CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Metarhizium anisopliae (METSCH.) SOROKIN, 1883 PROVENIEN-
TES DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ

Engenheiro Agrônomo

AUXILIAR DE ENSINO DA FACULDADE DE AGRONOMIA E
ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE NACIONAL DE
TUCUMAN - ARGENTINA

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas -
Área de Concentração: Entomolo-
gia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro, 1983

*Aos meus pais
e irmãos*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja manifestar aqui os seus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado. Em especial às seguintes pessoas e instituições:

Ao Prof. Dr. Sergio Batista Alves, pela valiosa orientação no transcorrer das fases deste trabalho.

À Faculdade de Agronomia e Zootecnia da Universidade Nacional de Tucumã, Argentina, pela concessão de licença para a realização do curso de Pós-graduação em Entomologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de estudo.

Aos Eng^{os} Antonio José Nasca e Juan Carlos Rimallo, que com sua ajuda, tornaram possível a realização deste curso.

Ao Prof. Dr. Raul Machado Neto, pelo auxílio na obtenção dos padrões eletroforéticos.

Ao Prof. Dr. Sinval Silveira Neto, pelo apoio e colaboração na confecção da presente dissertação.

Ao Prof. Dr. Octávio Nakano, chefe do Departamento de Entomologia da ESALQ-USP, pela contribuição na execução deste trabalho.

À PLANALSUCAR/Instituto do Açúcar e do Alcool, pelo fornecimento do material utilizado na pesquisa.

À Dra. Marinêia de Lara Haddad, pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos Eng^{os} Carlos Alberto Pérez e Roberto Alonso Silveira, pela amizade, estímulo e tradução dos manuscritos.

Aos Profs. Dr^s Evôneo Berti Filho e Luis Carlos Marchini pelo auxílio na versão do summary.

À Srta. Rosêlis Rolim Lourenço pelo estímulo e apoio constante.

Ao Eng^o Ramón Vicente Fernandez pela amizade e estímulo.

Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Emprego do <i>Metarhizium anisopliae</i> no controle microbiano de insetos	4
2.2. Caracterização de raças do <i>M. anisopliae</i>	8
2.2.1. Dimensões dos conídios	8
2.2.2. Produção de enzimas	12
2.2.3. Inativação pela luz ultravioleta	15
2.2.4. Produção de conídios e características morfológicas das colônias	16
2.2.5. Patogenicidade	18
2.3. Padronização	27
3. METODOLOGIA	
3.1. Material	29
3.1.1. Isolados do fungo <i>M. anisopliae</i>	29
3.1.2. Meios de cultura	31
3.1.3. Insetos empregados nos bioensaios	32
3.1.4. Equipamentos	33
3.2. Métodos	36
3.2.1. Produção de conídios e características culturais de isolados de <i>M. anisopliae</i> em meio BDA	36

	Página
3.2.2. Produção de conídios em arroz	37
3.2.3. Medição dos conídios	37
3.2.4. Produção de inóculo sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i>	38
3.2.5. Inativação de conídios dos diferentes <u>isola</u> dos do <i>M. anisopliae</i> com radiação ultravioleta	38
3.2.6. Bioensaios com <i>D. saccharalis</i> , <i>G. mel-</i> <i>lonella</i> e <i>T. molitor</i>	39
3.2.7. Determinação da capacidade de produção de enzimas	41
3.2.8. Obtenção de zimogramas do sistema de α -esterase, através de eletroforese ..	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Características morfológicas das colônias de 11 isolados de <i>M. anisopliae</i>	44
4.2. Produção de conídios e crescimento das colô- nias dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	52
4.3. Produção de conídios em meio de arroz	59
4.4. Dimensões dos conídios e produção de inóculo sobre cadáveres de <i>D. saccharalis</i>	60
4.5. Inativação de conídios dos diferentes <u>isola</u> - dos do <i>M. anisopliae</i> com radiação ultraviole- ta	62

4.6. Bioensaios com <i>D. saccharalis</i> , <i>G. mellonella</i> e <i>T. molitor</i>	65
4.7. Produção de enzimas	79
4.8. Padrões eletroforéticos e perfis baseados em características biológicas e bioquímicas de isolados de <i>M. anisopliae</i>	84
5. CONCLUSÕES	96
6. RESUMO	99
7. SUMMARY	101
8. RESUMEN	103
9. LITERATURA CITADA	105

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Denominação dos isolados de <i>M. anisopliae</i> , respectivas procedências, hospedeiro original e data de coleta	30
2	Descrição das colônias dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> que se desenvolveram a $26 \pm \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	51
3	Descrição das colônias dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> que se desenvolveram a $28 \pm \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.....	51
4	Descrição das colônias dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> que se desenvolveram a $30 \pm \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	52
5	Raiz quadrada dos valores médios de produção de conídios $\times 10^6$ de 11 isolados de <i>M. anisopliae</i> , após 6 dias de desenvolvimento em meio BDA, a diferentes temperaturas com os respectivos testes de Tukey a 5% entre tratamentos e entre temperaturas	53
6	Resultados da análise de variância e componentes de variância entre isolados	54
7	Resultados da análise de variância e componentes da variância entre temperaturas.....	54
8	Diâmetro médio das colônias (mm) de 11 isolados de <i>M. anisopliae</i> , após 6 dias de desenvolvimento, em meio BDA, a diferentes temperaturas, com os respectivos testes de Tukey a 5% entre tratamentos e entre temperaturas	55

TABELA		Página
9	Resultados da análise de variância entre isolados	56
10	Resultados da análise de variância entre temperaturas	56
11	Valores médios do número de conídios (raiz quadrada x 10^9) produzidos em 100g de arroz a 28°C e fotoperíodo de 16 horas, após 15 dias e resultados do teste Tukey a 5% de probabilidade	59
12	Médias dos comprimentos e largura de 50 conídios (micrômetros) dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> , desenvolvidos em meio BDA e raiz quadrada dos valores médios de produção de inóculo x 10^7 sobre lagartas pré-pupas de <i>D. saccharalis</i> , 12 dias após a inoculação, com seus respectivos testes de Tukey a 5%	61
13	DE ₅₀ de luz ultravioleta necessária para inibir a germinação de 50% dos conídios de 11 isolados de <i>M. anisopliae</i> , 24 horas após e seus respectivos intervalos de confiança	63
14	Porcentagens das mortalidades corrigidas e acumuladas de pré-pupas de <i>D. saccharalis</i> provocadas pelos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> na dose de $1,3 \times 10^8$ conídios/ml	66
15	Porcentagens das mortalidades corrigidas e acumuladas de lagartas de <i>G. mellonella</i> provocadas pelos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> na dose de $1,3 \times 10^8$ conídios/ml	67

TABELA

Página

16	Porcentagens das mortalidades corrigidas e acumuladas de <i>T. molitor</i> provocadas pelos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> na dose de $1,3 \times 10^8$ conídios/ml	68
17	TLs ₅₀ , intervalos de confiança (IC), Taxas de Potência dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> para lagartas pré-pupas de <i>D. saccharalis</i>	69
18	TLs ₅₀ , intervalos de confiança (IC), Taxas de Potência dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> para lagartas de <i>G. mellonella</i> de 7º ínstar	70
19	TLs ₅₀ , intervalos de confiança (IC), Taxas de Potência dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> para larvas de <i>T. molitor</i> de último ínstar	71
20	Comparação das Proporções de Atividade dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	80
21	Contraste das médias, através do teste Tukey (5%), dos índices enzimicos, para produção de amilase, protease e lipase, obtidos após inoculação a 28°C durante 5 dias	81
22	Resultados da análise de variância para os índices de amilase, protease e lipase dos diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Câmara de irradiação: a) placas de Petri com meio BDA, nas quais foram semeados conídios de <i>M. anisopliae</i> ; b) bulbo da lâmpada emissora de luz ultravioleta (2.537 Å)	35
2	Câmara de inoculação de plástico: a) suporte de arame; b) tampa desmontável; c) base	35
3	Características culturais do isolado PL-32, a pós 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	45
4	Características culturais do isolado PL-35, a pós 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	45
5	Características culturais do isolado PL-39, a pós 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	46
6	Características culturais do isolado PL-43, a pós 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	46
7	Características culturais do isolado PL-47, a pós 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	47
8	Características culturais do isolado PL-48, a pós 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm \pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	47

FIGURA

Página

9	Características culturais do isolado PL-50, a pós 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm$ $\pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	48
10	Características culturais do isolado PL-51, a pós 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm$ $\pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	58
11	Características culturais do isolado SPL-52T, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm$ $\pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	49
12	Características culturais do isolado SPL-54A, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm$ $\pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	49
13	Características culturais do isolado SPL-3F, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm$ $\pm 0,20^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas	50
14	Mortalidade vs. tempo (escala prôbitos / log.) de pré-pupas de <i>D. saccharalis</i> , inoculadas com diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	72
15	Mortalidade vs. tempo (escala prôbitos / log.) de pré-pupas de <i>D. saccharalis</i> , inoculadas com diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	73
16	Mortalidade vs. tempo (escala prôbitos / log.) de lagartas de 7 ^o ínstar de <i>G. mellonella</i> , ino- culadas com diferentes isolados de <i>M. aniso- pliae</i>	75

FIGURA

Página

17	Mortalidade vs. tempo (escala prōbitos / log.) de lagartas de 7º ĩnstar de <i>G. mellonella</i> , inoculadas com diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	75
18	Mortalidade vs. tempo (escala prōbitos / log.) de larvas de <i>T. molitor</i> de ũltimo ĩnstar inoculadas com diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	76
19	Mortalidade vs. tempo (escala prōbitos / log.) de larvas de <i>T. molitor</i> de ũltimo ĩnstar, inoculadas com diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i>	77
20	Perfil biolōgico e bioquĩmico do isolado padrāo SPL-3F e do isolado PL-32	86
21	Perfil biolōgico e bioquĩmico do isolado padrāo SPL-3F e do isolado PL-35	87
22	Perfil biolōgico e bioquĩmico do isolado padrāo SPL-3F e do isolado PL-39	88
23	Perfil biolōgico e bioquĩmico do isolado padrāo SPL-3F e do isolado PL-43	89
24	Perfil biolōgico e bioquĩmico do isolado padrāo SPL-3F e do isolado PL-47	90
25	Perfil biolōgico e bioquĩmico do isolado padrāo SPL-3F e do isolado PL-48	91

FIGURA		Página
26	Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado PL-50	92
27	Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado PL-51	93
28	Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado SPL-52T	94
29	Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado SPL-54A	95

1. INTRODUÇÃO

Após algumas décadas de utilização dos defensivos agrícolas e de observação dos seus efeitos indesejáveis nos agroecossistemas, os pesquisadores sentiram a necessidade de utilização de métodos mais racionais de controle de pragas. Assim, o controle integrado surgiu como uma opção ponderada sob os aspectos econômicos e ecológicos, para a solução a médio e longo prazo dos problemas fitossanitários.

Por outro lado, o controle biológico, quer natural ou aplicado, tem sido responsável por uma parcela significativa no sucesso da integração no controle de pragas. Dentre os agentes mais promissores nesse campo, destacam-se os microrganismos patogênicos, os quais, pela sua especificidade, não ocasionam efeitos colaterais deletérios nos agroecossistemas onde são introduzidos. Dentre esses, o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. destaca-se como um agente excepcional no controle de pragas.

Em 1913, Rorer fez menção à possibilidade do emprego desse fungo no controle do cercopídeo *Tomaspis varia* em cana-de-açúcar. Da mesma maneira, LATCH (1965) destacou a potencialidade do mesmo fungo para o controle de pragas das pastagens.

No Brasil, têm-se incrementado as pesquisas sobre o referido patógeno devido à sua notável importância como agente de controle biológico dos cercopídeos, que atacam a cana-de-açúcar e pastagens, principalmente das espécies: *Mahanarva posticata* (Stal), *M. fimbriolata* (Stal), *Deois flavopicta* (Stal), *D. schach* (Fabr.), *Zulia entreriana* (Berg.) e *Aeneolamia selecta* (Walk.).

Devido à razoável eficiência do fungo, tem-se verificado um aumento das áreas tratadas com esse patógeno. Assim, em 1975, o PLANALSUCAR financiou a instalação de laboratórios com a finalidade de produzir este entomopatógeno no Estado de Pernambuco. Atualmente, muitos usineiros da Região Nordeste possuem o seu laboratório de produção do fungo sob orientação do INSTITUTO DO AÇÚCAR E DO ALCOOL PLANALSUCAR (IAA /PLANALSUCAR).

Para mostrar a importância do programa desenvolvido nessa região, segundo MARQUES (1981), a área canavieira onde foram efetuadas aplicações com esse fungo, ou seja, nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, alcançou 101.105 ha no ano de 1980.

O valor do *M. anisopliae*, como agente de con-

trole microbiano, não se limita apenas aos insetos anteriormente referidos, pois outras pragas têm sido assinaladas como suscetíveis. Na cultura da soja, o fungo vem sendo recomendado para o controle de *Nezara* sp., *Piezodorus* sp. e *Edessa* sp.

Na cana-de-açúcar atinge outros insetos tais como *Diatraea* sp., *Metamasius hemipterus* (L.), *Spodoptera frugiperda* (Smith) e *Cirphis* sp.; sendo ainda muito provável que a sua ocorrência seja um dos fatores mais importantes na baixa infestação de *D. saccharalis* no Nordeste brasileiro.

Além dos sucessos obtidos através do emprego de *M. anisopliae*, também têm-se verificado casos de baixa efetividade, devido ao desconhecimento de diversos aspectos, tais como: influência dos fatores ambientais, viabilidade, padronização dos produtos, adaptabilidade das linhagens a cada região, compatibilidade com outros defensivos agrícolas, etc.

Levando-se em consideração a importância desse entomopatôgeno visou-se na presente pesquisa a caracterização e padronização de 11 isolados de *M. anisopliae*, de diferentes regiões do Brasil, procurando selecionar os isolados mais produtivos e altamente virulentos para a sua utilização no controle microbiano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Emprego do *Metarhizium anisopliae* no controle microbiano de insetos

Embora existam inúmeros trabalhos de controle microbiano através do *M. anisopliae*, a maioria deles limita-se à aplicação de uma suspensão de conídios e posterior contagem da mortalidade, sem considerar as causas da variação dos resultados obtidos.

O primeiro trabalho de controle foi realizado por Metschnikoff em 1880, que produziu massalmente o fungo para iniciar epizootias na população do curculionídeo, *Cleonus punctiventris* Germ., praga da beterraba. As pesquisas foram continuadas por Krassilstschik, o qual chegou a produzir 55 kg do fungo em 4 meses, durante o ano de 1884, conseguindo controlar de 55 a 80% dos insetos em pequenas áreas após 10 a 15 dias da aplicação (MARTIGNONI, 1968; LATCH, 1965; BALFOUR-BROWNE, 1960).

Quanto ao uso nas culturas de cana-de-açúcar, RORER (1910) propôs a produção de *M. anisopliae* para o controle de cigarrinhas, por apresentar perspectivas interessantes devido a facilidade de produção dos conídios.

O mesmo autor, em 1913, relatou que, após ter efetuado aplicação de 2,8 kg/ha, conseguiu uma média de 92 insetos mortos por perfilhos de cana-de-açúcar após 6 semanas, o que significou aproximadamente 184.000 insetos em 0,4 ha.

Mathlein e Lihnell (1944), citados por BALFOUR BROWNE (1960), obtiveram 40% de mortalidade em testes preliminares contra a traça dos grãos, *Tinea secalella* Zacher, quando aplicaram uma suspensão de conídios em água sobre as paredes dos depósitos de armazenamento.

Outros relatórios do Departamento de Agricultura de Burma (1941/43), afirmam que armadilhas de solo contaminadas com *M. anisopliae* reduziram em 15% as larvas de *Oryctes rhinoceros* L., numa localidade, mas em outros lugares essa redução foi de 70%. O mesmo autor conclui que o *M. anisopliae* pode ser um agente de controle efetivo em áreas relativamente pequenas, onde as condições são satisfatórias, atingindo proporções de epizootias apenas ocasionalmente, em circunstâncias naturais particulares; ainda, considera pouco viáveis os projetos de indução artificial de epizootias para a aniquilação das pragas. Em contraposição, NIRULA (1957) sugere o uso de *M. anisopliae* para o controle biológico de *O. rhinoceros* no sul da Índia. Da mesma maneira, GUAGLIUMI (1968) conside-

rou a possibilidade da introdução de *M. anisopliae* e *Empusa* sp. nos canaviais do Estado de Pernambuco, pois naquela época não tinha sido assinalada a presença das referidas espécies nessa região. Em 1970, o mesmo autor obteve resultados muito promissores com *M. anisopliae* num ensaio contra cigarrinhas das raízes da cana-de-açúcar e no capim pangola, *Digitaria de cumbens*.

GUAGLIUMI (1971 e 1972) relatou que *M. anisopliae* vem se mostrando como o mais eficiente inimigo natural das "cigarrinhas das folhas", no nordeste do Brasil. Sendo que a ação desse fungo é favorecida através de pulverizações de conídios em suspensão aquosa sobre os canaviais infestados, nas dosagens de 500 a 1.000 g de conídios em 400 a 500 l de água/ha. Após 20 dias, a mortalidade de ninfas e adultos pode atingir 80%, e após um mês encontram-se até 60-65% das ninfas e adultos mortos. A média da porcentagem de mortalidade de ninfas e adultos entre 30 a 60 dias após a aplicação foi 35%, sendo que para ninfas, as porcentagens mais frequentes foram de 40 a 50%. Da mesma maneira que no Estado de Pernambuco, o fungo tornou-se um fator limitante das cigarrinhas nas regiões canavieiras de Campos (RJ) e do sul do Brasil.

WALSTAD e ANDERSON (1971) também encontraram que *M. anisopliae* juntamente com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. são fatores importantes na mortalidade de *Hylobius pallens* (Herbst) e verificaram que em aplicações de *M. anisopliae* nas dosagens de 16, 19,5 e 36 kg/0,4 ha provocaram respectiva

mente 66, 77 e 100% de mortalidade em 2 semanas; porém a utilização de elevadas dosagens foi um fator que limitou seriamente sua aplicação.

TEDDERS *et alii* (1973) avaliaram a efetividade de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Neoaplectana dutky* em diferentes tratamentos, no campo, contra *Curculio caryae* (Horn.). As porcentagens de mortalidade obtidas foram 67% para *N. dutky*, 61% para *B. bassiana* multiplicada em meio líquido e 59% para uma mistura de conídios de *M. anisopliae* com vermiculita.

Em Pernambuco, AQUINO (1974) constatou, em um ensaio experimental com *M. anisopliae* em cana-de-açúcar, que ocorreu parasitismo pelo fungo 5 dias após a sua aplicação, sendo observada sua permanência na área por mais de 18 meses, causando diferentes graus de infecção em ninfas e adultos.

MACEDO *et alii* (1977) em trabalho de controle de *M. fimbriolata*, realizado na região de Ribeirão Preto, com pulverizações de *M. anisopliae* (450 g/3600 m²) obtiveram na 4ª e 8ª semanas 23,36 e 41,49% de mortalidade, respectivamente, concluindo que o fungo pode ser usado com sucesso nos programas de controle.

Guagliumi (1973) citado por FERRON (1981) relatou que o *M. anisopliae* vem sendo aplicado em cana-de-açúcar no Brasil para o controle de cercopídeos. No Estado de Pernambuco, entre os anos 1972 e 1978, a área tratada com Metaquino passou de 500 para 50.000 ha. Em 1977 as pulverizações de 50 l/ha (contendo 6×10^{11} a $1,2 \times 10^{12}$ conídios) se-

guiadas de avaliações para verificar a mortalidade provocada aos 30, 60 e 90 dias, encontrou-se que o patógeno controlou em média 40%, 55% e 60% de cigarrinhas respectivamente. Recentemente o IAA/PLANALSUCAR adotou um programa similar, na unidade de produção de Maceió (AL), capaz de fornecer material suficiente para tratar diariamente 100 ha de cana-de-açúcar. Em ambos programas os custos de tratamento são consideravelmente mais baixos que o tratamento químico usual.

Relatos mais recentes afirmam que durante os anos 1977/78 foram tratadas com fungo 20.000 ha de cana-de-açúcar; e que em 1979 chegaram a 53.554 ha (RISCO, 1978 e MENDONÇA e COSTA, 1980).

2.2. Caracterização de raças do *M. anisopliae*

Da constatação da existência de raças do *M. anisopliae* surgiu a necessidade de caracterização das mesmas, para possibilitar a continuidade de outras linhas de pesquisas. Algumas das técnicas usadas em caracterização serão citadas nos próximos itens.

2.2.1. Dimensões dos conídios

Sem dúvida o caráter dimensão dos conídios não é de natureza tão estável para ser considerado na distinção

de uma raça da outra, pelo fato de se encontrar linhagens diferentes, com conídios de dimensões semelhantes.

Metschnikoff em 1879 descreveu a espécie *Entomophthora anisopliae* desenhando conídios de comprimentos variáveis. Porém no trabalho descreve conídios de 4,8 micrômetros de comprimento. Sorokin em 1883 estudando a mesma espécie a identificou dentro do gênero *Metarhizium* citando as dimensões de 4,8 por 1,6 micrômetros. Johnson em 1915 diferenciou as formas *major*, com conídios de 11,9 por 3,0 micrômetros, e a *minor* com conídios de 3,5 por 2,0 a 3,0 micrômetros, as que ocorrem sobre diferentes hospedeiros; observou também que existem variações de comprimento num mesmo isolado, devido a diferenças fisiológicas (STEINHAUS, 1949 e TULLOCH, 1976). Segundo LATCH (1965) estas categorias, *major* e *minor* foram propostas por Friederichs (1920) o qual relatou que besouros, *O. rhinoceros*, provenientes de Samoa, apresentavam uma linhagem com conídios de 9,0 a 14,0 por 3,3 micrômetros e outros de Madagascar possuíam outra linhagem diferente, apresentando conídios de 6,0 a 8,0 por 2,5 micrômetros. Da mesma maneira RADHA et alii (1956) encontraram diferenças semelhantes nas medições de isolados originários da Índia, Califórnia e Holanda.

Friederichs (1930), citado por TULLOCH (1976), propôs o nome *oryctophagum* para a forma de conídios compridos.

PETCH (1931) citou vários autores que realizaram medições de conídios, e concluiu que é possível diferenciar as subespécies ou variedades pelas formas de conídios com

pridos ou curtos, não sendo assim no caso do isolado de *Melolontha* encontrado por Delacroix em 1893, no qual os conídios de uma mesma estirpe apresentavam-se com uma ampla gama de variações no seu comprimento.

Na Argentina, MARCHIONATO (1942) descreveu uma cepa de *M. anisopliae*, isolada de *Diloboderus abderus* (Sturm.), que possuía conídios cilíndricos de 8,0 a 9,0 por 2,5 a 3,0 micrômetros, retos, esverdeados e moniliformes.

Kamat *et alii* em 1952, citados por TULLOCH (1976), reafirmaram a ideia de Johnson (1915) ao encontrar que as variações no comprimento dos conídios dependiam do meio de cultura utilizado. Os conídios formados sobre agar nutriente mediam 5,0 a 7,6 por 2,5 a 3,5 micrômetros, e sobre arroz 8,0 a 14,0 por 3,0 a 4,5 micrômetros.

ROCKWOOD (1950) observou diferentes raças do fungo desenvolvendo-se sobre vários insetos, mas não encontrou diferenças notáveis quanto ao tamanho dos conídios.

RADHA *et alii* (1956) encontraram consideráveis variações nas dimensões dos conídios, contudo foi possível a sua separação nas formas *major* e *minor*, desde que a forma *major* se caracteriza pela sua patogenicidade específica para *O. rhinoceros*, representando um grupo fisiológico definido, sendo proposta a variedade *rhinoceros*.

MASERA (1957) isolou uma cepa de *M. anisopliae*, na qual determinou um comprimento de 7,0 a 12,0 por 3,0 a 4,0 micrômetros de largura. O autor citou que as dimensões varia

ram reduzindo-se para 7,0 a 9,0 micrômetros de comprimento e 3,0 micrômetros de largura, atribuindo este fato ao tempo e ambiente.

Segundo BALFOUR-BRÖWNE (1960) os conídios variam em tamanho nas diferentes raças, desde 4,8 a 14,0 micrômetros de comprimento, sendo que os menores são os mais comuns. Assim o autor constatou uma epizootia em gafanhotos os quais estavam infectados por linhagens com conídios de 4,6 a 6,0 micrômetros de comprimento por 1,5 a 2,0 micrômetros de largura.

LATCH (1965) realizou estudos sobre 6 isolados de *M. anisopliae* e efetuou medições dos conídios, que desenvolveram em BDA e sobre seus respectivos hospedeiros, encontrando algumas diferenças, segundo o substrato que desenvolviam. Todos os isolados estavam dentro da categoria proposta por Friederichs, de conídios curtos.

BARRON (1968) diz ter encontrado apenas a raça de conídios pequenos em Ontario, embora existam as formas de conídios pequenos (5,0 a 7,0 por 2,5 a 3,0 micrômetros) e a de grandes (10,0 a 14,0 por 3,0 a 4,0 micrômetros).

Segundo TULLOCH (1976) para a distinção das formas de conídios curtos e compridos, é necessário determinar o tamanho dos conídios de 80 culturas, e considera este caráter suficiente para justificar a separação em duas variedades, *anisopliae* e *major*; sendo que a variedade *anisopliae* corresponde a forma de conídios curtos com 3,5 a 9,0 micrômetros de com-

primento, geralmente com 5,0 a 8,0 micrômetros; e a variedade *major* com 9,0 a 18,0 micrômetros e usualmente com 10,0 a 14,0 micrômetros de comprimento. O mesmo autor faz referência a Veen (1968), que estabeleceu um comprimento médio não superior a 7,6 micrômetros para a forma de conídios curtos e 9,8 micrômetros para conídios compridos.

MESSIAS e AZEVEDO (1980), realizando estudos sobre a genética do mesmo fungo, determinaram que tanto as raças haplóides como as diplóides não devem ser distinguidas, baseando-se nas medições dos conídios. Os mesmos autores (1981) concluíram que a determinação do tamanho dos conídios, através de microscopia ótica, pode auxiliar na diferenciação dos isolados haplóides e diplóides, e que o tamanho também pode ser influenciado pelo número de núcleos presentes nos conídios.

ALVES (1982), efetuando a caracterização de 9 isolados de *M. anisopliae*, observou variações no comprimento dos conídios de 7,20 a 10,05 micrômetros, com média de 7,9; sendo que um dos isolados poderia ser classificado como pertencente a variedade *major*.

2.2.2. Produção de enzimas

Quanto a terminologia, alguns autores usam, in distintamente, a denominação enzimas ou toxinas; no entanto ROBERTS (1981) adotou o termo toxinas para os produtos de baixo

peso molecular e sem atividade enzimica, resultantes do metabolismo de microrganismos ou da interação microrganismo-hospedeiro; contudo vários autores tem-se referido às enzimas dos fungos entomopatogênicos como toxinas.

A capacidade de produção de enzimas dos fungos entomopatogênicos tem sido estudada com várias finalidades, sendo uma delas a de correlacioná-la com os processos de patogênese e virulência. PARIS e SEGRETAİN (1978) conseguiram comprovar que a virulência de *B. bassiana* estava relacionada com a produção de lipase, o que facilitaria a seleção das raças com esta capacidade.

Leopold e German, citados por COCHRANE (1958), determinaram que *M. anisopliae* produz uma enzima denominada protopectinase, capaz de converter as protopectinas em ácido pectínico solúvel em água.

ROBINSON (1966) estudou o processo de penetração dos fungos *Aspergillus flavus*, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* e *Cordyceps militaris* através do tegumento de *Tenebrio molitor* comparando-os com *A. oryzae* e *Trichothecium roseum*, os quais não apresentam patogenicidade nem penetram a exocutícula. O autor atribui à capacidade de produção de enzimas quitinolíticas ou proteolíticas a eficiência de penetração. Embora também estejam envolvidos no processo aspectos de ordem mecânico, com pressão das hifas, mediante estrutura denominadas apressórios.

GABRIEL (1968) determinou a produção de enzi-

mas lipolíticas, quitinolíticas e proteolíticas de diversas espécies de *Entomophthora*, comparando-as com as raças F 84-1-1 de *M. anisopliae* e F 25-7-2 de *B. bassiana*, nas quais Huber, em 1958, tinha determinado a sua atividade enzimica.

RATAULT e VEY (1977), efetuando estudos histo-enzimológicos, verificaram produção de esterases e N - acetil-glucosaminase no processo de penetração das hifas de *M. anisopliae*, no tegumento de *O. rhinoceros*.

AL-AIDROOS e SEIFERT (1980) demonstraram que um mutante de uma raça selvagem de *M. anisopliae* possuía a habilidade de degradar amido, e quando crescia sobre meios de cultura, contendo amido, comportava-se em forma hipervirulenta para o mosquito *Culex pipiens pipiens* nos testes de laboratório.

CONTI **et alii** (1980) detectaram variabilidade intraespecífica no sistema de esterases de *M. anisopliae*, quando submeteram diferentes isolados a eletroforese. O que permite a caracterização das diferentes linhagens do fungo.

ROSATO **et alii** (1981) determinaram os níveis de produção de enzimas extracelulares, com a finalidade de conhecer a variabilidade entre as diferentes cepas de *M. anisopliae*. Os autores obtiveram índices enzimicos, semelhantes para os isolados oriundos de uma mesma região geográfica, porém também encontraram índices semelhantes para regiões geográficas diferentes.

KUCERA (1981) estudou a produção de enzimas proteolíticas tóxicas de *M. anisopliae*, avaliando 29 fontes de

nitrogênio em meios de cultura líquidos, e em duas condições de pH, assinalando a maior atividade proteolítica a pH 5,5.

2.2.3. Inativação pela luz ultravioleta

Após a aplicação de inseticidas microbianos nas culturas, os mesmos encontram-se expostos a fatores ambientais, que os inativam. Segundo ALVES (1980) o fator de maior incidência e responsável pela instabilidade desses produtos é a luz solar, na qual o componente luz ultravioleta tem um papel preponderante.

TINLINE e NOVIELLO (1971) irradiaram com luz ultravioleta uma suspensão de conídios de *M. anisopliae*, com a finalidade de obter mutantes auxotróficos, para estudos genéticos sobre heterocarioses.

Através do trabalho realizado por IGNOFFO **et alii** (1977) constatou-se o efeito prejudicial da luz ultravioleta sobre fungos, virus, bactérias e protozoários, mediante testes de patogenicidade.

Também SANTOS (1978) e OKINO **et alii** (1978) estudaram os efeitos da luz ultravioleta sobre a linhagem A de *M. anisopliae*, os autores traçaram curvas de sobrevivência dos conídios, considerando os diferentes intervalos de exposição; os autores concluíram que a luz ultravioleta induz mutações, sendo possível o seu uso em estudos genéticos e de melhoramento deste fungo. Da mesma maneira MESSIAS (1979) obte

ve a curva de sobrevivência para a linhagem Eg, além disso, selecionou mutantes morfológicos e auxotróficos, apropriados para estudos genéticos.

A inativação dos conídios de *M. anisopliae* foi estudada por CORREA (1982) em interação com 2 tipos de solos de composição e textura diferentes, obtendo-se menor inativação em solos arenosos.

2.2.4. Produção de conídios e características morfológicas das colônias

RADHA et alii (1956) realizaram estudos sobre as características culturais de 3 isolados de *M. anisopliae* em diferentes meios de cultura, complementando a caracterização com medições de conídios. Da mesma maneira, LATCH (1965) descreveu a aparência das colônias de 6 linhagens que desenvolveram-se em 4 tipos de meios de cultura, verificando o crescimento e esporulação diferencial dos isolados após 18 dias a uma temperatura de 20°C.

Têm-se utilizado diferentes meios de cultura para esporulação abundante, URS e GOVINDU (1971) utilizaram para esta finalidade, 40 ml de um caldo preparado com 6 ml de mel, 1 g de peptona e 100 ml de água, onde inoculou-se 5 ml de uma suspensão de conídios de *M. anisopliae*. Esta mistura foi colocada num frasco contendo 100 g de cevada esterilizada, que foi agitada vigorosamente duas vezes ao dia, até

obter no término de 24 dias uma esporulação elevada.

MOURA COSTA e MAGALHÃES (1974) experimentaram um meio de cultura a base de farinha de arroz 5%, mais agar em pó 1% e 100 ml de água destilada. Os autores conseguiram obter crescimento micelial, após 4 dias de semeadura e esporulação entre 8 a 10 dias. Com este método o Instituto Biológico da Bahia produziu em aproximadamente 4 meses 2.000 l de meio.

GUAGLIUMI *et alii* (1974) conseguiram produzir em média de 15 a 20 g de conídios em garrafas de um litro, com 100 g de arroz, obtendo como máximo até 20 a 25 g em condições ótimas.

GRUNER e ABUD-ANTUN (1976) observaram o efeito da temperatura na esporulação de um isolado de *M. anisopliae*, concluindo que obtiveram abundante formação de micélio e maior esporulação a 25°C.

LATCH (1976) testou vários cereais para produção de inóculo e selecionou *Avena sativa* L. pelo fato de favorecer na maior esporulação. Após 21 dias de incubação em condições de escotofase e a 25°C, obteve-se entre 16 e 18 g de conídios para cada 100 g de peso seco de aveia.

BASTOS e DA MATA (1976) pesquisaram a influência da temperatura e a luz na esporulação de *M. anisopliae*, cultivado em meio de arroz. Os autores observaram maior esporulação em luz alternada a 25°C.

SANTOS (1978) verificou que o crescimento micelial das colônias mantidas no escuro total foi maior que nos tratamentos com luz alternada ou constante, entretanto a produção de conídios foi maior sob luz contínua do que sob luz alternada ou escuro constante.

MATTA e OLIVEIRA (1978) estudaram a influên-
cia da luz na esporulação de *M. anisopliae*, concluindo que é necessária uma luminosidade mínima constante de 144 horas após a inoculação.

VILLACORTA (1978) estudando 4 isolados de *M. anisopliae*, observou diferenças marcantes quanto ao crescimento em diâmetro das colônias de um dos isolados em relação aos restantes, o que indica a possibilidade de ser uma raça diferente.

ALVES **et alii** (1980) constataram que os espectros azul, amarelo, vermelho e de planta estimularam o crescimento das colônias e uma alta produção de conídios.

Segundo FERRON (1981), no Brasil, o IAA mantém uma produção da ordem de 250 kg do produto biológico por dia, entretanto, em Recife (PE), as unidades laboratoriais provêm 100 kg de Metaquino por dia, sendo que cada g de arroz triturado acarreta 1 a 2×10^9 conídios.

2.2.5. Patogenicidade

Os testes de patogenicidade em diferentes insectos

tos tem sido um dos aspectos mais estudados desde que se tomou conhecimento da existência do *M. anisopliae*.

Em 1926, Glaser verificou 100% de mortalidade de lagartas de *Bombyx mori*, quando eram pinceladas com conídios do fungo; todavia o autor observou que a inoculação através do alimento não se mostrou letal (BALFOUR-BROWNE, 1960). Estes resultados são discordantes dos obtidos por MASERA (1957), o qual concluiu que *M. anisopliae* mostrou-se patogênico para *B. mori*, quando inoculado via oral e não por contato. Em testes com *T. molitor*, *Galleria mellonella*, *Saturnia pyri* e *Dermestes lardarius* o mesmo autor observou a manifestação da doença nos 3 primeiros insetos, não ocorrendo no último. Quanto a capacidade infectiva do inóculo, constatou haver uma estreita relação no que concerne a idade dos conídios e a temperatura na qual foram mantidos, não tendo influência decisiva a umidade. Observou que a viabilidade e virulência declinam rapidamente em condições de laboratório, cessando totalmente após 4 meses.

Quanto ao desenvolvimento do processo patológico, este pode ser afetado pelas condições em que se encontram hospedeiro e parasito. Wallengren em 1929, citado por BALFOUR e BROWNE (1960) demonstrou que *Pyrausta nubilalis* sucumbe à doença em 12 dias, em condições de baixa umidade; por outro lado, em condições de atmosfera saturada o efeito dá-se em 6 dias a 16-19°C, e em 4 dias a 25°C.

ROCKWOOD (1950) observou que uma raça denomina

da *Amara* apresentou pouca ou nenhuma virulência para larvas de elaterídeos. A raça *Idaho* por sua vez, mostrou ser mais virulenta, sendo um isolado de *M. brunneum* o que provocou a máxima mortalidade ($72 \pm 4,6\%$). Destes resultados, o autor concluiu que as diferentes espécies ou raças do gênero *Metarhizium* exibem virulência diferencial para as diferentes espécies. Isto foi confirmado por RADHA *et alii* (1956) quando inocularam larvas de *Oryctes* com isolados oriundos de diferentes hospedeiros, sendo apenas os isolados obtidos de *O. rhinoceros* os que se mostraram patogênicos.

FOX e JAQUES (1958) comprovaram uma diminuição da virulência para elaterídeos, após sucessivas repicagens no meio de cultura, o que não concorda com o estabelecido por ROCKWOOD (1950), que encontrou inalterada a virulência ao repicar em meio artificial. Estes autores constataram, também, a influência da temperatura, obtendo maior infecção a 21°C.

SANTOS (1978) referindo-se a Bichuk (1962) relatou que o mesmo pesquisou os efeitos das condições de umidade do solo sobre a infecção de *Bothynoderus (Cleonus) punctiventris* por *M. anisopliae*, verificando uma maior infectividade em solos quentes e úmidos.

LATCH (1965) constatou declínio na virulência de 2 isolados de *M. anisopliae*, sendo que um foi obtido de *Costelytra zealandica* White e o outro de *Heteronychus sanctahelenae* Blanch. A porcentagem de virulência permaneceu inalterada até o 6º mês, mas após o 11º caiu para 24%, quando se

utilizou o isolado proveniente de *C. zealandica*, no entanto, para o proveniente de *H. sanctae-helenae* a virulência foi de 17%. Por outro lado, o mesmo autor verificou que a virulência de uma cultura de *M. brunneum* não sofreu variações após 30 anos de multiplicação em meio de cultura artificial.

ROBINSON (1966) determinou a virulência de 5 fungos entomógenos para *T. molitor*. O *M. anisopliae* provocou 80% e 20% de mortalidade a 95% e 70% de umidade relativa, respectivamente. A inoculação foi realizada mediante aplicação tópica de uma suspensão de conídios.

JAQUES *et alii* (1968) estudaram a mortalidade provocada por *M. anisopliae* nas lagartas de *Pseudeuxentera mali* (Freeman) e de *Operophtera brumata* (L.). Os autores aplicaram uma suspensão de fungo e encontraram decréscimo considerável na porcentagem de emergência de adultos de *P. mali*. Porém, o mesmo tratamento não reduziu a sobrevivência de *O. brumata* (L.), nas mesmas condições.

VEEN (1968) estudou os efeitos da inoculação de suspensões com diferentes concentrações de conídios de *M. anisopliae* sobre ninfas de diferentes estágios de *Schistocerca gregaria* (Forsk.) e comprovou que a susceptibilidade diminui com a idade dos gafanhotos, sendo que o período de incubação da doença torna-se maior nas ninfas dos últimos estágios.

FERRON e DIOMANDE (1969) conseguiram provocar micose nas larvas de *O. rhinoceros*, apenas com as cepas de *M.*

anisopliae isoladas de insetos do mesmo gênero, mas as aplicações nas ninfas de *Schistocerca gregaria* e larvas de *Leptinotarsa decemlineata* Say provocaram a doença, independente da origem das cepas consideradas.

BELL e HAMALLE (1970) em ensaios de laboratório, aplicaram *M. anisopliae* numa proporção de 111×10^9 conídios por grama de areia ou solo, com a finalidade de determinar a patogenicidade em larvas de estágio avançado de *Chalco-dermus aeneus* e observaram 100% de mortalidade em ambos substratos, 6 dias após o tratamento.

BELL e HAMALLE (1971) testaram doses crescentes de conídios de *M. anisopliae* (de $0,4 \times 10^6$ até 25×10^6) para larvas de curculionídeo *Chalco-dermus aeneus* infectadas por *Serratia marcescens* e o díptero parasito *Myiophasia globosa*; e contrariamente ao esperado observaram maior mortalidade com a menor concentração de conídios do fungo, o que interpretaram como um caso de antagonismo.

GOYER e BENJAMIN (1971) infectaram adultos de *Hylobius rhizophagus* Millers fazendo-os caminhar sobre culturas puras de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Todos os adultos expostos ao *M. anisopliae* morreram entre 7 e 10 dias, entretanto *B. bassiana* ocasionou 25% de mortalidade.

URS e GOVINDU (1971) provaram a patogenicidade de *M. anisopliae* para *O. rhinoceros*, *Poecillocerus pictus*, *B. mori* e *Heliothis obsoleta*, quando aplicado em pulverização.

WALSTAD e ANDERSON (1971) observaram 100% de mortalidade de *H. pales*, após 14 dias de aplicação de $0,5 \times 10^6$ conídios de *M. anisopliae* por curculionídeo. Para *B. bassiana* a mortalidade foi menor, tendo sido aplicado $1,4 \times 10^6$ conídios por inseto.

BERRIOS e HIDALGO-SALVATIERRA (1971) encontraram que 50% das larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller testadas, morreram após 9 dias da aplicação de uma suspensão de $1,2 \times 10^7$ conídios viáveis por ml.

HIDALGO-SALVATIERRA e BERRIOS (1972) determinaram que lagartas de *H. grandella* no 5º instar, mostraram-se mais susceptíveis a *M. anisopliae*, encontrando também que neste estágio a CL_{50} foi de $3,6 \times 10^7$ conídios viáveis por ml, quando as lagartas foram mergulhadas na suspensão por um minuto.

BELL et alii (1972) efetuaram aplicações com *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Nomuraea rileyi* em 3 tipos de substrato (arêia, arêia lavada e solo), para observar o efeito do contato das mesmas com larvas e pupas de *Diabrotica balteata* Le Conte e encontraram interações significativas entre o substrato e o tempo em que o fungo provocou mortalidade. Para *Metarhizium*, em arêia, ocorreu mortalidade antes que no solo, mas após o 7º dia a mortalidade no solo incrementou-se rapidamente superando a de outros substratos.

FERRON et alii (1972) estudaram a especificidade de 8 raças de *M. anisopliae* sobre 9 espécies de Coleópte-

ros da família Scarabaeidae. Para isso incorporaram entre 5×10^2 e 3×10^9 conídios por litro de dieta e demonstraram que a maioria dos insetos foram susceptíveis apenas à raça do fungo isolado a partir de insetos da mesma espécie. Contudo, as espécies de *Oryctes* mostraram-se susceptíveis às raças originárias do gênero *Oryctes*, verificando-se uma menor especificidade neste caso.

VEIGA et alii (1972) constataram 90 a 100% de parasitismo por *M. anisopliae* sobre *D. incompleta* em condições de laboratório, enfatizando que o controle das cigarrinhas é altamente eficiente e promissor.

TEDDERS et alii (1973) realizaram testes aplicando o inóculo no solo contra *Curculio caryae* (Horn) e determinaram diferenças na virulência de vários isolados de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Neoapectana dutky*.

AQUINO (1974) realizou ensaios visando o controle de ninfas e adultos de *M. posticata*, quando observou infecção por *M. anisopliae* após 8 dias da inoculação. A mortalidade total ocorreu aos 30 dias.

BELL e HAMALLE (1974) preservaram vários fungos entomopatogênicos em sílica gel a -20°C . Os resultados revelaram que de 3 raças de *M. anisopliae* duas perderam a viabilidade após 24 e 33 meses de armazenagem, mas a outra permaneceu viável após 36 meses. Da mesma maneira, a sua virulência não se alterou nos 3 anos que durou o período de ensaios.

VALDES (1974) usou a técnica de imersão e apli

cação tópica para inocular *G. mellonella* com duas raças de *M. anisopliae*, uma originária de Yaritagua (Venezuela) e a outra de Recife (Brasil). O primeiro isolado provou ser o mais virulento e a forma de aplicação mais satisfatória foi a de imersão.

FERRON et alii (1975) estudando a susceptibilidade dos adultos de *Oryctes* sp., observaram maior facilidade na aquisição da doença em insetos de idade mais avançadas, diminuindo o seu TL_{50} ; este efeito foi mais notável quando se utilizaram 1×10^7 conídios/ml.

No trabalho de FERRON e ROBERT (1975) constatou-se a susceptibilidade de *Acanthocelides obtectus* a vários entomopatôgenos, dentre eles diferentes isolados de *M. anisopliae* mostraram-se virulentos, embora a forma *minor* resultou mais virulenta que a *major*. Em todos os casos os efeitos observados foram proporcionais à concentração de conídios (1×10^7 até 1×10^9 conídios/ml) nas suspensões empregadas.

SCHABEL (1976) inoculou cerca de 450 conídios de *M. anisopliae*, por via oral, em adultos do besouro *Hylobius pales*, obtendo a maior mortalidade (90%) dentro dos 8 a 16 dias. No entanto, quando a aplicação dos conídios se realizou na porção anterior do trato digestivo, mediante um tubo de plástico, obteve-se 100% de mortalidade.

VENTURA e MATIOLI (1980) inocularam *M. anisopliae* em ninfas e adultos do cercopídeo *Z. entreriana* constatando mortalidade entre 5 e 15 dias, não citando a

quantidade de insetos inoculados e nem a porcentagem de mortalidade.

ALVES et alii (1980) comprovaram que o comprimento de onda sob a qual as colônias se desenvolveram afetou a virulência. Dessa maneira, os autores encontraram que os conídios produzidos sob luz azul, mostravam-se mais patogênicos para *G. mellonella*.

É possível adaptar alguns entomopatôgenos a seus insetos hospedeiros, com relação a isto TIMONIN (1980) conseguiu aumentar o grau de virulência até provocar 100% de mortalidade das lagartas de *Choristoneura fumiferana* em 48 h. Isso depois de 4 inoculações sucessivas de um isolado de *M. anisopliae* nesse mesmo hospedeiro.

ALMEIDA et alii (1981a,b,c) estimaram o TL₅₀ para *D. saccharalis* quando inoculada com diferentes concentrações de conídios de *M. anisopliae*, determinando também a DL₅₀ ao 6º e 9º dia. Em ensaios de laboratório verificaram 100% de mortalidade de ovos da espécie citada quando se aplicou 10⁶ conídios por postura. A ação do fungo estendeu-se às lagartas, recém eclodidas, provenientes de ovos tratados com os conídios do fungo.

ALMEIDA e ALVES (1981) observaram 100% de mortalidade de lagartas de *D. saccharalis* em 7 dias, após a aplicação de $1,56 \times 10^6$ conídios de *M. anisopliae* por lagarta.

ALVES et alii (1981) determinaram a taxa de potência de diferentes isolados de *M. anisopliae* para *D. sac-*

charalis e *G. mellonella*, sendo que o isolado mais virulento apresentou taxas de potência de 1.097 e 1.746 Unidades Padrão, respectivamente para as duas espécies de insetos testadas.

MURAYAMA *et alii* (1982) através de testes realizados com *G. mellonella* constataram diminuição da virulência do *M. anisopliae* após a 8ª repicagem em meio de arroz; sendo que a mortalidade média na 2ª repicagem foi de 58% e na 9ª repicagem decresceu para 22%.

2.3. Padronização

Através da presente revisão constatou-se a variabilidade intraespecífica que ocorre em *M. anisopliae* assim como em outros entomopatógenos formulados como inseticidas biológicos. Uma consequência dessa variabilidade é a disparidade dos resultados obtidos, quando se utilizam linhagens diferentes. Assim, uma maneira de se comparar a potencialidade das formulações dos inseticidas biológicos, seria através da padronização mediante bioensaios; determinando o potencial biocida de uma linhagem padrão para um inseto teste e comparando o com o potencial de outra raça, para o mesmo inseto teste, nas mesmas condições do bioensaio.

Para *M. anisopliae* o primeiro trabalho de padronização foi realizado por ALVES (1982), o qual estabeleceu como padrão um isolado de *D. flavopicta* que denomi-

nou SPL-3F, atribuindo-lhe 1.000 Unidades Padrão de Potência (UP). Também determinou as UPs para 8 isolados em relação ao padrão, as quais variaram entre 760 e 1.086 UP.

3. METODOLOGIA

3.1. Material

3.1.1. Isolados do fungo *M. anisopliae*

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP - Piracicaba (SP).

Trabalhou-se com isolados cuja origem, denominação (proposta por ALVES, 1982), inseto hospedeiro e data de coleta constam da Tabela 1.

Os diferentes isolados foram purificados até a 3ª repicagem e conservados no escuro a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sobre meio de cultura com antibióticos.

TABELA 1. Denominação dos isolados de *M. anisopliae*, respectivas procedências, hospedeiro original e data de coleta.

Denominação	Procedência	Hospedeiro original	Data de coleta
PL-32	Fazenda Victor Sense, Conceição de Macabu (RJ).	<i>M. posticata</i> (Stal).	22-07-81
PL-35	Fazenda Cambaiba, Campos (RJ).	<i>M. posticata</i> (Stal).	22-07-81
PL-39	Fazenda Dois Irmãos, Usina Itapetingui (BA).	<i>M. fimbriolata</i> (Stal).	28-07-81
PL-43	Fazenda Papua, Usina Peixe. Flexeiras (AL).	<i>M. posticata</i> (Stal).	05-08-81
PL-47	Usina Santa Cruz, Campos (RJ).	<i>M. posticata</i> (Stal).	21-08-81
PL-48	Usina Santa Cruz, Campos (RJ).	<i>M. posticata</i> (Stal).	01-09-81
PL-50	Usina Beira Tai, Campos (RJ).	<i>M. posticata</i> (Stal).	25-09-81
PL-51	Usina Beira Tai, Campos (RJ).	<i>M. posticata</i> (Stal).	29-09-81
SPL-52 T	ESALQ - USP - Piracicaba (SP).	<i>Thyanta perditor</i> Fabr.	20-10-81
SPL-54 A	Piracicaba (SP).	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Forel).	03-11-81
SPL-3 F	Estância Umbu, Indaiatuba (SP).	<i>D. flavopicta</i> (Stal).	15-03-81

3.1.2. Meios de cultura

Meio BDA + antibiótico

Batata sem casca	200 g
Dextrose	15 g
Ágar	20 g
Sulfato de streptomicina	0,25 g
Sulfato de dihidroestreptomicina	0,25 g
Água destilada, completar até	1.000 ml

Meio para determinação da atividade amilolítica (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975)

Ágar nutriente "Difco"	23 g
Amido solúvel	2 g
Água destilada, completar até	1.000 ml

Meio para determinação da atividade lipolítica (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975)

"Tween 20"	10 ml
Peptona "Difco"	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Cloreto de cálcio dihidratado	0,1 g
Ágar granulado	20 g
Água destilada, completar até	1.000 ml

Meio para determinação da atividade
proteolítica (GABRIEL, 1968)

Ágar nutriente "Difco"	23 g
Leite em pó desnatado	23 g
Água destilada, completar até	1.000 ml

Todos estes meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 125°C durante 30 minutos. O pH foi ajustado com hidróxido de sódio para 6,8.

Meio para produção de conídios

Arroz sem casca	100 g
-----------------	-------

O arroz foi autoclavado durante 30 minutos a 125°C e posteriormente cozido durante 10 minutos, sofrendo logo após, 4 autoclavagens de 30 minutos.

3.1.3. Insetos empregados nos bioensaios

Diatraea saccharalis (Fabr.)

Provenientes da criação do laboratório de Controle Biológico do IAA/PLANALSUCAR, criadas em dieta artificial de HENSLEY e HAMMOND modificada pelo IAA/PLANALSUCAR (MENDES et alii, 1980). Foram utilizadas no teste lagartas pré-pupas.

Galleria mellonella L.

Criadas no Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, em dieta artificial segundo GUERRA (1973). Foram utilizadas lagartas de 7º instar com aproximadamente 15 mm de comprimento.

Tenebrio molitor L.

Criadas no Departamento de Entomologia da ESALQ/USP em dieta artificial segundo AMARAL e ALVES (1979). Foram utilizadas larvas de último instar.

3.1.4. Equipamentos

- Capela de fluxo vertical marca VECO, modelo VLFS-09, que proporcionou as condições de assepsia para os trabalhos de isolamento, purificação e inoculação.

- Estufa incubadora BOD, marca FANEM, modelo 347-G. Equipada com lâmpada fluorescente modelo F15-T 12/LD.

- Balança marca METTLER, com indicadores digitais, modelo PB-300 e balança analítica marca BOSCH, modelo S-2000.

- Medidor de pH digital, marca MICRONAL, modelo B-272.

- Agitador elétrico, marca ETICA, para homogeneização da suspensão do inóculo (com capacidade de 108 rotações/min. até 310 rotações/min.).

- Microscópio marca WILD.
- Câmara de Neubauer destinada para a calibração do inóculo e contagem de conídios.
- Câmara de irradiação equipada com lâmpada germicida modelo G15-T8, com emissão de ondas de $2.537 \text{ \AA}$ de comprimento. Câmara construída de papelão e com as seguintes dimensões: 37 cm de largura por 45 de comprimento e 35 de altura. Distância do bulbo as placas de 30 cm (Figura 1).
- Câmara de inoculação de plástico, de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura (Figura 2).
- Outros materiais: estufa para esterilizar a seco, placas de Petri, alça de Drigallsky, alça de platina, algodão, álcool, solução de hipoclorito de sódio 5% mais 0,5 g de streptomocina, água destilada estéril com agente molhante Agral 1%, pinças, papel de alumínio, lâminas, garrafas de soro com capacidade para 500 ml, tubos de cultura, erlenmeyer, bécher, peneiras com 0,59 mm de abertura, pipeta automática de duplo estágio modelo PIPEMAT de 5 e 10 microlitros e aparelhos e instrumental utilizados para eletroforese.

FIGURA 1. Câmara de irradiação: a) placas de Petri com meio BDA, nas quais foram semeados conídios de *M. anisopliae*; b) bulbo da lâmpada emissora de luz ultravioleta ($2.537 \text{ \AA}$).

FIGURA 2. Câmara de inoculação de plástico: a) suporte de arame; b) tampa desmontável; c) base.

3.2. Métodos

3.2.1. Produção de conídios e características culturais de 11 isolados de *M. anisopliae* em meio BDA

Com a finalidade de determinar a produção de conídios dos 11 isolados sob 3 temperaturas, procedeu-se a inoculação em 3 pontos por placa, utilizando-se 2 placas por isolado. O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado, sendo que cada tratamento ($26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$; $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$; $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) constou de 6 repetições.

As placas foram mantidas em estufas de incubação (BOD), nas temperaturas correspondentes e com fotoperíodo de 16 horas.

Aos 6 dias, determinaram-se além do diâmetro das colônias a sua produção de conídios. Para isso cortaram-se perimetralmente as colônias, das quais foram retirados os conídios mediante lavagens com 10 ml de água esterilizada mais um agente molhante. Nessa suspensão procedeu-se a contagem dos conídios produzidos por cada colônia, tomaram-se 3 amostras as quais foram levadas a câmara de Neubauer, onde foram contados os conídios presentes em 10 campos/repetição. Desta maneira foi obtido o número de conídios por ml, o que possibilitou estimar o número total de conídios por colônia.

Para análise estatística os dados de produção

de conídios $\times 10^6$ foram transformados em $\sqrt{x}$ e feita a análise de variância e teste de Tukey.

3.2.2. Produção de conídios em arroz

Foram inoculadas 400 g de arroz por isolados endo esta quantidade distribuída em 4 garrafas de vidro para soro, constituindo 4 repetições de 100 g.

As garrafas foram mantidas em sala com 16 horas de fotoperíodo a $28 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Transcorridos 15 dias, retiraram-se os conídios através de peneiramento do arroz, pesando-se a massa fúngica (conídios mais amido). A partir dessa massa foram obtidas amostras de 0,01 g por isolado e por repetição, as quais foram suspendidas em 10 ml de água contendo espalhante. Em seguida determinou-se a quantidade de conídios da mesma forma que se procedeu no item 3.2.1.

Para análise estatística os dados de produção de conídios $\times 10^9$ foram transformados em $\sqrt{x}$ e feita a análise de variância e teste de Tukey.

3.2.3. Medição dos conídios

A determinação do comprimento e largura dos conídios, produzidos sobre meio BDA, foi efetuada com o auxílio de um microscópio ótico, equipado com uma ocular micrométrica

(10 aumentos) em combinação com uma objetiva (40 aumentos). Para determinação das dimensões montaram-se lâminas dos diferentes isolados, tomando-se as medidas de 50 conídios por isolado.

3.2.4. Produção de inóculo sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis*

Determinou-se a quantidade de conídios produzidos sobre lagartas prē-pupas de *D. saccharalis*. Para esta finalidade foram lavadas 10 lagartas após 12 dias de inoculadas, utilizando 50 ml de água estéril contendo espalhante adesivo. Para cada isolado foram lavadas 20 lagartas, perfazendo 2 repetições. Para a avaliação do número de conídios utilizou-se a metodologia no item 3.2.1.

Para a análise estatística os dados de produção de conídios $\times 10^7$ foram transformados em $\sqrt{x}$ e feita a análise de variância e teste de Tukey.

3.2.5. Inativação de conídios dos diferentes isolados do *M. anisopliae* com radiação ultravioleta

Para determinar a sensibilidade natural dos diferentes isolados de *M. anisopliae* a radiação ultravioleta, submeteram-se os conídios a intervalos crescentes de exposição a mesma. Utilizou-se como fonte de luz ultravioleta uma lâmpada do tipo G15-T8, instalada dentro da câmara de irradiação (Figura 1).

Para a irradiação foram colocados 10 microli-

tros de água esterilizada com espalhante sobre uma fina camada do meio de cultura BDA e posteriormente com uma alça de platina semeados os conídios, os quais, eram espalhados com o auxílio de uma alça de Drigallsky. Em seguida, realizou-se a irradiação sobre as placas abertas a uma distância de 30 cm da fonte.

As placas foram levadas para uma sala mantida a temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e, após 24 horas, realizou-se a contagem do número de conídios germinados e não germinados através de microscópio com 100 aumentos. Foram contados 1.000 conídios por placa, sendo que cada tratamento era constituído de 4 placas, uma das quais representava a testemunha.

Os resultados obtidos foram corrigidos de acordo com a fórmula de Schneider e Orelli (NAKANO et alii, 1981) e expressos em DE_{50} (Dose Efetiva necessária para inibir 50% da germinação dos conídios decorridas 24 horas), a qual se determinou com a metodologia proposta por BLISS (1935).

3.2.6. Bioensaios com *D. saccharalis*, *G. mellonella* e *T. molitor*

Os inóculos necessários para a realização dos bioensaios foram obtidos através da multiplicação dos isolados em substrato de arroz. Decorridos 15 dias da semeadura no referido substrato, os conídios foram separados por peneiramento. Retirou-se uma amostra de 0,15 g desses conídios, colo-

cando-os em suspensão em um erlenmeyer, contendo 70 ml de água destilada esterilizada com espalhante adesivo Agral. Posteriormente calibrou-se o inóculo dos 11 isolados a uma concentração próxima a $1,3 \times 10^8$ conídios viáveis/ml. Logo após, com o auxílio de uma câmara de inoculação (Figura 2) foram mergulhados 40 indivíduos por tratamento, durante 3 segundos, 2 vezes consecutivas.

Após a inoculação, as lagartas de *D. saccharalis* foram colocadas individualmente em caixas plásticas de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura.

As lagartas de *G. mellonella* foram acondicionadas em placas de vidro de 15 cm de diâmetro por 2,5 cm de altura, e alimentadas com a dieta de GUERRA (1973).

Do mesmo modo, após a inoculação em larvas de último ínstar de *T. molitor*, as mesmas foram colocadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro por 2 cm de altura com a dieta de AMARAL e ALVES (1979).

Os indivíduos das 3 espécies foram mantidos em salas a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e em condições de umidade próxima a saturação.

As respectivas mortalidades foram diagnosticadas e avaliadas diariamente, confirmando o diagnóstico através dos sinais do patógeno (conidióforos e conídios).

Com os resultados de mortalidade obtidos calcularam-se os Tempos Letais 50 (TL₅₀) para cada isolado nos diferentes insetos, mediante a metodologia proposta por BLISS (1935).

O cálculo das Taxas de Potência realizou-se me diante a fórmula utilizada por ALVES (1982).

3.2.7. Determinação da capacidade de produção de enzimas

Para estudar a capacidade de produção de enzimas nos diferentes isolados do *M. anisopliae* utilizou-se de meios de cultura sólidos visando determinar as atividades: amilolítica, lipolítica e proteolítica.

O fungo era inoculado em 3 pontos nas placas contendo o meio de cultura apropriado para cada teste, através de uma alça de platina. Utilizaram-se 2 placas por isolado e por teste, perfazendo assim 6 repetições por tratamento.

Na elaboração dos meios de cultura para testar as diferentes atividades enzimáticas empregaram-se as técnicas descritas por HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975), no entanto para o teste de atividade proteolítica seguiu-se a técnica segundo GABRIEL (1968).

Após a inoculação as placas foram levadas a estufa de incubação (BOD) regulada a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, onde desenvolveram as colônias produzindo seus halos correspondentes, os quais refletiram a atividade enzími-ca de cada isolado.

Para efeito de comparação entre os tratamen-
tos procedeu-se à medição dos diâmetros das colônias e dos ha-

los respectivos, decorridos 5 dias após a instalação do ensaio. Expressou-se a atividade enzimica pela relação diâmetro do halo/diâmetro da colônia.

3.2.8. Obtenção dos zimogramas do sistema de α -esterase, através de eletroforese

A caracterização através dos padrões eletroforéticos foi realizada no Departamento de Zoologia da ESALQ/USP Piracicaba (SP).

As linhagens foram isoladas e purificadas entre a 3ª e a 6ª repicagem em meio BDA, submetendo-as a eletroforese quando as colônias completaram 14 dias de idade. A semeadura nas placas de Petri foi feita com alça de Drigallsky objetivando-se obter conídios suficientes para preparação das amostras.

As amostras foram preparadas a partir de conídios coletados das placas que continham as colônias puras. Posteriormente pesou-se em média 0,04 g de conídios macerando-os em 1 ml de água deionizada e mantendo-os a uma temperatura próxima a 0°C. Logo após, este macerado foi submetido a centrifugação (2.000 rpm durante 3 minutos). No sobrenadante foi adicionada sacarose, de tal forma que as amostras apresentassem uma concentração 10% dessa substância. Tomou-se 100 microlitros desta amostras e aplicou-se no tubo contendo o gel de poliacrilamida, destinado a separação eletroforética.

O procedimento empregado na eletroforese foi basicamente o mesmo ao utilizado por BREWER e ASHWORTH (1969). A corrente aplicada ao sistema foi de 1,5 mV/tubo sendo empregado um gel de 7,5% de poliacrilamida.

O gel foi revelado em solução de α -naftil acetato e "fast blue" em tampão fosfato pH 6,0 e tratamento posterior com solução decorante composta por 5 partes de água, 5 de etanol e 1 de ácido acético glacial.

Determinaram-se os padrões eletroforéticos dos isolados provenientes dos seus hospedeiros originais e desses mesmos fungos inoculados e reisolados em *D. saccharalis* e *G. mellonella*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características morfológicas das colônias de 11 isolados de *M. anisopliae*

As características culturais dos diferentes isolados de *M. anisopliae* que se desenvolveram à temperatura de 28°C e fotoperíodo de 16 horas, estão representadas nas Figuras 3 a 13. As descrições de suas respectivas colônias, que se desenvolveram a 26, 28 e 30°C e fotoperíodo de 16 horas encontram-se nas Tabelas 2, 3 e 4 respectivamente.

Pode-se verificar, através das Tabelas 2, 3 e 4, que as características morfológicas das colônias apresentaram-se melhor definidas, quando expostas às temperaturas de 26 e 28°C e 16 horas de fotoperíodo, resultados estes que coincidiram com os obtidos por ALVES (1982), o qual estabeleceu como sendo as condições mais favoráveis para a caracterização morfológica das colônias dos isolados de *M. anisopliae*.

FIGURA 3. Características culturais do isolado PL-32, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

FIGURA 4. Características culturais do isolado PL-35, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

FIGURA 5. Características culturais do isolado PL-39, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

FIGURA 6. Características culturais do isolado PL-43, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

FIGURA 7. Características culturais do isolado PL-47, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas

FIGURA 8. Características culturais do isolado PL-48, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

FIGURA 9. Características culturais do isolado PL-50, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e foto período de 16 horas.

FIGURA 10. Características culturais do isolado PL-51, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e foto período de 16 horas.

FIGURA 11. Características culturais do isolado SPL-52T, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e período de 16 horas.

FIGURA 12. Características culturais do isolado SPL-54A, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e período de 16 horas.

FIGURA 13. Características culturais do isolado SPL-3F, após 6 dias de incubação em meio BDA, a $28 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

TABELA 2. Descrição das colônias dos diferentes isolados de *M. anisopliae* que se desenvolveram a $26 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas

Isolados	Características morfológicas das colônias
PL-32	Margem elevada com esporulação central irregular
PL-35	Margem elevada com esporulação central irregular
PL-39	Levemente pulvinada com esporulação esparsa por toda colônia
PL-43	Rasa com esporulação normal
PL-47	Micélio desenvolvido na região central, esporulação irregular
PL-48	Pulvinada com esporulação central irregular
PL-50	Margem elevada com esporulação irregular
PL-51	Pulvinada com esporulação irregular
SPL-52T	Rasa com esporulação normal
SPL-54A	Pulvinada com esporulação muito irregular no centro
SPL-3F	Rasa com esporulação normal

TABELA 3. Descrição das colônias dos diferentes isolados de *M. anisopliae* que se desenvolveram a $28 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas

Isolados	Características morfológicas das colônias
PL-32	Margem elevada com esporulação central irregular
PL-35	Margem elevada com esporulação central irregular
PL-39	Rasa com esporulação normal
PL-43	Margem elevada com esporulação central irregular
PL-47	Levemente pulvinada com esporulação central irregular
PL-48	Pulvinada com esporulação central irregular
PL-50	Margem elevada com esporulação central irregular
PL-51	Pulvinada com esporulação central irregular
SPL-52T	Rasa com esporulação normal
SPL-54A	Margem elevada com esporulação central irregular, conídios escuros
SPL-3F	Rasa com esporulação normal.

TABELA 4. Descrição das colônias dos diferentes isolados de *M. anisopliae* que se desenvolveram a $30 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Isolados	Características morfológicas das colônias
PL-32	Pulvinada com esporulação central sob o micélio
PL-35	Pulvinada com esporulação central sob o micélio
PL-39	Pulvinada com esporulação central sob o micélio
PL-43	Micélio desenvolvido na região central, bordos normais
PL-47	Pulvinada com esporulação central sob o micélio
PL-48	Pulvinada com esporulação central sob o micélio
PL-50	Pulvinada com esporulação central irregular
PL-51	Pulvinada
SPL-52T	Micélio desenvolvido na região central, bordos normais
SPL-54A	Pulvinada com esporulação irregular no centro
SPL-3F	Micélio desenvolvido na região central, bordos normais.

4.2. Produção de conídios e crescimento das colônias dos diferentes isolados de *M. anisopliae*

Os resultados obtidos, expressos pela média do número de conídios produzidos pelas colônias de cada isolado, quando submetido às diferentes temperaturas e fotoperíodo de 16 horas, constam da Tabela 5. As médias dos diâmetros das mesmas colônias encontram-se na Tabela 8. Nas Tabelas 6 e 7 acham-se os resultados da análise de variância da produção de conídios entre isolados e da produção de conídios entre as temperaturas respectivamente. Os resultados da análise de vari

TABELA 5. Raiz quadrada dos valores médios da produção de conídios $\times 10^6$, de 11 isolados de *M. anisopliae*, após 6 dias de desenvolvimento, em meio BDA, a diferentes temperaturas com os respectivos testes de Tukey a 5% entre tratamentos e entre temperaturas.

Isolados	Temperat. 26°C		Temperat. 28°C		Temperat. 30°C	
	Tukey	Isolados	Tukey	Isolados	Tukey	Isolados
PL-32	8,03	bc	A	8,86	gh	A
PL-35	6,58	bcd	C	4,64	ij	D
PL-39	8,75	b	F	9,50	g	F
PL-43	14,00	a	H	6,98	hi	I
PL-47	4,66	cd	J	4,36	j	J
PL-48	5,03	cd	L	4,84	ij	L
PL-50	4,67	d	M	4,20	j	MN
PL-51	5,22	cd	P	4,41	j	P
SPL-52T	13,76	a	Q	13,43	f	Q
SPL-54A	1,00	e	S	3,28	j	T
SPL-3F	7,80	bcd	U	11,05	fg	V
						8,23
						U

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

ância dos diâmetros das colônias entre isolados e entre temperaturas encontram-se nas Tabelas 9 e 10 respectivamente.

TABELA 6. Resultados da análise de variância e componentes de variância entre isolados.

Temperaturas (°C)	F	$\bar{m}$	s	C.V.	d.m.s.
26	29,78**	7,23	4,06	56,15 %	3,39
28	49,95**	6,87	3,40	49,52 %	2,44
30	10,48**	4,92	2,22	45,19 %	2,77

(**) = Significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 7. Resultados da análise de variância e componentes de variância entre temperaturas.

Isolados	F	$\bar{m}$	s	C.V.	d.m.s.
PL-32	17,21**	7,50	1,66	22,19 %	1,50
PL-35	40,36**	4,65	1,73	37,27 %	1,23
PL-39	16,00**	7,69	2,48	32,25 %	2,31
PL-43	43,59**	9,14	3,72	40,70 %	2,34
PL-47	6,60**	3,96	1,14	28,78 %	1,36
PL-48	0,08	4,99	1,29	25,96 %	n.s.
PL-50	6,97**	3,99	0,94	23,78 %	1,12
PL-51	3,32	4,24	1,57	37,23 %	n.s.
SPL-52T	7,44**	11,54	4,11	35,61 %	4,79
SPL-54A	12,13**	2,97	1,91	64,27 %	1,93
SPL-3F	15,70**	9,02	1,75	19,43 %	1,63

(**) = significativo ao nível de 1% de probabilidade;

F = resultado do teste F;

m = média;

s = desvio padrão;

C.V. = coeficiente de variação;

d.m.s. = diferença mínima significativa

n.s. = não significativo.

TABELA 8. Diâmetro médio das colônias (mm) de 11 isolados de *M. anisopliae*, após 6 dias de desenvolvimento, em meio BDA, a diferentes temperaturas com os respectivos testes de Tukey a 5% entre tratamentos e entre temperaturas

Isolados	Temperat.		Tukey 5%		Temperat.		Tukey 5%		Temperat.		Tukey 5%	
	-----		-----		-----		-----		-----		-----	
	26°C	Isolados	Temperat.	28°C	Isolados	Temperat.	30°C	Isolados	Temperat.	Isolados	Temperat.	Temperar.
PL-32	24,67	b	A	24,33	fg	A	13,50	k	B			
PL-35	23,67	bc	C	24,83	f	C	13,54	k	D			
PL-39	23,25	bc	E	24,17	fg	E	22,00	i	F			
PL-43	24,33	b	G	22,25	gh	H	15,08	jk	I			
PL-47	23,50	bc	J	24,33	fg	J	12,83	k	K			
PL-48	23,33	bc	L	23,75	fgh	L	14,00	k	M			
PL-50	23,50	bc	N	23,67	fh	N	14,00	k	O			
PL-51	25,17	bc	P	24,33	fg	P	14,83	k	Q			
SPL-52T	22,17	c	R	23,17	fgh	R	18,50	j	S			
SPL-54A	27,67	a	T	30,50	e	U	24,92	i	V			
SPL-3F	16,33	d	W	21,83	h	X	17,33	jk	X			

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

TABELA 9. Resultados da análise de variância entre isolados

Temperaturas (°C)	F	$\bar{m}$	s	C.V.	d.m.s.
26	36,76**	23,42	2,81	12,00 %	2,15
28	22,67**	24,29	2,40	9,88 %	2,26
30	28,64**	16,41	4,09	24,91 %	3,47

(**) = significativo ao nível de 1% de probabilidade

TABELA 10. Resultados da análise da variância entre temperaturas

Isolados	F	$\bar{m}$	s	C.V.	d.m.s.
PL-32	147,67**	28,83	5,32	18,45 %	1,92
PL-35	196,08**	20,68	5,17	25,00 %	1,63
PL-39	15,77**	23,14	1,08	4,67 %	1,00
PL-43	109,50**	20,56	4,10	19,94 %	1,71
PL-47	203,90**	20,22	5,33	26,37 %	1,65
PL-48	651,23**	20,36	4,53	22,25 %	0,79
PL-50	42,53**	20,39	4,90	24,03 %	3,06
PL-51	129,23**	21,44	4,82	22,48 %	1,86
SPL-52T	6,23*	21,28	2,98	14,00 %	3,61
SPL-54A	26,88**	27,69	2,58	9,32 %	1,98
SPL-3F	28,14**	18,50	2,69	14,54 %	2,03

{**} = significativo ao nível de 1% de probabilidade

{*} = significativo ao nível de 5% de probabilidade

F = resultado do teste F;

$\bar{m}$ = média;

s = desvio padrão;

C.V. = coeficiente de variação;

d.m.s. = diferença mínima significativa.

Os resultados de produção de conídios (Tabela 5) evidenciaram diferenças no comportamento entre os isolados nas 3 temperaturas.

Em análise comparativa entre os isolados, verificou-se que o mais produtivo nas 3 temperaturas foi o SPL-52T, não diferindo do PL-43 a 26°C ao nível de 5% de significância, nem do SPL-3F a 28°C e nem do SPL-3F, PL-43 e PL-32 a 30°C.

Os isolados menos produtivos a 26, 28 e 30°C foram: PL-35, PL-51, PL-48, PL-50, PL-47 e SPL-54A, sendo que este último isolado à temperatura de 26°C diferiu estatisticamente dos demais. À temperatura de 26°C o isolado SPL-3F não diferiu do grupo de menor produção de conídios, ocorrendo de igual modo com o isolado PL-39 à temperatura de 30°C.

Com relação ao comportamento dos isolados nas diferentes temperaturas pode-se observar na Tabela 5 que de modo geral os isolados apresentam uma tendência no sentido de diminuir a produção de conídios na medida que a temperatura é aumentada; apresentando estes resultados, com exceção dos isolados PL-48 e PL-51, diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 5). Esta tendência de diminuição na produção foi também observada por GRUNER e ABUD-ANTUN (1976) em linhagens de *M. anisopliae* que apresentaram maior esporulação a 25°C do que a 28 e 31°C. Não obstante esta tendência não coincida com a observada por ALVES (1982) estudando outros isolados; o isolado SPL-3F, também estudado pe

lo mesmo autor, apresentou idêntico comportamento naquela oportunidade.

A comparação de médias pelo Teste Tukey revelou diferenças significativas no crescimento das colônias entre isolados. O isolado que apresentou maior crescimento micelial nas 3 temperaturas foi SPL-54A, não diferindo do PL-39 a 30°C ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 8). O isolado que apresentou menor desenvolvimento nas 3 temperaturas foi SPL-3F, não diferindo estatisticamente dos isolados PL - 48, PL-50 e SPL-52T a 28°C e nem dos isolados PL-32, PL-35, PL-43, PL-47, PL-48, PL-50 e PL-51 a 30°C.

Analizando o comportamento de cada isolado exposto a 26 e 28°C, em geral não foram observadas diferenças significativas. Apenas nos isolados SPL-54A e SPL-3F observou-se um aumento significativo no diâmetro das colônias, entretanto o isolado PL-43 manifestou diminuição significativa (Tabela 8). O aumento da temperatura de 28 para 30°C acarretou a diminuição do crescimento, com exceção do SPL-3F, cuja diminuição do crescimento não foi significativa ao nível de 5% de probabilidade.

Em pesquisas realizadas por LATCH (1965), o autor constatou que a temperatura ótima de crescimento para um isolado de *M. anisopliae* oriundo de *Oxycaenus* foi de 20°C, no entanto para outras linhagens a faixa ótima está compreendida entre 25 e 30°C, verificaram-se assim diferenças marcantes quanto à influência da temperatura sobre cres

cimento e esporulação das diferentes raças de *M. anisopliae*.

4.3. Produção de conídios em meio de arroz

A comparação dos valores médios de produção de conídios pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade encontram-se na Tabela 11.

TABELA 11. Valores médios do número de conídios (raiz quadrada $\times 10^9$) produzidos em 100g de arroz a 28°C e fotoperíodo de 16 horas, após 15 dias e resultados do Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Isolados	Repetições				Média	Tukey (5%)
	1	2	3	4		
PL-32	3,61	8,68	8,20	8,55	7,26	ab
PL-35	10,92	13,60	5,48	5,38	8,84	ab
PL-39	2,47	5,14	6,26	5,90	4,94	b
PL-43	5,95	5,44	9,18	7,64	7,05	ab
PL-47	6,82	5,70	5,90	7,54	6,49	ab
PL-48	6,14	8,02	9,01	7,25	7,60	ab
PL-50	5,97	6,59	6,94	5,97	6,37	b
PL-51	4,54	6,69	6,50	4,47	5,55	b
SPL-52T	8,28	10,37	11,36	14,66	11,17	a
SPL-54A	6,06	5,51	6,60	5,75	5,98	b
SPL-3F	5,52	7,03	4,76	4,72	5,51	b
Teste F entre isolados: $F = 3,38^{**}$ $\bar{m} = 6,98$ $s = 2,40$ C.V. = 34,38% d.m.s. = 4,71						

Através do Teste de Tukey (Tabela 11) verificou-se que o isolado SPL-52T foi o mais produtivo não diferenciando do PL-32, PL-35, PL-43, PL-47 e PL-48, os que, por sua vez, tampouco apresentavam diferenças com os menos produtivos: PL-39, PL-50, PL-51, SPL-54A e SPL-3F.

4.4. Dimensões dos conídios e produção de inóculo sobre cadáveres de *D. saccharalis*

As dimensões médias dos conídios dos 11 isolados estudados, respectivas análises de variância e quantidade de conídios produzidos por 10 lagartas pré-pupas de *D. saccharalis*, após 12 dias de inoculação pelos diferentes isolados, estão na Tabela 12.

Através dos resultados do Teste Tukey (5%) pode-se inferir 4 categorias de médias do comprimento de conídios (Tabela 12). Os isolados que apresentaram o maior comprimento de conídios em ordem decrescente foram: PL-47, PL-51, PL-50, PL-43, PL-35, embora a média destes 3 últimos não sejam diferentes das médias de SPL-3F e PL-48. Os isolados PL-39, SPL-52T e PL-32 situaram-se em outra categoria intermediária e suas médias não diferiram entre si, no entanto o isolado SPL-54A apresentou os menores conídios diferenciando dos demais.

TABELA 12. Média do comprimento e largura de 50 conídios (micrômetros) dos diferentes isolados de *M. anisopliae* desenvolvidos em meio BDA e raiz quadrada dos valores médios de produção de inóculo $\times 10^7$ sobre lagartas pré-pupas de *D. saccharalis*, 12 dias após a inoculação, com seus respectivos testes de Tukey a 5% de probabilidade.

Isolados	Dimensão de conídios		Nº de conídios produzidos/ 10 lagartas de <i>D. saccharalis</i> (nx10 ⁷)	Tukey	5%
	Comprimento (micrômetros)	Largura (micrômetros)			
PL-32	5,74	2,25	9,68	b	
PL-35	7,50	2,20	10,14	b	
PL-39	5,95	2,22	16,24	a	
PL-43	7,51	2,36	13,39	ab	
PL-47	7,89	2,18	15,82	a	
PL-48	7,18	2,35	15,00	a	
PL-50	7,65	2,32	10,42	b	
PL-51	7,80	2,44	15,33	a	
SPL-52T	5,88	2,44	4,66	c	
SPL-54A	5,37	2,62	10,44	b	
SPL-3F	7,20	2,35	5,93	c	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

Teste F para comprimento de conídios Teste F para produção de conídios em *D. saccharalis*
 $F = 83,70^{**}$ $\bar{m} = 6,88$ $s = 0,90$ $F = 30,74^{**}$ $s = 3,84$
 $CV = 13,08\%$ $dms = 0,47$ $CV = 33,25\%$ $dms = 4,01$

Considerando os valores médios das medições realizadas, os isolados estudados pertencem à forma de conídios curtos, denominada variedade *anisopliae*, cujos valores limites de ocorrência mais freqüente foram estabelecidos por TULLOCH (1976) entre 5,0 e 8,0 micrômetros de comprimento, podendo ocorrer também conídios com 3,5 a 9,0 micrômetros de comprimento.

Quanto a produção de inóculo sobre lagartas de pré-pupa de *D. saccharalis*, os isolados responsáveis pela maior produção de conídios foram: PL-39, PL-47, PL-51, PL-48 e PL-43. Este último isolado apresentou uma média de produção que não difere estatisticamente do grupo de produção intermediário constituído por PL-50, SPL-54A, PL-35 e PL-32. O grupo de menor produção de conídios, mostrou estar constituído por SPL-3F e SPL-52T.

4.5. Inativação de conídios dos diferentes isolados do *M. anisopliae* com radiação ultravioleta

Os valores de DE_{50} , de ultravioleta, necessária para evitar a germinação de 50% dos conídios dos diferentes isolados, após 24 horas encontram-se na Tabela 13.

Os valores que se observam na Tabela 13, evidenciam a sensibilidade dos diferentes isolados à exposição de luz ultravioleta. Os que apresentaram maior resistência fo

TABELA 13. DE₅₀ de luz ultravioleta necessária para inibir a germinação de 50% dos co-
nídios de 11 isolados de *M. anisopliae*, 24 horas após e seus respectivos in-
tervalos de confiança.

Isolados	DE ₅₀ (segundos)	Intervalo de confiança para DE ₅₀ (segundos)	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Coefficiente correlação (r)
PL-32	48,46b	45,54 a 51,56	5,0579	6,6419	0,9727
PL-35	48,11b	40,59 a 57,01	5,5609	4,8546	0,8644
PL-39	39,81c	39,02 a 40,65	5,4110	7,5769	0,9916
PL-43	53,70b	52,22 a 54,77	5,0470	6,0518	0,9496
PL-47	44,56b	42,91 a 46,28	4,9895	5,9179	0,9910
PL-48	60,71a	58,93 a 62,54	5,0282	5,3826	0,9869
PL-50	53,67b	50,21 a 57,36	4,8559	5,2953	0,9589
PL-51	50,32b	48,72 a 51,96	4,7664	5,0283	0,9932
SPL-52T	68,18a	66,88 a 69,49	5,0532	7,7523	0,9956
SPL-54A	32,01c	30,63 a 33,45	5,2064	4,0123	0,9960
SPL-3F	46,54b	44,86 a 48,29	5,5225	7,0266	0,9918
Média das DEs ₅₀ = 49,65		s(m) = 2,93	IC = 49,65 ± 6,53		s = 9,72

ram SPL-52T e PL-48. Mostraram-se medianamente resistentes os isolados PL-43, PL-50, PL-51, PL-32, PL-35, SPL-3F e PL - 47; sendo que os isolados PL-39 e SPL-54A foram os mais sensíveis.

A maior sensibilidade dos isolados PL-39 e SPL-54A à luz ultravioleta pode estar relacionada a uma seleção natural de corrente do hábito dos insetos hospedeiros. Assim, o isolado PL-39 foi obtido de *M. fimbriolata* praga que incide nas raízes da cana-de-açúcar ou na região do colo da planta. Da mesma maneira o SPL-54A foi isolado de *Atta sexdens rubropilosa* que constrói ninhos subterrâneos. Os outros isolados mais resistentes à radiação ultravioleta foram obtidos de insetos que atacam a parte aérea das plantas.

No trabalho realizado por OKINO *et alii* (1978), os autores irradiaram com luz ultravioleta (2.537 Å) durante 60 segundos conídios suspensos em uma solução fisiológica e obtiveram 100% de sobrevivência, ocorrendo uma queda para 10,7% quando irradiados durante 120 segundos. Estes resultados não concordam com os obtidos no presente trabalho, assim, os isolados que apresentaram a menor susceptibilidade à luz ultravioleta foram SPL-52T e PL-48 apresentando 50% de germinação com 68,18 e 60,71 segundos de exposição respectivamente. Esta discordância possivelmente deve-se a diferença na metodologia no processo de irradiação, considerando a baixa penetrabilidade da luz ultravioleta é muito provável que a menor porcentagem de inativação se deva à presença da solução fisiológica.

4.6. Bioensaios com *D. saccharalis*, *G. mellonella* e *T. molitor*

Os resultados obtidos em bioensaios com *D. saccharalis*, *G. mellonella* e *T. molitor*, acham-se nas Tabelas 14, 15 e 16 expressos em porcentagens de mortalidade corrigida e acumulada. Os tempos necessários para provocar 50% de mortalidade (TL_{50}) nas 3 espécies de insetos testadas, seus respectivos intervalos de confiança, Taxas de Potência, coeficientes lineares e angulares encontram-se nas Tabelas 17, 18 e 19.

As retas correspondentes aos valores de mortalidade-tempo (escala log. tempo-probita) para os insetos testados com diferentes isolados de *M. anisopliae*, encontram-se nas Figs. 14 a 19.

Através dos TLs_{50} é possível inferir uma maior susceptibilidade da espécie *T. molitor*, na qual o TL_{50} variou entre 2,03 e 6,32 dias (Tabela 19 e Fig. 18, 19). *G. mellonella* comportou-se como a mais resistente, devido a que os isolados estudados provocaram 50% de mortalidade entre os 5,85 e 17,70 dias (Tabela 18 e Fig. 16 e 17). Para *D. saccharalis* os TLs_{50} variaram entre 3,22 e 6,45 dias, apresentando assim um comportamento intermediário em relação as espécies anteriores (Tabela 17 e Fig. 14, 15).

Com relação ao comportamento dos isolados entre si, foi possível dividi-los em 3 categorias. Os mais vi-

TABELA 14. Porcentagens das mortalidades corrigidas e acumuladas de pré-pupas de *D. saccharalis* provocadas pelos diferentes isolados de *M. anisopliae* na dose de $1,3 \times 10^8$ conídios/ml.

Dias após inoculação	Isolados									
	PL-32	PL-35	PL-39	PL-43	PL-47	PL-48	PL-50	PL-51	SPL-52T	SPL-54A SPL-3F
1			2,5						2,5	
2			2,5						7,5	
3	12,5	10,0	32,5	22,5	15,0	15,0	27,5	22,5	27,5	8,1 3,3
4	57,5	60,0	90,0	52,5	42,5	52,5	40,0	67,5	80,0	29,7 13,3
5	90,0	72,5	92,5	65,0	80,0	82,5	52,5	85,0	87,5	37,8 30,0
6	92,5	80,0		67,5	82,5	87,5	75,0		87,5	40,5 50,0
7									90,0	63,3
8										66,7
9										70,0

TABELA 15. Porcentagens das mortalidades corrigidas e acumuladas de lagartas de *G. mel- lonella* provocadas pelos diferentes isolados de *M. anisopliae* na dose de $1,3 \times 10^8$ conídios/ml

Dias após		Isolados									
inocu-		-----									
1aço	PL-32	PL-35	PL-39	PL-43	PL-47	PL-48	PL-50	PL-51	SPL-52T	SPL-54A	SPL-3F
3	2,5	7,5	5,0	2,5	2,5	5,0	5,0		2,5	5,0	5,0
4	10,0	10,0	10,0	10,0	17,5	12,5	12,5		12,5	7,5	5,0
5	25,0	15,0	32,5	27,5	22,5	12,5	5,0	7,5	35,0	17,5	10,0
6	47,5	40,0	55,0	45,0	17,5	17,5	15,0	17,5	52,5	27,5	20,0
7	52,5	52,5	57,5	57,5	30,0	22,5	20,0	20,0	62,5	30,0	30,0
8	55,0	62,5	65,0	60,0	35,0	25,0	25,0	25,0	72,5	35,0	35,0
9	57,5	65,0	67,5	70,0	37,5	25,0	32,5	35,0	80,0	40,0	42,5
10	60,0	70,0	82,5	70,0	42,5	30,0	37,5	35,5	82,5	42,5	47,5
11	62,5	75,0	90,0	72,5	45,0	37,5	50,0	40,0	85,0	47,5	47,5
12	65,0	77,5	92,5	77,5	50,0	40,0	50,0	50,0	85,0	47,5	52,5
13				77,5	55,0	40,0	50,0	60,0	87,5	47,5	55,0
14				77,5	55,0	40,0	50,0	60,0		52,5	55,0
15				77,5	55,0	42,5	55,0	62,5			57,5
16				80,0	55,0		60,0				57,5
17					57,5		67,5				62,5

TABELA 16. Porcentagens das mortalidades corrigidas e acumuladas de larvas de *T. molitor* provocadas pelos diferentes isolados de *M. anisopliae* na dose de $1,3 \times 10^8$ conídios/ml

Dias após inoculação	Isolados											
	PL-32	PL-35	PL-39	PL-43	PL-47	PL-48	PL-50	PL-51	SPL-52T	SPL-54A	SPL-3F	
1		7,5	40,0	5,0	7,5	7,5		15,0	27,5	2,5	5,0	
2	10,0	17,5	52,5	12,5	15,0	22,5	5,0	20,0	45,0	37,5	7,5	
3	30,0	35,0	65,0	22,5	32,5	27,5	7,5	45,0	65,0	62,5	7,5	
4	47,5	52,5	95,0	50,0	40,0	50,0	32,5	72,5	95,0	70,0	10,0	
5	60,0	55,0	95,0	55,0	57,5	52,5	60,0	80,0	100,0		25,0	
6	70,0		97,5	65,0	75,0	55,0	77,5				45,0	
7	87,5				87,5		87,5				70,0	
8	92,5				90,0		92,5				72,5	
9							95,0				75,0	
10											77,5	

TABELA 17. TL₅₀, intervalos de confiança (IC) e Taxas de Potência dos diferentes isolados de *M. anisopliae* para lagartas pré-pupas de *D. saccharalis*.

Isolado	Intervalo confiança		Taxa de Potência (UP)	Coeficiente linear (a)	Coeficiente angular (b)	Coeficiente correlação (r)
	TL50 (dias)	para TL50 (dias)				
PPL-32	3,86	3,36 a 4,44	1018b	5,2881	9,5735	0,9822
PL-35	4,14	3,12 a 5,51	949b	5,1470	6,8668	0,9328
PL-39	3,22	2,67 a 3,88	1220a	5,0004	9,8275	0,9759
PPL-43	4,24	3,31 a 5,44	927b	5,0483	4,0723	0,9521
PL-47	4,15	3,50 a 4,92	947b	5,1365	7,1965	0,9745
PL-48	3,98	3,50 a 4,52	987b	5,2219	7,7476	0,9857
PL-50	4,45	3,62 a 5,46	833b	4,9328	3,9601	0,9671
PL-51	3,64	2,56 a 5,18	1080b	5,1885	8,2665	0,9910
SPL-52T	3,36	2,33 a 4,86	1170a	5,6139	5,3193	0,8913
SPL-54A	6,45	3,79 a 10,99	609c	4,4727	3,5727	0,9223
SPL-3F	3,93	3,46 a 4,47	1000b	5,3286	5,2939	0,9641

UP = Unidade Padrão de Potência fixada em 1000 para SPL-3F
Média das Taxas de Potência = 981; s = 160; IC = 981 ± 107,0

TABELA 18. TL₅₀, intervalos de confiança (IC) e Taxas de Potência dos diferentes isolados de *M. anisopliae* para lagartas de *G. mellonella* de 7º instar

Isolados	TL ₅₀ (dias)	Intervalo confiança para TL ₅₀ (dias)	Taxa de potência (UP)	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Coefficiente correlação (r)
PL-32	7,58	6,65 a 8,64	1558b	5,0702	2,3065	0,9105
PL-35	6,83	6,44 a 7,24	1729a	5,3304	3,2521	0,9883
PL-39	6,22	5,65 a 6,85	1899a	5,4379	4,5094	0,9648
PL-43	7,72	7,02 a 8,50	1530b	5,3423	3,2431	0,9576
PL-47	13,48	12,92 a 14,08	876c	4,8392	2,3974	0,9884
PL-48	17,70	15,96 a 19,62	667c	4,5168	2,3224	0,9778
PL-50	13,30	12,81 a 13,80	888c	4,8733	3,7140	0,9825
PL-51	12,04	11,54 a 12,56	981b	4,8330	3,7108	0,9827
SPL-52T	5,85	5,44 a 6,29	2019a	5,5141	3,8120	0,9819
SPL-54A	13,65	12,60 a 14,78	865c	4,8019	1,6190	0,9722
SPL-3F	11,81	11,11 a 12,51	1000b	4,9538	1,9942	0,9743

UP = Unidade Padrão de Potência fixada em 1000 para SPL-3F

Média das Taxas de Potência = 1274; s = 480; s(m) = 144; IC = 1274 ± 322,6

TABELA 19. TL₅₀, intervalos de confiança (IC) e Taxas de Potência dos diferentes isolados de *M. anisopliae* em larvas de *T. molitor* de último instar.

Isolados	TL ₅₀ (dias)	Intervalo confiança para TL ₅₀ (dias)	Taxa de Potência (UP)	Coefficiente linear (a)	Coefficiente angular (b)	Coefficiente correlação (r)
PL-32	4,14	3,73 a 4,59	1526c	5,3468	4,4421	0,9796
PL-35	4,17	3,30 a 5,27	1516c	4,7624	2,7811	0,9806
PL-39	2,03	1,07 a 3,86	3113a	5,8246	4,3190	0,9463
PL-43	4,50	3,88 a 5,23	1404c	4,8055	3,3964	0,9780
PL-47	4,20	3,74 a 4,71	1505c	5,3288	4,4325	0,9744
PL-48	4,81	3,76 a 6,16	1311c	4,8995	2,0648	0,9302
PL-50	3,31	2,04 a 5,38	1909b	5,8259	3,4186	0,8712
PL-51	3,11	2,76 a 3,51	2032a	5,1164	4,4327	0,9931
SPL-52T	2,20	1,34 a 3,62	2873a	5,3930	6,3581	0,8909
SPL-54A	3,71	2,82 a 4,88	1704b	4,9530	5,7200	0,9519
SPL-3F	6,32	5,53 a 7,22	1000c	5,2653	4,8657	0,9391

UP = Unidade Padrão de Potência fixada em 1000 para SPL-3F

Média das Taxas de Potência = 1808; s = 650; s($\bar{m}$) = 87; IC = 1808 $\pm$ 194,0

FIGURA 14. Mortalidade vs. tempo (escala próbitos/log) de pré-pupas de *D. saccharalis*, inoculadas com diferentes isolados de *M. anisopliae*.

FIGURA 15. Mortalidade vs. tempo (escala próbitos/log.) de pré-pupas de *D. saccharalis*, inoculadas com diferentes isolados de *M. anisopliae*.

FIGURA 16. Mortalidade vs. tempo (escala próbitos/log.) de lagartas de 7º instar de *G. mellonella*, inoculadas com diferentes isolados de *M. anisopliae*.

FIGURA 17. Mortalidade vs. tempo (escala próbitos/log.) de lagartas de 7º ínstar de *G. mellonella*, inoculadas com diferentes isolados de *M. anisopliae*.

FIGURA 18. Mortalidade vs. tempo (escala próbitos/log.) de larvas de *T. molitor* de último instar, inoculadas com diferentes isolados de *M. anisopliae*.

FIGURA 19. Mortalidade vs. tempo (escala próbitos/log.) de larvas de *T. molitor* de último instar, inoculadas com diferentes isolados de *M. anisopliae*.

ruentos, comuns aos 3 insetos testados foram PL-39 e SPL-52-T, além destes, os isolados PL-35 e PL-51 mostraram-se virulentos para *G. mellonella* e *T. molitor* respectivamente.

Os isolados PL-32, PL-43, SPL-3F e PL-51 comportaram-se como medianamente virulentos para *G. mellonella* e *D. saccharalis*, mas nesta última espécie os isolados PL-48, PL-35, PL-47 e PL-50 podem ser reunidos na mesma categoria.

Para *T. molitor* apenas os isolados PL-50 e SPL-54A mostraram-se como medianamente virulentos.

O isolado SPL-54A mostrou baixa virulência para *D. saccharalis* e *G. mellonella*. Para a última espécie os isolados PL-50, PL-47 e PL-48 também tiveram idêntico comportamento. Da mesma maneira, os isolados que mostraram baixa virulência para *T. molitor* foram: PL-32, PL-35, PL-47, PL-43, PL-48 e SPL-3F.

A eficiência dos mesmos isolados para *D. flavopicta*, pode ser determinada através da equação da reta elaborada por ALVES (1982). Assim, no caso dos isolados SPL-52T, PL-39, PL-35, PL-32 e PL-43, a porcentagem relativa de mortalidade de *D. flavopicta* seria muito elevada, evidenciando a superioridade desses isolados em relação aos estudados pelo referido autor, no entanto os isolados PL-51, PL-50, PL-47 e SPL-54A podem ser considerados de menor eficácia para *D. flavopicta*. O isolado PL-48 foi o que apresentou menor eficiência.

Segundo DULMAGE (1981), quando são realizados bioensaios com 2 espécies de insetos é possível comparar as

δ - endotoxinas do *Bacillus thuringiensis* com as toxinas da linhagem utilizada como padrão, baseando-se nas Proporções de Atividades entre as Unidades Internacionais de Potência (UIs) obtidas para as 2 espécies de insetos.

Usando as Taxas de Potência obtidas para os diferentes insetos calculou-se as Proporções de Atividades para os isolados de *M. anisopliae*. Os resultados encontram-se na Tabela 20.

Por esses resultados observou-se que os isolados PL-50 e PL-51 possuíam proporções de Atividade semelhantes (G.m./D.s. = 1; T.m./G.m. = 2,1; e T.m./D.s. = 2), o que poderia indicar uma certa semelhança em termos de toxinas. Este fato também foi observado para isolados PL-32, PL-35 e PL-43 (G.m./D.s. = 1,6; T.m./G.m. = 0,9 e T.m./D.s. = 1,5). Idêntica tendência observou-se nos isolados PL-39 com SPL-52T (G.m./D.s. = 1,6; T.m./G.m. = 1,5 e T.m./D.s. = 2,5) e PL-47 com PL-48 (G.m./D.s. = 0,8; T.m./G.m. = 1,8 e T.m./D.s. = 1,4). De modo geral, as Proporções de Atividade apresentadas pelos isolados estudados foram diferentes do Padrão, SPL-3F.

4.7. Produção de enzimas

As médias dos índices enzimáticos obtidos da relação diâmetro do halo produzido/diâmetro da colônia encontram-se na Tabela 21.

TABELA 20. Comparação das Proporções de Atividades dos diferentes isolados de *M. anisopliae*.

Propor- ções de	Isolados										
	PL-32	PL-35	PL-39	PL-43	PL-47	PL-48	PL-50	PL-51	SPL-52T	SPL-54A	SPL-3F
Gm/Ds	1,5	1,8	1,6	1,6	0,9	0,7	1,0	0,9	1,7	1,4	1,00
Tm/Gm	1,0	0,9	1,6	0,9	1,7	2,0	2,1	2,1	1,4	2,0	1,00
Tm/Ds	1,5	1,6	2,6	1,5	1,6	1,3	2,1	1,9	2,4	2,8	1,00

TABELA 21. Contraste das médias, através do teste Tukey (5%), dos índices enzimáticos, para produção de amilase, protease e lipase, obtidos após incubação a 28°C durante 5 dias.

Isolados	Amilase	Tukey (5%)	Protease	Tukey (5%)	Lipase	Tukey (5%)
PL-32	1,5913	ab	1,4846	d	1,0000	i
PL-35	1,7638	a	1,4095	de	1,0159	hi
PL-39	1,5011	bc	1,4296	d	1,1004	h
PL-43	1,5592	abc	1,4076	de	1,0364	hi
PL-47	1,5526	abc	1,2944	ef	1,0000	i
PL-48	1,4737	bc	1,4045	de	1,0000	i
PL-50	1,5406	abc	1,3855	de	1,0000	i
PL-51	1,3822	bc	1,2485	ef	1,0994	h
SPL-52T	1,4916	bc	1,1964	f	1,2340	g
SPL-54A	1,5722	abc	1,3502	def	1,0000	i
SPL-3F	1,3569	c	1,0392	f	1,3205	g

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 22. Resultados da análise de variância para índices de amilase, protease e lipase dos diferentes isolados de *M. anisopliae*.

Índices	F	$\bar{m}$	s	C.V.	d.m.s.
Amilase	5,32**	1,5259	0,1482	9,71%	0,2242
Protease	11,55**	1,3318	0,1491	11,20%	0,1798
Lipase	26,63**	1,0733	0,1148	10,70%	0,0954

Como pode-se observar na Tabela 22, os isolados que apresentaram maior produção de amilase foram PL-35, PL-32, SPL-54A, PL-43, PL-47 e PL-50, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Por sua vez os isolados PL-32, SPL-54A, PL-43, PL-47, PL-50, PL-39, SPL-52T, PL-48 e PL-51 também podem ser reunidos num grupo intermediário, não diferindo entre si. A exceção do PL-32, os isolados referidos em último lugar não diferiram do isolado SPL-3F, o qual produziu menos amilase. ROSATO *et alii* (1981) estudaram a atividade amilolítica em 11 isolados, dos quais 3 não apresentaram produção de amilase extracelularmente sendo seu índice igual a 1,0 o que não foi observado nos isolados estudados no presente trabalho.

Considerando a capacidade de produção de protease, os isolados que se mostraram mais produtivos foram PL-32, PL-39, PL-35, PL-43, PL-48, PL-50 e SPL-54A, não diferindo entre si ao nível de 5% de significância, porém os 5 úl-

timos não diferiram dos isolados PL-47 e PL-51, reunidos num grupo intermediário. Por sua vez os isolados SPL-54A, PL-47 e PL-51 não diferiram dos isolados SPL-52T e SPL-3F localizados no grupo com menor atividade proteolítica. Mediante a análise dos resultados constatou-se que existe correlação positiva entre os índices de atividade amilolítica e proteolítica, com um valor de $r = 0,65^*$, significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Com relação à capacidade de produção de lipase, os isolados mais produtivos foram SPL-3F e SPL-52T, diferindo dos demais isolados. Num grupo intermediário situam-se os seguintes isolados: PL-39, PL-51, PL-43 e PL-35. Porém, estes 2 últimos isolados que apresentaram atividade lipolítica não diferiram estatisticamente dos isolados PL-32, PL-47, PL-48, PL-50 e SPL-54A, os quais não mostraram atividade lipolítica, ao menos extracelularmente. PARIS e SEGRETAIN (1978) também não encontraram atividade lipolítica no fungo *Beauveria tenella*, atribuindo este fato a uma acumulação intracelular da enzima.

Não obstante, as análises de correlação dos índices lipolíticos com as Taxas de Potência não serem significativas, observou-se que os isolados mais virulentos SPL-52T e PL-39 apresentaram os índices lipolíticos mais elevados, o que poderia significar uma característica necessária para traduzir-se em virulência. O isolado SPL-3F possui alta capacidade de produção de lipase, porém não se mostrou virulento, possivelmente pelo fato de apresentar baixa capacidade de produção de amilase e protease.

Encontrou-se também correlação plotando os índices de atividade lipolítica contra os de atividade amilolítica.

tica e proteolítica, sendo que em ambos casos a correlação foi negativa com valores de $r = -0,62^*$ (significativo) e $r = 0,85^{**}$ (altamente significativo) respectivamente. ROSATO et alii (1981) determinaram a atividade enzimica de 11 isolados de *M. anisopliae* mas não observaram estas correlações negativas.

4.8. Padrões eletroforéticos e perfis baseados em características biológicas e bioquímicas de 11 isolados de *M. anisopliae*.

Os zimogramas do sistema α - esterase dos diferentes isolados do *M. anisopliae* estão representados nas Fig. 20 a 29, acompanhados de seus respectivos perfis.

Mediante a análise desses zimogramas puderam-se reunir 2 grupos de isolados com padrões eletroforéticos idênticos: o primeiro grupo constituído pelos isolados PL-32, PL-50 e PL-51 e o segundo grupo formado pelos isolados PL-35, PL-43 e PL-48, os quais foram diferentes do primeiro grupo pela presença de uma banda a mais.

O isolado PL-47 apresentou um padrão semelhante ao segundo grupo, mas as bandas 3 e 5 apresentavam-se indefinidas.

Os isolados PL-39, SPL-52T, SPL-54A e SPL-3F apresentaram padrões eletroforéticos diferentes entre si e dos

demaís. Sendo apenas semelhantes os de SPL-52T e SPL-3F, diferenciando-os entre si pela presença de 2 bandas a mais no zimograma do isolado SPL-52T.

Também foi observado que os zimogramas dos diferentes isolados obtidos a partir dos seus hospedeiros originai nais, não sofreram alterações após a inoculação desses isolaa dos em lagartas de *D. saccharalis* e *G. mellonella*.

FIGURA 20. Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado PL-32.
 * *G. mellonella*; ***D. saccharalis*; ****T. molitor*.

FIGURA 21. Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado PL-35. **G. mellonella*; ***D. saccharalis*; ****T. molitor*.

FIGURA 22. Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado PL-39
 G. mellonella*; *D. saccharalis*; ****T. molitor*.

FIGURA 23. Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado PL-43.
 *G. mellonella; **D. saccharalis; ***T. molitor.

FIGURA 24. Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado PL-47
 G. mellonella*; *D. saccharalis*; ****T. molitor*.

FIGURA 25. Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado PL-48. **G. mellonella*; ***D. saccharalis*; ****T. molitor*.

FIGURA 26. Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado PL-50. **G. mellonella*; ***D. saccharalis*; ****T. molitor*.

FIGURA 28. Perfil biológico e bioquímico do isolado padrão SPL-3F e do isolado SPL-52T
 G. mellonella*; *D. saccharalis*; ****T. molitor*.

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos permite as seguintes conclusões:

- 1 - As temperaturas de 26 e 28°C e fotoperíodo de 16 horas forneceram as condições necessárias para o desenvolvimento das colônias com características típicas permitindo assim, uma melhor caracterização morfológica.
- 2 - De modo geral, as temperaturas já referidas favorecem uma maior produção de conídios e maior crescimento das colônias, sobre meio BDA.
- 3 - A linhagem SPL-52T foi a única que apresentou maior produção em meio BDA, às diferentes temperaturas e um substrato de arroz a 28°C, com 16 horas de fotoperíodo.
- 4 - Todos os isolados estudados pertencem à variedade *anisopliae*.

- 5 - Os isolados que apresentaram maior produção de conídios sobre *D. saccharalis*, em ordem decrescente foram: PL - 39, PL-47, PL-51, PL-48 e PL-43. Entretanto os isolados SPL-52T e SPL-3F foram os menos produtivos.
- 6 - Os isolados que apresentaram maior resistência natural à radiação ultravioleta foram SPL-52T e PL-48.
- 7 - Os isolados que mostraram maior virulência para os 3 insetos testados foram SPL-52T e PL-39, no entanto para *G. mellonella* o PL-35 também apresentou alta virulência, da mesma maneira aconteceu para *T. molitor* com o isolado PL-51.
- 8 - Os isolados não apresentaram especificidade em relação aos diferentes hospedeiros.
- 9 - As Proporções de Atividade foram semelhantes para os isolados PL-32, PL-35 e PL-43; e para os pares PL-50, PL-51; PL-39, SPL-52T, PL-47 e PL-48.
- 10 - Os índices de produção de amilase e protease possuem uma correlação positiva, sendo a mesma negativa quando se confronta os índices já citados com os de produção de lipase. Todos esses índices não apresentaram nenhuma correlação com as Taxas de Potência, porém os isolados mais virulentos mostraram elevada atividade lipolítica.
- 11 - A passagem dos diferentes isolados em *D. saccharalis* e *G. mellonella* não alterou os seus padrões eletroforéticos.

- 12 - Os pares de isolados PL-32, PL-35, PL-50 e PL-51 apresentaram seus perfis biológicos e bioquímicos semelhantes, além disso sua origem é comum podendo-se cogitar que sejam linhagens idênticas. As demais linhagens são diferentes.
- 13 - As linhagens que apresentaram características mais apropriadas ao controle microbiano foram SPL-52T (maior produção, alta virulência, e alta resistência a radiação ultravioleta) e PL-39 (alta virulência, produção média em meio de arroz e alta produção de conídios sobre cadáveres de pré-pupas de *D. saccharalis*).

CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE ISOLADOS
DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 PROVENIENTES
DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

Autor: DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ
Orientador: Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

6. RESUMO

A presente pesquisa visou a caracterização e padronização de 11 isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, procurando selecionar os isolados mais produtivos e altamente virulentos para sua utilização no controle microbiano de pragas. Os ensaios foram realizados no laboratório de Patologia dos Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP. A caracterização baseiou-se em estudos de produção de conídios, aspectos morfológicos culturais e crescimento micelial das colônias, quando submetidas a 3 temperaturas ($26 \pm 0,2$; $28 \pm 0,2$ e $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$); produção em meio de arroz; determinações do tamanho dos conídios das colônias que desenvolveram em meio de cultura BDA e estudos de resistência à luz ultravioleta ($2.537 \text{ \AA}$). Realizou-se a padronização através de bioensaios, utilizando-se como insetos testes: *Diatraea saccharalis* (F.), *Galleria mellonella* L. e *Tenebrio molitor* L. Determinaram-se as Taxas de Potência de cada isolado para as 3

espécies de insetos, com as mesmas calcularam-se as Proporções de Atividade dos diferentes isolados, encontrando-se analogia entre alguns deles, o que significaria a presença de toxinas homólogas. Foram estudadas capacidade de produção de inóculo sobre lagartas do último ínstar de *D. saccharalis* e a atividade amilolítica, proteolítica e lipolítica em meios de cultura sólidos, não encontrando-se correlação entre virulência e atividade enzimica, porém, a maior atividade lipolítica ocorreu nos isolados mais virulentos (PL-39 e SPL-52T) e no Padrão (SPL-3F). Com os resultados obtidos nos diferentes ensaios foram elaborados perfis biológicos e bioquímicos, para facilitar a análise comparativa entre os isolados. Verificou-se que os isolados PL-50 e PL-51 da mesma linhagem não diferiram em seu comportamento. Os isolados PL-32 e PL-35 apresentaram características semelhantes, não sendo idênticos, entretanto os demais isolados foram diferentes entre si. A linhagem que apresentou menor suscetibilidade a radiação ultravioleta, maior produção de conídios em BDA e em arroz foi a SPL-52T, sendo altamente virulenta para os 3 insetos testados, juntamente com a PL-39. Entretanto, esta última apresentou produção média de conídios sobre BDA e arroz, mostrando alto potencial de esporulação sobre pré-pupas de *D. saccharalis*.

CHARACTERIZATION AND STANDARDIZATION OF ISOLATES
OF *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 FROM
DIFFERENT BRAZILIAN REGIONS

Author: DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ
Adviser: Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

7. SUMMARY

This research was carried out in order to characterize and to standardize 11 isolates of *M. anisopliae*, and then choose the more productive and virulent ones for pest control. The experiments were set in the laboratory of Insect Pathology of the Department of Entomology, Superior School of Agriculture "Luiz de Queiroz", in Piracicaba, State of São Paulo, Brazil. The characterization was based on the following parameters: conidia production, morphological aspects of the colony and mycellia growing, when submitted to 3 different temperatures ($26 \pm 0,2$; $28 \pm 0,2$ and $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$); production on rice medium; determination of conidia size from colonies developed on PDA medium; studies of resistance under ultra-violete light ($2.537 \text{ \AA}$). The standardization was studied with the following insects: *Diatraea saccharalis* (F.), *Galleria mellonella* L. and *Tenebrio molitor*. The Potency Rate (PR) of each isolate to each insect species was determined. These

PR were used to calculate the Activity Ratios of the isolates. The analogy found among some isolates indicates the presence of homologous toxins. The capacity of inoculum production on last instar larvae of *D. saccharalis* and amilolytic, proteolytic and lipolytic activities on solid media were also studied. No correlation was found between virulence and enzymatic activity, however the highest lipolytic activity was observed occurring in the most virulent isolates (PL-39 and SPL-52T) and in the standard one (SPL-3F). The data obtained in the different tests were used to make the biological and biochemical profiles to facilitate the comparative analyses among the isolates. It was found out that the isolates PL-50 and PL-51 from the same lineage did not differ in their behaviour. The isolates PL-32 and PL-35 showed similar characteristics, though not identical, however the other ones were different among themselves. The lineage that showed the lowest susceptibility to ultraviolet radiation and the highest conidia production on PDA and on rice was SPL-52T, which together with PL-39 was highly virulent to the three insects tested, meanwhile the lineage PL-39 showed a mean conidia production on PDA and rice, showing a high potential of sporulation on pre-pupae of *D. saccharalis*.

CARACTERIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS
DE *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883
PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIONES DEL BRASIL

Autor: DANIEL RICARDO SOSA GÓMEZ
Orientador: Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

8: RESUMEN

El propósito de esta investigación fue caracterizar y estandarizar 11 cepas de *M. anisopliae*, con la finalidad de seleccionar las más virulentas y altamente productivas, para su empleo en control microbiano de plagas. Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Patología de Insectos del Departamento de Entomología de la Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidad de San Pablo, Piracicaba, Estado de San Pablo, Brasil. La caracterización se basó en: producción de conidios, aspectos morfológicos y crecimiento micelial de las colonias incubadas a 3 temperaturas ($26 \pm 0,2$; $28 \pm 0,2$ e $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$); producción en medio de arroz; determinación del tamaño de conidios de las colonias que desarrollaron en medio de cultivo de agar papa glucosado y estudios de resistencia a radiación ultravioleta ($2.537 \text{ \AA}$). La estandarización se realizó mediante bioensayos, utilizando larvas de: *Diatraea saccharalis* (F), *Galleria mellonella* L. y *Tenebrio molitor* L.

Se determinaron las Tasas de Potencia (TP), de cada cepa, para las 3 especies de insectos; con las TP se calcularon las Proporciones de Actividad de las diferentes cepas, encontrandose analogía entre algunas de ellas, lo que indicó presencia de toxinas homólogas. Se estudió también, la capacidad de producción de inóculo sobre larvas de *D. saccharalis* de último estadio y la actividad amilolítica, proteolítica y lipolítica en medios de cultivos sólidos. No se constató correlación entre virulencia y actividad enzimática, no obstante, las cepas mas virulentas (PL-39 e SPL-52T) presentaron elevada actividad lipolítica junto con la standard (SPL-3F). Con los resultados de los diferentes ensayos se elaboraron perfiles biológicos y bioquímicos, con la finalidad de facilitar el análisis comparativo entre las cepas. Se verificó que las cepas PL-50 y PL-51 no difieren en comportamiento, perteneciendo por lo consiguiente a la misma raza. Las cepas PL-32 y PL-35 presentaron características semejantes, sin ser idénticas, mientras que las restantes fueron diferentes entre sí. La cepa que presentó menor susceptibilidad a radiación ultravioleta, mayor producción de conidios en agar papa glucosado y en arroz, fue SPL-52T, resultando altamente virulenta para los 3 insectos testados, juntamente con la PL-39. Entretanto esta última fue medianamente productiva sobre agar papa glucosado y arroz, evidenciando alto potencial de esporulación sobre prepupas de *D. saccharalis*.

9. LITERATURA CITADA

- AL-AIDROOS, K.; SEIFERT, A.M. 1980. Polysacharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 36(1): 29-34.
- ALMEIDA, L.C.; ALVES, S.B., 1981. Testes preliminares de dosagens do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., para o controle da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Araras, IAA/PLANALSUCAR, COSUL. 08 p.
- ALMEIDA, L.C.; ALVES, S.B.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; ARAÚJO, J.R., 1981a. Efeito de diferentes dosagens do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, isolado SPL, sobre larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Araras, IAA/PLANALSUCAR, COSUL. 10 p.
- ALMEIDA, L.C.; ALVES, S.B.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; PINHEIRO, J.B., 1981b. Determinação da patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, sobre ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.), de diferentes idades. Araras, IAA/PLANALSUCAR, COSUL. 12 p.

- ALMEIDA, L.C.; BOTELHO, P.S.M.; ALVES, S.B.; DEGASPARI, N.; ARAÚJO, J.R., 1981c. Efeito do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, sobre ovos da broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Araras, IAA/PLANALSUCAR, COSUL, 13p.
- ALVES, S.B., 1980. Alguns fatores que afetam o controle microbiano de insetos. In: V Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, Itajaí, SC, 14-19 de Abril.
- ALVES, S.B., 1982. Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, ESALQ/USP, 95 p. (Tese de Livre-Docente).
- ALVES, S.B.; FORTI, L.C.; CIVIDANES, F.J., 1980. Influence of light color on some biological activities *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin an entomopathogenic fungus. Rev. Bras. Ent., São Paulo, 24(2): 123-5.
- ALVES, S.B.; RISCO, S.H.; MACHADO NETO, R., 1981. Potency rate of different isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on *Diatraea saccharalis* and *Galleria mellonella*. Entomology Newsletter. Araras, IAA/PLANALSUCAR, 11:6-7.
- AMARAL, E.; ALVES, S.B., 1979. Insetos Úteis, Piracicaba, Editora Livroceres. 192 p.
- AQUINO, M.L.N., 1974. O fungo entomôgeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no Estado de Pernambuco. Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas, Recife, 72: 1-26.
- AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L., 1981. Tamanho de conídios em diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*. Boletim do grupo de pesquisadores de Controle Biológico, Brasília, (2): 5-8.

- BALFOUR-BROWNE, F.L., 1960. The green muscardine disease of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea. Proceedings of Royal Entomological Society of London, Ser. A, London, 35: 65-74.
- BARRON, G.L., 1968. The genera of hyphomycetes from soil. Baltimore, The Williams & Wilkins Co. 686 p.
- BASTOS, C.N.; DA MATA, E.A.F., 1976. Influência das temperaturas e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. B. IBB, Salvador, 15(1): 5-8.
- BELL, J.V.; HAMALLE, R.J., 1970. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermus aeneus*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 15: 447-450.
- BELL, J.V.; HAMALLE, R.J., 1971. A bacterium and a dipterous parasite in wild populations of cowpea curculio larvae: effects of treatment with spores of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 17: 256-259.
- BELL, J.V.; HAMALLE, R.J.; ONSAGER, J.A., 1972. Mortality of larvae and pupae of the banded cucumber beetle in soil and sand following topical application of fungus spores. Journal of Economic Entomology, College Park, 65: 605-606.
- BELL, J.V.; HAMALLE, R.J., 1974. Viability and pathogenicity of entomogenous fungi after prolonged storage on silica gel at -20°C. Canadian Journal of Microbiology, 20(5): 639 - 642.
- BERRIOS, F.; HIDALGO-SALVATIERRA, O. 1971. Estudios sobre el barrenador, *Hypsipyla grandella* Zeller. VI. Suceptibilidad de la larva al hongo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Turrialba, Costa Rica, 21(2): 214-219.

- BLISS, C.I., 1935. The calculation of the dosage - mortality curve. Ann. Appl. Biol., Cambridge, 22: 134-167.
- BREWER, J.M.; ASHWORTH, R.B., 1969. Disc electrophoresis. Journal Chem. Ed., 46: 41-45.
- COCHRANE, V.W., 1958. Physiology of Fungi. New York, J. Wiley and Sons, Inc. 524 p.
- CONTI, E.; MESSIAS, C.L.; SOUZA, H.M.L.; AZEVEDO, J.L., 1980. Electrophoretic variation in esterases and phosphatases in eleven wild-type strains of *Metarhizium anisopliae*. Experientia, Schwetz, 36: 293-294.
- CORREA, G.S., 1982. Influência da radiação ultravioleta na germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no solo. Boletim do grupo de pesquisadores de Controle Biológico, 3: 8-9.
- DULMAGE, H.T., 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: BURGESS, H.D. Microbial Control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press Inc., (London), p.193-222.
- FERRON, P., 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: BURGESS, H.D. Microbial Control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press Inc., (London), p. 465-481.
- FERRON, P.; DIOMANDE, T., 1969. Sur la spécificité à l'égard des insectes de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Fungi Imperfecti) en fonction de l'origine des souches de ce champignon. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Ser. D, 268: 331-332.

- FERRON, P.; HURPIN, B.; ROBERT, P.H., 1972. Sur la spécificité de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Entomophaga, 17(2): 165-178.
- FERRON, P.; ROBERT, P.H., 1975. Virulence of entomopathogenic fungi (Fungi Imperfecti) for the adults of *Acanthocelides obtectus* (Coleoptero: Bruchidae). Journal Invertebrate Pathology, New York, 25(3): 379-388.
- FERRON, P.; ROBERT, P.H.; DEOTTE, A., 1975. Susceptibility of *Oryctes rhinoceros* adults to *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 25: 313-320.
- FOX, C.J.S.; JAKES, R.P., 1958. Note on the green muscardine fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., as a control for wireworms. The Canadian Entomologist, 90: 314-315.
- GABRIEL, B.P., 1968. Enzymatic activities of some entomopathogenic fungi. Journal Invertebrate Pathology, New York, 11: 70-81.
- GOYER, R.A.; BENJAMIN, D.M., 1971. Infection of a pine root weevil, *Hyllobius rhizophagus* Millers by two muscardine fungi. Journal of Economic Entomology, College Park, 64: 562.
- GUAGLIUMI, P., 1968. As cigarrinhas dos canaviais no Brasil. Primeira contribuição: perspectivas de uma luta biológica nos Estados de Pernambuco e Alagoas. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 72(3): 34-43.

- GUAGLIUMI, P., 1971. Lucha integrada contra las "cigarrinhas" (Homoptera: Cercopidae) en el noroeste de Brasil. Revista Peruana de Entomologia, 14: 361-368.
- GUAGLIUMI, P., 1972. Resultados preliminares da luta biológica contra a cigarrinha da folha da cana-de-açúcar no Estado de Pernambuco. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 80 (3): 49-51.
- GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E.J.; VILAS BOAS, A.M., 1974. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da "cigarrinha da folha" *Mahanarva posticata* (Stal) no Nordeste de Brasil. Boletim Técnico CODECAP, Recife, 3: 1-54.
- GUERRA, M. de S., 1973. Bionomia das traças da cera, *Galleria mellonella* L. e *Achroia grisella* F. no Município de Piracicaba, São Paulo. Piracicaba, ESALQ/USP, 133p. (Dissertação de Mestrado).
- GRUNER, L.; ABUD-ANTUN, A., 1976. Étude des conditions de ru-
lation et de conservation d'une souche de *Metarhizium anisopliae* Sorokin isolée de *Phyllophaga pleei* Bl. en Guadeloupe (Coleoptera: Scarabaeidae). Turrialba, Costa Rica, 6(3): 241-246.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia, Bronx, 67: 597-607.
- HIDALGO-SALVATIERRA, O.; BERRIOS, F., 1972. Studies on the shot-borer *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). XII. Determination of the LC₅₀ of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin spores on fifth instar larvae. Turrialba, Costa Rica, 22: 435-438.

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SIKOROWSKI, P.P.; SUTTER, G.; BROOKS, W.M., 1977. Inactivation of representativespecies of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. Environmental Entomology, 6(3): 411-415.

JAKES, R.P.; STULTZ, H.T.; HUSTON, F., 1968. The mortality of the pale apple leaf roller and winter moth by fungi and nematodes applied to soil. The Canadian Entomologist, 100: 813-818.

KUCERA, M., 1981. The production of toxic protease by the entomopathogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 38: 33-38.

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, Wellington, 8: 384-396.

LATCH, G.C.M., 1976. Studies on the susceptibility of *Oryctes rhinoceros* to some entomogenous fungi. Entomophaga, 21(1): 31-38.

MACEDO, N.; MENDES, A.C.M.; BOTELHO, P.S.M.; MAGRO, J.A. 1977. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da cigarrinha da raiz (*Mahanarva fimbriolata* Stal) na cultura da cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 90(2): 16-19.

MARCHIONATTO, J.B., 1942. Nota sobre la "muscardina verde", *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Revista Chilena de Historia Natural, 1942-1943: 12-14.

- MARQUES, E.J., 1981. A cigarrinha da folha, *Mahanarva posticata* (Stal) (Homoptera: Cercopidae) fator limitante na produção de açúcar no nordeste do Brasil. VI Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, João Pessoa, PB, 20-26 de Abril.
- MARTIGNONI, M.E., 1968. Producción masiva de patógenos de insectos. In: de BACH, P. Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. México DF, Editora Continental, p. 949.
- MASERA, E., 1957. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, a parassita del baco da seta. Annali della Sperimentazione Agraria, 11: 281-295.
- MATTA, E.A.F.; OLIVEIRA, M.Z.A. de., 1978. Efeito da luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. "in vitro". Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia, p. 75.
- MENDES, A.C.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N.; ARAÚJO, S.M.S.S. 1980. Desenvolvimento do combate biológico da *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lep.: Pyralidae), na Coordenadoria Regional Sul, importância, resultados e perspectivas, futuras. In: V Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, Itajaí, SC, 14-19 de Abril.
- MENDONÇA, A.F.; COSTA, J.M., 1980. O problema de controle integrado a cigarrinha da folha, *Mahanarva posticata* (Stal) (Homoptera: Cercopidae) no Estado de Alagoas durante a campanha de 1979. Resultados e perspectivas futuras. V Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, Itajaí, SC, 14-19 de Abril.

- MESSIAS, C.L., 1979. Parasexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. USP, SP, 73p. (Tese de Doutorado).
- MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L., 1980. Parasexuality in the deuteromycete *Meterhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society, Cambridge, 75(3): 473-477.
- MOURA COSTA, M.D.; MAGALHÃES, C.D., 1974. Um novo meio de cultura para o fungo entomôgeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin parasito da cigarrinha das pastagens. B. IBB, Salvador, 13: 57-60.
- MURAYAMA, M.Y.; ALVES, S.B.; ALMEIDA, L.C., 1982. Efeito de repicagens em meio de arroz na patogenicidade, morfologia e produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Boletim do grupo de pesquisadores de Controle Biológico, 3: 1.
- NAKANO, O.; SILVEIRA NETTO, S.; ZUCCHI, R.A., 1981. Entomologia Econômica, São Paulo, 314 p.
- NIRULA, K.K., 1957. Observations on the green muscardine fungus on populations of *Oryctes rhinoceros* L. Journal of Economic Entomology, College Park, 50: 767-770.
- OKINO, L.A.; SILVA, J.C.; SANTOS, A.L.L.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L., 1978. Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. O solo, Piracicaba, SP, 70(2): 32-36.
- PARIS, S.; SEGRETAIN, G., 1978. Etude de l'activité lipasique esterasique intracellulaire de *Beauveria tenella*. Annales de Microbiologie (Inst. Past.), Paris, 129(2): 133-145.

- PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. Transactions of the British Mycological Society, Cambridge, 16 (1): 55-75.
- RADHA, K.; NIRULA, K.K.; MENON, K.P.V., 1956. The green muscardine disease of *Oryctes rhinoceros* L. II The Causal organism. Indian Coconut Journal 9(2): 83-89.
- RATAULT, C.; VEY, A., 1977. Production d'estérase et de N - acétyl glucosaminidase dans le tegument du Coléoptère *Oryctes rhinoceros* par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Entomophaga, 22(3): 289-294.
- RISCO, B.S.H., 1978. National program of sugarcane improvement, develops a multiplication program of the fungus *Metarhizium anisopliae* for biological control of *Mahanarva posticata* in the states of northeast of Brazil. International Society of Sugarcane Technologists, Entomology Newsletter, 5: 17-18.
- ROBERTS, D.W., 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In: BURGESS, H.D. Microbial Control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press Inc., (London), p. 441-464.
- ROBINSON, R.K., 1966. Studies on penetration of insect integument by fungi. Pest Article and New Summaries, Sect. B., 12: 131-142.
- ROCKWOOD, L.P., 1950. Entomogenous fungi of the genus *Metarhizium* on wireworms in the Pacific Northwest. Annals Entomological Society of America, 43(4): 495-498.
- RORER, J.B., 1910. The froghopper fungus. Bull. Dept. Agric. Trinidad Tobago, 9: 182-184.

- RORER, J.B., 1913. The use of the green muscardine in the control of some sugar cane pests. Phytopathology, 3: 88-94.
- ROSATO, Y.B.; MESSIAS, C.L.; AZEVEDO, J.L., 1981. Production of extracelular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 38(1): 1-3.
- SANTOS, A.L.L. dos., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 148 p. (Dissertação de Mestrado).
- SCHABEL, H.G., 1976. Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 27: 377-383.
- STEINHAUS, E.A., 1949. Principles of insect pathology. McGraw Hill Publications in the Agricultural Sciences. R.A. Brink, Consulting Editor. 757 p.
- TEDDERS, W.L.; WEAVER, D.J.; WEHUNT, E.J., 1973. Pecan weevil: supression of larvae with the fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and the nematode *Neoaplectana dutky*. Journal of Economic Entomology, College Park, 66: 723-725.
- TIMONIN, M.I., 1980. Possibility of using white and green muscardine fungi for control of cone and seed insect pests. The Canadian Entomologist, 112: 849-854.
- TINLINE, R.D.; NOVIELLO, C., 1971. Heterokaryosis in the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*. Mycologia, 63: 701-712.

- TULLOCH, N., 1976. The genus *Metarhizium*. Transaction of the British Mycological Society, Cambridge, 66: 407-411.
- URS, N.V.R.R.; GOVINDU, H.C., 1971. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, and its host range. - Mycopathologia et Mycologia Applicata, 44: 317-320.
- VALDES, T., 1974. Patogenicidad del hongo *Metarhizium anisopliae*, en larvas de *Galleria mellonella*. Centro de Investigaciones Agropecuarias Región Centro Occidental, Acarigua, Venezuela, 4 (3/4): 5-6.
- VEEN, K.H., 1968. Recherches sur la maladie due à *Metarhizium anisopliae* chez le criquet pelerin. Mededelingen Lanbouwhogeschool Wageningen, Nederland, 68: 1-77.
- VEIGA, A.F.S.L.; AQUINO, M.L.M.; ARRUDA, G.P., 1972. Nota sobre o controle biológico da "cigarrinha das pastagens" (Homoptera: Cercopidae) com o fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no Estado de Pernambuco. Pesq. Agrop. Nord., 4(2): 71.
- VENTURA, J.A.; MATIOLI, J.C., 1980. Ocorrência de epizootias causadas por *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Ecosistema, Espírito Santo do Pinhal, 5(1): 92-95.
- VILLACORTA, A., 1978. Efeito da temperatura e da nutrição sobre o desenvolvimento de vários isolamentos de *Metarhizium anisopliae* Sorok. Resumos do III Congresso Latinoamericano de Entomologia e V Congresso Brasileiro de Entomologia, Bahia. p. 70.

WALSTAD, J.D.; ANDERSON, R.F., 1971. Effectiveness of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as control agents for the pales weevil (*Hylobius pales* (Herbst.) : Curculionidae) Journal of Economic Entomology, College Park, 64: 322-323.