INFLUENCIA DA QUALIDADE DA LUZ NO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO
DO *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

TERESA LOSADA VALLE

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

PIRACICABA

Estado de São Paulo-Brasil

Junho, 1984

Aos meus pais,
ao Álvaro e
a Pepita

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação precisa e constante.
- Aos Amigos do curso de pós-graduação, pela convivência sempre interessante.
- Aos Funcionários da biblioteca da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e do Instituto Agrônomo, pelo atendimento eficiente e cordial.
- Aos Funcionários do laboratório do setor de Genética de Microrganismos pela presteza nos serviços solicitados.
- Aos Professores Dr. Sérgio B. Alves, Dra. Silvia M. Frigo e Dra. Aline A.P. Kleiner pelas bibliografias cedidas.
- Ao Prof. Dr. José Carlos Ometto do Departamento de Física e Meteorologia ESALQ/USP, por medir a transmitância das lâmpadas.
- Ao Dr. José Osmar Lorenzi, na pessoa de chefe da Seção de Raízes e Tubérculos/Instituto Agrônomo, pelas facilidades concedidas.
- Ao Dr. Hilario da Silva Miranda Filho, pelas sugestões e elaboração do summary.
- Ao Dr. Bruno Roberto Concone da Escola de Engenharia Mauá pelas facilidades concedidas.
- À EMBRAPA pela verba destinada a compra das lâmpadas.
- Ao CNPq. pela bolsa de mestrado.
- À Todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Classificação, descrição e desenvolvimento do fungo	3
2.2. Influência do meio de cultura	6
2.3. Influência da luz	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Linhagens.....	16
3.2. Meios de cultura e soluções	17
3.2.1. Meio Completo (MC)	17
3.2.2. Solução de ácido nucleico de leveduras .	18
3.2.3. Solução de vitaminas	18
3.2.4. Meio de Batata-dextrose-ágar (BDA)	18
3.2.5. Meio de Arroz (MA)	19
3.2.6. Solução salina	19
3.2.7. Solução de "Tween 80"	19
3.3. Esterilização	19
3.4. Estocagem das linhagens e repicagem	20
3.5. Equipamentos	20
3.5.1. Incubadoras	20
3.5.2. Fontes de luz	20
3.5.3. Placas de Petri	20
3.6. Instalação dos Experimentos	22
3.6.1. Montagem	22
3.6.2 Delineamento Experimental	23

	Página
3.7. Avaliação do efeito da qualidade da luz	23
3.7.1. Crescimento radial	24
3.7.2. Produção total de conídios	24
3.7.3. Taxa de produção de conídios	24
3.7.4. Viabilidade dos conídios	24
4. RESULTADOS	26
4.1. Produção total de conídios	26
4.2. Crescimento radial	32
4.3. Taxa de produção de conídios	35
4.4. Viabilidade dos conídios	40
5. DISCUSSÃO	42
5.1. Produção de conídios	42
5.2. Crescimento radial	48
5.3. Viabilidade dos conídios	50
6. CONCLUSÕES	51
7. BIBLIOGRAFIA CITADA	52
ANEXOS	63

INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DA LUZ NO CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO
DO *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN

AUTÓRA: TERESA LOSADA VALLE

ORIENTADOR: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

O presente trabalho verificou a influência da qualidade da luz na esporulação e crescimento radial do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Para isso utilizaram-se seis linhagens: A₄, A₁₉, E₉, K, M e P; três meios de cultura: Meio Completo (MC), Meio de Arroz (MA) e Batata-dextrose ágar (BDA); seis tratamentos com luz: "BL" ("black light"), azul, verde, amarelo, vermelho e dia, e uma testemunha (escuro). Verificou-se que o crescimento radial foi mais influenciado pelo meio de cultura do que pela luz. A produção total de conídios aumentou, em média 116%, quando as linhagens foram cultivados sob luz, mas a amplitude da resposta foi função do meio de cultura, da linhagem e da qualidade da luz. Linhagens com baixa produção de conídios em MC e BDA recuperaram a capacidade de esporulação em MA mesmo sem tratamento luminoso. A viabilidade dos conídios diminuiu significativamente na linhagem E₉ quando cultivado em MC e iluminada com luzes azul, verde, vermelho, amarelo ou dia.

INFLUENCE OF LIGHT QUALITY IN GROWTH AND SPORULATION IN
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN

AUTHOR: TERESA LOSADA VALLE

ADVISER: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

The present work was carried out in order to study the influence of the quality of light in the radial growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. It was used six fungus strains, three growth media (complete medium - CM, rice medium - RM and potato-dextrose-agar - PDA). The types of light used were: "black-light" (BL), blue, green, yellow, red and day lights, and also a check treatment (dark). The radial growth was less influenced by the qualities of light than by the growth media. The best medium was the CM; PDA was superior to the RM. The total yield of conidia increased, in average, 116% when the strains were under light, in relation to dark. The magnitude of response, however was function of the growth medium, the strain, and the quality of light. Strains with low conidia production, when grown on CM and PDA, recovered their capacity of sporulation in RM, even in the dark. The strain E₉ had its conidia viability reduced significantly when grown on MC, under blue, green, red, yellow or day light. Every quality of light increase significantly the production of conidia, but for a maximum yield, it is necessary to determinate the best light, in relation to each strain and growth medium.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é um dos principais fatores responsáveis pelo rompimento do equilíbrio de populações na natureza. O manejo adequado dessa nova dinâmica de populações é ponto vital para a manutenção de ecossistemas produtivos no tempo e no espaço e, portanto, para a sobrevivência na terra.

Os defensivos químicos são utilizados no controle de populações em desequilíbrio que competem com o homem pela produção agrícola. Com o crescimento da agricultura, porém aumentou o consumo desses produtos, que logo mostraram seus efeitos colaterais negativos, como a perda da eficiência e a deterioração do meio ambiente.

O controle biológico é uma técnica que, sozinha ou conjunta a outras em controles integrados, permite manter populações abaixo do nível de danos econômicos aumentando artificialmente a população de seus inimigos naturais. Este processo similar ao que ocorre na natureza, não tem os efeitos negativos dos defensivos químicos.

Alguns microrganismos são patógenos de muitos insetos, entre os quais, alguns são pragas. Para utilizá-los no controle de pragas, além de conhecer muito bem sua integração no ambiente físico e biológico, deve-se dispor de técnicas que permitam a produção massal de princípios ativos para inseticidas microbianos.

O fungo *Metarhizium anisopliae*, pelas suas características entomopatogênicas, já é utilizado no controle de cigarrinhas em pastagens e cana-de-açúcar, mas ainda oferece possibilidade para o controle de outras pragas, devido à grande quantidade de hospedeiros distribuídos na natureza em diversas condições edafoclimáticas. Para isso, é necessário conhecer as situações ambientais que permitam desencadear epizootias e dispor de esporos em grande quantidade.

Uma vez que estudos anteriores demonstram a influência positiva da luz na esporulação de muitos fungos, e existindo indicações na literatura de que o mesmo ocorre com *M. anisopliae*, neste trabalho procurou-se estudar alguns aspectos relacionados ao efeito da luz quanto à qualidade, possíveis interações com o meio de cultura, e ainda respostas diferenciais entre linhagens.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CLASSIFICAÇÃO, DESCRIÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO FUNGO

O fungo *Metarhizium anisopliae* é um Deuteromiceto pertencente à ordem Moniliales, família Moniliaceae. Foi descrito, pela primeira vez, por Metschnikoff, na Rússia, em 1879, parasitando larvas de *Anisopliae austriaca*, coleóptero da família Scarabaeidae. Inicialmente foi classificado como *Entomophthora anisopliae*, mas, em 1883, Sorokin reclassificou-o como *Metarhizium anisopliae*. Desde 1879 teve dezessete sinônimas, sendo incluído dentro de vários gêneros, entre os quais *Penicillium*.

TULLOCH (1976) revisou a taxonomia do gênero *Metarhizium* e manteve duas espécies: *Metarhizium flavoviride* (Gams Rozsypal), *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. var. *anisopliae* (também conhecida como minor) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. var. *major* (Johnston). O autor incluiu na espécie *M. anisopliae* duas outras: 1) *M. album*, por

entender que a forma descrita corresponderia a um isolado imaturo de *M. anisopliae*; 2) *M. brunneum*, porque a julgou um mutante natural cor marrom da forma selvagem de *M. anisopliae*, que é verde-oliva.

As variedades *anisopliae* e *major* são separadas pelo tamanho dos conídios. Na primeira, os conídios têm comprimento de 3,5 μ a 9 μ , normalmente 5 μ a 8 μ ; na segunda, 9 μ a 18 μ , normalmente 10 μ a 14 μ (TULLOCH, 1976). Essa separação foi proposta por JOHNSTON, em 1915, mas ainda é hoje um assunto polêmico porque alguns autores argumentam ser o tamanho dos conídios influenciado pelo meio de cultura e/ou hospedeiro. VEEN (1968) e TULLOCH (1976) discutem vários pontos de vista a respeito da utilização desse critério na separação das variedades.

A separação a nível de linhagens é feita mediante um conjunto de informações tais como: produção de enzimas extracelulares, dimensões de conídios, estudos citológicos, padrões eletroforéticos, etc. A caracterização de linhagens foi revista e discutida por ALVES (1982).

A forma perfeita de *M. anisopliae* foi descrita somente sobre insetos, considerando-o Ascomiceto. Inicialmente TRYON (1914) encontrou na forma perfeita um *Cordyceps*, e posteriormente, SCHAEFFENBERG (1954) diz pertencer provavelmente ao grupo *Sphaeriales* (apud VEEN, 1968). Ambos os trabalhos não são totalmente aceitos por autores mais recentes, pois não são suficientemente claros nem apresentam repetibilidade (LATCH, 1965; VEEN, 1968; e TULLOCH, 1976).

A parassexualidade é um importante mecanismo para a criação de variabilidade genética em fungos. Consiste na anastomose de hifas com núcleos diferentes (heterocariose), fusão desses núcleos e posterior haploidização através da formação consecutiva de aneuplóides até voltar ao número de cromossomos inicial. Evidentemente, este núcleo

final será um recombinante inter e, às vezes, intracromossômico dos dois núcleos originais. Em *M. anisopliae*, TINLINE e NOVIELLO (1971) descreveram a formação de heterocários em laboratório, mas o ciclo parassexual completo foi demonstrado por MESSIAS (1979), AL-AIDROOS (1980) e MESSIAS e AZEVEDO (1980).

Em condições de laboratório, sobre ágar Sabouraud, VEEN (1968) descreve *M. anisopliae* da seguinte maneira:

"Desenvolve-se uma placa de micélio branco na qual formam-se os esporos em pequenas "ilhas" (chamadas esporodóquios por Latch, 1965); mais tarde, essas "ilhas" se juntam. Os esporos aderem firmemente à placa micelial. O micélio é composto de hifas de $1,0\mu$ a $3,5\mu$ hialinas, septadas e ramificadas com paredes finas. Os conidióforos formam-se sobre o micélio, ramificados irregularmente em direção às fiáides. Na extremidade dos conidióforos forma-se uma placa similar a estacas. As fiáides são cilíndricas ficando ligeiramente intumescidas à medida que os conídios se formam. Suas dimensões são $8,0\mu$ a $11,5\mu$ x $1,7\mu$ a $2,3\mu$. Os conídios, formados em cadeias quebradas, são similares a cilindros arredondados nas duas extremidades, onde algumas vezes, são ligeiramente estreitos. Suas dimensões são $4,6\mu$ - $11,5\mu$ x $2,3\mu$ - $2,9\mu$ (média $6,8\mu$ x $2,4\mu$)".

Alguns isolados não formam esporodóquios, mas apresentam esporulação abundante, constituindo uma placa verde-oliva aderida ao micélio.

Os meios de cultura e técnica usuais em laboratório permitem, com facilidade, o cultivo e manutenção de *M. anisopliae*. Desenvolve-se entre 7 e 35°C , mas a temperatura ótima é por volta de 28°C (VILACORTA, 1978 e outros). É tolerante à faixa de pH 2,0 a 8,5, porém 6,9 é a melhor condição para crescimento e esporulação. Umidade relativa acima de 95% permite germinação dos esporos (VEEN, 1968).

Na natureza, é uma espécie bastante cosmopolita, encontrando-se disseminada desde a Rússia até a Argentina,

quer parasitando uma larga gama de insetos hospedeiros, quer vivendo saprofiticamente no solo.

2.2 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA

A esporulação em fungos é estimulada por vários fatores: temperatura, luz, umidade, aeração, pH, composição do meio de cultura, etc. Estes levam a colapsos na homeostase celular que favorece a reprodução sexual e assexual.

O meio de cultura influencia o crescimento e a diferenciação celular à medida que condições favoráveis à esporulação, geralmente, são restritivas ao desenvolvimento micelial. Essas condições podem ser criadas através da composição quantitativa e qualitativa do meio de cultura, adicionando-se sais e vitaminas, variando-se as fontes de carbono ou nitrogênio; ou então, mudanças adversas provocadas pelo crescimento vegetativo como: diminuição do pH e de nutrientes, concentração de metabólitos secundários, etc., (BULL e TRINCI, 1977). Muitas são as mudanças nutricionais internas e externas à célula que levam a alterações metabólicas e estimulam a diferenciação. Segundo DALBERG e VAN ETEN (1982), em fungos a esporulação está intimamente associada ao metabolismo de carboidratos.

O fungo *M. anisopliae* não requer condições especiais para o seu manuseio em laboratório. Cresce e esporula bem em meios de cultura ricos, pobres, empíricos, quimicamente definidos com várias fontes de C e N, sem necessidade de fatores de crescimento especiais. Essa grande facilidade de cultivo permite, como é de esperar, respostas diferenciais a nutrientes, de tal maneira que é possível obter meios de cultura mais favoráveis à produção de esporos e/ou crescimento vegetativo.

ROBERTS (1966) comparou duas fontes de N, uma

orgânica (neopeptona) e outra inorgânica (NaNO_3). Constatou que a produção de matéria seca foi praticamente duas vezes mais no meio de cultura com neopeptona após a primeira semana, mas quase não houve diferença após quatro semanas de cultivo.

Entre várias fontes orgânicas de N (16 tipos de peptona), BARNES *et al.* (1975) constataram que extrato de *levedura* proporcionou bom crescimento e boa esporulação, enquanto em triptona e casitona houve bom crescimento micelial, mas pouca esporulação.

Os aminoácidos que mais estimularam a esporulação e favoreceram o crescimento foram triptofano, ácido glutâmico e histidina, quando comparados com 24 outros e nitrato de potássio (CAMPBELL *et al.*, 1978).

Quanto ao aproveitamento de carboidratos, *M. anisopliae* esporulou melhor quando utilizado inositol, glicérol, manose, frutose e trealose como fonte de C no meio de cultura. Porém houve maior crescimento em manose, glicose, sucrose, trealose e maltose CAMPBELL *et al.* (1983).

Em face dos resultados encontrados nesses dois trabalhos de CAMPBELL *et al.* (1978 e 1983), em *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana*, os autores ressaltam diferenças entre esses fungos entomopatogênicos e outros no que se refere à utilização de fontes de C e N. A maioria dos fungos não utilizam o triptofano, ou o utilizam mal, mas essas espécies a aproveitam bastante bem. Fato similar ocorre com trealose, principal carboidrato da hemolinfa de muitas espécies de insetos. Portanto, esses aspectos nutricionais indicam que podem ter significativa relação com a condição entomopatogênica desses fungos.

Meios de cultura complexos com diferentes substratos foram ensaiados por vários autores.

AQUINO (1974) comparou arroz, mandioca (amido) e batata (batata-dextrose-água), verificando que o primeiro foi melhor que o segundo, e este melhor que o terceiro, tanto

para a quantidade de esporos produzida como para a rapidez na esporulação.

BASTOS *et al.* (1976) ensaiaram farinhas de milho, arroz e trigo, constatando que sempre houve maior produção de esporos em meio contendo farinha de trigo. Esta somente foi utilizada acrescentada às demais não aparecendo em tratamento isolado.

O meio de arroz foi considerado o melhor para a produção de conídios por DAOUST e ROBERTS (1983), quando comparado com outros meios usuais em laboratório para cultivo de fungos.

FRIGO (1983) também constatou a superioridade do meio de arroz para a produção de conídios, em relação ao "Meio Completo para *Aspergillus nidulans*" descrito por PONTECORVO *et al.* (1953), considerado bastante rico em nutrientes.

A relação C:N é um parâmetro que permite melhor utilização do meio de cultura, isto é, produção máxima de esporos com o mínimo de nutrientes.

Em seis espécies entomopatogênicas da ordem Entomophorales a relação C:N foi entre 7 e 11 com 30g/l de glicose e 20g/l de proteínas para obter esporulação máxima (LATAGÈ e REMAUDIERE, 1974-1975).

No caso de *M. anisopliae*, não há estudos sobre a relação C:N, porém FRIGO (1983), estudando quantidades crescentes de farinha de arroz (15, 30, 45, 60, 75 e 90g/l) em meio de cultura, verificou que o máximo de produção de conídios ocorre com 60g/l em cinco linhagens. Utilizando tabelas da composição de farinha de arroz (ADAIR, 1972), verifica-se que essa quantidade equivale a 4g de proteína e 48g de carboidratos por litro. Evidentemente, estes dados não são suficientes para comprovar a proporção C:N ideal, mas são um bom indício para orientar trabalhos futuros.

O crescimento e diferenciação em culturas submersas e de superfície são quantitativa e qualitativamente diferentes. Normalmente, culturas de superfície favorecem a esporulação.

Em culturas submersas, além de menor produção de conídios, há a formação de blastósporos em vários fungos entomopatogênicos, como *Beauveria bassiana*, *B. brongniarti*, *M. anisopliae*, *Sorospora uvella* e *Verticillium lecanii* (FERRON, 1978). No caso de *M. anisopliae*, VEEN (1968) relata que a adição de "Tween 80" a 0,4% pode eliminar a formação de blastósporos.

A composição do meio de cultura também é responsável pela qualidade do princípio ativo produzido, isto é, virulência dos esporos. FARGUES, *et al.* (apud FERRON, 1978) constataram que 10 esporos de *M. anisopliae* injetados na cavidade do corpo de larvas de *Oryctes rhinocerus* causam 70% de mortalidade se a linhagem for homóloga, mas são necessários 10^5 esporos para obter-se o mesmo efeito se a linhagem for heteróloga (isolada de *Cetonia aurata*).

FARGUES e ROBERT (1983) mediram a virulência em dois isolados de *M. anisopliae* produzidos em oito meios de cultura e nos dois hospedeiros homólogos. Verificaram que a produção de esporos foi maior nos insetos do que nos meios de cultura mesmo quando estes continham quitina. Quanto à qualidade o mesmo fato se repetiu: a virulência foi maior quando o inóculo foi produzido no hospedeiro. Somente quando a dosagem de inóculo foi muito alta (10^8 esporos/ml), a porcentagem de insetos mortos foi similar, independentemente da origem dos conídios.

É fato bastante estudado que a virulência de fungos entomopatogênicos está correlacionada com a produção de enzimas. No caso de *M. anisopliae*, a virulência parece estar ligada à produção de amilase extracelular (AL-AIDROOS e SEIFERT, 1980, e SILVA e MESSIAS, 1984) e lipase extracelular (SILVA e MESSIAS, 1984), mas não é alterada pela produção de proteases (AL-AIDROOS e SEIFERT, 1980, e SILVA e MESSIAS, 1984).

A produção de enzimas e a virulência são influenciadas pelo meio de cultura. Mutantes hipervirulentos

produziram mais amilase que a linhagem parental, mas quando são cultivados em meios de cultura sem amido tornam-se menos virulentos. Esses mutantes, chamados dep⁺ (degradação de polissacarídeos), produzem mais enzimas e toxinas, são mais virulentos e esporulam precocemente, e os esporos germinam mais rápido, mas somente se produzidos em meio de cultura com amido (AL-AIDROOS e SEIFERT, 1980).

SILVA *et al.* (1982), estudando produção de enzimas por isolados provenientes de insetos e meio de cultura, verificaram que a produção de lipase e amilase extracelular é significativamente maior quando o isolado se origina do inseto.

MURAYAMA *et al.* (1982) e BARBOSA *et al.* (1983) constataram a perda de virulência de subculturas sucessivas em meio de arroz.

DAOUST e ROBERTS (1983) produziram conídios de *M. anisopliae* sobre arroz cozido e esterilizado, com viabilidade, rendimento e virulência bastante satisfatórios. Estes foram tão virulentos quanto os conídios produzidos em meio contendo amido, e mais virulentos do que os produzidos com maltose, glicose ou dextrose.

Meio de cultura para a produção em grande quantidade de conídios de *M. anisopliae*, normalmente, sempre foi à base de arroz. Já em 1913, RORER (apud VEEN, 1968) produziu quantidades relativamente grandes de conídios sobre arroz esterilizado.

Atualmente, no Brasil, onde é produzido em grande quantidade, o meio de cultura à base de arroz parece definitivamente estabelecido. Os trabalhos visam facilitar o processo da produção desenvolvendo novas embalagens e quantidade de água a ser utilizada para o cozimento do arroz (VILAS BOAS, 1973; MOURA COSTA *et al.*, 1974; AQUINO *et al.*, 1975; VILACORTA, 1978; DAOUST e ROBERTS, 1983).

As vantagens da utilização de arroz para gran-

des produções de conídios parecem evidentes: proporciona bom rendimento por ter uma composição de nutrientes favoráveis associada a culturas de superfície, e ainda, boa qualidade de esporos, porque o substrato tem como fonte de C o amido.

2.3 INFLUÊNCIA DA LUZ

As radiações podem ser benéficas, maléficas ou inócuas para os fungos dependendo da qualidade e intensidade da radiação, tempo de exposição etc. Quando as radiações não são maléficas, isto é, não causam efeitos letais, normalmente influenciam o crescimento e a reprodução.

Alguns fungos só esporulam na ausência de luz, outros são indiferentes, outros esporulam abundantemente sob luz contínua e outros só esporulam se houver períodos com e sem luz. Estes últimos são chamados por LEACH (1971) "esporuladores diurnos".

A luz ultravioleta (U.V.) com comprimento de onda entre 230 e 380nm estimula a esporulação em alguns fungos. Associando a sensibilidade a esses comprimentos de onda LEACH (1965) encontrou em micélio de alguns fungos (*Ascochyta pisi*, *Alternaria chrysantemi* e outros) uma substância chamada P_{310} , que absorvia luz entre 260 e 340nm, com um pico a 310nm. Não era encontrada em culturas crescidas no escuro e tinha efeito mimético da luz. Atualmente, é denominada micosporina, mas ainda não é muito bem conhecida. FRAIKIN e RUBIN (1979) sugerem tratar-se de um metabólito intermediário envolvido em um processo de esporulação induzido por luz, do qual participam acetilcolina e ergosterol. Respostas a essa faixa de luz só foram encontradas em Ascomycetos e Deuteromycetos (DURAND, 1976).

A faixa de luz com comprimento de onda entre 300 e 520nm incorpora ultravioleta próximo e azul. Entre os tipos de luz que influenciam os seres vivos, é o mais estuda-

do e o que interfere no maior número de processos biológicos fotossensíveis conhecidos (tropismo, carotenogênese, etc).

Nas quatro classes de fungos: Ficomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos, encontram-se fungos que são estimulados a esporular por comprimentos de onda U.V. e azul, como *Trichoderma* sp., *Penicillium claviforme*, *Coprinus macrorhizus* e outros.

A luz azul é inibidora da esporulação em fungos sensíveis a fotoperíodo, geralmente revertendo o estímulo provocado pela luz U.V., como no caso de *Alternaria tomato*, *A. solani*, *Botrytis cinerea* e outros. Recentemente, foi descoberto que em alguns fungos os efeitos inibidores da luz azul podem ser eliminados por U.V. próximo e vice-versa, portanto a esporulação depende da última iluminação. KUMAGAI (1978) propôs um esquema fotoceptor chamado "micocromo" envolvendo duas formas de um pigmento: P_B (que absorve luz azul) e P_{NUV} (forma que absorve luz U.V. próximo) que são reversíveis. A esporulação seria inibida pela primeira e estimulada pela segunda forma.

A luz U.V. próximo e azul são tratadas no mesmo grupo porque não foi possível distinguir os fotorreceptores de cada tipo de luz. Em fungos sensíveis à luz U.V. próximo e luz azul, sejam estímulos positivos ou negativos, encontram-se dois picos de absorção principais: 450nm (azul), que pode ser encontrado por carotenóides ou riboflavina e 370nm (U.V. próximo) que se identifica com a absorção de flavinas ou alguns carotenóides na forma *cis* (DURAND, 1976). No entanto, em *Phycomyces* PRESTI *et al.* (1977) encontraram um mutante incapaz de sintetizar *cis*- β -caroteno com respostas fototrópicas similares ao tipo selvagem.

TAN (1975) relatou que existem dois mecanismos fotoinduzidos em *Botrytis cinerea*. A luz U.V. próximo estimula a esporulação, mas seu efeito é reduzido pela luz azul. O infravermelho elimina a ação da luz azul, mas o efeito do in-

fravermelho pode ser revertido pela luz vermelha, portanto o nível de esporulação é determinado pelo último tipo de iluminação.

O fungo entomopatogênico *Entomophthora coronata* (*Conidiobolus villosus*) tem respostas fototrópicas à luz de 400 a 650nm. O espectro de absorção de extrato do fungo, em acetona, mostrou picos de absorção a 412, 506, 543, 580 e 630nm, característico de uma porfirina (PAGE e BRUNGARD, 1961).

JEREBZOFF e JAQUES (1972) estudaram o efeito de radiações no crescimento de conidióforos em *Sclerotinia fructicola*. Os comprimentos de onda que mais estimularam o crescimento foram U.V. próximo (390-370nm) e azul (420 a 470nm) com $30\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de iluminação contínua durante cinco dias, houve o máximo crescimento de conidióforos. Quando se utilizou radiância 70 a 80 vezes maior, luz verde (550-575nm) e vermelha (610-630nm) deram melhores resultados do que U.V. próximo e azul. Extratos do micélio mostraram picos de absorção de luz a 365, 400, 420-430, 455, 550 e 675nm. Os autores sugerem que carotenóides e/ou flavinas e porfirinas atuem como fotorreceptores.

A esporulação em *Pilobolus kleinii* é fotoinduzida PREVOST-MONNOT, 1974 (apud DURAND, 1976). A formação de trofocistos é ativada por amplo espectro de radiações, que mostra picos de atividade a 367, 445, 460, 485 e 560nm. O sistema fotorreceptor compreende um carotenóide, uma flavina e uma porfirina.

A maioria dos trabalhos que estudam o efeito da luz pretendem utilizá-la para resolver problemas de má esporulação em condições de laboratório, principalmente em fungos fitopatogênicos, e não para estudar o fenômeno da fotossensibilidade.

Apesar das ressalvas feitas acima, podemos esquematizar alguns estudos. O efeito positivo ou negativo das radiações ultravioleta e visível parece ser ligado muito mais

à espécie ou à linhagem do que à qualidade da luz, exceção feita a fungos sensíveis a fotoperíodo em que a luz azul e a vermelha parecem inibir a esporulação e a luz U.V. próximo e infravermelha estimula-la.

Quanto a substâncias fotorreceptoras, parecem situadas em três grupos: a substância esporogênica P_{310} (microsporína) com pico de absorção a 310nm, as flavinas e carotenóides, com absorção na luz U.V. (370nm) e azul (450nm), e finalmente, as porfirinas atuando no espectro visível acima de 520nm. Muitos autores, porém acreditam que os sistemas fotorreceptores sejam vários compostos químicos ainda não conhecidos.

A luz provoca grandes mudanças metabólicas que podem levar à esporulação. Em *Physarum polycephalum*, a iluminação de um receptor de luz azul inibe metabolismo da glicose reversivelmente. DALBERG e VAN ETEN (1982) sugerem que possa existir um mecanismo em que fotorreceptores afetam o sistema de transporte de elétrons, alteram o pH, balanço iônico da célula e seu meio, bem como o metabolismo de carboidratos. Em *Phycomyces*, o nível de AMP cíclico diminui 50% em relação ao escuro após um minuto de iluminação (COHEN, 1974 apud DALBERG e VAN ETEN, 1982). O AMP cíclico está ligado à utilização de fontes de carbono endógeno e exógeno e a conidiação em *Neurospora crassa* (PALL, 1981).

O efeito estimulador na esporulação exercido pela luz, pode ser substituído, total ou parcialmente, por nutrientes do meio de cultura como sais inorgânicos, vitaminas, etc.

A luz pode interferir na esporulação de uma maneira indireta decompondo carboidratos, vitaminas e outros componentes do meio de cultura, ou ainda mudando suas características físicas, como a viscosidade..

Em *M. anisopliae*, os estudos sobre efeitos da luz concentram-se em duas áreas: estímulo à esporulação e efeitos letais da luz U.V.

A respeito da influência da luz na esporulação,

os resultados dos primeiros trabalhos são contraditórios, porém, à medida que outras pesquisas foram feitas, confirmaram seu efeito estimulador na produção de esporos. VOUK e KLASS (1931) afirmaram que a luz reduz a esporulação, mas CHENG e CHEN (1962) que a favorece (apud VEEN, 1968). BASTOS e MATTA (1976) relatam que os melhores efeitos são obtidos com alternância de período claro/escuro, mas SANTOS (1978), MATTA e OLIVEIRA (1978) e ALVES (1982) obtiveram maior produção de conídios com iluminação contínua.

O tipo de luz também tem efeitos diferentes sobre a quantidade e qualidade dos esporos. ALVES *et al.*, (1980) relatam que luz azul, amarela, vermelha e "plant lights" estimulam produção de esporos em maior quantidade do que luz verde, "day light", "cold green", branca, negra e U.V.; os esporos produzidos sob luz azul mostraram-se muito mais patogênicos que os demais. Em 1983, ALVES *et al.*, utilizaram luz vermelha, azul e "day light" para estudos de fotoperíodo, e concluíram que iluminação contínua com a lâmpada "day light" proporcionou a maior produção de esporos. Os mais patogênicos foram os produzidos sob luz vermelha e "day light".

Os efeitos letais causados por luz U.V. (253nm) foram demonstrados por CORREA (1983), FRIGO (1984) e outros. Esses autores encontraram grande variabilidade entre isolados e sugerem sua utilização em programas de melhoramento visando obter linhagens mais resistentes.

A radiações solares também podem causar perda de viabilidade desse fungo. CORREA (1983) demonstrou que luz solar direta causa altas taxas de mortalidade, mas os conídios estão mais protegidos sob luz difusa e em solos mais porosos. ZIMMERMAN (1982) estudando o efeito de lâmpadas artificiais com o mesmo espectro de ação da luz solar e com potência dez vezes maior, constatou que a luz diminui e retarda a germinação de conídios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS

No presente trabalho empregaram-se linhagens do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Campinas, e cedidas pelo Dr. Claudio Luis Messias.

As linhagens utilizadas, mostradas na TABELA 1, foram selecionadas por dois critérios:

- a) padrão eletroforético de esterase diferente, determinado por CONTI *et al.*, 1980;
- b) quando não era conhecido o padrão eletroforético escolheram-se linhagens originadas de locais diferentes.

TABELA 1. Linhagens, locais de origem, hospedeiro e padrão eletroforético de esterase do fungo *M.anisopliae*.

Linhagem	Local de origem	Padrão eletroforético	Hospedeiro
A ₄	Bahia	1	<i>Mahanarva posticata</i>
A ₁₉	Bahia	2	<i>Deois schach</i>
E ₉	Espírito Santo	5	<i>Deois flavopicta</i>
K	São Paulo	3	<i>Deois flavopicta</i>
M	Amazonas	*	<i>Deois</i> sp
P	Pará	*	<i>Mahanarva posticata</i>

* Não determinado

3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

3.2.1 MEIO COMPLETO (MC)

Peptona	2,0g
Caseína hidrolisada	1,5g
Solução de vitaminas	1,0ml
Ácido nucleico de leveduras	2,5ml
Extrato de levedura	0,5g
NaNO ₃	6,0g
KH ₂ PO ₄	1,5g
KCl	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Glicose	10,0g
Agar	15,0g
Água destilada	1000ml
pH ajustado a 6,8 com NaOH 4%	

O meio acima corresponde ao descrito por PONTE-CORVO *et al.*, (1953)

Quando se fez necessário utilizou-se meio completo líquido, sem ágar.

3.2.2 SOLUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEÍCO DE LEVEDURAS

a) Ácido nucleico de leveduras - 2g em 15ml de solução 1N de HCl.

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

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

3.2.3 SOLUÇÃO DE VITAMINAS

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

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

3.2.4 MEIO DE BATATA-DEXTROSE-AGAR (BDA)

Batata-dextrose-agar (Difco)	39g
Água destilada	1000ml

pH ajustado a 6,8 com NaOH 4%.

3.2.5 MEIO DE ARROZ (MA)

Farinha de arroz	60g
Ágar	15g
Água destilada	1000ml

pH ajustado a 6,8 com NaOH 4%.

A farinha de arroz foi obtida a partir de arroz beneficiado, variedade Precoce Dourado, cuja cultura sabidamente não foi tratada com fungicidas. O arroz foi moído em moinho de facas (Stein Laboratory Mill, modelo L2, série 296) durante três minutos, tempo suficiente para obter-se uma farinha relativamente fina.

3.2.6 SOLUÇÃO SALINA

Preparou-se uma solução de 8,5g de cloreto de sódio em 1000ml de água destilada. Colocaram-se 9 ml da solução em frascos, autoclavaram-se e conservaram-se a temperatura ambiente.

3.2.7 SOLUÇÃO DE "TWEEN 80"

Preparou-se uma solução de 1 ml de "tween 80" em 1000ml de água destilada. Distribuiu-se em tubos de ensaio, autoclavou-se quando necessário, e conservou-se a temperatura ambiente.

3.3 ESTERILIZAÇÃO

Os meios de cultura (MC, BDA e MA) e a solução salina foram esterilizadas em autoclave por 15 minutos a 120°C.

3.4 ESTOCAGEM DAS LINHAGENS E REPICAGEM

Antes de iniciar-se a montagem dos experimentos fez-se um estoque , em meio completo inclinado, com todas as linhagens e mantido em geladeira. Este estoque foi utilizado para repicagem em todos os ensaios.

A repicagem foi feita utilizando-se um fio de níquel-cromo no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura.

3.5 EQUIPAMENTOS

3.5.1 INCUBADORAS

Utilizaram-se duas incubadoras modelo BOD marca Fanen reguladas a 28°C. O controle da temperatura foi feito por um termômetro instalado dentro da incubadora e verificou-se gradiente de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.5.2 FONTES DE LUZ

No presente trabalho utilizaram-se lâmpadas fluorescentes, de 20 watts de seis cores diferentes, descritas na TABELA 2.

3.5.3 PLACAS DE PETRI

Para realizar este trabalho utilizaram-se somente placas de Petri de vidro marca Anumbra porque, dentre as disponíveis, foram as que permitiram a mais alta porcentagem de transparência a todos os comprimentos de onda. A transparência desse vidro foi registrado em um espectroradiômetro, para ultravioleta e visível, Carl Zeiss número 463476 e mostrado na FIGURA 1.

Fig. de Petri

Figura 1. - Transparência da placa de Petri (marca "Anumbra") e do ar (em %) à radiações com λ de 200 a 800nm.

TABELA 2. Cor, marca comercial, modelo e transmitância (amplitude e pico) das lâmpadas utilizadas no trabalho.

Cor	Marca	Modelo	Transmitância (nm) ^{1/}
BL (black)	Matsushita	FL-20	300-450 (pico 350)
Azul	General Eletric	-	300-650 (pico 450)
Verde	Sylvania	F20/VD	470-630 (pico 530)
Amarela	Tungsrn	12 BIMP	540-620 (pico 570)
Vermelha	Sylvania	F-20/VM	550-750 (pico 630)
Luz do dia	General Eletric	F-20/VD	350-700 (pico 450 a 600)

^{1/} Fonte: HIENTON (1974), referentes a lâmpadas com 15 watts.

3.6 INSTALAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

3.6.1 MONTAGEM

Instalaram-se dentro de cada incubadora BOD, duas prateleiras horizontais de madeira de 30cm x 60cm, com encaixes para 15 placas de Petri cada uma. A 30cm de cada prateleira colocou-se uma lâmpada da cor a ser ensaiada, portanto em cada estufa utilizavam-se simultaneamente 30 placas com duas lâmpadas iguais, para a montagem de um experimento.

Com essa montagem conseguiu-se que a cada ponto de encaixe das placas chega-se, em média, a quantidade de energia expressa na TABELA 3.

A potência média foi medida através de um elemento receptor de impulso (Eppley Radiometer model PSP, serial nº 15208 f3, constante de calibração $9,48 \cdot 10^{-6}$ V/W m²), acoplado a um aparelho medidor de impulso (Potenciômetro

Cambridge tipo 44228 com fundo de escala de 101 mv e leituras centesimais).

TABELA 3. Tipos de lâmpadas e respectivas potências médias nos locais a serem instaladas as placas de Petri.

Tipo de lâmpada	Potência média mW/m ²
"BL" ("black light")	1055
Azul	4200
Verde	1740
Amarelo	1055
Vermelho	3692
Luz do dia ("day light")	2373

O experimento testemunha (escuro) foi feito da mesma maneira que os demais apenas não se colocou qualquer fonte de iluminação.

3.6.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Realizaram-se 21 experimentos (três meios de cultura, seis tratamentos com luz e uma testemunha), todas inteiramente casualizados com quatro repetições, das quais utilizaram-se somente três, devido a contaminações ou outros imprevistos.

3.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUALIDADE DA LUZ

A avaliação do efeito da qualidade da luz foi medida em colônias crescidas em placas de Petri contendo 24ml de meio de cultura sólido após dez dias de incubação sob iluminação contínua.

Trocaram-se as tampas das placas de Petri sempre que houve a formação de gotículas de água em sua superfície.

3.7.1 CRESCIMENTO RADIAL

O crescimento radial foi medido determinando-se o diâmetro da colônia com uma régua milimetrada.

3.7.2 PRODUÇÃO TOTAL DE CONÍDIOS

A produção de conídios foi estimada da seguinte maneira: colocaram-se 10ml da solução "Tween 80" na placa, a colônia foi raspada superficialmente com uma lâmina e recolhida a um frasco. A placa foi lavada com mais 10ml da solução de "Tween 80" e recolhidos ao mesmo frasco. Homogenizaram-se os 20ml da suspensão de conídios em agitador vortex durante um minuto, a seguir dilui-se de 1:10, homogenizou-se novamente a suspensão e fez-se a contagem do número de esporos em uma Câmara de Neubauer. Depois fizeram-se os cálculos para estimar o número de conídios por colônia.

3.7.3 TAXA DE PRODUÇÃO DE CONÍDIOS

A taxa de produção de conídios foi medida calculando-se o número de conídios produzidos por unidade de área, isto é, dividindo-se a produção total de conídios pela área da colônia calculada através de seu diâmetro.

3.7.4 VIABILIDADE DOS CONÍDIOS

Para verificar se a qualidade da luz afetou a viabilidade dos conídios utilizou-se a linhagem E₉ cultivada em meio completo.

Inicialmente prepararam-se sete suspensões de conídios em "Tween 80" seis sob efeito de luz mais a testemunha (aproximadamente 5×10^7 esporos/ml). Transferiu-se um ml de cada suspensão em tubos com cinco ml de meio completo líquido. Utilizaram-se 42 tubos, dois para cada repetição. Após 20 horas de incubação contou-se o número de conídios germinados e não germinados.

4. RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO TOTAL DE CONÍDIOS

A produção média de conídios das linhagens A_4 , A_{19} , E_9 , K, M e P são mostradas nas FIGURAS 2, 3 e 4. Estes resultados são visualizados em três meios de cultura (MC, BDA e MA) com seis tratamentos de luz ("BL", azul, verde, amarelo, vermelho e dia) e uma testemunha (escuro). Os dados originais encontram-se nos ANEXOS 1, 2 e 3. No ANEXO 4 são mostradas todas as médias dos diversos tratamentos isolados ou combinados.

Tanto as FIGURAS 2, 3 e 4 como o ANEXO 4 mostram grande variação na produção de conídios, principalmente entre linhagens. Essa variação é refletida na análise estatística dos ensaios individuais, onde o efeito de linhagens foi altamente significativo (ANEXO 5). De modo geral, as linhagens mais produtivas foram E_9 e M, e também a linhagem A_4 quando cultivada em MA. As linhagens com menor esporulação foram A_{19} e K e a linhagem P teve produção intermediária.

A₄

Figura 2: Produção de conídios das linhagens A₄ e P em três meios de cultura com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro).

28
M

A₁₉

Figura 3: Produção de conídios das linhagens M e A₁₉ em três meios de cultura com seis tratamentos de luz e uma testemunha¹⁹ (escuro).

K

Figura 4: Produção de conídios das linhagens E_g e K em três meios de cultura com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro).

Os meios de cultura tiveram efeitos marcantes na produção de conídios (ANEXO 4). A produção média em BDA ($18,5 \times 10^7$ conídios) foi significativamente inferior à produção média em MC ($62,2 \times 10^7$ conídios) e MA ($53,1 \times 10^7$ conídios). Apesar das produções médias, em MC e MA, não diferiram significativamente entre si, verifica-se que os efeitos à nível de linhagem são diferentes. Em MA, todas as linhagens esporulam de maneira relativamente homogênea, embora estatisticamente diferentes, porém em MC, algumas esporulam muito bem (E_9 e M), e outras praticamente não produzem conídios (A_{19} e K).

Todas as linhagens produziram mais conídios sob iluminação do que no escuro, exceto a linhagem P (ANEXO 4). Esta se cultivada em BDA, sob luz vermelha e dia diminui significativamente a produção em relação ao escuro. Quando as linhagens foram cultivadas em MC, se iluminadas, produziram mais conídios, porém, as produções médias não apresentaram diferenças significativas da testemunha. Em BDA as luzes verde, amarela e vermelha aumentaram a produção média de conídios de maneira significativa em relação ao escuro. Em MA os tratamentos com luz "BL", azul, amarelo e dia foram estatisticamente superiores ao escuro. Ainda no ANEXO 4 verifica-se que as maiores respostas à luz variaram entre linhagens, o que está refletido na significância das interações duplas na análise conjunta da variância (ANEXOS 6).

Mesmo que a luminosidade estimule a esporulação, a produção máxima de cada linhagem foi obtida em condições específicas de tipo de luz e meio de cultura. Este fato é demonstrado estatisticamente pela significância da interação tripla na análise conjunta da variância (ANEXO 7). Na TABELA 4 são especificados os tratamentos que proporcionaram as 12 maiores produções de conídios.

A TABELA 5 resume os acréscimos médios obtidos com iluminação e ainda, o melhor tratamento luminoso. A linhagem A_4 , por exemplo, produz 168% mais se iluminada, e 350% mais se iluminada com luz azul.

Tabela 4 . Tratamentos que produziram o maior número de coní
dios e significância entre as médias dos trata-
mentos.

Linhagem	Meio de cultura	Tipo de luz	Produção de esporos ($\times 10^7$)	Significância 1%
A ₄	MA	Azul	214,0	<i>a</i>
E ₉	MC	Vermelho	173,7	<i>b</i>
M	MC	Verde	171,9	<i>bc</i>
M	MC	Amarela	169,9	<i>bcd</i>
E ₉	MC	Azul	166,8	<i>bcde</i>
M	MC	Vermelho	160,4	<i>bcdef</i>
E ₉	MC	"BL"	144,5	<i>bcdef</i>
M	MC	Azul	142,3	<i>cdef</i>
E ₉	MC	Verde	139,6	<i>def</i>
M	MC	Dia	138,7	<i>ef</i>
A ₄	MA	Amarela	134,1	<i>f</i>
M	MA	"BL"	133,0	<i>f</i>

(¹) Médias acompanhadas com letras iguais não diferem entre si significativamente, segundo teste de Tukey.

Tabela 5. Produção de conídios ($\times 10^7$) de seis linhagens de *M. anisopliae* com luz e sem luz, o acréscimo (%) proporcionado pelo efeito da luz, e ainda, o tratamento luminoso com maior resposta em relação a testemunha (sem luz)

Tratamento	A ₄	A ₁₉	E ₉	K	M	P
S/luz	20,8	6,0	37,8	4,3	44,1	19,5
C/luz	55,8	14,7	78,8	7,2	95,9	37,5
$\Delta(\%)$	168	145	108	67	117	92

Tratamento	Azul	Dia	Vermelho	Dia	Amarelo	Verde
com >						
resposta	93,4	21,4	91,5	10,1	103,3	48,4
$\Delta(\%)$	350	260	140	130	130	150

4.2 CRESCIMENTO RADIAL

O crescimento radial (diâmetro das colônias) das linhagens A₄, A₁₉, E₉, K, M e P são mostradas nas FIGURAS 5 e 6. Estes resultados são visualizados em três meios de cultura com todos os tratamentos luminosos. Os dados originais encontram-se nos ANEXOS 8, 9 e 10. O ANEXO 11 mostra todas as médias dos diversos tratamentos isolados ou combinados.

As FIGURAS 5 e 6 visualizam as diferenças existentes entre o diâmetro das colônias das linhagens sob os diversos tratamentos. Essa variação é estatisticamente significativa entre algumas linhagens, quando comparadas através da diferença mínima significativa (DMS) mostrada no ANEXO 12.

As linhagens tem crescimento radial diferente, como pode ser verificado no tratamento testemunha (escuro) em

A₁₉ E₉

MC BDA MA

Figura 5: Diâmetro de colônias das linhagens A₄, A₁₉ e E₉ em três meios de cultura com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro).

MC BDA MA

Figura 6: Diâmetro de colônias das linhagens K, M e P em três meios de cultura com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro).

todos os meios de cultura. Em MC, as linhagens K e M tiveram diâmetro maior e a linhagem P o menor, em BDA as linhagens K e M foram as maiores e menores respectivamente; A₄, E₉ e K tiveram o diâmetro maior e P o diâmetro menor, em MA.

Todos os tratamentos com luz aumentaram a média do diâmetro das colônias, quando as linhagens foram cultivadas em MC, porém, nenhuma média foi significativamente maior que o valor médio obtido no escuro (46,8mm). Em BDA e MA, alguns tipos de luz aumentaram e outros diminuíram a média do diâmetro, mas em nenhum caso essas diferenças foram estatisticamente significativas. Essas médias encontram-se no ANEXO 11.

Quanto aos meios de cultura, em média, todos mostraram resultados diferentes estatisticamente. O MC proporcionou o maior crescimento (50,2mm), BDA intermediário (44,7mm) e MA o menor (38,0mm).

Os resultados diferenciais, encontrados para cada combinação dos tratamentos, são refletidos na significância estatística da interação linhagem x luz x meio de cultura (ANEXO 12). Essa informação impede generalizações sobre as melhores condições para caracterizar o crescimento de linhagens, mas a grosso modo o menor e maior crescimento foram das linhagens P e K respectivamente.

Os tratamentos que produziram o maior crescimento radial estão na TABELA 6.

4.3 TAXA DE PRODUÇÃO DE CONÍDIOS

A taxa de produção de conídios ou taxa de esporulação, calculada conforme metodologia descrita no item 3.7.3, é expressa em número de conídios $\times 10^7/\text{cm}^2$. Os resultados de todos os tratamentos são mostrados no ANEXO 15 e correspondem as FIGURAS 7, 8 e 9

Tabela 6 . Tratamentos que apresentaram os doze maiores crescimentos radiais e significância entre as médias dos tratamentos (¹).

Linhagem	Meio de cultura	Tipo de luz	ϕ da colônia(mm)	Significância 1%
K	MC	Vermelho	59,3	<i>a</i>
K	MC	Verde	59,3	<i>a</i>
K	MC	Amarelo	57,0	<i>ab</i>
E ₉	MC	Azul	56,6	<i>abc</i>
A ₁₉	MC	Amarelo	55,0	<i>bcd</i>
K	MC	"BL"	54,3	<i>bcd</i>
M	MC	Amarela	54,3	<i>bcd</i>
K	BDA	Escuro	54,0	<i>bcd</i>
M	MC	Vermelho	54,0	<i>bcd</i>
K	BDA	Dia	53,6	<i>cd</i>
K	BDA	Verde	53,3	<i>d</i>
K	MC	Escuro	53,3	<i>d</i>

(¹) Médias acompanhadas com letras iguais não diferem entre si significativamente, segundo teste de Tukey.

Figura 7: Produção de conídios, por unidade de área, das linhagens A₄ e A₁₉ em três meios de cultura com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro).

Pg do Protocolo

38
7

Figura 8: Produção de conídios, por unidade de área, das linhagens E₉ e K em três meios de cultura com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro).

Figura 9: Produção de conídios, por unidade de área, das linhagens M e P em três meios de cultura com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro).

A linhagem A_4 tem taxa de esporulação relativamente alta em MC, BDA e MA. A linhagem P tem comportamento intermediário quanto a essa característica em BDA, ruim em MA e relativamente alto em MC. Porém as duas apresentam respostas altamente positivas à iluminação, em MA, principalmente sob luz azul.

As linhagens A_{19} e K tem baixa taxa de esporulação em MC e BDA, porém, é parcialmente recuperada em MA mas com respostas pequenas à luz.

Quanto as linhagens E_9 e M a taxa de esporulação é alta em MC, mas é baixa em BDA, mas, tem um aumento relativo se as linhagens crescem sob luz. Em MA, no escuro, as duas tem baixa taxa de esporulação, porém a linhagem M aumenta substancialmente quando iluminada, e a linhagem E_9 tem respostas moderadas à luz.

De modo geral, observa-se que o MA permite às linhagens aumentar substancialmente a produção de conídios, sob iluminação, principalmente com luz azul, dia, "BL" e amarela. Em MC e BDA os acréscimos são relativamente pequenos.

4.4 VIABILIDADE DOS CONÍDIOS

Os resultados de influência da qualidade da luz na viabilidade da linhagem E_9 estão na TABELA 7. A análise estatística utilizando-se o teste χ^2 é mostrada na TABELA 8. Através destes dados constata-se que, com exceção da luz "BL" as demais diminuem significativamente a viabilidade dos conídios.

Tabela 7 Efeito da qualidade da luz na viabilidade de conídios de *M. anisopliae*, linhagem E₉, cultivada em M.C.⁽¹⁾

Tipo de luz	Conídios germinados	Conídios não germinados	Total	Germinação (%)
	nº			
Escuro	543	228	771	70,4
"B1"	641	306	947	67,5
Azul	400	411	811	49,6
Verde	486	341	827	58,8
Amarelo	514	415	929	55,7
Vermelho	539	402	941	57,1
Dia	524	453	877	59,7

(¹) Média de três repetições

Tabela 8. Valores de χ^2 e sua respectiva significância comparando a viabilidade de conídios produzidos sob seis tratamentos de luz com a testemunha (escuro)

	"BL"	Azul	Verde	Amarelo	Vermelho	Dia
Escuro (testemunha)	1,6ns	72,4**	24,1**	41,3**	31,8**	18,7**

ns - Não significativo

** - Significativo a 1% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS

Os ensaios, conduzidos para medir produção de conídios, apresentaram dados dispersos (ANEXOS 1, 2 e 3) e coeficientes de variação relativamente altos (ANEXOS 5, 6 e 7), porém, similares aos encontrados na literatura (ALVES, 1982, ALVES e MORAES, 1979, CAMPBELL *et al.*, 1983 e outros). A precisão dos ensaios é prejudicada pelo erro provocado na contagem de conídios, através da Câmara de Neubauer, e pelas interações genótipo x micro-ambiente, consequência alta plasticidade fenotípica encontrada nos organismos em que prevalece a reprodução assexual.

A variabilidade encontrada entre as seis linhagens, para a capacidade de esporulação, foi bastante alta e mais evidenciada em MC e BDA (ANEXO 4). Essa variação pode ter várias causas. O "background" genético seria uma explicação. As seis linhagens foram isoladas de insetos coletados

em ambientes naturais. Nessas condições, para manterem-se viáveis, necessitam gerar um bom potencial de inóculo; portanto, todas devem ter competência genética para esporular, dependendo apenas de estímulos ambientais para isso. Este fato ficou demonstrado quando foram cultivadas sobre MA.

Essas linhagens foram mantidas em laboratório, desde seu isolamento, em meios de cultura ricos, que exigem repicagens frequentes e favorecem o crescimento micelial. Este processo leva a degeneração de linhagens que se inicia com a perda gradativa da conidiogênese. Em *M.anisopliae* diminuição da produção de conídios e alterações morfológicas após repicagens sucessivas foram descritas por MURAYAMA *et al.* (1982). Portanto, é provável que a variabilidade na produção de conídios seja muito mais consequência de um processo de degeneração, causado pela desativação de genes responsáveis pela esporulação, do que "background" genético muito diferentes, uma vez que, linhagens mais velhas produziram menos conídios em ME e BDA, mas recuperaram a capacidade esporulação em MA (ANEXO 4), onde possivelmente houve reativação dos genes responsáveis pela conidiogênese.

Se analisarmos o comportamento no escuro (ANEXO 4), verificamos que as linhagens A₁₉ e K praticamente não produziram conídios em MC e BDA, mas se cultivadas em MA esporularam bem; a linhagem A₄ alterou pouco a quantidade de conídios produzidos nos três meios de cultura, e as linhagens E₉, M e P diminuíram em dez vezes a produção de conídios se cultivadas em MA, quando comparadas às produções no MC. Essas variações são resultado da interação genótipo x meio de cultura provocada por respostas diferenciais das linhagens às composições do meio de cultura, este comportamento também foi relatado por FRIGO (1984). Portanto, linhagens que normalmente esporulam bem, fizeram-no melhor em MC, mas aquelas que produziram poucos conídios em MC e BDA recuperaram a capacidade de esporulação em MA.

As diferenças na produção de conídios total ou por unidade de área, nos diferentes meios de cultura (ANEXOS 4 e 15), podem ser provocadas por vários componentes desses meios.

Inicialmente as fontes de C, uma vez que o metabolismo de carboidratos está ligado ao processo de esporulação (DALBERG e VAN ETEN, 1982) e no caso específico de *M. anisopliae* respostas diferentes à carboidratos foram relatadas por CAMPBELL, 1983. No presente trabalho utilizaram-se fontes de C em quantidade e qualidade diferentes, 10g de glicose em MC, 20g de dextrose e algum amido solúvel em BDA, e cerca de 48g de amido em MA.

Fontes de N diferentes também alteram a esporulação (ROBERTS, 1966; BARNES *et al.* 1975 e CAMPBELL *et al.* 1978); como MC, BDA e MA contêm diferentes tipos de compostos nitrogenados (item 3.2), estes podem ter contribuído para as diferenças encontradas na produção de conídios; assim como, a relação C:N que, comparativamente, é baixa em MC, intermediária em BDA, e alta em MA. Também podem ter afetado a produção de conídios sais, vitaminas, etc., existentes nos meios de cultura mas não identificados, uma vez que, estes meios são quimicamente definidos.

Na produção, em larga escala, de conídios de *M. anisopliae* parece estar definitivamente implantada a utilização do meio de cultura a base de arroz, devido ao baixo custo, fácil manuseio e manutenção da virulência dos esporos, portanto seriam convenientes estudos, sobre esse meio de cultura, que permitissem determinar a melhor relação C:N e uma fonte de N eficiente com baixo custo.

Cabe ainda ressaltar a possível eficiência do MA, para estocagem das linhagens que recuperam a capacidade de esporulação nesse meio de cultura, já que na reprodução vegetativa o processo de senescência é atenuado quando feita através de esporos, em vez de pedaços de micélio.

Apesar dos vários trabalhos encontrados na literatura, sobre meios de cultura e produção de conídios, em *M. anisopliae*, é praticamente impossível a comparação dos dados absolutos entre si. A falta de uma uniformização mínima na composição do meio de cultura, condução de experimentos, métodos de amostragem na avaliação da produção, e principalmente, a utilização de linhagens diferentes que interagem de maneira diversa com o meio de cultura, como mostram os resultados deste trabalho geralmente, permitem apenas comparações relativas. E em termos de comparação relativa, AQUINO (1974) e DAOUST e ROBERTS (1983) encontram resultados mais favoráveis a MA na produção de conídios, quando comparados com BDA, o que também ocorreu neste trabalho. Analisando a taxa de produção de conídios por cm^2 , em MA e MC, os resultados aqui encontrados (ANEXO 15) são similares aos encontrados por FRIGO (1984) para as linhagens A_4 e K, mas discordantes para as linhagens E_9 em MC e M em MA, porém esses resultados podem não diferir entre si significativamente, ou foram influenciados por modificações no meio de cultura.

O aumento na esporulação, sob iluminação, é função dos nutrientes do meio de cultura, da capacidade de linhagem responder a iluminação, da fonte de luz e das interações entre esses três fatores.

As linhagens E_9 , M e P quando iluminadas, em MC, principalmente com luz "BL", azul, verde e vermelha e ainda amarela aumentam a produção total de conídios (ANEXO 5, FIGURAS 2, 3 e 4), geralmente de duas maneiras: a) ampliando a área de esporulação da colônia (ANEXO 11, FIGURAS 8 e 9), b) aumentando a taxa de esporulação por cm^2 (ANEXO 15, FIGURAS 6 e 7). Quando comparamos a produção de conídios destas linhagens, no escuro e sob certos tipos de iluminação, em MC, com as mesmas condições em MA, verifica-se que, em MC a resposta à luz foi menor que em MA. Possivelmente, essa menor resposta à luminosidade está ligada a composição dos meios de

cultura. MC tem grande diversidade de nutrientes e, possivelmente algumas substâncias com efeito mimético parcial em relação à luz.

Quanto a linhagem P mostrou as maiores respostas à luz em MA, não apresentou altas produções de conídios, porque, em MA, diminuiu sensivelmente o crescimento, mas teve a taxa de produção de conídios aumentada de 12 a 37 vezes. Portanto, a característica de hipersensibilidade à luz pode ser incorporada à outras linhagens em programas de melhoramento tendo a linhagem P como doadora de genes.

Quando as linhagens E_9 , M e P foram cultivadas em BDA, no escuro, tiveram uma esporulação relativa, e mostraram respostas satisfatórias à luminosidade, com exceção, da linhagem P, que manteve ou diminuiu a produção total e a taxa de produção de conídios sob luz vermelha e dia.

As linhagens A_{19} e K somente a primeira, mostrou uma relativa sensibilidade a luz, em MC e BDA, principalmente à luz "BL", verde e dia. Em MA, esporularam comparativamente bem, no escuro, mas foram pouco sensíveis aos efeitos luminosos (ANEXOS 4 e 15; FIGURAS 3, 4, 5 e 6). Possivelmente, este comportamento é consequência de uma ausência natural de sensibilidade à luz ou do processo de estocagem. As repicagens sucessivas podem ter provocado uma seleção negativa ou desativação dos mecanismos sensíveis à luz. Quando A_{19} e K foram cultivadas em MA os estímulos luminosos podem ter sido parcialmente substituídos por um componente quantitativo ou qualitativo do meio de cultura.

A linhagem A_4 teve um comportamento peculiar, mostrou resultados similares nos três meios de cultura, sem iluminação. Em MC e BDA, respondeu discretamente aos efeitos da luz, porém, quando cultivada em MA, aumentou a taxa de produção de conídios em onze vezes. Esses resultados vem reunir-se aos apresentados por AZEVEDO e MESSIAS (1981) e aos estudos citológicos feitos por LUNA (AZEVEDO, comunicação pessoal), caracterizando a linhagem A_4 com perfil bastante diferentes das demais.

As condições específicas, que determinam a maior produção de conídios, para cada linhagem, entre outras causas já citadas, talvez estejam refletindo a situação do seu local de origem. Portanto, linhagens podem responder de maneira distinta à fonte de luz, que envolve a qualidade e intensidade, e ao meio de cultura, porque, possivelmente, estão adaptadas a condições geográficas, ecológicas e hospedeiros diferentes.

Face as fontes de luz utilizadas e as respostas obtidas, não é possível saber quais são as faixas de comprimento de onda específicas que estimulam a esporulação, porque nas lâmpadas utilizadas há sobreposição dessas faixas (TABELA 2). Há ainda que considerar-se o efeito da potência de cada lâmpada (TABELA 3), e outras interações como: luz x linhagem x potência, que podem dissimular os resultados.

Os efeitos da potência de cada fonte de luz são diretamente responsáveis pelo sucesso ou fracasso do tratamento luminoso, como ficou demonstrado nos trabalhos de LEACH (1962) e JEREBZOFF e JACQUES (1972). Normalmente, radiações com comprimento de onda menor são mais eficientes do que radiações com comprimento de onda maior, ainda que tenham intensidade similar. Este fato pode explicar a eficiência aquém do esperado da lâmpada luz do dia, que, embora emitindo ampla faixa de comprimentos de onda, possivelmente, tem baixa potência nos picos de luz que estimulam a esporulação. Portanto, seriam altamente esclarecedores estudos sobre a intensidade de luz mais conveniente para a produção de conídios.

O fungo *M. anisopliae*, no caso das linhagens estudadas, mostrou resposta a todos os comprimentos de onda examinados (340 a 700nm). Este comportamento pode ser compreendido se admitirmos que possui vários fotorreceptores sensíveis a essas radiações e/ou que, esses compostos químicos são sensíveis a comprimentos de onda simultaneamente, como no caso das porfirinas.

Sob o ponto de vista evolucionário, parecem existir vantagens para fungos entomopatogênicos que sejam estimulados à esporular por radiações visíveis e ultravioleta. Inicialmente, aumentando o potencial de inóculo, de maneira quantitativa e qualitativa, uma vez que, os resultados encontrados por ALVES *et al.* (1980 e 1983) mostram que conídios produzidos sob determinados tipos de luz podem ser mais patogênicos. Posteriormente porque a luz pode estimular a produção de carotenóides, como já foi relatado em *Neurospora crassa* (BLANC *et al.* 1976), cuja principal função, provavelmente, é proteger as células dos efeitos deletérios da fotooxidação (JANSEN, 1965). Portanto selecionar linhagens com mais carotenóides ou mais sensíveis do estímulo da luz na sua síntese, pode ser um caminho para obter linhagens mais resistentes aos efeitos letais da própria luz. Esta característica tem alto interesse em material a ser pulverizado em condições de campo.

Comprimentos de onda do espectro ultravioleta e visível influenciando o comportamento de fungos entomopatogênicos, além de *Entomophthora coronata* e *M. anisopliae* já citados, também são relatados em *Beauveria bassiana* por ALVES e MORAES (1979), ALVES *et al.* (1979) e NEGREIROS *et al.* (1980).

5.2 CRESCIMENTO RADIAL

Os ensaios, conduzidos para medir o crescimento radial, tem coeficientes de variação relativamente baixos, refletindo o bom controle ambiental dos experimentos (ANEXOS 12, 13 e 14).

O crescimento radial significativamente diferente entre linhagens (ANEXO 11, FIGURAS 8 e 9), pode expressar hábitos ou magnitudes de crescimento diferentes, mas de modo geral não é correlacionado com a produção de conídios. O diâmetro da colônia não está, necessariamente, ligado ao crescimen

to global da linhagem, e sim ao seu hábito de crescimento. Certas linhagens, cujo desenvolvimento micelial é preferencialmente aéreo, tem diâmetro menor do que outras, nas quais o micélio cresce aderente ao meio de cultura, portanto, as primeiras podem ter crescimento total maior e diâmetro menor, o inverso também pode acontecer com as linhagens do segundo tipo.

Os meios de cultura foram os principais responsáveis pelo diâmetro das colônias (ANEXO 11). MC permitiu o maior crescimento radial, possivelmente, por ser o mais rico em nitrogênio. MA e BDA tem quantidades bastante inferiores, portanto, o menor crescimento, em MA, talvez seja porque parte do nitrogênio é encaminhado para o processo de esporulação, ao passo que, em BDA, deve ser utilizado no crescimento micelial.

A influência da luz, no crescimento radial, foi positiva ou negativa, dependendo da linhagem e do meio de cultura. Não foi possível estabelecer uma regra geral sobre seus efeitos. Em MC, apenas a linhagem K, sob luz azul, diminuiu o diâmetro das colônias, nos demais tratamentos foi igual ou maior. Uma vez que, o número de conídios produzidos também foi maior sob iluminação, a luz deve ativar o metabolismo e permitir maior eficiência no aproveitamento dos nutrientes do meio de cultura.

Em BDA, em média, não houve diferenças no crescimento radial das colônias, com e sem iluminação, mesmo que cinco linhagens diminuíram o diâmetro das colônias, porque a linhagem A₁₉ foi estimulada a crescer principalmente por luz "BL", vermelha e dia. ALVES *et al.* (1980), estudando o efeito da cor da luz em uma linhagem cultivada em BDA não encontrou alterações no diâmetro das colônias, portanto modificar ou não o crescimento radial, sob diferentes cores de luz, é característica de cada linhagem em particular.

5.3 VIABILIDADE DE CONÍDIOS

A luz afetou a viabilidade de conídios na linha gem E₉, de maneira significativa, quando comparados com o escuro, com exceção da lâmpada "BL" (TABELAS 7 e 8). A diminuição da viabilidade é, provavelmente, causada por efeitos letais provocadas por radiações do espectro visível. Ainda que, a intensidade luminosa usada não tenha sido excessivamente alta, a iluminação contínua possivelmente teve efeito cumulativo aumentando seus efeitos letais. Estas consequências negativas das radiações visíveis são amplamente demonstradas na literatura (LEFF e KRINSKI, 1967, WEBB e MALINA, 1967, BLANC *et al.*, 1976, e outros).

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que se desenvolveram os experimentos os resultados obtidos permitem apresentar as seguintes conclusões:

- a) A luz U.V. e visível estimulam a esporulação;
- b) A interação linhagem x meio de cultura x fonte de luz determinam o máximo rendimento de produção de conídios;
- c) Linhagens que esporulam mal em BDA e MC podem recuperar a capacidade de esporulação em MA;
- d) A luz visível diminui a viabilidade dos conídios.

7. LITERATURA CITADA

- ADAIR, C.R., 1972. Production and utilization of rice. In:
HOUSTON, D.F., ed. Rice Chemistry and Technology. Cap. I
(p.10).
- AL-AIDROOS, K., 1980. Demonstration of parasexual cycle in
the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Canadian Journal of Genetic and Cytology 22:309-314.
- AL-AIDROOS, K. e A.M. SEIFERT, 1980. Polysaccharide and
protein degradation, germination, and virulence against
mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium*
anisopliae. Journal of Invertebrate Pathology 36:29-34.
- ALVES, S.B., 1982. Caracterização, padronização e produção
de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba
ESALQ/USP, 95p. (Tese de livre-docência).

- ALVES, S.B. e S.A. de MORAES, 1979. Influência da luz sobre o crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Ecossistema 4:43-50.
- ALVES, S.B., J.M. MILANEZ e P. KASTEN JR., 1979. Influência do fotoperíodo no crescimento e esporulação do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 8(2):203-206.
- ALVES, S.B., L.C. FORTI e F.J. CIVIDANES, 1980. Influence of light color on some biological activities *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. Revista Brasileira de Entomologia 24:123-125.
- ALVES, S.B., S.H. RISCO, L.C. ALMEIDA, 1983. Lamp effect of different colors, temperatures and photoperiods on the production and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Isolate PL-5. Entomology Newsletter 14:2-3.
- 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.
- AZEVEDO, J.L. e C.L. MESSIAS, 1981. Tamanho de conídios em diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico 2:5-8.

- BARBOSA, F.R. e W.A. MOREIRA, 1983. Efeitos de sucessivas repicagens em arroz na virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin em *Deois flavopicta* (Stal). In: VIII Congresso Brasileiro de Entomologia (resumos). Brasília p. 247.
- BARNES, G.L., D.J. BOETHEL, R.D. EIKENBARY, J.T. CRISWELL e C.R. GENTRY, 1975. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptona sources. Journal of Invertebrate Pathology. 25:301-305.
- BASTOS, C.N. e E.A.F. MATTA, 1976. Influência da temperatura e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. Boletim do Instituto Biológico da Bahia 15:5-8.
- BASTOS, C.N., E.A.F. da MATTA e J.M. de FIGUEIREDO, 1976. Esporulação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, em meio de cultura de diferentes composições. Boletim do Instituto Biológico da Bahia 15:9-11.
- BLANC, P.L., R.W. TUVESON e M.L. SARGENT, 1976. Inactivation of carotenoid - producing and albino strain of *Neurospora crassa* by visible light, black light and ultraviolet radiation. Journal of Bacteriology 125:616-625.
- BULL, A.T. e A.P.J. TRINCI. 1977. The physiology and metabolic control of fungal growth. In: ROSE, A.H. e D.W. TEMPEST, ed. Advances in Microbial Physiology 15:1-83.

- CAMPBELL, R.K., G.L. BARNES, B.O. CARTWRIGHT e R.D. EIKENBARY, 1983. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate sources. Journal of Invertebrate Pathology 41:117-121.
- CAMPBELL, R.K., T.M. PERRING, G.L. BARNES, R.D. EIKENBARY e C.R. GENTRY, 1978. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on media containing various amino acids. Journal of Invertebrate Pathology 31: 289-295.
- CHENG, W.Y. e CHEN, C.B., 1962. Preliminary studies on Green Muscardine fungus. Rep. Taiwn Sug Exp. Stn. 29:72-73.
Apud: VEEN, K., 1968. Recherches sur la maladie, due a *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pelerin. Wageningen. 77p. Mededelingen Landbowhogeschool 68-5.
- COHEN, R.J., 1974. Cycliz AMP levels in *Phycomyces* during a response to light. Nature 251:144-46 Apud: DAHLBERG, K.R. e J.L. van ETEN, 1982. Physiology and biochemistry of fungal sporulation. Annual Reviews Phytopathology 20:281-301.
- CONTI, E. de, C.L. MESSIAS, H.M.L. de SOUZA e J.L. AZEVEDO, 1980. Electrophoretic variation in esterase and phosphatase in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. Experientia 36(3):293-294.

- CORREA, G.S., 1983. Influência da radiação ultravioleta e solar na viabilidade de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 84p. (Dissertação de Mestrado).
- DAHLBERG, K.R. e J.L. van ETEN, 1982. Physiology and biochemistry of fungal sporulation. Annual Reviews Phytopathology 20:281-301.
- DAOUST, R.A. e D.W. ROBERTS, 1983. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: effect of growth substrate on conidial against mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology 41:161-170.
- DURAND, R., 1976. Influence des radiations lumineuses sur les processus de reproduction des champignons; hypotheses sur l'identite des photorecepteurs. Revue Bibliographique. Mycopathologia 60:3-16.
- FARGUES, J. e P.H. ROBERT, 1983. Influence de l'antécédent nutritionnel sur la virulence de deux souches de l'hyphomycete entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Mycopathologia 81:145-154.
- FARGUES, J., P.H. ROBERT, A. VEY, 1976. Rôle du tegument et de la défense cellulaire des Coléoptères hotes dans la specificité des souches entomopathogenes de *Metarhizium anisopliae* (fungi imperfecti). C R Acad. Sū. Ser. D. 181: 2223-26. Apud: FERRON, P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review Entomology 23:409-442.

- FERRON, P., 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual Review Entomology 23:409-442.
- FRAIKIN, G.Y. e L.B. RUBIN, 1979. Some physiological effects of near-ultraviolet light in microorganisms. Photochemistry and Photobiology 29:185-187
- FRIGO, S.M., 1983. Variabilidade e fusão de protoplastos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 116p. (Tese de Doutorado).
- HIENTON, T.E., 1974. Summary of investigations of electric insect traps. United States Department of Agriculture. Washington. 150p. (Technical Bulletin nº 1498).
- JENSEN, S.L., 1965. Biosynthesis and function of carotenoid pigments in microorganisms. Annual Review of Microbiology 19:163-182.
- JEREBZOFF, S. e R. JACQUES, 1972. Equal quantal spectra for the effect of light on the growth of conidiophores and for the induction of a circadian rhythm of zonation in *Sclerotinia fruticola*. Plant Physiology 50:187-190.
- JOHNSTON, J.R., 1915. The entomogenous fungi of Porto Rico. Government of Porto Rico Board of Commissioners of Agriculture. Rio Pedras Bulletin 10:26-28 p. Apud: TULLOCH, M., 1976. The genus *Metarhizium*. Transactions British Mycological Society 66:407-411.

- KUMAGAI, T., 1978. Mycochrome system and conidial development in certain fungi imperfecti. Photochemistry and Photobiology 27:371-379.
- LATCH, G.C.M., 1965. *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. New Zealand Journal of Agricultural Research 8:384-396.
- LATGÉ, J.P. e G. REMAUDIERE, 1974-1975. Croissance et esporulation de six espèces d'Entomophthorales. III. Influence des concentrations de carbone et d'azote et du rapport C/N. Revue de Mycologie. 39:239-250.
- LEACH, C.M., 1965. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. Canadian Journal of Botany 43:185-200.
- LEACH, C.M., 1971. A practical guide to the effects of visible and ultraviolet light on fungi. In: BOOTH, C. ed. Methods in Microbiology, vol. IV, 609-664.
- LEACH, C.M. e E.J. TRIONE, 1965. An action spectrum for light induced sporulation in the fungus *Ascochyta pisi*. Plant Physiology 40:808-812.
- LEFF, J. e N.I. KRINSKI, 1967. A mutagenic effect of visible light mediated by endogenous pigments in *Euglena gracilis*. Science 158:1332-1334.

- MARQUES, E.J. e A.M. VILASBOAS, 1973. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* no controle da cigarrinha da folha (*Mahanarva posticata* Stal) no nordeste do Brasil. In: Anais da Primeira Reunião Anual da Sociedade Entomológica do Brasil, Viçosa, MG, p. 70.
- MATTA, E.A.F. da e M.Z.A. de OLIVEIRA, 1978. Efeito da luz na esporulação do fungo *M. anisopliae* (Metsch) Sorok, "in vitro". In: V Congresso Brasileiro de Entomologia (resumos). Ilhéus - Itabuna.
- MESSIAS, C.L., 1979. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 73p. (Tese de Doutorado).
- MESSIAS, C.L. e J.L. de AZEVEDO, 1980. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Transactions of British Mycological Society, 75:473-477.
- MOURA COSTA, M.D., E.A.F. MATTA, C.D. MAGALHÃES e D.P. MATOS, 1974. Nova técnica para a produção em larga escala do fungo *Metarhizium anisopliae* em laboratório. Boletim do Instituto Biológico da Bahia 13:85-89.
- MURAYAMA, M.Y., S.B. ALVES e L.C. de ALMEIDA, 1982. Efeito de repicagens em meio de arroz na patogenicidade, morfologia e produção de esporos em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico 3:5.

- NEGREIROS, J., S.B. ALVES, M.J.M. FERREIRA e L.A.S. MENTEN, 1980. Influência de luzes de diferentes cores na esporulação de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. Ecossistema 5:88-91.
- OGAWA, J.M., J.D. GILPATRICK, J.K. UYEMOTO e G.S. ABAWI, 1978. Variations in fungal growth on various preparations of potato-dextrose-agar media. Plant Disease Report 62:437-441.
- PAGE, R.M., 1965. The physical environment for fungal growth. In: AINSWORTH, G.G. e A.S. SUSSMAN, Ed. The fungi. vol. 2. cap. 23:559-574.
- PAGE, R.M. e J. BRUNGARD, 1961. Phototropism in *Conidiobolus*, some preliminary observations. Science 134:773-774.
- PALL, M.L., 1981. Adenosine 3', 5' Phosphate in fungi. Microbiological Reviews 45:462-480.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONDS, K.D. McDONALD e A. W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics 5:141-238.
- PRESTI, D., W. HSU e M. DELBRUCK, 1977. Phototropism in *Phycomyces* mutants lacking β -caroteno. Phytochemistry and Photobiology 26:403-405.

- PREVOST-MONNOT, F., 1974. Recherches sur la sporulation de *Pilobolus kleinii* Van Tiegh. (Mucorale) et sa photo-induction. Thèse Paris Sud (Orsay). Apud: DURAND, R., 1976. Influence des radiations lumineuses sur les processus de reproduction des champignons; hypotheses sur l'identite des photorecepteurs. Revue Bibliographique. Mycopathologia 60:3-16.
- ROBERTS, D.W., 1966. Toxins from the entomogenous fungus *M. anisopliae*. I. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. Journal of Invertebrate Pathology 8:212-221.
- RORER, J.B., 1913. The use of the green muscardine in the control of some sugar-cane pests. Phytopathology 3:88-92. Apud: VEEN, K.H. 1968. Recherches sur la maladie, due a *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. Wageningen, 77p., Mededelingen. Landbouwhogeschool. 68-5.
- SANTOS, A.L.L., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok., Piracicaba, ESALQ/USP, 148p. (Dissertação de Mestrado).
- SCHAERFFENBERG, B., 1959. Zur Biologie und Ökologie des insektentötenden Pilzes *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor. Z. angew Ent. 44:262-271 Apud: VEEN, K.H., 1968. Researches sur la maladie, due a *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. Wageningen. 77p., Mendedelingen Landbouwhogeschool 68-5.

- SILVA, J.C. e C.L. MESSIAS, 1984. Virulência de alguns mutantes de *M. anisopliae* em *Rhodnius prolixus* e obtenção de revertentes. In: XI Reunião Anual de Genética de Microorganismos. Londrina (resumo 20).
- SILVA, J.C., C.L. MESSIAS e I.R. BARACHO, 1982. Tamanho de conídios e produção de algumas enzimas extra-celulares de *Metarhizium anisopliae* proveniente de inseto e meio de cultura. In: IX Reunião Anual de Genética de Microorganismos. Brasília p. 11.
- TAN, K.K., 1975. Interaction of near-ultraviolet, blue, red and far-red light in sporulation of *Botrytes cinerea*. Transactions British Mycological Society 64:215-222.
- TINLINE, R.D. e C. NOVIELLO, 1971. Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Mycology 63: 701-712.
- TRYON, H., 1914. Cane grub and muscardine fungus at Cairns. Qd. agric. J. 2:(Nº 6):402-406. Apud: VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie, due a *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. Wageningen. 77p., Mendedelingen Landbouwhogeschool 68-5.
- TULLOCH, M., 1976. The genus *Metarhizium*. Transactions British Mycological Society 66:407-411.

- VALADARES, M.C.C. e M.A. ALVES, 1983. Esporulação de *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin, cultivado em arroz em presença e ausência de luz. In: VIII Congresso Brasileiro de Entomologia (resumos). Brasília p.244.
- VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie, due a *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. Wageningen. 77p. Mededelingen Landbouwhogeschool 68-5.
- VILACORTA, A., 1978. Efeito da temperatura e nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolados de *Metarhizium anisopliae*. In: III Congresso Latinoamericano de Entomologia (resumos), Bahia, p.70.
- VOUK, V. e Z. KLAS, 1931. Conditions influencing the growth of the inseticidal fungus. *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor. Int Corn Borer Inv. 4:24-45. Apud: VEEN, K.H. 1968. Recherches sur la maladie, due a *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. Wageningen. 77p. Mededeling. Landbouwhogeschool. 68-5.
- ZIMMERMANN, G., 1982. Effect of hight temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 40:36-40.
- WEBB, R.B. e M.M. MALINA, 1967. Mutagenesis of *Escherichia coli* by visible light. Science 156:1104-1105.

Anexo 1 . Produção de conídios ($\times 10^7$), em MC, de seis linhagens de *M. anisopliae* com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), após dez dias de incubação.

Tipo de luz	Repetições	Linhagens					
		A ₄	A ₁₉	E ₉	K	M	P
Escuro	1	28,2	0,0	85,0	0,0	114,2	31,4
	2	31,4	0,1	81,2	0,0	108,0	43,6
	3	28,4	0,0	80,8	0,0	115,0	37,8
"BL"	1	40,0	22,1	109,0	6,0	103,8	54,4
	2	18,7	5,8	167,6	3,8	146,0	60,0
	3	35,5	17,0	156,8	3,5	123,2	64,8
Azul	1	51,0	3,2	163,8	0,0	130,0	46,2
	2	47,3	11,8	180,4	0,0	158,0	49,0
	3	43,7	13,0	156,3	0,0	139,0	50,0
Verde	1	52,0	12,1	142,8	0,1	167,2	85,8
	2	45,0	12,4	144,0	0,0	196,2	85,0
	3	51,3	8,4	132,0	0,1	152,3	90,0
Amarelo	1	45,6	1,6	91,4	0,7	160,0	48,0
	2	43,2	2,5	92,8	0,1	183,2	45,6
	3	40,0	3,4	97,6	0,2	166,4	46,3
Vermelho	1	41,6	1,6	165,0	0,0	153,6	54,4
	2	40,8	0,3	173,6	0,0	135,6	53,6
	3	38,4	1,1	182,4	0,3	192,0	63,2
Dia	1	31,8	10,0	97,6	0,0	95,0	42,8
	2	27,0	15,4	72,3	0,8	160,0	37,0
	3	30,0	15,6	93,6	0,2	161,2	40,0

Anexo 2 . Produção de conídios ($\times 10^7$), em BDA, de seis linhagens de *M. anisopliae* com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), após dez dias de incubação.

Tipo de luz	Repetições	Linhagens					
		A ₄	A ₁₉	E ₉	K	M	P
Escuro	1	12,2	0,6	19,8	0,0	10,6	19,6
	2	13,4	0,1	19,2	0,0	7,8	24,0
	3	15,4	0,1	19,6	0,0	11,8	14,0
"BL"	1	12,0	9,6	34,4	0,1	10,3	13,6
	2	7,0	15,4	33,6	0,1	13,2	16,4
	3	13,2	9,5	29,2	1,4	9,8	15,2
Azul	1	17,6	0,3	25,4	0,0	58,2	13,2
	2	17,2	0,7	26,2	0,7	51,8	9,0
	3	21,8	0,2	29,6	0,1	44,0	15,4
Verde	1	26,0	3,0	63,8	0,1	63,8	15,0
	2	31,0	3,9	59,7	0,0	55,0	19,5
	3	26,4	1,2	45,7	0,0	66,0	18,6
Amarela	1	19,0	2,6	36,5	0,0	57,4	23,2
	2	17,4	2,0	40,2	0,1	52,0	21,2
	3	18,0	2,8	35,8	0,1	55,8	20,5
Vermelha	1	17,0	1,6	51,2	0,1	38,4	8,7
	2	23,2	0,3	48,6	0,1	36,0	8,6
	3	15,2	1,1	50,6	0,0	36,0	8,8
Dia	1	14,6	4,9	40,3	0,0	36,0	10,6
	2	16,8	1,8	43,4	0,2	26,8	8,4
	3	19,4	5,6	38,0	0,0	37,8	10,6

Anexo 3 . Produção de conídios($\times 10^7$), em MA, de seis linhagens de *M.anisopliae* com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), após dez dias de incubação.

Tipo de luz	Repetições	Linhagens					
		A ₄	A ₁₉	E ₉	K	M	P
Escuro	1	25,2	18,8	12,6	11,8	10,2	1,3
	2	14,2	18,6	10,8	12,4	10,0	1,9
	3	19,0	15,6	11,6	14,4	9,4	1,6
"BL"	1	108,3	31,6	46,5	22,6	100,4	40,6
	2	101,2	32,2	48,0	27,6	146,3	55,4
	3	76,6	26,0	54,5	21,6	152,3	44,0
Azul	1	240,0	35,4	68,3	13,6	111,0	58,3
	2	271,5	35,2	76,0	15,4	116,3	65,6
	3	130,4	25,8	71,8	14,4	112,8	55,6
Verde	1	69,4	39,4	63,3	22,8	62,0	43,0
	2	85,2	21,6	58,5	23,4	66,6	38,2
	3	75,6	39,6	58,0	25,0	60,8	40,6
Amarelo	1	161,7	43,1	66,7	25,2	88,4	28,2
	2	128,6	33,2	72,0	24,6	86,2	27,2
	3	112,0	26,0	61,0	18,6	80,2	47,6
Vermelho	1	32,6	13,8	46,3	7,0	40,3	21,0
	2	35,2	14,8	53,2	15,0	45,8	27,3
	3	36,4	15,6	52,7	5,6	51,2	20,0
Dia	1	97,5	48,4	76,8	29,1	123,3	49,4
	2	90,8	47,2	62,6	29,0	148,6	45,0
	3	105,0	43,4	68,6	31,5	115,8	42,8

Anexo 4 . Produção média de conídios ($\times 10^7$), de seis linhagens de *M. anisopliae* com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), utilizando-se três meios de cultura (¹).

Linha- gens	Tipos de luz						Média	
	Escuro	"BL"	Azul	Verde	Amarelo	Vermelho		
Meio completo								
A ₄	29,3	31,4	47,3	49,4	42,9	40,3	29,6	38,6
A ₁₉	0,0	15,0	9,3	11,0	2,5	1,0	13,7	7,5
E ₉	82,3	144,5	166,8	139,6	93,9	173,7	87,8	127,0
K ₉	0,0	4,4	0,0	0,0	0,3	0,1	0,3	0,8
M	112,4	124,3	142,3	171,9	169,9	160,4	138,7	145,7
P	37,6	59,7	48,4	86,9	46,6	57,1	39,9	53,8
Média	43,6	63,2	69,0	76,5	59,7	72,1	51,7	62,2
Batata-dextrose-agar								
A ₄	13,7	10,7	18,9	27,8	18,1	18,5	16,9	17,8
A ₁₉	0,3	11,5	0,4	2,7	2,5	1,0	4,1	3,2
E ₉	19,5	32,4	27,1	56,4	37,5	50,1	40,6	37,7
K ₉	0,0	0,5	0,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
M	10,1	11,1	51,3	61,6	55,1	36,8	33,5	37,1
P	19,2	15,1	12,5	17,7	21,6	8,7	9,9	15,0
Média	10,5	13,6	18,4	27,7	22,5	19,2	17,5	18,5
Meio de arroz								
A ₄	19,5	95,4	214,0	76,7	134,1	34,7	97,8	96,0
A ₁₉	17,7	29,9	32,1	33,5	34,1	14,7	46,3	29,8
E ₉	11,7	49,7	72,0	59,9	66,6	50,7	69,3	54,3
K ₉	12,9	23,9	14,5	23,7	22,8	9,2	29,9	19,6
M	9,9	133,0	113,4	63,1	84,9	45,8	129,2	82,8
P	1,6	46,7	59,8	40,6	34,3	22,8	45,7	35,9
Média	12,2	63,1	84,3	49,6	62,8	29,7	69,7	53,1
Média	22,1	46,6	57,7	51,3	48,1	40,3	46,3	44,6

(¹) Média de três repetições.

Anexo 5 . Componentes das análises da variância da produção de confídios (QMx10¹⁶, C.V., médias e DMS) de 21 experimentos realizados com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro) em três meios de cultura.

Fonte de variação	GL	Escuro	"BL"	Azul	Verde	Amarelo	Vermelho	Dia
Meio completo								
Linhagens	5	61,6336**	10,2868**	144,9843**	144,3658**	123,3363**	177,5475**	81,5541**
Resíduo	12	0,1008	2,7388	0,6704	0,9485	0,2741	1,5620	2,7407
CV (%)		6,5	26,2	11,9	12,7	8,8	17,3	32,0
Média(x10 ⁷)		43,6	63,2	69,0	76,5	59,7	72,1	51,7
DMS (x10 ⁷) ¹		10,7	55,8	27,6	32,8	17,7	42,1	55,8
Batata-dextrose-agar								
Linhagens	5	2,2948**	3,2712**	11,0830**	20,7801**	13,2600**	12,4485**	7,9872**
Resíduo	12	0,0535	0,0599	0,1214	0,2321	0,0268	0,0364	0,0894
CV (%)		22,1	7,3	18,9	17,4	7,2	9,9	17,1
Média		10,5	13,6	18,4	27,7	22,5	19,2	17,5
DMS(x10 ⁷) ¹		7,8	8,3	11,7	16,2	5,5	6,4	10,1
Meio de arroz								
Linhagens	5	1,2073**	54,0702**	156,3028**	12,2062**	52,9308**	8,5091**	42,2351**
Resíduo	12	0,0609	1,9717	9,2757	0,3249	1,5129	0,1508	0,6946
CV (%)		20,2	22,3	36,1	11,5	24,8	13,1	12,0
Média		12,2	63,1	73,2	49,6	62,1	29,7	69,7
DMS (x10 ⁷) ¹		8,3	47,3	102,7	19,2	41,5	13,1	28,1

(¹) Calculada pelo teste de Tukey com 1% de probabilidade.

Anexo 6 . Quadrados médios da análise conjunta da variância (luz e linhagens) da produção de conídios, em três meios de cultura.

Fontes de variação	GL	Meios de cultura					
		MC		BDA		MA	
		GL ¹	QM(x10 ¹⁶)	GL ¹	QM(x10 ¹⁶)	GL ¹	QM(x10 ¹⁶)
Luz (L)	6	-	22,2043**	-	5,7357**	-	110,3692**
Linhagens (S)	5	-	340,8823**	-	54,4188**	-	196,8581**
L x S	30	20	82,5679**	21	4,7843**	10	21,7222**
Resíduo	84	52	1,2907	54	0,0850	25	1,9988
CV (%)			18,3		16,1		26,7
Média (x10 ⁷)			62,2		18,5		53,1
DMS (x10 ⁷)			33,3		8,5		43,8

(¹) Graus de liberdade corrigidas

Anexo 7 . Análise conjunta da variância (luz, linhagens e meios de cultura) da produção de conídios.

Fontes de variação	GL	SQ($\times 10^{-16}$)	QM($\times 10^{-16}$)	F
Linhagens (S)	5	3314,3992	662,8798	588,7**
Luz (L)	6	404,8734	67,4789	59,9**
C/luz	5	86,1459	17,2292	15,3**
C/luz x s/luz	1	318,7275	318,7275	283,1**
M. de cultura (M)	2	1341,0128	670,5064	595,5**
S x L	30	394,5767	13,1526	11,7**
S x M	10	1840,1521	184,0152	163,4**
L x M	12	450,8027	37,5669	33,4**
S x L x M	60	671,2588	11,1876	9,9**
Resíduo	252(60) ¹	283,7546	1,1260	
Média = $44,6 \times 10^7$ esporos CV = 23,8% DMS(1%) $30,6 \times 10^7$ esp				

(¹) g.l. corrigidos

Anexo 8 . Diâmetro de colônias (mm), em MC, de seis linhagens de *M. anisopliae* com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), após dez dias de incubação.

Tipo de luz	Repetições	Linhagens					
		A ₄	A ₁₉	E ₉	K	M	P
Escuro	1	46	43	44	54	50	41
	2	47	43	48	54	49	42
	3	45	44	46	52	51	44
"BL"	1	46	50	47	57	49	51
	2	47	50	54	53	54	49
	3	48	51	54	53	52	48
Azul	1	49	46	57	46	48	49
	2	46	50	56	51	50	50
	3	50	46	57	50	51	50
Verde	1	46	44	51	60	51	47
	2	47	50	52	68	52	47
	3	38	50	51	60	54	45
Amarelo	1	53	54	52	59	53	41
	2	52	55	53	59	55	47
	3	56	56	50	53	55	45
Vermelho	1	53	53	45	59	53	48
	2	53	54	51	61	54	48
	3	53	52	56	58	55	47
Dia	1	45	47	46	53	44	45
	2	46	44	47	58	54	46
	3	47	47	46	50	51	45

Anexo 9 . Diâmetro de colônias (mm), em BDA, de seis linhagens de *M. anisopliae* com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), após dez dias de incubação.

Tipo de luz	Repetições	Linhagens					
		A ₄	A ₁₉	E ₉	K	M	P
Escuro	1	50	31	48	54	48	46
	2	48	29	48	52	48	45
	3	49	31	48	56	49	44
"BL"	1	48	48	43	48	40	43
	2	46	49	44	50	38	44
	3	45	47	45	44	40	44
Azul	1	44	30	44	50	48	43
	2	44	28	42	44	46	41
	3	45	29	43	38	44	41
Verde	1	48	33	43	52	50	44
	2	50	33	47	53	49	42
	3	50	35	44	55	50	45
Amarelo	1	47	34	42	52	48	43
	2	46	34	45	54	46	43
	3	41	32	43	44	47	42
Vermelho	1	47	53	44	52	39	41
	2	47	54	44	50	40	37
	3	46	52	42	50	37	40
Dia	1	49	43	44	53	51	46
	2	49	40	43	53	44	44
	3	49	41	42	55	48	42

Anexo 10 . Diâmetro de colônias (mm), em MA, de seis linhagens de *M. anisopliae* com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), após dez dias de incubação.

Tipo de luz	Repetições	Linhagens					
		A ₄	A ₁₉	E ₉	K	M	P
Escuro	1	41	38	41	40	38	27
	2	40	37	43	41	37	27
	3	41	39	42	39	37	26
"BL"	1	41	38	40	38	39	25
	2	39	38	41	35	41	27
	3	39	37	40	35	41	26
Azul	1	40	38	44	39	38	24
	2	40	37	45	36	40	29
	3	40	38	44	35	35	26
Verde	1	43	41	44	42	40	29
	2	44	39	43	42	39	27
	3	45	41	44	43	41	30
Amarelo	1	42	38	46	43	38	24
	2	42	37	43	43	38	27
	3	40	39	41	42	38	28
Vermelho	1	38	40	43	38	43	26
	2	38	41	44	43	42	27
	3	37	41	42	43	42	26
Dia	1	40	40	40	40	37	28
	2	41	41	43	38	40	30
	3	40	39	42	43	38	27

Anexo 11 . Diâmetro médio de colônias (mm), de seis linhagens de *M. anisopliae* com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), utilizando-se três meios de cultura ⁽¹⁾.

Linha- gens	Tipos de luz							Média
	Escuro	"BL"	Azul	Verde	Amarelo	Vermelho	Dia	
Meio completo								
A ₄	46,0	47,0	48,3	43,7	53,7	53,0	46,0	48,2
A ₁₉	43,3	50,3	47,3	48,0	55,0	53,0	46,0	49,0
E ₉	46,0	51,7	56,6	51,3	51,7	50,7	46,3	50,6
K	53,3	54,3	49,0	59,3	57,0	59,3	53,7	55,1
M	50,0	51,7	49,7	52,3	54,3	54,0	49,7	51,7
P	42,3	49,3	49,7	46,3	44,3	47,7	45,3	46,4
Média	46,8	50,7	50,1	50,2	52,7	52,9	47,8	50,2
Batata-dextrose-agar								
A ₄	49,0	46,3	44,3	49,3	44,7	46,7	49,0	47,0
A ₁₉	30,3	48,0	29,0	33,7	33,3	53,0	41,3	38,4
E ₉	48,0	44,0	43,0	44,7	43,3	43,3	43,0	44,2
K	54,0	47,3	44,0	53,3	50,0	50,7	53,6	50,4
M	48,3	39,5	46,0	49,6	47,0	38,7	47,7	45,2
P	45,0	43,7	41,7	43,7	42,7	39,3	44,0	42,9
Média	45,8	44,8	41,3	45,7	43,5	45,3	46,4	44,7
Meio de arroz								
A ₄	40,7	39,7	40,0	44,0	41,3	37,7	40,3	40,5
A ₁₉	38,0	37,7	37,7	40,3	38,0	40,7	40,0	38,9
E ₉	42,0	40,3	44,3	43,7	43,3	43,0	41,7	42,6
K	40,0	36,0	36,7	42,3	42,7	41,3	40,3	39,9
M	37,3	40,3	37,7	40,0	38,0	42,3	38,3	39,1
P	26,7	26,0	26,3	28,7	26,3	26,3	28,3	27,0
Média	37,4	36,7	37,1	39,8	38,3	38,6	38,2	38,0
Média	43,4	44,1	42,9	45,2	44,8	45,6	44,1	44,3

(¹) Média de três repetições

Anexo 12 . Componentes da análise da variância do crescimento radial, em mm, de 21 experimentos realizados com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), em três meios de cultura

Fontes de variação	GL	Escuro	"BL"	Azul	Verde	Amarelo	Vermelho	Dia
Meio completo								
Linhagens	5	57,1000**	18,4556**	33,2889**	91,0333**	59,0667**	44,9889**	31,5667**
Resíduo	12	1,6667	5,2778	3,2778	6,9444	5,0556	5,8333	7,8889
CV (%)		2,8	4,5	3,6	5,2	4,2	4,7	5,9
Média		46,8	50,7	50,1	50,2	52,7	52,9	47,8
DMS (1)		4,4	7,7	6,1	8,9	7,6	8,1	9,5
Batata-dextrose-agar								
Linhagens	5	197,1556**	30,4889**	115,7333**	142,3222**	95,9667**	104,0556**	62,4889**
Resíduo	12	1,2778	2,5556	7,2778	2,0000	7,2222	1,7778	3,5000
CV (%)		2,5	3,6	6,5	3,1	6,2	2,9	4,0
Média		45,8	44,8	41,3	45,7	43,5	45,3	46,4
DMS (1)		3,4	6,1	9,1	4,8	9,1	4,5	6,3
Meio de arroz								
Linhagens	5	92,4889**	90,6667**	106,4889**	97,9667**	118,1889**	117,8222	73,0333**
Resíduo	12	0,6667	1,2222	2,9444	1,0556	2,2222	1,7778	2,4444
CV (%)		2,2	3,0	4,6	2,6	3,9	3,5	4,1
Média		37,4	36,7	37,1	39,8	38,3	38,6	38,2
DMS (1)		2,8	3,7	5,8	3,4	5,0	4,5	5,3

(¹) Calculada pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

Anexo 13 . Quadrados médios da análise conjunta da variância (luz e linhagens) do crescimento radial, em três meios de cultura.

Fontes de variação	GL	Meios de cultura					
		MC		BDA		MA	
		GL ¹	QM	GL ¹	QM	GL ¹	QM
Luz (L)	6	-	277,4841**	-	165,2698**	-	59,8571**
Linhagens (S)	5	-	582,9952**	-	1035,7571**	-	1959,3952**
L x S	30	29	71,1560**	22	555,2175**	26	24,0714**
Resíduos	84	69	6,7729	59	5,2091	71	2,0845
CV (%)			5,2		5,1		3,8
Média (mm)			50,2		44,7		44,3
DMS (mm)			7,4		6,6		4,1

(¹) Graus de liberdade corrigidas

Anexo 14 . Análise conjunta da variância (luz, linhagens e meios de cultura) do crescimento de colônias.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	F
Linhagens (S)	5	3628,8492	725,7698	594,6**
Luz (L)	6	318,5714	53,0952	43,5**
C/luz	5	262,6914	52,5383	43,0**
C/luz x s/luz	1	55,8801	55,8801	45,8**
M. de cultura (M)	2	9367,6825	4683,8413	3837,6**
S x L	30	1284,9842	42,8328	35,1**
S x M	10	2334,7302	233,4730	191,3**
L x M	12	686,6509	57,2209	46,9**
S x L x M	60	1626,2697	27,1045	22,2**
Resíduo	252(177) ¹	307,5540	1,2205	
Média 44,3mm	CV 2,5%	DMS 3,1mm		

(¹) g.l. corrigidas

ANEXO 15. Taxa de produção de conídios ($\times 10^7/\text{cm}^2$) de seis linhagens de *M. anisopliae* com seis tratamentos de luz e uma testemunha (escuro), utilizando três meios de cultura

Linha- gens	Tipos de Luz							Média
	Escuro	"BL"	Azul	Verde	Amarelo	Vermelho	Dia	
Meio completo								
A ₄	1,76	1,81	2,58	3,29	1,89	1,83	1,78	2,13
A ₁₉	0,00	0,75	0,53	0,61	0,11	0,05	0,82	0,41
E ₉	4,95	6,88	6,63	6,75	4,47	8,60	5,21	6,21
K	0,00	0,19	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,03
M	5,72	5,92	7,34	8,00	7,34	7,00	7,15	6,32
P	2,68	3,13	2,49	5,16	3,02	3,20	2,48	3,16
Média	2,52	3,11	3,26	3,97	2,81	3,45	2,97	3,14
Batata-dextrose-agar								
A ₄	0,73	0,64	1,23	1,46	1,15	1,08	0,90	1,17
A ₁₉	0,04	0,64	0,06	0,30	0,29	0,05	0,31	0,24
E ₉	1,08	2,13	1,87	3,59	2,55	3,40	2,80	2,49
K	0,00	0,03	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
M	0,55	0,91	3,09	3,19	3,18	3,13	1,87	2,27
P	1,21	1,01	0,92	1,18	1,51	0,72	0,65	1,03
Média	0,60	0,89	1,20	1,62	1,45	1,40	1,09	1,20
Meio de arroz								
A ₄	1,50	7,71	17,03	5,04	10,01	3,11	7,67	7,44
A ₁₉	1,56	2,68	2,88	2,63	3,01	1,13	3,68	2,51
E ₉	0,84	3,90	4,67	3,99	4,52	3,49	5,07	3,78
K	1,03	2,35	1,37	1,69	1,59	0,69	2,34	1,50
M	0,91	10,43	10,16	5,02	7,49	3,26	11,21	6,92
P	0,29	8,80	11,01	6,28	6,31	4,20	7,27	6,31
Média	0,97	5,98	7,85	4,11	5,49	2,65	6,21	4,74
Média	4,05	3,33	4,10	3,23	3,25	2,50	3,40	3,03