VARIABILIDADE E FUSÃO DE PROTOPLASTOS EM *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin

SILVIA MARIA FRIGO

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1983

A meu pai (in memoriam)
mãe e irmã

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

- Ao mestre e amigo Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, que pela orientação e estímulo possibilitou-me a realização deste trabalho;

- Ao Prof. Dr. Ernesto Paterniani, na pessoa do Diretor do Instituto de Genética da ESALQ/USP, pelas facilidades concedidas;

- A prezada amiga Aline A.P. Kleiner, pelo apoio e colaboração constante;

- Ao amigo Isaias Olívio Geraldi, pela preciosa orientação na execução das análises estatísticas.

- Aos funcionários do Instituto de Genética pela colaboração e assistência prestada;

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido pelo Programa Integrado de Genética, CNPq/FINEP;

- A amiga M. Angélica Calazans pela ajuda na feitura do Summary.

ÍNDICE

	<u>página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Classificação e descrição	4
2.2. Desenvolvimento do fungo	7
2.3. Características das linhagens	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Linhagens utilizadas	16
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas ..	17
3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO <i>et alii</i> 1953) (MM)	17
3.2.2. Meio completo sólido (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953, modificado por AZE- VEDO e COSTA, 1973) (MC)	18
3.2.3. Meio mínimo líquido (PONTECORVO <i>et</i> <i>alii</i> , 1953)	18
3.2.4. Meio completo líquido (PONTECORVO <i>et alii</i> , 1953)	18
3.2.5. Meio mínimo mais 2% de meio comple- to e meio mínimo mais 4% de meio completo	19
3.2.6. Meio completo 2x concentrado	19
3.2.7. Meio mínimo 2x concentrado	19

3.2.8. Meio mínimo líquido para crescimento de micélio	19
3.2.9. Meio para crescimento de micélio	20
3.2.10. MMKCl para reversão e obtenção de produtos de fusão	20
3.2.11. MCKCl para obtenção de crescimento de células totais (protoplastos, micélio e conídios não digeridos)	20
3.2.12. Meio de arroz (modificado a partir do meio proposto por AQUINO, 1974) (MA)..	21
3.2.13. Solução de vitaminas	21
3.2.14. Solução de ácido nucléico de leveduras	22
3.2.15. Suplementos adicionados ao meio mínimo	22
3.2.16. Solução salina (0,85%)	24
3.2.17. Solução de "Tween" 80 - (1,0% - v/v)..	24
3.2.18. Solução de caseína hidrolisada	24
3.2.19. Tampão fosfato pH 5,8	25
3.2.20. Solução de KCl 1.4M pH 5,8	25
3.2.21. Solução de KCl 0.7M pH 5,8	26
3.2.22. Solução de Polietilenoglicol (PEG) 30%	26
3.2.23. Solução em enzimas para produção de protoplastos (HAMLIN <i>et alii</i> , 1981)	27
3.2.24. Filtros Buchner para filtração de micélio	27
3.3. Esterilização e incubação	27
3.4. Taxa de crescimento das colônias	28

	..vii.
3.5. Produção de conídios	28
3.5.1. Em meio completo	28
3.5.2. Em meio de arroz (MA)	29
3.6. Sobrevivência à luz ultravioleta	30
3.8. Produção de protoplastos	32
3.8.1. Contagem de protoplastos	34
3.8.2. Fusão de protoplastos	34
3.8.3. Verificação da presença de hifas, esfe roplastos e conídios na suspensão de protoplastos	35
3.9. Obtenção de heterocários e diplóides	35
3.9.1. Obtenção de heterocários por fusão de protoplastos	35
3.9.2. Obtenção de heterocário pela metodolo- gia convencional - Ciclo Parassexual (MESSIAS e AZEVEDO, 1980)	36
3.9.3. Obtenção de diplóides	37
3.10. Medida do tamanho dos conídios	37
3.11. Análise estatística dos dados	38
4. RESULTADOS	39
4.1. Taxa de crescimento das colônias	39
4.2. Produção de esporos	56
4.2.1. Em meio completo.....	56
4.2.2. Produção de esporos em meio de arroz..	72
4.2.2.1. Comparação da produção de es- poros em meio completo e em meio de arroz	74

4.3. Porcentagem de sobrevivência a luz ultravioleta	76
4.4. Obtenção de mutantes	78
4.5. Obtenção de heterocáries	80
4.5.1. Cruzamentos pelo ciclo parassexual..	80
4.5.2. Fusão de protoplastos	80
5. DISCUSSÃO	83
5.1. Taxa de crescimento e produção de esporos em meio completo	83
5.2. Produção de esporos em meio de arroz	87
5.3. Sobrevivência a luz ultra violeta	89
5.4. Obtenção de mutantes	90
5.5. Obtenção de heterocáries	92
5.5.1. Cruzamento pelo ciclo parassexual ..	92
5.5.2. Fusão de protoplastos	94
6. CONCLUSÕES	99
7. LITERATURA CITADA	101

VARIABILIDADE E FUSÃO DE PROTOPLASTOS EM
Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin

Autora: SILVIA MARIA FRIGO

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar a variabilidade natural existente em 11 linhagens de *Metarhizium anisopliae* de diferentes origens, com relação ao crescimento, produção de esporos em meio completo e em meio contendo diferentes concentrações de arroz, resistência à luz ultravioleta e fusão de protoplastos entre diferentes linhagens. Para o crescimento, mediu-se o diâmetro das colônias do 5º ao 10º dia de desenvolvimento e nessas colônias determinou-se a produção de esporos tanto em meio completo como em diferentes concentrações de arroz. A influência da luz ultravioleta foi estudada pela taxa de sobrevivência em diferentes tempos de irradiação. Os resultados obtidos indicaram a existência de uma alta variabilidade entre as linhagens quanto ao crescimento; no entanto, colônias que

crescem pouco no 5º dia, continuaram com menor crescimento, mesmo após o último dia de observação, o que permite uma seleção de isolados de maior crescimento logo nos primeiros dias. Houve também grande variabilidade quanto a produção de esporos sendo que, em geral, um pico de produção ocorreu entre o 7º e 8º dia de desenvolvimento. As linhagens mais produtoras em meio completo foram M, E₆, A₄ e E₉ e, em meio de arroz verificou-se que, maior produção ocorria quando na concentração de 60 g/l. Com relação a luz ultravioleta, as linhagens E_{9A}, E₆ e E₉ foram as mais resistentes e as linhagens A₄, M_j e M as menos resistentes. Um setor amarelo de E₉ designado E_{9A} foi inclusive mais resistente que a linhagem original. Este mutante é de importância para o melhoramento das linhagens em relação a esta característica. Mutantes auxotróficos e morfológicos foram obtidos de 4 das 5 linhagens ensaiadas e sua utilização permite testes envolvendo cruzamentos entre linhagens. Cruzamentos foram realizados por técnicas convencionais de parassexualidade e por fusão de protoplastos. Cruzamentos entre isolados da mesma linhagem, produziram heterocáries o mesmo não ocorrendo entre isolados de diferentes linhagens estudadas. A técnica do "doador morto" usada em um dos casos demonstrou ser possível o isolamento de diplóides entre duas diferentes linhagens.

VARIABILITY AND PROTOPLAST FUSION IN
Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin

Author: SILVIA MARIA FRIGO

Adviser: JOÃO LUCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

The present work was carried out aiming the study of the natural variability occurring in 11 isolate of *Metarhizium anisopliae* of different origins, in relation to the growth and production of conidia in complete medium and in rice medium; the natural resistance to ultra-violet light and protoplast fusion between strains were also studied. To evaluate growth, of each isolate it was measured the diameter of colonies from the 5th to the 10th day of development. It was also determined the production of conidia from each isolate both in complete medium and in different concentrations of rice. The influence of ultra-violet light was studied by survival curves using different times of irradiation. The results indicated the occurrence of a high variability among the isolates when they were compared in relation to the growth rates; colonies that present slow growth rate in the

5th day, continued to growth slowly, even after the last day of observation; this may permit a selection of faster growing isolates already with 5 days in the after inoculation. There was also a great variability for conidia production, a maximum occurring the 7th and 8th days of growth. The more productive isolate in complete medium were M, E₆, A₄ and E₉ and it was confirmed that in rice medium, occurred a greater production when concentrations reach 60 g/l. In relation to ultra-violet light, the isolated E_{9A}, E₆ and E₉ were more resistant while the isolated A₄, M_j and M were the less resistant. A yellow sector of E₉ designated E_{9A} was inclusive more resistant than the original isolate, which can be an important source for the improvement of isolates in relation to this characteristic. Auxotrophic and morphological mutants were obtained from four out of five isolates tested. Their use permit test of crosses among isolates crosses were performed using parasexual cycle and protoplast fusion. Crosses between isolates from the same strain produced heterokaryum but there was not formed between distinct studied strains. The "dead donor" technique was used in one cross and by this way was possible to isolate diploids between such strains.

1. INTRODUÇÃO

Pelo conhecimento atual, pode-se deduzir que antes da intervenção do homem na natureza, desmatando para abrir picadas e para plantar, o número de insetos dependia da sua capacidade de reprodução em relação às condições naturais. Posteriormente, quando o homem iniciou a derrubada intensiva das matas, tornou-se vítima de si mesmo porque, modificando o ambiente provocou o aumento do número de insetos que afetam a qualidade e quantidade de plantas úteis, ou que são vetores de doenças, em animais e no próprio homem.

O aumento da população no nosso planeta tornou certos problemas como o da carência de alimentos e poluição do ambiente muito mais graves. Nesses casos, insetos que se constituem pragas de plantas cultivadas não só competem com o homem na luta pelos alimentos, como também o combate a essas pragas através da utilização de inseticidas químicos, tem pro

vocado desequilíbrio ecológicos e poluição do ambiente pelos agrotóxicos. Embora os inseticidas químicos tenham proporcionado um enorme avanço para o combate dos insetos indesejáveis, a emergência de mutantes na população de insetos, que são resistentes aos mesmos, tornam muitas vezes, a sua utilização pouco eficiente, aliado ao fato de que outras dificuldades surgem pelo uso dos inseticidas. Entre essas podem ser citadas: aparecimento de novos tipos de pragas que antes de seu uso passavam despercebidas; eliminação de inimigos naturais do inseto indesejável, o que permite o ressurgimento deste em anos subsequentes em condições muito mais extremas; danos aos animais e ao próprio homem devido as propriedades tóxicas que apresentam, além de poder ser uma medida antieconômica e pouco eficaz, especialmente em regiões tropicais.

Assim, o controle de pragas por microrganismos é uma alternativa que visa contornar em parte ou inteiramente os defeitos que apresentam os inseticidas.

Dessa forma, visando-se a preservação da ecologia e minimização dos gastos, cada vez mais se procura usar o controle integrado, aliando-se o controle químico e biológico além de outras práticas agrícolas, de modo a reduzir as populações de pragas e mantê-las a um nível tal, que não causem danos econômicos à cultura.

Sob o aspecto "controle microbiano" , o fungo en

tomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, assume grande importância econômica principalmente no Brasil. Este fungo, já é produzido em escala industrial por órgãos governamentais e firmas particulares e vem sendo muito utilizado em controle biológico ou integrado, em pragas de pastagens e cana-de-açúcar. Além disso, já se possui um razoável volume de dados publicados resultantes de pesquisas realizadas com esta espécie.

O presente trabalho foi então conduzido visando estudar várias linhagens de *Metarhizium anisopliae* em relação a sua variabilidade natural para taxa de crescimento e produção de esporos; sobrevivência a luz ultravioleta e obtenção de mutantes, bem como realizar cruzamentos entre e dentro dessas linhagens pelo processo clássico e pela técnica da fusão de protoplastos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação e descrição

O fungo *Metarhizium anisopliae* foi descrito por Metschnikoff em 1879 como *Entomophthora anisopliae* Metschnikoff, citado por PETCH, 1931, e KENDRICK, 1971), infectando larvas do besouro do trigo *Anisoplia austriaca*. É um deuteromiceto pertencente a ordem Moniliales, família Moniliaceae. Posteriormente por sugestão do botânico CIENKOWISKY o fungo foi denominado *Isaria destructor*; após uma série de controvérsias, com a proposição de diversos sinônimos, finalmente foi transferido para o gênero *Metarhizium* em 1883 por SOROKIN (GUAGLIUMI *et alii*, 1974). Assim, sua designação atual é *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin.

BARON (1968), estudando a espécie, estabeleceu uma estrutura de formação de conídios agregada a hifas entrelaçadas e contendo uma massa compacta de conidióforos simples

ou ramificados, provenientes de células denominadas fiálides; as fiálides afilam-se para um ápice estreito os fialósporos não septados, cilíndricos e hialinos. As fiálides podem ser simples em pares ou espiraladas (BARNETT, 1960) e, as hifas produzidas internamente num inseto parasitado apresentam-se arroxeadas ao passo que as produzidas externamente são hialinas (MARCHIONATO, 1942).

Este fungo pode apresentar conídios cilíndricos de $8-9 \mu\text{m} \times 2,5-3,0 \mu\text{m}$ (MARCHIONATO, 1942) ou variações que vão de ovóides a cilíndricos, unicelulares, hialinos ou levemente pigmentados, dando ao conjunto um aspecto verde oliva (BARNETT, 1960).

Quanto ao tamanho, os conídios apresentam variação, sendo esta uma característica utilizada na divisão da espécie em duas variedades a *anisopliae* e a *major* (JOHNSTON, 1915; FRIEDERICH, 1930 e Kamat *et alii*, 1952, citado por TULLOCH, 1976).

TINLINE (1971), procurando correlacionar tamanho de conídios com número de núcleos e quantidade de DNA por conídio nestas duas variedades, verificou que o aumento no tamanho dos conídios não levava a um aumento no número de núcleos, embora ocorresse variação na quantidade de DNA, sendo a quantidade máxima encontrada na variedade *major*. Estudos comparados por imunoeletroforese (FARGUES *et alii*, 1975), de

extratos somáticos e metabólicos de quatro linhagens entomopatógenicas de *Metahizium anisopliae* não mostraram diferenças imunológicas importantes entre a variedade de esporos grandes (*major*) e pequenos (*anisopliae*). Entretanto, BALFOUR-BROWE (1960), tratando larvas de *Eritrea* sp. com conídios dessas variedades, verificou que as mesmas eram afetadas e mortas pela linhagem com conídios menores.

Foi demonstrado que o fungo possui conídios uninucleados (VEEN, 1967; ZACHARUK, 1970a e b e TINLINE, 1971), sendo os condióforos igualmente uninucleados no início de seu desenvolvimento. Todos os núcleos produzidos de um conidióforo provêm de um mesmo progenitor. Os conídios maduros são tipicamente uninucleados. No entanto, alguns conídios tem mais que um núcleo, o que levou alguns autores a sugerirem que os conídios com dois núcleos estejam em um processo de germinação (TINLINE e NOVIELLO, 1971) ou que a ocorrência de anastomose levou a esta condição.

Por outro lado, MESSIAS *et alii* (1978), constataram através da coloração por Giemsa uma proporção de 95% de conídios uninucleados para 5% de binucleados em uma linhagem E₆ enquanto LUNA e AZEVEDO (1983) introduziram modificações nessa técnica as quais permitiram a observação dos distintos estágios de diferenciação em estruturas vegetativas.

2.2. Desenvolvimento do fungo

Segundo vários autores e através de observações efetuadas em laboratório e no campo, o desenvolvimento normal do *Metarhizium anisopliae* como também sua influência sobre hospedeiros, deve-se e é condicionada principalmente ao complexo temperatura e umidade. Este complexo estende-se tanto no ambiente de laboratório como no microclima dos campos onde é aplicado.

De fato, a umidade é essencial para a germinação do esporo de muitos fungos. Várias informações permitem distinguir entre o papel da umidade atmosférica durante o processo de infecção e os vários fenômenos epizooticos (FERRON, 1978). É conhecido que o desenvolvimento de fungos em insetos mortos e posteriormente a esporulação, está intimamente associada com a umidade (ponto de saturação). Nestas condições a multiplicação do inóculo resulta numa excessiva contaminação do inseto, favorecendo o desenvolvimento de uma micose epizootica.

Considerando-se esse fator como apenas um dos muitos que podem prejudicar um programa de controle por microrganismos, vários trabalhos foram desenvolvidos com os mais diferentes fungos utilizados. Dessa maneira, ficou evidente que a longevidade do esporo é dependente da umidade relativa (CLERK e MENDELIN, 1965); assim conídios de *Beauveria*

bassiana e *Paecilomyces farinosus* desenvolvem-se melhor à umidade relativa de 0 - 34% que a 75% enquanto conídios de *Metarhizium anisopliae* desenvolvem melhor em altas e baixas umidades (0 e 92% UR), do que em umidades intermediárias, próximas a 45% UR (WALSTAD *et alii*, 1970; WILDING, 1973; NEWMAN e CARNER, 1975).

Por outro lado, se os esporos forem lavados com água destilada ou agentes molhantes esse nível muda para 65% UR. O efeito desfavorável da umidade é também reduzido ou suprimido em esporos estocados em atmosfera enriquecida com CO₂ ou isenta de O₂ (CLERK e MENDELIN, 1965).

Outro fator importante quando se utiliza fungos entomopatôgenos é a temperatura, uma vez que o rápido desenvolvimento micelial e portanto a rápida evolução da infecção depende da temperatura. Em geral, a temperatura ótima situa-se entre 20° a 30°C com limites entre 5° a 35°C, podendo-se citar: 23°C para *Beauveria brongniartii*; 24°C para *Entomophthora obscura* e *Entomophthora exitialis*; 25°C para *Beauveria bassiana* e *Nomuraea rileyi* e 27°C a 28°C para *Metarhizium anisopliae* (FERRON, 1978). Temperatura menor que a ótima retarda o desenvolvimento da micose sem contudo afetar necessariamente a mortalidade total (FERRON, 1967; ZACHARUK e TINLINE, 1968).

Para *Metarhizium anisopliae*, temperaturas aci-

ma de 30°C afeta sobremaneira o desenvolvimento enquanto que abaixo de 7°C não há crescimento (VILACORTA, 1978).

AQUINO *et alii* (1975), verificaram que alterações morfológicas nas colônias de *Metarhizium anisopliae* podem reduzir ou anular a produção de conídios, pois as frutificações normais se apresentam com aspectos esporodóquio formado por numerosos conidióforos aglomerados. Em preparações microscópicas, os micélios hialinos são constituídos por conidióforos hiperatrofiados e solitários originados ao lado de numerosas hifas estéreis. Estes autores consideram a hipótese de que as alterações sejam causadas pela elevação da temperatura ou efeito da luminosidade ou ainda antibiose provocada por organismos invasores. Vários trabalhos foram desenvolvidos com a finalidade de se verificar a influência da temperatura, bem como da luz no desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae*, entre eles: MASERA (1957), BALFOUR-BROWE (1960), LATCH (1965), DIAMONDÉ (1969), BASTOS e MATTA (1976), SANTOS (1978), ALVES (1983).

Deve-se lembrar entretanto, que a temperatura ideal para o fungo não é necessariamente a mesma para o desenvolvimento da doença; contudo a temperatura do ambiente no inseto hospedeiro deve ser considerada, uma vez que pode modificar a duração de um determinado estágio e dessa maneira impedir a penetração do fungo no tegumento (FERRON, 1978).

Dado o primeiro passa para o emprego de *Metar-*

hizium anisopliae no controle de certas pragas (especialmente *Mahanarva posticata*, *Deois schach*, *D. flavopicta*, etc.) foi sentida a necessidade de produzi-lo em maior escala a fim de proceder sua difusão nas diferentes áreas canavieiras ou mesmo de pastagens afetadas pela praga. Verificou-se que o fungo, utiliza como fonte de carbono, amido, glicose, glicerina, levulose, maltose, sacarose e quitina (LIHNELL, 1944; HUBER, 1958).

No Brasil, assim como em outros países (FERRON, 1978), inúmeros meios de cultura foram ensaiados visando uma produção em larga escala do *Metarhizium anisopliae*. Assim, sucessivamente, as culturas foram efetuadas em frascos de Erlenmeyer, garrafas de Roux, sacos de polietileno e polipropileno (MOURA COSTA e MAGALHÃES, 1974; MOURA COSTA *et alii*, 1974; BASTOS, 1976 e AQUINO *et alii*, 1977), utilizando-se principalmente o BDA (batata-dextrose-ágar) e depois "arroz cozido" (MARQUES e VILAS BOAS, 1973; AQUINO, 1974).

A utilização do "arroz cozido" como meio de cultura foi acompanhado por ensaios com outros substratos (GUAGLIUMI *et alii*, 1974 e BASTOS *et alii*, 1976a). Em contraposição aos demais meios, o substrato de arroz mostrou-se altamente favorável à frutificação e desenvolvimento do *Metarhizium anisopliae*. A maior eficiência do meio de arroz foi comprovada através da superior produção de esporos do fungo em um menor espaço de tempo quando comparado com os demais (AQUINO, 1974).

Este meio entretanto, apresentava desvantagens pois, dependendo da concentração do arroz ou tornava-se difícil o manuseio devido a inconsistência do meio de cultura ou havia falta de homogeneidade do arroz em grão no meio solidificado. Para resolver esse impasse MOURA COSTA e MAGALHÃES, (1974), resolveram utilizar a farinha de arroz, obtida com auxílio de um moinho e posteriormente passada em peneira de malhas finas. Também verificaram que a melhor concentração deste novo meio era 5% de farinha de arroz, 1% de ágar em pó e 100 ml de água destilada, ajustando o pH para 6,0.

Outro fator de grande importância quando se trabalha com fungos entomopatogênicos no controle biológico de pragas, é o conhecimento do poder de latência de seus propágulos pois estes, poderão ser submetidos às mais diversas condições de ambiente no decorrer das operações de conservação, transporte e aplicação no campo (AQUINO, 1974; BELL e HAMALLE, 1974; BASTOS, 1976 e BASTOS *et alii*, 1976b).

Entre essas condições, não se deve negligenciar a importância do solo, uma vez que, muitos insetos são subterrâneos. Nesse caso, não só a influência do solo sobre o fungo deve ser considerada: temperatura, umidade, luminosidade, pH, presença de inseticidas (MASERA, 1957; BICHUK, 1962; AQUINO, 1974; ALVES *et alii*, 1980a e b e GOMES, 1982), como também a maneira de aplicação do fungo deve ser observada (FERRON, 1978).

Recentemente CORRÊA (1982), estudando a influência da luz ultravioleta sobre a germinação de 3 linhagens de *Metarhizium anisopliae* em dois tipos de solos (arenoso e argiloso), verificou que em solos arenosos, a sobrevivência dos esporos é maior do que em solos argilosos; mesmo quando se considera o mesmo tipo de solo, os isolados mostram variação quanto aos efeitos letais da luz ultravioleta.

Esses dados, assim como os demonstrados por SANTOS (1978), MESSIAS (1979), VALE *et alii* (1980) e MATOS (1983), mostram a existência de uma alta variabilidade quanto a resistência a ultravioleta entre os diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*.

Assim, o caráter resistência a luz solar, que é importante para o controle biológico, pode vir a ser melhorado, não apenas por mutação para resistência, como também por recombinação através do ciclo parassexual, recentemente determinado (MESSIAS, 1979 e MESSIAS e AZEVEDO, 1980, AL-AIDROOS, 1980).

Essa nova linha de pesquisa, muito importante no que diz respeito ao melhoramento de linhagens de *Metarhizium anisopliae* tem sido desenvolvida nos últimos 10 anos, em vários países e especialmente no Brasil. Dessas pesquisas resultaram linhagens com virulência alterada obtidas através de mutações (ver revisão de FERRON, 1978), hibridação ou produção de heterocários (TINLINE e NOVIELLO, 1971; MESSIAS, 1979,

1980; LUGLI e MESSIAS, 1982). Entretanto, dentre as novas técnicas de recombinação em microrganismos que foram desenvolvidas principalmente a partir da década dos 70 (HOPWOOD e WRIGHT, 1978, 1979; AZEVEDO, 1979), uma das mais promissoras é a da fusão de protoplastos. Tais técnicas, individualmente ou associada àquelas do DNA recombinante, tem grande interesse e potencialidade tanto para estudos fundamentais de genética e áreas afins como para o melhoramento de microrganismos de valor econômico. O desenvolvimento dessas técnicas foi o resultado de um estudo sistemático, desde aqueles envolvendo isolamento de protoplastos, como os referentes a sua regeneração e fusão (PEBERDY, 1971 e 1979; AZEVEDO, 1981; CHACEL *et alii*, 1982).

A técnica da fusão de protoplastos é um novo sistema de recombinação que se presta bem para o cruzamento entre linhagens incompatíveis e portanto não suscetíveis de cruzamento através do ciclo parassexual convencional. A descoberta de que o polietileno glicol atua como eficiente fusogênico (ANNE e PEBERDY, 1975) tornou essa técnica utilizável em larga escala para cruzamento intra e interespecíficos (PEBERDY, 1979; FERENCZY, 1981). Variações das técnicas de fusão de protoplastos incluem diferentes processos de seleção (CARRAU *et alii*, 1982) e utilização de linhagens selvagens mortas por agentes físicos tais como a luz ultravioleta e altas temperaturas. Esta é conhecida pelo nome de técnica do "doador morto" (FERENCZY, 1981; HOPWOOD e WRIGHT, 1981). Re-

visões sobre o assunto, bem como uma nova técnica de enriquecimento para obtenção de mutantes e obtenção da curva de sobrevivência a ultravioleta é apresentada por SILVEIRA e AZEVEDO (1982), SILVEIRA (1983) e AZEVEDO *et alii*, 1983.

2.3. Caracterização das linhagens

Em geral, a classificação de fungos entomopatôgenos está baseada em critérios morfológicos. Contudo, conhecimentos adicionais da virulência e especificidade, revelaram a necessidade de uma caracterização mais precisa. Algumas informações foram dadas por um estudo mais especializado da conidiogênese (HAMMIL, 1972), observações através da microscopia eletrônica dos esporos (MATANMI e LIBBY, 1975) e algumas vezes por estudos fisiológicos; porém, uma caracterização correta das linhagens, requer novas técnicas. Para tal, estudos comparativos na caracterização de diferentes isolados através de métodos eletroforéticos e imunoeletroforéticos (FARGUES *et alii*, 1975; De CONTI *et alii*, 1980), tem-se mostrado muito promissor no desenvolvimento de técnicas para o controle de pragas, uma vez que alguns desses isolados mostram diferentes patogenicidades. A produção de enzimas extracelulares também possibilita uma caracterização, já que, uma variação quanto ao índice enzimático é mostrado entre diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae* desenvolvidos em meio

sólido (ROSATO *et alii*, 1981) e também de acordo com a fonte de nitrogênio utilizada (MADELIN, 1968; Samsinakowa, 1973, citado por FERRON, 1978; RATAULT e VEY, 1977; KUCERA, 1980 e 1981).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

As linhagens de *Metarhizium anisopliae* utilizadas neste trabalho foram:

<i>Linhagem</i>	<i>Fornecido por</i>	<i>Local de isolamento</i>	<i>Hospedeiro original</i>
A ₄	EPABA	Salvador (BA)	<i>Mahanarva posticata</i>
A ₁₉	EPABA	Salvador (BA)	<i>Deois schach</i>
E ₆ , E ₉	EMPABA	Vitória (ES)	<i>Deois flavopicta</i>
C	CODECAP	Recife (PE)	<i>M. posticata</i>
K	Dr. K. El. KADI	Jahú (SP)	<i>D. flavopicta</i>
M	Dr. C.L. Messias	Manaus (AM)	<i>Deois</i> sp
MT	EMBRAPA - MT	Mato Grosso	<i>Deois</i> sp
AL	PLANALSUCAR	Maceio	<i>M. posticata</i>
PE (PL ₅)	Dr. Ednilson J. Marques	Pernambuco	<i>M. posticata</i>

<i>Isolado</i>	<i>Fornecido por</i>	<i>Local de isolamento</i>	<i>Hospedeiro original</i>
M _J (majors)	Dr. D. Roberts	USA	
RJ			
RJ ylo ade lys	W.D. Silveira	Obtidas a partir das linhagens RJ (Rio de Janeiro) e E ₆ por tratamento com luz ⁶ ultravioleta (SILVEIRA, 1983)	
E ₆ vio met bio			
E ₆ ylo ade lys			
E ₆ ylo pir lys			

3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas

3.2.1. Meio mínimo (PONTECORVO *et alii*, 1953) (MM)

NaNO ₃	6,0 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
glicose	10,0 g
ágar	15,0 g
água destilada	1000 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.2. Meio completo sólido (PONTECORVO *et alii*, 1953, modificado por AZEVEDO e COSTA, 1973) (MC)

Adicionou-se ao meio mínimo:

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolizada	1,5 g
Extrato de leveduras	0,5 g
Solução de vitaminas	1,0 ml
Ácido nucleico de leveduras	2,5 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.3. Meio mínimo líquido (PONTECORVO *et alii*, 1953)

Preparado segundo o item 3.2.1., não sendo adicionado ágar.

3.2.4. Meio completo líquido (PONTECORVO *et alii*, 1953)

Preparado segundo os itens 3.2.1. e 3.2.2., não sendo adicionado o ágar.

3.2.5. Meio mínimo mais 2% de meio completo e meio mínimo mais 4% de meio completo

Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,5 ml de meio mínimo líquido mais 2% de meio completo líquido e, mínimo mais 4% de meio completo líquido, respectivamente. Estes tubos foram autoclavados e conservados em refrigerador.

3.2.6. Meio completo 2x concentrado

Preparado segundo os itens 3.2.1. e 3.2.2., onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada com exceção da água.

3.2.7. Meio mínimo 2x concentrado

Preparado segundo item 3.2.1., onde cada componente foi colocado em quantidade dobrada, com exceção da água.

3.2.8. Meio mínimo líquido para crescimento de micélio

Ao meio mínimo preparado segundo o item 3.2.1., foram adicionado o(s) requisito(s) para cada marca auxotrófica.

3.2.9. Meio para crescimento de micélio

Ao meio mínimo líquido preparado segundo o item 3.2.1., foram adicionados 2,0 g/l de caseína hidrolisada e 5,0 g/l de extrato de levedura.

3.2.10. MMKCl para reversão e obtenção de produtos de fusão

Preparado segundo item 3.2.7., onde o mesmo foi diluído no momento do uso com KCl 1.4M em tampão fosfato pH 5,8 na proporção 1:1.

3.2.11. MCKCl para obtenção de crescimento de células totais (protoplastos, micélio e conídios não digeridos)

Preparado segundo o item 3.2.6., onde o mesmo foi diluído no momento de uso em KCl 1.4M em tampão fosfato pH 5,8 na proporção de 1:1.

3.2.12. Meio de arroz (modificado a partir do meio proposto por AQUINO, 1974) (MA)

Farinha de arroz	15,0 g
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml
pH ajustado para 6,8 com NaOH 4%	

3.2.13. Solução de vitaminas

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

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

3.2.14. Solução de ácido nucléico de leveduras

a. Ácido nucléico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução 1 N
de Na Cl

b. Ácido nucléico de leveduras - 2 g em 15 ml de solução 1 N
de NaOH

Ambas as soluções foram aquecidas a 100°C durante 20 minutos, misturados e o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 4%. Filtrou-se e completou-se o volume para 40 ml sendo a seguir conservada em refrigerador a 4°C sob clorofórmio.

3.2.15. Suplementos adicionados ao meio mínimo

Preparou-se o estoque de suplementos adicionando-se cada um deles em água destilada esterilizada. As soluções foram aquecidas em banho-maria por 15 minutos e conservadas em refrigerador.

Solução estoque	Quantidade adicionada por placa (20 ml de meio de cultura)	Concentração final no meio de cultura
Adenina	500,0 mg 0,1 ml	25,00 µg/ml
Ácido nicotínico	10,0 mg 0,1 ml	0,50 µg/ml
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	5,0 mg 0,1 ml	0,25 µg/ml
Biotina	4,0 mg 0,1 ml	0,20 µg/ml
Metionina	1,0 g 0,1 ml	50,00 µg/ml
Piridoxina	5,0 mg 0,1 ml	0,25 µg/ml
Prolina	1,0 g 0,1 ml	50,00 µg/ml
Riboflavina	10,0 mg 0,1 ml	0,50 µg/ml
Tiossulfato de sódio	2,0 g 0,1 ml	100,00 µg/ml

3.2.16. Solução salina (0,85%)

Preparou-se uma solução de 8,5 g de cloreto de sódio em 1000 ml de água destilada. Colocou-se 10 ml da solução em frascos, autoclavou-se e conservou-se à temperatura ambiente.

3.2.17. Solução de "tween" 80 - (0,1% - v/v)

Preparou-se uma solução de 0,1 ml de "tween" 80 em 100 ml de água destilada. Distribuiu-se em tubos de ensaio (2,5 ml cada), autoclavou-se e conservou-se à temperatura ambiente.

3.2.18. Solução de caseína hidrolisada

Preparou-se a solução, dissolvendo-se 100 mg de caseína hidrolisada em 10 ml de água destilada esterilizada. Esta foi aquecida em banho-maria por 15 minutos e a seguir conservada em refrigerador a 4°C.

3.2.19. Tampão fosfato pH 5,8

Solução A

NaH_2PO_4	240 g
Água destilada	1000 ml

Solução B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	71,6 g
Água destilada	1000 ml

Adicionaram-se 920 ml de solução A em 80 ml de solução B. As soluções A e B foram conservadas no refrigerador e o tampão fosfato foi preparado no momento do uso.

3.2.20. Solução de KCl 1.4M pH 5,8

Para o preparo dessa solução, 104,38 g de KCl foram dissolvidos com agitação e aquecimento em 500 ml de solução A (tampão fosfato pH 5,8). Levou-se ao potenciômetro e adicionou-se solução B (tampão fosfato pH 5,8) até atingir-se pH 5,8. O volume final foi acertado para 1000 ml com tampão fosfato pH 5,8. Autoclavou-se e conservou-se em refrigerador.

3.2.21. Solução de KCl 0.7M pH 5,8

Para o preparo desta solução, um volume de KCl 1.4M foi diluído em igual volume de tampão fosfato pH 5,8. Autoclavou-se e armazenou-se em refrigerador.

3.2.22. Solução de Polietilenoglicol (PEG) 30%

Solução A

CaCl ₂	11,0 g
Água destilada	1000 ml

Solução B

Glicina	3,75 g
Água destilada	1000 ml
pH ajustado para 8,0 com NaOH 4%	

Foram adicionados 10 ml da solução A em 10 ml da solução B e o volume corrigido para 100 ml com água destilada. O pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4% e adicionado PEG 6000 (SIGMA) em concentração final de 30%.

3.2.23. Solução em enzimas para produção de protoplas_utos (HAMLIN *et alii*, 1981)

- Novozym 234 (Novo Enzyme Products Ltd. Dinamarca)
- Celulose CP (John and Esturys Ltd, Birmingham, Inglaterra)

Para cada 1,0 ml de KCl 0,7 M em tampão fosfato pH 5,8 foram adicionados 5,0 ml de enzima lítica.

3.2.24. Filtros Büchner para filtração de micélio

Estes foram preparados mantendo-se em seu interior duas folhas de papel de filtro Whatman nº 1. Foram envolvidos em papel de alumínio e papel comum e autoclavados por 15 minutos a 120°C.

3.3. Esterilização e incubação

Os meios de culturas e as soluções foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 120°C (exceto nos casos assinalados). Os frascos que necessitaram ser utilizados e esterilizados, foram autoclavados a 120°C por 35 minutos (filtros, frascos de produção de protoplastos, etc.). A temperatura de incubação foi de 28°C, exceto quando foi necessário deixar o material à temperatura ambiente.

3.4. Taxa de crescimento das colônias

Conídios das diferentes linhagens foram semeados separadamente, em placas de Petri contendo meio completo, de maneira a se obter colônias isoladas.

Após 48 horas de incubação, com o auxílio de uma alça de microcromo, transferiu-se as microcolônias para meio completo (uma microcolônia por placa) e, novamente incubou-se por mais 24 horas no escuro. A variabilidade quanto ao crescimento apresentada pelas linhagens, foi verificada através de medições diárias efetuadas no início do 5º dia de desenvolvimento (96 horas a contas da 1ª semeadura), até o 10º dia.

3.5. Produção de conídios

3.5.1. Em meio completo

Ao mesmo tempo que transferiu-se microcolônias para placas de Petri, como citado anteriormente (item 3.4.) , transferiu-se também para frascos individuais, com tampa de baquelite, fracamente rosqueadas. Esses frascos, juntamente com as placas foram incubadas por 24 horas no escuro. Concomitantemente à determinação do diâmetro das colônias nas placas, efetuou-se a determinação da quantidade de conídios produzidos pelas colônias, nestes frascos. Para tal, procedeu-se da seguinte maneira: em cada frasco adicionou-se 2,5 ml

de "tween" 80 (0,1%) e após forte agitação, com o auxílio de uma pipeta, retirou-se alíquotas da suspensão, para contagem dos conídios em hematímetro (câmara de Neubauer).

3.5.2. Em meio de arroz (MA)

Conídios das linhagens A₄, C, E₉, K, M e PE de *Metarhizium anisopliae* foram inoculadas separadamente, em 4 pontos equidistantes de placas de Petri, contendo farinha de arroz em concentrações crescentes (15, 30, 45, 60, 75 e 90 g/l). Após 10 dias de incubação, através de um cilindro metálico de 7 mm de diâmetro foram retiradas amostras da região central de 3 colônias de cada linhagem. Para contagem dos conídios, colocavam-se essas amostras em 2,5 ml de solução de "tween" 80 (0,1%); a seguir, após forte agitação, determinava-se o número dos mesmos em hematímetro.

A quantidade de conídios foi estimada em relação a área da amostra utilizada. Esta área foi determinada a partir da fórmula $a = \pi R^2$, onde

π = constante

R = raio do círculo.

Dessa maneira a unidade de medida utilizada foi $N \times 10^5 / \text{cm}^2 / \text{ml}$, onde

N = número de conídios

3.6. Sobrevivência à luz ultravioleta

Suspensões de conídios (10^6 /ml), das linhagens selvagens E_6 , A_4 , M_J , E_9 , M e E_{9A} em "tween" 80 foram observados ao microscópio com o auxílio de uma câmara de Neubauer, determinando-se assim o número de conídios por mililitro. Essas suspensões foram diluídas em solução salina (1:10) colocadas em placas de Petri esterilizadas e, efetuou-se a irradiação mantendo-se as suspensões irradiadas a uma distância de 14 centímetros da fonte de luz ultravioleta com agitação. Nestes experimentos foi utilizada a luz ultravioleta de ondas curtas (Mineralight lamp Model UVSL-25, 115 volts 60H₂ 0,16 AMPS). Antes de ser iniciada a irradiação, a lâmpada permaneceu ligada por 10 minutos e, todo experimento (irradiação, semeadura e incubação) foram realizados na ausência de luz, sendo o tempo utilizado para todas linhagens: 0, 1, 2, 4 e 8 minutos. Após cada irradiação, diluições apropriadas foram feitas em solução salina 0,85% e 0,1 ml foi semeado em placas contendo MC. As placas foram incubadas a 28°C durante 4 dias. Findo este período, as colônias sobreviventes foram contadas e procedeu-se o cálculo da curva de sobrevivência, tomando-se o número de colônias obtidas no tempo 0 (zero) minuto como 100% de sobrevivência. Estimou-se deste modo, o tempo de irradiação que permitia 5% de sobrevivência para as diferentes linhagens. A porcentagem de sobrevivência, foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\text{Nº de sobreviventes}}{\text{Nº de conídios da suspensão inicial}} \times 100$$

3.7. Obtenção dos mutantes auxotróficos e morfológicos

Conídios das linhagens A₄, E₆, RJ, M e M_J com 10 dias de desenvolvimento foram transferidos para tubos de ensaio contendo solução de "tween" 80. Em seguida determinou-se o número dos mesmos em hematímetro, procurando-se obter uma concentração de aproximadamente 10⁶ conídios por mililitro.

A suspensão de conídios foi diluída (1:10) em solução salina e irradiada (UV), por um período de tempo capaz de inviabilizar 95% dos conídios.

A suspensão irradiada foi diluída e dessa diluição semeou-se 0,1 ml por placa de Petri contendo meio completo. Após sete dias de incubação os conídios das várias colônias foram transferidos para placas de Petri, inoculadas na distribuição 5 x 5 mais 1, em MM (AZEVEDO, OLIVEIRA e ROCHA CAMPOS, 1976) e incubadas por 48 horas. As colônias que não se desenvolveram neste meio foram consideradas mutantes. Cortando-se o ágar sobre o qual os conídios foram inoculados, transferiram-se os blocos obtidos para tubos inclinados contendo meio completo. Dessa maneira, conseguiram-se novos conídios para ensaio das deficiências nutricionais.

Para o ensaio dessa deficiências, os conídios de possíveis mutantes, foram suspensos em tubo contendo solução "tween" 80 e semeou-se uma alíquota de 0,2 ml dessa suspensão bem densa por "pour plate", para 20 ml de MM, ainda líquido, à temperatura de 45°C. Os conteúdos dos tubos foram transferidos para placas de Petri e incubadas a 28°C. Após 24 horas, gotas de solução de caseína hidrolisada, vitaminas, extrato de leveduras e ácidos nucleicos foram distribuídos cuidadosamente em diferentes locais das placas e estas foram novamente incubadas. Após 7 dias, um crescimento ao redor destas soluções indicava a deficiência do mutante. Posteriormente, ensaiou-se conforme o caso, cada aminoácido, vitamina e base nitrogenada, procurando-se a caracterização final do mutante. Dessa maneira obteve-se mutantes simples. Isolaram-se também aqueles mutantes que mesmo crescendo em meio mínimo se diferenciavam da linhagem selvagem quanto ao aspecto morfológico. A irradiação desses morfológicos permitiu, através da mesma técnica já descrita, a obtenção de mutantes com duas marcas, uma para morfologia e outra para deficiência nutricional.

3.8. Produção de protoplastos

Conídios crescidos em MC inclinado incubados por 7 a 8 dias, foram suspensos em solução salina e determina

dos suas concentrações (conídios/ml) com auxílio de lâmina de Neubauer e microscópio. Estas foram adicionadas em meio para produção de micélio (3.2.9.), mais os requisitos de cada mutante, para uma concentração final de 10^6 conídios/ml. O meio assim obtido, foi mantido em agitador (150 rpm) por 24 horas. Findo este período, o micélio desenvolvido foi filtrado em filtro de Büchner com auxílio de bomba de vácuo e lavado em KCl 1.4M (tampão fosfato pH 5,8). Determinou a seguir, seu peso úmido. Esse micélio foi colocado em presença de KCl 0.7M (tampão fosfato pH 5,8) e complexo de enzimas líticas na proporção de 50 mg de micélio: 1,0 ml de KCl 0.7 M: 5 mg de enzima (50% de celulase CP e 50% de NOVO) (HAMLYN *et alii*, 1982). Agitou-se (150 rpm) por 2:30 horas - e verificou-se a presença de protoplastos com o auxílio do microscópio (uma gota da suspensão que havia sido agitada). Uma vez observada a presença de protoplastos, centrifugou-se a suspensão por 30 segundos a 500 rpm, retirou-se a sobrenadante e o mesmo foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, ressuspensão o "pellet" em KCl 0.7M esterilizado e novamente centrifugado (3000 rpm, 10 minutos). Repetiu-se esta operação mais 2 vezes.

3.8.1. Contagem de protoplastos

Os protoplastos obtidos no item (3.8.) ("pellet") foram ressuspensos em KCl 0,7 M (tampão fosfato pH 5,8) e contados em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico.

3.8.2. Fusão de protoplastos

Para a utilização de protoplastos foi utilizada a técnica do doador morto (HOPWOOD e WRIGHT, 1981), com algumas modificações. Os protoplastos obtidos em KCl 0,7 M da linhagem selvagem e mortos por luz ultravioleta (10 minutos de irradiação), foram misturados em quantidades iguais com protoplastos vivos das linhagens deficientes nutricionais (nunca menos que 10^6 protoplastos/ml). A seguir foram centrifugados a 3000 rpm/10 minutos e o "pellet" lavado por centrifugação em presença de KCl 0,7 M, mais duas vezes. O "pellet" assim obtido foi ressuspenso em PEG (1 ml) pré-aquecido (30°C) e mantido em banho-maria (30°C) por 10 minutos. Após esse período adicionou-se KCl 0,7 M (cerca de 25 ml) e centrifugou-se por 10 minutos - 3000 rpm. Esse procedimento foi repetido por 2 vezes. O "pellet" assim obtido foi ressuspenso em 1 ml de KCl 0,7 M e diluições apropriadas (1:10) foram feitas, também em KCl 0,7 M. Essas diluições foram semeadas por "pour plate" (1,0 ml) em MMKCl e MCKCl com diluições apropriadas.

3.8.3. Verificação da presença de hifas, esferoplastos e conídios na suspensão de protoplastos

Os protoplastos da linhagem mutante e selvagem obtidos no ítem 3.8. foram semeados por "pour plate" em MC e MCKCl. O crescimento de colônias neste meio de cultura (MC), indica o número de hifas e conídios que existem na suspensão de protoplastos quando comparado com a suspensão semeada em placas com MCKCl. A semeadura foi feita nas diluições apropriadas.

3.9. Obtenção de heterocários e diplóides

3.9.1. Obtenção de heterocários por fusão de protoplastos

Das placas de MMKCl, oriundas de fusão de protoplastos (ítem 3.8.2.) e contendo pequenas colônias, foram recortados blocos de ágar (contendo estas colônias) que foram transferidas para placas contendo MM e MC. Incubou-se estas placas a 28°C por 15-20 dias.

3.9.1.1. Frequência de fusão de protoplastos

Esta foi determinada como sendo:

$$\frac{\text{colônias desenvolvendo em MMKCl}}{\text{colônias desenvolvendo em MCKCl}}$$

3.9.2. Obtenção de heterocário pela metodologia convencional - Ciclo Parassexual (MESSIAS e AZEVEDO, 1980)

Conídios de diferentes linhagens (com complementação para marcas auxotróficas e morfológicas) foram colocados em tubos de ensaio contendo 2,5 ml de MM líquido suplementado com 2% e 4% de MC líquido (permite uma germinação inicial dos conídios). Estes tubos foram incubados por 10 dias (28°C) e a película formada na superfície do meio foi transferida para placas contendo MM sólido.

Após incubação, uma extremidade dessa película foi novamente transferida para placas contendo MM sólido e novamente incubadas a 28°C por mais 10 dias, para evitar-se crescimento devido a resquícios de MC vindos dos tubos.

3.9.3. Obtenção de diplóides

Tanto os conídios de colônias heterocarióticas em MM, provenientes de fusão de protoplastos, quanto os de película (metodologia clássica), foram usados para obtenção de suspensões em "tween" 80, 0,1% (cerca de 10^7 conídios/ml). Estas suspensões foram semeadas em MM sem diluição e com diferentes diluições e incubadas por 6-7 dias. As colônias que desenvolveram nestas placas foram transferidas novamente para MM (prováveis diplóides) e MC (para testar estabilidade). Incubou-se por 7 a 8 dias.

3.10. Medida do tamanho dos conídios

Conídios provenientes das colônias em MM (prováveis diplóides, item, 3.9.3.), como também das linhagens parentais foram medidos. As medidas foram efetuadas com o auxílio de um microscópio óptico (aumento 240X), usando-se ocular milimetrada previamente calibrada em microns. Os conídios foram escolhidos ao acaso, em cinco diferentes campos do microscópio, e os mesmos eram mantidos entre lâmina em gota de água sem qualquer coloração. Para cada esporo foram efetuadas duas medidas: uma delas, do comprimento maior, e a outra, da largura. Para cada placa (prováveis diplóides) foram medidos no máximo 30 esporos. Através dessas medidas e consideran-

do-se a forma dos mesmos como do elipsoide, calculou-se o volume médio dos conídios, através da fórmula:

$$\frac{3}{4} \pi (a^2 \cdot c) \quad \text{onde,}$$

π = constante; R = raio (diâmetro menor); c = raio (diâmetro maior).

3.11. Análise estatística dos dados

Foram realizadas análises de variâncias para os caracteres diâmetro da colônia e produção de esporos segundo um esquema em classificação hierárquica, considerando-se "dias" como tratamentos e "dentro de dias" como resíduo. Com a finalidade de se atender às exigências estatística, os dados de produção de esporos foram previamente transformados na escala logarítmica.

Para o caso das linhagens em que foram feitos três experimentos (K, A₁₉, C, E₆, A₄, M e MT) foi realizada ainda uma análise de variância conjunta, com o intuito de se verificar a ocorrência ou não de interação entre os diferentes experimentos.

Foram calculados ainda os coeficientes de correlação de "Spearman" entre os caracteres produção de esporos e diâmetro da colônia, para cada experimento em separado.

4. RESULTADOS

4.1. Taxa de crescimento das colônias

A Tabela 1 apresenta os valores médios obtidos para o diâmetro de colônias das linhagens K, A₁₉, A₄, E₆, E₉, M_J, M, Al, MT, PE e C de *Metarhizium anisopliae*. Essas medidas representam a média de 4 a 12 repetições efetuadas do 5º ao 10 dia de crescimento. As figuras de 1 a 11 mostram isoladamente o crescimento e produção de esporos de cada linhagem enquanto que a Figura 12 permite uma comparação do crescimento entre as mesmas linhagens. Os resultados da análise da variância para o caráter diâmetro das colônias estão colocados nos Apêndices de 1 a 8.

TABELA 1. Média de crescimento de 11 linhagens de *Metarhizium anisopliae* do 5º ao 10º dia de crescimento.
(média de 4 a 12 repetições).

Linhagens	Diâmetro (cm) dias					
	5º	6º	7º	8º	9º	10º
K	0,90	1,28	1,78	2,23	2,83	3,25
A ₁₉	1,26	1,84	2,40	2,85	3,50	4,07
A ₄	0,54	1,12	1,70	2,17	2,90	3,24
E ₆	0,70	1,30	2,14	2,52	3,28	3,75
E ₉	0,60	1,25	1,72	2,30	2,75	3,77
M _J	0,70	1,10	1,62	2,17	2,62	2,91
AL	0,42	0,92	1,45	1,52	2,32	2,55
MT	0,59	1,18	1,93	2,48	3,17	3,83
PE	0,60	1,12	1,50	2,10	2,37	2,90
C	0,87	1,30	1,94	2,44	2,94	3,47
M	0,44	0,80	1,17	1,50	2,01	2,30

FIGURA 1. Crescimento da colônia e produção de esporos do isolado MT do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 2. Crescimento da colônia e produção de esporos do isolado M_J do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 3. Crescimento e produção de esporos do isolado E_6 do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 4. Crescimento e produção de esporos do isolado A_4 do 5º ao 10º dia de desenvolvimento

FIGURA 5. Crescimento e produção de esporos do isolado K do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 6. Crescimento e produção de esporos do isolado A₁₉ do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 7. Crescimento e produção de esporos do isolado M do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 8. Crescimento e produção de esporos do isolado C do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 9. Crescimento e produção de esporos do isolado E_9 do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 10. Crescimento e produção de esporos do isolado AL do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 11. Crescimento e produção de esporos do isolado PE do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 12. Crescimento de colônias de 11 isolados de *Metarhizium anisopliae* do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

4.2. Produção de esporos

4.2.1. Em meio completo

Como citado no item 3.5.1., as microcolônias foram transferidas para frascos individuais como tampa de baquelite. Nessa transferência teve-se o cuidado de não rosquear totalmente as tampas para que ocorresse esporulação. Da mesma maneira que as placas (item 3.4.) as medições foram efetuadas diariamente a partir do 5º dia de desenvolvimento (96 horas a contar da 1ª semeadura) até o 10º dia. Na Tabela 2, figuras 13a, 13b e 13c, podem ser visualizados os resultados obtidos para 11 linhagens de *Metarhizium anisopliae* utilizadas.

Os resultados da análise de variância dos dados apresentados na Tabela 2 estão colocados nos Apêndices de 9 a 16 enquanto que os resultados de uma análise de variância conjunta tanto para o caráter diâmetro das colônias como para produção de esporos (linhagens K, A₁₉, C, E₆; A₄, M e MT) são mostrados nos Apêndices 17 e 18.

O Apêndice 19 mostra o coeficiente de correlação (rs) entre o caráter produção de esporos e diâmetro da colônia de 11 linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

TABELA 2. Produção de esporos ($N \times 10^5/\text{ml}$)/dia em 11 linhagens de *Metarhizium anisopliae* do 5º ao 10º dia de desenvolvimento (MC). Média de 4 a 12 repetições.

Linhagens	Dias					
	5º	6º	7º	8º	9º	10º
K	0,10	1,40	8,03	12,26	106,76	169,33
A ₁₉	1,28	12,05	34,88	34,70	88,72	286,33
A ₄	0,07	18,94	19,25	248,19	574,60	536,60
E ₆	5,73	17,91	52,93	224,66	336,34	932,00
E ₉	0,57	0,50	0,55	28,60	269,00	511,00
M _J	0,00	0,32	8,52	19,90	86,60	92,10
AL	0,00	0,00	0,02	0,66	6,90	1,75
MT	0,00	0,34	16,30	68,40	146,34	420,67
PE	52,50	55,00	31,50	191,00	201,00	330,00
C	0,30	2,36	5,17	24,26	28,30	97,66
M	0,25	0,53	2,82	141,43	533,66	1030,00

FIGURA 13a. Produção de esporos em MC de 5 isolados de *Metarhizium anisopliae* do 5º a 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 13b. Produção de esporos em MC de 4 isolados de *Metarhizium anisopliae* do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

FIGURA 13c. Produção de esporos em MC de 4 isolados de *Metarhizium anisopliae* do 5º ao 10º dia de desenvolvimento.

4.2.2. Produção de esporos em meio de arroz

Com a finalidade de se verificar o efeito do meio na produção de esporos, 6 linhagens de *Metarhizium anisopliae* foram inoculadas em placas de Petri com concentrações crescentes de farinha de arroz (item 3.5.2.). A contagem dos esporos foi efetuada no 10º dia de incubação. Os resultados apresentados na Tabela 3, Figura 14, representam a média de 3 repetições.

O número de esporos foi determinado calculando-se em 1º lugar a superfície das amostras circulares ($\emptyset = 7$) através da fórmula πR^2 , onde:

π = Constante

R = Raio da amostra.

TABELA 3. Produção de esporos ($N \times 10^5$ /cm/ml) das 6 linhagens de *Metarhizium anisopliae* no 10º dia de crescimento em concentrações crescentes de farinha de arroz.

arroz g/l	Linhagens					
	A ₄	C	E ₉	K	M	PE
15	0	0,10	17,70	0	9,70	8,30
30	11,10	8,33	88,40	20,13	159,47	26,37
45	22,87	21,17	258,27	28,43	159,10	230,53
60	59,97	51,36	197,60	43,67	256,20	280,80
75	57,93	40,90	187,90	50,97	141,10	101,10
90	27,03	10,07	230,57	57,56	118,23	172,63

FIGURA 14. Produção de esporos no 10º dia de desenvolvimento de 6 isolados de *Metarhizium anisopliae* em concentrações crescentes de arroz.

4.2.2.1. Comparação da produção de esporos em meio completo e em meio de arroz

Nesta comparação foram utilizados os resultados obtidos no 10º dia de crescimento nas linhagens A_4 , C, E_9 , K, M e PE em meio completo e os obtidos no 10º dia em meio de arroz (60 g/l). Os valores para meio completo foram transformados para $N \times 10^5/\text{cm}^2/\text{ml}$, uma vez que os valores em meio de arroz já estavam nessa unidade.

A Tabela 4 sumariza esses resultados enquanto que a Figura 15 visualiza as diferenças de produção de esporos nos dois meios de cultura.

TABELA 4. Produção de esporos ($N \times 10^5/\text{cm}^2/\text{ml}$) no 10º dia de desenvolvimento em meio completo e meio de arroz (60 g/l) de 6 linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

meio de cultura	Linhagens					
	A_4	C	E_9	K	M	PE
MA	59,97	51,36	197,60	43,67	256,20	280,80
MC	65,12	10,26	45,06	20,30	248,19	50,00

FIGURA 15. Comparação da produção de esporos em meio completo e em meio de arroz (60 g/l) no 109 dia de desenvolvimento de 6 isolados de *Metarhizium anisopliae*.

4.3. Porcentagem de sobrevivência a luz ultravioleta

Suspensão de conídios das linhagens E_6 , E_9 , A_4 , M , M_J E_{9A}^* de *Metarhizium anisopliae* foram irradiadas (UV) conforme descrito no item 3.6. Os resultados dos números e porcentagens relativas dos conídios sobreviventes estão sumarizados na Tabela 5. A Figura 16 mostra a curva de sobrevivência das diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae* após 4 dias de incubação.

TABELA 5. Número de conídios ($N \times 10^5/\text{ml}$) e porcentagem de sobrevivência (UV) de 6 linhagens de *Metarhizium anisopliae*. (Média de 2 repetições).

Linhagens	Tempos				
	t_0	t_1	t_2	t_4	t_8
E_6	4,70 (100%)	4,60 (97,87%)	3,50 (74,46%)	1,40 (29,79%)	0,06 (1,27%)
A_4	6,53 (100%)	3,53 (54,05%)	0,06 (0,96%)	0,02 (0,30%)	0,01 (0,16%)
M_J	3,16 (100%)	1,23 (38,90%)	0,62 (19,62%)	0,05 (1,61%)	0,001 (0,03%)
E_9	7,77 (100%)	7,50 (96,52%)	3,84 (49,42%)	2,33 (29,98%)	0,06 (0,77%)
M	9,76 (100%)	5,93 (60,75%)	1,66 (17,00%)	0,41 (4,20%)	0,05 (0,50%)
E_{9A}^*	4,70 (100%)	4,60 (97,87%)	2,70 (57,44%)	1,60 (34,04%)	0,18 (3,82%)

* setor espontâneo amarelo do isolado E_9 .

FIGURA 16. Curva de colonização à luz UV de 6 isolados de *Metarhizium anisopliae*.

4.4. Obtenção de mutantes

Utilizando-se a luz ultravioleta para obtenção de 5% de sobrevivência para cada linhagem utilizada, obteve-se mutantes auxotróficos das linhagens ensaiadas, numa frequência de cerca de 0,5% para cada linhagem. Mutantes morfológicos incluindo-se aqueles que apresentam alterações na coloração de conídios foram também obtidos para as diferentes linhagens.

Apenas para a linhagem M_J , em cerca de 600 colônias ensaiadas não foram obtidos mutantes; o crescimento da linhagem em MM foi pequeno quando comparado com as outras linhagens da variedade *minor* no mesmo meio, indicando a possível necessidade de uma suplementação no meio de cultura.

Na Tabela 6 estão indicados os mutantes obtidos bem como a simbologia utilizada para caracterizá-los. Somente estão indicados os mutantes estáveis, isto é, aqueles que mostraram não reverter em frequência maior do que 1 em 10^7 conídios.

TABELA 6. Mutantes auxotróficos e morfológicos obtidos a partir de 5 linhagens de *Metarhizium anisopliae*, após irradiação com luz ultravioleta.

Linhagem	Mutação para:	Símbolo
A ₄	biotina	bio
	metionina	met
	conídios amarelos	ylo
	adenina	ade
E ₆	colônia aconidial	aco
	adenina	ade
	conídios amarelos	ylo
	colônia compacta	com
	lisina	lys
RJ	lisina	lys
	conídios vináceos	vin
M	adenina	ade
	lisina	lys
	metionina	met
	ácido nicotínico	nic
	conídios amarelos	ylo
	colônia compacta	com
MJ	(não foram obtidos mutantes)	

4.5. Obtenção de heterocários

4.5.1. Cruzamento pelo ciclo parassexual

A metodologia para obtenção de heterocários entre mutantes da linhagem E_6 (E_6 *vio met bio* x E_6 *ylo ade lys* e E_6 *ylo pir lys* x RJ *ylo ade lys*) foi realizada segundo item 3.9.2. (MESSIAS e AZEVEDO, 1980; SILVEIRA, 1983).

As películas obtidas entre mutantes da mesma linhagem (E_6) em MM + 4% MC, quando transferidas para placas contendo somente MM cresceram vigorosamente, o mesmo não ocorrendo no cruzamento de E_6 x RJ. Nesse caso, houve apenas formação de uma película incipiente que, quando transferida para placas com MM não apresentou desenvolvimento.

4.5.2. Fusão de protoplastos

A metodologia utilizada para obtenção de produtos de fusão entre o mutante auxotrófico e morfológico E_6 *ylo pir lys* e a linhagem selvagem MT, foi realizado segundo o item 3.8.2. Suspensão de conídios obtidos (item 3.9.1.) e semeados em MM, produziram pequenas colônias, indicando prováveis produtos de fusão. Estas foram transferidas para placa com MM e MC e desenvolveram-se ou não no MM em colô-

nias heterocarióticas. De um total de $5,85 \times 10^7$ protoplas-
tos semeados (em MC e MM) resultaram $3,3 \times 10^4$ colônias em
MM, o que dá uma frequência de fusão da ordem de 0,00041.

Suspensões de conídios a partir de colônias
heterocarióticas (10^5 conídios/ml) escolhidas ao acaso e de-
signadas por I, II, III, IV, V, VI e VII foram semeados em
MM e MC e os resultados obtidos encontram-se relacionados na
Tabela 7.

Tabela 7. Número de colônias em MM e MC resultantes da fu-
são entre as linhagens E_6 *ylo pir lys* x MT.

Suspensão de conídios das colônias	MM	MC
I	$4,02 \times 10^6$	$2,60 \times 10^6$
II	$8,05 \times 10^6$	$8,95 \times 10^6$
III	$4,28 \times 10^6$	$5,10 \times 10^6$
IV	$6,80 \times 10^6$	$5,88 \times 10^6$
V	$3,27 \times 10^6$	$3,40 \times 10^6$
VI	$3,30 \times 10^6$	$5,02 \times 10^6$
VII	$2,90 \times 10^7$	$6,40 \times 10^7$

Após esse procedimento, realizou-se a medida do volume dos conídios originados dessas colônias (resultantes da fusão) e das linhagens parentais, cujos valores encontram-se relacionados na Tabela 8. O volume foi calculado considerando-se a forma dos conídios como elipsóide através da fórmula:

$$\frac{3}{4} \pi (a^2 \times c)$$

onde

π = constante; a = raio (diâmetro menor) e

c = raio (diâmetro maior)

TABELA 8. Comprimento e largura de conídios de 7 colônias (resultantes da fusão de protoplastos) e das duas linhagens parentais (MT e *E₆ ylo pir lys*).

Conídios das colônias	Medida dos conídios (μ)		
	comprimento	largura	volume μ^3
I	4,44	1,74	18,15
II	5,15	1,74	21,05
III	5,34	2,85	35,76
IV	3,27	1,51	11,60
V	4,62	1,36	14,76
VI	4,64	1,32	14,93
VII	5,05	1,79	21,24
MT	4,68	1,32	14,51
<i>E₆ ylo pir lys</i>	4,85	1,51	17,21

5. DISCUSSÃO

5.1. Taxa de crescimento e produção de esporos em meio completo

Como se verifica pela Tabela 1 e Figuras de 1 a 12, a taxa de crescimento em meio completo das diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae* foi muito variada.

Em geral, linhagens que apresentavam menor diâmetro no início (M e A₁ no 5º dia), continuaram sendo as menores no 10º dia de desenvolvimento, enquanto que a linhagem A₁₉ que alcançou maior diâmetro no 5º dia continuou sendo a maior também no 10º dia. Entretanto, nota-se que as linhagens K, C, PE e M₇ não seguiram esse padrão, pois apesar de apresentarem um certo crescimento no 5º dia, foram superadas pelas linhagens E₉ e MT ao atingirem o 10º dia. A variação encontrada entre experimento para a mesma linhagem (Apêndices 1 a 19) pode ser explicada pela instabilidade da mesma. Como

cada experimento foi feito com colônias distintas da mesma linhagem, uma variação maior, encontrada para certas linhagens pode refletir também uma maior instabilidade da mesma.

Verifica-se portanto, que na maioria dos casos é possível fazer-se uma seleção entre as linhagens, que apresentam crescimento mais rápido já no 5º dia de desenvolvimento ou talvez até antes com sensíveis economia de tempo no processo de seleção.

Uma vez que já é possível o cruzamento dentro de linhagens (MESSIAS, 1979) e mesmo entre linhagens, através da fusão de protoplastos (SILVEIRA, 1983), um estudo posterior a ser feito, seria o cruzamento da linhagem A₁₉ (maior crescimento) com AL e M (menor crescimento). Isso nos possibilitaria o conhecimento da natureza genética da variação de tamanho e quantos genes estão envolvidos.

Comparando-se a Tabela 1 com a Tabela 2 e Figuras 13a, b e c, verifica-se que a produção de esporos em termos cumulativos variou bastante entre as linhagens. Apesar de não ter sido feita uma análise entre linhagens, existe uma correlação dentro da mesma linhagem, no que se refere ao diâmetro da colônia e produção de esporos (Apêndice 19). Evidentemente quanto maior o diâmetro da colônia, maior é a produção de esporos dentro da mesma linhagem. Nota-se contudo que, entre linhagens algumas delas apresentam um me-

nor diâmetro em relação as outras mas possui boa produção de esporos, como é o caso da linhagem M (Tabelas 1 e 2). Também, nem sempre uma linhagem que apresenta boa produção no início do crescimento será a melhor no final. Assim, por exemplo, nota-se que a linhagem PE, colocada em primeiro lugar em termos de produção no 5º dia de desenvolvimento, foi a 6ª classificada ao final, enquanto que a linhagem M, melhor produtora, até o 8º dia, foi superada por outras linhagens menos produtivas.

Esses dados são importantes do ponto de vista do melhoramento, pois sendo a linhagem E₉ mais virulenta de todas (MESSIAS, não publicado), através do cruzamento com a linhagem M (mais produtiva) poderíamos obter o dobro de esporos que apresentam ao mesmo tempo, maior virulência.

Outro fato evidente, é que, em geral, as linhagens apresentam um pico de produção ao redor do 7º e 8º dia (Figuras 1-7 e 11). Uma possível explicação para esse fato, poderia estar relacionada a uma diminuição de nutrientes do meio (parcialmente consumidos) o que criaria condições adversas ao crescimento propiciando melhor esporulação. Na Figura 7 ainda, nota-se o comportamento peculiar da linhagem M: inicialmente apresenta um desenvolvimento micelial, seguido de um aumento da esporulação (7º e 8º dia) de 50 vezes.

Estudos posteriores sobre mecanismos indutores de esporulação evidentemente, trariam enormes vantagens

econômicas, pois o tempo necessário para a produção de esporos em larga escala, poderia ser reduzido.

AZEVEDO e MESSIAS (1980) estudaram diversos isolados de *Metarhizium anisopliae* quanto ao tamanho dos conídios e sugeriram que conídios de isolados como E_9 e M apresentam os menores volumes enquanto A_4 e AL apresentam em média, conídios maiores; sugerem também que os isolados A_4 e AL sejam mais frequentemente binucleados ou então, que esses conídios apresentam maior quantidade de material genético.

Pela observação da Tabela 2 pode-se verificar que os isolados M, E_6 , A_4 e E_9 foram os que produziram maior número de conídios por ml quando comparados com as linhagens M_J e AL, últimas classificadas. Nesse caso pode ser sugerido que a produção de conídios, esteja relacionada com o tamanho dos mesmos e que linhagens com conídios menores, produziram mais que as linhagens de conídios maiores. Outra explicação também poderia ser que, essas linhagens M e AL pelo fato de apresentarem maior quantidade de material genético sejam instáveis, e que esta instabilidade leve a uma queda na produção de esporos, fato esse marcante na linhagem AL. Casos de instabilidade devido a material genético em excesso em organismos superiores e em microrganismos particularmente em fungos já foram descritos na literatura (BAINBRIDGE e ROPER, 1966; NGA e ROPER, 1969 e AZEVEDO e ROPER, 1970).

Contudo, há necessidade de uma análise genética dos setores isolados, originados de linhagens instáveis, na tentativa de se estabelecer as causas da instabilidade e os genes envolvidos. Mesmo na linhagem A₄, 3^a classificada quanto a produção de esporos no 10º dia, verificou-se uma queda na produção entre o 9º e 10º dia (Tabela 2). Essa queda, coincidentemente ocorreu com o aparecimento nas colônias de setores esbranquiçados no 10º dia de desenvolvimento.

Portanto, este é um dado importante a ser considerado antes de uma possível utilização desse fungo no controle biológico.

5.2. Produção de esporos em meio de arroz

A superioridade do meio de arroz em relação ao de batata-dextrose e o de amido, na frutificação e desenvolvimento do fungo, já foram comprovados por MARQUES e VILLAS BOAS (1973), AQUINO (1974), enquanto que MOURA COSTA e MAGALHÃES (1974) e VILLACORTA (1977), utilizaram esse meio de cultivo para o *Metarhizium anisopliae*, com sucesso.

Entretanto, como se observa na Tabela 3, existe uma concentração ótima de arroz para cada linhagem, que é em geral, ao redor de 60 g/l. Em termos de produção relativa o número de esporos formados por cm² no 10º dia foi

maior nas linhagens PE, M, E₉ e C.

Estes resultados sugerem que meios muito ricos e muito pobre diminuem a produção de esporos enquanto que meios intermediários promovem um aumento de produção. Essa diferença é evidenciada na Tabela 4 e Figura 15 onde é feita uma comparação quanto a quantidade de esporos produzidas no 10º dia em meio completo e meio de arroz (60 g/l). Nota-se que as linhagens ensaiadas aumentaram de 1 a 5 vezes a esporulação em meio de arroz. Observa-se também que nesta concentração de arroz, a linhagem PE foi a mais produtiva, enquanto que a A₄ mostrou uma queda na produção, quando comparada ao MC.

Torna-se evidente na Figura 15 que meio muito rico (MC) não favoreceu a produtividade das linhagens (exceção da A₄) enquanto que o meio de arroz numa concentração média de 60 g/l, propiciou a esporulação, da maioria delas.

Entretanto, para a produção em massa de esporos do *Metarhizium anisopliae* visando aplicações em larga escala, outros substratos poderão ser estudados visando principalmente redução do preço da produção de esporos.

BASTOS *et alii* (1976) utilizaram farinha de milho, farinha de arroz, de trigo, e mistura desses amiláceos e verificaram que a esporulação foi sempre melhor nos meios em que a farinha de trigo entrou na composição. Dessa

maneira, uma sugestão seria em se introduzir farinha de trigo juntamente com a concentração ideal de arroz na produção de esporos, principalmente das linhagens mais virulentas, com a finalidade de estimular ainda mais a produção de esporos e conseqüentemente o uso desse fungos no controle biológico.

5.3. Sobrevivência a luz ultra violeta

Utilizando-se de luz ultra-violeta foi possível a construção da curva de sobrevivência de 6 linhagens de *Metarhizium anisopliae* (Tabela 5, Figura 16) evidenciando-se uma correlação entre a dose e o efeito produzido.

A dose capaz de inviabilizar 95% dos conídios foi obtida com um tempo de exposição a ultravioleta que foi de 1,95 minutos para a linhagem A_4 ; 3,60 a 3,80 para M_J e M respectivamente e entre 7,35 a 7,80 minutos para as linhagens E_9 , E_6 e E_{9A} . No entanto, este tempo está relacionado com a fonte de irradiação. SANTOS (1978) obteve uma sobrevivência de 1 a 5% em um tempo igual a 2,40 minutos e MESSIAS (1979) obteve com 13 minutos, utilizando outra fonte de ultra violeta.

Dados de irradiação com luz ultra violeta em *Aspergillus nidulans* são extremamente frequentes na literatura (PIZZIRANI, 1977). Contudo os resultados indicam que es-

se mutagênico é bastante efetivo para causar letalidade em conídios de *Metarhizium anisopliae* apesar da coloração verde clara dos mesmos (OKINO *et alii*, 1978; AZEVEDO *et alii*, 1981). Por outro lado, observa-se na Tabela 5 que o isolado mais resistente foi E_{9A}^* que produz conídios amarelos (setor espontâneo de E_9). Este fato é de grande importância, uma vez que, os conídios dessa linhagem serão mais resistentes a luz solar. Como se sabe, entre os vários fatores que podem prejudicar a eficiência dos fungos entomopatogênicos no que se refere a produção de esporos, está a luz solar (MADELIN, 1968). Entretanto, a luz solar possivelmente o espectro ultra violeta, conhecido como "matador de esporos") é negligenciado (Muller-Kogler, 1967, citado por FERRON, 1978), podendo inclusive ser um dos fatores responsáveis pelo fracasso de possíveis tentativas de controle. Dessa maneira, torna-se evidente a vantagem desse isolado sobre as demais. Através de cruzamentos, poderia se transferir os genes de resistência para outras linhagens mais virulentas, atualmente aplicadas em extensas áreas (Nordeste principalmente) onde a radiação solar é maior.

5.4. Obtenção de mutantes

Irradiando-se conídios das linhagens A_4 , E_6 , M , M_J RJ de *Metarhizium anisopliae* var. *minor*, com luz

ultravioleta obtiveram-se mutantes morfológicos e auxotróficos. Os morfológicos obtidos apresentam-se bastante estáveis. Foram conseguidos também mutantes nutricionais para síntese de aminoácidos e vitaminas (Tabela 6).

Nos ensaios de reversão realizados verificou-se que as marcas envolvidas no estudo apresentavam-se bastante estáveis, isto é, não reverteram em frequência maior do que 1 em 10^7 conídios.

A luz ultra violeta foi eficiente na obtenção de mutantes auxotróficos, e a frequência com este, foi de 0,5%, o que dá maior rendimento quando comparado com MESSIAS (1979) obtidos com *Metarhizium anisopliae*. A mesma porcentagem foi obtida em *Aspergillus nidulans* por PONTECORVO *et alii* (1953). Sugere-se então, que sejam estudados outros mutagênicos, tanto físicos como químicos, os quais poderiam apresentar melhores rendimentos. SANTOS (1978) verificou que radiação ionizante como os raios γ , são efetivos em causar morte a conídios de uma linhagem de *Metarhizium anisopliae*, e que poderia ser empregado para obtenção de mutantes.

O estabelecimento de uma técnica de enriquecimento por filtração e obtenção de mutantes (FRIES, 1947; SILVEIRA, 1983), permitiu que houvesse um aumento no número de mutantes auxotróficos obtidos de 0,01% (MESSIAS, 1979) para 2,34% a 6,13% ou seja, um aumento máximo de 613 vezes. Dessa maneira, grande número de duplos auxotróficos poderão ser

obtidos, o que torna estudos de análise genética mais seguros devido ao número de marcas envolvidas com consequente diminuição da frequência de reversão.

No entanto, outros tipos de mutantes poderão ser procurados, como aqueles resistentes a luz ultra violeta, e drogas e para produção de enzimas em trabalhos futuros, o que poderá permitir, agora com o ciclo parassexual ou mesmo fusão de protoplastos, melhores estudos relacionados com a patogenicidade aos insetos, ou estudos de genética formal em microrganismos.

5.5. Obtenção de heterocários

5.5.1. Cruzamento pelo ciclo parassexual

Os heterocários produzidos através da metodologia clássica entre mutantes da linhagem E_6 , mostraram complementação, com consequente formação de película, demonstrando que as marcas utilizadas são recessivas. O fenômeno da heterocariose é básico, para a ocorrência do ciclo parassexual e a complementação entre as marcas envolvidas é sempre muito importante para a manutenção destes; uma fraca complementação pode levar a um não desenvolvimento em MM o que dificultaria a formação do diplóide. TINLINE e NOVIELLO (1971) trabalhando com uma linhagem de *Metarhizium aniso-*

pliae, empregando a mesma técnica do presente trabalho, não conseguiram o desenvolvimento de alguns heterocários devido a baixa complementação entre as marcas utilizadas. Os dados do cruzamento entre mutantes complementares da linhagem E_6 de *Metarhizium anisopliae*, confirmam portanto, os obtidos por MESSIAS (1979); MESSIAS e AZEVEDO (1980) e SILVEIRA (1983), que também obtiveram com facilidade heterocários entre essas linhagens.

Da mesma maneira que verificado por SILVEIRA (1983), não foi possível obter heterocários entre linhagens distintas, no caso, E_6 e RJ. A grande dificuldade de obtenção de películas de heterocários entre essas linhagens pode ser explicada pelo alto grau de divergência existente entre as mesmas. Estas divergências podem ser refletidas no padrão eletroforético de esterases (DE CONTI *et alii*, 1980 e SILVEIRA, 1983), diferença no número de protoplastos frente a um mesmo complexo lítico e tamanho dos conídios (SILVEIRA, 1983).

Como demonstrado pelo mesmo autor citado anteriormente, a incompatibilidade entre linhagens de *Metarhizium anisopliae* foi rompida pela produção de protoplastos dessas linhagens e posterior fusão. Nesse caso, heterocários e segregantes de diversos tipos foram obtidos, indicando que a incompatibilidade deve ser devida às diferentes constituições das paredes celulares das duas linhagens. Foi

em virtude dessa observação, que no presente trabalho foi tentado também, cruzamentos entre diferentes linhagens, através da fusão de protoplastos.

Entretanto, isolamento de mutantes morfológicos e auxotróficos além de requerer trabalhos adicionais (Ítem 3.7.) pode alterar características importantes das linhagens, devido ao uso contínuo de agentes mutagênicos. Dessa maneira, foi tentado a técnica do "doador morto", que elimina em uma das linhagens, os passos necessários à obtenção de mutantes, evitando assim, o emprego de várias radiações, no caso do agente mutagênico utilizado ser a luz ultravioleta.

5.5.2. Fusão de protoplastos

Após a fusão de protoplastos entre uma linhagem selvagem (MT) morta por luz ultravioleta com a linhagem mutante *E₆ ylo pir lys*, houve formação de colônias em MM.

Esses possíveis produtos de fusão foram novamente transferidos a MM e continuaram a apresentar crescimento. A frequência de produtos de fusão foi de $41,0 \times 10^{-5}$, valor esse semelhante ou maior que o encontrado por SILVEIRA (1983), quando analisou fusões obtidas entre diferentes linhagens.

Sete produtos de fusão foram analisados quanto a capacidade de seus conídios crescerem em MM e MC (Tabela 7).

Os resultados indicam que todos conídios capazes de crescer em meio completo, são capazes de crescer em meio mínimo.

Uma das hipóteses aventadas é que essas colônias (originadas das que cresceram em MMKCl), poderiam ter-se desenvolvido devido à lise de protoplastos na solução de fusão, com consequente liberação de nutrientes, suficientes para um pequeno crescimento. Entretanto, como podem continuar a crescer em MM (Tabela 7), esta hipótese pode ser descartada.

Uma outra possibilidade é a ocorrência de fusão de protoplastos entre as duas linhagens resultando em heterocários ou diplóides. Também pode ser aventada a hipótese de que diplóides tenham sido produzidos e devido a sua alta instabilidade resultaram segregantes haplóides capazes de crescer em meio mínimo.

Resultados semelhantes que mostram a obtenção de segregantes a partir de diplóides instáveis foram observados em *Cephalosporium acremonium* (BALL e HAMLYN, 1982) onde os autores, após fusão de protoplastos não obtiveram evidências para a formação de diplóides estáveis. Entretanto, recombinantes presumivelmente haplóides, foram recuperados em

uma variedade de meios seletivos de regeneração. A mesma observação foi feita em *Aspergillus niger* por BONATELLI *et alii* (1983) ao obterem recombinantes, sem a formação de diplóides. Esse fenômeno que parece ter frequência generalizada, foi designado de parameiose por BONATELLI *et alii* (1983). Em *Metarhizium anisopliae*, pelo cruzamento de linhagens distintas por fusão de protoplastos esses segregantes foram também obtidos. Para se distinguir entre a formação de um heterocário e de uma diplóide ou segregante selvagem, conídios dessas colônias foram semeados em MM e MC e produziram praticamente o mesmo número de colônias em ambos (Tabela 7). Logo, a hipótese dessas colônias serem heterocários pode ser descartada.

Das sete colônias analisadas (produto de fusão) uma produziu conídios com praticamente o dobro do volume, quando comparada com as demais colônias e também com as linhagens parentais.

Quanto a colônia que apresentou conídios maiores, sugere-se que estes sejam diplóides (colônia III, Tabela 8). Entretanto essa distinção entre haplóide e diplóides não deve ser baseada apenas através de medidas de volume. Também o conteúdo de DNA por núcleo (HEAGY e ROPER, 1952), mutabilidade e volume nuclear deve ser utilizada, uma vez que o diplóide pode apresentar o volume igual ao dobro da haploide (*Aspergillus nidulans*, ROPER, 1952) e outras vezes

não (*Ustiligo maydis*, HOLLIDAY, 1961; *Cochiliobus sativus*, TINLINE, 1962; *Aspergillus flavus*, MESSIAS, 1977 e *Aspergillus* sp 321, PEREIRA, 1978).

Por outro lado, comparando-se o volume dos conídios do possível diplóide (colônia III, Tabela 8) com a linhagem parental selvagem, verifica-se que este apresenta o dobro do volume das linhagens parentais. Isto afasta portanto, a hipótese da sobrevivência da linhagem parental (MT) à irradiação U.V., o que aliás, já havia sido verificado através de um controle onde a linhagem MT irradiada não produziu colônias.

Também verifica-se na Tabela 8, que algumas colônias produziram conídios com volume maior que as parentais (colônias II e VII) porém, menor que o possível diplóide. Uma possibilidade para explicar a ocorrência desses conídios é sugerida: durante a fusão de protoplastos, núcleo da linhagem parental MT, foi transferido para protoplasto anucleado da linhagem *E₆ ylo pyr lys*, originando recombinantes viáveis com conídios maiores. As outras 4 colônias analisadas (I, IV, V e VI) poderiam ser originadas de segregantes haplóides prototróficos.

Uma confirmação da ocorrência de conídios um pouco maiores que o das linhagens parentais seria tratar protoplastos provenientes desses conídios de volumes atípicos com ultravioleta e promover sua fusão pela técnica do "doador

morto" com a linhagem MT, carregando marcas de auxotrofia. Se, dessa fusão resultarem prototróficos de mesmo volume que a linhagem MT, esta seria uma forte indicação da validade dessa hipótese.

Finalmente, essa técnica de fusão de protoplastos e posterior fusão de núcleos abreviando e facilitando o ciclo parassexual, abre possibilidades para o estudo genético em fungos cuja fusão de hifas é difícil ou mesmo impossível por problemas de incompatibilidade. Essa técnica permite principalmente que cruzamentos interspecíficos possam ser feitos não só com a finalidade de se aquilatar melhor, diferenças taxonômicas entre espécies, como também combinar qualidades favoráveis de diferentes fungos em um só, com vistas ao melhoramento genético em fungos de importância industrial.

Poder-se-ia obter por exemplo, um recombinante do fungo *Metarhizium anisopliae* a partir da linhagem M (maior produtora de esporos) com a linhagem E₉ (mais virulenta; MESSIAS, não publicado). Recombinantes como este e outros obtidos de maneira semelhante poderiam portanto, combinar qualidades favoráveis de duas linhagens constituindo-se em excelentes materiais a serem usados no controle biológico.

6. CONCLUSÕES

a. Existe grande variabilidade entre as linhagens quanto ao crescimento e produção de esporos. Essa variabilidade é importante no melhoramento da espécie para estas importantes características.

b. Dentro da linhagem há correlação entre a taxa de crescimento e produção de esporos.

c. Existe em geral, um pico de produção de esporos entre o 7º e 8º dia de desenvolvimento.

d. Para cada linhagem existe uma concentração ótima de arroz para produção de esporos, estando ao redor de 60 g/l. Meios muito ricos ou pobres condicionam uma produção de esporos menor que em meios intermediários.

e. Entre as linhagens estudadas os heterocá -
rios não foram produzidos porém, foram conseguidos em isolados
de uma mesma linhagem; entretanto, por fusão de protoplastos
obtiveram-se heterocários entre linhagens diferentes.

f. A técnica do "doador morto" provou ser efe
tiva para obtenção de diplóides e segregantes entre linha
gens distintas.

7. LITERATURA CITADA

- AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Genetic and Cytology* 22 : 309-314.
- ALVES, S.B., 1983. Caracterização, padronização e produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico* 4:22-23. (Resumo de Tese).
- ALVES, S.B., R.L.O. REGITANO e J.L.G. CAMARGO, 1980a. Avaliação da influência de alguns herbicidas utilizados em cana-de-açúcar e pastagens sobre o fungo *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) Sorokin, 1883. *Ecossistema, Espírito Santo do Pinhal*, 5: 22-24.

- ALVES, S.B.; S.M. CARVALHO e A.O.R. CARVALHO, 1980b. Avaliação da toxidade de alguns inseticidas sobre o *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, 55 : 133-138.
- ANNÉ, J. e J.F. PEBERDY, 1975. Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. *Archives of Microbiology*, 105: 201-205.
- AQUINO, M.L.N., 1974. O fungo entomógeno - *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. *Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas*, 72 : 1-26. Recife.
- AQUINO, M.L.N.; V.A.L.B. CAVALCANTI; R.C. SENA e G.F. QUEIROZ, 1975. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*. *Boletim Técnico da CODECAP* 4: 1-31.
- AQUINO, M.L.N.; E.A. VITAL; V.L.B. CAVALCANTI e M.G. NASCIMENTO, 1977. Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin em sacos de polipropileno. *Boletim Técnico da CODECAP*, 5: 7-11.
- AZEVEDO, J.L., 1979. Novos sistemas de recombinação em microrganismos. 1º Simpósio de Enologia e Viticultura. Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. 1: 6-18.

AZEVEDO, J.L., 1981. Fusão de protoplastos na produção de híbridos intra e interespecíficos em fungos. *Anais do Simpósio Internacional de Engenharia Genética*, Piracicaba p. 55-56.

AZEVEDO, J.L. e J.A. ROPER, 1970. Mitotic non conformity in *Aspergillus*: successive and transposable genetic changes. *Genetical Research* (Cambridge) 16: 79-93.

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

AZEVEDO, J.L.; A. OLIVEIRA e A.J. ROCHA CAMPOS, 1976. Replícadador múltiplo para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytopathologica*, 2: 237-241.

AZEVEDO, J.L.; C.L. MESSIAS e W.D. SILVEIRA, 1983. Genética e melhoramento do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*: parassexualidade e fusão de protoplasto. ^{1^{rst}}. Symposium on Genetic Engineering. Piracicaba (no prelo).

AZEVEDO, J.L.; N.M. CHACEL e P. TIMO, 1981. Resistência à luz ultravioleta e mutantes de *Metarhizium anisopliae*. Resumos da VII Reunião de Genética de Microrganismos, p. 1.

BAINBRIDGE, B.W. e J.A. ROPER, 1966. Observations on the effects of a chromosome duplication in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 42: 417-424.

- BALL, C. e P.F. HAMLYN, 1982. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic *Cephalosporium* C. *Revista Brasileira de Genética* V : 1-13.
- BALFOUR-BROWE, F.L., 1960. The green muscardine diseases of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in eritrea. *Proceedings of Royal Entomological Society of London*. Ser. A., 35: 65-74.
- BARNETT, H.L., 1960. Illustrated genera of imperfecti fungi. Minneapolis Burgess Publishing Company, 225 p.
- BARON, G., 1968. The genera of Hyphomycetes from soil. Baltimore, *The Willians & Wilkins Company*, 686 p.
- BASTOS, C.N., 1976. Metodologia para produção e acondicionamento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., em larga escala. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, 15(1): 1-4.
- BASTOS, C.N. e E.A.F. MATTA, 1976. Influência das temperaturas e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, 15(1): 5-8.

- BASTOS, C.N.; E.A.F. MATTA e J.M. FIGUEIREDO, 1976a. Esporulação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., em meios de cultura de diferentes composições. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*. 15 : 9-11.
- BASTOS, C.N.; J.M. de FIGUEIREDO e E.A.F. da MATTA, 1976b. Utilização do Método Castellani para conservação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, 15 : 12-13.
- BELL, J.V. e R.J. HAMALLE, 1974. Viability and pathogenicity of entomogenous fungi after prolonged storage on silica gel at - 20°C. *Canadian Journal of Microbiology*, 20: 639-642.
- BICHUK, Yu. P., 1962. Effect of the conditions of the soil medium on the development of muscardine fungi infecting the sugar beet weevil. *All-Union Sugar Beet Science Research Institute*. 308 p.
- BONATELLI, Jr.R.; J.L. AZEVEDO e J.V. VALENTE, 1983. Parasexuality in citric acid-production strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética* 6: 399-405.
- CARRAU, J.L.; J.L. AZEVEDO; P. SUDBERY e D. CAMPBELL, 1982. Methods for recovering fusion products among oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Revista Brasileira de Genética*. 5 : 221-226.

- CHACEL, N.M.; E.W. KITAJINA e J.L. AZEVEDO, 1982. Ultra estrutura de protoplastos de *Metarhizium anisopliae*. *Boletim do grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, 3: 11.
- CLERK, G.C. e M.F. MADELIN, 1965. The longevity of three insect parasitizing hyphomycetes. *Transactions Britisth Mycological Society*, 48: 193-209.
- CORREIA, G.S., 1983. Influência da radiação ultravioleta na germinação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin no solo. Piracicaba, ESALQ/USP, 84 p. (Dissertação de Mestrado).
- De CONTI, E.; C.L. MESSIAS, H.M.L. de SOUZA e J.L. AZEVEDO, 1980. Eletrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-types strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia*, 36 : 293-294.
- DIAMONDÉ, T., 1969. Contribution to the study of the development of the green muscardine fungus *Metarhizium anisopliae* on *O. monoceros* larvae. *Bulletin of Institute Fondam Afrique Noire, Sér. A*, 31: 1381-1405.
- FARGUES, J.; T. DURIEZ, J. ANDRIEU; E. POPEYE e P. ROBERT, 1975. Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (DELACK) sien champignon hyphomicete entomopathogène. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academic des Sciences, Ser. D.*, 281: 1781-1784.

- FERRON, P., 1967. Etude en laboratoire des conditions écologiques favorisant le developpement de la mycose à *Beauveria tenella* du ver blanc. *Entomophaga*, 12: 257-293.
- FERRON, P., 1978. Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23:409-442.
- FERENCZY, 1981. Microbial Protoplast Fusion. In "genetics as a tool in Microbiology" (Glover Hopwood, Eds.) p. 1-35.
- FRIEDERICH, K., 1930. Die grundfragen and gesetzmassigkeiten der Land - und fortwirtschaftlichen. Zoologie, Berlin 463 p. Apud: Tulloch, M., 1978. The genus *Metarhizium*. *Transaction of the British Mycological Society*, 66: 407-411.
- FRIES, N., 1947. Experiments with different methods of isolating physiological mutations of filamentous fungi. *Nature*, 159: 199.
- GOMES, O.C.R., 1982. Resistência a metais pesados e defensivos agrícolas em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 89 p. (Dissertação de Mestrado).

- GUAGLIUMI, P.; E.J. MARQUES e A.M. VILAS BOAS, 1974. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin no controle da "cigarrinha-da-folha" *Mahanarva posticata* (Stal) no nordeste do Brasil (1). *Boletim Técnico da CODECAP*, 3: 11-53.
- HAMMIL, T.M., 1972. Electron microscopy of phialoconidiogenesis in *Metarhizium anisopliae*. *American Journal of Botanic*, 59: 317-326.
- HEAGY, F.C. e J.A. ROPER, 1952. Deoxyribosenucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. *Nature*, 170:713.
- HOLLIDAY, R., 1961. Induced mitotic crossing over in *Ustilago maydis*. *Genetical Research*, 2: 231-249.
- HOPWOOD, D.A. e H.M. WRIGHT, 1978. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular and General Genetics*, 162: 307-317.
- HOPWOOD, D.A. e H.M. Wright, 1979. Factors affecting recombinant frequency in protoplast fusion of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology*, 111: 137-143.

- HOPWOOD, D.A. e H.M. WRIGHT, 1981. Protoplast fusion in *Streptomyces*: Fusions involving ultraviolet-irradiated protoplasts. *Journal of General Microbiology*, 126: 21-27.
- HUBER, J., 1958. Untersuchungen zur physiologic insektentender pilze. *Archiv fur Mikrobiologie*, 29_ 257-276.
- Apud: MADELIN, M.F., 1968. Fungal parasites of invertebrates. I. Entomogenous fungi. In: The fungi. AINSWORTH, G.C. e A.S. SUSSMAN, Eds., 3: 227-238. New York, Academic Press.
- JOHNSTON, J.R., 1915, The entomogenous fungi of Porto Rico. *Puerto Rico Board of Commissioners of Agriculture Bulletin*, 10: 1-33.
- KAMAT, M.M.; M.K. PATEL e G.W. DHANDE, 1952. Ocurrance of the green muscardine fungus on *Pyrilla* species in Bombay. *Current Science*, 21: 317. Apud TULLOCH, M., 1976. The genus *Metarhizium anisopliae*. *Transactions British Mycological Society*. 66: 407-411.
- KENDRIK, W.B., 1971. Taxonomy of fung imperfecti. *University of Toronto Press*. 390 p.
- KUCERA, M., 1980. Proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 35: 304-310.

- KUCERA. M., 1981. The production of toxic protease bu the Entomopathogenous Fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38: 33-38.
- LATCH, G.C.M., 1965. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabilitating insets. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8 : 384-396.
- LIHNELL, D., 1944. Gronmykos Fororsakeo an *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. II. Fisiologiska Undersokningar over gronmykosens svamps. Stat. Vaxtskyodsant. *Stockolm meddel*, 43: 59-90.
- LUGLI, J. e C.L. MESSIAS, 1982. Parassexualidade em diferentes linhagens de *Metarhizium anisopliae*. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, 3: 15-16.
- LUNA, E.A. e J.L. AZEVEDO, 1983. Técnicas para coloração nuclear em estruturas vegetativas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, 4: 20-21.
- MADELIN, M.F., 1968. Fungal parasites of invertebrates. I. Entomogenous fungi. In: The fungi. AINSWORTH, G.C. e SUSSMAN, A.S. Eds. 3: 227-238. New York, Academic Press.

- MARCHIONATO, J.B., 1942. Nota sobre la muscardina verde [*Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin]. *Revista Chilena de História Natural*, 1942-1943: 12-4.
- MARQUES, E.J. e A.M. VILAS BOAS, 1973. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata* Stal) no nordeste do Brasil. *Anais da 1.^a Reunião Anual da Sociedade Entomológica do Brasil*, Viçosa, MG p.70.
- MASERA, E., 1957. *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, a parasita del baco da seta. *Annali della Sperimentazione Agraria*, 11: 281-295.
- MATAMI, B.A. e J.L. LIBBY, 1975. Scanning electron microscopy of *Entomophthora virulenta* and *Conidiobolus coronatus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 26: 165-170.
- MATOS, A.J.A., 1983. Crescimento, germinação, conidiação e resistência à luz ultravioleta, em linhagens de *Metarhizium anisopliae*. *Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*. 4: 24 (Resumo de Tese).
- MESSIAS, C.L., 1977. Parassexualidade e produção de aflatoxina em *Aspergillus flavus*, Link. Piracicaba, ESALQ/USP, 75 p. (Tese de mestrado).
- MESSIAS, C.L., 1979. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 73 p. (Tese de doutoramento).

- MESSIAS, C.L. e J.L. AZEVEDO, 1980. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. *Transactions of British Mycological Society*, 75: 473-477.
- MESSIAS, C.L.; J.L. AZEVEDO; E. de CONTI e H.M.L. de SOUZA, 1978. Aspectos biológicos e indução de mutantes de *Metarhizium anisopliae*. Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia, p. 69.
- MOURA COSTA, M.D. e C.D. MAGALHÃES, 1974. Um novo meio de cultura para o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok, parasito da "cigarrinha" das pastagens. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, 13 : 57-60.
- MOURA COSTA, M.D.; E.A.F. da MATA; C.D. MAGALHÃES e D.P. de MATOS, 1974. Nova técnica para produção em larga escala do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin em laboratório. *Boletim do Instituto Biológico da Bahia*, 13 : 85-89.
- NEWMAN, G.C. e G.R. CARNER, 1975. Environmental factors affecting conidial sporulation and germination of *Entomophthora gammae*. *Environmental Entomology*, 4: 615-618.
- NGA, B.H. e J.A. ROPER, 1969. A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genetical Research* (Cambridge), 14:63-70.

- OKINO, L.A.; J.C. SILVA; A.L.L. SANTOS; C.L. MESSIAS e J.L. AZEVEDO, 1978. Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. *Cesolo*, 70 : 32-36.
- PEBERDY, J.F., 1971. Protoplasts from *Mortierella vinacea*. *Transactions of the British Mycological Society*, 56: 67-72.
- PEBERDY, J.F., 1979. Fungal protoplast: isolation, reversion and fusion. *Annual Review of Microbiology*, 33: 21-39.
- PEREIRA, J.O., 1978. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, ESALQ/USP. 108 p. (Tese de mestrado).
- PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transactions British Mycological Society*, 16: 55-75.
- PIZZIRANI, A., 1977. Características, propriedades e estabilização de dissômicos em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 111 p. (Tese de mestrado).
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMMONDS; K.D. Mc DONALD e A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5: 141-238.

- RATAULT, C. e A. VEY, 1977. Production d'estereases et de N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase dans le tégument du coléoptère oryctes rhinoceros par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Entomophaga*, 22 : 289-294.
- ROPER, J.A., 1952. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8: 14-15.
- ROSATO, Y.B.; C.L. MESSIAS e J.L. AZEVEDO, 1981. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38: 1-3.
- SAMŠIŇAKOVA, A.; S. MISIKOVÁ, 1973. Enzyme activities in certain entomophagous representatives of Deuteromycetes in relationship to their virulence. *CESKA MYKOLOGY*, 27: 55-60. *Apud* FERRON, P., 1978. Biological control of Insect Pests by Entomogenous fungi. *Annual Review Entomology*, 23: 409-442.
- SANTOS, A.L., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP. 148 p. (Tese de mestrado).
- SILVEIRA, W.Q. da, 1983. Obtenção e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, Piracicaba, ESALQ/USP (Tese de mestrado). 153 p.

- SILVEIRA, W.D. e J.L. AZEVEDO, 1982. Obtenção de mutantes pela técnica de enriquecimento em: *Metarhizium anisopliae*. *Boletim de Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico*, 3: 14.
- TINLINE, R.D., 1962. *Cochliobolus sativus* V. Heterocaryosis and parasexuality. *Canadian Journal of Botany*, 40: 425-437.
- TINLINE, R.D., 1971. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, 63: 713-721.
- TINLINE, R.D. e C. NOVIELLO, 1971. Heterocaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycologia*, 63: 701-712.
- VALE, T.L.; S.M. FRIGO; J.L. AZEVEDO e C.L. MESSIAS, 1980. Variabilidade em linhagens haploides e diploides de *Metarhizium anisopliae*. *Resumos do VII Congresso Brasileiro de Entomologia*, Campinas, p. 347.
- VEEN, K.H., 1967. A technique for monospore cultures and the determination of nucleous number in *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9: 276-278.
- VILACORTA, A., 1978. Efeito da temperatura e nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolamentos de *Metarhizium anisopliae* Sorok. *Resumo do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia*, Bahia, p. 70.

WALSTAD, J.D.; R.F. ANDERSON e W.J. STAMBAUGH, 1970.

Effects of environment conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria* and *Metarhizium anisopliae*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 16: 221-226.

WILDING, N., 1973. The survival of *Entomophthora* spp. in mummified aphids at different temperatures and humidities. *Journal of Invertebrate Pathology*, 21: 309-311.

ZACHARUK, R.Y., 1970a. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae Elateridae (Coleoptera). I. Dormant and germinating conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15: 63-80.

ZACHARUK, R.Y., 1970b. Fine structure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larvae Elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and apressoria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15: 81-89.

ZACHARUK, R.Y. e R.D. TINLINE, 1968. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and other fungi, for five elaterids (Coleoptera) in Saskatchewan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 12: 294-309.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Análise de variância para o caráter diâmetro das colônias de 4 linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

Linha gens	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
M _J	Dias	5	15,422	3,084	233,70**	6,2%	1,85
	Dentro	18	0,237	0,013			
	Total	23	15,659				
AL	Dias	5	12,823	2,564	138,64**	8,7%	1,56
	Dentro	18	0,332	0,018			
	Total	23	13,156				
E _g	Dias	5	22,447	4,489	318,40**	5,09%	2,02
	Dentro	18	0,252	0,014			
	Total	23	22,699				
PE	Dias	5	14,438	2,887	138,80**	8,1%	1,77
	Dentro	18	0,375	0,020			
	Total	23	14,813				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 2. Análise da variância para o carater diâmetro da co
lônia na linhagem K de *Metarhizium anisopliae*.

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	16,787	3,357	86,09**	10,56%	1,87
	Dentro	18	0,702	0,039			
	Total	23	17,489				
II	Dias	5	17,987	3,597	128,94**	7,49%	2,22
	Dentro	18	0,502	0,027			
	Total	23	18,489				
III	Dias	5	15,145	3,029	74,24**	9,62%	2,10
	Dentro	18	0,735	0,040			
	Total	23	15,880				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

I, II e III-Número de experimento.

APÊNDICE 3. Análise da variância para o carater diâmetro da co
lônia na linhagem A₁₉ de *Metarhizium anisopliae*.

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	19,217	1,067	27,73**	8,74	2,24
	Dentro	18	0,692				
	Total	23	19,909				
II	Dias	5	18,480	3,696	131,53**	7,71%	2,17
	Dentro	18	0,505	0,028			
	Total	23	18,985				
III	Dias	5	22,432	4,486	443,22**	2,89%	3,47
	Dentro	18	0,181	0,010			
	Total	23	22,614				

** Siginiificativo ao nível de 1% de probabilidade.

I, II e III- Número de experimentos

APÊNDICE 4. Análise da variância para o caráter diâmetro da co
lônia na linhagem C de *Metarhizium anisopliae*.

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	21,733	4,346	44,86**	12,25%	2,54
	Dentro	18	1,745	0,096			
	Total	23	23,478				
II	Dias	5	17,155	3,431	2218,24**	2,61%	1,57
	Dentro	18	0,030	0,001			
	Total	23	17,185				
III	Dias	5	19,915	3,983	553,19**	3,57%	2,37
	Dentro	18	0,130	0,007			
	Total	23	20,045				

** Siginfcativo ao nível de 1% de probabilidade.

I, II e III-Número de experimentos.

APÊNDICE 5. Análise da variância para o caráter diâmetro da co
lônia na linhagem E₆ de *Metarhizium anisopliae*.

Experi mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	29,327	5,865	690,00**	3,52%	2,62
	Dentro	18	0,152	0,008			
	Total	23	29,479				
II	Dias	5	25,832	5,166	1201,49**	3,13%	2,09
	Dentro	18	0,077	0,004			
	Total	23	25,910				
III	Dias	5	23,493	4,698	527,94**	4,64%	2,03
	Dentro	18	0,160	0,008			
	Total	23	23,653				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

I, II e III- Número de experimentos.

APÊNDICE 6. Análise da variância para o caráter diâmetro da co
lônia na linhagem A_4 de *Metarhizium anisopliae*.

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	26,407	5,281	467,38**	4,48%	2,37
	Dentro	18	0,202	0,011			
	Total	23	26,610				
II	Dias	5	12,298	2,459	368,94**	5,13%	1,59
	Dentro	18	0,120	0,006			
	Total	23	12,418				
III	Dias	5	23,508	4,701	388,57**	6,07%	1,81
	Dentro	18	0,217	0,012			
	Total	23	23,726				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

I, II e III-Número de experimentos.

APÊNDICE 7. Análise da variância para o caráter diâmetro da colônia na linhagem M de *Metarhizium anisopliae*.

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	25,167	5,033	183,70**	7,80%	2,12
	Dentro	18	0,492	0,027			
	Total	23	25,659				
II	Dias	5	4,223	0,844	17,63**	23,99%	0,91
	Dentro	18	0,862	0,047			
	Total	23	5,086				
III	Dias	5	4,633	0,926	41,19**	14,88%	1,00
	Dentro	18	0,405	0,022			
	Total	23	5,038				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

I, II e III- Número de experimentos.

APÊNDICE 8. Análise da variância para o carater diâmetro da colônia na linhagem MT de *Metarhizium anisopliae*.

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	30,993	6,198	180,19**	8,18%	2,26
	Dentro	18	0,620	0,034			
	Total	23	31,613				
II	Dias	5	29,271	5,855	85,48**	11,24%	2,32
	Dentro	18	1,232	0,068			
	Total	23	30,509				
III	Dias	5	28,652	5,730	1330,80**	3,27%	2,00
	Dentro	18	0,077	0,004			
	Total	23	28,729				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 9. Análise da variância para o caráter produção de esporos de 4 linhagens de *Metarhizium anisopliae*.
(Dados previamente transformados na escala logarítmica).

Linha gens	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
M _J	Dias	4	15,520	3,880	86,80**	3,5%	6,11
	Dentro	15	0,670	0,044			
	Total	19	16,191				
AL	Dias	1	1,634	1,634	7,00**	9,0%	5,38
	Dentro	6	1,410	0,235			
	Total	7	3,044				
E ₉	Dias	5	40,712	8,142	221,90**	3,2%	5,93
	Dentro	18	0,660	0,036			
	Total	23	41,372				
PE	Dias	5	21,515	4,303	57,52**	4,1%	6,65
	Dentro	18	1,346	0,074			
	Total	23	22,862				

** Significatifo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 10. Análise da variância para o caráter produção de esporos na linhagem K de *Metarhizium anisopliae*. (Dados previamente transformados na escala logarítmica).

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	4	34,734	8,683	186,74**	3,74%	5,74
	Dentro	15	0,698	0,046			
	Total	19	35,432				
II	Dias	3	1,748	0,582	40,19**	1,80%	6,69
	Dentro	12	0,174	0,014			
	Total	15	1,922				
III	Dias	5	12,884		29,12**	5,26%	5,66
	Dentro	18	1,593				
	Total	23	14,478				

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

I, II e III-Número de experimentos.

APÊNDICE 11, Análise da variância para o carater produção de esporos na linhagem E_6 de *Metarhizium anisopliae*.
(Dados previamente transformados na escala logarítmica).

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	3	3,587	1,195	22,10**	3,20%	7,26
	Dentro	12	0,649	0,054			
	Total	15	4,236				
II	Dias	4	18,385	4,596	17,40**	7,66%	6,70
	Dentro	15	3,962	0,264			
	Total	19	22,348				
III	Dias	5	10,148	2,029	37,31**	3,26%	7,15
	Dentro	18	0,979	0,054			
	Total	23	11,127				

I, II e III-número de experimentos.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 12. Análise da variância para o carater produção de esporos na linhagem A_4 de *Metarhizium anisopliae*. (Dados previamente transformados na escala logarítmica).

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	45,346	9,069	35,25**	7,46%	6,79
	Dentro	18	4,630	0,257			
	Total	23	49,976				
II	Dias	4	16,029	4,007	207,63**	2,54%	5,47
	Dentro	15	0,289	0,019			
	Total	19	16,318				
III	Dias	4	5,192	1,298	107,28**	1,60%	6,86
	Dentro	15	0,181	0,012			
	Total	19	5,374				

I, II e III- Número de experimentos.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 13. Análise da variância para o caráter produção de esporos na linhagem M de *Metarhizium anisopliae*. (Dados previamente transformados na escala logarítmica).

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	53,761	10,752	152,30**	4,23	6,27
	Dentro	18	1,271	0,070			
	Total	23	55,033				
II	Dias	4	20,161	5,040	164,18**	2,84%	6,17
	Dentro	15	0,460	0,030			
	Total	19	20,621				
III	Dias	4	37,246	9,311	51,62**	6,65%	6,38
	Dentro	15	2,706	0,180			
	Total	19	39,953				

I, II e III-Número de experimento.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 14. Análise da variância para o carater produção de esporos na linhagem MT de *Metarhizium anisopliae*.
(Dados previamente transformados na escala logarítmica).

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	2	4,259	2,129	212,96**	1,41%	7,08
	Dentro	9	0,090	0,010			
	Total	11	4,349				
II	Dias	2	2,413	1,207	13,73**	4,61%	6,43
	Dentro	9	0,790	0,087			
	Total	11	3,204				
III	Dias	3	3,611	12,039	38,71**	2,46%	7,17
	Dentro	12	0,373	0,031			
	Total	15	3,984				

I, II e III-Número de experimentos.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 15. Análise da variância para o caráter produção de esporos na linhagem A₁₉ de *Metarhizium anisopliae*.
(Dados previamente transformados na escala logarítmica).

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I	Dias	5	33,437	6,687	122,26**	3,66%	6,38
	Dentro	18	0,984	0,054			
	Total	23	34,422				
II	Dias	5	7,843	1,568	9,26**	6,50%	6,32
	Dentro	18	3,048	0,169			
	Total	23	10,892				
III	Dias	5	15,976	3,195	29,13**	6,45%	5,13
	Dentro	18	1,974	0,109			
	Total	23	17,950				

I, II e III-Número de experimentos.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 16. Análise da variância para o carater produção de esporos na linhagem C de *Metarhizium anisopliae*.
(Dados previamente transformados na escala logarítmica).

Experi- mentos	FV	GL	SQ	QM	F	CV	Média
I .	Dias	4	14,440	3,610	284,27**	1,83%	6,15
	Dentro	15	0,189	0,012			
	Total	19	14,630				
II	Dias	4	27,545	6,886	156,51**	3,73%	5,62
	Dentro	15	0,659	0,044			
	Total	19	28,204				
III	Dias	2	1,516	0,758	33,25**	2,31%	6,52
	Dentro	9	0,205	0,022			
	Total	11	1,721				

I, II e III- Número de experimentos.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 17. Análise de variância conjunta para os três experimentos, para o caráter diâmetro das colônias, em 7 linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

Linha gens	FV	GL	SQ	QM	F
K	Experimento (E)	2	1,580	0,790	22,00**
	Dias (D)	5	49,761	9,952	277,20**
	D x E	10	0,157	0,015	0,40**
	Resíduo Médio	54	1,940	0,035	
	Total	71			
A ₁₉	Experimento (E)	2	25,562	12,781	501,22**
	Dias (D)	5	59,866	11,973	469,54**
	D x E	10	0,263	0,026	1,03**
	Resíduo Médio	54	1,379	0,025	
	Total	71	87,072		
C	Experimento (E)	2	12,817	6,408	182,07**
	Dias (D)	5	58,539	11,707	332,61**
	D x E	10	0,263	0,026	0,75**
	Resíduo Médio	54	1,900	0,035	
	Total	71	73,526		
E ₆	Experimento (E)	2	4,997	2,498	347,04**
	Dias (D)	5	78,165	15,633	2171,25**
	D x E	10	0,487	0,048	6,66**
	Resíduo Médio	54	0,390	0,007	
	Total	71	84,040		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

(Continua)

APÊNDICE 17. (Continuação)

<u>Linha</u> <u>gens</u>	FV	GL	SQ	QM	F
A ₄	Experimento (E)	2	7,740	3,870	387,00**
	Dias (D)	5	60,531	12,106	1210,06**
	D x E	10	1,682	0,168	16,83**
	Resíduo Médio	54	0,540	0,010	
	Total	71	70,495		
M	Experimento (E)	2	21,655	10,827	329,10**
	Dias (D)	5	28,219	5,643	171,54**
	D x E	10	5,804	0,580	17,64**
	Resíduo Médio	54	1,760	0,032	
	Total	71	57,439		
MT	Experimento (E)	2	1,420	0,710	19,88**
	Dias (D)	5	88,681	17,736	496,81**
	D x E	10	0,248	0,024	0,69**
	Resíduo Médio	54	1,930	0,035	
	Total	71	92,280		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 18. Análise de variância conjunta para os três experimentos, do caráter produção de esporos em 7 linhagens de *Metarhizium anisopliae*. (Dados transformados previamente em escala logarítmica).

Linha gens	FV	GL	SQ	QM	F
K	Experimentos (E)	2	4,086	2,043	29,83**
	Dias (D)	3	21,731	7,243	105,75**
	D x E	6	6,686	1,114	16,27**
	Resíduo Médio	36	2,466	0,068	
A ₁₉	Experimentos (E)	2	23,800	11,900	106,92**
	Dias (D)	5	44,339	8,867	79,68**
	D x E	10	12,918	1,291	11,61**
	Resíduo Médio	54	6,007	0,111	
C	Experimentos (E)	2	0,145	0,072	1,86 ^{ns}
	Dias (D)	2	2,724	1,362	34,84**
	D x E	4	0,332	0,083	2,12 ^{ns}
	Resíduo Médio	27	1,054	0,039	
E ₆	Experimentos (E)	2	1,087	0,543	3,50**
	Dias (D)	3	9,407	3,135	20,19**
	D x E	6	0,463	0,077	0,50 ^{ns}
	Resíduo Médio	36	5,591	0,155	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

ns. não significativo.

(Continua)

APÊNDICE 18. (Continuação)

<u>Linha</u> <u>gens</u>	FV	GL	SQ	QM	F
A ₄	Experimentos (E)	2	36,808	18,404	162,30**
	Dias (D)	4	29,881	7,470	65,88**
	D x E	8	4,540	0,567	5,00**
	Resíduo Médio	45	5,102	0,113	
M	Experimentos (E)	2	1,463	0,731	7,42**
	Dias (D)	4	96,737	24,184	245,28**
	D x E	8	4,906	0,613	6,22**
	Resíduo Médio	45	4,438	0,098	
MT	Experimentos (E)	2	5,913	2,956	65,58**
	Dias (D)	2	5,635	2,817	60,59**
	D x E	4	1,880	0,470	10,11**
	Resíduo Médio	27	1,254	0,046	

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 19. Coeficiente de correlação de "Spearman" (r_s) entre os caracteres produção de esporos e diâmetro da colônia de 11 linhagens de *Metarhizium anisopliae*.

Linhagens	Experimento	r_s
M _J	1	0,90
AL	1	-1,00*
E ₉	1	0,77
PE	1	0,71
	1	0,90
K	2	1,00
	3	0,89
	1	1,00
A ₁₉	2	0,83
	3	0,77
	1	0,90
C	2	0,80
	3	1,00
	1	1,00
E ₆	2	1,00
	3	1,00
	1	0,89
	2	0,90
A ₄	3	1,00
	1	0,83
M	2	1,00
	3	1,00
	1	1,00
MT	2	1,00
	3	1,00

* Nesse caso foi analisado apenas 2 dias.