DETERMINAÇÃO DAS EXIGÊNCIAS TÉRMICAS E HÍDRICAS DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROKIN, 1883

ROBERTO TEIXEIRA ALVES
Engenheiro Agrônomo

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: Entomologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1986

À minha querida esposa Elisabete,

OFEREÇO E DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece, em primeiro lugar , a "DEUS" por ter lhe sustentado durante toda a sua vida e especialmente nos momentos difíceis da realização deste trabalho, e às seguintes pessoas e instituições:

- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela oportunidade concedida para que este trabalho pudesse ser realizado.

- Ao Dr. Sérgio Batista Alves, Professor Adjunto do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) por sua orientação, amizade e estímulo constante na execução deste trabalho.

- Ao Dr. Sinval Silveira Neto, Professor Titular e Chefe do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pelas sugestões concedidas.

- À Dra. Marinéia de Lara Haddad e à M.Sc. Orghêda L. A. Domingues Zucchi, pelo apoio estatístico.

- Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP, pelos ensinamentos transmitidos.

- Ao IAA/PLANALSUCAR de Araras, São Paulo, nas pessoas do Dr. Paulo Sérgio M. Botelho e Dr. Luiz Carlos Almeida, pelo fornecimento das lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) para os experimentos.

- Ao Dr. José Roberto P. Parra, Professor Adjunto do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, por seu apoio e sugestões concedidas.

- Ao Dr. Rogério Remo Alfonsi, Pesquisador da Seção de Climatologia Agrícola do Instituto Agrônomo de Campinas, por seu apoio e sugestões concedidas.

- Ao Técnico de Laboratório Paulo Roberto Casarin Kawai, pelas fotografias e por sua boa vontade durante a realização deste trabalho.

- Às colegas de curso, Artemísia M. Vilas Boas, Gláucia Maria B. Ambrosano e Maria Elisabete G. Folegatti por suas valiosas contribuições na realização deste trabalho.

- Aos meus pais Helio e Lucila, e à minha esposa Elisabete, pelo carinho, colaboração e constante estímulo, a minha sincera gratidão.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS E APÊNDICE	xvi
RESUMO	xx
SUMMARY	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Considerações sobre o fungo <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i>	4
2.2. Classificação, descrição e modo de ação do fungo <i>M. anisopliae</i>	6
2.2.1. Classificação do fungo <i>M. anisopliae</i>	6
2.2.2. Descrição do fungo <i>M. anisopliae</i> ...	7
2.2.3. Modo de ação do <i>M. anisopliae</i> no hos- pedeiro	8
2.3. Doença e seu progresso em uma população de insetos	10
2.4. Fatores que afetam a ocorrência de epizootias de <i>M. anisopliae</i>	12
2.4.1. Fatores bióticos	12
2.4.2. Fatores abióticos	17
2.4.2.1. Influência da temperatura .	18
2.4.2.2. Influência da umidade	25

2.5. Utilização de climogramas	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Material	34
3.1.1. Isolados do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i>	34
3.1.2. Inseto utilizado	35
3.1.3. Meio de cultura	36
3.1.4. Equipamentos	36
3.2. Métodos	39
3.2.1. Calibração da temperatura no interior dos dessecadores	40
3.2.2. Calibração da umidade relativa do ar no interior dos dessecadores	40
3.2.3. Preparo dos inóculos utilizados na pesquisa	42
3.2.4. Inoculação e tipo de lagarta utilizada na pesquisa	44
3.2.5. Potencial de inóculo dos isolados de <i>M. anisopliae</i>	47
3.2.6. Determinação da produção de conídios de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i> em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar	48

3.2.7. Determinação da viabilidade dos conídios de <i>M. anisopliae</i> produzidos sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i> submetidos a diferentes condições de temperatura e umidade do ar	50
3.2.8. Utilização de <i>M. anisopliae</i> com base em climogramas	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Potencial de inóculo dos isolados de <i>M. anisopliae</i>	54
4.2. Determinação da produção de conídios de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i> em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar	56
4.3. Determinação da viabilidade dos conídios de <i>M. anisopliae</i> produzidos sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i> submetidos a diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar	82
4.4. Utilização de <i>M. anisopliae</i> com base em climogramas	100
5. CONCLUSÕES	110

6. LITERATURA CITADA	115
7. APÊNDICE	130

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Efeito da temperatura "in vitro", sobre a germinação dos conídios, crescimento vegetativo e conidiogênese de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorok. (adaptado de ROBERTS e CAMPBELL, 1977)	21
2	Relação dos isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizados, com suas respectivas denominações, procedências e hospedeiros originais	35
3	Concentrações e volumes da solução de ácido sulfúrico para controle da umidade relativa do ar no interior de um dessecador com 3.500 cm ³ de volume, em diferentes temperaturas	41
4	Quantidade de conídios dos três isolados de <i>M. anisopliae</i> encontrada no tegumento de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> após imersão na suspensão fúngica contendo 5,4 x 10 ⁷ conídios/ml	55

Tabela

Página

5	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes períodos de tempo e temperaturas, na umidade relativa do ar de 90%	61
6	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes períodos de tempo e umidades relativas do ar, na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$	63
7	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D. saccharalis</i> , em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar, após 48 horas.	66
8	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes condições de umidade relativa do ar, na temperatura de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 48 horas.	68
9	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes condições de umidade relativa do ar, na temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 48 horas.	70

10	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> em difentes condições de umidade relativa do ar, na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 48 horas.....	71
11	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes condições de umidade relativa do ar, na temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 48 horas.....	73
12	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes condições de temperatura, na umidade relativa do ar de 90%, após 48 horas.....	75
13	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes condições de temperatura, na umidade relativa do ar de 70%, após 48 horas.....	79
14	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes condições de temperatura, na umidade relativa do ar de 50%, após 48 horas.....	80

Tabela

Página

15	Produção de conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes condições de temperatura, na umidade relativa do ar de 30%, após 48 horas	81
16	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D. saccharalis</i> submetidos a diferentes períodos de tempo e temperaturas, na umidade relativa do ar de 90%	83
17	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D. saccharalis</i> submetidos a diferentes períodos de tempo e umidades relativas do ar, na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$	85
18	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D. saccharalis</i> submetidos a diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar, após 96 horas	88

Tabela

Página

19	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D.saccharalis</i> submetidos a diferentes umidades relativas do ar, na temperatura de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 96 horas	89
20	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D.saccharalis</i> submetidos a diferentes umidades relativas do ar, na temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 96 horas	91
21	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D.saccharalis</i> submetidos a diferentes umidades relativas do ar, na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 96 horas	92
22	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzido sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de <i>D.saccharalis</i> submetidos a diferentes umidades relativas do ar, na temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 96 horas	94

Tabela

Página

23	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> submetidos a diferentes temperaturas, na <u>umi</u> dade relativa do ar de 90%, após 96 horas .	95
24	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> submetidos a diferentes temperaturas, na <u>umi</u> dade relativa do ar de 70%, após 96 horas .	97
25	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> submetidos a diferentes temperaturas, na <u>umi</u> dade relativa do ar de 50%, após 96 horas .	98
26	Viabilidade dos conídios de três isolados de <i>M. anisopliae</i> , produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> submetidos a diferentes temperaturas, na <u>umi</u> dade relativa do ar de 30%, após 96 horas .	99

Tabela

Página

27	Condições de temperatura e umidade relativa do ar favoráveis à uma alta produção de conídios por cadáver de lagarta de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> e à manutenção de alta viabilidade dos conídios dos isolados E ₉ , PL-27 e PL-43 de <i>M. anisopliae</i>	102
----	---	-----

LISTA DE FIGURAS E APÊNDICE

Figura		Página
1	Estufa incubadora BOD com temperatura e fotofase controladas contendo dessecadores com umidades relativas do ar ajustadas e caixas plásticas com tampa telada em seu interior	39
2	Aspecto das lagartas, 24 horas após a morte causada por <i>M. anisopliae</i> , incubadas a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, fotofase de 16 horas e umidade relativa próxima à saturação ..	46
3	Desenvolvimento dos isolados E_9 , PL-27 e PL-43 de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i> incubados durante 12 horas a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ de temperatura e 90% de umidade relativa do ar	57
4	Desenvolvimento dos isolados E_9 , PL-27 e PL-43 de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i> incubados durante 24 horas a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ de temperatura e 90% de umidade relativa do ar ..	58

Figura		Página
5	Desenvolvimento dos isolados E ₉ , PL-27 e PL-43 de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i> incubados durante 48 horas a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ de temperatura e 90% de umidade relativa do ar	59
6	Produção de conídios do isolado E ₉ de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes períodos de tempo e temperaturas, na umidade relativa do ar de 90%.	62
7	Produção de conídios do isolado E ₉ de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> em diferentes períodos de tempo e umidade relativas do ar, na temperatura de $26 \pm 0,2$	64
8	Desenvolvimento do isolado E ₉ de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i> incubados durante 48 horas na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em diferentes umidades relativas do ar...	72

Figura		Página
9	Desenvolvimento do isolado E ₉ de <i>M. anisopliae</i> sobre cadáveres de lagartas de <i>D. saccharalis</i> incubados durante 48 horas na umidade relativa do ar de 90%, em diferentes temperaturas	77
10	Viabilidade dos conídios do isolado E ₉ de <i>M. anisopliae</i> produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de <i>D. saccharalis</i> incubados em diferentes umidades relativas do ar, durante diferentes períodos de tempo, na temperatura de 26±0,2°C	86
11	Climograma comparativo entre a região de Belém (PA) e a zona favorável à uma alta produção de conídios viáveis dos isolados E ₉ , PL-27 e PL-43 de <i>M. anisopliae</i>	105
12	Climograma comparativo entre a região de Quixadá (CE) e a zona favorável à uma alta produção de conídios viáveis dos isolados E ₉ , PL-27 e PL-43 de <i>Metarhizium anisopliae</i>	106

Figura	Página
13	Climograma comparativo entre a região de Cuiabá (MT) e a zona favorável à uma alta produção de conídios viáveis dos isolados E ₉ , PL-27 e PL-43 de <i>Metarhizium anisopliae</i> 107
14	Meses com temperaturas médias e umidades relativas médias favoráveis para aplicação dos isolados E ₉ , PL-27 e PL-43 de <i>Metarhizium anisopliae</i> em diferentes regiões do Brasil 109
Apêndice 1	Temperaturas médias mensais e umidades relativas médias mensais de diferentes regiões do Brasil 131

DETERMINAÇÃO DAS EXIGÊNCIAS TÉRMICAS E HÍDRICAS
DO FUNGO *Metarhizium anisopliae*
(METSCH.) SOROKIN, 1883

Autor: ROBERTO TEIXEIRA ALVES

Orientador: Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi determinar as exigências térmicas e hídricas dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin para obtenção de uma elevada produção de conídios viáveis desse patógeno e desenvolver um método com a utilização de climogramas, para se determinar quais as regiões e as épocas do ano mais indicadas para a aplicação desse fungo. O trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Lagartas de 5º instar de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) foram inoculadas com $3,8 \times 10^5$ conídios por lagarta, para cada isolado, e em seguida (24 horas após a morte) os cadáveres foram mantidos nas temperaturas de $22 \pm 0,2$; $26 \pm 0,2$; $30 \pm 0,2$ e $34 \pm 0,2^\circ\text{C}$ associadas às umidades relativas do ar de 30, 50, 70 e 90%, durante diferentes períodos de tempo. Após a retirada dos cadáveres do interior dos

dessecadores, realizou-se a contagem dos conídios produzidos sobre esses cadáveres com o auxílio da câmara de Neubauer. Determinou-se também a viabilidade dos conídios em meio de cultura BDA. Em função dos resultados obtidos, foi possível concluir que: a) o tempo de 48 horas de incubação é o mais indicado para se comparar a produção de conídios em diferentes temperaturas e umidades relativas do ar; b) as produções de conídios mais elevadas foram obtidas nas temperaturas de 26°C associada a umidades de 90 e 70%; 22°C associada a umidades de 30, 50, 70 e 90%; 30°C associada a umidades de 90 e 70%; c) a produção de conídios foi baixa em qualquer umidade quando a temperatura é de 34°C; d) a temperatura de 22°C inibiu a influência das diferentes umidades sobre a produção de conídios; e) o tempo de 96 horas de incubação é o mais indicado para se comparar a viabilidade dos conídios produzidos sobre cadáveres de *D. saccharalis* em diferentes temperaturas e umidades relativas do ar; f) a viabilidade dos conídios manteve-se próxima de 100%, após 96 horas, nas temperaturas de, 22°C associada a umidades iguais ou superiores a 50%; 26°C associada a umidades iguais ou superiores a 70%, a 30 e 34% associadas à umidade de 90%; g) as exigências térmicas e hídricas para se obter alta produção de conídios e para a manutenção da viabilidade desses conídios próxima de 100%, são atendidas nas temperaturas de, 22°C associada a umidades iguais ou superiores a 50%; 26°C associada a umidades iguais ou superiores a 70%; 30°C associada a umidades iguais ou superiores a 90%; h) a utilização de

climogramas com base nas exigências térmicas e hídricas dos isolados de *M. anisopliae*, demonstrou ser útil para a determinação da época de aplicação e previsão da ocorrência de epizootias nas diferentes regiões do país.

DETERMINATION OF THE TEMPERATURE AND MOISTURE
REQUIREMENTS OF THE FUNGUS *Metarhizium anisopliae*
(METSCH.) SOROKIN, 1883

Author : ROBERTO TEIXEIRA ALVES

Adviser: Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

SUMMARY

The objective of this research was to determine the temperature and moisture requirements of the *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin isolates E₂, PL-27 and PL-43 for obtaining a high production of viable spores of this pathogen and developing a method utilizing climatograms in order to determine the most favorable regions and times of the year for application of this fungus. The study was conducted in the Insect Pathology Laboratory of the Department of Entomology, ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo - Brazil. Fifth instar larvae of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) were inoculated with $3,8 \times 10^5$ spores per larvae, for each isolate. The cadavers (24 hours after death), were maintained under temperatures of $22 \pm 0,2$; $26 \pm 0,2$; $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$ and $34 \pm 0,2^\circ\text{C}$ associated with relative humidities of the air of 30, 50, 70 and 90%, for different periods of time. After removing the cadavers from the dessiccators, the spores produced on these cadavers

were counted utilizing the Neubauer chamber. The viability of the spores in PDA culture was also determined. The results obtained led to the following conclusions: a) 48 hours is the most favorable incubation period of time for comparing spore production under different temperatures and relative humidities of the air; the highest spore productions were obtained at temperatures of 26°C associated with humidities of 90 and 70%; 22°C associated with humidities of 30, 50, 70 and 90%; 30°C associated with humidities of 90 and 70%; c) spore production was low at any humidity at 34°C; d) the temperature of 22°C inhibited the influence of different humidities on spore production; e) 96 hours was the most favorable incubation time for comparing the viability of spores produced on *D. saccharalis* cadavers under different temperatures and relative humidities of the air; f) spore viability was maintained close to 100%, after 96 hours, at temperatures of 22°C associated with humidities equal to or above 50%; 26°C associated with humidities equal to or above 70%; at 30 and 34°C associated with 90% humidity; g) the temperature and moisture requirements for obtaining a high spore production and for maintaining the viability of such spores near 100% are met at the temperatures of 22°C associated with humidities equal to or above 50%; 26°C associated with humidities equal to or above 70%; 30°C associated with humidities equal to or above 90%; h) the utilization of climatograms based on the temperature and moisture requirements of *M. anisopliae* isolates was shown to be useful for determining the time of application and for

predicting the occurrence of epizooties in different regions
of the country.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). Sorokin têm sido bastante estudado nos últimos anos, pois é considerado um importante patógeno de várias espécies de insetos, tais como cigarrinhas-das-pastagens, cigarrinhas-da-cana-de-açúcar e também por apresentar um grande potencial, a ser desenvolvido, para o controle de broca-da-cana-de-açúcar, percevejos de soja e outros insetos.

Vários trabalhos demonstram que o emprego do *M. anisopliae* como inseticida microbiano é bastante válido, porém existem alguns problemas que devem ser resolvidos para que sua eficiência no controle da praga a nível de campo seja mais elevada, sendo necessário o desenvolvimento de pesquisas sobre os fatores que regulam as epizootias nas diferentes regiões onde se deseje aplicar este fungo como inseticida microbiano.

Os fatores que determinam uma epizootia podem ser classificados como bióticos e abióticos. Os fatores bióticos estão relacionados aos hospedeiros e patógenos e os abióticos estão correlacionados ao ambiente.

As condições ambientais que podem ou não favorecer a ocorrência de epizootias são: temperatura, umidade relativa do ar ou do solo, radiação solar e presença de substâncias químicas na folhagem ou no solo. E para o caso do fungo *M. anisopliae*, pode-se dizer que as condições que basicamente influenciam são temperatura, umidade e radiação solar (raios ultravioleta), sendo que esta última pode ser bastante amenizada com o uso de formulações adequadas, uso de isolados mais resistentes ou com a aplicação do fungo em horários adequados.

Em vista da necessidade de se conhecer melhor a conidiogênese do *M. anisopliae* em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar sobre um inseto hospedeiro, elaborou-se esta pesquisa para se verificar a influência desses dois fatores abióticos sobre essa importante fase do ciclo biológico desse patógeno, que é responsável pela produção de uma grande quantidade de propágulos, os quais serão disseminados por agentes como vento, chuva, orvalho, animais e pelo próprio homem.

Também, procura-se demonstrar a influência da temperatura e da umidade relativa do ar sobre a viabilidade dos conídios produzidos e expostos a períodos variáveis de

tempo nas diferentes condições climáticas.

Com base nesses conhecimentos, seria possível elaborar climogramas com os dados de temperatura e umidade das diferentes regiões onde se desejar aplicar o fungo, e com os limites superiores e inferiores de temperatura e umidade relativa do ar mais favoráveis à conidiogênese e à manutenção da viabilidade dos conídios próxima de 100%, verificando-se a possibilidade ou não dessa aplicação, assim como a determinação da época do ano mais indicada à realização da mesma. Dessa maneira, pode-se fazer um zoneamento ecológico para os isolados de *M. anisopliae* testados sendo que, nas regiões e épocas favoráveis, a probabilidade de ocorrência de epizootia, a partir de uma aplicação do fungo, será elevada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O FUNGO *Metarhizium anisopliae*

O fungo *Metarhizium anisopliae* é atualmente um dos microrganismos mais utilizados no controle biológico de pragas, principalmente no Brasil onde vem sendo multiplicado em maior escala por laboratórios de órgãos governamentais e por empresas privadas, para sua posterior aplicação no campo.

Um organismo para ser considerado aceitável dentro de esquema de controle microbiano segundo DUNN e MECHALAS (1963), deve cumprir três exigências para determinar sua adaptabilidade: (a) o organismo deve provar sua habilidade em reduzir a população de insetos de importância econômica; (b) o organismo não deverá ser patogênico nem tóxico para animais de sangue quente, incluindo o homem; (c) o organismo deve ser produ

tivo e econômico quando usado em escala comercial para um controle efetivo . E no caso do *M. anisopliae*, este patógeno tem cumprido estas exigências, pois desde o primeiro trabalho de controle microbiano realizado por Metschnikoff (1879), citado por SANTOS (1978), que aplicou *M. anisopliae* para o controle do curculionídeo *Cleonus punctiventris* Germ., praga de beterraba, até o dia de hoje, ficou demonstrado que este fungo é capaz de reduzir populações de insetos considerados pragas. Segundo FARGUES *et alii* (1975), o *M. anisopliae* ataca cerca de 204 espécies de insetos, sabendo-se hoje que este número é bem maior.

Quanto ao fato do *M. anisopliae* não ser patogênico ou tóxico aos animais de sangue quente, CAMERON (1963) cita que não há evidência na literatura de que fungos entomopatogênicos sejam perigosos para animais superiores ou plantas.

VENTURA (1981) demonstrou que, após inocular *M. anisopliae* em camundongos por via intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intramuscular, ingestão e inalação, não houve evidência clínica ou patológica nos animais testados e após análises cuidadosas não se observou germinação de conídios nem desenvolvimento do fungo nos tecidos inoculados.

Em relação à terceira exigência comentada por DUNN e MECHALAS (1963), o *M. anisopliae* no caso tem sido produtivo e econômico (AQUINO *et alii*, 1975), porém, tem havido alguns problemas na perda da qualidade no armazenamento como a queda de viabilidade dos conídios, que segundo ALVES (1982) decorre de um armazenamento em condições inadequadas, devido à

falta de informações mais precisas sobre o assunto.

Trabalhos como os de CLERK e MADELIN (1965), BELL e HAMALLE (1974), ALVES (1982), DAOUST *et alii* (1982), DAOUST *et alii* (1983) e DAOUST e ROBERTS (1983) demonstram a possibilidade de se preservar a viabilidade e a virulência do *M. anisopliae* em laboratórios por longos períodos de tempo, utilizando-se de temperaturas baixas, umidades relativas controladas e formulações adequadas do patógeno.

Se a etapa de armazenamento parece estar quase vencida, o mesmo não acontece após a aplicação do fungo a nível de campo, pois existem alguns fatores não controláveis que podem afetar a germinação, reprodução e disseminação do fungo, não permitindo que ocorram epizootias, que proporcionariam o controle da praga a nível desejado.

DIAMONDÉ (1969) em seu trabalho, relata que as condições ambientais têm grande influência sobre o fungo e, devido ao fato das mesmas não se reproduzirem a contento no campo, o fungo pode não apresentar o resultado desejado.

2.2. CLASSIFICAÇÃO, DESCRIÇÃO E MODO DE AÇÃO DO FUNGO

M. anisopliae

2.2.1. CLASSIFICAÇÃO DO FUNGO *M. anisopliae*

O fungo *M. anisopliae* é um patógeno da classe

Hyphomycetes, ordem Moniliales e família Moniliaceae e segundo PETCH (1931) e KENDRICK (1971) foi classificado pela primeira vez por Metschnikoff em 1879 como *Entomophthora anisopliae* na praga do milho *Anisopliae austriaca*, sendo que em 1880, o mesmo autor deu um novo nome ao fungo, *Isaria destruc**tor*. Após algumas proposições de novos nomes como as de Delacroix e de Vuillemin, citados por PETCH (1931), o que prevaleceu foi o de *Metarhizium anisopliae* classificado por Sorokin em 1883, conforme GUAGLIUMI *et alii* (1974).

2.2.2. DESCRIÇÃO DO FUNGO *M. anisopliae*

Na descrição do fungo *M. anisopliae*, BARON (1968) relata que este patógeno possui um corpo de frutificação semelhante a um esporodóquio agregado a hifas entrelaçadas, contendo uma massa compacta de conidióforos num estroma plano ou em forma de disco; os conidióforos simples ou ramificados resultam em células esporogênicas chamadas fiálides sendo que estas podem ser cilíndricas e hialinas afiladas no ápice, os fialósporos não são septados, cilíndricos hialinos ou levemente pigmentados.. As colunas verdes de conídios surgem de um micélio branco dando uma aparência de aderência na cultura.

Hammil (1972), citado por SANTOS (1978), definiu as fiálides como células conidiogênicas que produzem pelo menos o seu primeiro conídio entre a extensão apical da célula

la, o qual é liberado pela ruptura da parede celular e observou que as fiálides são geralmente cilíndricas e levemente intumescidas antes de afilarem rapidamente para um estreito ápice conidiogênico de 1 micrômetro no máximo. Após um conídio prévio ter sido delimitado por um septo, ele move-se para fora do colo da fiálide e o próximo começa a se formar. As organelas penetram nos conídios e os mesmos são delimitados por septos, continuando o processo.

Quanto ao tamanho dos conídios de *M. anisopliae*, Johnston (1915), citado por SANTOS (1978), refere-se à duas formas deste fungo, sendo proposto por TULLOCH (1976) a combinação das formas referidas por Johnston, em duas variedades, a variedade *minor* com conídios de 2,0 a 3,5 micrômetros de comprimento e a variedade *major* com conídios de 3,0 a 11,9 micrômetros de comprimento.

2.2.3. MODO DE AÇÃO DO *M. anisopliae* NO HOSPEDEIRO

Os fungos, de modo geral, agem inicialmente via tegumento e raramente via oral, e vários trabalhos explicam o modo de ação do *M. anisopliae* sobre diferentes tipos de hospedeiros como os de GUAGLIUMI *et alii* (1974), SCHABEL (1976), FERRON (1981), SILVEIRA e MESSIAS (1983) e ALVES (1984).

Segundo ALVES (1984) os conídios de *M. anisopliae* ao caírem sobre o tegumento do inseto *Diatraea sacchara*

lis (Fabr.), germinam quando encontram condições favoráveis de temperatura e umidade. A germinação ocorre dentro do período de 12 a 24 horas e se caracteriza pelo aumento do volume dos conídios e pela formação de um tubo germinativo, o qual possui na sua extremidade, uma porção dilatada, denominada apressório e um grampo de penetração. Estas estruturas têm ação mecânica no processo de penetração e nesta fase estão envolvidos dois processos: o físico, representado pela pressão da hifa que rompe as áreas quitinosas do tegumento, e o químico, no qual tomam parte diferentes enzimas, que provocam a histólise do tegumento. A penetração ocorre principalmente nas regiões intersegmentares do corpo do inseto, no período de 24 a 48 horas.

Conforme o mesmo autor, após a penetração, inicia-se o processo de colonização do hospedeiro. A hifa penetrante se engrossa e se ramifica através do tegumento e na cavidade geral do inseto. O micélio se quebra, formando pequenos conjuntos de hifas. Durante esta fase, o fungo secreta uma série de toxinas, as quais contribuem para a ocorrência de distúrbios fisiológicos e para o desencadeamento da micose, terminando com a morte do inseto.

Após a morte do inseto, o fungo cresce saprofiticamente no interior do cadáver, recobrando todos os órgãos e ocupando a cavidade geral do corpo. O inseto torna-se mumificado, não ocorrendo a putreficação dos tecidos em virtude da elaboração, pelo fungo, de toxinas de efeito antibacteriano. A colonização do hospedeiro ocorre no período de 76 a 120 horas, dependendo das con

dições do inseto e do ambiente. A morte do inseto pode ocorrer depois de 96 a 120 horas da inoculação. As hifas começam a emergir pelos espiráculos e pelas áreas intersegmentares do corpo do inseto. A reprodução do fungo se desenvolve depois de 24 a 48 horas da emergência das hifas. Como sintomas da doença podem aparecer manchas no tegumento, falta de apetite e desorientação nos hábitos. O inseto torna-se, inicialmente, coberto por uma massa de micélio de coloração branca e posteriormente, por um pó esverdeado, representando os conídios que poderão se disseminar e entrar em contato com outros hospedeiros, iniciando um novo ciclo da doença.

2.3. DOENÇA E SEU PROGRESSO EM UMA POPULAÇÃO DE INSETOS

GAUMANN (1950) definiu doença como um processo dinâmico no qual hospedeiro e patógeno, em íntima relação com o meio, se influenciam mutuamente do que resultam modificações morfológicas e fisiológicas.

As doenças causadas em insetos segundo VENTURA (1981), podem dividir-se em dois grupos: as enzoóticas, quando ocorrem numa dada região, porém com baixa intensidade e afetando poucos indivíduos, e as epizoóticas, quando se manifestam com grande intensidade, afetando um grande número de indivíduos ou mesmo toda uma população.

Segundo TANADA (1963), o progresso de uma doença em uma população de insetos pode ser demonstrado por uma curva denominada curva epizoótica, que pode ser dividida em três fases: pré-epizoótica, epizoótica e pós-epizoótica. A fase pré-epizoótica se caracteriza por um baixo número de hospedeiros doentes, resultando de focos primários da doença. Esses focos são formados devido a imigrações de insetos doentes ou a partir de estruturas do patógeno que podem permanecer no solo, nos cadáveres, nas plantas ou são trazidas por pássaros, insetos e por outros animais. A fase epizoótica se caracteriza por elevado índice da doença em consequência da multiplicação e disseminação do inóculo produzido nos focos primários. A fase pós-epizoótica se caracteriza pela diminuição do número de insetos atacados em relação à fase anterior.

ALVES (1985) observou que nas condições da região canavieira do Nordeste, os primeiros adultos de *Mahanarva posticata* (Stal.) aparecem nos meses de março-abril. Após esse período surgem as primeiras cigarrinhas parasitadas pelo *M. anisopliae* (fase pré-epizoótica). O pico da população de adultos se dá nos meses de julho a agosto e a fase epizoótica da doença vai de agosto a meados de dezembro, quando se inicia a fase pós-epizoótica coincidindo com a redução da população da cigarrinha na região.

2.4. FATORES QUE AFETAM A OCORRÊNCIA DE EPIZOOTIAS DE *M. anisopliae*

Para que ocorra uma epizootia do fungo *M. anisopliae*, alguns fatores deverão estar influenciando favoravelmente. Esses fatores são classificados em bióticos e abióticos, e o conhecimento da ação dos mesmos sobre o hospedeiro e sobre o patógeno é de suma importância para permitir um prognóstico consistente de uma epizootia ocorrendo naturalmente ou provocada pela introdução de um elevado potencial de inóculo do fungo no ambiente.

Diversos autores como TANADA (1963); FERRON (1978); KISH e ALLEN (1978); FERRON (1981); VENTURA (1981); WEISER (1982), comentam a necessidade em se obter conhecimentos sobre Epizootiologia, para serem empregados em programas de manejo integrado de pragas.

2.4.1. FATORES BIÓTICOS

Para que ocorram epizootias naturais, é necessário que a praga visada seja suscetível ao *M. anisopliae* e que a população da mesma esteja elevada, favorecendo a formação de um alto potencial de inóculo e uma disseminação mais rápida do fungo no ambiente (TANADA, 1963; BURGUES, 1981; VENTURA, 1981; WEISER, 1982; ALVES, 1985).

O hábito e o estágio do inseto hospedeiro devem ser levados em conta, pois conforme a espécie do inseto, a suscetibilidade pode variar segundo esses dois fatores (TANADA, 1963; BURGUES, 1981; MOSCARDI e CORSO, 1981; WEISER, 1982; ALVES, 1985).

Trabalhos como os de TANADA (1963), BURGUES (1981) e ALVES (1985), comentam a importância das migrações de insetos e de sua distribuição espacial nas plantações, porque permitem que a doença atinja outros insetos mais distantes de seu foco primário, ocorrendo assim uma acentuada epizootia.

ALVES (1985) observou a ocorrência anual de uma doença de caráter epizootico nos canaviais da região Nordeste, disseminada inicialmente pela imigração de adultos de cigarrinha contaminados por *M. anisopliae*.

Segundo TANADA (1963) e ALVES (1985), os hospedeiros intermediários podem favorecer os processos de variabilidade genética dos patógenos, a disseminação e a perpetuação do patógeno, inclusive na ausência do hospedeiro principal.

Quanto às características dos patógenos, são de grande importância para a ocorrência de epizootias e segundo TANADA (1963), o patógeno deve apresentar alta virulência e agressividade, alta capacidade de sobrevivência e alta capacidade de dispersão no ambiente.

A obtenção de isolados ou linhagens de *M. anisopliae* mais virulentas e agressivas tem sido feita através de bioensaios comparativos por diversos pesquisadores no Bra-

sil (VILLACORTA, 1980; ALVES, 1982; SOSA GÓMEZ, 1983; SOSA GÓMEZ e ALVES, 1983; ALVES *et alii*, 1984c; BORGES, 1985).

A virulência pode ser aumentada através de passagens sucessivas sobre o hospedeiro (FERRON, 1978) ou através de engenharia genética provocando-se mutações ou até de cruzamentos entre linhagens do patógeno (PEREIRA *et alii*, 1982).

SCHAERFFENBERG (1964) demonstra a necessidade de se passar o fungo *M. anisopliae* pelo inseto hospedeiro de tempos em tempos, para manter a virulência do patógeno quando cultivado em meio artificial por longos períodos de tempo. Este fato foi demonstrado também por MURAYAMA *et alii* (1982), quando detectaram alterações consideráveis na morfologia e virulência do *M. anisopliae* após a 8ª repicagem em meio de arroz.

SOSA GÓMEZ e ALVES (1983) constataram elevada atividade lipolítica, proteolítica e amilolítica em isolados mais virulentos de *M. anisopliae* sobre *Diatraea saccharalis* (F.).

Segundo TANADA (1963), a capacidade do patógeno sobreviver no ambiente natural junto ao hospedeiro ou dentro do hospedeiro, pode determinar a frequência de epizootias nas populações de insetos. Comenta também que, o patógeno pode sobreviver associado a insetos parasitos, predadores e outros animais.

MILNER e LUTTON (1976) reportam que conídios de *M. anisopliae* podem sobreviver por muitos anos no solo, de preferência em temperaturas variando de 16 a 23°C.

OLIVEIRA *et alii* (1981) concluíram que o *M. anisopliae* tem seu potencial de sobrevivência no solo, na forma de conídios, por um período mínimo de 90 dias e que a "taxa de infestação" de $1,41 \times 10^6$ conídios viáveis por grama de solo é suficiente para manter este patógeno, de maneira saprofítica, pelo mesmo período de tempo.

ALVES *et alii* (1984d) trabalhando com o isolado E₉ de *M. anisopliae* sobre plantas de cana-de-açúcar, determinaram que 50% dos conídios aplicados tornaram-se inviáveis decorridas 34,3; 31,5 e 162,5 horas quando localizados respectivamente em folhas do ponteiro, folhas superiores e nas bainhas das folhas. Este trabalho foi realizado à uma umidade relativa do ar de 58,9%, temperatura média de 20,7°C e não houve precipitação pluviométrica. Caso a época de aplicação fosse chuvosa, o ambiente estaria mais úmido, o que certamente proporcionaria maior capacidade de sobrevivência.

O fungo *M. anisopliae*, como outros patógenos, deve possuir alta capacidade de reprodução para favorecer a ocorrência de epizootias, sendo que esta capacidade pode variar de acordo com os isolados do fungo e com o inseto hospedeiro, levando-se em conta o seu tamanho (KISH e ALLEN, 1978; ALVES *et alii*, 1982; SOSA GÓMEZ, 1983; ALVES, 1985).

KISH e ALLEN (1978) encontraram diferentes médias do número de conídios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre cadáveres de *Anticarsia gemmatalis* Hübner de diferentes tamanhos, sendo $5,6 \times 10^8$ conídios nas lagartas mortas peque-

nas, $1,5 \times 10^9$ conídios sobre as médias e $3,18 \times 10^9$ conídios sobre as grandes.

ALVES *et alii* (1982) determinaram o número de conídios de *M. anisopliae* produzidos sobre ninfas e adultos da cigarrinha *Mahanarva posticata* Stal durante a fase epizootica da doença em lavoura de cana-de-açúcar no Estado de Alagoas, sendo encontrado uma média de 1×10^8 conídios para ninfas do terceiro ao quarto ínstar e $1,4 \times 10^8$ conídios para os aultos. Com base no número de insetos atacados por hectare, concluíram que é formado um elevado potencial de inóculo (4,9 kg de conídios/hectare) que justifica a ocorrência de epizootias anuais na região.

SOSA GÓMEZ (1983) ao testar vários isolados de *M. anisopliae* sobre *D. saccharalis*, verificou que há diferença entre eles, no que se refere à produção de conídios sobre cadáveres do inseto, sendo que os isolados PL-39, PL-47, PL-51 e PL-48 foram os mais produtivos.

RAMOSKA (1984) demonstra que a capacidade de reprodução está diretamente relacionada à umidade relativa do ar, quanto mais úmido o ambiente, maior a capacidade de reprodução.

Por último, é necessário que o fungo conte com alguns fatores de disseminação dos conídios para favorecer a ocorrência de epizootias, segundo TANADA (1963).

O mesmo autor diz que a maioria dos entomopatôgenos é incapaz de atingir o hospedeiro por seus próprios meios

e que os agentes físicos de disseminação (vento, água da chuva, orvalho, córregos, etc.) e os agentes biológicos de disseminação (hospedeiros primários, secundários, parasitos, predadores, mamíferos, aves e o próprio homem através de aplicações de um elevado potencial de inóculo no local) são de grande importância para que uma epizootia possa ocorrer.

2.4.2. FATORES ABIÓTICOS

O conhecimento da ação dos fatores abióticos sobre os fungos é essencial para se obter bons resultados a nível de campo. Os estudos sobre esses fatores ainda não são consistentes, o que prejudica sobremaneira a eficiência desses patógenos no campo.

Os fatores abióticos estão correlacionados com o ambiente e são de grande importância, pois a simples presença de um patógeno sobre um hospedeiro suscetível não é condição suficiente para que este seja colonizado (ALVES, 1985).

As condições ambientais que mais influenciam na ocorrência de epizootias de patógenos são: temperatura, umidade relativa, radiação solar, presença de substâncias químicas no ambiente, vento, etc. (TANADA, 1963; GALLI e CARVALHO, 1978; WEISER, 1982; ALVES, 1985).

De acordo com ALVES (1985), a ação dos fatores ambientais é mais pronunciada durante as fases de dissemina-

ção, germinação e penetração do patógeno, do que durante a fase de colonização, quando o mesmo está em pleno desenvolvimento.

No caso do fungo *M. anisopliae*, os fatores abióticos que basicamente influenciam são temperatura, umidade e radiação solar, sendo que o efeito prejudicial deste último fator (radiação ultravioleta) pode ser amenizado com o uso de formulações mais adequadas, que protegeriam o inóculo desas radiações; também com o emprego, a nível de campo, de isolados virulentos mais resistentes à radiação ultravioleta (ALVES e RISCO, 1983; BORGES, 1985; SÓSA GÓMEZ, 1983); e também pode ser amenizado através da aplicação do fungo em horários adequados (final da tarde e noite).

Neste trabalho procura-se enfatizar a ação da temperatura e umidade sobre o comportamento do *M. anisopliae*, principalmente sobre a manutenção da viabilidade dos conídios e sobre a conidiogênese, já que são dois requisitos de grande importância para a ocorrência de epizootias.

2.4.2.1. Influência da temperatura

A temperatura é um dos principais fatores abióticos, pois atua sobre o *M. anisopliae* afetando desde a produção em laboratório e armazenamento até a sua aplicação e eficiência a nível de campo, podendo favorecer ou não a ocorrên-

cia de epizootias.

MASERA (1957) cita que temperaturas, entre 25 e 29°C, são importantes na patogenicidade porque aceleram o processo de infecção de doenças causadas por fungos sobre o hospedeiro.

De acordo com COCHRANE (1958), a temperatura tem influência no crescimento, germinação e reprodução dos fungos e que a faixa favorável para o crescimento da maioria dos fungos é de 25 a 30°C.

BALFOUR-BROWNE (1960) constatou que, ao inocular *M. anisopliae* em *Ostrinia nubilalis*, as condições ideais para a ocorrência da doença eram de umidade saturada e temperatura em torno de 25°C, sendo a mínima de 10°C, a ótima em torno de 25°C e a máxima entre 32 e 34°C.

TANADA (1963) comenta que, em geral, altas temperaturas aceleram o progresso da doença.

Segundo SCHAEFFENBERG (1964) a influência da temperatura deve ser considerada de acordo com as exigências de cada fase da relação patógeno-hospedeiro. Cita também que o *M. anisopliae* alcança o seu crescimento vegetativo máximo entre 25 e 30°C.

CLERK e MADELIN (1965) verificaram que a longevidade de conídios de *M. anisopliae* decresce à medida que a temperatura de armazenamento é aumentada de 8 para 25°C.

LATCH (1965) observou que o crescimento de *M. anisopliae* torna-se muito pequeno abaixo de 7°C e acima de

35°C, sendo a faixa ótima entre 25 e 30°C, sendo que nesta faixa o fungo apresenta-se, também, altamente patogênico.

Segundo WALSTAD *et alii* (1970), o ótimo de temperatura para a germinação de conídios de *M. anisopliae*, encontra-se na faixa de 25 a 30°C, quando a umidade relativa do ar se encontra próxima de 90%.

AQUINO (1974) cultivou *M. anisopliae* em garrafas de Roux contendo arroz cozido e em tubos de cultura contendo batata-dextrose-âgar (BDA) por seis meses, sob temperaturas que variaram de 3 a 10°C, observando que tanto as culturas mantidas sob congelamento como as que permaneceram a 8°C durante 6 meses, paralisaram o crescimento do fungo. Essas culturas após repicadas, apresentaram crescimento normal sem diminuição na conidiogênese e virulência do fungo.

BELL e HAMALLE (1974) estudaram a viabilidade e patogenicidade de *M. anisopliae* e de outros fungos entomopatogênicos, armazenados em sílica-gel à temperatura de -20°C, sendo que o *M. anisopliae* manteve a viabilidade e patogenicidade por 36 meses.

BASTOS e MATTA (1976) observaram em seu trabalho sobre a influência da temperatura na conidiogênese do fungo *M. anisopliae*, que o ponto ótimo de temperatura foi de 25°C, o mínimo em torno de 20°C e o máximo de 30°C, sendo que nas temperaturas testadas de 10, 15 e 35°C não houve conidiogênese.

ROBERTS e CAMPBELL (1977) elaboraram revisão so

bre a influência da temperatura na germinação, crescimento e conidiogênese de diversos fungos, entre eles o *M. anisopliae*. Os dados sobre este fungo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Efeito da temperatura "in vitro", sobre a germinação dos conídios, crescimento vegetativo e conidiogênese de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (adaptado de ROBERTS e CAMPBELL, 1977).

Fase de desenvolvimento	Temperatura (°C)		Referência
	Ótimo	Suportável	
Germinação dos conídios	25	-	Clerk e Madelin (1965)
	25 a 30	15 a 35	Walstad <i>et alii</i> (1970)
Crescimento micelial	24 a 26	10 a 30	Vouk e Klas (1932)
	25 a 30	10 a 34	Notini <i>et alii</i> (1944)
	25 a 30	-	Schaerffenberg (1964)
Conidiogênese	24 a 26	-	Vouk e Klas (1932)
	25 a 30	10 a 35	Walstad <i>et alii</i> (1970)
	-	15 a 32	Notini <i>et alii</i> (1944)

Segundo FERRON (1978), a temperatura exerce influências simultaneamente sobre o fungo entomopatôgeno e sobre o inseto hospedeiro. Cita que a temperatura ótima para o desenvolvimento do *M. anisopliae* está em torno de 27 a 28°C em meio nutritivo. Relatou também que, em condições de laboratório, em temperaturas cons

tantes, o período de incubação da doença está diretamente associado à temperatura e que há uma correlação positiva entre o desenvolvimento da doença no hospedeiro e o aumento de temperatura de 13 para 23°C. Para temperaturas superiores a esta faixa, a correlação será negativa.

SANTOS (1978) ao estudar o efeito da temperatura sobre o fungo *M. anisopliae*, verificou que a 37°C os conídios tiveram sua germinação inibida, sendo que estes tornaram-se inviáveis após ficarem submetidos por mais de 96 horas nessa temperatura.

VILLACORTA (1978) ao trabalhar com diferentes isolados de *M. anisopliae*, verificou que a temperatura ótima foi de 28°C e que o desenvolvimento do fungo foi prejudicado acima de 30°C e nulo abaixo de 7°C.

DOBERSKY (1981) estudando a influência da temperatura e da umidade na infecção de *M. anisopliae* sobre larvas do besouro *Scolytus scolytus*, obteve menores tempos para alcançar 50% de mortalidade da praga à medida que a temperatura era elevada de 2 para 20°C.

Segundo MARQUES *et alii* (1981) as salas de germinação dos laboratórios do IAA/PLANALSUCAR são mantidas a uma temperatura de 26°C durante a fase de crescimento e conidiogênese do *M. anisopliae*, pois esta temperatura se mostrou mais favorável para essas fases de desenvolvimento do fungo.

De acordo com ALVES (1982) a temperatura é um dos fatores abióticos de grande importância e atua sobre os patógenos a

fetando a produção, estabilidade na estocagem e patogenicidade nas condições de campo, ressaltando que o fator temperatura torna-se ainda mais importante, tendo em vista a incapacidade dos patógenos de se protegerem das variações de temperatura através de sistemas fisiológicos.

DAOUST *et alii* (1982) ao estudarem o efeito da formulação na virulência de conídios de *M. anisopliae* sobre larvas de mosquitos, observaram que o fungo formulado com o pó orgânico THIXCIN R manteve a viabilidade em 71% e a virulência bastante alta, durante um ano de armazenamento na temperatura de 40°C.

ZIMMERMANN (1982) em seu trabalho sobre o efeito de altas temperaturas, umidade relativa e radiação solar artificial na viabilidade de conídios de *M. anisopliae*, demonstra que a temperatura média letal pode aumentar à medida que a umidade relativa decresce.

Ao estudarem o efeito da temperatura e umidade relativa sobre a viabilidade e virulência de conídios de *M. anisopliae* quando armazenados por um período de dois anos, DAOUST e ROBERTS (1983) observaram que à medida que se diminui a temperatura, na faixa de 37°C para 19°C para a umidade relativa de 97%, consegue-se manter a viabilidade em até 90% e também uma alta virulência. Já para a temperatura de 40°C, conseguiram manter essas características do fungo em condições elevadas, somente a 0% de umidade relativa.

ALVES (1984) verificou que a faixa favorável à

germinação de conídios de *M. anisopliae* vai de 18 a 36°C, sendo que a faixa mais favorável é de 25 a 27°C em umidades acima de 80%, e que acima de 36°C, praticamente, não ocorre germinação, porém os conídios podem permanecer viáveis até a temperatura de 40°C, a partir da qual vão perdendo gradativamente a viabilidade. Relatou também que, sob condições elevadas de umidade, a reprodução do fungo ocorre na faixa de 21 a 30°C de temperatura.

ALVES e NOGUEIRA (1984) ao estudarem o efeito da temperatura sobre dois isolados de *M. anisopliae* (E₉ e PL-43), concluíram que esses isolados conseguem germinar na faixa de 16 a 36°C, sendo que abaixo de 16°C e acima de 36°C a germinação é nula. Concluíram também que o isolado E₉ perdeu toda a viabilidade após a sua manutenção por 24 horas a partir da temperatura de 40°C e que o isolado PL-43 apresentou 50% de viabilidade a 40°C e viabilidade nula acima dessa temperatura.

ALVES *et alii* (1984a) verificando a influência de diferentes temperaturas sobre a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* isolado PL-27 sobre lagartas de *D. saccharalis*, observaram após seis dias da inoculação do fungo, mortalidades de 95,1; 91,4; 87,8 e 16,6%, respectivamente para as temperaturas de 26, 28, 30 e 35°C. De acordo com este trabalho, verifica-se que à medida que a temperatura aumentou, a mortalidade do inseto decresceu.

ALVES *et alii* (1984b) ao estudarem a influên-

cia do fotoperíodo e da temperatura no desenvolvimento e conidiogênese do *M. anisopliae*, concluíram que dentre as combinações de temperatura e fotoperíodo testadas, a condição mais adequada para a produção deste fungo foi a de 28°C de temperatura e 16 horas de fotoperíodo.

RIBA e MARCANDIER (1984) demonstram que a agressividade do fungo *M. anisopliae* sobre os ovos de *Ostrinia nubilalis* Hübn. foi mais elevada na condição de 25°C e umidade relativa de 100%.

Segundo ALVES (1985), pode-se considerar para efeito de aplicação no campo, a faixa de 20 a 30°C, como sendo a mais indicada para a maioria dos patógenos conhecidos.

O mesmo autor comenta que, se as temperaturas de produção e armazenamento são fáceis de serem controladas, as temperaturas após as aplicações no campo, são impossíveis de serem modificadas.

2.4.2.2. Influência da umidade

A umidade desempenha um papel importante, tanto para o patógeno como para o inseto hospedeiro.

A maioria dos insetos apresenta redução na atividade e desenvolvimento quando a umidade relativa é inferior a 40%. Já os insetos que vivem no solo são mais afetados pela falta ou excesso de água no solo, que basicamente depende da

chuva (SILVEIRA NETO *et alii*, 1976).

Müller-Kögler (1965) citado por FERRON (1977), comenta que os fungos entomopatogênicos penetram caracteristicamente no inseto hospedeiro através do tegumento e por isso atribui uma grande importância à umidade relativa do ambiente para que o processo infectivo das doenças causadas por deuteromicetos como *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea* e *Paecilomyces*, possa se desenvolver.

Ainda com relação aos fungos, a umidade é essencial, sendo importante para as fases de germinação e penetração, e limitante para a fase de reprodução dos mesmos (ALVES, 1985). Este autor comenta também que a umidade pode influir na espessura da camada de cera dos insetos, tornando-os mais ou menos resistentes aos patógenos.

TANADA (1963) comenta a importância da umidade na ocorrência de epizootias e que fungos como o *M. anisopliae* necessitam de umidades de 60 a 100% para o seu desenvolvimento, principalmente na germinação dos conídios. Cita também a importância do microclima ao redor do inseto, que pode até ser mais importante que o macroclima, dependendo da vegetação, da capacidade do solo em reter a umidade e outros.

SCHAERFFENBERG (1964) relatou que altas umidades são mais necessárias na fase de reprodução do fungo *M. anisopliae*.

CLERK e MADELIN (1965) verificaram que conídios de *M. anisopliae* sobrevivem mais tempo em altas (75,4%) e baixas

(0%) umidades relativas, do que em umidades relativas médias (33,7%), sendo constatado esse resultado em todas as temperaturas testadas no experimento.

Segundo LATCH (1965), a umidade é um dos fatores ambientais que influenciam no mecanismo de patogenicidade do fungo *M. anisopliae* sobre insetos hospedeiros.

WALSTAD e ANDERSON (1971) verificaram que o *M. anisopliae* requer umidade próxima a 92,5% e temperatura entre 15 e 25°C para germinação do conídio, desenvolvimento micelial e conidiogênese.

FERRON (1977) ao estudar a influência da umidade relativa do ar sobre o desenvolvimento da doença causada por *Beauveria bassiana* (Baís) Vuillemin sobre adultos de *Acanthoscelides obtectus* Say, verificou que após 10 dias da inoculação obteve 100% de mortalidade dos insetos em todas as umidades testadas (0, 35, 55, 76, 92, 98 e 100%) a 25°C de temperatura e 16 horas de fotofase. Constatou também que o processo infeccioso foi acelerado, a medida que a umidade relativa do ar aumentava. Já o desenvolvimento micelial do fungo e a conidiogênese no exterior dos cadáveres dos insetos só ocorreu em umidades relativas iguais ou superiores a 92% e por essa razão ele comenta que as epizootias naturais deste fungo só ocorrem no período chuvoso onde a umidade relativa é elevada.

FERRON (1978) concluiu que umidades relativas do ambiente próximas da saturação, são necessárias para o desenvolvimento de "surtos epidêmicos" da doença, como para a reprodu-

ção do fungo sobre os cadáveres dos insetos hospedeiros.

KISH e ALLEN (1978) inocularam o fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) em lagartas da espécie *Anticarsia gemmatalis* Hübner em diferentes umidades relativas do ar (90, 70 e 50%) com temperatura diurna de 32°C e temperatura noturna de 21°C, e observaram que ocorreu 68% de mortalidade dos insetos nas umidades de 90 e 70% e que não ocorreu infecção do fungo na umidade de 50%, demonstrando que existe um nível de umidade relativa do ar entre 70 e 50% que é limitante para o fungo *N. rileyi* causar infecção em lagartas de *A. gemmatalis*.

Estes autores incubaram lagartas com 3 a 4 dias depois de mortas nas umidades de 50, 70 e 90% com temperatura diurna de 32°C e noturna de 21°C e observaram que a 50% não houve conidiogênese, a 70% ocorreu conidiogênese parcial e a 90% a conidiogênese foi total.

DOBERSKY (1981) ao inocular *M. anisopliae* em larvas do besouro *Scolytus scolytus* sob diferentes umidades relativas do ar (51; 74; 86; 90; 95; 97,5 e 100%) observou que este fungo causou infecção no inseto em todas as umidades sendo que, com o aumento da umidade relativa, o tempo necessário para matar 50% da população de insetos (TL₅₀) diminuía.

LINGG e DONALDSON (1981) ao verificarem o efeito combinado da temperatura e umidade, durante 10 dias, sobre a longevidade de conídios de *B. bassiana* no solo, concluíram que em todas as umidades relativas testadas (0, 33, 52, 75 e 100%) a sobrevivência dos conídios no solo esterilizado não sofria re

dução alguma na temperatura de -15°C . Para a temperatura de 55°C não houve sobrevivência dos conídios em nenhuma umidade relativa. E nas temperaturas intermediárias de 10 e 25°C , os índices de sobrevivência foram maiores a 33 e 100% de umidade relativa, principalmente nesta última umidade.

ZIMMERMANN (1982) verificou que a medida que a umidade relativa decresce, a temperatura média letal para conídios de *M. anisopliae* pode aumentar.

DAOUST e ROBERTS (1983) estudaram o efeito do armazenamento prolongado de conídios de *M. anisopliae* (isolado E₉ ESMC), em diferentes temperaturas e umidades relativas, sobre a viabilidade e virulência desses conídios. Verificaram que a viabilidade declinou rapidamente a 37°C de temperatura, principalmente nos valores intermediários de umidade relativa (12, 33, 50 e 70%). Nas temperaturas de 19 e 26°C , os conídios mantiveram por mais tempo a sua capacidade de germinação, sendo este fato mais nítido a 0% e a 97% de umidade relativa. A umidade menos favorável a 19 e 26°C foi a de 33%. A sobrevivência dos conídios a 4°C foi similar em todas as umidades relativas até três meses de armazenamento, e após isso houve um declínio significativo da viabilidade nos valores acima de 0% de umidade. Após dois anos na temperatura de 4°C e 0% de umidade relativa, os conídios ainda apresentavam 66% de viabilidade. A -20°C de temperatura a viabilidade caiu rapidamente (93 para 18% após seis meses), mas a perda ao final de dois anos não foi total. A melhor combinação de tempe-

ratura e umidade foi a de 19°C e 97% de umidade que manteve a p^os dois anos 90% de viabilidade dos conídios.

Quanto à virulência, os mesmos autores compararam conídios que estiveram estocados nas melhores condições de temperatura e umidade relativa (26°C e 97%, 19°C e 97%, 4°C e 0%) do experimento e observaram que a virulência mais elevada, sobre larvas de mosquitos, foi a apresentada pelos conídios armazenados a 19°C de temperatura e 97% de umidade relativa.

RAMOSKA (1984) trabalhando com *B. bassiana* em *Blissus leucopterus*, observou que o fungo conseguiu provocar doença no inseto sob umidades relativas de 30, 50, 75 e 100%, porém a conidiogênese só ocorreu em ambientes com umidade relativa de 75 e 100%, demonstrando assim que a capacidade de reprodução está diretamente associada à umidade relativa do ar. Este comentou que em insetos menos esclerotizados, o fungo encontrou maior facilidade de se desenvolver. Comentou também que deve-se considerar a importância do microclima ao redor do inseto sobre o desenvolvimento do fungo.

RIBA e MARCANDIER (1984), estudando a influência da umidade relativa sobre os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, observaram que os conídios de *M. anisopliae*, submetidos por 15 dias a 20, 25 e 30°C de temperatura em umidades relativas abaixo de 90%, perderam quase toda a sua virulência sobre ovos de *Ostrinia nubilalis* Hübn. Verificaram que, a medida que a umidade relativa decresce de 100% para 30%, o tempo

necessário para o fungo *B. bassiana* matar 50% das lagartas de *O. nubilalis* aumenta em três dias. Observaram que não ocorreu conidiogênese do fungo *B. bassiana* na superfície externa das lagartas quando submetidas à umidade relativa de 30%.

ALVES (1985) comenta que em condições de laboratório, não ocorre conidiogênese total do fungo *M. anisopliae* sobre insetos colonizados e colocados em ambientes com 40 e 60% de umidade relativa. E em condições de campo, têm se verificado que as epizootias estão sempre correlacionadas com alta umidade relativa (70 a 100%), como ocorre com *M. anisopliae* sobre cigarrinhas (Homoptera:Cercopidae).

Baseando-se nos trabalhos apresentados, verifica-se que a influência deste fator abiótico está intimamente associada à temperatura ambiente e que altos níveis de umidade (70 a 100%) e temperaturas na faixa de 20 a 30°C são necessárias para ocorrer alta taxa de germinação dos conídios e alta taxa de reprodução do patógeno.

2.5. UTILIZAÇÃO DE CLIMOGRAMAS

A Lei da Tolerância Ecológica de Shelfford (1913), citado por SILVEIRA NETO (1976), diz que os organismos apresentam limites ecológicos mínimo e máximo, dentro dos quais se desenvolvem.

A temperatura e a umidade são dois fatores abióticos que podem ser limitantes para a produção de conídios

e para a manutenção da viabilidade desses conídios, como foi comentado anteriormente nesta revisão de literatura.

Para a análise da influência conjunta da temperatura e umidade, pode-se utilizar de climogramas, que é uma forma clássica de representação do clima que permite, de maneira simples e prática, a comparação entre duas ou mais regiões no tocante às variações climáticas.

Sob o ponto de vista ecológico, o climograma é útil para se evidenciar a possibilidade de desenvolvimento, adaptação, instalação e expansão de uma espécie nas regiões em estudo.

Para a sua construção, segundo SILVEIRA NETO *et alii* (1976), são colocados nas abscissas os dados mensais de umidade da região em estudo e nas ordenadas os dados mensais de temperatura da mesma região e a seguir une-se, em ordem crescente, os doze pontos referentes aos doze meses do ano, formando um polígono próprio de cada região.

Trabalhos interessantes sobre a previsão de ocorrência e zoneamento ecológico de pragas e de zoneamento ecológico de culturas, foram realizados no Brasil.

PUZZI e CAMARGO (1963) realizaram um estudo sobre a possibilidade da adaptação climática da cochonilha *Oxthezia praelonga* Douglas nos pomares de citros do Estado de São Paulo, baseando-se em climogramas (termo-higrogramas), combinando temperatura e umidade relativa do ar.

CAMARGO (1966) realizou um trabalho excepcional

sobre a viabilidade e limitações climáticas para a cultura do milho no Brasil utilizando-se de evapopluviogramas (climogramas adaptados ao balanço hídrico).

Trabalhos de zoneamento ecológico de pragas foram desenvolvidos por PARRA (1981) para o bicho-mineiro-do-cafeeiro e por CAMPOS GUEVARA (1983) para a lagarta-da-maçã-do-algodoeiro, ambos no Estado de São Paulo.

SILVEIRA NETO *et alii* (1986) estabeleceram um zoneamento ecológico preliminar para as cigarrinhas-das-pastagens no Brasil, através de climogramas adaptados ao balanço hídrico (evapopluviograma).

Após a construção do climograma representativo de uma região em estudo, pode-se correlacioná-lo com o fungo *M. anisopliae*, traçando-se sobre o gráfico os pontos de temperatura e umidade relativa do ar que delimitam as condições favoráveis e limitantes, tanto para manutenção da viabilidade dos conídios próxima a 100%, como para uma alta produção de conídios.

É evidente que outros fatores, tais como solo, luminosidade, radiação, etc., podem afetar a produção e a viabilidade dos conídios e por conseguinte a intensidade das doenças. O conhecimento da ação desses fatores podem também servir para a elaboração de zoneamentos mais precisos do fungo *M. anisopliae*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, Estado de São Paulo.

3.1. MATERIAL

3.1.1. ISOLADOS DO FUNGO *Metarhizium anisopliae*

Trabalhou-se com três isolados, obtidos na coleção do laboratório citado anteriormente, cuja denominação, procedência original e hospedeiros originais constam na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação dos isolados de *Metarhizium anisopliae* utilizados, com suas respectivas denominações, procedências e hospedeiros originais.

Denominação	Procedência	Hospedeiro original
E ₉	EMCAPA, Vitória (ES)	<i>Deois flavopicta</i> (Stal)
PL-27	Fazenda Charles, Mal. Deodoro (AL)	<i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr.)
PL-43	Fazenda Papuã, Usina Peixes, Fleixeiras (AL)	<i>Mahanarva posticata</i> (Stal)

A razão da escolha desses isolados se deve ao fato de terem sido utilizados em ensaios de campo realizados por Instituições de Pesquisa no Brasil, para controle de cigarrinhas-das-pastagens, cigarrinha-da-cana-de-açúcar e broca-da-cana-de-açúcar.

3.1.2. INSETO UTILIZADO

Foram utilizadas no experimento, lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis*, provenientes da criação do Laboratório de Controle Biológico do IAA/PLANALSUCAR de Araras, Estado de São Paulo, criadas em dieta artificial de HENSLEY e HAMMOND modificada pelo IAA/PLANALSUCAR (MENDES *et alii*, 1980).

3.1.3. MEIO DE CULTURA

O meio de cultura empregado para a purificação e multiplicação dos isolados de *M. anisoplíae* foi o BDA mais antibiótico, cuja composição encontra-se a seguir:

batata inglesa sem casca.....	200 g
dextrose.....	15 g
ágar.....	20 g
streptoduocin veterinário.....	0,5 g
água destilada.....	1000 ml

O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 125°C e à uma pressão de 1 atm, durante 30 minutos.

3.1.4. EQUIPAMENTOS

- . Agitador e aquecedor elétrico, marca FANEM, modelo 258.
- . Agitador elétrico, marca ETICA, para homogeinização da suspensão de conídios, com faixa de rotação de 108 até 310 rotações/minuto.
- . Balança, marca METTLER, com indicadores digitais, modelo PB-300.
- . Caixas plásticas de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura, com tampa telada e espaçadores na base, permitindo que a umida-

- de relativa do ar em seu interior seja a mesma do exterior, para conterem as lagartas nos dessecadores.
- . Câmara asséptica de fluxo laminar vertical (capela), marca VECO, modelo VLFS-09, para trabalhos de isolamento, purificação, repicagem, inoculação do fungo e transferência de meio de cultura para placas de Petri.
 - . Câmara de Neubauer, destinada à calibração do inóculo através de contagem de conídios.
 - . Câmara de plástico de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura, para inoculação por imersão do fungo nas lagartas, com tampa e fundo telados, conforme SOSA GÓMEZ (1983).
 - . Dessecadores de plástico reforçado com tampas prosqueáveis, hermeticamente fechados, com volume interno de 3.500 cm^3 , contendo cristalizador com soluções de ácido sulfúrico e grade de sustentação das caixas plásticas com tampa telada (Figura 1).
 - . Estufas incubadoras BOD, marca FANEM, modelo 347-G, equipadas com lâmpadas fluorescentes modelo F 15-T 12/LD e lâmpada incandescente de 30 watts (Figura 1).
 - . Microscópio-estereoscópico, marca WILD.
 - . Microscópio de contraste de fase, marca AMERICAN OPTICAL.
 - . Microscópio óptico, marca OLYMPUS-CBA 213.
 - . Termistor digital calibrado, modelo ESALQ/USP.
 - . Termo-higrômetro calibrado, marca SUND0 e psicômetro, marca INCOTERM.
 - . Outros materiais: autoclave; estufa para esterilizar a se-

co; freezer, fogão a gás; microcomputador marca PROLÓGICA modelo CP-500; alça de Drigallsky; alça de platina; algodão; água destilada e deionizada esterilizada com e sem espalhante adesivo Tween 80 na concentração de 0,1% (v/v); soluções de ácido sulfúrico em diferentes concentrações; solução de hipoclorito de sódio a 5%; Beckers de 500 ml; Erlenmeyers de 250 ml; termômetros; tubos de cultura com 2,5 cm de diâmetro e 8 cm de altura; pipetas; piscetas; pinças; pincéis, etiquetas adesivas; lamparina; plástico transparente elástico marca ROLOPAC; contador manual de conídios; caixas plásticas com 6 cm de diâmetro e 2 cm de altura; lâminas; lâminulas; graxa de silicone; espátula; papel alumínio; placas de Petri com 9 cm de diâmetro e 2 cm de altura e colmos de milho (Piranão VD2).

Figura 1 - Estufa incubadora BOD com temperatura e fotofase controladas contendo dessecadores com umidades relativas do ar ajustadas e caixas plásticas com tampa telada em seu interior.

3.2. MÉTODOS

Utilizando-se dos materiais descritos anteriormente, empregou-se os seguintes métodos para cada fase da pesquisa:

3.2.1. CALIBRAÇÃO DA TEMPERATURA NO INTERIOR DOS DESSECADORES

A calibração da temperatura no interior dos 16 dessecadores utilizados no experimento, sendo quatro dessecadores para cada temperatura (22, 26, 30 e 34°C), foi realizada colocando-se os mesmos no interior das quatro estufas incubadoras (uma para cada temperatura) com regulagem automática da temperatura desejada e provida de termômetro em seu interior para simples conferência. Além disso, introduziu-se em cada dessecador, o sensor de um termistor digital calibrado, de alta precisão, para refinar o ajuste da temperatura desejada, que demonstrou existir uma variação máxima de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ para cada temperatura.

3.2.2. CALIBRAÇÃO DA UMIDADE RELATIVA DO AR NO INTERIOR DOS DESSECADORES

A calibração das diferentes umidades relativas do ar (30, 50, 70 e 90%) no interior dos 16 dessecadores, já com suas temperaturas calibradas, foi realizada com o auxílio de soluções de ácido sulfúrico (H_2SO_4) em diferentes volumes e concentrações, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações e volumes da solução de ácido sulfúrico para con
trole da umidade relativa do ar no interior de um dessecador
com 3.500 cm³ de volume, em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Umidade relativa desejada (%)	Concentração da solução de áci- do sulfúrico(N)	Volume da solução de ácido sulfúri- co (ml)
22±0,2	30	13,68	73
22±0,2	50	8,69	82
22±0,2	70	5,69	138
22±0,2	90	2,41	168
26±0,2	30	14,27	70
26±0,2	50	10,20	75
26±0,2	70	5,82	140
26±0,2	90	2,43	170
30±0,2	30	14,27	70
30±0,2	50	9,13	78
30±0,2	70	5,77	136
30±0,2	90	2,35	172
34±0,2	30	14,27	70
34±0,2	50	8,48	84
34±0,2	70	5,03	156
34±0,2	90	2,07	195

O fato de se utilizar, para uma mesma umidade relativa do ar, concentrações e volumes de ácido sulfúrico com uma pequena variação, se deve à influência das diferentes temperaturas, que foi registrada e ajustada com o auxílio de um termo-higrômetro.

3.2.3. PREPARO DOS INÓCULOS UTILIZADOS NA PESQUISA

Os inóculos necessários para a realização da pesquisa, foram obtidos da seguinte forma, para cada isolado do fungo testado:

Inicialmente foram purificados e multiplicados em placas de Petri com meio de cultura + antibiótico até a 2ª repicagem, incubados durante 9 dias em cada repicagem na temperatura de $26 \pm 0,2^\circ\text{C}$ com 16 horas de fotofase.

Em seguida, retiraram-se os conídios com a ajuda de um pincel fino, transportando-os para um Becker com 100 ml de água deionizada estéril com espalhante adesivo. Esta suspensão permaneceu por 60 minutos em um agitador elétrico a 200 rotações por minuto, para que houvesse uma perfeita homogeneização.

Uma parte da suspensão de cada isolado (5 ml) foi retirada para a realização de um teste de viabilidade dos conídios, pipetando-se 0,5 ml da suspensão para cada placa de Petri com meio de cultura + antibiótico, que foi espalhado com

auxílio de uma alça de Drigallsky, com um total de 10 repetições por isolado, sendo constatado 24 horas após, 100% de viabilidade em todas as repetições dos três isolados. A leitura foi realizada em 100 conídios por repetição, e para serem considerados germinados, os mesmos deviam apresentar o tubo germinativo, pelo menos com o mesmo comprimento do conídio.

Na outra parte (95 ml), lagartas de 5º ínstar, de *D. saccharalis* (20 por isolado) foram imersas durante 6 segundos (2 ciclos de 3 segundos) e colocadas em caixas plásticas esterilizadas, de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura, com porções de colmo de milho lavadas. Foram incubadas na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ com fotofase de 16 horas e umidade relativa próxima da saturação, durante nove dias. O alimento era trocado a cada dois dias. Todo esse procedimento foi realizado para se garantir uma alta virulência dos isolados sobre as lagartas a serem utilizadas na pesquisa.

Como os insetos foram submetidos à condições especiais de assepsia e a conidiogênese tinha ocorrido recentemente, foi possível dar um toque com uma alça de platina nos conídios sobre os cadáveres das lagartas e transportá-los para placas de Petri com meio de cultura + antibiótico, conseguindo-se reisolar e purificar os isolados na 1ª repicagem. Esses conídios foram espalhados nessas placas com auxílio de uma alça de Drigallsky e foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente, por nove dias, para posteriormente serem retirados com o auxílio de um pincel fino e transportado

para um Becker contendo 100 ml de água deionizada esterilizada com espalhante adesivo. Essa suspensão foi homogeneizada conforme descrição anterior, onde também se realizou um teste de viabilidade dos conídios como o descrito anteriormente, constatando-se 100% de viabilidade para os conídios dos três isolados.

A suspensão original de cada isolado foi quantificada na câmara de Neubauer, ajustando-a através de diluição, na concentração de $5,4 \times 10^7$ conídios viáveis/ml sendo homogeneizada, para finalmente se fazer a inoculação das lagartas a serem utilizadas na pesquisa propriamente dita.

3.2.4. INOCULAÇÃO E TIPO DE LAGARTA UTILIZADA NA PESQUISA

Lagartas de *D. saccharalis* no 5º ínstar, recém-retiradas da dieta artificial onde foram criadas, sofreram uma lavagem rápida em água deionizada esterilizada sem espalhante adesivo, para se retirar os resíduos de dieta, impregnados no corpo do inseto.

Em seguida, realizou-se a inoculação das mesmas, mergulhando-as na suspensão fúngica com $5,4 \times 10^7$ conídios viáveis/ml, durante 6 segundos (2 ciclos de 3 segundos) utilizando-se de uma câmara de inoculação por imersão (SOSA GÓMEZ, 1983).

Posteriormente, foram colocadas em caixas plásticas de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura com porções de colmo de milho lavadas, ficando em estufa incubadora (BOD) a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 16 horas de fotofase e umidade relativa próxima da saturação. O alimento foi trocado a cada dois dias.

O número de lagartas inoculadas foi o seguinte: 750 lagartas por isolado para a determinação da produção de conídios sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar e 1000 lagartas por isolado para a determinação da viabilidade dos conídios produzidos sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* expostos a diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar.

Diariamente anotavam-se e se retiravam as lagartas mortas, utilizando-se apenas as que morreram 108 horas (4,5 dias) após a inoculação do fungo, pois é nesse período que ocorre a maior porcentagem de mortalidade, possibilitando a obtenção do número necessário de lagartas para os três isolados e para os diferentes tratamentos.

Essas lagartas mortas selecionadas, foram colocadas em caixas plásticas (quatro por caixa) de 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura contendo uma porção de algodão úmido e incubadas a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, fotofase de 16 horas e umidade relativa próxima da saturação, durante 24 horas. Realizou-se nova seleção de lagartas mortas (192 por isolado para

a determinação da produção de conídios e 320 por isolado para a determinação da viabilidade dos conídios), com tamanho e desenvolvimento micelial uniforme (Figura 2), para serem submetidas às diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar, dentro de caixas plásticas com 6 cm de diâmetro por 2 cm de altura, colocadas no interior de dessecadores (Figura 1).

Figura 2 - Aspecto das lagartas, 24 horas após a morte causada por *M. anisopliae*, incubadas a $26 \pm 0,2^{\circ}$, fotofase de 16 horas e umidade relativa próxima à saturação.

3.2.5. POTENCIAL DE INÓCULO DOS ISOLADOS DE *M. anisopliae*

Com o objetivo de se conhecer qual era a quantidade de conídios que efetivamente entrou em contato com o tegumento das lagartas de *D. saccharalis*, logo após a inoculação com as suspensões dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* (conforme descrição do item 3.2.4.), transferiu-se cada uma dessas lagartas para tubos de cultura contendo 3 ml de água deionizada esterilizada + espalhante adesivo. O tubo foi agitado durante 60 minutos a 200 rotações por minuto. Em seguida, avaliou-se o número de conídios suspensos/ml de água, com o auxílio da câmara de Neubauer. O número de conídios por lagartas foi obtido, multiplicando-se o valor encontrado na leitura por 3, já que cada lagarta foi lavada com 3 ml de água. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três tratamentos (referentes aos três isolados) e 10 repetições (10 lagartas por isolado), sendo feita a análise estatística através do teste F e do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.6. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *M. anisopliae* SOBRE CADÁVERES DE LAGARTAS DE *D. saccharalis* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR

Com a finalidade de determinar a produção de conídios dos três isolados de *M. anisopliae* (E₉, PL-27 e PL-43) sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis*, obtidos conforme descrição anterior (item 3.2.4.), submeteu-se os mesmos a 16 condições climáticas diferentes (temperaturas de $22 \pm 0,2$; $26 \pm 0,2$; $30 \pm 0,2$ e $34 \pm 0,2$ °C associadas a umidades relativas do ar de 30, 50, 70 e 90%) durante três diferentes períodos de tempo (12, 24 e 48 horas).

Após cada período de tempo, as caixas plásticas com tampa telada contendo os cadáveres das lagartas, eram retiradas do interior dos dessecadores e eram armazenadas imediatamente em freezer a -20°C de temperatura, para inativação completa do desenvolvimento do fungo.

Posteriormente, os cadáveres das lagartas eram retirados do freezer e colocados, individualmente, em tubos de cultura, com 2,5cm de diâmetro por 8 cm de altura, contendo 20 ml de água destilada esterilizada + espalhante adesivo, devidamente etiquetados. Os conídios existentes sobre cada cadáver eram retirados, com o auxílio de um pincel fino dentro do próprio tubo contendo água+espalhante adesivo, dando origem à uma suspensão de conídios que, em seguida, foi agita

da durante 60 minutos a 200 rotações por minuto.

O número de conídios por cadáver de lagarta foi obtido com o auxílio de uma câmara de Neubauer, preparando-se duas lâminas por suspensão e efetuando-se a leitura em quatro campos de 1,0000 mm² de área e 0,100 mm de profundidade por lâmina. Fêz-se a média das duas lâminas e multiplicou-se por 20 (20 ml de suspensão por tubo contendo um cadáver).

A comparação da produção de conídios de *M. anisopliae* durante os três diferentes períodos de tempo (12, 24 e 48 horas) foi realizada, para os três isolados, fixando-se a umidade relativa do ar em 90% para as quatro temperaturas e fixando-se a temperatura em 26±0,2 °C para as quatro umidades relativas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. As combinações dos fatores estudados (temperatura, umidade e isolado), num total de 48 tratamentos, foram submetidas ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A transformação utilizada para a análise de variância foi $\sqrt{x + 0,5}$.

Devido ao interesse nas interações duplas, os desdobramentos destas foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, tendo-se fixado o tempo de 48 horas, devido ao fato deste ser um tempo suficiente para que ocorra alta produção de conídios e onde os efeitos, benéficos ou prejudiciais, das diferentes temperaturas e umidades são bastante nítidos.

3.2.7. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE CONÍDIOS DE *M. anisopliae* PRODUZIDOS SOBRE CADÁVERES DE LAGARTAS DE *D. saccharalis* SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR

Com o objetivo de determinar a viabilidade de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* produzidos sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis*, também obtidos conforme descrição anterior (item 3.2.4.), submeteu-se os mesmos a 16 condições climáticas diferentes (temperaturas de $22 \pm 0,2$; $26 \pm 0,2$; $30 \pm 0,2$ e $34 \pm 0,2$ °C associadas a umidades relativas do ar de 30, 50, 70 e 90%) durante cinco diferentes períodos de tempo (12, 24, 48, 72 e 96 horas).

Após cada período de tempo, as caixas plásticas com tampa telada contendo os cadáveres das lagartas, eram retiradas do interior dos dessecadores e cada um desses cadáveres era esfregado levemente, com auxílio de uma pinça, em 0,1 ml de água sem espalhante adesivo sobre a superfície do meio de cultura + antibiótico em placa de Petri dando origem a uma pequena suspensão de conídios que foi espalhada na placa com o auxílio de uma alça de Drigallsky. Essas placas foram incubadas a $26 \pm 0,2$ °C de temperatura com fotofase de 16 horas. Após 24 horas, fez-se a leitura direta no microscópio ótico, do número de conídios germinados, contando-se um total de 100 conídios por repetição de cada tratamento. Para serem

considerados germinados, os conídios deviam apresentar o tubo germinativo, pelo menos, com o mesmo comprimento do conídio.

A comparação da viabilidade dos conídios de *M. anisopliae* durante os cinco diferentes períodos de tempo (12, 24, 48, 72 e 96 horas) foi realizada, para os três isolados, fixando-se a umidade relativa do ar em 90% para as quatro temperaturas e fixando-se a temperatura em $26 \pm 0,2$ °C para as quatro umidades relativas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. As combinações dos fatores estudados (temperatura, umidade e isolado), num total de 48 tratamentos, foram submetidas ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Devido ao interesse nas interações duplas, os desdobramentos destas foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, tendo-se fixado o tempo de 96 horas, devido ao fato deste ser um tempo suficiente para que os efeitos, benéficos ou prejudiciais, das diferentes temperaturas e umidades sobre a viabilidade dos conídios sejam mais perceptíveis e acentuados.

3.2.8. UTILIZAÇÃO DE *M. anisopliae* COM BASE EM CLIMOGRAMAS

Dados mensais da temperatura média e umidade

relativa do ar média, referentes a 30 anos de observação (1931 a 1960), foram obtidos através de dados e publicações existentes nos arquivos da Seção de Climatologia Agrícola do Instituto Agrônomo de Campinas (BRASIL, 1969 a; BRASIL, 1969b; BRASIL, 1969 c; BRASIL, 1969 d e SÃO PAULO, 1986). A partir desses dados, construíram-se termohigrogramas colocando-se nas abscissas os dados mensais de umidade da região em estudo e nas ordenadas os dados mensais de temperatura da mesma região e a seguir uniram-se, em ordem crescente, os doze pontos referentes aos doze meses do ano, formando um polígono próprio de cada região (SILVEIRA NETO *et alii*, 1976).

Após a construção de vários climogramas, cada um referente à uma região em estudo, os mesmos foram correlacionados com os isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae*, traçando-se sobre o gráfico os pontos de temperatura e umidade relativa do ar que delimitam as condições favoráveis que atendem às exigências térmicas e hídricas, para a manutenção da viabilidade dos conídios próxima a 100% e para uma alta produção de conídios.

Esses pontos que delimitam tais condições foram obtidos através de análises estatísticas realizadas, conforme os itens 3.2.6. e 3.2.7.

Com base nesses conhecimentos, foi possível de terminar a partir de que mês e até quando se pode aplicar o fungo *M. anisopliae* sobre a praga visada em diferentes regiões do Brasil, estimando-se que no período favorável exista maior

possibilidade de ocorrência de epizootias, obtendo-se um controle mais efetivo da praga. Isto foi demonstrado através de climogramas para três regiões, com características climáticas diferentes (Belém-PA, Quixadá-CE e Cuiabá-MT). As épocas favoráveis e desfavoráveis das demais regiões foram apresentadas em forma de figura .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. POTENCIAL DE INÓCULO DOS ISOLADOS DE *M. anisopliae*

Na Tabela 4 consta o número de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 que efetivamente entrou em contato com o tegumento das lagartas de *D. saccharalis*, logo após a imersão das mesmas na suspensão fúngica contendo $5,4 \times 10^7$ conídios/ml, onde se verifica que as quantidades de conídios obtidas foram bem próximas, não havendo diferença estatística segundo o teste F e de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, o que pode ser considerado como um bom resultado, já que aumenta a confiabilidade dos dados de produção de conídios dos três isolados obtidos nas diferentes temperaturas e umidades relativas, devido a esta confirmação de que cada lagarta ao ser inoculada, recebeu aproximadamente o mesmo número de conídios.

Tabela 4. Quantidade de conídios dos três isolados de *M. anisopliae* encontrada no tegumento de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* após imersão na suspensão fúngica com - tendo $5,4 \times 10^7$ conídios/ml.

Isolado	Quantidade de conídios encontrada/lagarta	Tukey 5% ^{1/}
E ₉	$3,675 \times 10^5$	a
PL-27	$3,765 \times 10^5$	a
PL-43	$4,080 \times 10^5$	a
Média	$3,840 \times 10^5$	

^{1/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Teste F entre tratamentos: F = 0,20^{ns}

C.V.(%) = 39,4297

4.2. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CONÍDIOS DE *M. anisopliae* SOBRE CADÁVERES DE LAGARTAS DE *D. saccharalis* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR

O aspecto do desenvolvimento dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* incubados a $26 \pm 0,2$ °C de temperatura e 90% de umidade relativa do ar durante 12, 24 e 48 horas, pode ser observado através das figuras 3, 4 e 5, respectivamente. Após 12 horas de incubação, observa-se que o micélio encontra-se completamente desenvolvido (coloração branca), mas com uma baixa produção de conídios (pigmentação verde clara). Após 24 horas, percebe-se um aumento na produção de conídios, principalmente nos isolados PL-27 e PL-43. Depois de 48 horas de incubação, ocorreu uma alta produção de conídios, para os três isolados testados, o que proporcionou a cobertura total do corpo das lagartas (coloração verde-escura).

Figura 3. Desenvolvimento dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 12 horas a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ de temperatura e 90% de umidade relativa do ar.

Figura 4. Desenvolvimento dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 24 horas a $26 \pm 0,2^\circ\text{C}$ de temperatura e 90% de umidade relativa do ar.

Figura 5. Desenvolvimento dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 48 horas a $26 \pm 0,2$ °C de temperatura e 90% de umidade relativa do ar.

Os dados da produção de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* submetidos durante 12, 24 e 48 horas a temperaturas de $22 \pm 0,2$, $26 \pm 0,2$, $30 \pm 0,2$ e $34 \pm 0,2$ °C na umidade relativa do ar de 90%, encontram-se na Tabela 5 e a representação gráfica para o isolado E₉ pode ser observada na Figura 6.

Pode-se observar que, com o passar do tempo, a produção de conídios dos três isolados aumentou nas temperaturas de $22 \pm 0,2$, $26 \pm 0,2$ e $30 \pm 0,2$ °C, ocorrendo uma estabilização dessa produção apenas na temperatura de $34 \pm 0,2$ °C que foi bastante inferior às produções obtidas nas demais temperaturas.

Observa-se que somente após 48 horas os efeitos benéficos ou prejudiciais das diferentes temperaturas testadas sobre a produção de conídios, na umidade relativa de 90%, se mostraram bastante pronunciados, verificando-se o mesmo comportamento para os três isolados, sendo $26 \pm 0,2$ °C a temperatura mais favorável à produção de conídios seguida das temperaturas de $22 \pm 0,2$, $30 \pm 0,2$ e $34 \pm 0,2$ °C.

Tabela 5. Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* em diferentes períodos de tempo e temperaturas, na unidade relativa do ar de 90%

Temperatura (°C)	Média do nº de conídios x 10 ⁶ por lagarta							
	12 horas		24 horas		48 horas			
	E ₉	PL-27	PL-43	E ₉	PL-27	PL-43	E ₉	PL-27
22±0,2	2,07	13,25	4,72	15,30	37,81	15,19	66,41	67,34
								78,18
26±0,2	0,76	10,08	3,40	13,93	26,50	61,69	165,76	70,63
								94,12
30±0,2	12,08	0,53	2,52	32,69	2,29	22,12	30,12	52,44
								71,55
34±0,2	1,71	0,31	0,10	1,92	0,46	1,64	1,91	0,38
								1,31

Figura 6. Produção de conídios do isolado E₉ de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* em diferentes períodos de tempo e temperaturas, na umidade relativa do ar de 90%.

Na Tabela 6, pode-se verificar o efeito das umidades relativas testadas (30, 50, 70 e 90%) sobre a produção de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* em cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis*, na temperatura de $26 \pm 0,2^\circ\text{C}$ durante diferentes períodos de tempo.

Tabela 6. Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* em diferentes períodos de tempo e unidades relativas do ar, na temperatura de $26 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Unidade Relativa do ar (%)	Média do nº de conídios x 10 ⁶ por lagarta								
	12 horas			24 horas			48 horas		
	E ₉	PL-27	PL-43	E ₉	PL-27	PL-43	E ₉	PL-27	PL-43
30	5,97	4,64	4,00	21,63	9,09	9,35	22,42	6,87	3,81
50	8,29	17,00	1,79	3,18	4,50	6,69	22,93	40,65	0,79
70,	6,16	10,86	0,50	13,62	36,31	14,06	130,23	59,20	35,38
90	0,76	10,08	3,40	13,93	26,50	61,69	165,76	70,63	94,12

Observa-se que a produção de conídios dos três isolados também aumentou com o passar do tempo, quando os cadáveres das lagartas estavam expostos a umidades de 70 e 90%, e nas umidades relativas mais baixas, 30 e 50%, ocorreu uma certa irregularidade nessa produção, tendo-se obtido produções inferiores às obtidas nas umidades mais elevadas. Isto pode ser melhor visualizado na Figura 7, tomando-se o isolado E₉ como exemplo.

Figura 7. Produção de conídios do isolado E₉ de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* em diferentes períodos de tempo e umidades relativas do ar, na temperatura de $26 \pm 0,2^\circ \text{C}$.

Pode-se verificar que após o tempo de 48 horas,

a influência das diferentes umidades sobre a produção de conídios é mais nítida, proporcionando uma separação das umidades favoráveis (90 e 70%) e das umidades desfavoráveis (50 e 30%) para a produção de conídios na temperatura de $26 \pm 0,2$ °C.

A comparação dos valores médios do número de conídios dos três isolados, produzidos sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 48 horas em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, encontra-se na Tabela 7.

Os resultados de produção de conídios (Tabela 7) evidenciaram que tanto a temperatura como a umidade relativa do ar influenciam no comportamento dos isolados testados, e que esses dois fatores abióticos estão intimamente ligados. Observa-se que, de um modo geral, os três isolados apresentam uma tendência de diminuir a produção quando a temperatura é igual ou superior a $30 \pm 0,2$ °C, principalmente em umidades relativas inferiores a 90%.

Procurou-se observar na Tabela 7, as combinações de temperatura e umidade relativa que proporcionaram altas produções de conídios para os três isolados ao mesmo tempo. Isso é importante para se determinar as melhores condições à conidiogênese, evitando-se basear somente no comportamento de um isolado.

As produções de conídios observadas nos tratamentos com número de ordem 1 e 2 ($165,768912 \times 10^6$ conídios /lagarta e $130,231210 \times 10^6$ conídios/lagarta, respectivamente) po

Tabela 7. Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis*, em diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar, após 48 horas.

Número de ordem	Tratamento			Média do número de conídios x 10 ⁴ por lagarta		Tukey 5%
	Isolado	Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)	Transformada ^{1/}	Original	
1	E ₃	26 ± 0,2	90	12,894530	165,768912	a
2	E ₃	26 ± 0,2	70	11,433775	130,231210	ab
3	PL-43	26 ± 0,2	90	9,727692	94,127985	abc
4	PL-43	22 ± 0,2	90	8,870273	78,181737	abcd
5	E ₃	22 ± 0,2	50	8,530979	72,277605	abcde
6	PL-43	30 ± 0,2	90	8,488729	71,558528	abcdef
7	PL-27	26 ± 0,2	90	8,433969	70,631841	abcdef
8	PL-27	22 ± 0,2	90	8,236576	67,341186	abcdefg
9	E ₃	22 ± 0,2	90	8,180133	66,414574	abcdefgh
10	E ₃	30 ± 0,2	50	8,179770	66,408645	abcdefgh
11	PL-27	22 ± 0,2	50	7,954324	62,771267	abcdefghi
12	PL-27	22 ± 0,2	70	7,773982	59,934797	abcdefghij
13	PL-27	26 ± 0,2	70	7,726591	59,200210	abcdefghij
14	PL-43	22 ± 0,2	70	7,465713	55,236864	abcdefghijk
15	PL-27	30 ± 0,2	90	7,276207	52,443188	abcdefghijkl
16	PL-27	22 ± 0,2	30	7,004520	48,563300	abcdefghijklm
17	E ₃	30 ± 0,2	70	6,560786	42,543910	bcdefghijklm
18	PL-27	26 ± 0,2	50	6,415564	40,659456	bcdefghijklm
19	PL-43	26 ± 0,2	70	5,990396	35,384845	bcdefghijklm
20	E ₃	22 ± 0,2	70	5,647305	31,392059	bcdefghijklm
21	E ₃	30 ± 0,2	90	5,533782	30,122738	bcdefghijklm
22	E ₃	26 ± 0,2	50	4,841356	22,938731	cdefghijklm
23	E ₃	26 ± 0,2	30	4,788189	22,426753	cdefghijklm
24	E ₃	22 ± 0,2	30	4,377945	18,666406	cdefghijklm
25	PL-43	22 ± 0,2	30	4,351995	18,439856	cdefghijklm
26	PL-43	30 ± 0,2	70	4,281402	17,830400	cdefghijklm
27	PL-27	30 ± 0,2	50	4,278512	17,805669	cdefghijklm
28	PL-27	30 ± 0,2	70	4,207481	17,202900	cdefghijklm
29	PL-43	22 ± 0,2	50	3,895605	14,675741	cdefghijklm
30	PL-43	26 ± 0,2	30	3,810780	14,022041	cdefghijklm
31	E ₃	34 ± 0,2	70	3,405403	11,096767	defghijklm
32	E ₃	30 ± 0,2	30	3,206535	9,781864	defghijklm
33	PL-43	30 ± 0,2	30	2,889180	7,847364	defghijklm
34	PL-27	26 ± 0,2	30	2,716057	6,876963	efghijklm
35	PL-43	34 ± 0,2	70	2,385290	5,189608	fghijklm
36	PL-27	30 ± 0,2	30	2,160953	4,169716	ghijklm
37	E ₃	34 ± 0,2	30	2,103427	3,924405	hijklm
38	PL-43	34 ± 0,2	30	1,856315	2,945905	ijklm
39	PL-43	34 ± 0,2	50	1,723983	2,472116	ijklm
40	E ₃	34 ± 0,2	90	1,552706	1,910894	klm
41	E ₃	34 ± 0,2	50	1,383616	1,414393	klm
42	PL-43	34 ± 0,2	90	1,346775	1,313803	lm
43	PL-43	30 ± 0,2	50	1,247635	1,056592	lm
44	PL-43	26 ± 0,2	50	1,137624	0,794188	m
45	PL-27	34 ± 0,2	30	1,043875	0,589676	m
46	PL-27	34 ± 0,2	90	0,942522	0,388348	m
47	PL-27	34 ± 0,2	50	0,928237	0,361624	m
48	PL-27	34 ± 0,2	70	0,891608	0,294965	m

^{1/} Médias transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$

^{2/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Teste F entre tratamentos: F = 8,4323 **. C.V. (%) = 42,6478

dem ser consideradas como excelentes, e por essa razão considerou-se como tratamentos que apresentaram alta produção de conídios até o de número 30 ($14,022041 \times 10^6$ /lagarta sendo o último com a letra c).

Pode-se verificar que as produções de conídios mais elevadas dos três isolados foram obtidas em temperaturas como: $26 \pm 0,2$ °C associada às umidades relativas de 90 e 70%; $22 \pm 0,2$ °C associada às umidades relativas de 90, 70, 50 e 30%; e $30 \pm 0,2$ °C associada às umidades relativas de 90 e 70%.

Os três isolados se mostraram bastante sensíveis à alta temperatura como $34 \pm 0,2$ °C, porém o isolado PL-27 foi o que apresentou as menores produções de conídios nessa temperatura, nas quatro umidades relativas testadas.

Através da Tabela 8, pode-se observar o efeito das diferentes umidades relativas sobre a produção de conídios dos três isolados incubados na temperatura de $34 \pm 0,2$ °C, onde se constatou que essa temperatura praticamente inibe o efeito positivo das altas umidades (90 e 70%) sobre a conidogênese, obtendo-se baixas produções de conídios dos três isolados nas quatro umidades relativas. Este resultado coincide com o obtido por VILLACORTA (1978), onde relata que o fungo *M. anisopliae* tem o seu desenvolvimento prejudicado em temperaturas acima de 30°C. Na Tabela 8, verifica-se que o isolado PL-27 foi o que apresentou os menores índices de produção de conídios em todas as umidades relativas, demonstrando ser o mais sensível à temperatura de $34 \pm 0,2$ °C.

Tabela 8. Produção de conídios dos três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* em diferentes condições de umidade relativa do ar, na temperatura de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 48 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média do número de conídios $\times 10^6$ por lagarta		Tukey 5% ^{2/}
	Isolado	Umidade relativa do ar (%)	Transformada ^{1/}	Original	
1	E ₉	70	3,405403	11,096767	a
2	PL-43	70	2,385290	5,189608	ab
3	E ₉	30	2,103427	3,924405	ab
4	PL-43	30	1,856315	2,945905	ab
5	PL-43	50	1,723983	2,472116	ab
6	E ₉	90	1,552706	1,910894	ab
7	E ₉	50	1,383616	1,414393	ab
8	PL-43	90	1,346775	1,313803	ab
9	PL-27	30	1,043875	0,589676	b
10	PL-27	90	0,942522	0,388348	b
11	PL-27	50	0,928237	0,361624	b
12	PL-27	70	0,891608	0,294965	b

^{1/} Médias transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$

^{2/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 9, pode-se constatar que a temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ também provoca uma certa inibição da influência das diferentes umidades relativas sobre a conidiogênese, mas assim mesmo, observa-se que as umidades mais elevadas (70 e 90%) favorecem a produção de conídios dos isolados E_9 , PL-27 e PL-43 sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* e que as umidades mais baixas (30 e 50%) proporcionaram menores produções, exceto para o isolado E_9 a 50% de umidade relativa.

Com relação aos dados da produção de conídios sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, pode-se constatar através da Tabela 10, que nessa temperatura é onde se evidencia mais nitidamente o efeito das diferentes umidades relativas, sendo portanto a temperatura mais apropriada para ser utilizada em trabalhos de pesquisa que procurem verificar a influência de diferentes umidades relativas sobre a conidiogênese do fungo *M. anisopliae*. Observa-se também que a umidade mais favorável para a produção de conídios dos isolados E_9 , PL-27 e PL-43 foi a de 90% seguida de 70%. A 50% e 30% de umidade relativa a produção decresce bastante. Esses resultados coincidem com os obtidos por SCHAERFFENBERG (1964), por FERRON (1978) e por RAMOSKA (1984), os quais relatam que altas umidades são necessárias na fase de reprodução do fungo *M. anisopliae*.

O aspecto do desenvolvimento do isolado E_9 de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 48 horas na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e em dife

Tabela 9. Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *P. saccharalis* em diferentes condições de umidade relativa do ar, na temperatura de 30±0,2°C, após 48 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média do número de conídios x 10 ⁶ por lagarta		Tukey 5% ^{2/}
	Isolado	Umidade relativa do ar (%)	Transformada ^{1/}	Original	
1	PL-43	90	8,488729	71,558528	a
2	E ₉	50	8,179770	66,408645	ab
3	PL-27	90	7,276207	52,443188	abc
4	E ₉	70	6,560786	42,543910	abcd
5	E ₉	90	5,533782	30,122738	abcd
6	PL-43	70	4,281402	17,830400	abcd
7	PL-27	50	4,278512	17,805669	abcd
8	PL-27	70	4,207481	17,202900	abcd
9	E ₉	30	3,206535	9,781864	abcd
10	PL-43	30	2,889180	7,847364	bcd
11	PL-27	30	2,160953	4,169716	cd
12	PL-43	50	1,247635	1,056592	d

^{1/} Médias transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$

^{2/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10. Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* em diferentes condições de umidade relativa do ar, na temperatura de 26±0,2°C, após 48 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média do número de conídios x 10 ⁶ por lagarta		Tukey 5% ^{2/}
	Isolado	Umidade relativa do ar (%)	Transformada ^{1/}	Original	
1	E ₉	90	12,894530	165,768912	a
2	E ₉	70	11,433775	130,231210	ab
3	PL-43	90	9,727692	94,127385	abc
4	PL-27	90	8,433969	70,631841	abcd
5	PL-27	70	7,726591	59,200210	abcde
6	PL-27	50	6,415564	40,659456	bcde
7	PL-43	70	5,990396	35,384845	cdef
8	E ₉	50	4,841356	22,938731	cdef
9	E ₉	30	4,788189	22,426753	cdef
10	PL-43	30	3,810780	14,022041	def
11	PL-27	30	2,716057	6,876963	ef
12	PL-43	50	1,137624	0,794188	f

^{1/} Médias transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$

^{2/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

rentes umidades relativas, pode ser visto na Figura 8, onde se observa perfeitamente que, a medida que a umidade relativa se eleva, a produção de conídios também aumenta.

Figura 8. Desenvolvimento do isolado E₉ de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 48 horas na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em diferentes umidades relativas do ar.

Os dados referentes à produção de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados em diferentes umidades relativas na temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ encontram-se na Tabela 11. Observa-se que não houve diferença significativa entre as médias, através

Tabela 11. Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* em diferentes condições de umidade relativa do ar, na temperatura de $22 \pm 0,2^\circ\text{C}$, após 48 horas.

Número de ordem	Tratamento		Umidade relativa do ar (%)	Média do número de conídios $\times 10^6$ por lagarta		Tukey 5% ^{2/}
	Isolado			Transformada ^{1/}	Original	
1	PL-43		90	8,870273	78,181737	a
2	E _a		50	8,530979	72,277605	a
3	PL-27		90	8,236576	67,341186	a
4	E _g		90	8,180133	66,414574	a
5	PL-27		50	7,954324	62,771267	a
6	PL-27		70	7,773982	59,934797	a
7	PL-43		70	7,465713	55,236864	a
8	PL-27		30	7,004520	48,563300	a
9	E _g		70	5,647305	31,392059	a
10	E _g		30	4,377945	18,666406	a
11	PL-43		30	4,351995	18,439856	a
12	PL-43		50	3,895605	14,675741	a

^{1/} Médias transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$

^{2/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, e que todas as condições climáticas proporcionaram alta produção de conídios (acima de $14,022041 \times 10^6$ conídios/lagarta) nos três isolados de *M. anisopliae*. Mas pode-se perceber uma leve tendência da produção de conídios diminuir, a medida que a umidade relativa decresce. O fato de não ter havido diferença estatística entre as produções de conídios nas diferentes umidades, talvez possa ser atribuído ao efeito da temperatura de $22 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Essa temperatura pode amenizar o efeito prejudicial das baixas umidades relativas. Temperaturas iguais ou superiores a $26 \pm 0,2^\circ\text{C}$ parecem provocar uma desidratação do micélio, impedindo a formação dos conidióforos e dos conídios. Fica evidenciado, portanto, que a influência das diferentes umidades relativas do ar sobre a produção de conídios dos isolados, E₉, PL-27 e PL-43 é dependente da temperatura ambiente.

As médias da produção de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 sobre cadáveres de *D. saccharalis* incubados em diferentes temperaturas na umidade relativa constante de 90% encontram-se na Tabela 12, onde se verifica que a temperatura de $26 \pm 0,2^\circ\text{C}$ foi a mais favorável à conidiogênese de todos os isolados (E₉ = $165,768912 \times 10^6$ conídios/lagarta, PL-43 = $94,127985 \times 10^6$ conídios/lagarta, PL-27 = $70,631841 \times 10^6$ conídios/lagarta), porém suas médias não diferiram significativamente das médias obtidas pelos três isolados na temperatura de $22 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Tabela 12. Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* em diferentes condições de temperatura, na unidade relativa do ar de 90%, após 48 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média do número de conídios x 10 ⁶ por lagarta		Tukey 5% ^{2/}
	Isolado	Temperatura (°C)	Transformada ^{1/}	Original	
1	E _a	26 ± 0,2	12,894530	165,768912	a
2	PL-43	26 ± 0,2	9,727692	94,127985	ab
3	PL-43	22 ± 0,2	8,870273	78,181737	ab
4	PL-43	30 ± 0,2	8,488729	71,558528	ab
5	PL-27	26 ± 0,2	8,433969	70,631841	ab
6	PL-27	22 ± 0,2	8,236576	67,341186	ab
7	E _g	22 ± 0,2	8,180133	66,414574	ab
8	PL-27	30 ± 0,2	7,276207	52,443188	b
9	E _a	30 ± 0,2	5,533782	30,122738	bc
10	E _a	34 ± 0,2	1,552706	1,910894	c
11	PL-43	34 ± 0,2	1,346775	1,313803	c
12	PL-27	34 ± 0,2	0,942522	0,388348	c

^{1/} Médias transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$.

^{2/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, as médias de produção de conídios também foram elevadas, sendo que apenas os isolados PL-27 e E₉ tiveram suas produções diferentes das observadas no isolado E₉ a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, que pode ser considerada excelente. A temperatura de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ foi prejudicial à uma alta produção de conídios.

Todos os resultados obtidos na umidade relativa de 90% coincidem com os do trabalho de BASTOS e MATTA (1976), onde relatam que o ponto ótimo de temperatura para a conidiogênese foi de 25°C , o mínimo em torno de 20°C e o máximo de 30°C , e também com a recomendação técnica de MARQUES *et alii* (1981), os quais indicam a temperatura de 26°C como a mais favorável para o crescimento e conidiogênese do fungo *M.anisopliae*.

Através da Figura 9, pode-se observar o aspecto da produção de conídios do isolado E₉ sobre cadáveres de broca-da-cana-de-açúcar incubados por 48 horas na umidade relativa de 90% em diferentes temperaturas, onde percebe-se uma intensa conidiogênese a $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (verde escuro) e a $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Na temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ a cobertura do corpo da lagarta não foi total (verde claro) e a $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ não se detecta, através de uma observação convencional a ocorrência de conidiogênese, a qual pôde ser quantificada na câmara de Neubauer, após a lavagem das lagartas.

Verifica-se que a umidade relativa de 90% pode ser indicada para ser fixada em testes onde se procura determinar somente o efeito de diferentes temperaturas sobre a produ

dução de conídios de isolados de *M. anisopliae*.

Figura 9. Desenvolvimento do isolado E₉ de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 48 horas na umidade relativa do ar de 90%, em diferentes temperaturas.

A produção de conídios dos isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 48 horas em diferentes temperaturas e na umidade relativa do ar de 70% encontram-se na Tabela 13, onde se percebe uma certa tendência da produção de conídios ser mais elevada nas

temperaturas de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e menor nas temperaturas mais altas como $30 \pm 0,2$ e principalmente $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, nos três isolados, porém essa tendência não é tão nítida como a que ocorre na umidade de 90%.

Na umidade relativa do ar de 50%, a influência das diferentes temperaturas sobre a produção de conídios já começa a ser prejudicada pela baixa umidade relativa, pois conforme pode ser observado na Tabela 14, não ocorreu grandes diferenças, ao nível de 5% de significância, entre os tratamentos. Assim, a produção do isolado PL-43 na temperatura de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ foi superior às obtidas pelo mesmo isolado nas temperaturas de $30 \pm 0,2$ e $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. A temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ foi a que proporcionou maior produção de conídios dos três isolados, talvez devido ao fato dessa temperatura amenizar o efeito prejudicial da umidade relativa de 50%, não permitindo uma desidratação rápida do micélio, a qual afetaria diretamente a conidiogênese. Dessa maneira, pode-se inferir que não é somente a temperatura ou somente a umidade relativa que vão influenciar na conidiogênese, e sim a combinação desses dois fatores.

Através da Tabela 15, pode-se constatar que a umidade relativa do ar de 30% causou inibição da influência das diferentes temperaturas sobre a produção de conídios. Apenas na temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ o isolado PL-27 apresentou média mais elevada, a qual foi diferente ao nível de 5% de significância, das médias dos tratamentos com o número de ordem 8

Tabela 13 . Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de *P. saccharalis* em diferentes condições de temperatura, na umidade relativa do ar de 70%, após 48 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média do número de conídios x 10 ⁶ por lagarta		Tukey 5% ^{2/}
	Isolado	Temperatura (°C)	Transformada ^{1/}	Original	
1	E ₉	26 ± 0,2	11,433775	130,231210	a
2	PL-27	22 ± 0,2	7,773982	59,934797	ab
3	PL-27	26 ± 0,2	7,726591	59,200210	ab
4	PL-43	22 ± 0,2	7,465713	55,236864	ab
5	E ₉	30 ± 0,2	6,560786	42,543910	abc
6	PL-43	26 ± 0,2	5,990396	35,384845	abc
7	E ₉	22 ± 0,2	5,647305	31,392059	bc
8	PL-43	30 ± 0,2	4,281402	17,830400	bc
9	PL-27	30 ± 0,2	4,207481	17,202900	bc
10	E ₉	34 ± 0,2	3,405403	11,096767	bc
11	PL-43	34 ± 0,2	2,385290	5,189608	bc
12	PL-27	34 ± 0,2	0,891608	0,294965	c

^{1/} Médias transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$

^{2/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 14. Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* em diferentes condições de temperatura, na unidade relativa do ar de 50%, após 48 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média do número de conídios x 10 ⁶ por lagarta		Tukey 5% ^{2/}
	Isolado	Temperatura (°C)	Transformada ^{1/}	Original	
1	E ₉	22 ± 0,2	8,530979	72,277605	a
2	E ₉	30 ± 0,2	8,179770	66,408645	a
3	PL-27	22 ± 0,2	7,954324	62,771267	a
4	PL-27	26 ± 0,2	6,415564	40,659456	ab
5	E ₉	26 ± 0,2	4,841356	22,938731	ab
6	PL-27	30 ± 0,2	4,278512	17,805669	ab
7	PL-43	22 ± 0,2	3,895605	14,675741	ab
8	PL-43	34 ± 0,2	1,723983	2,472116	b
9	E ₉	34 ± 0,2	1,383616	1,414393	b
10	PL-43	30 ± 0,2	1,247635	1,056592	b
11	PL-43	26 ± 0,2	1,137624	0,794188	b
12	PL-27	34 ± 0,2	0,928237	0,361624	b

^{1/} Médias transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$.

^{2/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 15 . Produção de conídios de três isolados de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* em diferentes condições de temperatura, na umidade relativa do ar de 30%, após 48 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média do número de conídios x 10 ⁶ por lagarta		Tukey 5% ^{2/}
	Isolado	Temperatura (°C)	Transformada ^{1/}	Original	
1	PL-27	22 ± 0,2	7,004520	48,563300	a
2	E ₉	26 ± 0,2	4,788189	22,426753	ab
3	E ₉	22 ± 0,2	4,377945	18,666406	ab
4	PL-43	22 ± 0,2	4,351995	18,439856	ab
5	PL-43	26 ± 0,2	3,810780	14,022041	ab
6	E ₉	30 ± 0,2	3,206535	9,781864	ab
7	PL-43	30 ± 0,2	2,889180	7,847364	ab
8	PL-27	26 ± 0,2	2,716057	6,876963	b
9	PL-27	30 ± 0,2	2,160953	4,169716	b
10	E ₉	34 ± 0,2	2,103427	3,924405	b
11	PL-43	34 ± 0,2	1,856315	2,945905	b
12	PL-27	34 ± 0,2	1,043875	0,589676	b

^{1/} Médias transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$.

^{2/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

a 12. A umidade relativa de 30% pode provocar uma perda de água do micélio, ressecando-o e fazendo com que o número de conídios seja reduzido. Percebe-se que a temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ na umidade relativa de 30% foi a mais favorável para a conidiogênese e que a temperatura de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ foi a mais prejudicial, pois se associou alta temperatura com baixa umidade relativa. Esta associação proporcionou a condição mais desfavorável ao patógeno na presente pesquisa.

4.3. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DOS CONÍDIOS DE *M. anisopliae* PRODUZIDOS SOBRE CADÁVERES DE LAGARTAS DE *D. saccharalis* SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR

Os dados referentes à viabilidade dos conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* produzidos sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* submetidos a diferentes períodos de tempo e a diferentes temperaturas na umidade relativa do ar constante de 90%, encontram-se na Tabela 16.

Pode-se verificar que após 96 horas (Tabela 16) houve um pequeno decréscimo na viabilidade dos conídios submetidos às temperaturas de $22 \pm 0,2$, $30 \pm 0,2$ e $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, porém mantiveram-se próximas de 100%. Isto pode ser atribuído à umidade relativa de 90%, que não permitiu que houvesse um resse-

Tabela 16. Viabilidade dos conídios de três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* submetidos a diferentes períodos de tempo e temperaturas, na umidade relativa do ar de 90%.

Temperatura (°C)	Média da viabilidade dos conídios (%)											
	12 horas			24 horas			48 horas			72 horas		
	E ₉	PL-27	PL-43	E ₉	PL-27	PL-43	E ₉	PL-27	PL-43	E ₉	PL-27	PL-43
22 ± 0,2	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	92,50
26 ± 0,2	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
30 ± 0,2	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	97,50	100,00	100,00	96,25	98,75
34 ± 0,2	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	92,50	95,00

camento dos conídios, o que poderia prejudicar a germinação , até mesmo na temperatura de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Estes resultados coincidem com os obtidos por MacLeod *et alii*, citados por BELL (1974), onde mencionam que os conídios possuem uma delicada membrana externa podendo perder ou ganhar água rapidamente, de acordo com a umidade do ar, sendo que em atmosferas insaturadas perdem facilmente a viabilidade. Pôde-se constatar que a umidade relativa de 90% não permitiu que a viabilidade dos conídios dos três isolados sofresse uma queda mais brusca nas diferentes temperaturas com o passar do tempo, o que não possibilitou a visualização nítida do tempo de incubação dos cadáveres de lagartas, mais adequado para se determinar a influência das temperaturas testadas, sobre a viabilidade dos conídios produzidos nos diferentes períodos de tempo testados.

Ao se verificar a influência das diferentes umidades relativas sobre a viabilidade dos conídios, em diferentes períodos de tempo, na temperatura constante de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, pôde-se determinar conforme consta na Tabela 17, o tempo de incubação suficiente para que esses efeitos fossem bastante perceptíveis. Observa-se por essa tabela, que após 48 horas de incubação a viabilidade continua elevada nos três isolados, não sendo possível diferenciar a(s) temperatura(s) mais adequada(s) para a manutenção da viabilidade das temperaturas desfavoráveis. Após 72 horas já se conseguiu visualizar esses efeitos, mas quando se testou a viabilidade desses conídios produzidos e incubados nas diferentes umidades durante 96 horas,

[illegible]

verificou-se que este é o tempo ideal para essa diferenciação. Assim, constatou-se que: as umidades relativas de 90 e 70%, quando associadas à temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, são altamente favoráveis para a manutenção da viabilidade; que na umidade de 50% os conídios dos três isolados sofrem uma perda considerável dessa viabilidade e que a 30% os conídios quase perdem totalmente sua viabilidade.

Pode-se visualizar melhor esses efeitos através da representação gráfica para o isolado E_9 , na Figura 10.

Figura 10. Viabilidade dos conídios do isolado E_9 de *M.anisopliae* produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* incubados em diferentes umidades relativas do ar, durante diferentes períodos de tempo, na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

A comparação das médias de viabilidade dos conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43, produzidos sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 96 horas, em diferentes temperaturas e umidades relativas do ar, realizada pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, encontra-se na Tabela 18.

Os resultados evidenciam que tanto a umidade relativa do ar como a temperatura afetam a viabilidade dos conídios dos três isolados, sendo que o efeito da interação desses dois fatores é que vai permitir ou não que os conídios se mantenham viáveis. Ao se observar cada temperatura individualmente, verifica-se que a medida que a umidade relativa diminui, a viabilidade dos conídios tende a decrescer. Observa-se também que em umidades relativas iguais ou inferiores a 70%, os conídios tendem a se tornarem inviáveis a medida que a temperatura aumenta. Os tratamentos que mantiveram a viabilidade dos conídios dos três isolados, após 96 horas, iguais ou próximas de 100% foram os que apresentaram as seguintes combinações de temperatura e umidade relativa: $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ com umidades de 90, 70 e 50%; $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ com umidades de 90 e 70%; $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ com 90% de umidade relativa. As combinações de temperaturas iguais ou superiores a $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ com umidades relativas iguais ou inferiores a 50% foram altamente desfavoráveis à manutenção da viabilidade dos conídios. Resultados semelhantes foram obtidos por WALSTAD *et alii* (1970), SANTOS (1978), DAOUST e ROBERTS (1983), ALVES (1984) e ALVES e NOGUEIRA (1984).

Tabela 18. Viabilidade dos conídios de três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartos de 5º instar de *P. saccharalis* submetidos a diferentes condições de temperatura e umidade relativa do ar, após 96 horas.

Número de ordem	Tratamento			Média da viabilidade dos conídios (%)	Tukey 5% ^{1/}
	Isolado	Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)		
1	E ₁	22 ± 0,2	70	100,00	a
2	PL-27	22 ± 0,2	70	100,00	a
3	PL-43	22 ± 0,2	70	100,00	a
4	E ₁	26 ± 0,2	70	100,00	a
5	PL-27	26 ± 0,2	70	100,00	a
6	PL-43	26 ± 0,2	70	100,00	a
7	E ₁	22 ± 0,2	90	100,00	a
8	PL-27	22 ± 0,2	90	100,00	a
9	E ₁	26 ± 0,2	90	100,00	a
10	PL-27	26 ± 0,2	90	100,00	a
11	PL-43	26 ± 0,2	90	100,00	a
12	E ₁	30 ± 0,2	90	100,00	a
13	PL-27	22 ± 0,2	50	97,50	ab
14	E ₁	22 ± 0,2	50	95,00	ab
15	PL-27	30 ± 0,2	90	95,00	ab
16	E ₁	34 ± 0,2	90	95,00	ab
17	PL-43	34 ± 0,2	90	95,00	ab
18	PL-47	34 ± 0,2	90	93,75	ab
19	PL-43	22 ± 0,2	50	92,50	ab
20	PL-43	22 ± 0,2	90	92,50	ab
21	PL-27	30 ± 0,2	70	90,00	ab
22	PL-43	30 ± 0,2	90	86,25	ab
23	PL-27	34 ± 0,2	70	70,00	bc
24	E ₁	34 ± 0,2	70	51,25	cd
25	E ₁	30 ± 0,2	70	50,00	cd
26	PL-27	26 ± 0,2	50	47,50	cd
27	PL-43	30 ± 0,2	70	41,25	cde
28	PL-43	26 ± 0,2	50	40,00	de
29	E ₁	26 ± 0,2	50	32,50	def
30	PL-43	34 ± 0,2	70	26,25	defg
31	E ₁	22 ± 0,2	30	23,75	defg
32	PL-27	22 ± 0,2	30	12,50	efg
33	PL-43	22 ± 0,2	30	12,50	efg
34	PL-27	26 ± 0,2	30	7,50	fg
35	PL-43	26 ± 0,2	30	7,50	fg
36	PL-43	30 ± 0,2	50	3,75	fg
37	E ₁	26 ± 0,2	30	2,50	g
38	E ₁	30 ± 0,2	50	2,50	g
39	PL-27	30 ± 0,2	50	2,50	g
40	E ₁	30 ± 0,2	30	0,00	g
41	PL-27	30 ± 0,2	30	0,00	g
42	PL-43	30 ± 0,2	30	0,00	g
43	E ₁	34 ± 0,2	30	0,00	g
44	PL-27	34 ± 0,2	30	0,00	g
45	PL-43	34 ± 0,2	30	0,00	g
46	E ₁	34 ± 0,2	50	0,00	g
47	PL-27	34 ± 0,2	50	0,00	g
48	PL-43	34 ± 0,2	50	0,00	g

^{1/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Teste F entre tratamentos: F = 435,62**

C.V. (%) = 7,76419

Tabela 19. Viabilidade dos conídios de três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de *D. sacchalis* submetidos a diferentes umidades relativas do ar, na temperatura de 34±0,2°C, após 96 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média da viabilidade dos conídios (%)	^{1/} Tukey 5%
	Isolado	Umidade relativa do ar (%)		
1	E ₉	90	95,00	a
2	PL-43	90	95,00	a
3	PL-27	90	93,75	a
4	PL-27	70	70,00	b
5	E ₉	70	51,25	c
6	PL-43	70	26,25	d
7	E ₉	30	0,00	e
8	PL-27	30	0,00	e
9	PL-43	30	0,00	e
10	E ₉	50	0,00	e
11	PL-27	50	0,00	e
12	PL-43	50	0,00	e

^{1/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Através da Tabela 19. pode-se observar o efeito das diferentes umidades relativas sobre a viabilidade dos conídios dos três isolados, na temperatura constante de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, onde se verifica que somente na umidade relativa de 90% a viabilidade manteve-se elevada (próxima de 100%). Os conídios produzidos e expostos à umidade relativa de 70% apresentaram uma redução considerável em suas viabilidades. Isso se deve, provavelmente, à grande perda de umidade, através da delicada membrana externa dos conídios, conforme trabalho de MacLeod *et alii*, citados por BELL (1974). Nas umidades relativas de 50 e 30% a viabilidade foi zero, demonstrando o efeito prejudicial da temperatura de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ quando associada a baixas umidades.

Dessa maneira, a aplicação em campo, de qualquer um desses isolados pode ser realizada em dias com temperaturas elevadas como $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ desde que a umidade relativa seja igual ou superior a 90%, porém nos dias subsequentes a temperatura deverá diminuir para que possa ocorrer uma alta produção de conídios sobre os insetos mortos.

Pode-se verificar na Tabela 20, que na temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, apenas a umidade relativa de 90% permitiu que a viabilidade dos conídios dos três isolados se mantivesse elevada (próxima de 100%), sendo que a 70% de umidade relativa somente o isolado PL-27 apresentou os mesmos índices e os outros isolados tiveram a viabilidade de seus conídios bastante reduzida. Nas umidades relativas de 50 e 30% os conídios perderam, após 96 horas, praticamente toda a sua viabilidade. Is

Tabela 20. Viabilidade dos conídios de três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *P. saccharalis* submetidos a diferentes umidades relativas do ar, na temperatura de 30±0,2°C, após 96 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média da viabilidade dos conídios (%)	Tukey 5% ^{1/}
	Isolado	Umidade relativa do ar (%)		
1	E ₉	90	100,00	a
2	PL-27	90	95,00	ab
3	PL-27	70	90,00	ab
4	PL-43	90	86,25	b
5	E ₉	70	50,00	c
6	PL-43	70	41,25	c
7	PL-43	50	3,75	d
8	E ₉	50	2,50	d
9	PL-27	50	2,50	d
10	E ₉	30	0,00	d
11	PL-27	30	0,00	d
12	PL-43	30	0,00	d

^{1/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21. Viabilidade dos conídios de três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* submetidos a diferentes unidades relativas do ar, na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, após 96 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média da viabilidade dos conídios (%)	Tukey 5% ^{1/}
	Isolado	Umidade relativa do ar (%)		
1	E ₉	70	100,00	a
2	PL-27	70	100,00	a
3	PL-43	70	100,00	a
4	E ₉	90	100,00	a
5	PL-27	90	100,00	a
6	PL-43	90	100,00	a
7	PL-27	50	47,50	b
8	PL-43	50	40,00	bc
9	E ₉	50	32,50	c
10	PL-27	30	7,50	d
11	PL-43	30	7,50	d
12	E ₉	30	2,50	d

^{1/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

so ocorreu, provavelmente em função de uma desidratação, a qual prejudicou a viabilidade dos mesmos. Também observa-se que na temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, a medida que a umidade relativa decresce, a viabilidade dos conídios também diminui.

Constata-se através da Tabela 21, que na temperatura de $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ os efeitos das diferentes umidades relativas sobre a viabilidade dos conídios são bastante pronunciados, permitindo dizer que após 96 horas, nessas condições, as umidades de 90 e 70% são altamente favoráveis à germinação dos conídios dos três isolados testados. Na umidade relativa de 50% os conídios já perdem boa parte de sua viabilidade e a 30% os conídios tendem a perder totalmente sua capacidade de germinar. Resultados semelhantes foram obtidos por DAOUST e ROBERTS (1983), os quais ao estudarem o efeito do armazenamento prolongado de conídios do isolado E₉ de *M. anisopliae* em diferentes temperaturas e umidades relativas sobre a viabilidade e virulência desses conídios, puderam constatar que a umidade menos favorável, na faixa de 19 a 26°C , foi de 33%.

Os valores referentes às viabilidades dos conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 produzidos sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 96 horas em diferentes umidades relativas com a temperatura constante de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, encontram-se na Tabela 22. Observa-se que não houve diferença, ao nível de 5% de significância, entre as viabilidades dos conídios dos três isolados nas umidades relativas de 90, 70 e 50%, sendo que todos os valores ficaram pró-

Tabela 22. Viabilidade dos conídios de três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* submetidos a diferentes umidades relativas do ar, na temperatura de 22±0,2°C, após 96 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média da viabilidade dos conídios (%)	Tukey 5% ^{1/}
	Isolado	Umidade relativa do ar (%)		
1	E _a	70	100,00	a
2	PL-27	70	100,00	a
3	PL-43	70	100,00	a
4	E _a	90	100,00	a
5	PL-27	90	100,00	a
6	PL-27	50	97,50	a
7	E _a	50	95,00	a
8	PL-43	50	92,50	a
9	PL-43	90	92,50	a
10	E _a	30	23,75	b
11	PL-27	30	12,50	c
12	PL-43	30	12,50	c

^{1/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 23. Viabilidade dos conídios dos três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* submetidos a diferentes temperaturas, na umidade relativa do ar de 90%, após 96 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média da viabilidade dos conídios (%)	¹/ Tukey 5%
	Isolado	Temperatura (°C)		
1	E ₉	22 ± 0,2	100,00	a
2	PL-27	22 ± 0,2	100,00	a
3	E ₉	26 ± 0,2	100,00	a
4	PL-27	26 ± 0,2	100,00	a
5	PL-43	26 ± 0,2	100,00	a
6	E ₉	30 ± 0,2	100,00	a
7	PL-27	30 ± 0,2	95,00	ab
8	E ₉	34 ± 0,2	95,00	ab
9	PL-43	34 ± 0,2	95,00	ab
10	PL-27	34 ± 0,2	93,75	ab
11	PL-43	22 ± 0,2	92,50	ab
12	PL-43	30 ± 0,2	86,25	b

¹/ Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ximos de 100 %. Somente a umidade relativa de 30% foi prejudicial à manutenção da viabilidade dos conídios na temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, provavelmente devido a esta umidade ser muito baixa fazendo com que os conídios perdessem água, afetando dessa maneira a capacidade de germinar.

Através da Tabela 23, pode-se constatar que em umidades relativas como 90%, a viabilidade dos conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 permaneceu elevada após o tempo de 96 horas, independentemente da temperatura, dentro da faixa testada de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ a $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. É provável que a alta umidade não favoreça a perda de água dos conídios para o ambiente externo, o que evitaria a perda da viabilidade dos mesmos.

Os dados relativos à viabilidade dos conídios produzidos sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incbados durante 96 horas em diferentes temperaturas com a umidade relativa de 70%, encontram-se na Tabela 24. Observa-se que a viabilidade dos conídios dos três isolados foi de 100% nas temperaturas de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e que somente os conídios do isolado PL-27 na temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ mantiveram-se tão viáveis quanto os citados anteriormente.

Observa-se pela Tabela 25, que na umidade relativa de 50%, apenas a temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ permitiu que os conídios dos três isolados se mantivessem altamente viáveis (viabilidade próxima de 100%), provavelmente em função desta temperatura ter compensado o efeito desfavorável da umidade relativa de 50%, não deixando que os conídios sofressem uma per

Tabela 24. Viabilidade dos conídios de três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* submetidos a diferentes temperaturas, na unidade relativa do ar de 70%, após 96 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média da viabilidade dos conídios (%)	Tukey 5% ^{1/}
	Isolado	Temperatura (°C)		
1	E _g	22 ± 0,2	100,00	a
2	PL-27	22 ± 0,2	100,00	a
3	PL-43	22 ± 0,2	100,00	a
4	E _g	26 ± 0,2	100,00	a
5	PL-27	26 ± 0,2	100,00	a
6	PL-43	26 ± 0,2	100,00	a
7	PL-27	30 ± 0,2	90,00	a
8	PL-27	34 ± 0,2	70,00	b
9	E _g	34 ± 0,2	51,25	c
10	E _g	30 ± 0,2	50,00	c
11	PL-43	30 ± 0,2	41,25	c
12	PL-43	34 ± 0,2	26,25	d

^{1/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 25. Viabilidade dos conídios de três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º ínstar de *D. saccharalis* submetidos a diferentes temperaturas, na unidade relativa do ar de 50%, após 96 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média da viabilidade dos conídios (%)	Tukey 5% ^{1/}
	Isolado	Temperatura (°C)		
1	PL-27	22 ± 0,2	97,50	a
2	E ₉	22 ± 0,2	95,00	a
3	PL-43	22 ± 0,2	92,50	a
4	PL-27	26 ± 0,2	47,50	b
5	PL-43	26 ± 0,2	40,00	bc
6	E ₉	26 ± 0,2	32,50	c
7	PL-43	30 ± 0,2	3,75	d
8	E ₉	30 ± 0,2	2,50	d
9	PL-27	30 ± 0,2	2,50	d
10	E ₉	34 ± 0,2	0,00	d
11	PL-27	34 ± 0,2	0,00	d
12	PL-43	34 ± 0,2	0,00	d

^{1/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 26. Viabilidade dos conídios de três isolados de *M. anisopliae*, produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* submetidos a diferentes temperaturas, na umidade relativa do ar de 30%, após 96 horas.

Número de ordem	Tratamento		Média da viabilidade dos conídios (%)	Tukey 5% ^{1/}
	Isolado	Temperatura (°C)		
1	E ₉	22 ± 0,2	23,75	a
2	PL-27	22 ± 0,2	12,50	b
3	PL-43	22 ± 0,2	12,50	b
4	PL-27	26 ± 0,2	7,50	bc
5	PL-43	26 ± 0,2	7,50	bc
6	E ₉	26 ± 0,2	2,50	cd
7	E ₉	30 ± 0,2	0,00	d
8	PL-27	30 ± 0,2	0,00	d
9	PL-43	30 ± 0,2	0,00	d
10	E ₉	34 ± 0,2	0,00	d
11	PL-27	34 ± 0,2	0,00	d
12	PL-43	34 ± 0,2	0,00	d

^{1/} Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

da de água excessiva para o ambiente externo, o que não aconteceu nas demais temperaturas testadas. Nesta umidade relativa, a medida que a temperatura aumenta, a viabilidade dos conídios decresce, chegando a ser igual a zero na temperatura de $34 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Pode-se constatar através da Tabela 26, que a viabilidade dos conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 produzidos sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* incubados durante 96 horas a 30% de umidade relativa, foi bastante afetada em todas as temperaturas, pois a porcentagem máxima de viabilidade encontrada foi de 23,75% para os conídios do isolado E₉ na temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Assim a umidade relativa de 30% foi a responsável por esse resultado, provavelmente por ter provocado uma perda de água do interior dos conídios para o ambiente externo ressecando os conídios e fazendo com que os mesmos perdessem sua capacidade de germinação.

4.4. UTILIZAÇÃO DE *M. anisopliae* COM BASE EM CLIMOGRAMAS

Após a aplicação de *M. anisopliae* a nível de campo, alguns fatores não controláveis podem afetar a viabilidade e a posterior germinação dos conídios, a reprodução e a disseminação do fungo no ambiente, não permitindo a ocorrência de epizootias. Assim, há necessidade de estudos epizootiológicos visando a utilização mais racional dos patógenos em pro-

gramas de manejo integrado de pragas (TANADA, 1963; FERRON, 1978; KISH e ALLEN, 1978; FERRON, 1981; VENTURA, 1981; WEISER, 1982).

Baseando-se nos resultados de produção de conídios (Tabela 7) e nos resultados de viabilidade dos conídios (Tabela 18) dos isolados E₉, PL-27 e PL-43, pôde-se determinar quais as condições de temperatura e umidade relativa do ar que atendem às exigências térmicas e hídricas dos três isolados de *M. anisopliae* para se obter altas produções de conídios viáveis (Tabela 27). Não é vantajoso ao controle microbiano conseguir alta produção de conídios se estes perdem rapidamente a sua viabilidade. Do mesmo modo, não adianta se obter conídios altamente viáveis em uma quantidade insuficiente para a formação de focos primários da doença.

O número de conídios produzidos sobre cadáveres de lagartas de 5º instar de *D. saccharalis* considerado como mínimo, foi de $14,67 \times 10^6$ conídios por lagarta, conforme foi discutido no item 4.2. (Tabela 7). E a porcentagem de viabilidade dos conídios produzidos sobre cadáveres de 5º instar de *D. saccharalis* considerada como mínima, foi de 86,25%, conforme foi discutido no item 4.3. (Tabela 18).

Observa-se na Tabela 27, que ambientes que possuem temperaturas de: $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$; $26 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, associadas respectivamente a umidades relativas iguais ou superiores a 50,70 e 90%, são favoráveis à obtenção de uma alta produção de conídios de qualquer um dos isolados testados, que permanece

Tabela 27. Condições de temperatura e umidade relativa do ar favoráveis à uma alta produção de conídios por cadáver de lagarta de 5º ínstar de *O. saccharalis* e à manutenção de alta viabilidade dos conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae*.

Isolado	Condições favoráveis		Média do nº de conídios viáveis x 10 ⁶ por lagarta	Média do nº de conídios x 10 ⁶ por lagarta	Média da viabilidade de conídios (%)
	Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)			
E ₉	26 ± 0,2	90	165,768912	165,768912	100,00
E ₉	26 ± 0,2	70	130,231210	130,231210	100,00
PL-43	26 ± 0,2	90	94,127985	94,127985	100,00
PL-43	22 ± 0,2	90	72,318106	78,181737	92,50
PL-27	26 ± 0,2	90	70,631841	70,631841	100,00
E ₉	22 ± 0,2	50	68,663724	72,277605	95,00
PL-27	22 ± 0,2	90	67,341186	67,341186	100,00
E ₉	22 ± 0,2	90	66,414574	66,414574	100,00
PL-43	30 ± 0,2	90	61,719230	71,558528	86,25
PL-27	22 ± 0,2	50	61,201985	62,771267	97,50
PL-27	22 ± 0,2	70	59,934797	59,934797	100,00
PL-27	26 ± 0,2	70	59,200210	59,200210	100,00
PL-43	22 ± 0,2	70	55,236864	55,236864	100,00
PL-27	30 ± 0,2	90	49,821028	52,443188	95,00
PL-43	26 ± 0,2	70	35,384845	35,384845	100,00
E ₉	22 ± 0,2	70	31,392059	31,392059	100,00
E ₉	30 ± 0,2	90	30,122738	30,122738	100,00
PL-43	22 ± 0,2	50	13,575060	14,675741	92,50

rão viáveis, no mínimo, por 96 horas. Este tempo pode ser considerado como suficiente para que após uma aplicação do fungo a nível de campo, pelo menos, alguns indivíduos da população da praga entrem em contato com os conídios distribuídos, para que posteriormente ocorra a germinação desses conídios e o desenvolvimento do fungo sobre o inseto. RAMOSKA (1984) relatou que a umidade superficial do inseto é suficiente para que ocorra a germinação dos conídios e o processo de colonização do hospedeiro pelo patógeno. Após o desenvolvimento do micélio, o ambiente que possui essas condições favoráveis irá permitir que ocorra sobre o cadáver do inseto, a formação de um grande número de conídios. Esses conídios poderão permanecer viáveis por, pelo menos 96 horas, podendo serem disseminados através da praga e por outros agentes de disseminação, provocando o aparecimento de uma epizootia e proporcionando um bom controle da praga.

Pode-se também constatar entre as condições climáticas favoráveis (Tabela 27), que a umidade relativa do ar de 50% somente foi favorável quando associada à temperatura de $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Isso pode ser devido ao efeito benéfico da temperatura que amenizou o efeito prejudicial da umidade de 50%, não permitindo uma perda excessiva de água do interior dos conídios.

De outro lado, a temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ somente foi favorável quando associada à umidade relativa do ar de 90%. Isso provavelmente, pode ser devido à umidade elevada que não permitiu a dessecação dos conídios, o que já não aconteceu

para a umidade relativa do ar de 70% na temperatura de $30 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Em seguida, construiu-se vários climogramas conforme SILVEIRA NETO *et alii* (1976), com os dados de temperatura e umidade relativa do ar de diferentes regiões do Brasil (Apêndice 1) e traçou-se sobre estes gráficos, os pontos de temperatura e umidade relativa do ar que delimitam as condições favoráveis, tanto para obtenção de uma alta produção de conídios como para a manutenção da viabilidade desses conídios próxima de 100%. Assim, foi possível obter um triângulo que delimitou a zona favorável para aplicação de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae*. Dessa maneira, é provável que sob o ponto de vista ecológico, existam grandes possibilidades de desenvolvimento, adaptação, instalação e expansão deste fungo em qualquer região que possua essas condições. Esse método permite determinar com alguma base científica, a partir de que mês e até quando se pode aplicar o patógeno sobre a praga visada nas diferentes regiões.

Verifica-se através da Figura 11, que na região de Belém (PA) pode-se aplicar o fungo durante qualquer época do ano, pois se trata de uma região altamente favorável aos isolados E₉, PL-27 e PL-43, podendo inclusive ocorrer epizootias naturais.

Na Figura 12, observa-se que a região de Quixadá (CE) não oferece condições para aplicação do patógeno durante todos os meses do ano.

Figura 11. Climograma comparativo entre a região de Belém (PA) e a zona favorável à uma alta produção de conídios viáveis dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae*.

Figura 12. Climograma comparativo entre a região de Quixadá (CE) e a zona favorável à uma alta produção de conídios viáveis dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *Metarhizium anisopliae*.

Através da Figura 13, observa-se que a região de Cuiabá (MT) apresenta condições climáticas favoráveis ao fungo no período de novembro a julho, e serve de exemplo de região onde dificilmente poderá ocorrer epizootias naturais, com excessão de alguns topoclimas. Nessa região nos meses de agosto, setembro e outubro, o fungo dificilmente poderá resistir às condições climáticas desfavoráveis que são características desses meses ao longo dos anos. Esta região é também exemplo do que ocorre na maioria das regiões do Brasil (Centro-Oeste e Sudeste) onde se utiliza o *M. anisopliae* para o controle das cigarrinhas-das-pastagens. Isso demonstra a necessidade da aplicação do fungo se tornar um método de rotina durante a ocorrência da praga.

Os meses favoráveis e desfavoráveis para aplicação dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 em outras regiões, estão resumidos na Figura 14, onde se observa que a região de Recife (PE) apresenta condições favoráveis à aplicação desses isolados durante, praticamente, todo o ano. Essas condições também favorecem a ocorrência de epizootias do fungo sobre *M. posticata*, conforme foi relatado por ALVES *et alii* (1982) na região canavieira do litoral nordestino, reforçando a validade do modelo proposto, que é a utilização dos conhecimentos sobre as exigências térmicas e hídricas do *M. anisopliae* com base em climogramas.

Figura 13. Climograma comparativo entre a região de Cuiabá (MT) e a zona favorável à uma alta produção de conídios viáveis dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *Metarhizium anisopliae*.

Figura 14. Meses com temperaturas médias e unidades relativas médias favoráveis para aplicação dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *Metarhizium anisopliae* em diferentes regiões do Brasil.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e para as condições em que os testes foram executados, as seguintes conclusões podem ser feitas:

1. O tempo de 48 horas de incubação é o mais indicado para se comparar a produção de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 de *M. anisopliae* sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* mantidas em diferentes temperaturas e umidades relativas do ar.
2. A temperatura e a umidade relativa do ar influenciam na produção de conídios sobre o hospedeiro.

3. As produções de conídios mais elevadas dos isolados E₉ , PL-27 e PL-43 foram obtidas nas temperaturas de: 26⁰C associada a umidades relativas do ar de 90 e 70 %; 22⁰C associada a umidades relativas do ar de 30, 50, 70 e 90% e 30⁰C associada a umidades relativas do ar de 90 e 70%.
4. Os isolados E₉ , PL-27 e PL-43 apresentam baixa produção de conídios em qualquer umidade relativa do ar, quando a temperatura é igual a 34⁰C, sendo o isolado PL-27 o mais sensível a esta temperatura.
5. A influência das diferentes umidades relativas do ar sobre a produção de conídios é mais pronunciada na temperatura de 26⁰C, onde se observa que a medida que a umidade se eleva, a produção de conídios também aumenta.
6. A temperatura de 22⁰C inibe a influência das diferentes umidades relativas do ar sobre a produção de conídios dos isolados E₉ , PL-27 e PL-43.

7. A influência das diferentes temperaturas sobre a produção de conídios é mais pronunciada na umidade relativa do ar de 90%.
8. A umidade relativa do ar de 30% inibe a influência das diferentes temperaturas so-bre a produção de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43.
9. O tempo de 96 horas de incubação é o mais indicado para se comparar a viabilidade dos conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 produzidos sobre cadáveres de lagartas de *D. saccharalis* mantidos em diferentes temperaturas e umidades relativas do ar.
10. A temperatura e a umidade relativa do ar influenciam na manutenção da viabilidade dos conídios sobre o hospedeiro.
11. A viabilidade dos conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 que se mantiveram próximas de 100%, foram obtidas nas temperaturas de : 22°C associada a umidades relativas do ar de 90,70 e 50%; 26°C associada a umidades relativas do ar de 90 e 70%; 30°C e 34°C quando associadas a u-

midade relativa do ar de 90%.

12. A temperatura de 22^oC ameniza o efeito prejudicial das baixas umidades relativas do ar sobre a viabilidade dos conídios dos isolados até o limite mínimo de 50%.
13. A influência das diferentes umidades relativas do ar sobre a viabilidade dos conídios é mais pronunciada na temperatura de 26^oC, onde se observa que a medida que a umidade relativa decresce, a viabilidade dos conídios também decresce.
14. A umidade relativa do ar de 90% ameniza o efeito prejudicial de temperaturas como 30^oC e 34^oC sobre a viabilidade dos conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43.
15. A umidade relativa do ar de 30% é prejudicial à viabilidade dos conídios em qualquer uma das temperaturas testadas.
16. As exigências térmicas e hídricas para se obter alta produção de conídios dos isolados E₉, PL-27 e PL-43 e para a manutenção da via

bilidade desses conídios próxima de 100%, são atendidas nas seguintes combinações de temperatura e umidade relativa do ar: 22^o C e umidades iguais ou superiores a 50%; 26^o C e umidades iguais ou superiores a 70%; 30^o C e umidades iguais ou superiores a 90%.

17. É possível a utilização de climogramas com base nas exigências térmicas e hídricas do fungo, visando estabelecer épocas de aplicação e a previsão da ocorrência de epizootias nas diferentes regiões do país.

6. LITERATURA CITADA

- ALVES, S.B., 1982. Caracterização, padronização e produção do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Piracicaba, ESALQ/USP, 95p. (Tese de Livre Docência).
- ALVES, S.B., 1984. Controle biológico de pragas de pastagens
In: Simpósio sobre Manejo de Pragas de Pastagens, 7.,
Piracicaba, FEALQ. Anais, p.169-208.
- ALVES, S.B., 1985. Patologia de Insetos. Apostila do Curso de Pós-Graduação em Entomologia. Piracicaba, ESALQ/USP, 580p.

ALVES, S.B. e N.L. NOGUEIRA, 1984. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 9., Londrina. Resumos, p.170 .

ALVES, S.B. e S.H. RISCO, 1983. Influência da radiação ultra-violeta de 2537 Å sobre a germinação de 15 isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 8., Brasília. Resumos, p.246.

ALVES, S.B.; S.H.RISCO e L.C. ALMEIDA, 1982. Evaluation of spore amounts of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. produced per hectare during the epizootic phase of the disease on sugarcane leafhopper, *Mahanarva posticata*. Entomology Newsletter. Araras, 13: 7.

ALVES, S.B.; J.W.N. CHAVES; N. MACEDO e S. SILVEIRA NETO, 1984a. Patogenicidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. isolado PL-27 sobre lagartas de *Diatraea saccharalis* Fabr. em diferentes temperaturas. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 9., Londrina. Resumos, p.169.

ALVES, S.B.; S.H. RISCO e L.C. ALMEIDA, 1984b. Influence of photoperiod and temperature on the development and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Zeitschrift für angewandte Entomologie. Berlin, 97: 127-129.

ALVES, S.B.; S.H. RISCO; S. SILVEIRA NETO e R. MACHADO NETO, 1984c. Pathogenicity of nine isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. to *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Zeitschrift für angewandte Entologie. Berlin, 97: 403-406.

ALVES, S.B.; S. SILVEIRA NETO e M.L. HADDAD, 1984d. Capacidade de sobrevivência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (isolado E₉) sobre cana-de-açúcar, nas condições de campo. O Solo. Piracicaba, (1): 39-42.

AQUINO, M.L.N., 1974. O fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Estado de Pernambuco. Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas. Recife, 72: 1-26.

AQUINO, M.L.N.; V.A.L.B. CAVALCANTI; R.C. SENA e G.F. QUEIROZ, 1975. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*. Boletim Técnico da CODECAP. Recife, 4: 1-31.

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

BARON, G., 1968. The genera of hyphomycetes from soil. Baltimore, Willians & Willians Company. 686p.

- BASTOS, C.N. e E.A.F. DA MATTA, 1976. Influência das temperaturas e luz na esporulação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Boletim do Instituto Biológico da Bahia. Salvador, 15: (1): 5-8.
- BELL, J.V., 1974. Mycoses. In: CANTWELL, G.E. Insects Diseases. New York, Marcel Dekker, p.185-230.
- BELL, J.V. e R.J. HAMALLE, 1974. Viability and pathogenicity of entomogenous fungi after prolonged storage on silica gel at -20°C. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 20: 639-642.
- BORGES, V.E., 1985. Estudo de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 para controle da cigarrinha-das-pastagens. Piracicaba, ESALQ/USP, 99p. (Dissertação de Mestrado).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, 1969a. Normais Climatológicas: (Acre-Amazonas-Pará-Maranhão). Rio de Janeiro, Escritório de Meteorologia, vol. 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, 1969b. Normais Climatológicas: (PiauÍ-Rio Grande do Norte-Paraíba-Pernambuco-Alagoas-Sergipe-Bahia). Rio de Janeiro, Escritório de Meteorologia, vol. 2.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, 1969c. Normais Climatológicas: (Minas Gerais-Espírito Santo-Rio de Janeiro-Guanabara). Rio de Janeiro, Escritório de Meteorologia, vol. 3.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, 1969d. Normais Climatológicas: (Mato Grosso-Goiás). Rio de Janeiro Escritório de Meteorologia, vol.5.
- BURGUES, H.D., 1981. Strategy for the Microbial Control of Pests in 1980 and Beyond. In: BURGUES, H.D., Ed. Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980. New York, Academic Press, p.797-836.
- CAMARGO, A.P. de, 1966. Viabilidade e limitações climáticas para a cultura do milho no Brasil. In: MORGENTHALER, J. Coord. Cultura e adubação do milho. São Paulo, Instituto Brasileiro de Potassa, p.225-247.
- CAMERON, J.W.M., 1963. Factors affecting the use of microbial pathogens in insect control. Annual Review of Entomology, 8: 265-286.

- CAMPOS GUEVARA, L.A., 1983. Previsão de ocorrência e zoneamento ecológico de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de algodão. Piracicaba, ESALQ/USP, 117p. (Tese de Doutorado).
- CLERK, G.C. e M.F. MADELIN, 1965. The longevity of three insect parasitizing hyphomycetes. Transactions British Mycological Society, 48: 193-209.
- COCHRANE, V.W., 1958. Physiology of fungi. New York, John Wiley and Sons, Inc. 524 p.
- DAOUST, R.A. e D.W. ROBERTS, 1983. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia: Effect of temperature and relative humidity on conidia! viability and virulence against mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 41: 143-150.
- DAOUST, R.A.; M.G. WARD e D.W. ROBERTS, 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 41: 151-160.
- DAOUST, R.A.; M.G. WARD e D.W. ROBERTS, 1982. Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 40: 228-236.

- DIOMANDÉ, T., 1969. Contribution to the study of the development of the green muscardine fungus *Metarhizium anisopliae* on *O. monoceros* larvae. Bulletin of Institute Fondam Afrique Noire, Serie A, 31: 1381-1405.
- DOBERSKY, J.W., 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens on the elm beetle *Scolytus scolytus*: Effect of temperature and humidity on infection by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. Journal Invertebrate Pathology. New York, 37: 195-200.
- DUNN, P.H. e B.J. MECHALAS, 1963. The potencial of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin as a microbial insecticide. Journal of Insect Pathology, 5: 451-459.
- FARGUES, J.; T. DURIEZ; J. ANDRIEU; R. POPEYE e P. ROBERT, 1975: Étude immunologique comparée de souches de *Metarhizium anisopliae* (Delacr.) Sien champignon hyphomycète entomopathogène. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Serie D., 281: 1781-1784.
- FERRON, P., 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi imperfecti, Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus* (Col. Bruchidae). Entomophaga, 22: (4): 393-396.

FERRON, P. 1978. Etiologie et epidemiologie des muscardines. Paris, Université Pierre e Marie Curie, 112p. (These de Doctorat D'Etat).

FERRON, P., 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: BURGUES, H.D., Ed. Microbial Control of Pests Diseases, 1970-1980. New York, Academic Press, p.465-482.

GALLI, F. e P.C.T. CARVALHO, 1978. Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: GALLI, F., Coord. Manual de Fitopatologia. 2^a ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, p.176-198.

GAUMANN, E., 1950. Principles of plant infection. London, Crosby Lockwood & Son, Ltd. 543p.

GUAGLIUMI, P.; E.J. MARQUES e A.M. VILAS BOAS, 1974. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal) no Nordeste do Brasil. Recife, CODECAP, 54p. (Boletim Técnico, 3).

KENDRICK, W.B., 1971. Taxonomy of fungi imperfecti. University of Toronto Press. 309p.

- KISH, L.P. e G.E. ALLEN, 1978. The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatilis* in soybean. Gainesville, University of Florida, 48p. (Fla. Agric. Exp. Stn. Bull, 795).
- LATCH, G.C.M., 1965. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. New Zealand Journal of Agricultural Research. Wellington, 8: 384-396.
- LINGG, A.L. e M.D. DONALDSON, 1981. Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 38: 191-200.
- MARQUES, E.J.; A.M. VILAS BOAS e C.E.F. PEREIRA, 1981. Orientações técnicas para produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em laboratórios setoriais . Boletim Técnico do PLANALSUCAR. Piracicaba, 3(2): 1-23.
- MASERA, E., 1957. *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, a parasita del baco da seta. Annali della Sperimentazione Agraria, 11:281-295.

MENDÊS, A.C.; P.S.M. BOTELHO; N. DEGASPARI e S.M.S.S. ARAÚJO, 1980. Desenvolvimento do combate biológico da *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lep:Pyralidae), na Coordenadoria Regional Sul, importância, resultados e perspectivas futuras. In ; Encontro Nacional dos Entomologistas do IAA/PLANALSUCAR, 5., Itajaí, 14-19 de abril.

MILNER, R.J. e G.G. LUTTON, 1976. *Metarhizium anisopliae*: survival of conidia in the soil. Intern. Colloq. Pathol. 1., Kingston. Anais, p.428-429.

MOSCARDI, F. e I.C. CORSO, 1981. Teste de fungicidas para o controle da incidência do fungo *Beauveria* sp. em *Bombyx mori* Linnaeus, 1758. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 10(1): 129-133.

MURAYAMA, M. Y.; S.B. ALVES e L.C. ALMEIDA, 1982. Efeito de repicagens em meio de arroz na patogenicidade, morfologia e produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico. Brasília, 3:12.

OLIVEIRA; D.P. de; G.M. CHAVES e E.G. LAURES, 1981. Estudo comparativo da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes tipos de solo. Revista Theobroma. Ilhéus, 11(4): 233-239.

- PARRA, J.R.P., 1981. Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mênev., 1842) visando o seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. Piracicaba, ESALQ/USP, 96p. (Tese de Livre-Docência).
- PEREIRA, J.O.; A.C. MONTEIRO; E.O. RUFINO e B.M. MASCARENHAS 1982. Controle biológico: interação fungo-inseto na região Amazônica. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico. Brasília, 3: 12.
- PETCH, T., 1931. Notes on entomogenous fungi. Transactions British Micological Society, 16: 55-75.
- PUZZI, D. e A.P. de CAMARGO, 1963. Estudo sobre a possibilidade da adaptação climática de *Orthezia praelonga* Douglas nos pomares de citros do Estado de São Paulo. O Biológico. São Paulo, 29:81-85.
- RAMOSKA, W.A., 1984. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug *Blissus leucopterus*. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 43: 389-394.

- RIBA, G. e S. MARCANDIER, 1984. Influence de l'humidité relative sur l'agressivité et la viabilité des souches de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin et de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, hyphomycètes pathogènes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübn. Agronomie, 4(2): 189-194.
- ROBERTS, D.W. e A.S. CAMPBELL, 1977. Stability of entomogenous fungi. Mis. Publ. Entomol. Soc. Am., 10(3): 19-75.
- SANTOS, A.L.L., 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ/USP, 148p. (Dissertação de Mestrado).
- SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura. Instituto Agrônomo de Campinas, 1986. Arquivo de dados climatológicos. Campinas, Seção de Climatologia Agrícola.
- SCHABEL, H.G., 1976. Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 27: 377-383.
- SCHAERFFENBERG, B. 1964. Biological and enviromental conditions for the development of mycoses caused by *Beauveria* and *Metarhizium*. Journal of Insect Pathology, 6: 8-20.

- SILVEIRA, G.A. e C.L. MESSIAS, 1983. Infecção de *Deois* sp. por *Metarhizium anisopliae* - penetração e colonização. Boletim do Grupo de Pesquisadores de Controle Biológico. Brasília, 4: 14.
- SILVEIRA NETO, S.; O. NAKANO; D. BARBIN e N.A. VILLA NOVA, 1976. Manual de Ecologia dos Insetos. Piracicaba, Editora Agronômica Ceres. 419p.
- SILVEIRA NETO, S.; J.R.P. PARRA; R.A.ZUCHI e S.B. ALVES, 1986. Zoneamento ecológico para as cigarrinhas de pastagens no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 10., Rio de Janeiro. Resumos, p. 127.
- SOSA GÓMEZ, D.R., 1983. Caracterização e padronização de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 provenientes de diferentes regiões do Brasil. Piracicaba, ESALQ/USP, 117 p. (Dissertação de Mestrado).
- SOSA GÓMEZ, D.R. e S.B. ALVES, 1983. Caracterização de onze aislamentos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. 1. Estandarización, virulencia y actividad enzimática. CIRPON, Rev. Invest., 1(3): 83-102.
- TANADA, Y., 1963. Epizootiology of Infectious Diseases. In: STEINHAUS, E.A. Ed. Insect pathology: an advanced treatise. New York, Academic Press, v. 2, p. 423-475.

- TULLOCH, M., 1976, The genus *Metarhizium*. Transactions
British Mycological Society, 66: 407-411.
- VENTURA, J.A., 1981. Epizootiologia. Boletim do Grupo de
Pesquisadores de Controle Biológico. Brasília, 2:12.
- VILLACORTA, A., 1978. Efeito da temperatura e da nutrição
sobre o desenvolvimento de vários isolamentos de *Metarhizium*
anisopliae Sorok. In: Congresso Latinoamericano de
Entomologia, 3. e Congresso Brasileiro de Entomologia, 5.,
Ilhéus/Itabuna. Resumos, p.70
- VILLACORTA, A., 1980. Suscetibilidade de ninfas de *Deois*
flavopicta (Stal., 1854) (Homoptera:Cercopidae) a diferentes
isolamentos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin.
Anais da Sociedade Entomologica do Brasil, 9(1): 33-38.
- WALSTAD, J.D. e ANDERSON, R.J., 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.

WALSTAD, J.D.; R.F. ANDERSON e W.J. STAMBAUGH. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). Journal of Invertebrate Pathology. New York, 16: 221-226.

WEISER, J., 1982. Persistence of fungal insecticides: influence of environmental factors and future applications. In: KURSTAK, E., Ed. Microbial and Viral Pesticides. New York, Marcel Dekker, Inc., p.531-557.

ZIMMERMANN, G., 1982. Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology. New York, 40: 36-40.

7. APÊNDICE

Apêndice 1. Temperaturas médias mensais e umidades relativas médias mensais de diferentes regiões do Brasil.

Local	Dado climático	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
Belém (PA)	Temp. Média (°C)	25,6	25,5	25,4	25,7	26,0	26,0	25,9	26,0	26,0	26,2	26,5	26,3
	Umid. Rel. Média (%)	88,8	90,7	90,7	90,4	87,2	84,5	83,2	83,4	83,8	82,8	81,8	84,9
Manaus (AM)	Temp. Média (°C)	25,9	25,8	25,8	25,8	26,4	26,6	26,9	27,5	27,9	27,7	27,3	26,7
	Umid. Rel. Média (%)	87,7	87,8	88,2	88,5	86,2	83,0	79,7	77,2	77,5	79,4	82,1	85,2
Fortaleza (CE)	Temp. Média (°C)	27,2	27,2	26,8	26,8	26,7	26,1	26,0	26,0	26,4	26,8	26,9	27,2
	Umid. Rel. Média (%)	77,4	79,9	81,9	82,2	80,1	78,1	75,3	73,3	73,7	72,9	74,2	75,4
Quixadá (CE)	Temp. Média (°C)	27,4	27,0	26,6	26,4	26,2	26,0	26,1	26,5	27,0	27,3	27,5	27,5
	Umid. Rel. Média (%)	63,2	66,6	69,3	70,0	70,6	68,8	66,0	63,7	61,8	60,5	61,5	62,0
Garanhuns (PE)	Temp. Média (°C)	21,9	21,9	21,9	21,2	19,8	18,8	17,8	17,9	19,2	20,6	21,5	22,0
	Umid. Rel. Média (%)	75,1	76,3	77,4	81,0	87,3	89,6	90,7	88,9	83,2	78,3	75,8	74,7
Recife (PE)	Temp. Média (°C)	27,0	27,1	27,0	26,6	25,6	24,7	24,2	24,2	25,0	25,9	26,4	26,7
	Umid. Rel. Média (%)	76,3	77,4	78,8	80,8	82,5	82,7	81,6	80,4	78,4	76,4	76,4	76,3
Belo Horizonte (MG)	Temp. Média (°C)	22,8	22,9	22,3	21,1	19,1	18,0	17,7	19,0	20,8	21,5	21,7	21,6
	Umid. Rel. Média (%)	75,9	74,5	75,7	74,5	72,8	71,7	67,1	61,4	63,3	69,0	73,9	79,8
Janaína (MG)	Temp. Média (°C)	25,1	25,3	25,2	24,6	23,3	22,2	22,0	23,4	25,5	26,4	25,2	24,7
	Umid. Rel. Média (%)	78,7	76,6	78,1	75,5	72,2	69,2	63,8	57,4	56,8	63,4	75,5	80,6
Conceição da Barra (ES)	Temp. Média (°C)	25,9	26,1	25,8	24,6	23,1	22,0	21,3	21,6	22,6	23,6	24,3	25,1
	Umid. Rel. Média (%)	83,2	83,4	84,1	84,2	84,3	85,5	84,5	82,4	82,5	83,6	85,0	84,7
Vitória (ES)	Temp. Média (°C)	25,7	26,0	25,7	24,3	22,9	21,9	21,0	21,4	22,2	23,0	23,7	24,7
	Umid. Rel. Média (%)	79,7	79,1	80,2	80,2	79,6	79,8	79,4	78,0	78,5	80,3	81,4	81,2
Goiânia (GO)	Temp. Média (°C)	22,8	23,0	22,8	22,2	20,4	18,9	18,8	21,2	23,2	23,6	23,0	22,7
	Umid. Rel. Média (%)	80,8	81,6	82,3	77,9	72,2	68,0	61,8	51,6	54,0	67,6	78,3	81,6
Luiziânia (GO)	Temp. Média (°C)	21,9	22,0	21,7	21,1	19,4	18,3	18,1	20,0	22,1	22,3	21,9	21,6
	Umid. Rel. Média (%)	80,7	80,6	82,1	78,7	75,5	69,1	63,5	56,0	57,9	69,1	79,3	83,8
Cuiabá (MT)	Temp. Média (°C)	26,5	26,5	26,2	25,5	24,3	23,2	22,8	25,0	27,0	27,2	26,8	26,6
	Umid. Rel. Média (%)	80,8	82,0	82,5	81,0	77,1	72,6	65,3	56,4	58,0	68,7	75,7	79,1
Campo Grande (MS)	Temp. Média (°C)	24,3	24,3	23,8	22,0	20,3	19,3	19,1	21,1	22,8	23,5	24,0	24,5
	Umid. Rel. Média (%)	79,6	81,0	79,8	77,7	76,0	73,1	67,8	58,9	62,3	69,2	72,2	75,4
Campinas (SP)	Temp. Média (°C)	23,0	23,0	22,7	20,8	18,5	17,2	17,2	19,0	20,5	21,2	21,9	22,4
	Umid. Rel. Média (%)	76,2	77,0	75,4	74,0	73,1	72,1	67,9	64,3	64,6	69,5	70,9	75,6
Pindorama (SP)	Temp. Média (°C)	24,0	23,9	23,5	21,8	19,7	18,6	18,6	20,7	22,6	23,3	23,6	23,7
	Umid. Rel. Média (%)	79,5	80,0	78,2	73,7	71,3	70,2	63,7	57,9	60,2	68,5	71,2	77,6
Presidente Prudente (SP)	Temp. Média (°C)	25,2	25,5	25,4	23,0	20,9	19,6	19,4	21,2	22,2	23,3	24,0	24,6
	Umid. Rel. Média (%)	78,5	78,5	76,7	72,7	72,3	72,4	67,2	63,2	67,6	71,0	72,7	78,1