

PRODUÇÃO DE *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON EM MEIOS À BASE DE CRISÁLIDA DO BICHO-DA-SEDA

Pedro J. Neves¹ e Sérgio B. Alves²

ABSTRACT

Production of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in Culture Media Made of Silkworm Pupae

The fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson was produced in solid media made of ground pupae bran from *Bombyx mori* L. The virulence of *N. rileyi* produced in these media was compared to the virulence of *N. rileyi* produced in SMAY (Sabouraud maltose agar + yeast extract). The largest production of conidia was obtained in SMAY (1×10^{12} conidia/liter of medium). The medium with pupae and potato (FCBA) was the most economical. In this medium the formation of conidia was faster, resulting in a production cost 2.3 times lower than in SMAY. The virulence of *N. rileyi* produced in SMAY was higher than in the other media tested.

KEY WORDS: Insecta, entomopathogenic fungi, production, solid process.

RESUMO

O fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson foi produzido em meios sólidos à base de farinha de crisálida de *Bombyx mori* L., e sua virulência comparada através de bioensaios, com conídios produzidos em meio de SMAY (Sabouraud maltose agar e extrato de levedura). A maior produção de conídios foi obtida em SMAY (1×10^{12} esporos/litro de meio). O meio farinha-de-crisálida-batata (FCBA) foi o mais econômico, sendo que a formação de conídios foi mais rápida e a um custo 2,3 vezes menor do que em SMAY. A virulência de *N. rileyi* foi maior para os conídios produzidos em SMAY.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, fungo entomopatogênico, produção, processo sólido.

Recebido em 21/09/94. Aceito em 29/10/95.

¹Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Agronomia, Caixa postal 6001, 86051-970, Londrina, PR.

²Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Entomologia, Caixa postal 9, 13418-900, Piracicaba, SP.

INTRODUÇÃO

O fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson é um patógeno que ataca diversas pragas de importância econômica no Brasil e em várias partes do mundo. Este patógeno tem sido produzido principalmente em meio SMAY (Sabouraud maltose agar + extrato de levedura) (Bell 1975, Garcia & Ignoffo 1978, Bell *et al.* 1982, Holdon & Van de Klashorst 1986a, Alves 1986, Balardin & Loch 1988, Ignoffo & Garcia 1989). Entretanto, meios alternativos a SMAY têm sido investigados, visando diminuir os custos de produção para *N. rileyi*. Desde modo, Balardin (1984) utilizou meios à base de extrato de aveia, batata, tomate e cenoura, em comparação a SMAY. Observou que para um isolado o melhor meio foi SMAY e para outro foi o meio de tomate alcançando produções, aos 14 dias após inoculação, de $1,23 \times 10^{10}$, e $0,70 \times 10^{10}$ conídios, respectivamente.

Testes com diferentes meios foram feitos por Holdon & Van de Klashort (1986b) com diferentes fontes de carboidratos e proteínas, sendo as melhores fontes de proteína o levedo de cerveja e o leite em pó desnatado, e a melhor fonte de carboidratos o amido solúvel seguido do amido de milho. Os autores observaram que *N. rileyi* utilizou somente a parte solúvel do amido. Os custos dos meios alternativos foram dez vezes menores que os custos de SMAY.

Objetivando a produção de *N. rileyi* em larga escala, Bell *et al.* (1982) produziram 5,5 kg de conídios, em meio de SMAY com 1% de extrato de levedura, a um custo de US\$ 1,75 por grama de conídios (1978-1979) com uma média de $7,42 \times 10^{10}$ conídios por grama.

Nos diferentes estudos de produção realizados, porém, não se testou a virulência dos conídios produzidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de produção de *N. rileyi*, em meios contendo como ingrediente principal a farinha de crisálida de *Bombix mori* L. subproduto da indústria da seda, e testar a virulência dos conídios.

MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *N. rileyi* foi isolado de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, provenientes de lavoura de soja da região de Campinas, SP e encontra-se armazenado em sílica gel na micoteca do Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", sob número 804.

Os meios testados e as suas respectivas composições foram os seguintes: Sabouraud maltose agar e extrato de levedura (SMAY) = Neopeptona (10g), extrato de levedura (10g), maltose (40g), sulfato de estreptomicina (0,5g), agar (15g), água destilada (qsp) (1000ml). Farinha de crisálida mais batata (FCBA) = Batata (200g), farinha de crisálida (200g), ágar (15g), sulfato de estreptomicina (0,5g), água destilada (qsp) (1000ml). Precipitação de farinha de crisálida (PFCA) = Farinha de crisálida (200g), ágar (15g), sulfato de estreptomicina (0,5g), água destilada (qsp) (1000ml). Sobrenadante de farinha de crisálida (SFCA) = farinha de crisálida (200g), ágar (15g), sulfato de estreptomicina (0,5g), água destilada (qsp) (1000ml).

Para o preparo do meio FCBA, ferveu-se a farinha de crisálida por cinco minutos, sendo então filtrada para extração do caldo, ao qual se adicionou o caldo de batata. Finalmente, o ágar e o antibiótico foram adicionados, deixando-se aquecer até ao ponto de fervura. Para os meios PFCA e SFCA, após preparado o caldo com a farinha de crisálida, como já descrito, este permaneceu em repouso até à formação de um precipitado. Fez-se, então, a separação do precipitado e do sobrenadante, completando-se o volume para 1000ml e adicionando-se ágar e antibiótico.

A quantificação de conídios, nos diferentes meios, bem como a padronização das suspensões de conídios para os bioensaios, foram feitas usando-se a câmara de Neubauer. Conídios provenientes da quinta repicagem foram usados para a preparação de uma suspensão com $9,5 \times 10^8$ conídios/ml. Esta suspensão (0,1 ml) foi utilizada para inoculação das placas, sendo espalhada com alça de Drigalsky por toda a superfície das mesmas. Após inoculação, as placas foram levadas para estufa incubadora regulada a 26°C e fotofase de 12 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos: FCBA, SMAY, PFCA e SPCA observados os oito e 16 dias, sendo repetidos oito vezes. Em cada observação foi retirado um círculo da colônia, de 11mm de diâmetro com $95,03\text{mm}^2$ de área, provavelmente de uma região da colônia de pleno crescimento e esporulação, para quantificar os conídios produzidos. Os dados foram analisados através da comparação das médias dos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 1% e 5% de probabilidade.

Após 16 dias da inoculação, conídios produzidos nos diferentes meios foram utilizados para a avaliação da patogenicidade e virulência para lagartas de 2º instar de *A. gemmatilis*, provenientes de criação em laboratório. Para a inoculação das lagartas foram usadas porções circulares de folhas (uma por repetição), de 4,5cm de diâmetro, pulverizadas em ambos os lados com 0,1 ml de uma suspensão com $6,5 \times 10^6$ conídios/ml, resultando em aproximadamente 310 conídios por mm^2 de área foliar. A testemunha foi pulverizada com água estéril mais espalhante adesivo (Tween 80, 20 μl por litro).

Na aplicação do fungo, as porções circulares de folhas de cada uma das repetições, de cada tratamento, foram colocadas lado a lado e pulverizadas, simultaneamente, utilizando-se um microatomizador com pressão de 15 LB/pl². Após a pulverização, o círculo de folha foi colocado em placa de Petri, previamente forrada com papel de filtro esterilizado e levemente umedecido. Em seguida, 25 lagartas de *A. gemmatilis* foram deixadas por 48 horas alimentando-se da folha, após o que foram alimentadas com folhas de soja não tratadas. Os bioensaios foram conduzidos a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em estufa incubadora com fotofase de 12 horas. As observações relativas à mortalidade foram feitas diariamente, sendo as lagartas mortas deixadas a 26°C e sob elevada umidade relativa para a esporulação e confirmação da morte pelo fungo. O delineamento experimental utilizado no bioensaio foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram os conídios produzidos nos quatro meios diferentes e uma testemunha (água mais espalhante). Utilizaram-se 25 lagartas por repetição, totalizando 100 lagartas por tratamento. A determinação do tempo letal médio (TL^{50}), para os diferentes tratamentos, foi feita utilizando-se o método Probit. Para análise dos custos de produção dos conídios de *N. rileyi* consideraram-se somente os custos, em dólares, relativos aos meios de cultura utilizados. Para todas as comparações estabeleceu-se que 1 litro de meio pode ser distribuído em 40 placas de Petri (9 cm de diâmetro), com área de $2.544,7\text{cm}^2$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio mais produtivo foi o SMAY aos 16 dias (SMAY 16), o qual diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Este meio produziu 47,8% mais conídios do que o segundo melhor meio, FCBA aos 16 dias (FCBA 16) (Tabela 1). Com relação ao meio FCBA, apesar de não ter havido diferença significativa para a colheita aos 8 e 16 dias após a inoculação, com produções de $1,95 \times 10^7$ e $2,56 \times 10^7$ conídios/ml respectivamente, verificou-se que a produção de conídios aos 16 dias foi 31,7% maior do que aos 8 dias. Considerando-se somente a variável tempo, o meio FCBA (8 dias) produziu uma quantidade de conídios igual à metade obtida no

Tabela 1. Produção média de conídios de *Nomuraea rileyi* nos diferentes meios aos 8 e 16 dias após a inoculação.

| Meios | Dias após inoc. | Número médio de conídios | | | |
|-------------------|-----------------|--------------------------|---------|------------------------|-----------------------------|
| | | Por ml ($\times 10^7$) | | Por placa ² | Por ml de meio ³ |
| | | transf. | origin. | ($\times 10^{10}$) | ($\times 10^9$) |
| SMAY ⁴ | 16 | 19,43a ¹ | 3,79 | 2,50 | 1,00 |
| FCBA ⁵ | 16 | 15,85b | 2,56 | 1,70 | 0,69 |
| FCBA | 8 | 13,96b | 1,95 | 1,30 | 0,52 |
| PFCA ⁶ | 16 | 10,06c | 1,01 | 0,68 | 0,27 |
| SFCA ⁷ | 16 | 9,04c | 0,82 | 0,54 | 0,21 |
| PFCA | 8 | 8,55c | 0,73 | 0,48 | 0,19 |
| SFCA | 8 | 8,38c | 0,70 | 0,47 | 0,19 |
| SMAY | 8 | 2,18d | 0,06 | 0,04 | 0,02 |

D.M.S. 1% = 2,50397

¹Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

²Placas de 9 cm de diâmetro.

³Considerando cada placa de 9 cm de diâmetro com 25 ml de meio.

⁴Sabouraud maltose agar, extrato de levedura.

⁵Farinha de crisálida, batata, agar.

⁶Precipitação de farinha de crisálida agar.

⁷Sobrenadante de farinha de crisálida agar.

meio SMAY, aos 16 dias. Sob este aspecto o meio FCBA (8) foi também mais produtivo do que FCBA (16). Comparando-se as produções obtidas nos meios de PFCA e SFCA nota-se que estes foram estatisticamente inferiores aos meios SMAY (16), FCBA (16) e FCBA (8), para qualquer uma das épocas. Esta diferença está provavelmente associada à menor quantidade de carboidratos nestes dois meios. Estes resultados concordam com Holdon & Van de Klashorst (1986b), os quais demonstraram a importância do amido solúvel no desenvolvimento de *N. rileyi*.

Também verificou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos PFCA e SFCA em nenhuma época, embora o meio PFCA tenha sido ligeiramente superior ao SFCA. Esta superioridade deveu-se, provavelmente, ao fato de PFCA apresentar maiores concentrações de nitrogênio. Este elemento, na farinha de crisálida, encontra-se principalmente em substâncias quitinosas, não se solubilizando em água.

O meio SMAY (8 dias) foi o que resultou nas menores produções. Este fato pode estar relacionado com a característica apresentada por *N. rileyi* em SMAY, de, no início do seu desenvolvimento, passar por um estágio leveduriforme, com duração de 4 a 5 dias, seguido de crescimento micelial. Deste modo, o início da formação de conidióforos e conídios de *N. rileyi* em SMAY ocorreu por volta do 7º dia após a inoculação, com reduzida produção de conídios no 8º dia. Por outro lado, nos meios com farinha de crisálida o estágio leveduriforme foi mais rápido, variando de 1 a 2 dias, propiciando uma maior precocidade no desenvolvimento micelial e na formação de conídios.

Tabela 2. Tempos letais médios (TL), em dias, intervalo de confiança (IC) e equação da reta resultantes da inoculação de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* com conídios de *Nomuraea rileyi* produzidos em diferentes meios.

| Meios | TL ₅₀ | I.C. | TL ₉₀ | Equação da reta |
|-------------------|------------------|-----------|------------------|--------------------------|
| SFCA ¹ | 5,8 | 3,4 - 9,8 | 11,24 | $y=1,62 + 4,44 \log x$ |
| SMAY ² | 7,1 | 6,1 - 8,1 | 8,54 | $y=-8,08 + 15,42 \log x$ |
| PFCA ³ | 7,1 | 6,1 - 8,3 | 10,10 | $y=-2,26 + 8,50 \log x$ |
| FCBA ⁴ | 7,6 | 5,8 - 9,8 | 15,10 | $y=1,19 + 4,31 \log x$ |

¹Sobrenadante de farinha de crisálida agar.

²Sabouraud maltose agar, extrato de levedura.

³Precipitação de farinha de crisálida agar.

⁴Farinha de crisálida, batata, agar.

Comparando os meios SMAY e FCBA, pode-se sugerir que o meio SMAY propiciou maiores produções de conídios devido à presença do extrato de levedura e da peptona, fontes ricas em nitrogênio e importantes na esporulação de *N. rileyi*, o que já havia sido confirmado por Loch (1978), o qual não observou o desenvolvimento de *N. rileyi* em meio mínimo. Entretanto, quando se adicionou 1% de extrato de levedura, ocorreu esporulação intensa do patógeno. Camargo (1981) também confirmou a importância do extrato de levedura, observando que no meio Sabouraud maltose agar (SMA) o fungo cresceu apenas vegetativamente, não ocorrendo a esporulação. Silva & Loch (1987) demonstraram um aumento na produção de conídios à medida que se aumentou a concentração de extrato de levedura. Apesar de rico em nitrogênio, o meio FCBA não apresentou uma esporulação tão intensa como a observada em SMAY, provavelmente devido à forma como este elemento está disponível no meio FCBA.

A comparação dos resultados deste experimento com os obtidos por outros autores, torna-se difícil, já que existe uma grande variação nas unidades utilizadas para a quantificação da produção de conídios, além de terem sido utilizados isolados diferentes. Entretanto, Loch (1978) obteve produções de $1,2 \times 10^{10}$ conídios por placa, 14 dias após a inoculação, utilizando meio SMAY, com 8 g de extrato de levedura por litro de meio. Esta produção é menor do que a observada neste experimento nos tratamentos SMAY (16), FCBA (16) e FCBA (8) (Tabela 1).

Por outro lado, Balardin (1984) observou, para o isolado Passo Fundo, em meio SMAY, produções superiores à alcançada pelo melhor meio deste experimento. Já para o isolado Camaquã, o autor observou que o melhor meio foi o de extrato de tomate. As produções alcançadas foram, porém, inferiores às observadas para SMAY (16) e próximas às obtidas no meio de FCBA no presente trabalho. Balardin (1984), no entanto, utilizou extrato de levedura a 1,5% nos meios alternativos a SMAY e quantificou a produção de conídios 14 dias após a inoculação. Torna-se, portanto, evidente que, em termos quantitativos, o meio FCBA mostrou-se competitivo quando comparado ao meio de SMAY.

Com relação aos resultados dos bioensaios com *A. gemmatalis*, observou-se que não ocorreram diferenças relevantes nos TL₅₀ dos tratamentos. Entretanto, ao se analisar o TL₉₀ e o coeficiente angular da reta de mortalidade (slope), observou-se que os conídios provenientes

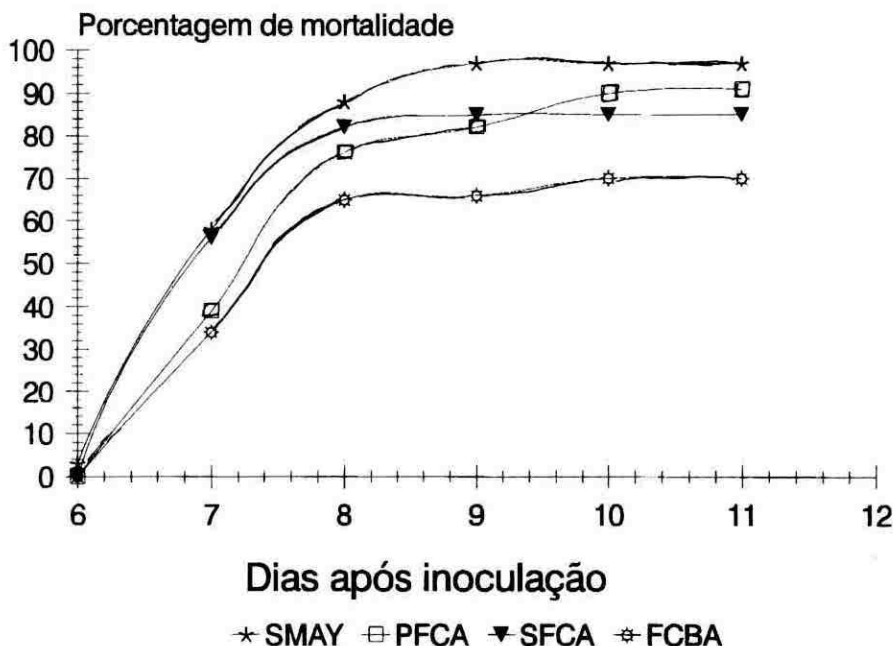


Figura 1. Mortalidade corrigida e acumulada de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* inoculadas com conídios de *Nomuraea rileyi* produzidos nos diferentes meios. SMAY (Sabouraud maltose agar, extrato de levedura); PFCA (Precipitação de farinha de crisálida agar); SFCA (Sobrenadante de farinha de crisálida agar); FCBA (Farinha de crisálida agar).

de SMAY foram os mais virulentos, propiciando um TL_{50} inferior ao observado nos demais (Tabela 2 e Fig. 1).

A maior virulência associada aos conídios produzidos em SMAY deveu-se provavelmente, ao fato de ter ocorrido neste meio um estágio leveduriforme mais característico e prolongado do que nos outros meios. Este estágio já foi correlacionado com a virulência por Morrow *et al.* (1989). Estes autores observaram que sucessivas repicagens de *N. rileyi* em SMAY provocaram redução na virulência, associada à não formação do estágio leveduriforme.

Os TL_{50} observados apresentam uma baixa variação quando comparados aos obtidos por outros autores. Assim, Ignoffo *et al.* (1976), utilizando metodologia idêntica à usada neste experimento, obtiveram um TL_{50} de 6,4 dias para um isolado proveniente do Brasil. Boucias *et al.* (1982), utilizando uma dosagem de 7500 conídios por mm^2 de dieta, observaram um TL_{50}

de 5,6 dias. Já na inoculação de um isolado brasileiro, na concentração de 500 conídios por mm^2 de folha, Boucias *et al.* (1984) observaram um tempo médio de mortalidade de 7,2 dias.

Com relação aos custos de um litro de meio, o preço de SMAY é de US\$ 23,05 e o de FCBA é de US\$ 5,94, sendo portanto este último 3,9 vezes mais econômico do que o primeiro. Se não for utilizado agar importado (mais caro) esta diferença entre os custos dos dois meios pode aumentar, pois o agar representa aproximadamente 98% do custo de FCBA e somente 25% do custo de SMAY. Isto é confirmado quando não se considera o custo do agar, que é utilizado em igual concentração nos dois meios, onde seriam gastos 9,2 centavos de dólar por litro de FCBA e US\$ 17,2 por litro de SMAY, ou seja, 186,9 vezes mais. Considerando-se que um litro de SMAY distribuído em 40 placas de 9 cm de diâmetro produz 10^{12} conídios por litro a um custo de US\$ 23,05 e que um litro de FCBA (8), em 40 placas, produz $5,2 \times 10^{11}$ conídios a um custo de US\$ 5,94, são necessários 1,7 litros de FCBA para se produzir a mesma quantidade de conídios obtidos com um litro de SMAY. Deste modo, utilizando a metade do tempo, o meio FCBA tem um custo 2,3 vezes menor. Assim, economicamente, o meio de FCBA mostra um elevado potencial na produção de *N. rileyi*, quando comparado com os outros meios utilizados. Entretanto, a diminuição na virulência deve ser considerada, podendo ser contornada com a adição de extrato de levedura ao meio.

AGRADECIMENTOS

À Solange A. Vieira, técnica do Laboratório de Patologia de Insetos, pelo apoio e colaboração no desenvolvimento deste trabalho e ao Dr. Paulo S.M. Botelho, pela leitura dos originais.

LITERATURA CITADA

- Alves, S.B. 1986. Fungos entomopatogênicos, p. 72-126. In S.B. Alves (coord.), Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 407p.
- Balardin, R.S. 1984. Meios de cultura semi-sintéticos, agentes preservantes e rotina para a produção massal do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Dissertação de mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, 104p.
- Balardin, R.S. & L.C. Loch. 1988. Metodologia para a produção e preservação de inóculo de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Summa Phytopath. 14: 144-151.
- Bell, J.V. 1975. Production and pathogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid media. J. Invert. Pathol. 26: 129-130.
- Bell, J.C., R.J. Hamalle & C.M. Ignoffo. 1982. Methods and costs of producing *Nomuraea rileyi* conidiospores. New Orleans, U.S. Department of Agriculture, Southern Series, 24, 7p.
- Boucias, D.G., E.A. Schoborg & G.E. Allen. 1982. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatilis*. J. Invert. Pathol. 39: 238-240.

- Boucias, D.G., D.L. Bradford & C.S. Barfield. 1984.** Susceptibility of the velvetbean caterpillar and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to *Nomuraea rileyi*: effects of pathotype, dosage, temperature, and host age. *J. Econ. Entomol.* 77: 247-253.
- Camargo, M. 1981.** Crescimento e esporulação do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em diferentes meios de cultura. Dissertação de mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, 51p.
- Garcia, C. & C.M. Ignoffo. 1978.** A simplified diet-surface treatment technique for determining the infectivity of conidia of *Nomuraea rileyi*. *J. Invert. Pathol.* 32: 398-399.
- Holdon, D.G. & G. Van de Klashorst. 1986a.** Sporulation by hyfal bodies of *Nomuraea rileyi* and subsequent infection of *Heliothis* spp. *J. Invert. Pathol.* 48: 242-245.
- Holdon, D.G. & G. Van de Klashorst. 1986b.** Inexpensive culture media and methods for *Nomuraea rileyi*. *J. Invert. Pathol.* 48: 246-248.
- Ignoffo, C.M., C. Garcia & D.L. Hostetter. 1976.** Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Environ. Entomol.* 5: 935-936.
- Ignoffo, C.M. & C. Garcia. 1989.** Relative virulence of *Nomuraea* spp. (*N. rileyi*, *N. atypicola*, *N. anemonoides*) originally isolated from an insect, a spider, and soil. *J. Invert. Pathol.* 54: 373-378.
- Loch, L.C. 1978.** Exigências nutricionais e ambientais do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e seu comportamento na presença de defensivos agrícolas. Dissertação de mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, 65p.
- Morrow, B.J., D.G. Boucias & M.A. Heath. 1989.** Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* after serial in vitro passage. *J. Econ. Entomol.* 82: 404-407.
- Silva, L. & L.C. Loch. 1987.** Esporulação do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em meio de cultura à base de grãos de arroz polidos. *An. Soc. Entomol. Brasil* 16: 213-220.
-