CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO

Nomuraea rileyi (FARLOW) SAMSON EM

DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

MARGARETE CAMARGO

Eng.^a Agr.^a - F.F.A.L.M.

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo

Janeiro - 1981

*A meus avós, pais e
irmãos*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO pela orientação precisa e constante.
- Ao professor Dr. HIROSHI KIMATI pelas sugestões e incentivos constantes.
- À professora FLÁVIA MARIA DE OLIVEIRA e a engenheira agrônoma TERESA LOSADA VALLE por todas as sugestões técnicas e pela amizade e apoio demonstrados.
- Aos funcionários da Biblioteca Central da E.S.A.L.Q. e em particular a LUIZ CARLOS VERÍSSIMO pelo atendimento sempre eficiente e cordial.
- À professora ALINE P. KLEINER pelas explicações e sugestões.
- Ao professor ARIOVALDO SANT'ANNA pela realização das fotos incluídas neste trabalho.
- Aos funcionários do Laboratório do Setor de Genética de Microrganismos pela presteza nos serviços solicitados.
- Ao Dr. FLÁVIO MOSCARDI do I.A.P.A.R. (PR) por ceder as lagartas para isolamento do fungo.
- À Fundação Faculdade de Agronomia "Luiz Meneghel" pela oportunidade de realizar este trabalho.
- À Bibliotecária da FFALM CLEIDE BEZERRA pela ajuda na obtenção de referências bibliográficas.
- À professora MARIA APPARECIDA V. FELTRIN da FFALM pela ajuda nas análises estatísticas.

.iii.

- Ao professor IVAN DEMÉTRIO pela revisão de português.
- À família COSTA pelo constante apoio e otimismo transmitidos.
- A todos os colegas da F.F.A.L.M. e do Setor de Genética de Microrganismo da E.S.A.L.Q. que compartilharam momentos bons e maus durante a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Linhagem	15
4.2. Meios de cultura e soluções	15
4.3. Metodologia	19
4.3.1. Produção de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i>	19
4.3.2. Influência de diferentes meios de cultura no crescimento radial de <i>Nomuraea rileyi</i>	19
4.3.3. Influência de diferentes meios líquidos na germinação de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i>	19
4.3.4. Influência na germinação de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i> da passagem destes por diferentes concentrações salinas	20
4.3.5. Tamanho de conídios e diâmetro do núcleo. Número de núcleos por conídios de <i>Nomuraea rileyi</i>	20
4.3.6. Sobrevivência de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i> à luz ultravioleta	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Produção de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i>	22
5.2. Influência de diferentes meios de cultura no crescimento radial de <i>Nomuraea rileyi</i>	23
5.3. Germinação de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i> em diferentes meios de culturas líquidas.....	26
5.4. Influência de diferentes concentrações salinas na germinação de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i>	28

	<u>Página</u>
5.5. Tamanho de conídios e núcleos de <i>Nomuraea rileyi</i>	32
5.6. Sobrevivência de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i> submetidos a irradiação ultravioleta	33
6. DISCUSSÃO	36
6.1. Produção de conídios e influências de diferentes meios no desenvolvimento micelial de <i>Nomuraea rileyi</i>	36
6.2. Germinação de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i>	38
6.3. Os conídios de <i>Nomuraea rileyi</i> com relação ao seu tamanho, número de núcleos e sensibilidade à luz ultravioleta	40
7. CONCLUSÕES	42
8. SUMMARY	43
9. LITERATURA CITADA	44

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
I. Diâmetro da colônia (em mm) aos 8º, 14º e 20º dias após a <u>se</u> meadura nos meios de arroz (MA); Mínimo (MM); Completo (MC), Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e Sabouraud (SMA)	24
II. Análise de variância da influência dos diferentes meios de cultura no desenvolvimento micelial de <i>Nomuraea rileyi</i>	25
III. Análise de variância da influência dos diferentes meios de cultura no desenvolvimento micelial de <i>N. rileyi</i> com desdobramento	25
IV. Teste de Tukey para comparação de médias do diâmetro das colônias nos diferentes meios e nas diferentes épocas	26
V. Número de esporos germinados e não germinados e porcentagem de germinação em água e nos meios líquidos de Batata (BD), Meio Completo (MC) e Meio Mínimo (MM)	27
VI. Número de colônias obtidas após incubação de conídios de <i>N. rileyi</i> , que permaneceram durante 7 dias em água e nas soluções de 0,9 a 3,6% de NaCl	28
VII. Análise de variância da influência das diferentes concentrações salinas na germinação de esporos de <i>N. rileyi</i>	29
VIII. Análise de variância da influência das diferentes concentrações salinas na germinação de esporos de <i>N. rileyi</i> com desdobramento	29
IX. Análise de variância da influência das diferentes concentrações salinas na germinação de esporos de <i>N. rileyi</i> com desdobramento	30
X. Teste de Tukey para o número de colônias desenvolvidas após a passagem de esporos por soluções de diferentes concentrações salinas	30
XI. Tamanho de conídios e diâmetro do núcleo (μ m) de <i>Nomuraea rileyi</i>	32

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
XII. Número e porcentagem relativa de esporos sobreviventes de <i>N. rileyi</i> submetidos a irradiação ultravioleta	34

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
01. Produção de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i> a partir de fragmentos de micélio em BD durante 7 dias	23
02. Desenvolvimento dos conídios de <i>Nomuraea rileyi</i> após permanecerem 7 dias em H ₂ O e solução de 0,9 e 3,6% de NaCl, na concentração de 10 ³ esporos/ml	31
03. Curva de sobrevivência de conídios de <i>Nomuraea rileyi</i> irradiados com luz ultravioleta	35

1. RESUMO

Utilizando-se uma linhagem do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, isolado de *Anticarsia gemmatilis* Huebner obtida no Município de Londrina, Estado do Paraná, foi desenvolvida uma técnica eficiente para obtenção de conídios do mesmo. A técnica consta na colocação de fragmentos de micélio em tubo com meio líquido e após sete dias transferir todo o conteúdo do tubo para meio sólido o que produz uma esporulação abundante e rápida. Foi também ensaiado o desenvolvimento do fungo em diferentes meios sólidos constatando-se que o melhor meio foi o Sabouraud-Maltose-Ágar mesmo sem adição de extrato de levedura. A germinação de conídios em diferentes meios líquidos mostrou que o meio completo foi o mais eficiente e verificou-se também que a germinação de conídios e desenvolvimento de colônias em meio sólido são influenciadas por pré-tratamento em meio líquido com diferentes concentrações salinas.

Uma melhor caracterização dos conídios da linhagem estudada revelou que os mesmos têm diâmetro maior que variam de 3,04 a 5,04 μm e diâmetro menor variando de 1,89 a 3,15 μm . Uma grande maioria deles

.2.

(98,8%) é uninucleada e os núcleos têm diâmetros que variam de 1,16 a 1,78 μm . Estes dados aliados ao fato de que a linhagem cresce em meio mínimo e é bastante sensível à luz ultravioleta tornam-na favorável para futuros estudos genéticos na espécie.

2. INTRODUÇÃO

A cultura da soja vem se expandindo rapidamente no Brasil. De acordo com OLIVEIRA et alii (1980) a área cultivada com soja passou de 1%, no início da década de 50, para 20% do total da área cultivada do país e contribuiu com aproximadamente 13,6% das exportações brasileiras de janeiro a setembro de 1979.

Os custos de produção têm-se elevado significativamente nestes últimos anos. O custo variável de produção para a safra 1980/81 teve aumento de 161% se comparado com a safra anterior, segundo o DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL do Estado do Paraná.

Dada a importância da cultura na economia nacional, é bastante oportuno o desenvolvimento de tecnologia que proporcione um aumento na produtividade ou diminuição dos custos de produção.

O fungo *Nomuraea rileyi* é um inimigo natural da lagarta de *Anticarsia gemmatilis*, uma das principais pragas da soja. A ocorrência desse patógeno nos últimos anos, em condições naturais na região de Londrina (PR), tem sido tão notável, que pesquisadores e agricultores têm de-

monstrado interesse no aproveitamento deste microrganismo em substituição aos inseticidas.

Para que o controle biológico seja viável e eficiente é necessário o desenvolvimento de métodos específicos que englobam desde a produção do fungo em grande escala até as técnicas de aplicações no campo.

É conhecida a dificuldade de se trabalhar com fungos entomógenos em laboratório e em particular com *N. rileyi*. A maior parte da literatura sobre o assunto é estrangeira e dedicada ao crescimento do fungo em lagartas. São escassas as referências sobre o uso de meios artificiais para cultivo desse organismo.

Como uma das exigências para utilização do fungo na prática é a produção de um grande número de esporos viáveis e patogênicos, um dos objetivos deste trabalho foi a procura de um método em que se conseguisse uma esporulação abundante.

Outras finalidades propostas foram a obtenção de dados citológicos que fornecessem subsídios para futuros estudos genéticos e o início de pesquisas com uma linhagem isolada de campos brasileiros.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O fungo *Nomuraea rileyi* tem sido citado como entomógeno por vários pesquisadores, sendo que diversas espécies de insetos são consideradas suscetíveis.

Até 1974, havia uma discordância em relação a posição taxonômica desse microrganismo. CHARLES (1936), cita que um fungo proveniente de larvas de *Plusia brassicae* descrito por Farlow em 1883 foi por este denominado de *Botrytis rileyi*. Alguns anos após, Maublanc (1903) descreveu uma nova espécie com o nome de *Nomuraea prasina*, que foi também estudada por Sawada em 1919, que a considerou como pertencente ao gênero *Spicaria* e, portanto, o fungo passou a ser denominado de *Spicaria prasina*. Neste trabalho feito por CHARLES, ficaram demonstradas aparentes afinidades morfológicas de *Botrytis rileyi* com o gênero *Spicaria* e o organismo passou a ser designado por *Spicaria rileyi*.

Finalmente, KISH et alii, através de análise de material herbarizado, concluíram em 1974 que tais denominações se referiam ao mesmo microrganismo e o fungo foi reclassificado como *Nomuraea rileyi* (Farlow)

Samson.

A ocorrência de *S. rileyi* em lagartas de *Trichoplusia ni*, foi relatada por GETZIN (1961), que verificou a suscetibilidade de 5 ínstarés desse inseto sendo essas lagartas mais suscetíveis no 1º e 2º ínstar.

A patogenicidade de *Spicaria rileyi* à *Pseudoplusia includens* foi relatada por GUDAUSKAS e CANERDAY (1966) e esse fungo foi citado também como patogênico a esse inseto por BURLEIGH (1972) em estudo com níveis de população de *P. includens* em diversas culturas de soja.

No Brasil, HEINRICHS e da SILVA (1975), constataram a presença de *N. rileyi* em lagartas de *Anticarsia gemmatilis* e *Plusia* sp., em culturas de soja no Rio Grande do Sul. IGNOFFO et alii (1975a) relataram a incidência de *S. rileyi* associado a *T. ni* e *Platytena scabra*.

SPRENKEL e BROOKS (1975) aplicaram conídios de *N. rileyi* em soja, iniciando uma epizootia, e verificaram que a população de *Heliothis zea* e *P. scabra* baixou significativamente devido a essa aplicação.

A disseminação artificial e natural de *N. rileyi* em cultura de soja foi também estudada por IGNOFFO et alii (1976a). Nestes estudos concluíram que uma baixa população de lagartas infectadas pode produzir conídios suficientes para provocar uma epizootia e o controle de *T. ni* e *P. scabra*.

JOHNSON et alii (1976), estudando o efeito de defensivos aplicados em culturas de soja sobre *N. rileyi*, verificaram diferenças sig

nificativas na infecção de lagartas de *A. gemmatalis* pelo fungo, sendo que esses produtos impediram a ação do fungo.

KISH e ALLEN (1976a) conduziram experimentos para o desenvolvimento de um método para determinar a produção de conídios como função do tamanho do inseto e estabeleceram uma equação de regressão que poderia ser utilizada para estimar a produção de conídios de larvas de qualquer tamanho.

PUTTLER et alii (1976) ensaiaram a suscetibilidade de nove espécies de lagartas a *N. rileyi*. Os insetos utilizados foram *Spodoptera exigua*, *T. ni*, *P. scabra*, *Heliothis virescens*, *H. zea*, *Peridroma saucia*, *P. includens*, *A. gemmatalis* e *Pieris rapae*, sendo que apenas o último não se mostrou suscetível ao fungo.

O resultado de 3 anos de pesquisas sobre a incidência de parasitos e patógenos em lagartas de *H. zea*, *H. virescens* e *H. subflexa*, foi publicado por SMITH et alii (1976) onde citam o fungo *N. rileyi* como principal patógeno às lagartas destes insetos.

GALILLO et alii (1977) constataram novamente a presença do fungo em lagartas de *A. gemmatalis* e *Plusia* sp., coletadas de culturas de soja no Rio Grande do Sul.

O vento é considerado como um fator importante na disseminação de esporos de *N. rileyi* e GARCIA e IGNOFFO (1977) estudaram a influência da velocidade do vento no deslocamento de esporos, concluindo que na velocidade de 5,9 km, 90% dos conídios utilizados foram recuperados após 3 minutos.

O movimento de conídios através de solos arenosos e argilosos foi estudado por IGNOFFO et alii (1977a), que concluíram ser mínimo o movimento vertical dos esporos de *N. rileyi* em solos da maioria dos ecossistemas agrícolas. Grande parte dos conídios produzidos nas lagartas doentes pôde ser avaliada a poucas polegadas de profundidade do solo.

Os mesmos autores acima (1977b) avaliaram a transmissão do fungo através de sementes de soja tratadas com conídios. Os resultados demonstraram que essa técnica não seria tão eficiente com a pulverização das plantas com conídios, pois produziram baixo índice de mortalidade. A transmissão através do solo foi também verificada, encontrando-se conídios nas folhas e cotilédones demonstrando ser possível este tipo de transmissão e, conseqüentemente, um modo de infecção das lagartas.

SPRENKEL e BROOKS (1977) estudaram a sobrevivência dos conídios de *N. rileyi* no inverno em Carolina do Norte (E.U.A.). Os conídios mantiveram sua viabilidade após 281 dias de isolados de cadáveres de *H. virescens*.

ALVES et alii (1978) constataram a presença de *N. rileyi* em lagartas de *T. ni* em culturas de algodão no Estado de São Paulo.

A estabilidade de conídios de *N. rileyi* no solo foi verificada por IGNOFFO et alii (1978a) que concluíram que os conídios podem permanecer viáveis no solo e iniciar uma epizootia quando da instalação da nova cultura.

A eficiência de bactérias, fungos e vírus no controle de

H. zea em soja foi comparada por IGNOFFO et alii (1978b). Os resultados encontrados demonstraram que *N. rileyi* não teria valor imediato de aplicação como inseticida biológico para controle de várias espécies de *Heliothis* e foi especialmente ineficiente em larvas de 2º ínstar. Poderia ser contudo, uma prática profilática, aplicando-se conídios antes do aparecimento da população do inseto em níveis de danos econômicos..

Por outro lado, MOHAMED et alii (1978a) conduziram, em casa de vegetação, experimentos para determinar a infectividade de *N. rileyi* a *H. zea* e o efeito do número de aplicações em milho e concluíram que o fungo é capaz de causar uma certa mortalidade em lagartas do inseto, oferecendo potencial para uso como agente profilático e em sistemas de manejo integrado.

KING e BELL (1978) estudaram interações entre *Microplitis croceipes* e *N. rileyi* em lagartas de *H. zea* e verificaram que lagartas parasitadas com o braconídeo ficaram predispostas a infecção pelo fungo, mas este inibia o desenvolvimento do primeiro se a lagarta fosse infectada inicialmente com o fungo.

MOHAMED et alii (1978b) descreveram a histopatologia de *N. rileyi* em lagartas de *H. zea*. A germinação dos conídios ocorreu em 2 dias nestas lagartas e o tubo germinativo penetrou diretamente pela cutícula. Neste mesmo trabalho foi ensaiada "in vitro" a atividade enzimática do fungo, sendo que as evidências demonstraram que a produção de quitinase é fraca e os sinais de sua secreção apareceram 20 dias após a semeadura, enquanto que a atividade lipolítica e a proteolítica são bastante grandes, apa

recendo em 24 e 36 horas, respectivamente.

A patogenicidade do fungo às lagartas *Spodoptera litura*, *Achoea janata* e *Stenachroia elongella* foi ensaiada por PHADKE e RAO (1978). Foi verificado neste trabalho que, em condições de laboratório, duas aplicações de esporos em um intervalo de uma semana trouxeram mortalidade total à *Achoea janata* e uma alta mortalidade a *S. elongella*. O fungo não apresentou patogenicidade ao parasito de ovos de *Achoea janata*, *Telenomus proditor*.

HEINRICHS et alii (1979) verificaram a incidência de *N. rileyi* sobre lagartas de *A. gemmatalis* em lavouras de soja no Rio Grande do Sul. De acordo com estes autores, a infestação pelo fungo começou em fevereiro, durante o estágio de desenvolvimento dos frutos, quando a terceira geração de lagartas alcançou o seu ápice. Após 3 semanas, 100% das lagartas observadas sobre as folhas estavam infectadas pelo fungo.

IGNOFFO et alii (1979) utilizaram ratos para verificar os riscos que *N. rileyi* apresentaria como inseticida biológico. Nenhum efeito deletério foi observado nestes ratos e mais de 99,9% de infectividade do conídio foi perdida durante a passagem através do trato digestivo. Também nos olhos e pele de coelhos brancos tratados com conídios, não foi verificada nenhuma anormalidade histológica, clínica ou patológica.

Diversos meios de cultura foram utilizados para desenvolver o fungo.

GETZIN (1961); GUDAUSKAS e CANERDAY (1966) cultivaram *N.*

rileyi, em laboratório, utilizando um meio de cultura feito com 5% de batata, 1% de gema de ovo fresco, 1% de fermento seco ativo, 1% de Bacto-peptona e 1,5% de ágar. Os segundos autores obtiveram abundante esporulação num período de 7 a 10 dias, à temperatura de 25°C.

BEHNKE e PASCHKEC (1966) conseguiram intensa esporulação quando cultivaram o fungo em uma infusão de feno-ágar e concluíram, também, que o melhor crescimento vegetativo se verificava sobre farinha de trigo-ágar e Batata-Dextrose-ágar.

De acordo com LOCH (1978) o cultivo em Sabouraud-maltose-ágar com 1% de extrato de levedura foi feito por Belle Hamalle (1974).

KISH et alii (1974) usaram o malte-ágar à uma temperatura de 25°C para obtenção de conídios.

BELL (1975) usou meios de Sabouraud-maltose com 1% de extrato de levedura com e sem ágar, sendo que, no meio líquido, houve maior produção de conídios do que no meio sólido.

O meio de Sabouraud-maltose, com 1% de extrato de levedura, tem sido usado com frequência para o desenvolvimento do fungo. Entre os pesquisadores que o utilizaram são citados: IGNOFFO et alii (1975b); KISH e ALLEN (1976b); IGNOFFO et alii (1976b); GARCIA e IGNOFFO (1978); MOHAMED et alii (1978b); GARCIA e IGNOFFO (1979) e IGNOFFO et alii (1979).

LOCH (1978) utilizou em ensaios de exigências nutritiva, além do Sabouraud-maltose-ágar, o meio mínimo de PONTECORVO et alii (1953), modificado por Kimati (1975).

O meio de arroz tem sido empregado por diversos pesquisadores, como MOURA COSTA e MAGALHÃES (1974) e SANTOS (1978), para o cultivo do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae*.

Os esporos representam o fim e o começo do desenvolvimento do fungo. Possuem uma morfologia complexa e especializada que os diferenciam das células vegetativas.

Vários fatores influenciam na germinação de esporos e, entre eles, encontram-se a temperatura e a umidade, que são citados em diversas revisões sobre o assunto, como as de GOTTLIEB (1950) e COCHRANE (1960).

A temperatura ótima de desenvolvimento do fungo *N. rileyi* é 25°C, de acordo com IGNOFFO et alii (1976b). Segundo esses mesmos autores, em temperaturas maiores que 30°C ou menores que 15°C não ocorre esporulação, o que concorda com KISH e ALLEN (1976b) que citam este intervalo de temperatura para melhor desenvolvimento e esporulação.

O efeito da umidade sobre a esporulação e infecção de *N. rileyi* em lagartas foi verificado por KISH e ALLEN (1976b). A produção de esporos não ocorre abaixo de uma umidade de 70% e a produção máxima ocorre em 90%. Para a infecção de lagartas é necessário uma umidade relativa entre 50 e 70%, não tendo sido verificado a infecção em umidade relativa abaixo de 50%.

A influência da salinidade na germinação, desenvolvimento e esporulação de fungos tem sido pesquisada por diversos autores.

BORUT e JOHNSON, Jr. (1962) realizaram trabalhos onde pesquisaram a germinação e o desenvolvimento de vários fungos como *Paecilomyces puntóni*, *Trichoderma lignorum*, *Aspergillus wentii*, utilizando água destilada; 3,5% de NaCl; água do mar filtrada; água do mar autoclavada e água do mar sem nenhum tratamento. Dos resultados obtidos, concluíram que a germinação é influenciada por condições de salinidade.

BYRNE e GARETH JONES (1975) estudaram o efeito da salinidade na germinação de esporos de vários fungos terrestres e marinhos e concluíram que a germinação de esporos nos terrestres decresce com o aumento da salinidade.

MERT e DIZBAY (1977), utilizando os fungos *Aspergillus niger* e *Paecilomyces lilacinum*, estudaram o efeito da concentração salina no desenvolvimento e esporulação destes fungos, concluindo que ambos mostraram tolerância a 3% de NaCl.

MESSIAS (1979) e MESSIAS e AZEVEDO (1989) mediram esporos e núcleos de *M. anisopliae*, utilizando a técnica de coloração de PAES de BARROS (1977), e verificaram ainda que 95% dos esporos desse fungo eram uninucleados e 5% binucleados.

KISH et alii (1974) descreveram os conídios de *N. rileyi* como elipsóides ou cilíndricos, coloração verde-clara e verde quando em massa. O tamanho do conídio varia de 3,5-4,5 x 2-3,1 µm.

LEONARDI e ROSA (1980), efetuando a medição de conídios deste fungo, verificaram que estes variavam de 3,4-4,3 µm de comprimento por

2,0-2,9 μm de largura. Do total de conídios examinados, 92,2% eram mononucleadas, 6,3% eram anucleadas e 1,4% binucleados.

IGNOFFO et alii (1977c) verificaram que conídios de *N.rileyi* irradiados durante 4 horas com luz ultra-violeta perdiam sua patogenicidaa de. Conídios que foram protegidos causaram uma mortalidade de $76,6 \pm 7,8\%$ em lagartas de *Trichoplusia ni* enquanto que conídios desprotegidos ocasionaram uma mortalidade média de $10,3 \pm 9,8\%$.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagem

A linhagem do fungo *Nomuraea rileyi* foi isolada em Piracicaba de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* pela professora FLAVIA MARIA DE OLIVEIRA. Estas lagartas foram coletadas no Centro Nacional de Soja, de Londrina, Estado do Paraná e gentilmente cedidas pelo Dr. FLÁVIO MOSCARDI.

A linhagem foi isolada e mantida em meio de cultura Sabouraud-maltose-água e temperatura ambiente até o momento de seu uso.

4.2. Os meios de cultura e soluções utilizados foram os abaixo relacionados. Todos os meios de cultura foram autoclavados durante 15 minutos à 1 atmosfera.

4.2.1. Meio de Batata (BDA):

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 ml

4.2.2. Meio de Sabouraud-maltose-ágar (SMA):

Peptona	10 g
Extrato de levedura	10 g
Maltose	40 g
Ágar	15 g
Água	1000 ml

4.2.3. Meio de Arroz (MA):

Farinha de arroz	60 g
Ágar	15 g
Água	1000 ml

4.2.4. Meio mínimo (MM) (PONTECORVO e col., 1953):

NaNO ₃	6,00 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
KCl	0,50 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,50 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,00 g
Ágar	15,00 g
Água destilada	1000 ml

4.2.5. Meio completo (MC) (PONTECORVO e col., 1953):

NaNO ₃	6,00 g
KH ₂ PO ₄	1,50 g
KCl	0,50 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,50 g
FeSO ₄	0,01 g
ZnSO ₄	0,01 g
Glicose	10,00 g
Peptona	2,00 g

Caseína hidrolisada	1,50 g
Extrato de leveduras	0,50 g
Solução de vitaminas	1,00 ml
Ácido nucleico de leveduras	2,50 ml
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

4.2.6. Meio de Batata líquido (BD):

A mesma composição do BDA, sem a adição de ágar.

4.2.7. Meio completo líquido:

A mesma composição do meio completo sólido sem a adição do Ágar.

4.2.8. Meio mínimo líquido:

A mesma composição do meio mínimo sólido sem a adição do Ágar.

4.2.9. Solução de vitaminas:

Biotina	0,2 mg
Ácido p-aminobenzoico	10,0 mg
Aneurina ou Tiamina	50,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Ácido nicotínico	100,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada esterilizada	100 ml

A solução foi esterilizada em vapor fluente por 3 dias consecutivos e guardada em frasco escuro, sob clorofórmio, no refrigerador.

4.2.10. Hidrolisado de ácido nucleico de levedura:

Solução a)

Ácido nucleico de leveduras 2 g
Solução 1 N de NaOH 15 ml

Solução b)

Ácido nucleico de leveduras 2 g
Solução 1 N de HCl 15 ml

As soluções foram aquecidas por 20 minutos a 100°C, mistura
das, e o pH ajustado para 6,0. A mistura foi filtrada em seguida e o volu
me completado para 40 ml. A preparação foi guardada em refrigerador sob
clorofórmio.

4.2.11. Solução salina:

Cloreto de sódio 8,5 g
Água destilada 1000 ml

A solução foi distribuída em frascos com 9 ml cada um e au-
toclavados a uma atmosfera de pressão durante 15 minutos.

4.2.12. Solução de Tween:

A solução de tween foi feita adicionando-se tween 80 à
água destilada, numa concentração de 0,1% (v/v) e colocados 2,5 ml em ca-
da tubo que, depois de esterilizado, foi conservado em refrigerador.

4.3. Metodologia

4.3.1. Produção de conídios de *Nomuraea rileyi*

Fragmentos de micélio de 10 mm de diâmetro, cortados de uma placa do fungo cultivado em SMA durante 20 dias, foram colocados em tubos contendo 5 ml de meio líquido de batata (BD). Após 7 dias nesse meio líquido, todo o conteúdo do tubo foi vertido em placa contendo meio de batata (BDA) e incubados em temperatura ambiente.

4.3.2. Influência de diferentes meios de culturas no crescimento radical de *Nomuraea rileyi*

Para esse experimento foram utilizados os meios: completo, mínimo, de arroz, de batata e o Sabouraud-maltose-ágar. Fragmentos de micélio de 10 mm de diâmetro foram colocados nas placas, sendo em seguida incubadas em estufa a 28°C.

A avaliação foi feita medindo-se o diâmetro das colônias aos 8º, 14º e 20º dias, após a repicagem. Cada tratamento foi repetido 5 vezes e o delineamento usado foi o inteiramente casualizado.

4.3.3. Influência de diferentes meios líquidos na germinação de conídios de *Nomuraea rileyi*

Conídios de culturas de 20 dias foram utilizados para preparar uma suspensão de 10^7 esporos/ml. Esta suspensão foi feita colocando-se os esporos em "tween" 80, homogeneizado, e em seguida a contagem dos conídios foi feita em câmara de Neubauer. Diluições foram feitas até obter-se a concentração acima citada. Obtida essa concentração, foram distribuídas 1 ml da suspensão nos tubos contendo 9 ml dos diferentes meios

de cultura líquidos.

Os meios líquidos utilizados foram de batata (BD), mínimo (MM), completo (MC) e água. Cada meio com 3 repetições.

A contagem de esporos germinados e não germinados foi feita de 2 em 2 dias a partir do sexto, até o 26º dia. Foram contados 5 campos da câmara de Neubauer, sendo feita uma lâmina de cada tubo.

4.3.4. Influência na germinação de conídios de *Nomuraea rileyi*, da passagem destes por diferentes concentrações salinas

Um ml de uma suspensão de conídios de 10^7 esporos/ml obtida como no item 4.3.3. foi colocado em tubos com 9 ml de H_2O , 9 ml de uma solução 0,9% de NaCl e 9 ml de uma solução de 3,6% de NaCl.

Após 7 dias nestas soluções, foram feitas diluições até obtenção de concentração de 10^3 e 10^2 esporos/ml. Aliquotas de 0,1 ml foram semeadas em SMA, espalhadas com a alça de Drigalsky e colocadas em estufa a $28^\circ C$, durante 15 dias.

Cada tratamento foi feito com 4 repetições e a avaliação foi feita contando-se o número de colônias desenvolvidas nas placas.

4.3.5. Tamanho de conídios e diâmetro de núcleo. Número de núcleos por conídios de *Nomuraea rileyi*

Foram preparadas lâminas usando-se a técnica de coloração de PAES de BARROS (1977). Uma ocular micrométrica foi utilizada para medir 30 conídios e seus núcleos. Foi verificado, também, o número de núcleos por conídio.

4.3.6. Sobrevivência de conídios de *Nomuraea rileyi* à luz ultravioleta

Uma suspensão de conídios na concentração de 10^6 esporos/ml foi preparada de acordo com o item 4.3.3. Esta suspensão foi colocada em placa de Petri esterilizada e em seguida irradiada numa distância de 10 cm da fonte de luz ultravioleta com comprimento de onda de 2537 $\text{\AA}$. Antes da irradiação, foram feitas diluições em solução salina dessa suspensão e alíquotas de 0,1 ml de cada diluição semeadas em SMA. Após a irradiação nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos, o mesmo processo de semeadura foi repetido. Foram feitas 4 repetições de cada diluição e as placas foram incubadas em estufa a 28°C.

Após 12 dias de incubação foi feita a contagem das colônias desenvolvidas.

A determinação da porcentagem de sobrevivência nos diferentes tempos de irradiação foi feita tomando-se como 100% o número de conídios viáveis estimados nas amostras sem irradiação.

5. RESULTADOS

5.1. Produção de conídios de *Nomuraea rileyi*

Seis dias após vertido o conteúdo do tubo (BD mais o pedaço de micélio) em placa contendo BDA, houve uma intensa esporulação tomando toda extensão das placas. (Figura 1.)

Fig. 1 - Produção de conídios de *N. rileyi* a partir de fragmentos de micélio em BD durante 7 dias.

5.2. Influência de diversos meios de cultura no crescimento radial de *Nomuraea rileyi*

A média de dois experimentos, com 5 repetições para cada tratamento, está relacionada na Tabela I. A análise de variância é apresentada na Tabela II.

Tabela I - Diâmetro da colônia (em mm) aos 89, 149 e 209 dias após a semeadura nos meios de arroz (MA); Mínimo (MM); Completo (MC); Batata-Dextrose (BDA) e Sabouraud (SMA).

MEIOS	MA			MM			MC			BDA			SMA		
	8	14	20	8	14	20	8	14	20	8	14	20	8	14	20
1	21,5	41,5	61,0	23,0	40,0	54,0	31,5	51,0	72,5	30,5	48,0	65,5	34,5	56,5	77,5
2	23,5	44,0	62,0	23,0	38,5	54,5	31,5	51,0	71,5	29,0	49,0	67,0	31,5	53,0	76,0
3	23,0	41,5	64,0	25,0	39,5	53,0	30,0	47,5	71,5	30,0	47,0	65,0	33,5	54,5	77,0
4	24,0	43,5	64,0	24,5	38,0	52,5	30,5	49,5	71,0	28,5	46,5	66,0	31,0	53,0	75,5
5	23,0	42,5	64,0	23,0	38,5	51,5	32,0	49,0	71,0	29,0	45,0	65,0	32,0	53,5	76,0

OBS.: Em todos os meios houve somente crescimento micelial com exceção de pequena esporulação observada no meio SMA.

Tabela II - Análise de variância da influência dos diferentes meios de cultura no desenvolvimento micelial de *Nomuraea rileyi*.

CAUSA DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
meios (M)	4	2337,59	584,40	460,16**
épocas (E)	2	18053,84	9026,92	7107,81**
M x E	8	311,79	38,97	30,72**
resíduo	60	76,40	1,27	
TOTAL	74	20779,62		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

A análise de variância mostrou haver diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, as épocas e a interação épocas x meios. O resultado da análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade é apresentado na Tabela III e o teste de Tukey na Tabela IV.

Tabela III - Análise de variância da influência dos diferentes meios de cultura no desenvolvimento micelial de *N. rileyi* com desdobramento.

CAUSA DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
épocas	2	18053,84	—	—
meios/E ₁	4	376,46	94,12	74,11**
meios/E ₂	4	703,46	175,86	138,47**
meios/E ₃	4	1569,46	392,36	308,94**
resíduo	60	76,40	1,27	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela IV - Teste de Tukey para comparação de médias do diâmetro das colônias nos diferentes meios e nas diferentes épocas.

TRATAMENTOS	MÉDIAS (8 DIAS)	MÉDIAS (14 DIAS)	MÉDIAS (20 DIAS)
SMA	32,5 a	54,1	76,4
MC	31,1 ab	49,5	71,5
BDA	29,7 b	47,1	65,7
MA	23,0 c	42,6	63,0
MM	23,7 c	38,9	53,1

D.M.S. = 2,32

Médias acompanhadas da mesma letra não são diferentes entre si ao nível de 1% de probabilidade.

Os resultados demonstram que no 8º dia os meios de SMA e MC não se diferenciam significativamente. Uma diferença significativa é verificada, porém, no 14º e 20º dia. Para essas épocas, todos os meios se mostraram diferentes estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade, sendo o melhor meio o SMA e o mais desfavorável o MM.

5.3. Germinação de conídios de *Nomuraea rileyi* em diferentes meios de cultura líquidos

O número de conídios germinados e não germinados e a respectiva porcentagem de germinação, obtida de acordo com o Item 4.3.3., encontram-se na Tabela V.

Tabela V - Número de esporos germinados e não germinados e porcentagem de germinação em água e nos meios líquidos de Batata (BD), Meio Completo (MC) e Meio Mínimo (MM)*.

MEIOS	BD			MC			MM			ÁGUA		
	GERMI NADOS	NÃO GERMI NADOS	% DE GERMI NAÇÃO	GERMI NADOS	NÃO GERMI NADOS	% DE GERMI NAÇÃO	GERMI NADOS	NÃO GERMI NADOS	% DE GERMI NAÇÃO	GERMI NADOS	NÃO GERMI NADOS	% DE GERMI NAÇÃO
06	003	253	1,17	101	199	33,67	001	218	0,46	000	266	0,00
08	011	328	3,24	091	211	30,13	002	238	0,83	000	262	0,00
10	015	260	5,45	107	285	27,30	002	275	0,72	000	295	0,00
12	013	256	4,83	094	203	31,65	002	287	0,69	000	277	0,00
14	014	280	4,76	099	172	36,53	008	259	3,00	000	261	0,00
16	018	265	6,36	100	195	33,90	004	249	1,58	002	267	0,74
18	024	265	8,30	125	209	37,42	004	265	1,48	000	264	0,00
20	025	221	10,16	149	145	50,68	008	246	3,14	003	241	1,30
22	026	237	9,88	143	141	50,35	009	265	3,28	000	245	0,00
24	011	229	4,58	072	168	30,00	010	258	3,73	002	269	0,74
26	033	221	12,99	096	153	38,55	008	266	2,92	001	279	0,36

```
* total de 3 contagens.
```

Os resultados encontrados demonstram que a porcentagem de germinação de conídios desta linhagem é praticamente nula em água destilada esterilizada, e em meio mínimo. A melhor porcentagem de germinação foi obtida em meio completo entre os 20º e 22º dias após a semeadura dos esporos.

5.4. Influência de diferentes concentrações salinas na germinação de conídios de *Nomuraea rileyi*

Na Tabela VI estão colocados os números de colônias desenvolvidas em meio SMA por esporos que permaneceram durante 7 dias em água, solução 0,9% de NaCl e solução 3,6% de NaCl. Foram contadas as colônias nas concentrações de 10^3 e 10^2 esporos por ml, após 15 dias de incubação.

Tabela VI - Número de colônias obtida após incubação de conídios de *N. rileyi*, que permaneceram durante 7 dias em água e nas soluções de 0,9 e 3,6% de NaCl*.

REPETIÇÃO	H ₂ O		0,9%		3,6%	
	10 ³	10 ²	10 ³	10 ²	10 ³	10 ²
1	176	080	149	60	140	50
2	180	072	150	62	150	53
3	182	080	152	61	148	49
4	179	077	154	63	148	52

* média de dois experimentos.

A análise de variância apresentada na Tabela VII demonstra que os tratamentos são diferentes ao nível de 1% de probabilidade e indica diferenças significativas entre a germinação nas diferentes concentra

ções.

A análise de variância para o desdobramento dos graus de liberdade da interação meios $\times$ concentração são colocados nas Tabelas VIII e IX e o resultado do teste de Tukey na Tabela X.

Tabela VII - Análise de variância da influência das diferentes concentrações salinas na germinação de esporos de *N. rileyi*.

CAUSA DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
meios (M)	2	3751,74	1875,87	224,66**
concentração (C)	1	55008,37	55008,37	6587,82**
M $\times$ C	2	2026,13	1013,06	121,32**
resíduo	18	150,25	8,35	
TOTAL	23	59060,62		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela VIII - Análise de variância da influência das diferentes concentrações salinas na germinação de esporos de *N. rileyi* com desdobramento.

CAUSA DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
concentração	1	—	—	—
meios/10 ³ esporos	2	2505,50	1252,75	150,03**
meios/10 ² esporos	2	1396,50	698,25	83,62**
resíduo	18	150,25	8,35	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela IX - Análise de variância da influência das diferentes concentrações salinas na germinação de esporos de *N. rileyi* com desdobramento.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
Concentração/H ₂ O	1	20208,00	20208,00	2420,12**
Concentração/0,9% de NaCl	1	16110,12	16110,12	1929,36**
Concentração/3,6% de NaCl	1	18240,5	18240,5	2184,43**
resíduo	18	150,25	8,35	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Tabela X - Teste de Tukey para o número de colônias desenvolvidas após a passagem de esporos por soluções de diferentes concentrações salinas.

Tratamento	MÉDIA (Nº DE COLÔNIAS)	
	10 ³	10 ²
Água	179,25 a	77,25 c
0,9% de NaCl	151,25 b	61,50 d
3,6% de NaCl	146,25 b	51,00 e

D.M.S. = 5,86

Médias acompanhadas da mesma letra não apresentam diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade e tratamentos com letras diferentes divergem a este nível de significância.

Pelo teste de Tukey foi verificado que os conídios têm melhor germinação quando deixados em água, tanto na concentração 10³ como na 10² esporos/ml. Na concentração de 10³ esporos/ml a permanência dos co

nídios nas soluções salinas de 0,9 a 3,6% de NaCl não apresentou diferenças estatísticas significativas, mas esta diferença é acusada na concentração de 10^2 esporos/ml.

Um crescimento leveduriforme foi apresentado pelos esporos que permaneceram em água e em 0,9% de NaCl, o que não ocorreu com os mantidos em solução de 3,6% de NaCl. Este resultado pode ser observado na Figura 2.

Fig. 2 - Desenvolvimento dos conídios de *Nomuraea rileyi* após permanecerem 7 dias em H₂O (placa de cima) e solução de 0,9 (placa abaixo, à direita) e 3,6% de NaCl (placa abaixo, à esquerda), na concentração de 10^3 esporos por ml.

5.5. Tamanho de conídios e núcleos de *Nomuraea rileyi*.

Na Tabela XI encontram-se as medidas de maior e menor diâmetro de 30 conídios e os respectivos diâmetros dos núcleos.

Tabela XI - Tamanho dos conídios e diâmetro do núcleo(μm) de *Nomuraea rileyi*

Diâmetro maior	Diâmetro menor	Diâmetro do núcleo(μm)
4,62	2,73	1,26
4,83	2,83	1,47
3,78	2,31	1,26
3,99	2,73	1,16
4,41	2,73	1,26
5,04	2,52	1,36
4,72	2,83	1,26
5,04	2,42	1,47
4,83	2,31	1,47
3,78	1,89	1,47
3,04	2,10	1,26
5,04	3,04	1,16
4,94	2,42	1,26
4,72	2,73	1,68
3,99	2,83	1,68
4,20	2,52	1,68
4,41	2,52	1,58
4,30	3,04	1,78
4,83	3,15	1,58
4,09	2,52	1,16
4,72	3,15	1,26
4,51	2,31	1,16
4,41	3,04	1,26
4,52	2,62	1,26
4,41	3,15	1,36
4,20	3,04	1,16
3,88	2,73	1,36
5,04	2,47	1,58
4,20	2,31	1,68
4,20	2,31	1,78
$\hat{m} = 4,42$ $s = 0,47$	$\hat{m} = 2,64$ $s = 0,33$	$\hat{m} = 1,40$ $s = 0,20$

Foram determinados os intervalos de confiança ao nível de

5% de significância através da tabela de t, para 29 graus de liberdade, obtendo-se os seguintes resultados:

3,46 $\leq$ 4,42 $\leq$ 5,38 para diâmetro maior
 1,97 $\leq$ 2,64 $\leq$ 3,31 para diâmetro menor
 0,99 $\leq$ 1,40 $\leq$ 1,81 para diâmetro de núcleo

De um total de 1498 conídios, examinados para observação do número de núcleos presentes por esporos, foi encontrada a proporção de 1,20% de esporos binucleados sendo o restante uninucleado.

5.6. Sobrevivência de conídios de *Nomuraea rileyi* submetidos a irradiação ultravioleta

Na Tabela XII são apresentados os resultados da porcentagem de sobrevivência de esporos submetidos a irradiação ultravioleta, de acordo com o item 4.3.6.

As curvas de sobrevivência dos conídios estão representadas na Figura 3.

Tabela XII - Número e porcentagem relativa de esporos sobreviventes de *N. alleyi* submetidos a irradiação ultravioleta.

	1º EXPERIMENTO			2º EXPERIMENTO			3º EXPERIMENTO		
Tempo (minu- tos)	Conídi- os viáveis por ml ($\times 10^7$)	% relativa de sobrevivência	Conídi- os viáveis por ml ($\times 10^7$)	% relativa de sobrevivência	Conídi- os de por ml ($\times 10^7$)	% relativa de sobrevivência	Conídi- os de por ml ($\times 10^7$)	% relativa de sobrevivência	
0	7,352	100,00	4,795	100,00	10,970	100,00	10,970	100,00	
1	6,097	82,93	2,945	61,42	7,520	68,55	7,520	68,55	
2	2,160	29,38	1,402	29,24	5,515	50,27	5,515	50,27	
3	1,668	22,69	0,779	16,25	2,113	19,26	2,113	19,26	
4	0,223	3,03	0,396	8,26	1,229	11,20	1,229	11,20	
5	0,151	0,20	0,058	1,20	0,149	1,36	0,149	1,36

Fig. 3 - Curva de sobrevivência de cóndios de *Nomuraea rileyi* à irradiação ultravioleta.

6. DISCUSSÃO

6.1. Produção de conídios e influência de diferentes meios no desenvolvimento micelial de *Nomuraea rileyi*

Uma esporulação abundante foi conseguida em *N. rileyi* quando fragmentos de micélio eram deixados previamente em meio líquido (Fig. 1). Nota-se que a esporulação ocorre apenas a partir dos fragmentos de micélio nos bordos da massa micelial. O meio líquido vertido junto com o micélio no meio sólido deve favorecer o desenvolvimento e consequente esporulação do fungo. Além da umidade fornecida, alguns nutrientes do meio líquido devem interferir, pois estudos preliminares mostraram que colocando-se fragmentos de micélio em água apenas, não se obteve o mesmo resultado.

Um desenvolvimento inicial deve ocorrer no meio líquido e após ser vertido no meio sólido, há o crescimento e esporulação rápida, servindo talvez aquele desenvolvimento inicial como indutor para o desenvolvimento posterior. Em cerca de 48 horas todo o líquido foi absorvido possivelmente tanto pelo fungo que está se desenvolvendo, como pelo meio de cultivo sólido.

O exame microscópico do líquido não revelou a presença de células leveduriformes. Provavelmente, os pedaços de hifas em grande quantidade promovem esporulação abundante similarmente ao que é citado por LOCH (1978) só que em relação à semeadura de esporos. De acordo com este autor, para obtenção de esporulação é necessário recorrer ao método de inundação, semeando-se uma concentração de 10^4 a 10^6 esporos por ml.

BELL (1975) já havia produzido esporos de *N. rileyi* utilizando entretanto, ou o meio líquido ou o meio sólido. Verificou que uma maior produção de conídios ocorria no meio líquido mas, estes apresentavam pouca patogenicidade a *H. zea*. No presente trabalho, uma combinação de desenvolvimento do fungo, primeiramente no meio líquido e em seguida no meio sólido, produziu bons resultados referentes à produção de esporos. No entanto vai ser necessário a realização de ensaios de patogenicidade dessa linhagem em lagartas de *A. gemmatilis* para verificar o comportamento dos conídios produzidos por este método. Um outro aspecto que pode ser objeto de estudos futuros refere-se ao meio líquido utilizado. Este deve ser pesquisado não só com relação aos seus nutrientes como também pode-se ensaiar diferentes diluições da solução inicial e verificar os efeitos no crescimento e esporulação do fungo.

Dos diferentes meios de cultivo sólido ensaiados (Tabelas I a IV) demonstrou-se que o mais apropriado para o desenvolvimento micelial de *N. rileyi* é o Sabouraud-Maltose-Ágar (SMA). Estes resultados concordam com de outros autores que utilizaram esse meio para desenvolvimento do fungo (BELL, 1975; IGNOFFO et alii. 1975; KISH e ALLEN, 1976; LOCH, 1978). Para a linhagem utilizada no presente trabalho, o SMA foi o me-

lhor meio mesmo sem a adição de 1% de extrato de levedura usado rotineiramente para cultivo de fungo. LOCH (1978) concluiu que existem evidências indicando que ocorre algum fator que age favoravelmente sobre o crescimento e esporulação do fungo acelerando ambos os processos. Assim, poderia também ser utilizado outro meio de cultura mais econômico, como por exemplo o Batata-Dextrose-Ágar (BDA), adicionando-se apenas o extrato de levedura.

Embora o meio de arroz tenha sido usado com sucesso para o cultivo do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* por vários pesquisadores como MOURA COSTA e MAGALHÃES (1974) e SANTOS (1978), para a linhagem de *N. rileyi* aqui usada, ele não demonstrou bons resultados com desenvolvimento inferior ao verificado em BDA. O crescimento em meio mínimo, embora pequeno demonstra ser a linhagem utilizada prototrófica, ou seja, ela não necessita de outros requisitos além dos sais minerais e da fonte de carbono que existe neste meio. Essa talvez seja uma diferença entre a linhagem usada no presente trabalho e a utilizada por outros autores, o que justifica seu crescimento em SMA sem extrato de levedura. Também para estudos de genética e melhoramento da espécie essa linhagem deverá ser de valor uma vez que vai permitir o aparecimento de mutantes e desenvolvimento de processos parassexuais clássicos ou por fusão de protoplastos.

6.2. Germinação de conídios de *Nomuraea rileyi*

Os esporos de *N. rileyi* apresentam uma baixa porcentagem de germinação (Tabela V). Pode também ser verificado que fatores nutricional-

nais exercem influência sobre a germinação uma vez que os conídios quase não germinam em água e meio mínimo e maiores porcentagens de germinação se verificam em meio mais rico como o BD e igualmente o meio completo. Pelos resultados verificou-se que após 24 horas de incubação em meio líquido, os esporos não apresentam qualquer sinal de germinação. A contagem dos conídios germinados e não germinados foi feita a partir do 6º dia e o maior número de esporos germinados foi encontrado após o 20º dia de incubação. Outros fatores possivelmente poderão afetar as frequências de germinação. É sugerido então, que outros ensaios sejam realizados verificando-se também o efeito de agentes físicos como luz e temperatura, fatores importantes para a germinação de esporos de fungos como citam GOTTLIEB (1950) e COCHRANE (1960).

A concentração salina da solução onde foram deixados conídios de *N. rileyi* e posteriormente semeados, influi na germinação dos esporos quando estes são semeados em meio sólido (Tabelas VI a X). A absorção de água inicial parece favorecer o posterior desenvolvimento do esporo. Na concentração de 3,6% de cloreto de sódio há uma menor germinação ocasionada possivelmente pelo impedimento do conídio em absorver água. BYRNE e GARETH JONES (1975) estudando vários fungos terrestres, entre eles o *Penicillium notatum*, concluíram que a germinação de esporos destes fungos decrescem com o aumento da salinidade.

Como o melhor resultado foi obtido quando os esporos são mantidos em água destilada esterilizada, este poderia ser um método de melhorar e acelerar a germinação em lugar de semear os conídios diretamente em meio sólido. Outros sais, entretanto, poderiam ser empregados para ve-

rificar se os efeitos seriam modificados, com também na influência dos mesmos no tipo de desenvolvimento inicial leveduriforme ou não do fungo.

6.3. Os conídios de *Nomuraea rileyi* com relação ao seu tamanho, número de núcleos e sensibilidade à luz ultravioleta.

As dimensões dos conídios da linhagem de *N. rileyi* aqui estudada variaram de 3,04 a 5,04 μm de diâmetro maior por 1,89 a 3,15 μm de diâmetro menor (Tabela XI). Esses dados se comparados aos de KISH et alii (1974) que dão para o tamanho do conídio valores de 3,5-4,5 μm por 2,0-3,1 μm e de LEONARDI e ROSA (1980) que encontraram medidas de 3,4-4,3 μm por 2,0-2,9 μm , mostraram uma certa similaridade entre a linhagem usada no presente trabalho e os dos trabalhos citados, embora uma maior variabilidade no tamanho seja encontrada na linhagem aqui estudada.

Os dados de medidas dos conídios são importantes para futuras caracterizações de linhagens podendo ser um dos parâmetros utilizados na diferenciação dos diferentes isolados de localidades brasileiras, a semelhança do que vem sendo feito em *M. anisopliae* (AZEVEDO e MESSIAS, 1980).

A porcentagem de conídios uninucleados também mostra semelhanças com a encontrada por LEONARDI e ROSA (1980). De acordo com estes autores ocorreu uma proporção de 92,2% de mononucleados, 1,40% de binucleados e 6,40% de anucleados. O resultado conseguido no presente trabalho foi de 98,8% de mononucleados para 1,20% de binucleados. Não se observou porém conídios anucleados como os citados pelos autores acima o que é mais uma indicação de que a presente linhagem tem além das característi-

cas de prototrofia e maior variação de tamanho de conídios também variação com relação a outras linhagens no que se refere a número de núcleos nos conídios.

Com relação ao diâmetro do núcleo houve uma variação desde 1,16 μm até 1,78 μm .

Os conídios se mostraram sensíveis a irradiação de luz ultravioleta (Tabela XII e Fig. 3) e os resultados acusaram uma curva do tipo exponencial semelhante também a encontrada para *M. anisopliae* por OKINO et alii (1978). Os dados encontrados por estes autores indicam que a luz ultravioleta é bastante efetiva para causar letalidade em conídios de *M. anisopliae* apesar da pigmentação verde clara dos mesmos.

O fato de que a linhagem de *N. rileyi* usada apresenta uma grande proporção de seus conídios uninucleados e a sua sensibilidade à luz ultravioleta bastante acentuada, aliado ao fato de que conídios do fungo podem ser produzidos em grande quantidade pelo método desenvolvido no presente trabalho e que a linhagem usada pode crescer em meio mínimo e meio completo, fazem com que a mesma seja bem apropriada para futuros estudos genéticos onde mutantes auxotróficos poderão ser obtidos através de irradiação com luz ultravioleta. Isso poderia permitir a detecção de parassexualidade no fungo em questão à semelhança do que foi encontrado em outro fungo entomopatogênico, o *M. anisopliae* (MESSIAS e AZEVEDO, 1980) abrindo perspectivas para o posterior desenvolvimento da Genética e do Melhoramento genético de *N. rileyi*.

7. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões podem ser tiradas dos resultados obtidos:

1. A obtenção de conídios de *N. rileyi* pode ser feita através de fragmentos de micélio deixados em meio líquido em incubação e vertendo-se esse conteúdo após alguns dias em meio sólido.

2. O Sabouraud-Maltose-Ágar, mesmo sem a adição de extrato de levedura foi o melhor meio de cultura para o desenvolvimento da linhagem utilizada de *N. rileyi*. O melhor meio líquido para germinação de conídios foi o meio completo.

3. A germinação de conídios em meio sólido e presença de colônias leveduriformes é influenciada por pré-tratamento com diferentes concentrações de cloreto de sódio.

4. A alta frequência de conídios uninucleados, sua sensibilidade à luz ultravioleta e a capacidade de se desenvolver tanto em meio mínimo como em meio completo, tornam a linhagem de *N. rileyi* utilizada favorável para futuros estudos genéticos.

8. SUMMARY

A strain of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolated from *Anticarsia gemmatilis* Huebner in Londrina, State of Paraná, Brazil, was used in order to develop a technique for the production of conidia. The Technique consists in the development of mycelium fragments in test tubes containing liquid medium. After seven days incubation the test tube contents were transferred to solid medium. A rapid and abundant sporulation was obtained in this way. From different solid media tested the one which produced best results was Sabouraud-Maltose-Ágar even with no yeast extract added. The best liquid media for germination of spores was complete medium. Also, conidia germination and development of the colony on solid medium were influenced by pretreatment in different salt concentrations.

The conidia of the strain used have a size variable from 3.04 to 5.04 μm in length and 1.89 to 3.15 μm in width. 98.8% of the conidia were unicleated and presented nuclei which diameter varied from 1.16 to 1.78 μm . These data and the fact that the studied strain can grow on minimal medium and its conidia are quite sensitive to ultraviolet light make it very useful for future genetic studies.

9. LITERATURA CITADA

- ALVES, S.B., O. NAKANO, e K. NAKAYAMA, 1978. *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, eficiente patógeno de *Trichoplusia ni* (Huebner, 1802). Ecosistema, Espírito Santo do Pinhal, 3:77.
- AZEVEDO, J.L. e C.L. MESSIAS, 1980. Tamanho de conídios em diferentes isolados de *Metarhizium anisopliae*. Boletim sobre Controle Biológico das cigarrinhas por fungos, 2:10.
- BEHNKE, C.N. e J.D. PASCHKE, 1966. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles and *Aspergillus flavus* Link, entomogenous fungi of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubner) in Indiana and Wisconsin. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 8:103-8.
- BELL, J.V., 1975. Production and pathogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid media. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 26:129-30.
- BORUT, S.Y. e T.W. JOHNSON JR, 1962. Some biological observations on fungi in estuarine sediments. Mycologia, Bronx, 54:181-93.

- BURLEIGH, J.G., 1972. Population dynamics and biotic controls of the soybean looper in Louisiana. Environmental Entomology, Maryland, 1:290-4.
- BYRNE, P. e E.B. GARETH JONES, 1975. Effect of salinity on spore germination of terrestrial and marine fungi. Transactions of the British Mycological Society, London, 64:497-503.
- CHARLES, V.L., 1936. The synonymy of *Botrytis rileyi* Farlow. Mycologia, Bronx, 28:397-8.
- COCHRANE, V.W., 1960. Spore germination in plant pathology: an advance treatise. s.l., Academic Press, v.2.
- DEPARTAMENTO de Economia Rural, 1980. Acompanhamento da situação Agropecuária do Paraná, 6:52.
- GALILILEO, M.H.M., H.A. de O. GASTAL e E.A. HEIRINCHS, 1977. Ocorrência do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, do taquinídeos e himenópteros parasitos em *Anticarsia gemmatilis* Hubner e *Plusia* sp (Lepidoptera, Noctuidae) criadas em laboratório. Iheringia. Ser. Zool., Porto Alegre, 50:51-9.
- GARCIA, C. e C.M. IGNOFFO, 1977. Dislodgment of conidia of *Nomuraea rileyi* from cadavers of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 30:114-6.
- GARCIA, C. e C.M. IGNOFFO, 1978. A simplified diet-surface treatment technique for determining the infectivity of conidia of *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 32:398-9.

- GARCIA, C. e C.M. IGNOFFO, 1979. Sensitivity of *Nomuraea rileyi* to antibiotics, sulfonamides, and fungicidal substances. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 33:124-5.
- GETZIN, L.W. 1961. *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles, an entomogenous fungus of *Trichoplusia ni* (Hubner). Journal of Insect Pathology, Oxford, 3:2-10.
- GOTTLIEB, D., 1950. The physiology of spore germination in fungi. Botanical Review, 16:229-57.
- GUDAUSKAS, R.T. e T.D. CANERDAY, 1966. Pathogenicity of *Spicaria rileyi* to *Pseudoplusia includens*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 8:277.
- HEINRICHS, E.A., H.A. de O. GASTAL e M.H.M. GALILEO, 1979. Incidence of natural control agents of the velvetbean caterpillar and response of its predators to insecticide treatments in Brazilian Soybean fields. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 14:79-87.
- HEINRICHS, E.A. e R.F.P. da SILVA, 1975. Estudo de níveis de população de *Anticarsia gemmatilis* Hubner, 1818 e *Plusia* sp., em sojano Rio Grande do Sul. Agronomia Sulriograndense, Porto Alegre, 11:15-28.
- IGNOFFO, C.M., C. GARCIA e D.L. HOSTETTER, 1976(b). Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Environmental Entomology, Maryland, 5:935-6.

- IGNOFFO, C.M., C. GARCIA, D.L. HOSTETTER e R.E. PINNELL, 1977(a). Vertical movement of conidia of *Nomuraea rileyi* through sand and loam soils. Journal of Economic Entomology, College Park, 70:163-4.
- IGNOFFO, C.M., C. GARCIA, D.L. HOSTETTER e R.E. PINNELL, 1977(b). Laboratory studies of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*: soil-borne contamination of soybean seedlings and dispersal of disease larvae of *Trichoplusia ni*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 29:147-52.
- IGNOFFO, C.M., C. GARCIA, D.L. HOSTETTER e R.E. PINNELL, 1978(a). Stability of conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, in and on soil. Environmental Entomology, Maryland, 7:724-7.
- IGNOFFO, C.M., C. GARCIA, R.W. KAPP e W.B. COATE, 1979. An evaluation of the risks to mammals of the use of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, as a microbial insecticide. Environmental Entomology, Maryland, 8:354-9.
- IGNOFFO, C.M., D.L. HOSTETTER, K.D. BIEVER, C. GARCIA, G.D. THOMAS, W.A. DICKERSON e R. PINNELL, 1978(b). Evaluation of an entomopathogenic bacterium, fungus and virus for control of *Heliothis zea* on soybeans. Journal of Economic Entomology, College Park, 71:165-8.
- IGNOFFO, C.M.; D.L. HOSTETTER, C. GARCIA e R.E. PINNELL, 1975(b). Sensitivity of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* to chemical pesticides used on soybeans. Environmental Entomology, Maryland, 4:765-8.

- IGNOFFO, C.M., D.L. HOSTETTER, P.P. SIKOROWSKI, G. SUTTER e W.M. BROOKS, 1977(c). Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. Environmental Entomology, Maryland, 6:411-5.
- IGNOFFO, C.M., N.L. MARSTON, D.L. HOSTETTER e B. PUTTLER, 1976(a). Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 27:191-8.
- IGNOFFO, C.M., B. PUTTLER, N.L. MARSTON, D.L. HOSTETTER e W.A. DICKERSON, 1975(a). Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria rileyi* associated with Noctuid pests of soybeans. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 25:135-7.
- JOHNSON, D.W., L.P. KISH e G.E. ALLEN, 1976. Field evaluation of selected pesticides on the natural development of the entomopathogenic *Nomuraea rileyi*, on the velvetbean caterpillar in soybean. Environmental Entomology, Maryland, 5:964-6.
- KING, E.G. e J.V. BELL, 1978. Interactions between a braconid, *Microplitis croclipes*, and a fungus *Nomuraea rileyi*, in laboratory-reared bollworm larvae. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 31:337-40.
- KISH, L.P. e G.E. ALLEN, 1976(a). Conidial production of *Nomuraea rileyi* on *Pseudoplusia includens*. Mycologia, Bronx, 68:437-9.
- KISH, L.P. e G.E. ALLEN, 1976(b). The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatalis* in soybean. Gainesville, Institute of Food and Agricultural Sciences, Agricultural Experiment Station, 48p.

- KISH, L.P., R.A. SAMSON e G.E. ALLEN, 1974. The genus *Nomuraea* Maublanc. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 24:154-8.
- LEONARDI, M. e Y.B. ROSA, 1980. Observações citológicas iniciais em *Nomuraea rileyi*. Ciência e Cultura, São Paulo, 32:698. Suplemento.
- LOCH, L.C., 1978. Exigências nutricionais e ambientes do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e seu comportamento na presença de defensivos agrícolas. Piracicaba, ESALQ, 65p. (Tese de Doutorado).
- MERT, H.H. e M. DIZBAY, 1977. The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinus* species. Mycopathologia, 61:125-7.
- MESSIAS, C.L. 1979. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ, 73p. (Tese de Doutorado).
- MESSIAS, C.L. e J.L. AZEVEDO, 1980. Parasexuality in the Deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycological Society, London, 75:144-8.
- MOHAMED, A.K.A., J.V. BELL e P.P. SIKOROWSKI, 1978(a). Field cage tests with *Nomuraea rileyi* against corn earworm larvae on sweet corn. Journal of Economic Entomology, College Park, 71:102-4.
- MOHAMED, A.K.A., J.V. BELL e P.P. SIKOROWSKI, 1978(b). Histopathology of *Nomuraea rileyi* in larvae of *Heliothis zea* and in vitro enzymatic activity. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 31:345-52.

- MOURA COSTA, M.D. e C.D. MAGALHÃES, 1974. Um novo meio de cultura para o fungo entomôgeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin parasita da cigarrinha das pastagens. Boletim do Instituto Biológico da Bahia, Salvador, 13:57-60.
- OLIVEIRA, F.T.G. de, J.B. da SILVA, D.L. GAZZONI e A.C. ROESSING, 1980. Manejo de pragas na cultura da soja. Brasília, EMBRAPA/DID, 23p. (Documento DDT, 1).
- OKINO, L.A.,; J.C. SILVA; A.L.L. DOS SANTOS; C.L. MESSIAS e J.L. AZEVEDO, 1978. Determinação da sobrevivência de *Metarhizium anisopliae* e duas espécies de *Aspergillus* à radiação gama. O Solo, Piracicaba, 70:32-36.
- PAES DE BARROS, J., 1977. Análise citogenética de algumas linhagens de *Aspergillus nidulans* (Eidem) Winter. Piracicaba, ESALQ, 81p. (Dissertação de Mestrado)
- PHADKE, C.H. e V.G. RAO, 1978. Studies on the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samon. Current Science, New Delhi, 47:511-2.
- PIMENTEL GOMES, F., 1963. Curso de estatística experimental. 2^a ed. Piracicaba, ESALQ, 384p.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONKS, K.D. MCDONALD e W.J. BUFTON, 1953. The genetic of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, New York, 5:141-238.

- PUTTLER, B., C.M. IGNOFFO e D.L. HOSTETTER, 1976. Relative susceptibility of nine caterpillar species to the fungus *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 27:269-70.
- SANTOS, A.L.L. dos, 1978. Influência de alguns fatores no crescimento, germinação e produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, ESALQ, 148p. (Dissertação de Mestrado).
- SMITH, J.W., E.G. KING e J.V. BELL, 1976. Parasites and pathogens among *Heliothis* species in the Central Mississippi Delta. Environmental Entomology, Maryland, 5:224-6.
- SPRENKEL, R.K. e W.M. BROOKS, 1975. Artificial dissemination and epizootic initiation of *Nomuraea rileyi*, and entomogenous fungus of Lepidopterous pests of soybean. Journal of Economic Entomology, College Park, 68:847-51.
- SPRENKEL, R.K. e W.M. BROOKS, 1977. Winter survival of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* in North Carolina. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 24:262-6.