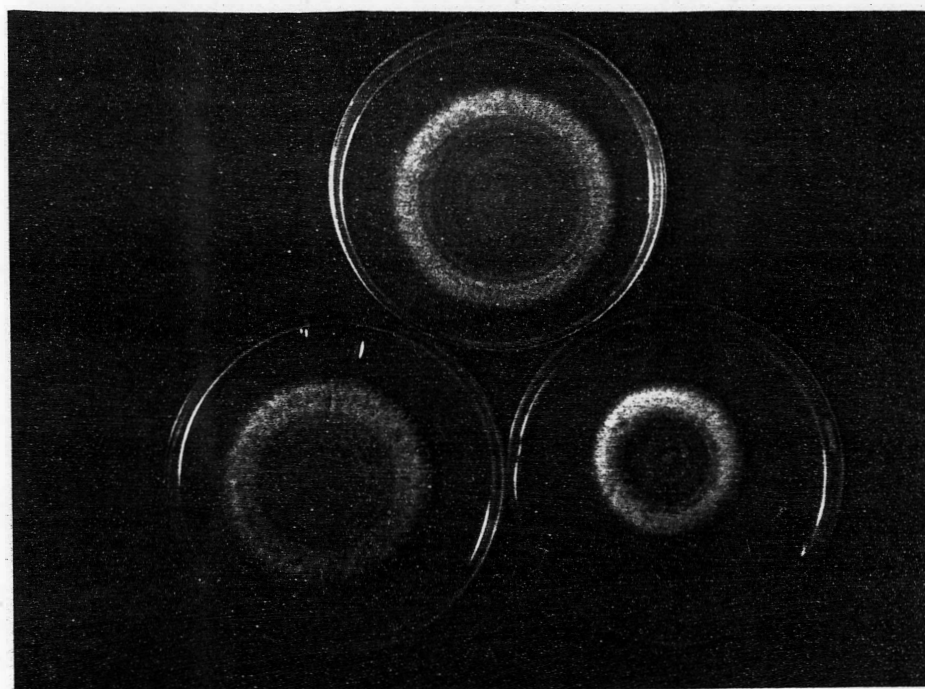


Figura 4. Aspectos morfológicos das colônias de *M. anisopliae* (inoculação central) em presença de sulfato de cobre ( $\mu\text{g/ml}$ ).

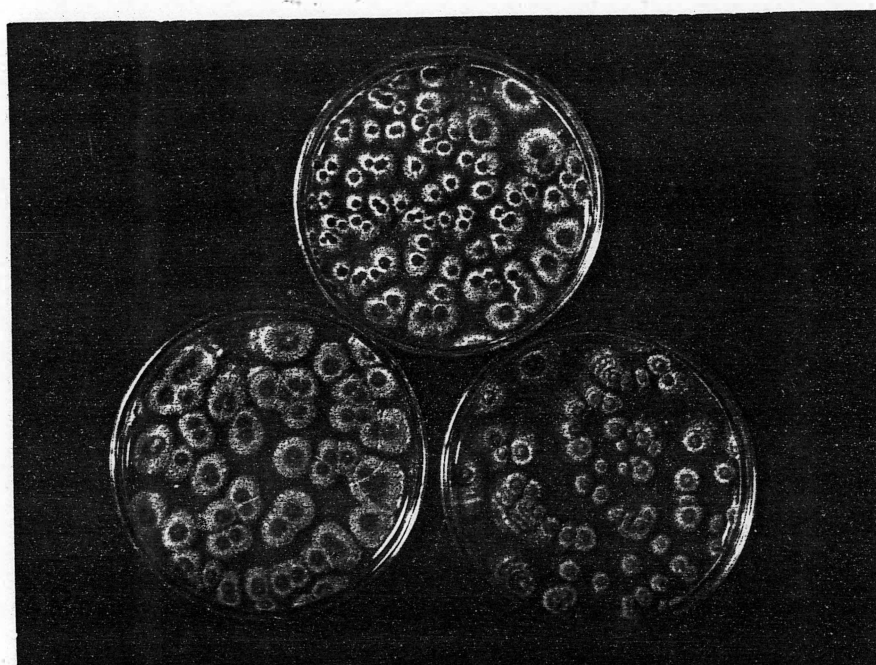


Figura 5. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* isoladas do Setor Cu<sub>1</sub>, nas concentrações em que houve crescimento após sementeira em meio com concentrações de 0, 100 e 1000 µg/ml de CuSO<sub>4</sub>.



cobre sobre o *M. anisopliae* e concluiu que não houve inibição do fungo pelo produto.

#### 4.1.3. Sulfato de Zinco

Na Tabela 4, observamos os dados experimentais referentes ao sulfato de zinco.

De modo geral, o *M. anisopliae* mostrou-se altamente resistente ao sulfato de zinco crescendo até a concentração de 10000 µg/ml.

Podemos observar que, embora haja crescimento até a concentração de 10000 µg/ml, houve inibição quanto ao tamanho das colônias, já a partir de 1 µg/ml, com relação à testemunha, tanto na semeadura como nas placas inoculadas no centro. A partir de 1000 µg/ml esta diminuição de tamanho vai se acentuando, e as colônias que cresceram em 10000 µg/ml foram muito pequenas.

O aspecto morfológico das colônias foi semelhante à testemunha, com relação à forma da colônia e cor do micélio e esporos, até a concentração de 1000 µg/ml. Com 2000 e 5000 µg/ml as colônias foram semelhantes à testemunha em forma, mas a esporulação foi de cor verde mais clara, e no centro da colônia notou-se a presença de filamentos com aspecto cottonoso. Na concentração de 10000 µg/ml, houve crescimento de micélio branco, e leve início de esporulação no centro, sendo os esporos ainda mais claros que nas concentrações anteriores (Figura 6).

Houve um efeito esporostático à medida em que cresceram as concentrações do sal, mas esse efeito foi se diluindo ao longo do experimento. Aos 3 dias, só havia esporulação até a concentração de 1000 µg/ml. No 5º dia, a esporulação estava normal inclusive em 5000 µg/ml. Na concentração de 10000 µg/ml, o início da esporulação se deu ao 9º dia, e a esporulação foi mais fraca que nas outras concentrações.

Tabela 4 - *M. anisopliae* - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa, após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de sulfato de zinco. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,52	4,15	98	98	98
1	2,12	3,76	98	98	98
5	2,08	3,85	94	94	94
10	2,14	3,85	90	91	91
50	2,16	3,73	91	93	93
100	2,00	3,54	86	86	86
1000	1,78	3,24	86	86	86
2000	1,50	3,18	86	87	87
5000	1,06	2,26	84	87	87
10000	0,16	0,97	0	74	74

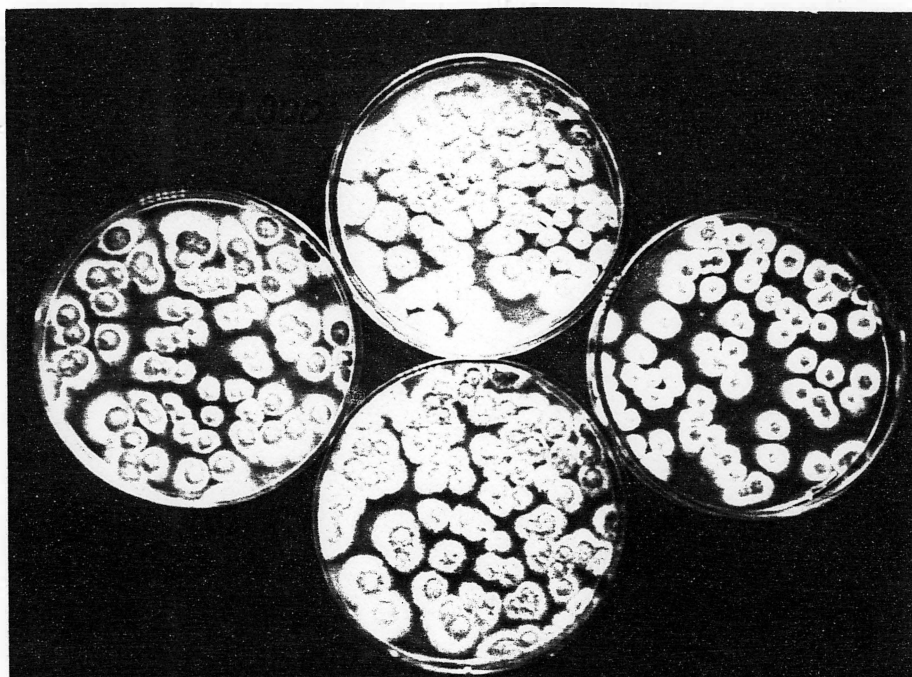


Figura 6. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* em presença de doses crescentes de  $ZnSO_4$  (1000, 2000, 5000 e 10000  $\mu g/ml$ ).

Na concentração de 5000  $\mu\text{g/ml}$  apareceram setores que foram isolados e testados para verificar a possibilidade de serem mutantes mais resistentes ao zinco.

As Tabelas 5 e 6 mostram os dados obtidos com esses dois setores ( $\text{Zn}_1$  e  $\text{Zn}_2$ ).

Os isolados cresceram em todas as concentrações de 0 a 20.000  $\mu\text{g/ml}$  e houve pequena variação em diâmetro e número de colônias/placa, quando comparamos os dois setores entre si. Morfologicamente, também não houve diferenças entre eles (Figuras 7, 8, 9, 10).

Houve um retardamento de germinação e esporulação para a dosagem de 20000  $\mu\text{g/ml}$ , onde o fungo só iniciou crescimento no 5º dia, e esporulação no 8º dia, enquanto que nas demais concentrações (0, 2000, 5000 e 10000  $\mu\text{g}$ ) observamos crescimento e esporulação a partir do 3º dia.

Quanto ao aspecto morfológico, as colônias se apresentaram semelhantes à testemunha, em forma, havendo apenas uma diferença de coloração a partir de 5000  $\mu\text{g/ml}$  (esporos com coloração verde mais clara, sendo a intensidade da cor verde inversamente proporcional à concentração.)

Com relação ao tamanho das colônias, houve diminuição com o aumento da concentração, a partir de 5000  $\mu\text{g/ml}$ . O número de colônias por placa também diminuiu, mas somente a partir de 10000  $\mu\text{g/ml}$ .

Esses dois variantes,  $\text{Zn}_1$  e  $\text{Zn}_2$ , apresentaram resistência ao  $\text{ZnSO}_4$  na concentração de 20000  $\mu\text{g/ml}$ , embora se tenha notado que, nessa concentração, houve retardamento na germinação (5 dias) e na esporulação (8 dias). De todo modo, este gen para resistência ao  $\text{ZnO}_4$  não parece ter efeito danoso sobre o fungo, pois se comparamos o número de colônias/placa e os diâmetros das mesmas, com medidas de linhagem original, ambos na concentração de 0  $\mu\text{g/ml}$ , não notamos grandes diferenças en

Tabela 5 - *M. anisopliae* - Variante Zn<sub>1</sub> - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa, após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de ZnSO<sub>4</sub>. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,00	5,30	85	85	85
2000	2,00	5,90	80	80	80
5000	1,50	4,80	85	85	85
10000	1,30	4,45	73	79	79
20000	0,95	3,95	0	65	65

Tabela 6 - *M. anisopliae* - Variante Zn<sub>2</sub> - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de ZnSO<sub>4</sub>. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	1,95	5,70	87	87	87
2000	1,93	5,80	80	80	80
5000	1,50	4,85	85	85	85
10000	1,25	4,50	68	68	68
20000	0,90	3,95	0	57	57

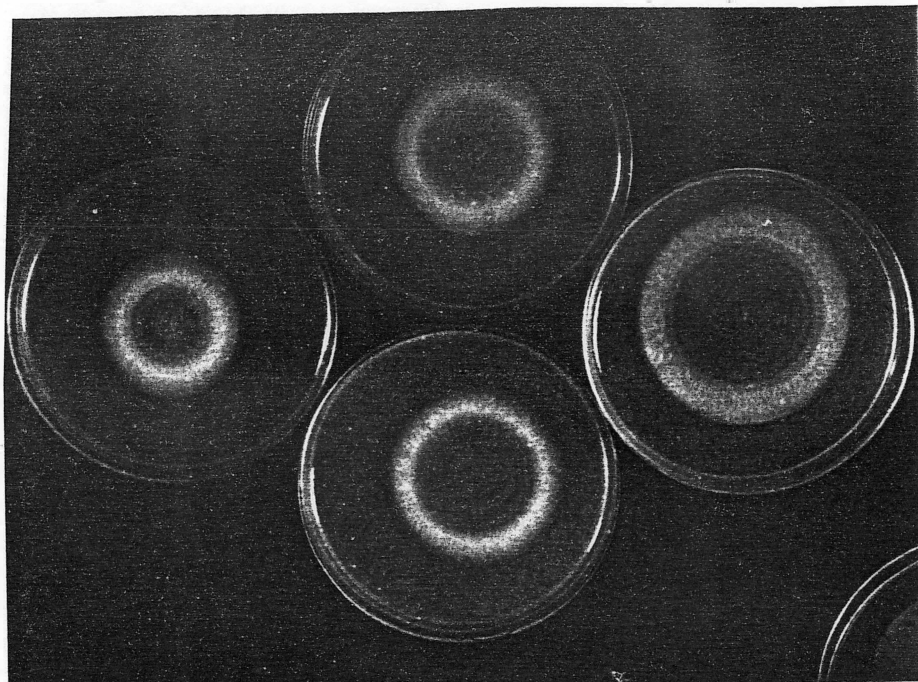


Figura 7. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* variante  $Zn_1$  (inoculação central) em presença de  $ZnSO_4$  ( $\mu g/ml$ )

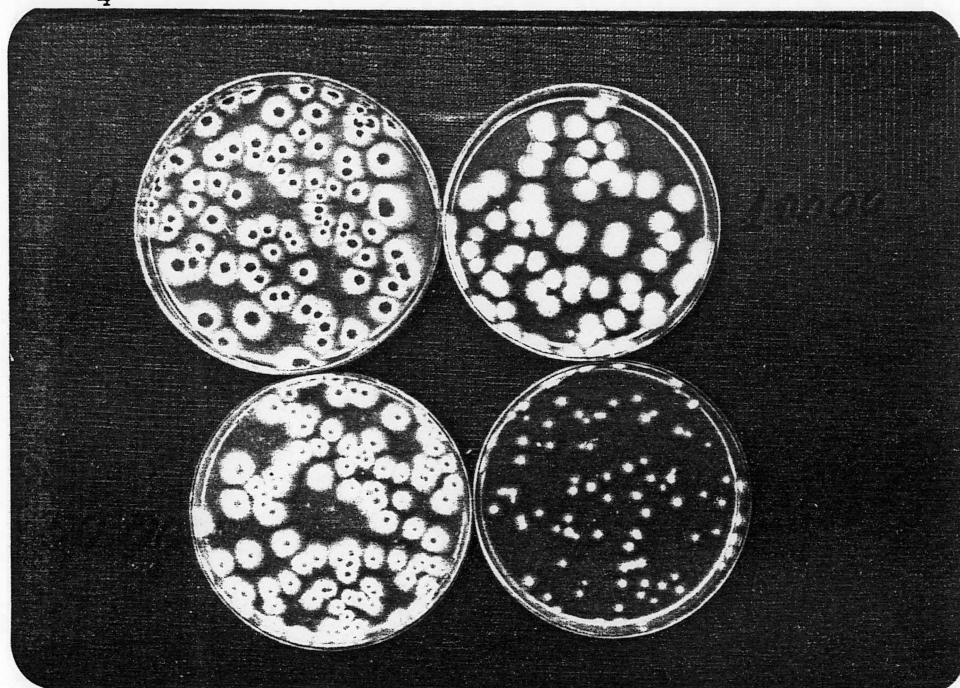


Figura 8. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* variante  $Zn_1$  (semeadura) em presença de  $ZnSO_4$  ( $\mu g/ml$ ).

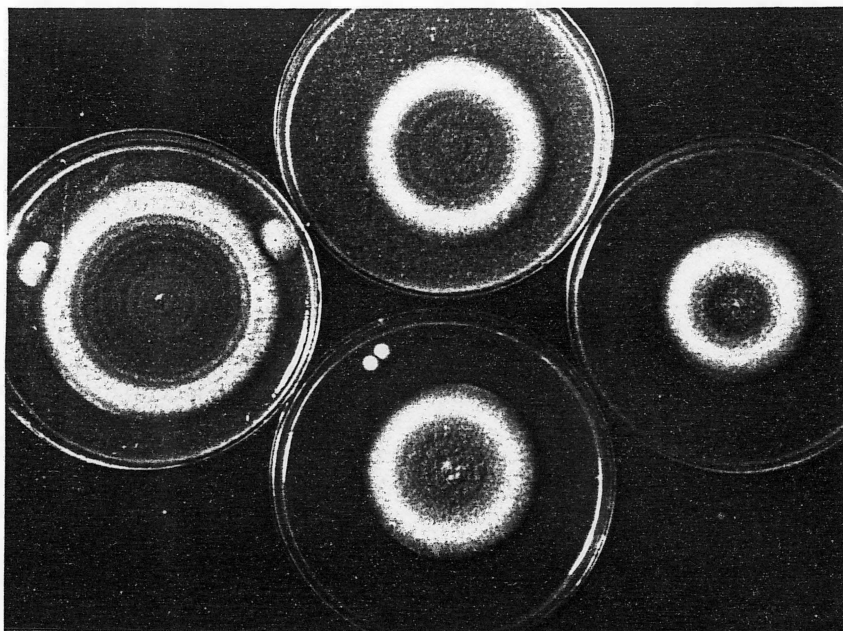


Figura 9. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (inoculação central), variante  $Zn_2$  em presença de  $ZnSO_4$  ( $\mu g/ml$ ).

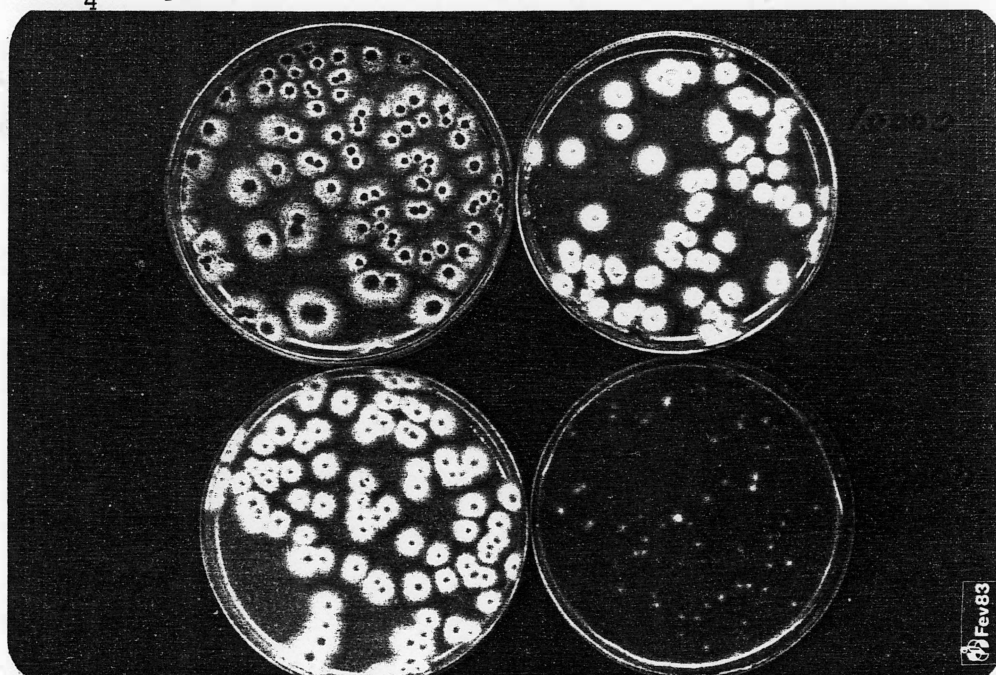


Figura 10. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* variante  $Zn_2$  (semeadura) em presença de  $ZnSO_4$  ( $\mu g/ml$ ).



tre os resultados. A Figura 11, compara o comportamento da linhagem original de *M. anisopliae* com os variantes Zn<sub>1</sub> e Zn<sub>2</sub>, nas concentrações usadas.

Visto que o gen para resistência não interfere no desenvolvimento do fungo esses variantes poderiam ser usados como marcos genéticos para cruzamento, uma vez que o ciclo parassexual já foi descrito nesta espécie (MESSIAS, 1979 e MESSIAS e AZEVEDO, 1980).

Também é importante que se conheça a resistência do fungo à produtos à base de zinco, uma vez que este elemento entra na composição de muitos fungicidas, como Zineb (Dithane Z-78), Ziram (Zerlate), Propineb (Antracnol), pois estes dados são muito importantes em controle integrado.

Assim, MACHROWICZ, 1967, citado por ROBERTS e CAMPBELL (1977) testou alguns fungicidas, entre eles Zineb, e verificou que este último inibiu o crescimento de *M. anisopliae*.

#### 4.1.4. Sulfato de manganês

Na Tabela 7, encontram-se os dados experimentais referentes ao efeito do MnSO<sub>4</sub> sobre o *M. anisopliae*.

O fungo mostrou resistência ao MnSO<sub>4</sub> em todas as dosagens, não havendo influência do sal sobre a germinação, pois o número de colônias, nas diferentes concentrações é muito semelhante, inclusive quando comparado à testemunha.

Houve um retardamento do crescimento na concentração de 10000 µg/ml, pois o fungo só iniciou a germinação aos 5 dias. Nesta mesma concentração e na concentração de 5000 µg/ml houve efeito esporostático, pois no 12º dia de inoculação, havia poucas colônias apresentando esporulação nas dosagens referidas.

Quanto ao aspecto morfológico, as colônias apresentaram forma, cor e diâmetro semelhantes à testemunha e en-

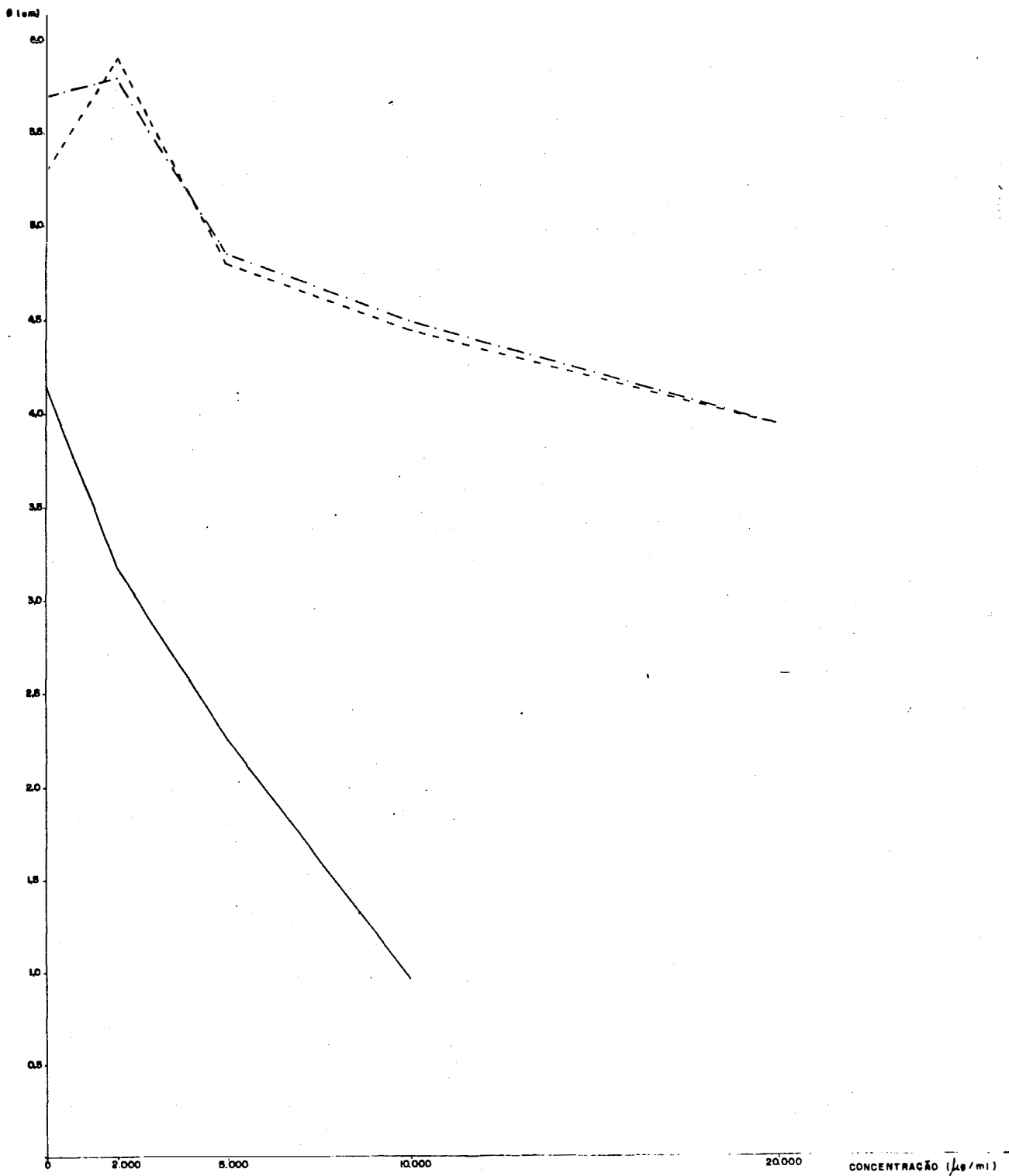


Fig. 11 - Representação gráfica do comportamento de *M. anisopliae*, linhagem E<sub>8</sub> e dos variantes Zn<sub>1</sub> e Zn<sub>2</sub> em presença de Sulfato de Zinco (ZnSO<sub>4</sub>).

LEGENDA

- M. anisopliae
- - - M. anisopliae - variante Zn<sub>1</sub>
- · - · M. anisopliae - variante Zn<sub>2</sub>

Tabela 7 - *M. anisopliae* - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa, após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de  $MnSO_4$ . Média de 4 repetições

Concentração µg/ml	Inoculação central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,42	4,20	98	98	98
1	2,18	4,27	92	92	92
5	2,22	4,28	95	95	95
10	2,26	4,18	91	91	91
50	2,24	4,20	92	92	92
100	2,18	4,01	92	92	92
1000	1,98	4,25	84	84	84
2000	1,40	3,80	82	84	84
5000	0,16	0,87	68	85	85
10000	0	0,37	0	76	76

tre as concentrações, até 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Nas dosagens de 1000 até 10000  $\mu\text{g/ml}$ , houve acentuada diminuição no diâmetro das colônias, sendo que na concentração mais alta, havia ainda desuniformidade do tamanho das colônias dentro da mesma placa.

Além disso, o aspecto das colônias a partir de 1000  $\mu\text{g}$  foi diferente da testemunha e demais concentrações. Neste caso, as colônias apresentaram-se com o centro de cor branca, mais elevado em relação ao restante da colônia, e a esporulação distribuída ao redor. A coloração dos esporos foi normal para todas as concentrações (Figuras 12 e 13).

Em algumas placas apareceram setores (Figura 14). Um deles foi isolado, purificado e testado para resistência a altas concentrações de  $\text{MnSO}_4$ .

Os resultados obtidos estão na Tabela número 8.

Observamos que o variante  $\text{Mn}_1$  mostrou ser altamente resistente ao sulfato de manganês, crescendo e esporulando normalmente até a concentração de 50000  $\mu\text{g/ml}$ , como podemos notar pelas Figuras 15 e 16.

O diâmetro das colônias foi semelhante quando comparamos as diferentes concentrações entre si e com a testemunha. Da mesma forma, o número de colônias/placa também foi praticamente o mesmo entre as concentrações, e com relação à testemunha. A esporulação foi normal a partir do 3º dia em todas as concentrações.

Morfológicamente, não houve grandes diferenças entre as concentrações e a testemunha, mas todos apresentaram diferenças se comparados à linhagem original do fungo. De modo geral, as colônias mostraram centro mais elevado, com aspecto filamentososo, branco, com esporos no centro e ao redor.

Da mesma forma que aconteceu com o sulfato de zinco, o gen para resistência ao  $\text{MnSO}_4$ , confere alto grau de

Tabela 8 - *M. anisopliae* - Variante Mn<sub>1</sub> - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C em meio de cultura com concentrações crescentes de MnSO<sub>4</sub>. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,20	4,00	101	101	101
10000	2,17	4,10	92	92	92
20000	2,20	4,10	92	92	92
30000	2,15	4,15	92	92	92
50000	2,15	4,00	90	90	90

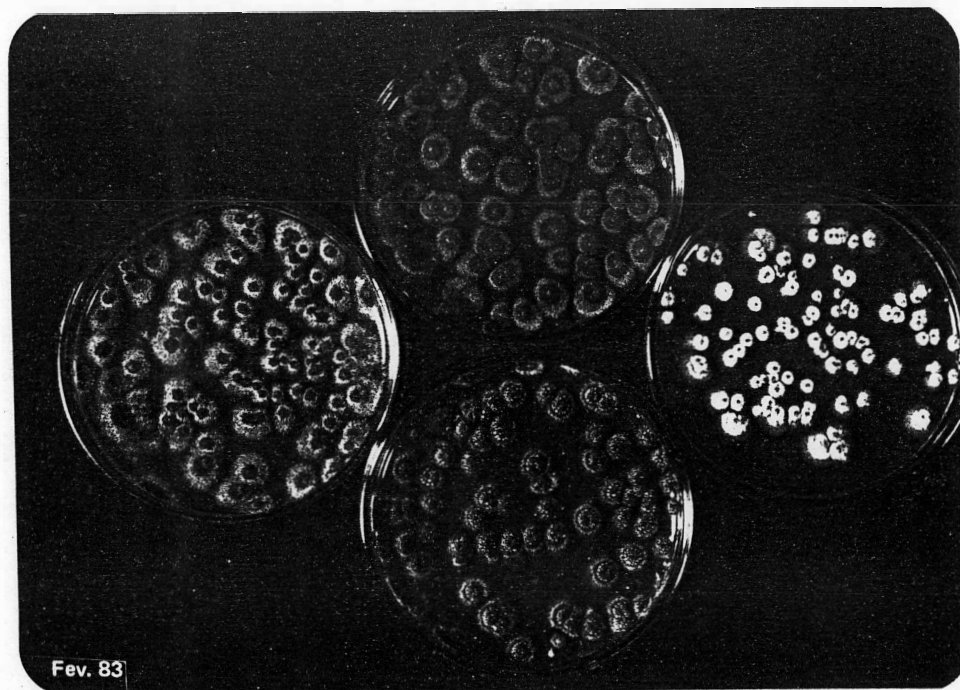


Figura 12. Aspecto morfológico de *M. anisopliae* em presença de  $\text{MnSO}_4$  ( $\mu\text{g/ml}$ ).

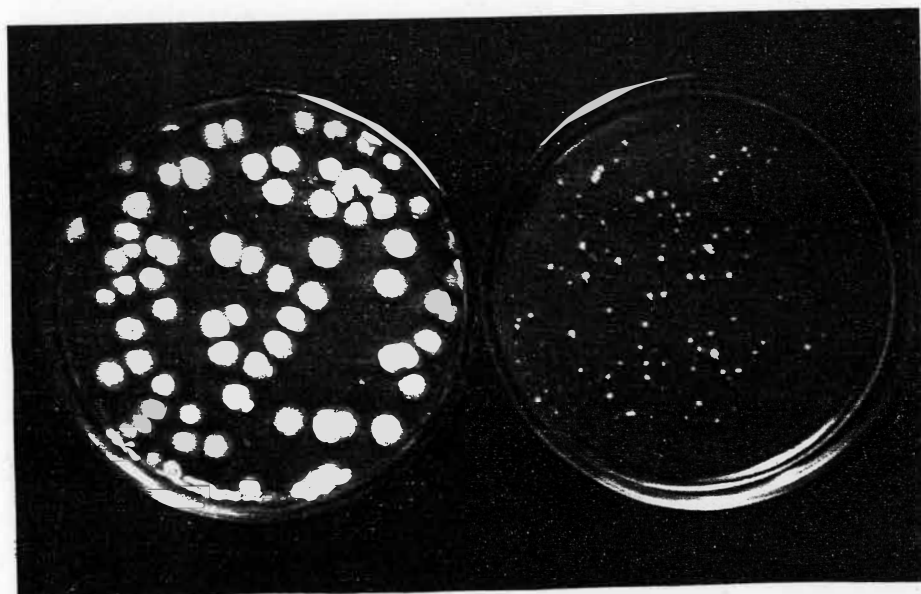


Figura 13. Aspecto das colônias de *M. anisopliae*, em presença de  $\text{MnSO}_4$ , 6 dias após a inoculação, nas concentrações de 5000 e 10000  $\mu\text{g/ml}$ .

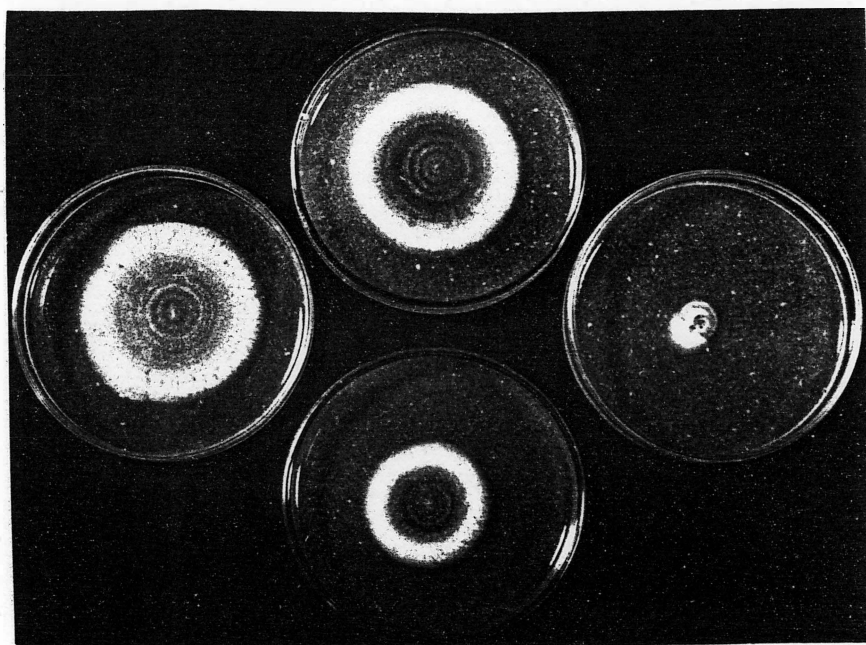


Figura 14. Colônias de  $\text{MnSO}_4$  nas concentrações de 1, 1000 , 2000 e 5000  $\mu\text{g/ml}$ , apresentando setores.

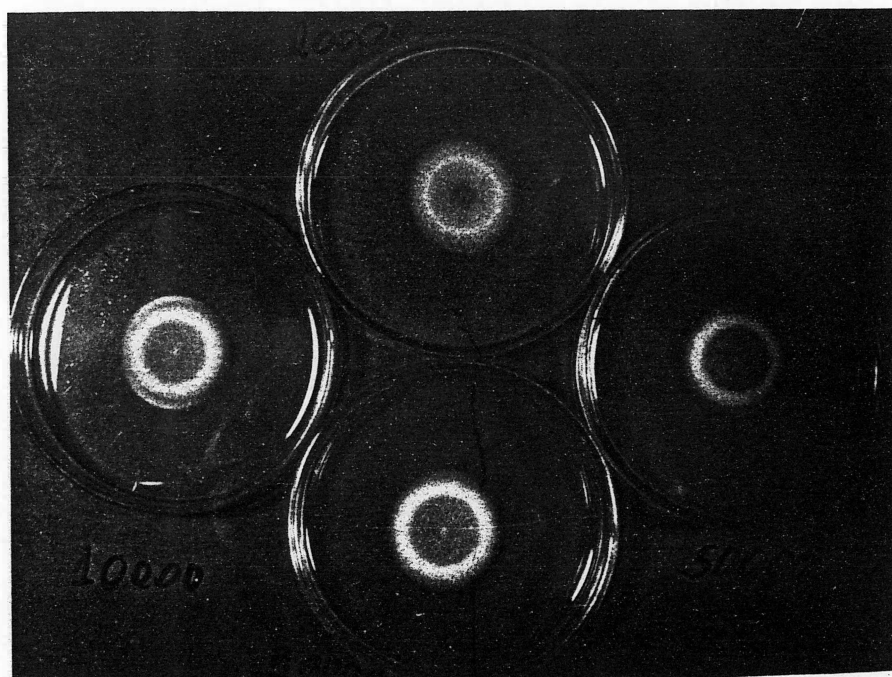


Figura 15. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* variante  $Mn_1$  (inoculação central) em presença de  $MnSO_4$  ( $\mu g/ml$ ).

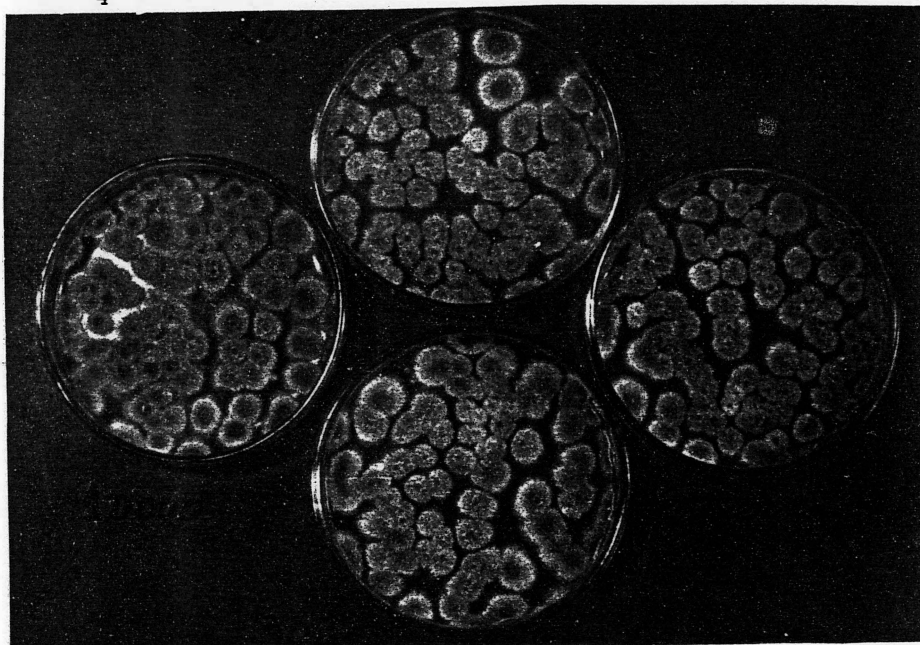


Figura 16. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* variante  $Mn_1$  (semeadura) em presença de  $MnSO_4$  ( $\mu g/ml$ ).



resistência e não parece ter qualquer efeito nocivo sobre o variante  $Mn_1$ , pois comparando crescimento das colônias e número de colônias/placa, na dosagem de 0  $\mu\text{g/ml}$  com as medidas da linhagem original nesta mesma concentração observamos que os resultados encontrados são muito semelhantes.

A Figura 17 compara o comportamento da linhagem original do fungo e do variante  $Mn_1$  com relação às doses utilizadas de  $MnSO_4$ .

Tais variantes poderiam ser utilizados como marcadores genéticos em cruzamentos, da mesma forma que o variante  $Zn_1$ , uma vez que o ciclo parassexual já foi descrito (MESSIAS, 1979 e MESSIAS e AZEVEDO, 1980).

Por outro lado, o manganês entra na composição de fungicidas, como por exemplo, o Maneb, que são muito usados em controle integrado. Por isto é muito importante que se conheça a ação do sal sobre o fungo.

#### 4.1.5. Biclureto de mercúrio

Para o  $HgCl_2$  foram usadas concentrações de 0; 1; 5; 10 e 20  $\mu\text{g/ml}$  pois em um teste preliminar, o fungo cresceu apenas até 10  $\mu\text{g/ml}$ . As concentrações e resultados obtidos encontram-se na Tabela número 9.

Por estes dados, podemos observar que o *M. anisopliae* foi fortemente inibido pelo  $HgCl_2$ , só crescendo até a concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$ , tanto nas placas de semeadura, como nas placas inoculadas no centro.

Podemos notar que o diâmetro das colônias foi semelhante, quando comparamos as diferentes concentrações entre si e com a testemunha. Na verdade, nota-se uma pequena diminuição no diâmetro das colônias, conforme a concentração aumenta, tanto aos 5, como aos 10 dias de inoculação (Figura 18).

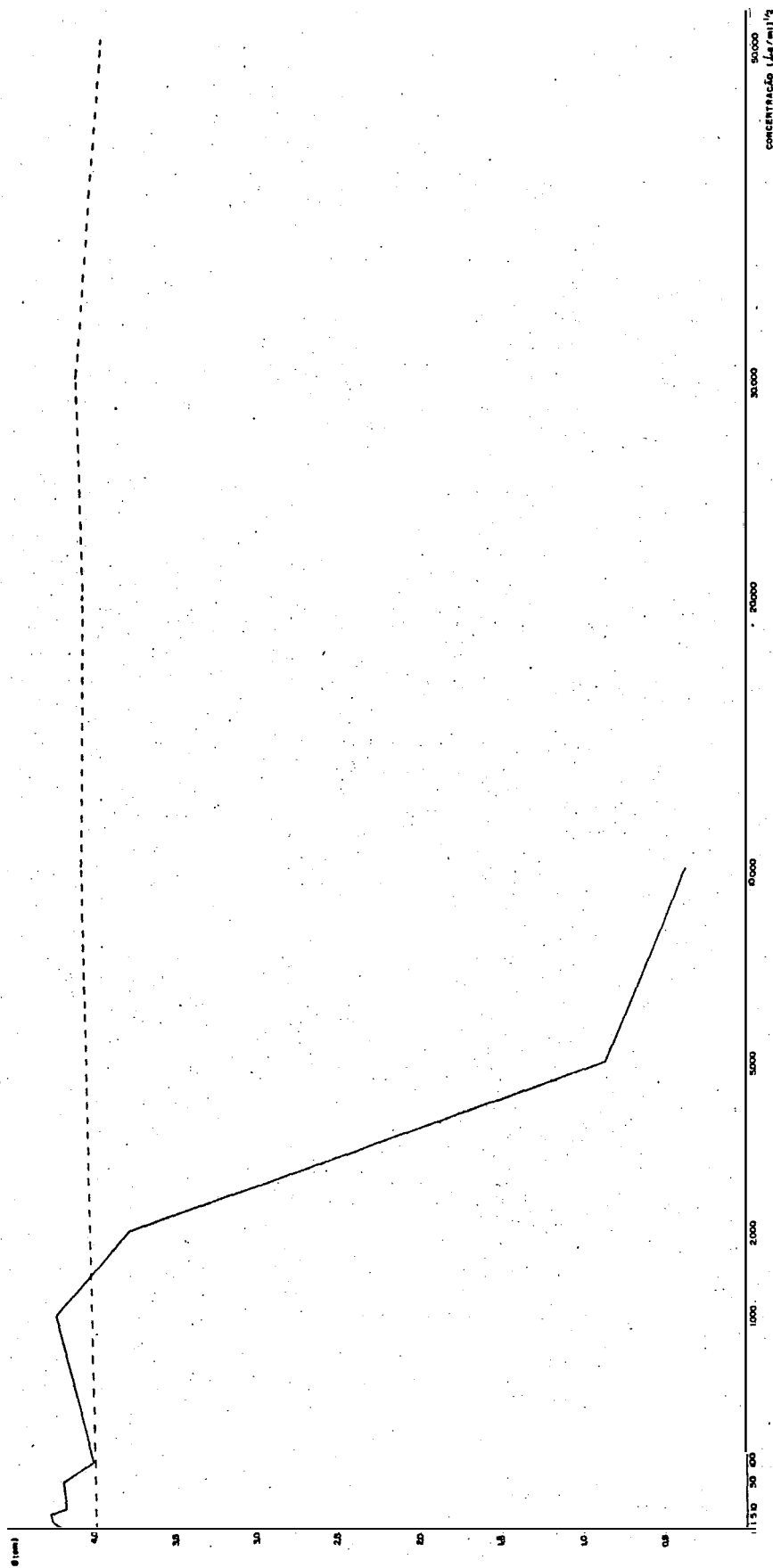


Fig. 17 - Representação gráfica do comportamento de M. antisipiae e do variante Mr1, em presença de MnSO4.

Tabela 9 - *M. anisopliae* - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes de HgCl<sub>2</sub>. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,62	4,46	97	97	97
1	2,60	4,12	80	80	80
5	2,48	4,04	76	76	76
10	2,30	3,78	65	65	65
20	0	0	0	0	0

Quanto à sementeira, notamos que já com 1  $\mu\text{g/ml}$ , há uma diminuição na quantidade de colônias com relação à testemunha, mas esse número se mantém praticamente constante até a concentração de 5  $\mu\text{g/ml}$ , caindo um pouco na concentração seguinte (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 19).

Observou-se esporulação em todas as concentrações e não houve diferenciação morfológica entre as diferentes concentrações. A partir de 20  $\mu\text{g/ml}$ , o  $\text{HgCl}_2$  inibiu fortemente o fungo.

Embora os fungicidas à base de mercúrio (Granosan, Neantina, etc) tenham seu uso limitado ao tratamento de sementes, é sempre bom lembrar que o uso destes produtos deve ser evitado em locais onde se espera que haja crescimento do fungo em questão.

Por outro lado, o mercúrio pode ser importante, devido a sua alta toxicidade ao fungo, em experimentos de campo, quando se deseja isolar lotes adjacentes, onde serão aplicados fungo e inseticida.

Segundo SANTOS (1978), usando-se o fungicida para o qual o fungo é suscetível, teremos garantia de que ele não passará para o lote tratado com inseticida e assim não influirá nos resultados do controle químico e biológico.

A Figura 20 mostra o comportamento do fungo em presença de concentrações crescentes dos sais minerais utilizados.

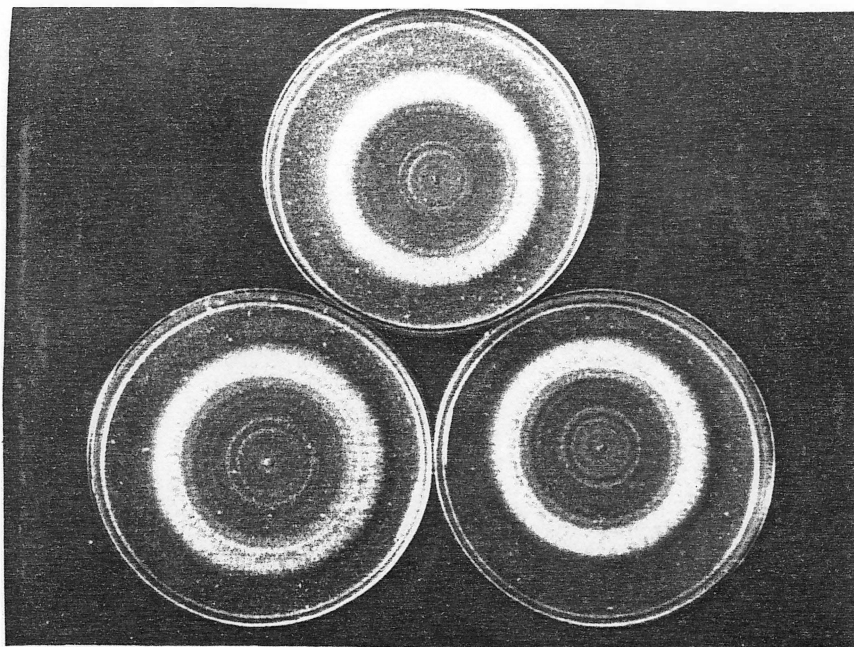


Figura 18. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (inoculação central) em presença de  $\text{HgCl}_2$  ( $\mu\text{g/ml}$ )

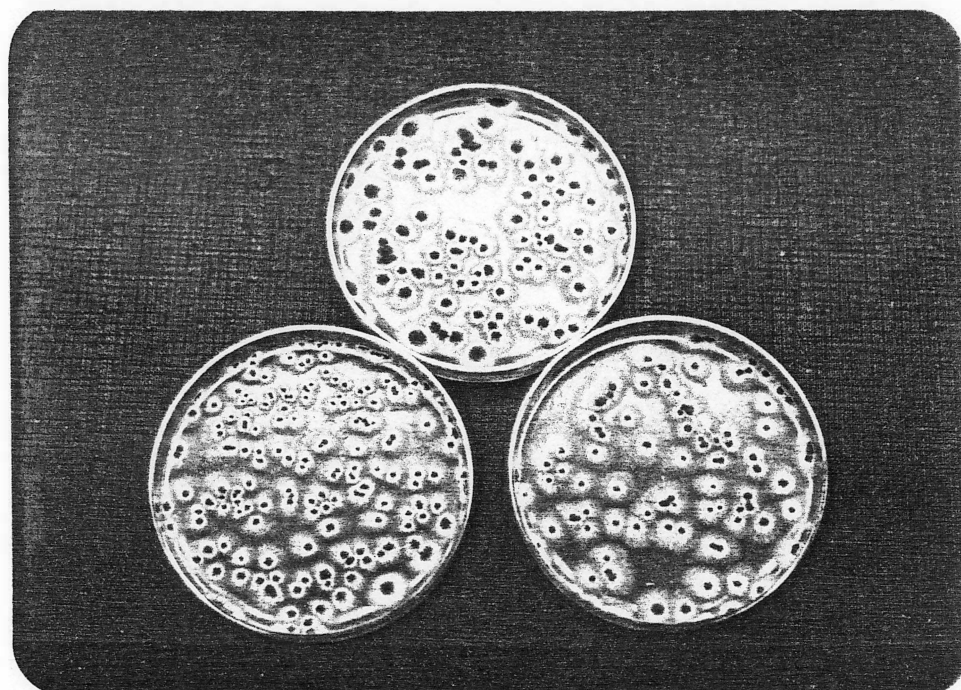


Figura 19. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (semeadura) em presença de  $\text{HgCl}_2$  ( $\mu\text{g/ml}$ )

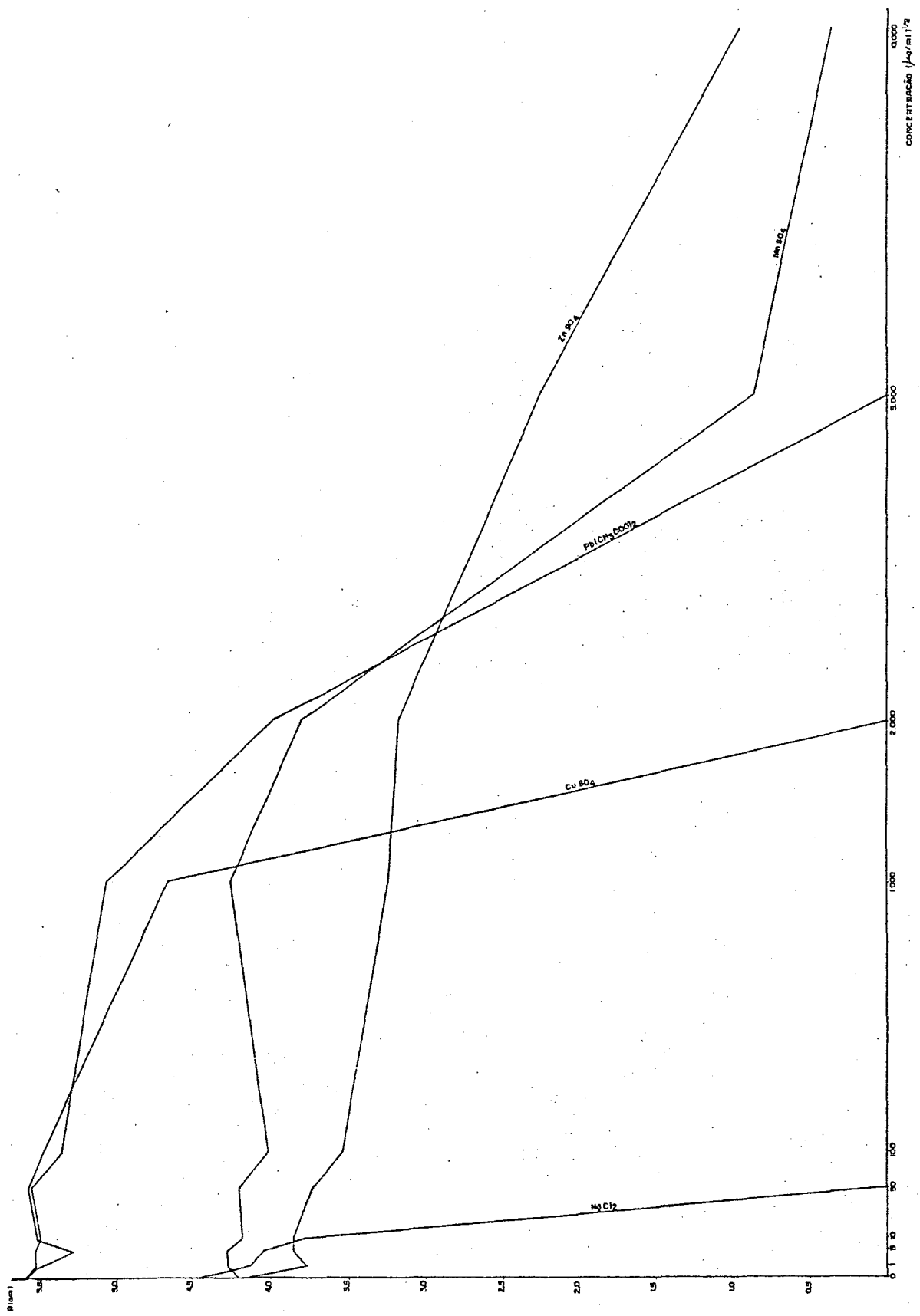


Fig. 20 - Representação gráfica do comportamento de M. anisopiles, linhagem EG em presença de diferentes sais minerais.

#### 4.2. Influência dos defensivos no crescimento e esporulação do *M. anisopliae*.

##### 4.2.1. Malathion

A Tabela 10 ilustra os resultados obtidos nos experimentos realizados com o inseticida Malathion, com a finalidade de estudar seus efeitos sobre o fungo *M. anisopliae*.

Por esses dados, podemos observar que o Malathion exerce forte efeito inibitório sobre o fungo, não permitindo o crescimento além da concentração de 2000 µg/ml. Além disso exerce efeito esporicida, pois a quantidade de colônias (esporos germinados) na semeadura, nas diferentes concentrações cai pela metade em relação à testemunha.

O Malathion influencia também o desenvolvimento vegetativo das colônias, pois há diminuição do diâmetro das mesmas, em relação inversa com a concentração do inseticida (Figura 21).

Nota-se ainda um efeito esporostático do inseticida, pois até 100 µg/ml houve esporulação no 3º dia, enquanto que para as concentrações de 1000 e 2000 µg/ml a esporulação foi iniciada apenas no 5º dia após a inoculação.

Quanto ao aspecto morfológico, até a concentração de 100 µg/ml as colônias se apresentaram semelhantes à testemunha, em forma, esporulação e cor. Nas concentrações de 1000 e 2000 µg/ml as colônias se apresentaram morfológicamente bem diferentes, com centro bem elevado, esporulação verde não radial, e coberta por micélio branco (Figura 22).

Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados por ALVES (1978) que observou que *M. anisopliae* foi inibido pelo Malathion nas dosagens de 10, 100 e 1000 ppm.

Também CARNEIRO (1981) verificou que Malathion inibia o crescimento do fungo em relação inversa à concentração usada.

Tabela 10 - *M. anisopliae* - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias, e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com concentrações crescentes do inseticida Malathion 50 CE. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,84	4,46	95	95	95
1	2,36	4,22	57	57	57
5	2,18	4,12	58	58	58
10	1,92	4,06	59	59	59
50	1,66	3,30	59	59	59
100	1,28	2,86	59	59	59
1000	0,60	1,12	56	56	56
2000	0,36	0,82	56	56	56
5000	0	0	0	0	0
10000	0	0	0	0	0



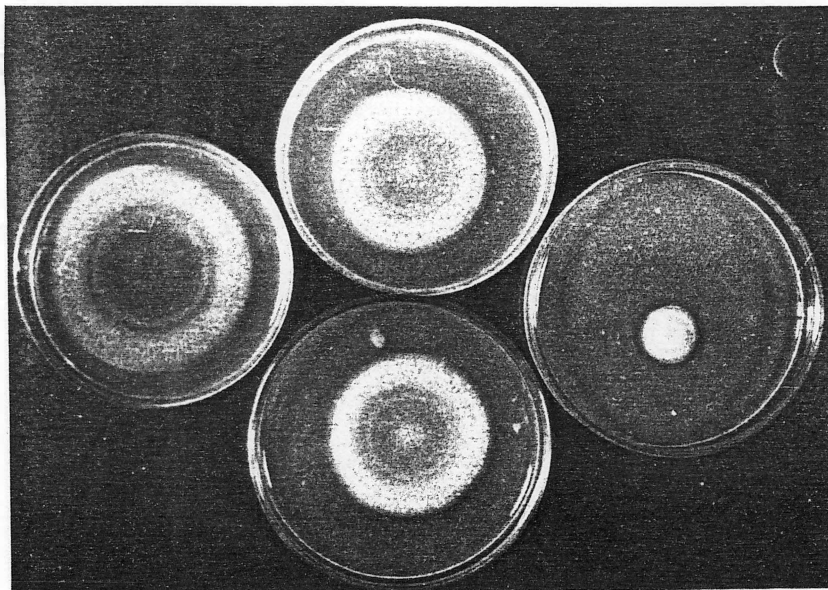


Figura 21. Aspectos morfológicos das colônias de *M. anisopliae* (inoculação central) em presença de Malathion ( $\mu\text{g/ml}$ ).

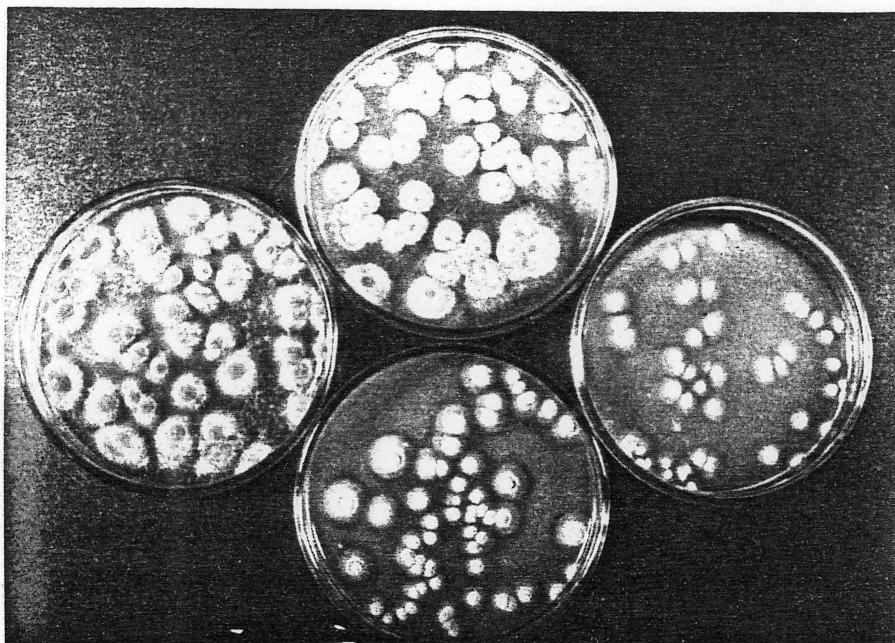


Figura 22. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (semeadura) em presença de Malathion ( $\mu\text{g/ml}$ )

Por outro lado, MATTA e OLIVEIRA (1978), verificaram que não houve ação letal do Malathion sobre o fungo e nem perda da patogenicidade ou viabilidade com o uso do produto.

#### 4.2.2. Dimetoato

A Tabela 11 sumariza os resultados obtidos com a inoculação do *M. anisopliae* em meio de cultura com dosagens crescentes de Dimetoato (0 - 10000 µg/ml).

Pelos dados da Tabela, observamos que o inseticida provocou inibição quanto ao número de esporos germinados (número de colônias nas placas semeadas), a partir da concentração de 1 µg/ml, com relação à testemunha, e esta inibição foi aumentando com a concentração. A partir de 5000 µg/ml houve completa inibição do fungo, tanto na semeadura, como na inoculação no centro das placas.

Quanto ao crescimento das colônias, em diâmetro, observamos que começou a haver inibição na dosagem de 50 µg/ml; a partir daí o diâmetro foi inversamente proporcional à concentração (Figura 23).

A esporulação foi iniciada no 5º dia após inoculação para todas as concentrações nos dois tipos de inoculação.

Quanto à morfologia, as colônias apresentaram-se semelhantes à testemunha, até a concentração de 100 µg/ml, no tipo e cor dos esporos, cor do micélio e forma da colônia. Na dosagem de 1000 e 2000 µg/ml, o aspecto das colônias mudou, e estas se apresentaram com centro mais elevado, com esporulação, sendo esta de um verde mais claro que a testemunha. A área micelial ao redor do centro esporulado (branco), apresentou-se bem maior nestas duas últimas concentrações (Figura 24).

ALVES (1978) trabalhando com *M. anisopliae* concluiu que o Dimetoate não afetou seriamente o desenvolvimento

Tabela 11 - *M. anisopliae* - Diâmetro das colônias (cm) após 5 e 10 dias e números de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em meio de cultura com doses crescentes do inseticida Dimethoate. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,32	5,40	94	94	94
1	2,25	5,32	81	81	81
5	2,45	5,50	80	80	80
10	2,40	5,50	79	79	79
50	2,12	5,17	76	76	76
100	1,95	4,72	74	74	74
1000	1,65	3,65	74	74	74
2000	1,20	2,82	75	75	75
5000	0	0	0	0	0
10000	0	0	0	0	0

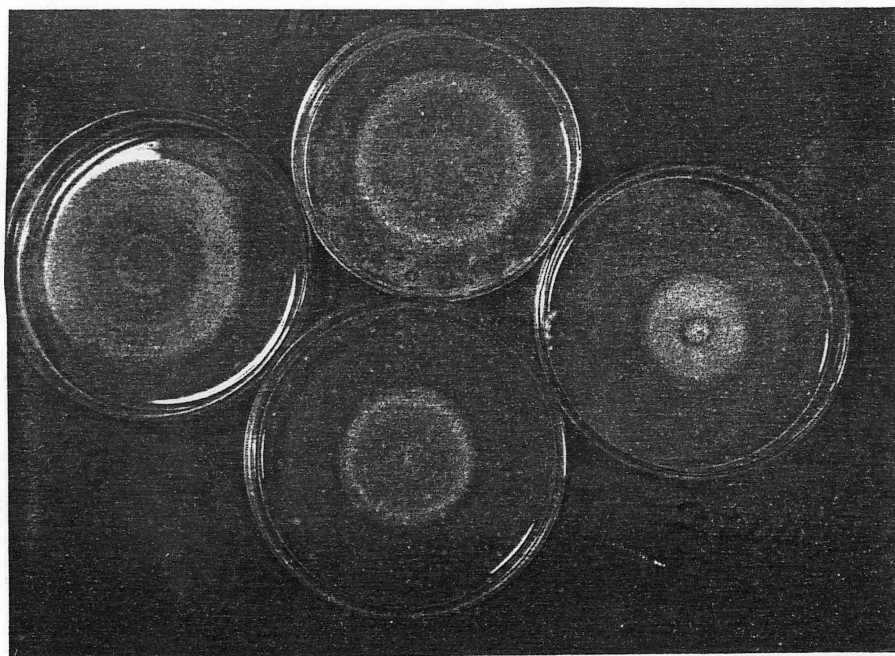


Figura 23. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (inoculação central) em presença de Dimetoato ( $\mu\text{g/ml}$ )

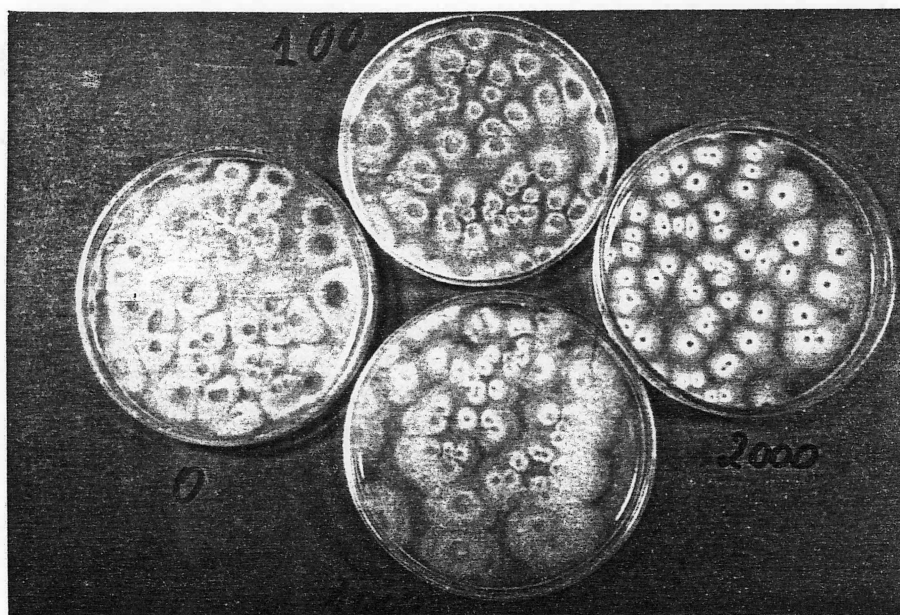


Figura 24. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (semeadura) em presença de Dimetoato ( $\mu\text{g/ml}$ )

do fungo, nas doses de 10, 100 e 1000 ppm.

LOCH (1978) estudou o efeito do Dimetoato sobre o fungo *Nomurea rileyi* e concluiu que o defensivo não inibe nem o desenvolvimento micelial nem a esporulação do referido fungo, nas concentrações usadas de 10, 100 e 1000 ppm.

CARNEIRO (1981), estudou o efeito do Dimetoato sobre os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, utilizando as dosagens mínima, média e máxima recomendada pelos fabricantes. Concluiu que o inseticida afetou medianamente o desenvolvimento dos fungos, nas dosagens média e máxima para *Beauveria* e na dosagem máxima para o *Metarhizium*. Afetou também a esporulação de *Beauveria* quando utilizado na dosagem máxima. Já para o *M. anisopliae*, o Dimetoato foi o que menos afetou a esporulação nas três concentrações usadas.

Os resultados encontrados pela autora, coincidem com dados deste trabalho.

#### 4.2.3. Decamethrina

Na Tabela número 12, encontramos os resultados referentes aos experimentos conduzidos com o inseticida Decamethrina em várias concentrações.

As dosagens utilizadas deste inseticida embora seguindo a mesma proporção dos outros produtos, foram bem mais baixas, para que pudessem ser encaixadas nas dosagens recomendadas pelo fabricante.

Pode-se observar redução do número de colônias/placa (número de esporos germinados) com relação à testemunha, já na dosagem de 0,01 µg/ml, e esta redução foi se acentuando conforme foi crescendo a concentração. Este produto foi bastante tóxico ao fungo, inibindo-o completamente na concentração de 40 µg/ml.

O diâmetro médio das colônias, manteve-se mais

Tabela 12 - *M. anisopliae* - Diâmetro (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em doses crescentes do inseticida Decamethrina. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,32	5,40	94	94	94
0,01	2,27	5,25	82	82	84
0,02	2,30	5,25	84	84	84
0,05	2,40	5,35	84	84	84
0,10	2,40	5,37	81	81	81
0,20	2,22	5,20	82	82	82
0,50	2,30	5,27	76	76	76
1,00	2,30	5,30	72	72	72
2,00	2,22	5,05	75	75	75
5,00	1,90	4,47	70	70	70
10,00	1,52	3,54	71	71	71
20,00	1,05	2,80	75	75	75
30,00	1,17	2,50	71	71	71
40,00	0	0	0	0	0

ou menos constante e semelhante à testemunha, até a concentração de 2,0 µg/ml, quando então o efeito inibidor do inseticida se fez sentir e os diâmetros diminuíram em relação inversa com a concentração (Figura 25).

O início da esporulação se deu no 5º dia após inoculação, em todas as concentrações. Até a concentração de 5 µg/ml, a esporulação foi radial. Daí em diante, apareceram esporos só no centro das colônias e a esporulação foi mais clara e mais fraca nas concentrações mais altas.

Quanto à morfologia, as colônias se mostraram semelhantes à testemunhas, até a concentração de 2 µg/ml. A partir daí, as colônias começaram a apresentar uma pequena elevação central com halo de esporos os quais germinaram, dando aspecto filamentoso ao centro da colônia (Figura 26).

Os inseticidas piretróides como a Decamethrina, de modo geral, são muito usados em controle químico e integrado, devido às vantagens que apresentam, como: baixa toxicidade aos mamíferos, controle de uma larga faixa de insetos, poder residual alto e baixa volatilidade, além de serem biodegradáveis (ELLIOT et alii, 1978). No entanto, o uso da Decamethrina em controle integrado com *M. anisopliae* deve ser evitado, uma vez que o fungo foi muito suscetível ao inseticida.

No entanto, este produto poderia ser usado para obtenção de mutantes resistentes, que poderiam ser empregados como marcos genéticos para cruzamentos, bem como para estudos básicos de genética. Além disso, esses mutantes poderiam ser usados em controle integrado, se eles realmente se mostrarem resistentes ao inseticida, sem perda da virulência.

#### 4.2.4. Fenvalerate

Na Tabela 13 encontram-se os dados referentes ao efeito do inseticida Fenvalerate sobre o *M. anisopliae*.

Notamos que o inseticida foi bastante tóxico ao

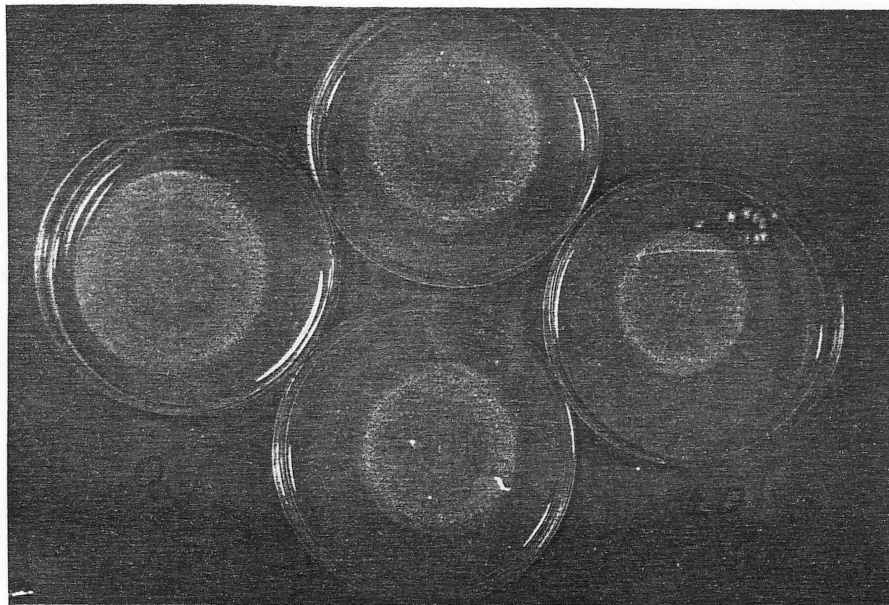


Figura 25. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (inoculação central) em presença de Decamethrina ( $\mu\text{g/ml}$ ).

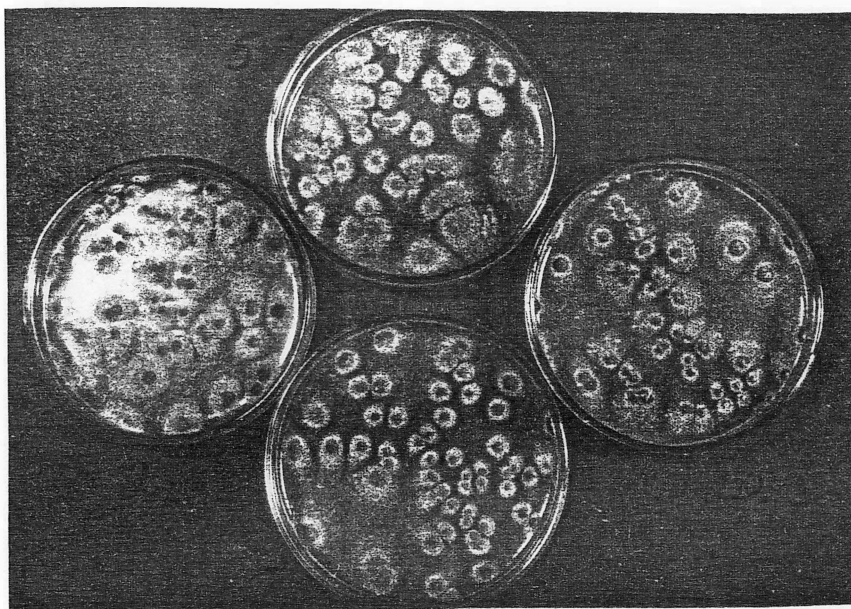


Figura 26. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (semeadura) em presença de Decamethrina ( $\mu\text{g/ml}$ ).



Tabela 13 - *M. anisopliae* - Diâmetro (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em doses crescentes do inseticida Fenvalerate. Média de 4 repetições.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,32	5,40	94	94	94
1	2,40	5,37	87	87	87
5	2,35	5,37	82	82	82
10	1,50	4,70	81	81	81
50	1,07	2,80	76	76	76
100	0,55	2,07	75	75	75
1000	0	0,35	0	70	70
2000	0	0	0	0	0
5000	0	0	0	0	0
10000	0	0	0	0	0

fungo, inibindo a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação do fungo.

O número de colônias/placa (esporos germinados), foi menor que na testemunha e decresceu na razão inversa da concentração.

Com 2000  $\mu\text{g/ml}$  houve inibição total, e com 1000  $\mu\text{g/ml}$ , o fungo teve sua germinação retardada, só iniciando crescimento no 6º dia após inoculação.

O inseticida inibiu também a esporulação do fungo. Aos 3 dias após a inoculação só havia esporulação nas primeiras concentrações (até 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Ao fim do 12º dia (colônias semeadas) e 10º dia (inoculação central), só apareceu esporulação até a concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

O diâmetro das colônias sofreu redução de modo inverso ao aumento da concentração do inseticida, a partir de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Na concentração de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , só foi possível medir o diâmetro das colônias no 10º dia após a inoculação, pois houve um atraso na germinação (Figura 27).

Até 10  $\mu\text{g/ml}$  a morfologia das colônias não foi afetada, com relação à testemunha. A partir de 50  $\mu\text{g/ml}$ , as colônias diminuíram de tamanho, tornaram-se bem arredondadas, com centro mais elevado, branco, circundado por halo de esporos, e seguido por halo micelial fazendo o contorno da colônia. Na concentração de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 12 dias após a inoculação, as colônias se apresentavam brancas, sem esporulação, com diâmetro bem reduzido (Figura 28).

Embora o Fenvalerate reúna todas as vantagens dos inseticidas piretróides, ele não deve ser usado em controle integrado com *M. anisopliae*, pelo menos até que se possa obter mutantes resistentes ao produto. Estes mutantes poderão ser utilizados tanto como marcos genéticos, como em estudos genéticos básicos.

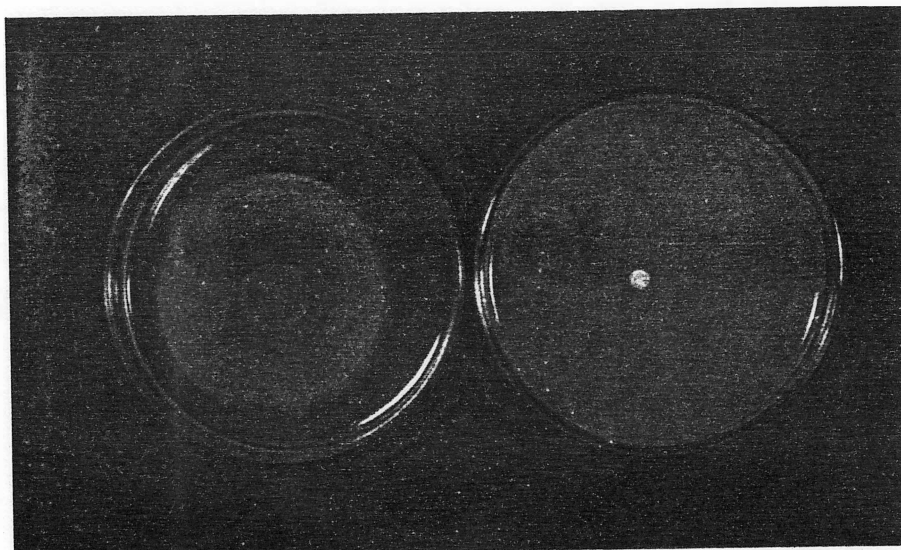


Figura 27. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (inoculação central), em presença de Fenvalerate ( $\mu\text{g/ml}$ )

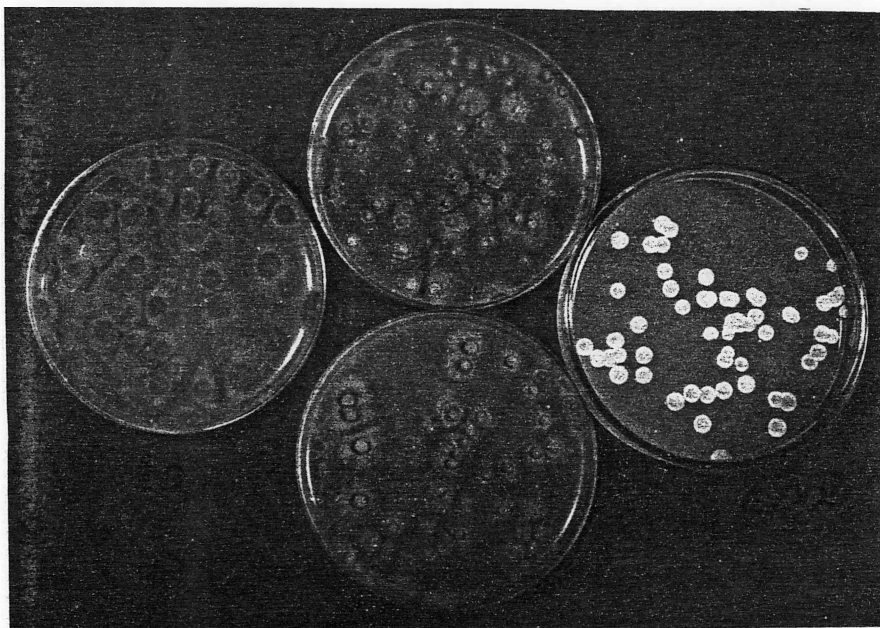


Figura 28. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (semeadura), em presença de Fenvalerate ( $\mu\text{g/ml}$ )

#### 4.2.5. Bihedonal (2,4-D + MCPA)

Na Tabela número 14 encontram-se os resultados obtidos experimentalmente sobre o efeito do herbicida Bihedonal no fungo *M. anisopliae*.

Notamos que há um efeito levemente inibitório sobre o número de colônias (semeadura) até 100 µg/ml, com relação à testemunha. Esta redução é acentuada a partir de 1000 µg/ml, sendo inversamente proporcional ao aumento da concentração.

Na dosagem de 5000 µg/ml, houve um efeito esporostático, pois os esporos só germinaram no 6º dia após a inoculação.

Houve inibição total para a concentração de 10000 µg/ml.

A esporulação foi semelhante à testemunha até 100 µg/ml (esporulação radial). Na concentração de 5000 µg/ml houve inibição total da esporulação.

O fungo apresentou diferenças morfológicas com relação à testemunha, nas concentrações acima de 100 µg/ml. Neste caso, a colônia apresentou-se com centro elevado, cotonoso, um halo de esporos ao redor do centro, seguido por outro halo micelial branco (Figura 29).

Também o diâmetro das colônias foi menor que o da testemunha a partir de 100 µg/ml, e esta redução foi inversamente proporcional à concentração (Figura 30).

Estes dados parecem concordar com CAMARGO(1980) que testou a toxicidade de alguns herbicidas com relação ao *M. anisopliae*. Os herbicidas testados foram: Tordon (2,4-D + Picloran), Herbamina (2,4D) e Banvel (Dicamba + 2,4 - D), e o

Tabela 14 - *M. anisopliae* - Diâmetro (cm) após 5 e 10 dias e número de colônias/placa após 3, 6 e 12 dias de incubação a 28°C, em doses crescentes do herbicida Bihedonal.

Concentração µg/ml	Inoculação Central		Semeadura		
	5	10	3	6	12
0	2,32	5,40	93	93	93
1	2,37	5,42	86	86	86
5	2,19	5,30	88	88	88
10	2,27	5,30	83	83	83
50	2,15	4,96	82	82	82
100	2,05	4,75	80	80	80
1000	1,02	2,22	74	74	74
2000	0,36	1,37	73	73	73
5000	0,20	0,70	0	52	52
10000	0	0	0	0	0

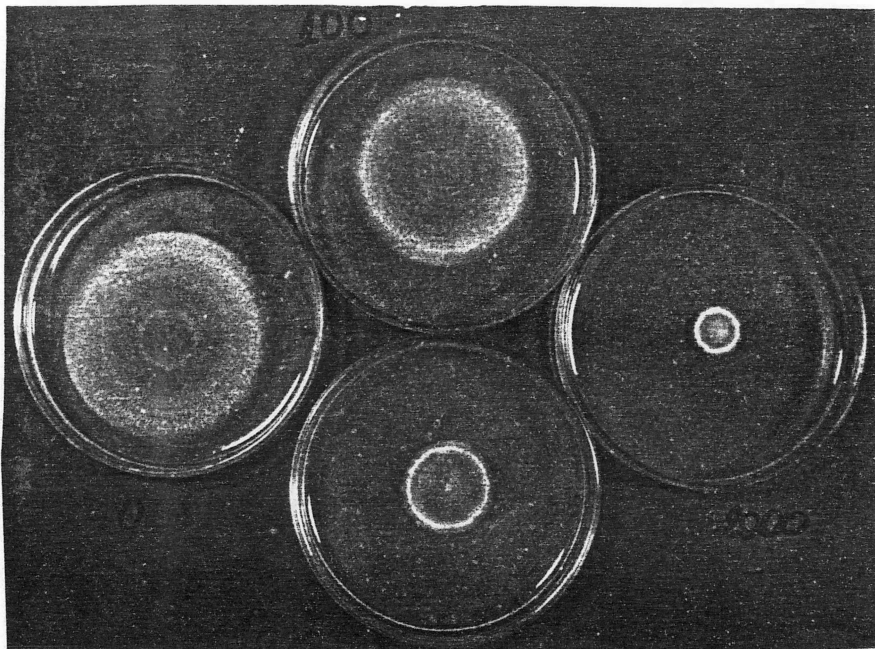


Figura 29. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (inoculação central), em presença de Bihedonal ( $\mu\text{g/ml}$ )

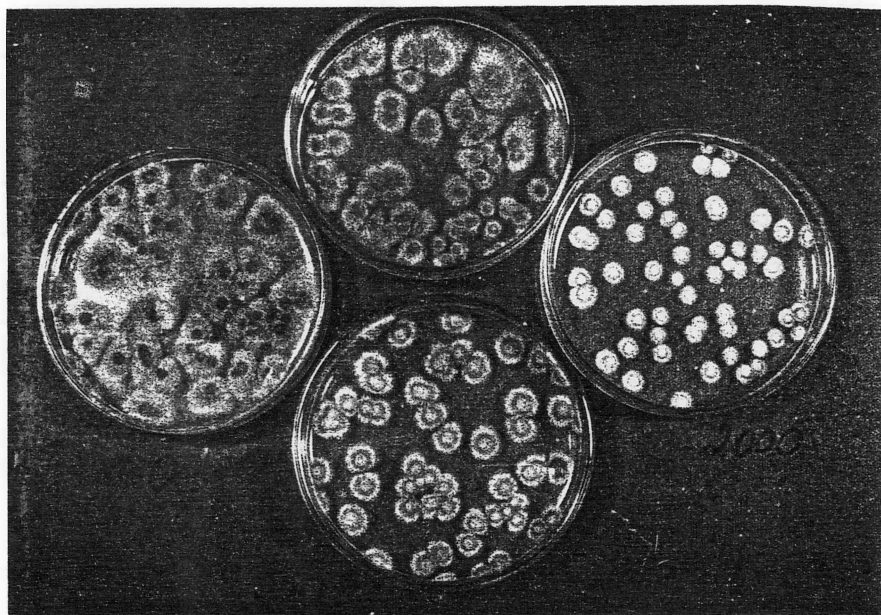


Figura 30. Aspecto morfológico das colônias de *M. anisopliae* (semeadura), em presença de Bihedonal ( $\mu\text{g/ml}$ ).

autor concluiu que todos foram tóxicos ao fungo, inibindo crescimento e esporulação.

CARNEIRO (1980) também testou entre outros defensivos, o herbicida DMA-6 (2,4-D), sobre *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Observou que o DMA-6 inibiu completamente o crescimento das colônias e mostrou além disso ação fungicida sobre os dois fungos estudados, pois quando os fungos foram repicados do meio contendo DMA-6 para outro meio sem herbicida, eles não apresentaram crescimento.

A Figura 31 ilustra o comportamento do fungo em presença de concentrações crescentes dos defensivos utilizados.

De modo geral, os resultados obtidos, fornecem dados que ajudam a esclarecer o comportamento do fungo em presença de sais de metais e defensivos, o que é importante no uso de controle integrado.

Esses resultados são importantes também para ensaios de campo, onde se faz controle químico e aplicação do fungo, separadamente, em parcelas, de modo que não haja interferência de uma parcela para outra. Neste caso, sabendo-se que o fungo é suscetível a um certo defensivo, basta aplicar este produto numa parcela para se ter certeza de que não haverá interferência nos resultados.

Em alguns casos, apareceram variantes que poderão ser usados em estudos básicos de genética, e também como marcos genéticos, desde que sejam realmente mutantes resistentes e virulentos.

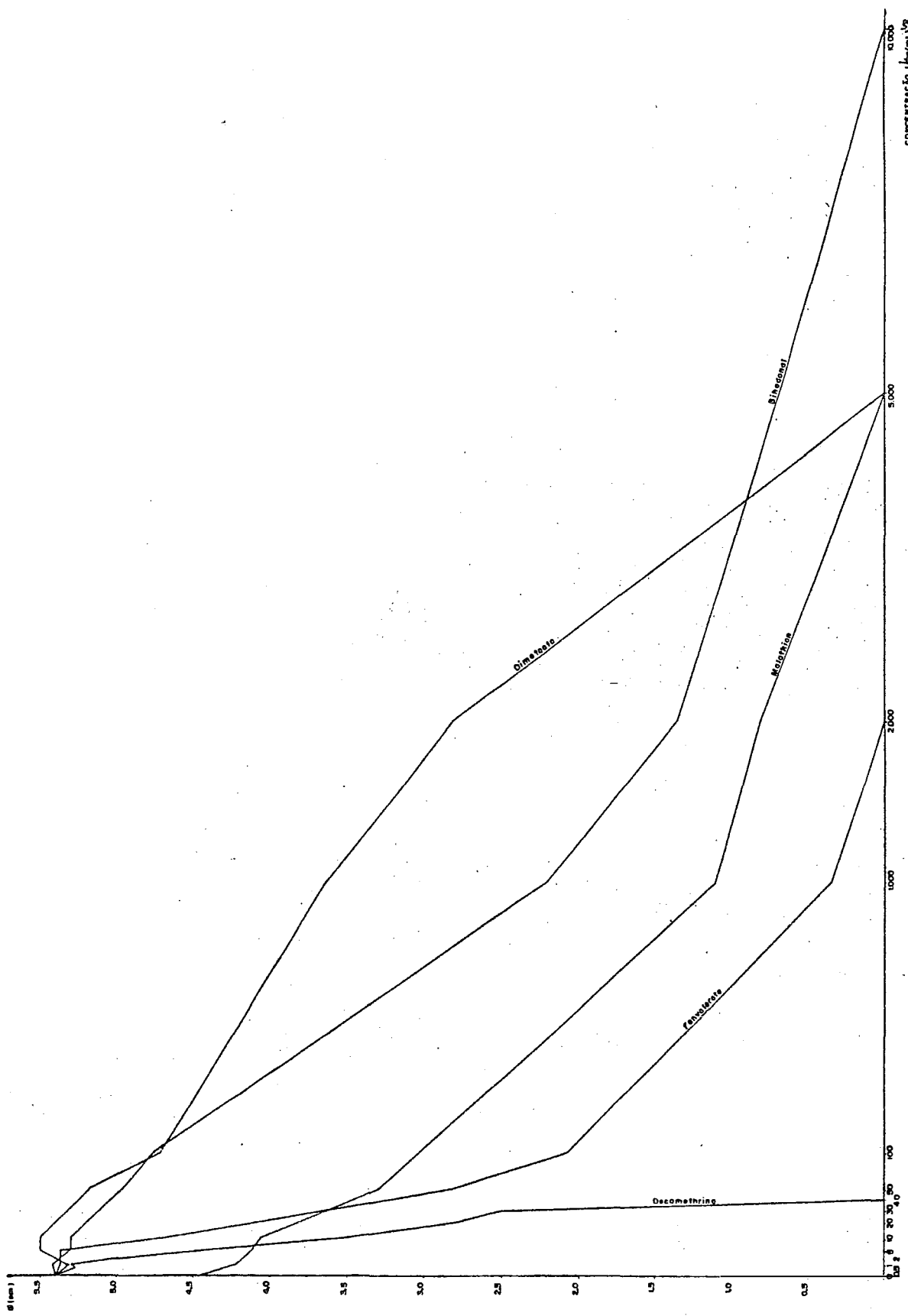


Fig. 31 - Representação gráfica do comportamento de M. anisopliae, linhagem ES em presença de defensivos químicos.

OBS.: As concentrações compreendidas entre 0,01 e 0,20 µg/ml de Decomethring e os diâmetros correspondentes foram desordenados em virtude de serem valores muito próximos, o que não altera o gráfico.

concentração, µg/ml

Tempo (h)



## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos tirar as seguintes conclusões:

- 1) De todos os sais minerais utilizados, o  $\text{HgCl}_2$  foi o que mais inibiu o fungo, seguido pelo  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . Os menos tóxicos foram  $\text{ZnSO}_4$  e  $\text{MnSO}_4$ . Isso indica que o uso de defensivos químicos à base de mercúrio deve ser evitado em controle integrado.
- 2) A associação de vários sais com relação à inibição e morfologia, especialmente no caso do acetato de chumbo, pode servir como fator auxiliar no isolamento e caracterização de *Metarhizium anisopliae*.
- 3) A obtenção de mutantes mais resistentes que a linhagem original, em dois casos (sulfato de zinco e sulfato de manganês), indica que marcadores genéticos podem ser obtidos para estudos básicos com o fungo, bem como os mutantes assim conseguidos poderão ter utilidade em controle integrado.
- 4) Alguns agentes inibidores empregados no presente trabalho, provocaram redução no diâmetro das colônias, o que é de grande valor em estudos genéticos. Estes agentes poderão substituir outros utilizados com a mesma finalidade.

5) Dentre os defensivos utilizados, Decamethrina e Fenvalerate, ambos piretróides, foram os mais tóxicos ao *M. anisopliae*, inibindo o crescimento nas dosagens de 40 µg/ml e 1000 µg/ml, respectivamente. Os outros defensivos usados afetaram o fungo em menor escala, seguindo-se pela ordem Malathion, Dime-thoate e Bihedonal. Concluiu-se pois, que a utilização dos piretróides acima, em controle integrado só será possível após a obtenção de mutantes resistentes, desde que estes mantenham sua virulência.

## 6. LITERATURA CITADA

AL-AIDROOS, K. e D.W. ROBERTS, 1978. Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence towards mosquito larvae. C. J. Genetic and Cytol., 22: 211-219.

AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *M. anisopliae*. C. J. Genetic and Cytol., 22: 309-314.

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

ALVES, S.B.; R.L.O. REGITANO e J.L.G. CAMARGO, 1980. Avaliação da influência de alguns herbicidas utilizados em cana-de-açúcar e pastagens sobre o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, 1883. Ecós. Espírito Santo do Pí-nhal, 5: 22-24.

- ALVES, S.B.; S.M. CARVALHO e A.O.R. CARVALHO, 1980. Avaliação da toxicidade de alguns inseticidas sobre o *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Rev. de Agricult. Piracicaba, 55(3): 133-138.
- AZEVEDO, J.L., 1979. O controle biológico de insetos por microrganismos. An. Simp. Ciênc. Bás. Apl. Publicação ACIESP nº 19: 171-175.
- AZEVEDO, J.L. e C.L. MESSIAS, 1983 (no prelo). Genética de fungos utilizados no controle biológico de insetos. In: "Genética de Microrganismos". (J.L. AZEVEDO, organizador).
- BAJAN, C.; K. KMITOWA e M. MOJCIECHOWSKA, 1977. The effect of enolofos 50 and its active substance chlorfenvinphos on growth and pathogenicity of entomopathogenic fungi. Pol. Ecol. Studies. Lomianki, 3(2): 65-77.
- BENZ, G., 1971. Microbial Control of Insects and Mites. London, New York, Academic Press. 861p.
- BURGES, H.D. e N.W. HUSSEY, 1971. Microbial Control of Insects and Mites. London, New York. In: BURGES, H.D. e N.W. HUSSEY. Academic Press. 861p.
- CADATAL, T.D. e B.P. GABRIEL, 1970. Effect of chemical pesticides on the development of fungi pathogenic to some rice insects. Phill. Entomol. Los Baños, 1(5): 379-395.
- CAMARGO, L.M.P.C.A. e D. GABRIEL, 1980. Efeito de alguns herbicidas sobre o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883. In: VI Cong. Brasil. Entom. Campinas, p.348-349. [Resumos].

- CARNEIRO, J.S., 1981. Toxicidade de defensivos agrícolas sobre os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Piracicaba, ESALQ/USP, 78p. [Dissertação de Mestrado].
- CARNEIRO, J.S.; L.A.T. SILVA e S.B. ALVES, 1980. Efeito de alguns defensivos "in vitro" sobre *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. In: VI Cong. Brasil. de Entom. Campinas, p.350-351. [Resumos].
- CASTRO, M.A.; C.F.S. ANDRADE; A.L. WALKER e M.E.M. HABIB, 1980. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill com quatro defensivos químicos. In: Cong. Brasil. Entom. Campinas, p.361. [Resumos].
- DE CONTI, E.; C.L. MESSIAS; H.L.M. SOUZA e J.L. AZEVEDO, 1980. Eletrophoretic variation in estearases and phosphatase, in eleven wild-type strains of *M. anisopliae*. Exper., 36: 293- -294.
- ELLIOT, M.; N.F. JANES e C. POTTER, 1978. The future of pyrethroids in insect control. Ann. Rev. Entom., 23: 443-469.
- EVLAKHOVA, A.A., 1964. The effects of DDT and BHC on the growth and virulence of entomopathogenic fungi. Trudy Vesayuznogo Instituta Zashchity Rastenii. Leningrad (1): 95-100. Appl. Rev. App. Entom., Series A: Agricultural. London, 55: 477, 1967.
- FARGUES, J., 1973. Sensibilité des larves de *Leptinotarsa decemlineata* Say (Col., Chrysomelidae) a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Fungi Imperfect, Moniliales) en présence de doses réduites d'inseticide. Ann. Zool.  col. Anim., 5(2): 231-246.

- FARGUES, J., 1975. Étude expérimentale dans la nature de l'utilisation combinée de *Beauveria bassiana* et d'insecticides a dose réduit contre *Leptinotarsa decemlineata*. Ann. Zool. Écol. Anim., 7(2): 247-264.
- FARGUES, J.; T. DURIEZ; J. ANDRIEU; R. POPEYE e P. ROBERT, 1975. Étude immunologique comparée de souches de *M. anisopliae* sien champignon hiphomicète entomopathogène. Comptes Rendus, Hebdomadaires des Scéances de l'Academie des Scientes, Ser. D., 281: 1781-1784.
- FERRON, P., 1971. Modification of the development of *Beauveria tenella* mycosis in *Melolontha melolontha* larvae, by means of reduced doses of organophosphorous insecticides. Ent. exp. e appl., 14: 457-466.
- FERRON, P., 1978. Biological control of insect pests by entomopathogenous fungi. Ann. Rev. Entomol., 23: 409-442.
- FISCHER, F.E. e J.T. GRIFFTHS, 1950. The fungicidal effect of sulphur entomogenous fungi attacking purple scale. J. Econ. Ent., 43(5): 712-718.
- GALLO, D.; O. NAKANO; F.M. WINDL; S. SILVEIRA NETO e R.P.L. CARVALHO, 1970. Manual de Entomologia. Editora Agronômica Ceres, São Paulo. 858p.
- GARNAGA, N.G., 1975. Integrated control of cabbage pests. Zashchita Rastenii, Moscow (7): 24. Apud: Rev. Appl. Ent., Series A: Agricultural. London, 64(12): 2029.
- GORAL, V.M. e N.V. LAPPA, 1977. The effect of Boverin, and certain insecticides on the population numbers of the Colorado beetle. Ann. Rev. Entom. Palo Alto, 65(4): 617.

- GRUNER, L., 1973. Sensibilisation des larves de *Phyllophaga plecti* Bl. et de *P. patrueloïdes* PA. (Coleoptera: Scarabaeidae) a la mycose a *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin au moyen d'une faible dose d'insecticide ou d'un autre agent infectieux. Ann. Zool. - Écol. Anim., 5(3): 335-349.
- HADDAD, C.R.B. e C.L. MESSIAS, 1979. Influência de espalhantes adesivos e de inseticida na germinação e desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae*. Bol. Cont. Biol. Cig. por Fungos, 1: 6.
- HALL, H.M. e P.H. DUNN, 1959. The effect of certain insecticides and fungicides on fungi pathogenic to the spotted alfalfa aphid. J. Ec. Entom. College Park, 52: 28-29.
- HALL, R.A., 1981. Laboratory studies on the effects of fungicides, acaricides and insecticides on the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii*. Ent. exp. applic., 29: 39-48. -
- IGNOFFO, C.M.; D.L. HOSTETTER; C. GARCIA e R.E. PINNELL, 1975. Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. Env. Entom. College Park, 4(5): 765-768.
- JOHNSON, D.W.; L.P. KISH e G.E. ALLEN, 1976. Field evaluation of selected pesticides on the natural development of the entomopathogen, *Nomuraea rileyi*, one of the velvetbean caterpillar in soybean. Env. Entom. College Park, 5(5): 964-966.
- KARADZHOV, S., 1974. Efficiency of the biopreparation Boverin (*Beauveria bassiana*) (Bals.) Vuill in the control of apple codling moth (*Carpocapsa pomonella* L.) Gradinarska i Lozarska Nauka, 11(5): 62-68. Apud: Rev. Appl. Entom., Series A: Agricultural. London, 64(6): 1021. 1976.

- KELLER, S., 1978. Investigations on the influence of Dimilin (diflubenzuron) on the growth and germination of the conidia of some fungi pathogenic to insects. Anzeiger fur Schadlingskunde, Pflanzenschutz Umweltschutz. Berlin, 51(6): 81-83.
- LOCH, L.C., 1978. Exigências nutricionais e ambientais do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e seu comportamento na presença de defensivos agrícolas. Piracicaba, ESALQ/USP, 65p. [Tese de Doutorado].
- MARICONI, F.A.M., 1971. Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. 3ª ed. São Paulo, Editora "A Gazeta Maçônica", 305p.
- MATTA, E.A.F. e M.Z.A. OLIVEIRA, 1978. Efeito do inseticida Malatol 50E no crescimento do fungo *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin, "in vitro". Com. Téc. EPABA-Salvador, nº 11, 8p.
- MAKINTOSH, M.E. e PRITCHARD, R.H., 1963. The production and replica plating of micro-colonies of *Aspergillus nidulans*. Gen. Res. Cambridge, 4: 320-322.
- MESSIAS, C.L., 1979. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP. [Tese de Doutorado].
- MESSIAS, C.L. e J.L. AZEVEDO, 1981. Parassexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Trans. Br. Mycol. Soc., 75(3): 473-477.
- MESSIAS, C.L.; J.L. AZEVEDO; E. DE CONTI e H.M.L. SOUZA, 1978. Aspectos biológicos e indução de mutantes em *M. anisopliae*. Resumos do III Cong. Latinoam. Entom. e V Cong. Brasil. Entom., Bahia, p.69.



- Minas Gerais. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 1979. Inf. Agrop., ano 5, nº 57.
- Minas Gerais. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 1979. Inf. Agrop., ano 5, nº 79.
- OLMERTH, I. e R.G. KENNETH, 1974. Sensitivity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii* and *Verticillium* sp., to fungicides and insecticides. Env. Entom. College Park, 3(1): 33-38.
- PRAMER, D., 1965. Symposium on Microbial Insecticides. III. Fungal Parasits on Insects and Nematodes. Bacter. Rev., 29(3): 382-387.
- PASCOAL, A.D., 1979. Base ecológica para o manejo de praga nos trópicos. An. do Simp. Ciênc. Bás. e Apl. Publicação ACIESP, 19: 178-80.
- PONTECORVO, G. e J.A. ROPER, 1952. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploid in *Aspergillus nidulans*. Adv. in Genetics, 5: 141-238.
- RAMARAJE, N.V.U.; H.C. GOVINDU e K.S.S. SHASTRY, 1967. The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. J. Inv. Path. New York, 9: 398-403.
- ROPER, J.A., 1952. Productions of heterozigous diploids in filamentous fungi. Exper., 8: 14-15.
- ROSATO, Y.B.; C.L. MESSIAS e J.L. AZEVEDO, 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *M. anisopliae*. J. Inv. Path., 38: 1-3.

- ROBERTS, D.W. e A.S. CAMPBELL, 1977. Stability of Entomopathogenic fungi. Miscell. Public. of the Entom. Soc. of America. College Park, 10(3): 19-76.
- ROBERTS, D.W. e W.G. YENDOL, 1971. Microbial Control of Insects and Mites. London, N.Y. In: BURGESS, H.D. e N.W. HUSSEY. Academic Press, 861p.
- SANTOS, A.L.L., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 148p. [Dissertação de Mestrado].
- SANTOS, A.L.L. e J.L. AZEVEDO, 1982. Resistência do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em relação a três fungicidas. Rev. Microbiol. São Paulo, 13: 272-278.
- SCHIMITT, A.A., 1978. Controle Biológico das Pragas em Soja. In: V Cong. Brasil. Entom. Ilhéus, Itabuna. [Resumos].
- SIKURA, I.A. e G.N. ZHIGAEV, 1972. The effectiveness of Boverin against the codling moth. Zasc. Rast. Moscow, 17(2): 21-22.
- SOPER, R.S.; F.R. HOLBOOK e C.C. GORDON, 1974. Comparative pesticide effects on *Entomophthora* and phytopathogen *Alternaria solani*. Env. Entomol. College Park, 3: 560-562.
- SMITH, R.F. e H.T. REYNOLDS, 1966. Principles, definitions and scope of integrated pest control. From the Proc. FAO Symp. Integ. Pest Control, 1: 11-17.

- TEDDERS, W.L., 1981. In vitro inhibition of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* by six fungicides used in pecan culture. Env. Entomol., 10: 346-349.
- TINLINE, R.D. e C. NOVIELLO, 1970. Heterocaryosis in the entomogenous fungus, *M. anisopliae*. Mycol., 63: 701-712.
- TINLINE, R.D., 1971. Nuclear distribution in *M. anisopliae*. Mycol., 63: 713-721.
- TORIBIO, J.A., 1976. Consequences de traitements fongicides sur *Acrostalagmus aphidum*, fungi imperfecti pathogène pour les pucerons. Ann. Zool. Écol. anim., 8: 103-108.
- TULOCH, M., 1976. The genus *M. anisopliae*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 66: 407-411.
- WILDING, N., 1972. The effect of systemic fungicides on the aphid pathogen, *Cephalosporium aphidicola*. Pl. Path., 21: 137-139.
- WOJCIECHOWSKA, M.; C. BAJAN e K. KMITOWA, 1977. The effects of carbamide herbicides, linuron and monolinuron on three species of entomopathogenic fungi. I. Laboratory studies. Pol. Ecol. Studies. Lomianki, 3(2): 29-42.
- ZAYATS, YU.; A.N. BRADEEVA e E.K. RZHAVINA, 1976. Biological control of the colorado beetle on egg-plant. Aash. Rast. Moscow, 9: 51. Appl. Rev. Annot. Entom., Series A: Agricultural. London, 65(7): 1061, 1977.
- ZIMMERMANN, G., 1976. Effect of systemic fungicides on aphid-infecting Entomophthoraceae (Zygomycetes) "in vitro". Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 83(5): 261-269. Rev. Appl. Entomol., Series A, 65(4): 599, 1977.