

ESPORULAÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Nomuraea rileyi*
(FARLOW) SAMSON EM MEIO DE CULTURA
À BASE DE GRÃOS DE ARROZ POLIDOS¹

Lucianita da Silva²

Luiz C. Loch³

ABSTRACT

Sporulation of the enthomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*
(Farlow) Samson on polished rice grain media

The use of polished rice grains in culture media for the production of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson spores, was studied at the Agricultural School - UFRGS, Porto Alegre, Brazil in 1984.

Three factors were tested: liquid and solid proportions of media; b) addition of yeast extract (2 and 4%); c) rice grains in boiling water for 1 minute.

The use of three different proportions of liquid and solid did not show significant difference ($P < 0,05$), while the two factors affected the production of spores.

The spores produced on tested culture media, maintained their pathogenicity to larvae of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818).

Recebido em 26/01/87

¹ Trabalho submetido como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Agronomia, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo primeiro autor. Financiado pelo Projeto FINEP 4282037600. Apresentado no X Congresso Brasileiro de Entomologia, Rio de Janeiro-RJ., Janeiro de 1986.

² Departamento de Fitotecnia do Centro Agro Veterinário-CAV da Universidade para o Desenvolvimento do Estado de Santa Catarina-UDESC, Lages, SC, C.P. 29-D.

³ Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

INTRODUÇÃO

Entre os insetos pragas da soja, a lagarta *Anticarsia gemmatalis* Huebner, 1818 (LEP., Noctuidae) é um dos principais causadores de danos. ALLEN *et al.* (1971) e CORRÊA & SMITH (1975) citam o controle de *A. gemmatalis* através do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samsom, em condições de campo. Portanto, potencialmente, este fungo pode ser utilizado como inseticida biológico em programas integrados para o controle da lagarta da soja.

Outras espécies de lepidópteros são suscetíveis a *N. rileyi*, sendo entre outras, referenciadas por PUTTLER *et al.* (1976) e IGNOFFO (1981), *Heliothis zea* (Boddie, 1850), *Bombyx mori* L. 1758, *Pseudoplusia includens* (Walker, 1854), e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).

Para o uso de *N. rileyi* como inseticida biológico, entre outros requisitos, é necessária a produção massal de esporos patogênicos, a um baixo custo.

GETZIN (1961) obteve esporos patogênicos de *N. rileyi* em meio de cultura composto por 5% de batata, 1% de gema de ovo fresco, 1% de levedura ativa seca, 1% de Bacto-peptona e 1,5% de ágar (1000 ml de água). Esporos de *N. rileyi* desenvolvidos em meio de cultura Sabouroud-maltose ágar + extrato de levedura (SMAY) por BELL (1975) causaram a morte de 98,4% das lagartas de *H. zea* tratadas com os conídios obtidos.

Foi observado por LOCH (1978) a influência positiva do extrato de levedura acrescido ao meio SMAY sobre a esporulação de *N. rileyi*.

CAMARGO (1981) testou os meios Batata-dextrose-ágar, meio de arroz, meio mínimo meio completo e meio SMAY para cultivo de *N. rileyi*, obtendo esporulação mais intensa no meio SMAY. Nos meios semi-sintéticos denominados cenoura-maltose-ágar, a-veia - maltose-ágar e tomate-maltose-ágar, BALARDIN (1984) obteve esporulações semelhantes ou superiores à ocorrida no meio SMAY.

Foram utilizados por AQUINO *et al.* (1975) e MARQUES *et al.* (1981), meios de cultura à base de grãos de arroz polidos e água para o desenvolvimento massal do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch).

Este trabalho tem o objetivo de avaliar a produção de conídios de *N. rileyi* em meio de cultura de baixo custo, composto por grãos de arroz polidos, extrato de levedura e água, sob ação de fervura pré-esterilização.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para cultivo do fungo foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 250 g dotados de tampa plástica com orifícios, através dos quais foi injetada, com auxílio de seringa hipodérmica, a suspensão de esporos. Este procedimento foi em baseado nos trabalhos de MARQUES *et al.* (1981) e BALARDIN (1984). Antes, e após a inoculação dos esporos, os orifícios foram vedados com fita gomada.

Os grãos de arroz polidos utilizados como componente do meio de cultura foram da Cultivar BR irga 409.

Foram aplicados três tratamentos: a) diferentes proporções de grãos (g) e líquido (ml), sendo estas 1,0: 0,5 (26,66g: 13,33ml), 1,0:1,0 (20g:20ml) e 1,0:1,5 (16g:24ml); b) concentrações de 0,2 e 4% de extrato de levedura acrescido à parte líquida do meio de cultura; c) fervura pré-esterilização.

O preparo do meio sem fervura constou na mistura dos grãos e líquido em frascos individuais nas respectivas proporções, com e sem extrato de levedura. Nos tratamentos com fervura, a parte líquida do meio de cultura correspondente a um tratamento foi colocada em recipiente de alumínio sob aquecimento até atingir o ponto de ebulição. Neste momento, era acrescida a quantidade de grãos correspondentes ao tratamento, sendo ambos, líquido e grãos, misturados sob aquecimento durante 1 minuto. Após fervura, o meio era depositado em recipiente de plástico ou vidro durante 60 minutos. O meio foi distribuído em proporções de 40g por frasco. Os frascos com diferentes meios, foram esterilizados em autoclave vertical (FABBE modelo 103 D) durante 40 minutos a 121°C e 1 atm de pressão.

Os tratamentos correspondem a um fatorial 3x3x2 com quatro repetições.

Foram inoculados $1,89 \times 10^8$ esporos de *N. rileyi* (TA 001) por frasco de cultivo e estes homogeneizados ao meio de cultura através da permanência de 6 minutos em agitador horizontal (FANEM modelo 254). A cada bloco foi acrescido um frasco contendo 40 g de meio SMAY, inoculado com igual quantidade de esporos acrescidos ao meio de arroz.

Os diferentes tratamentos foram distribuídos em blocos completos casualizados, sendo cada prateleira da Câmara Incubadora (FANEM Modelo 347) o local para deposição de um bloco. Os frascos permaneceram em câmara incubadora durante 12 dias à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e regime de luz constante.

Para coleta dos esporos foram acrescidos 60 ml de água destilada + TWEEN 80 (0,05%) por frasco. Os grãos que se apresentavam agrupados foram soltos, e os frascos colocados em agitador durante 15 minutos. Após este período, foi coletado 1 ml de suspensão de esporos de cada frasco e este, diluído sucessivamente em água esterilizada + TWEEN 80 (0,05%) (9 ml) até possibilitar a contagem dos esporos em hemocitômetro (Câmara de Neubauer).

A avaliação foi feita através da comparação da concentração da suspensão de esporos produzidos nos diferentes meios e aplicação de análise de variância, e do teste F.

Para o tratamento referente a diferentes concentrações de extrato de levedura foi desenvolvida uma análise de regressão dos resultados.

A patogenicidade do fungo desenvolvido nos diferentes meios de cultura foi avaliada mediante a aplicação de $1,42 \times 10^7$ esporos de *N. rileyi* sobre três folíolos de soja previamente desinfestados com hipoclorito de sódio 1% (1 minuto), lavados em água esterilizada e secos em condições ambiente. Os folíolos foram depositados sobre papel filtro dentro de placas de Petri com 9 cm de diâmetro. Cada placa recebeu 5 lagartas de *A. gemmatilis* (2ª instar); estas, permaneceram em contato e se alimentando das folhas tratadas durante 48 horas, sendo após, alimentadas com folhas de soja, até a morte ou empupamento.

Foram utilizadas 24 lagartas em cada tratamento, sendo estes: a) água + TWEEN 80 (0,05%) - Testemunha b) água + TWEEN 80 (0,05%) + $1,42 \times 10^7$ esporos produzidos em meios com 2% de extrato de levedura. c) água + TWEEN 80 (0,05%) + $1,42 \times 10^7$ esporos produzidos em meios com 4% de extrato de levedura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento referente a diferentes proporções de grãos e líquido para composição básica do meio de cultura, não influenciou de modo significativo ($P < 0,05$) sobre a produção de colônias de *N. rileyi* cultivados nestes meios (Quadro 1). Os tratamentos com fervura pré-esterilização e acréscimo de extrato de levedura aos meios, exerceram um efeito significativo ($P > 0,05$) sobre a produção de esporos do fungo (Quadro 1).

QUADRO 1 - Análise da variância do número de esporos de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson desenvolvidos sobre meios de cultura à base de grãos de arroz polidos, acrescido de diferentes proporções de água com diferentes concentrações de extrato de levedura e fervura pré-esterilização, com 12 dias de desenvolvimento. Dados transformados em $\sqrt{y + 1}$.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Blocos	3	2,41	0,80	6,35**
Tratamentos	17	4,87	0,29	2,30*
Proporção grão: água (A)	2	0,62	0,31	2,46
Concentração de extrato de levedura em água (B)	2	1,47	0,73	5,80**
Fervura pré-esterilização (C)	1	1,70	1,70	13,50**
A x B	4	0,58	0,14	1,11
A x C	2	0,34	0,17	1,35
B x C	2	0,02	0,01	0,08
A x B x C	4	0,14	0,03	0,24
Erro	51	6,42	0,12	
Total	71	13,70		

C.V. = 17,23

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

O aumento da produção de conídios, devido ao acréscimo de doses crescentes de extrato de levedura aos meios de cultura básico, se ajusta a uma equação de regressão linear, conforme mostram o Quadro 2 e Figura 1.

Em todos os tratamentos, o fungo desenvolveu-se esporulou ao redor de cada grão dos meios de cultura. A intensa produção de conídios nestes meios de cultura (Quadro 3), tem na grande superfície formada pelos grãos individualizados, um dos principais fatores responsáveis pela produção. Isso pode ser concluído, tendo como base o trabalho de CAMARGO (1981) que não obteve bons resultados quando ao crescimento de *N. rileyi* sobre meio de farinha de arroz que formava uma superfície plana disponível ao desenvolvimento do fungo, não sendo enriquecido com extrato de levedura.

QUADRO 2 - Análise de regressão para avaliar o efeito de diferentes concentrações de extrato de levedura sobre o desenvolvimento de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson cultivado sobre meio à base de grãos de arroz polidos, acrescido de diferentes proporções de água com fervura pré-esterilização. Dados transformados em $\sqrt{y + 1}$.

Causas da variação	GL	SQ	QM	F
Regressão linear	1	1,40	1,40	11,66*
Regressão quadrática	1	0,07	0,05	0,58
Erro	51	6,42	0,12	

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Segundo LOCH (1978) o extrato de levedura acrescido ao meio sabouraud-maltose-ágar, estimula a conidiogênese de *N. rileyi*. Neste caso, no tratamento fervura pré-esterilização, aumento da esporulação do fungo pode ser atribuída à maior penetração do extrato de levedura nos grãos devido ao modo de preparo do meio.

A produção de esporo no meio de arroz variou entre $1,63 \times 10^8$ e $5,26 \times 10^8$ esporos/ml de suspensão, enquanto no meio SMAY foram obtidos $1,18 \times 10^8$ esporos/ml de suspensão (Quadro 3).

QUADRO 3 - Efeito de meios de cultura à base de grãos de arroz polidos, acrescidos de diferentes proporções de água com diferentes concentrações de extrato de levedura com e sem fervura pré-esterilização sobre a esporulação do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Porto Alegre, junho de 1984.

Proporção grãos : (g) : água (ml)	Concentração de extra- to de levedura em água (%)	Fervura pré-esteri- lização (minutos)	
		0	1
1,0 : 0,5	0	2,64*	4,64
	2	2,51	5,03
	4	3,08	4,65
1,0 : 1,0	0	1,63	2,49
	2	2,74	3,46
	4	3,45	5,26
1,0 : 1,5	0	1,85	1,96
	2	2,64	3,53
	4	2,93	3,60

SMAY = $1,80 \times 10^8$ esporos/ml (média de 4 repetições)

* N^o de esporos ($x \cdot 10^8$) por ml de suspensão (média de 4 repetições) de esporos coletados de diferentes meios de cultura com 12 dias de incubação.

Quanto aos custos, um litro de meio SMAY, no Brasil, custa em torno de US\$ 18,00, enquanto que 1000g de meio de cultura a base de arroz acrescido de 4% de extrato de levedura custa cerca de US\$ 3,00.

Os esporos produzidos no meio à base de grãos de arroz foram patogênicos a lagartas de *A. gemmatalis*, conforme mostra o quadro 4.

QUADRO 4 - Ação de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson cultivado em meio à base de grãos de arroz polidos, acrescido de 2 e 4% de extrato de levedura sobre lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). Porto Alegre, julho de 1984.

Tratamento sobre as lagartas	<i>Anticarsia gemmatalis</i>			Total	TL50 (dias)
	Nº de lagartas mortas		Pupas		
	Com sintoma do fungo	Sem sintoma do fungo			
Esporos produzidos em meio com 2% de extrato de levedura (+Tween 80 - 0,05%)	4	17	3	24	8
Esporos produzidos em meio com 4% de extrato de levedura (+Tween 80 - 0,05%)	6	16	2	24	11
Água + Tween 80 - 0,05%	0	18	6	24	

TL 50 = tempo letal para a morte de metade da população tratada.

Para a produção do fungo *N. rileyi* neste tipo de meio de cultura, deveriam ser desenvolvidos trabalhos quanto à seleção de estirpes do fungo que manifestem intensa esporulação neste meio de cultura, sem perder as características de patogenicidade.

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos nas condições do presente trabalho, podem ser tiradas as seguintes conclusões:

- o uso de grãos de arroz polidos é uma alternativa para produção de esporos de *N. rileyi*;

- extrato de levedura intensifica a esporulação de *N. rileyi*;
- fervura pré-esterilização de grãos aumenta a esporulação de *N. rileyi*;
- esporos de *N. rileyi* produzidos em meios de cultura à base de grãos de arroz polidos acrescidos de extrato de levedura mantém a patogenicidade a lagartas;
- é possível se produzir esporos de *N. rileyi* patogênicos, a baixo custo de produção.

AGRADECIMENTOS: Ao Prof. João Riboldi, pela orientação estatística e ao setor de Entomologia da UFRGS, pelas lagartas cedidas para o trabalho.

LITERATURA CITADA

- ALLEN, G.E.; GREENE, G.L.; WHITCOMB, W.H. An epizootic of *Spicaria rileyi* on the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in Florida. *Fla Ent.* 54(2): 189-191, 1971.
- AQUINO, M.L.N.; CAVALCANTI, V.A.L.B.; SENA, R.C.; QUEIROS, G.E. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarhizium anisopliae*. Recife, CODECAP. 1975 p. 11-31.
- BALARDIN, R.S. Meios de Cultura semi-sintéticos, agentes pre servantes e rotina para produção massal do fungo entomogêno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. 1984, 104p. (UFRGS). Por to Alegre. Tese de Mestrado
- BELL, J.V. Production and pathogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid media. *J. Invertebr. Pathol.* 28:129-130, 1975.
- CAMARGO, M. Crescimento e esporulação do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em diferentes meios de cultura. Piracicaba, USP, 1981. 51p. Tese de Mestrado.
- CORREIA, B.S. & SMITH, J.C. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*, in Paranã, Brasil; note. *Fla Ent.* 59: 103, 1975.
- GETZIN, L.W. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hübner). *J. Invertebr. Pathol.* 3: 2-10, 1961.

- IGNOFFO, C.M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: BURGESS, H.D., ed. *Microbial control of pests and plant diseases*. New York, Academic Press, 1981. p. 413-538.
- LOCH, L.C. *Exigências nutricionais e ambientes do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e seu desenvolvimento na presença de defensivos agrícolas*. Piracicaba, USP, 1978. 65 p. Tese de Doutorado.
- MARQUES, E.J.; VILAS BOAS, A.; PEREIRA, C.E.F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) em laboratórios setoriais. Boletim Técnico da PLANALSUCAR, Piracicaba, 3(2):5-23, 1981.
- PUTTLER, B.; IGNOFFO, L.P.; HOSTETTER, D.L. Relative susceptibility of nine caterpillar species to the fungus *Nomuraea rileyi*; notes. *J. Invertebr. Pathol.* 27:269-270, 1976.

RESUMO

Foi desenvolvido em 1984 na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, um experimento utilizando meio de cultura à base de grãos de arroz polidos para produção massal do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson.

Foram testados três fatores: a) proporção entre os componentes líquidos e sólidos do meio de cultura; b) adição de 2 e 4% de extrato de levedura ao meio de cultura; c) efeito de fervura pré-autoclavagem (1 min).

As três proporções entre líquido e sólido testadas não influenciaram de modo significativo ($P < 0,05$) sobre a produção de esporos do fungo, sendo que os outros tratamentos influenciaram.

O fungo produzido neste meio de cultura avaliado, manteve-se patogênico a lagartas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818.

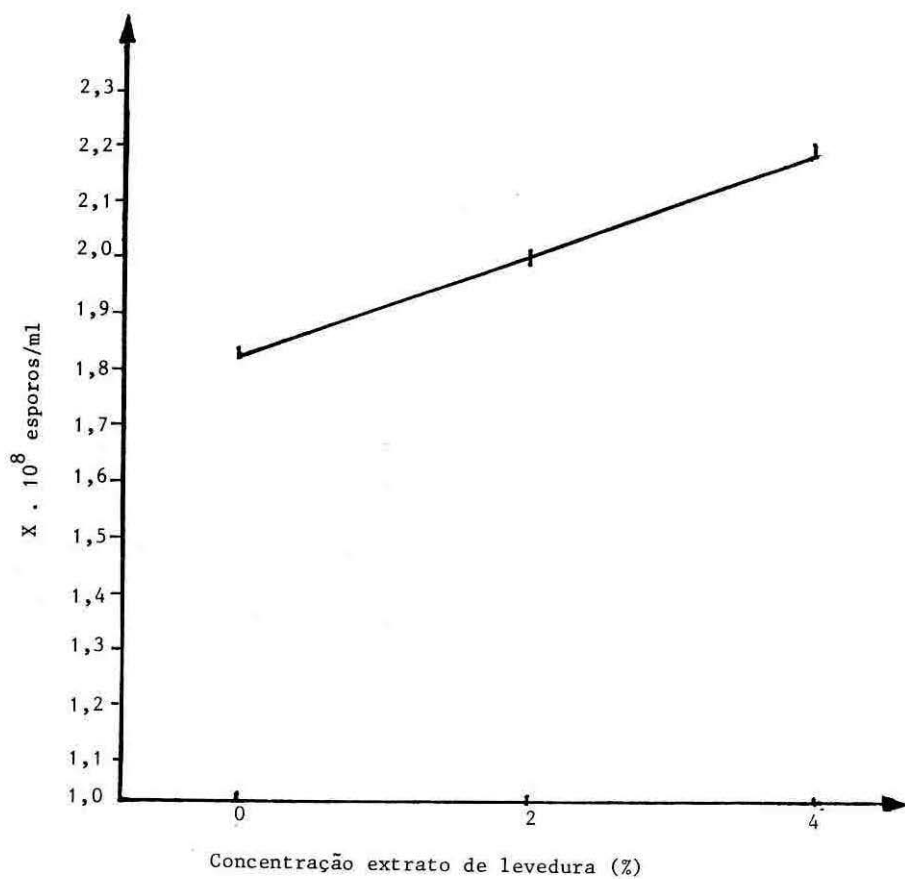


FIGURA 1 - Esporulação de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre meio de cultura a base de grãos de arroz polidos com diferentes concentrações de extrato de levedura. Dados transformados por $\sqrt{y+1}$.