**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Farlow) por
fermentação líquida e sólida**

Kauana Abati

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2015**

Kauana Abati
Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas

Produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Farlow) por fermentação líquida e sólida

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Abati, Kauana

Produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Farlow) por fermentação líquida e sólida / Kauana Abati. - - Piracicaba, 2015.
66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Metarhizium rileyi* 2. Blastosporos 3. Conídios 4. Entomopatógeno 5. Produção massal
I. Título

CDD 589.24
A119p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

DEDICO às pessoas mais especiais da minha vida:

Minha mãe, pelo exemplo de força que é.

Meu pai, o mais esforçado de todos os pais.

Meus irmãos, pelo incentivo direto ou indireto.

Meu grande amor, também o meu maior presente, por estar ao meu lado a cada passo da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, porque é a luz, fortaleza, proteção e sabedoria que dá sentido à minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Italo Delalibera Júnior, pela orientação, ensinamentos, sugestões, atenção depositada e por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), pela estrutura oferecida e apoio em tudo que fosse necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Acarologia e a todo seu corpo docente, administrativo, pela oportunidade de cursar o mestrado e de aprender com esses professores espetaculares.

Ao CNPq pela bolsa concedida, que permitiu que eu me mantivesse no tempo decorrido do trabalho.

À bióloga Solange Aparecida Vieira Barros, técnica do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, pela atenção, dedicação, ajuda e experiências transmitidas para a realização dos trabalhos.

À todos os colegas do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos. Em especial a Vanessa da Silveira Duarte e a Polyane de Sá Santos pelas sugestões e apoio, tanto na parte experimental quanto na redação do trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica, Vitor Isaías da Silva, Daniela Milanez Silva e Bianca Correa por toda ajuda oferecida e auxílio no desenvolvimento dos experimentos.

À Embrapa Soja pela disponibilização e liberação dos isolados. E em especial ao Prof. Doutor Daniel Ricardo Sosa-Gómez por toda sugestão em forma de orientação e apoio nos momentos de dúvidas.

Aos meus pais, Alfredo Abati e Irene Peretti Abati, inspiração e razão pela qual esse trabalho hoje se concretiza. Por tudo que lutaram e fizeram por mim que eu jamais serei capaz de retribuir.

Ao meu companheiro, Thiago de Souza Leal, que muitas e muitas vezes com todo o seu conhecimento me auxiliou em cada etapa desse trabalho. Além de todo amor, apoio, incentivo e companheirismo desprendidos a mim durante todos esses anos.

A minha família mais próxima, irmãos, sobrinhos, cunhados, tios e tias, minha sogra Elielza Leal de Souza e meu sogro Luiz Gonzaga de Souza, por terem me acompanhando em tudo desde a graduação, oferecendo todo o apoio necessário, carinho e acolhimento.

À todos, o meu mais sincero Obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 <i>Metarhizium rileyi</i> (Farlow) Kepler, S.A. Rehner & Humber.....	17
3.2 <i>Metarhizium rileyi</i> no controle biológico de pragas	18
3.3 Características de <i>Metarhizium rileyi</i>	20
3.4 Técnicas de produção de <i>Metarhizium rileyi</i>	22
3.4.1 Produção <i>in vitro</i>	22
3.4.1.1 Produção via fermentação sólida	22
3.4.1.2 Produção via fermentação líquida	23
3.4.1.3 Produção via fermentação bifásica	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Procedência dos isolados de <i>Metarhizium rileyi</i> e preparação do inóculo	29
4.2 Produção de conídios do fungo <i>Metarhizium rileyi</i> por fermentação sólida.....	29
4.3 Produção de blastosporos do fungo <i>Metarhizium rileyi</i> por fermentação líquida.....	31
4.4 Análise dos resultados	35
5 RESULTADOS	37
5.1 Produção de conídios do fungo <i>Metarhizium rileyi</i> por fermentação sólida.....	37
5.2 Produção de blastosporos do fungo <i>Metarhizium rileyi</i> por fermentação líquida.....	37
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	57

RESUMO

Produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Farlow) por fermentação líquida e sólida

Metarhizium rileyi é um importante fungo patogênico a várias espécies de pragas desfolhadoras da família Noctuidae. Existe uma grande demanda para a produção em escala deste fungo, mas ainda não há produtos comerciais no mercado brasileiro. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a produção de conídios de *M. rileyi* por fermentação sólida usando diferentes grãos e cereais e a produção de blastosporos por fermentação líquida em meios com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Na produção de conídios em substrato sólido, foi empregado o isolado ESALQ 1305 em oito tratamentos com grãos/cereais incubados por 15 dias. Para os experimentos de produção de blastosporos em substrato líquido, foram conduzidos quatro experimentos sequenciais onde foram testados diferentes meios e concentrações de células oriundas do pré-cultivo e diferentes fontes e concentrações de carbono, nitrogênio, relação C:N e tempo de cultivo. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os substratos sólidos que resultaram em maior produção de conídios foram o feijão fradinho moído sem peneirar ($7,4 \pm 2,8 \times 10^8$ conídios.g⁻¹) e trigo moído peneirado ($3,3 \pm 1,2 \times 10^8$ conídios.g⁻¹). Nos experimentos de fermentação líquida a 300 R.P.M e 25 °C observou-se que os meios desenvolvidos por Jaronski e Jackson (2012) com relação C:N de 50:1, proporcionam as maiores concentrações de blastosporos de *M. rileyi*. Os melhores resultados foram obtidos no último experimento com o isolado ESALQ 1305 quando o pré-cultivo foi realizado com meio contendo 36 g.L⁻¹ de concentração de carbono e relação C:N de 50:1, posteriormente inoculado na razão de 10^5 blastosporos.mL⁻¹ nos meios de cultivo contendo 40 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ de carbono, tendo extrato de levedura como fonte proteica, obtendo-se concentrações de $3,6 \pm 1,6 \times 10^9$ blastosporos.mL⁻¹ e $4,0 \pm 0,6 \times 10^9$ blastosporos.mL⁻¹, respectivamente, após quatro dias. Os resultados demonstram a viabilidade da produção de blastosporos de *M. rileyi*, por fermentação líquida.

Palavras-chave: *Metarhizium rileyi*; Blastosporos; Conídios; Entomopatógeno; Produção massal

ABSTRACT

Production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi* (Farlow) by liquid and solid fermentation

Metarhizium rileyi is an important fungus pathogenic to various species of defoliating pests of the family Noctuidae. There is a great demand for mass production of this fungus, but there is still no commercial products in the Brazilian market. The objectives of this study were to evaluate the conidial production of *M. rileyi* by solid fermentation using different grains and cereals and the production of blastospores by liquid fermentation in media with different sources of carbon and nitrogen. In the production of conidia in solid substrate, the isolated ESALQ 1305 was used in eight treatments with grains/cereals incubated for 15 days. For the production of blastospores in liquid substrate, four sequential experiments were conducted using different media, concentrations of pre-cultivation, sources of carbon, nitrogen, C:N ratio and cultivation time where tested. Data were analyzed by the use of ANOVA and post hoc comparisons of means using the Tukey's test to 5%. The solid substrates resulting in higher production of conidia were black-eyed beans milled without sieving ($7.4 \pm 2.8 \times 10^8$ conidia.g⁻¹) and wheat milled and sieved ($3.3 \pm 1.2 \times 10^8$ conidia.g⁻¹). In the liquid fermentation experiments to 300 R.P.M. and 25 °C it was observed that the media developed by Jaronski and Jackson (2012) with C:N ratio of 50:1, provides the greatest concentration of blastospores of *M. rileyi*. The best results were obtained in the last experiment with the isolate ESALQ 1305, when the pre-cultivation was conducted in media containing concentration of carbon of 36 g.L⁻¹ and C:N ratio of 50:1, inoculated in the ratio of 10⁵ blastosporos.mL⁻¹ in culture media containing 40 g.L⁻¹ and 80 g.L⁻¹ of carbon, using yeast extract as protein source, obtaining the concentrations of $3.6 \pm 1.6 \times 10^9$ blastospores.mL⁻¹ and $4.0 \pm 0.6 \times 10^9$ blastospores.mL⁻¹, respectively, after four days. The results demonstrate the viability of high-yield production of blastospores of *M. rileyi* by liquid fermentation.

Keywords: *Metarhizium rileyi*; Blastospores; Conidia; Entomophatogen; Mass-production

1 INTRODUÇÃO

Metarhizium rileyi (Farl.) Kepler, S.A. Rehner & Humber, (= *Nomuraea rileyi*) é um fungo entomopatogênico que apresenta distribuição cosmopolita e já foi isolado a partir de muitos insetos, artrópodes e solos cultivados. Destaca-se por ser um importante agente de controle natural de lepidópteros da família Noctuidae (Lepidoptera) pela ocorrência de epizootias na população dessas pragas desfolhadoras (IGNOFFO, 1981; SOSA-GÓMEZ et al., 2003; BING et al., 2008). Dentre as cerca de 30 espécies de lepidópteros que o fungo ataca, destacam-se três espécies de importância agrícola: *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), que é uma das pragas mais prejudiciais da soja no Brasil (FARIA; TIGANO-MILANI; LECUONA, 1993). *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), uma importante praga polífaga conhecida por atacar plantações de algodão e soja (CZEPAK et al., 2013) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta do cartucho por causar danos no interior do fruto e das sementes, atacando diferentes culturas como arroz, milho, sorgo e algodão (HAY-ROE; MEAGHER; NAGOSHI, 2013).

A primeira etapa para a implementação de bioprodutos a base de fungos entomopatogênicos visando o controle de pragas é a produção em larga escala do patógeno. Para *M. rileyi* e outros fungos, essa primeira etapa pode acontecer tanto *in vitro* quanto *in vivo*. *In vivo* ocorre a produção de fungos sobre insetos, porém essa técnica apresenta baixo rendimento na quantidade de propágulos, em contrapartida é importante como método da manutenção da virulência dos isolados (IGNOFFO; GARCIA, 1991; ALVES; PEREIRA, 1998; DEVI et al., 2003). É utilizada visando inoculações em laboratório ou aplicação em pequenas áreas, sendo recomendada quando os próprios insetos são utilizados para disseminação do patógeno (ALVES; PEREIRA, 1998; SUJII; CARVALHO; TIGANO, 2002).

In vitro, a produção pode acontecer em meio sólido, líquido, ou, ainda, em fermentação bifásica (ALVES; PEREIRA, 1998). Na técnica de produção em meio sólido, os conídios são colhidos diretamente da placa e inoculados em substrato sólido (JARONSKI; JACKSON, 2012), em geral, produtos agrícolas ou veículo poroso inorgânico (BARLLET; JARONSKI, 1984). Todavia, tal procedimento apresenta desvantagens, pois a chance de contaminação é grande já que o tempo entre a inoculação e a germinação dos conídios é considerado longo (JARONSKI; JACKSON, 2012).

Mesmo com algumas dificuldades, meios líquidos podem ser empregados para produção de grande quantidade de patógenos, já que tal técnica favorece a obtenção de grandes

quantidades de propágulos submersos, em um pequeno espaço físico e pouco tempo (ALVES; PEREIRA, 1998). Os estudos feitos a partir desta técnica, visam manipular as condições nutricionais e ambientais durante todo o crescimento do fungo entomopatogênico no meio de cultura líquido, a fim de induzir um padrão de crescimento desejado ou avaliar o potencial do organismo selecionado para a produção de propágulos apropriados e eficientes no controle biológico da espécie alvo (JARONSKI; JACKSON, 2012).

Metarhizium rileyi é um fungo que apresenta alto potencial para controle de lagartas praga em sistemas agrícolas, pois além de ser altamente virulento é um fungo epizoótico. Com isso é de grande interesse o desenvolvimento de métodos de produção via fermentação sólida utilizando substratos que viabilizem economicamente a sua produção. Ao mesmo tempo faz-se necessário verificar a viabilidade de produção de blastosporos via fermentação líquida, pois estes propágulos podem ser produzidos em curto período de tempo quando comparado a produção via fermentação sólida.

2 OBJETIVOS

- 1- Avaliar a produção de conídios de *M. rileyi* por fermentação sólida usando diferentes grãos e cereais como substrato;
- 2- Avaliar a produção de blastosporos de *M. rileyi* por fermentação líquida com diferentes fontes de nitrogênio e carbono.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Metarhizium rileyi* (Farlow) Kepler, S.A. Rehner & Humber

Metarhizium rileyi (Farl.) Kepler, S.A. Rehner & Humber é um fungo pertencente ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Clavicipitaceae (KEPLER et al., 2014). Ao longo de sua classificação taxonômica, *M. rileyi* posiciona-se juntamente com outros fungos entomopatogênicos que produzem conídios pigmentados (KEPLER et al., 2012).

Anteriormente a redescritção de Kish, Samson e Allen (1974), que classificaram a espécie como *Nomuraea rileyi* (Farl.) Samson, esta, a partir do basônimo *Botrytis rileyi* Farlow descrito em 1883, foi renomeada como *Spicaria rileyi* (Farl.) Charles em 1936 e como *Beauveria rileyi* (Farl.) Gösswald em 1939. O nome *Nomuraea rileyi* foi empregado na literatura por quatro décadas, nas quais houve avanço no estudo dessa espécie, e por isso é o mais mencionado em estudos especializados.

Atualmente, após nova combinação de estudos moleculares, o fungo foi classificado como *Metarhizium rileyi* (Farl.) Kepler, S.A. Rehner & Humber (KEPLER et al., 2014). Nesse mesmo estudo, outras espécies dos gêneros *Chamaeleomyces*, *Metacordyceps*, *Nomuraea* e *Paecilomyces* foram movidas para *Metarhizium*, elevando de 11 para 30 o número de espécies desse último gênero. Dentro desse gênero destaca-se o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, espécie essa que é princípio ativo de diversos bioprodutos utilizados no mundo, e que continua sendo objeto de estudo para controle de insetos pragas.

Considerado um fungo entomopatogênico altamente epizootico, *M. rileyi* tem distribuição cosmopolita e já foi isolado a partir de muitos insetos e solos cultivados, destacando-se principalmente como um importante agente de controle natural da família Noctuidae (Lepidoptera) por meio da ocorrência de epizootias em populações de pragas desfolhadoras desta família (IGNOFFO, 1981; SOSA-GÓMEZ et al., 2003; BING et al., 2008). Morfologicamente, é caracterizado por conidióforos que variam de verde pálido ao verde acinzentado, dispostos sobre um micélio esbranquiçado, sendo que os conidióforos emitem ramos com 2-5 cadeias de conídios (3.5-4.5 x 2-3 µm) cilíndricos a elipsóides (HUMBER, 1997).

Trata-se de um fungo dimórfico com ciclo marcado por duas fases morfológicas: uma hifal/micelial e outra leveduriforme de corpos hifais (blastosporos) (PENDLAND; BOUCIAS, 1997). Como reportado por Boucias, Pendland e Latgè (1988), o ciclo é iniciado quando os conídios se anexam a cutícula do inseto através de interações hidrofóbicas e depois de 12-24

horas germinam, formando tubos germinativos que penetram na epicutícula e crescem através das regiões cuticulares até a epiderme atingindo a hemocele. Na hemocele, o crescimento do fungo muda de fase, passando da fase hifal para a fase de corpos hifais, os quais se replicam extensivamente por brotamento e por septação dentro da hemolinfa. Em 5-7 dias após o início da infecção, os corpos hifais não invasivos, que enchem a hemocele do hospedeiro, convertem-se sincronicamente em uma fase micelial invasiva. Assim, o micélio cresce e se ramifica por todos os tecidos do hospedeiro e dentro de 24 horas, após essa conversão, o inseto paralisa e morre. Na sequência o micélio se exterioriza e os conidióforos e conídios são produzidos, reiniciando um ciclo, quando esse conídio atinge um novo inseto hospedeiro.

A partir do ciclo citado, estudos têm mostrado que tanto a fase micelial quanto a fase de corpos hifais não são infectivas ao hospedeiro (MORROW; BOUCIAS, 1988). A baixa virulência do micélio se deve ao estímulo que essa fase exerce sobre os tipos celulares responsáveis pela encapsulação dos fragmentos miceliais (BOUCIAS; LATGÈ, 1987) bloqueando, portanto, a sequência do ciclo, sendo apenas a fase hifal a promotora da patologia no hospedeiro.

3.2 *Metarhizium rileyi* no controle biológico de pragas

Com grande potencial no controle de lepidópteros, *M. rileyi* infecta lagartas de cerca de 30 espécies dessa ordem, em especial aquelas da família Noctuidae, que são as mais sensíveis a esse patógeno (DEVI et al., 2003; SRISUKCHAYAKUL; WIWAT; PANTUWATANA, 2005). Dentre os hospedeiros desse fungo entomopatogênico, algumas são espécies de importância agrícola, como: *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens*, *Colias lesbia*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Plathypena scabra*, *Pseudoplusia includens*, *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* (GAZZONI et al., 1994; RIZZO; LA ROSSA, 1994; SRISUKCHAYAKUL; WIWAT; PANTUWATANA 2005), com destaque para: *A. gemmatalis*, *H. armigera* e *S. frugiperda*.

A. gemmatalis é uma das pragas mais prejudiciais da soja no continente americano (EDELSTEIN, 2002), inclusive no Brasil (FARIA; TIGANO-MILANI; LECUONA, 1993), migrando da região Centro-Oeste para as regiões subtropicais e temperadas do Sul do país (MOSCARDI et al., 2012). Conhecida por atacar plantações de algodão e soja, a lagarta do algodão, *H. armigera*, é uma importante praga polífaga e apresenta um rápido desenvolvimento da população e é resistente a todos os principais grupos de inseticidas (NATIONAL DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2007; CZEPAK et al., 2013). Já *S. frugiperda* é popularmente conhecida como lagarta do cartucho, por causar danos no interior dos frutos e das

sementes, sendo altamente polífaga e com linhagens de hospedeiros diferentes, o que lhe permite o ataque de diferentes culturas: arroz, milho, sorgo e algodão (HAY-ROE; MEAGHER; NAGOSHI, 2013). Neste sentido, a presença de *M. rileyi* como agente controlador das lagartas noctuídeas pode ser uma ferramenta para impedir que as populações das pragas cheguem ao nível de dano econômico nas suas culturas hospedeiras, evitando, dessa forma, o uso de pesticidas para o seu controle (FARIA; TIGANO-MILANI; LECUONA, 1993). Além, também, de representar um método economicamente e ecologicamente satisfatório (PERINOTTO et al., 2013).

Diversos trabalhos tem demonstrado o uso de *M. rileyi* para o controle biológico das pragas. Sujii, Carvalho e Tigano (2002) observaram a produção de conídios em cadáveres de *A. gemmatilis* em condições de campo e encontraram o início da esporulação entre dois e seis dias após a introdução dos cadáveres no campo. Além disso, em 10 das 12 datas de liberação dos cadáveres, todos os indivíduos apresentaram produção de esporos, mas nenhum lote alcançou a taxa de 100% dos indivíduos no nível de esporulação total, durante o período observado. Este resultado difere de trabalhos obtidos por outros autores em condições de laboratório, onde o processo de esporulação de *M. rileyi* se inicia um dia após a formação do micélio na superfície do cadáver do hospedeiro, e se completa com esporulação total, em três dias após a morte da lagarta (KISH; ALLEN, 1978).

Conídios de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e de *M. rileyi* foram aplicados em larvas e pupas de *H. armigera*. O melhor desempenho, entre os três fungos, foi o de *M. rileyi* com média de mortalidade acumulada para aplicação tópica de $86 \pm 5 \%$. Este trabalho de Hatting (2012), demonstrou que a mortalidade causada por *M. rileyi* foi significativamente diferente dos demais tratamentos e do controle.

Para avaliar a eficiência de *M. rileyi* contra *S. frugiperda* foi utilizada uma formulação granulada que consistia de partículas de 1 mm de diâmetro de gérmen desengordurado de milho (GDM) inoculadas com 10^7 conídios.g⁻¹ de matéria seca. A preparação protegeu os conídios da radiação UV e eliminou 80% da população de larvas de *S. frugiperda* em bioensaios de laboratório. A esporulação começou no nono dia, atingindo um rendimento máximo de 6×10^9 conídios.g⁻¹ de matéria seca, no 12º dia. Tendo em vista a concentração de conídios inicial nos grânulos (10^7 conídios.g⁻¹ de matéria seca), foi possível aumentar a concentração de conídios em 600 vezes utilizando este método (PAVONE et al., 2009).

Muitas são as estratégias de grande potencial para a formulação de agentes fúngicos biocontroladores, especialmente aqueles com alta taxa de crescimento (PAVONE et al., 2009), porém faz-se necessário o estudo de qual estrutura fúngica é capaz de controlar mais

eficazmente as populações de pragas. Por exemplo, os blastosporos de *M. rileyi* podem ser facilmente produzidos em meios líquidos, mas não são infectivos quando aplicados topicamente em larvas (RIBA; GLANDARD, 1980). Ignoffo (1981) sugeriu que corpos hifais podem ser usados como um inóculo de campo, se a forma de aplicação permitir a ocorrência de esporulação nas plantas. No entanto, a produção de conídios por um processo de produção em duas fases, em que os corpos hifais de culturas submersas são transferidos para uma superfície absorvente inerte adequado para a esporulação, pode ser praticável (HOLDOM; KLASHORST, 1986). Um estudo recente mostrou ser possível a obtenção de preparações miceliais de fungos entomopatogênicos para a produção de conídios infecciosos, entretanto, preparações com micélio de *M. rileyi* aplicadas no campo são muito susceptíveis a serem dessecadas antes mesmo da formação dos conídios (HOLDOM, 1986).

3.3 Características de *Metarhizium rileyi*

A virulência dos fungos entomopatogênicos é afetada por fatores ambientais como: temperatura, pH, umidade e luz que irão refletir a sobrevivência e persistência dos esporos para a esporulação, bem como o desenvolvimento da doença no hospedeiro (HAJEK; CARRUTHERS; SOPER, 1990). *M. rileyi* é altamente sensível as condições nutricionais e ambientais quando comparado com os outros entomopatógenos, o que de certa forma limita a sua produção massiva, formulação e comercialização (TRUMPER et al., 2004; SONG et al., 2013).

A faixa de temperatura ideal para germinação e penetração de *M. rileyi* no corpo do inseto é de 20 a 25 °C, quando analisada com insetos noctuídeos (GARDNER, 1985). O trabalho de Edelstein, Trumper e Lecuona (2005) confirma essa faixa de temperatura. Na faixa de temperaturas entre 18 °C e 28 °C, 50% das larvas morreram depois de 5 a 10 dias de infecção. Foram observadas maiores mortalidades (66 a 90%) entre 10 a 16 dias. Distintamente, a 16 °C, a sobrevivência das larvas infectadas diminuiu lentamente ao longo do tempo atingindo uma sobrevivência de 41% em 26 dias e 36% aos 29 dias após a infecção. Assim, conclui-se que a temperatura para o desenvolvimento de inimigos naturais pode contribuir substancialmente de acordo com as diferentes condições ambientais (PERDIKIS; LYKOURESSIS, 2002).

Em outro trabalho, com a mesma espécie de fungo, foi avaliado o efeito do pH como regulador da germinação, do crescimento diametral da esporulação e da eficácia da infecção via cutícula (AGUIRRE, 2009). O isolado Nm006 germinou rapidamente em todos os valores de pH que variavam de 4 a 9, sugerindo que este fungo não apresenta um intervalo curto de pH para germinação como é observado em outros fungos como *Penicillium chrysogenum*

(SAUTOUR et al., 2001). O crescimento diametral das colônias variou entre 21,3 mm a 39,3 mm, com maior velocidade de crescimento entre o pH 5 a 8, mostrando que se reduz os valores de pH para muito baixo ou muito alto, sendo o recomendável valores perto da neutralidade. Quando se comparou a esporulação entre as faixas de pH de 4 a 9 nenhum valor se destacou significativamente, definindo que pH não é regulador de esporulação. Para a eficácia do isolado a faixa de pH entre 4 e 6 foram as melhores, isso devido a atividade ótima da protease Pr1 e da Pr2, enzimas produzidas pelos entomopatogênicos para penetrarem na cutícula do inseto, serem ótimas em pH perto da neutralidade. Além disso, depois da degradação da proteína da cutícula, o microrganismo produz quitinase que também tem o seu pH ótimo entre 5 e 8 (ST LEGER; JOSHI; ROBERTS, 1998).

Outros dois fatores importantes para a produção de *M. rileyi* são a umidade relativa e o fotoperíodo. Tang e Hou (2001) testaram essas características em lagartas de *H. armigera*. A mortalidade de larvas de terceiro ínstar foi alta, quando estas sofreram pulverização dos conídios e foram mantidas incubadas de 4 a 48 horas sob 100% de umidade relativa, e subsequente esporulação só foi encontrada em cadáveres incubados a 95 e 100% de umidade relativa, em umidades mais baixas não ocorreu a formação dos conídios. Ainda, neste trabalho o outro fator trabalhado foi o fotoperíodo sob condições de fotofase total, fotofase 12h e escotofase. A mortalidade larval sobre fotofase total e fotofase 12 h não diferiram significativamente, mas foram superiores a mortalidade em escotofase. O LT₅₀ foi o menor em fotofase total e o mais longo na escotofase, indicando que *M. rileyi* necessita de luz para proceder a infecção mais rápida em *H. armigera*. A taxa de esporulação foi significativamente menor quando as lagartas foram incubadas sob escotofase. Além disso, a produção de conídios foi 20 vezes superior, sob as duas condições de fotofase do que sob escotofase.

Para entomopatógenos, surge outro aspecto importante que indica a sua associação em programas de manejo de pragas. A compatibilidade de fungos entomopatogênicos com inseticidas é de grande importância, pois estes produtos podem afetar os focos primários da doença, muito importantes para o início da epizootia no campo, como indicado no trabalho de Barbosa et al. (1997) que estudando o efeito de nove inseticidas utilizados no controle das pragas da soja sobre a infecção de *M. rileyi* em *A. gemmatilis*, constataram que apenas os inseticidas triclorfon e clorpirifós etil não afetaram a infecção natural, o que favorece o controle do fungo sobre a praga. Já os outros sete inseticidas comprometedores do processo de infecção natural foram: monocrotofos, metamidofós, endosulfan, *Baculovirus anticarsia*, diflubenzuron, tiodicarb e metil paration.

Com isso, na prática, para qualquer novo isolado, é necessário estudar a relação hospedeiro/fungo e, especialmente, a sua patogenicidade em várias condições ambientais (TANG; HOU, 2001) para a sua real aplicação como controle no campo (TANG; HOU, 1998).

3.4 Técnicas de produção de *Metarhizium rileyi*

3.4.1 Produção *in vitro*

3.4.1.1 Produção via fermentação sólida

Com algumas exceções, o principal e mais prático estágio infeccioso de ser produzido de *M. rileyi* é o conídio aéreo, o qual aparece na natureza em estruturas erguidas em contato direto com a atmosfera, como, por exemplo, nos cadáveres de insetos (JARONSKI; JACKSON, 2012). Nesse sentido, a produção em massa de conídios aéreos usando fermentação em substrato sólido é a maior aproximação do natural e pode ser o processo mais eficiente, consistindo da técnica de mais fácil execução em situações de baixa tecnologia, e, portanto, do principal método de produção na indústria atualmente (ALVES; PEREIRA, 1998; JARONSKI; JACKSON, 2012).

Nessa técnica, conídios colhidos diretamente da placa são utilizados como inóculo para produção em substrato sólido, em concentração inicial mínima de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ (JARONSKI; JACKSON, 2012). Após o crescimento e esporulação do fungo, os conídios são separados do substrato por meio de peneira, podendo, em alguns casos, se utilizar os resíduos do meio sólido, juntamente com o fungo, na preparação da formulação (ALVES; PEREIRA, 1998). Alves e Pereira (1998) descrevem a produção em sacos de polipropileno, em garrafas de vidro e em bandejas como os principais métodos de produção em meios sólidos.

Em relação aos substratos, consistem geralmente de algum produto agrícola ou veículo poroso inorgânico, sendo descrita uma grande variedade destes na literatura (BARLLET; JARONSKI, 1984). Meios deficientes em N, porém ricos em C, tendem a produzir a produzir maior quantidade de conídios aéreos (; KANAVAL, 1969; ROMBACH; AGUDA; ROBERTS, 1988). Assim, os meios usados na produção em massa de fungos são geralmente constituídos de produtos vegetais ricos em amidos, como arroz, aveia, batata, feijão e milho (LEITE et al., 2003).

O arroz é o substrato mais amplamente utilizado para a produção em massa de todos os fungos entomopatogênicos por manter as condições físicas, com uma superfície eficaz e apropriada para o crescimento do micélio, com equilíbrio nutricional adequado e condições específicas de acordo com os requisitos de isolamento, em termos de arejamento e umidade (ALVES et al., 2008; SAHAYARAJ; KARTHICK, 2008; PRAKASH; PADMAJA; KIRAN,

2008), sendo indicado, após autoclavagem, por Alves e Faria (2010) e nas formas parboilizado, polido e não polido por Jaronski e Jackson (2012). Esses últimos autores citados ainda indicam a possibilidade de se usar flocos de aveia e cevada.

Trabalhando com arroz como substrato para a produção de conídios, Méndez, Pozo e García (2009), usaram três tratamentos para *M. rileyi*: arroz inteiro pré-cozido em autoclave, arroz inteiro pré-cozido em água até esgotar e arroz inteiro pré-cozido em água fervente por 5 minutos, concluíram que os tratamentos em que o arroz foi pré-cozido em água foram superiores ao outro tratamento. Devi (1994), avaliando a produção de conídios dessa espécie testou grãos de sorgo com suplementação e verificou que o tratamento onde o sorgo estava suplementado com 1% de extrato de levedura resultou na maior produção de conídios. Já Lopes e Barros (1995), testando a virulência de conídios armazenados de *M. rileyi* contra *A. gemmatilis*, produziram o fungo em meios semi-sólidos a base de sorgo, soja e arroz, observando que os fungos produzidos em soja foram os que proporcionaram a maior mortalidade (49%) quando comparados ao sorgo e ao arroz, porém quando os conídios não foram armazenados os fungos produzidos nos meios a base de arroz e sorgo resultaram nas maiores taxas de mortalidade, 50 e 66%, respectivamente.

Ainda, Devi et al. (2003), obtiveram alta produção de conídios de *M. rileyi*, em substrato composto de cevada e extrato de cenoura, em detrimento a outros substratos produzidos a partir da combinações desses ingredientes com sorgo moído. Finalmente, o milho também pode ser utilizado como substrato para crescimento de *M. rileyi*, como demonstrado por Pavone et al. (2009), que utilizaram gérmen desengordurado de milho inoculados com 1×10^7 conídios.g⁻¹, produziram 6×10^9 conídios.g⁻¹ no 12º dia após a inoculação.

Todavia, a fermentação em substrato sólido apresenta desvantagens, pois a chance de contaminação é aumentada tanto no processo de transferência do inóculo para o substrato, que poder levar traços de bactérias, quanto no tempo decorrente, de 12 a 24 horas, entre a inoculação e a germinação dos conídios, o qual pode abrir espaço para a instalação de bactérias e/ou fungos saprófitos (JARONSKI; JACKSON, 2012). Exemplo dessa possibilidade de contaminação pode ser encontrada no trabalho de Devi et al. (2003), que tiveram problemas de contaminação dos meios sólidos a base de cenoura e cevada por *Penicillium* sp.

3.4.1.2 Produção via fermentação líquida

Produção de entomopatógenos via fermentação líquida é um método que pode ser empregado para a produção de grande quantidade de inóculo de patógenos, já que tal técnica favorece a obtenção de massa micelial, e, em algumas condições, blastosporos, ambos elevando

a quantidade da biomassa do fungo em um pequeno espaço físico e pouco tempo (JACKSON, 1997; ALVES; PEREIRA, 1998).

Identificar fatores ambientais e nutricionais que incrementam a produção de blastosporos durante o crescimento da cultura é um pré-requisito para o desenvolvimento de um processo de produção economicamente viável (MASCARIN et al., 2015a; 2015b). Nutrição, osmolaridade, pH, tamanho do inóculo e disponibilidade de oxigênio têm se mostrado como parâmetros cruciais para a otimização de processos de fermentação industrial usando fungos filamentosos pois afetam seu metabolismo, crescimento dimórfico e capacidade produtiva (DURAN; CARY; CALVO, 2011; LI et al., 2011).

Nesse contexto, a diversidade de fontes de C e N tem sido bastante explorada no desenvolvimento de meios de cultura (LEITE et al., 2003), especialmente daqueles a base de produtos naturais, levando a avanços na aplicação desses produtos nos processos de fermentação em larga escala (CONNORS, 2002; KAMPEN, 2014). Esse processo de substituição dos componentes nutricionais por um substrato complexo, barato e acessível é importante quando se busca a redução dos custos de produção do meio (JACKSON et al., 1996; JACKSON, 1997).

A fonte de carbono é o principal componente de um meio de cultura, pois fornece o elemento mais importante para construção das células, o carbono, que compõe cerca de 50% da biomassa seca, além de suprir a energia necessária para movimentar o metabolismo do microrganismo (KAMPEN, 2014). Segundo Connors (2002), como fonte de carbono podem ser utilizados: açúcares simples (glicose, frutose), dissacarídeos (maltose, lactose, sacarose), polímeros (amido ou dextrinas), polióis (glicerol, manitol) ou óleos (soja, canola). As fontes de carbono mais utilizadas são: amido, glicose, sacarose e diversos outros açúcares (LEITE et al., 2003).

Entretanto, a concentração de carbono no meio se mostra mais importante do que a fonte de carbono, uma vez que, além da disponibilidade, afeta também os níveis de osmolaridade e oxigênio dissolvido. Meios com concentrações altas de carbono (140 e 200 g.L⁻¹) tiveram seu potencial osmótico e nível de oxigênio dissolvido aumentados em relação aqueles com concentração mais baixa, fatores que atuaram em sinergia e incrementaram a produção de blastosporos de *B. bassiana* (MASCARIN et al.; 2015b).

Estudos apontam que a produção de blastosporos de *B. bassiana* se mostra inversamente correlacionada com a atividade de água do meio líquido, ou seja, meios com maior potencial osmótico produziram mais blastosporos (HUMPHREYS et al., 1989; IINCHI; TRINCI, 1987; YPSILOS; MAGAN, 2004). A osmolaridade do meio também afeta a forma, a velocidade de

germinação e a virulência de blastosporos de *B. bassiana* (MASCARIN et al., 2015b). Isso se explica quando se têm em vista que concentrações de açúcares mais elevadas tornam o meio rico em soluto (hiper-osmótico), o que faz com que este mimetize melhor o ambiente encontrado na hemolinfa dos insetos, que é caracterizado por uma alta pressão osmótica (WANG et al., 2008; CHAPMAN, 2013). Ainda, existe a possibilidade da pressão osmótica atuar como indutora do crescimento vegetativo e formação de blastosporos (MASCARIN et al., 2015b).

Para o oxigênio, níveis elevados desse elemento dissolvido no meio, juntamente com condições nutricionais apropriadas durante o crescimento em cultura submersa de *Metarhizium flavoviridae* e *Isaria fumosorosea*, foram requisitos críticos para o aumento da produção de blastosporos dessas espécies (ISSALY et al., 2005; JACKSON, 2012). Sua disponibilidade é dependente da transferência de oxigênio do ambiente para o líquido, a qual é incrementada com o uso de *Erlenmeyer baffled cell culture flasks*, altas velocidades de agitação, baixo volume de cultura no frasco (50 mL) e maior viscosidade do meio (MASCARIN et al., 2015b). Maiores concentrações de carbono atuam justamente sobre a viscosidade do meio, tornando-o mais viscoso, e um meio com tal característica tende a aderir mais facilmente à parede do frasco, aumentando a transferência de oxigênio para o meio pelo incremento da superfície de contato (GIESE et al., 2013). Em um sistema de retro-alimentação positiva, o crescimento de blastosporos, em detrimento de hifas, melhora a transferência de oxigênio em culturas de fungos (PETER et al., 2004; ISSALY et al., 2005; JACKSON, 2012).

Depois do carbono e oxigênio, nitrogênio é o elemento mais abundante nas células dos fungos e é um dos nutrientes mais caros para o meio de fermentação (ZABRISKIE et al., 2008). A fonte de nitrogênio é requerida para a síntese de todos os compostos nitrogenados da célula, tais como aminoácidos, purinas e pirimidinas, sendo que o tipo e a concentração desse elemento impacta diretamente a fisiologia do organismo (CONNORS, 2002). As fontes de nitrogênio mais refinadas são: caseína ácida hidrolisada ou caseína enzimaticamente hidrolisada, hidrolisados de soja ou proteínas de carne que podem efetivamente serem substituídas por outras fontes de nitrogênio como, extrato de levedura, semente de algodão (JACKSON; CLIQUET; ITEN, 2003; MASCARIN; ALVES; LOPES, 2010; JACKSON, 2012).

Entre as fontes de nitrogênio, produtos complexos como milhocina, extrato de levedura, peptonas hidrolisadas ou digeridas de semente de algodão ou proteínas de leite e farinha de soja vêm sendo aplicados com sucesso na composição de meios de cultura para produção de blastosporos por fermentação submersa (JACKSON, 1997; MASCARIN; ALVES; LOPES, 2010; KAMPEN, 2014; MASCARIN et al., 2015a). A vantagem desses produtos, em relação a

fontes puras, é que fornecem muitos outros nutrientes, como vitaminas e minerais, e costumam ter menor custo (KAMPEN, 2014; MASCARIN et al., 2015a).

A relação C:N é outro importante fator a ser considerado no desenvolvimento de meios de cultura, principalmente de meios líquidos que visam a produção de formas submersas (OTTATI-DE-LIMA, 2007). O ajuste adequado da proporção C:N é de vital importância para que uma determinada forma do fungo seja produzida mais profusamente em detrimento das demais, que não são desejáveis (JARONSKI; JACKSON, 2012), permitindo se alinhar o processo de formulação do meio com os objetivos da produção. Mascarin, Alves e Lopes (2010) ressaltam a importância de se determinar a relação C:N de substratos alternativos para produção de fungos, pois esses produtos têm composição nutricional variável, o que pode afetar grandemente os parâmetros de produção do fungo.

Para fungos da ordem Entomophthorales, Leite et al. (2003) relatam que o excesso de nitrogênio no meio de cultura pode inibir o crescimento do fungo devido ao acúmulo de metabólitos. Já para Hypocreales, diversos autores relatam que meios com baixa relação C:N não estimulam a esporulação, enquanto que aqueles com alta relação induzem a conidiogênese, resultando em maior produção de conídios (AQUINO, 1974; CAMPBELL et al., 1983; FRIGO; AZEVEDO, 1986; BIDOCHKA, 2002).

Meios ricos em C e, principalmente, N, tendem a produzir maior quantidade de formas vegetativas: blastosporos, corpos hifais e micélio (McCOY; KANAVAL, 1969; ROMBACH; AGUDA; ROBERTS, 1988). Em meios líquidos, o aumento das proteínas no meio estimula o crescimento vegetativo (blastosporos, corpos hifais e micélio) ao invés da esporulação (conídios) de *M. anisopliae* (REZENDE, 2009). O mesmo ocorre para o cultivo de *B. bassiana* em meio líquido, onde a relação C:N tem uma correlação positiva direta com a produção de conídios submersos e inversa com a de blastosporos (ROMBACH, 1989). Nesse estudo de Rombach (1989), a proporção de 4:1 resultou em um aumento na produção de conídios, enquanto a máxima produção de blastosporos foi obtida na proporção 1:1.

Relações C:N mais altas também têm sido utilizadas com sucesso, como nos trabalhos de Mascarin et al. (2015a; 2015b) que utilizaram relação C:N de 23:1 para produção metacíclica de blastosporos na fase da pré-cultura de *B. bassiana*. Todavia, a resposta pode ser variável, não havendo uma relação que seja regra para todos os entomopatógenos, como reportado por Gao et al. (2007) para isolados de *M. anisopliae*, que testaram diferentes relações C:N e obtiveram respostas diversas de acordo com o isolado cultivado. Diante disso, para fungos da ordem Hypocreales, Jaronski e Jackson (2012) desenvolveram um protocolo para teste com

várias proporções C:N em meios para cultura submersa, tendo em vista o ajuste do meio que melhor se adequa as condições da espécie/isolado.

São poucos os trabalhos com o objetivo de se produzir *M. rileyi* em meio líquido. Pode-se citar o de Garcia et al. (2006), que testaram isolados obtidos a partir de *S. frugiperda* a fim de avaliar a produção de biomassa em cinco meios líquidos, além de um meio com diferentes concentrações de melaço e extrato de levedura. Em todos os meios usados foram quantificados a biomassa, porém o meio que continha melaço e extrato de levedura foi o que produziu maior biomassa com 13,18 g.L⁻¹, superando em três vezes a produção dos demais tratamentos, isso porque, os fungos são favorecidos por meios de cultivos capazes de fornecer carbono e nitrogênio, como é o caso do meio apresentado. Ainda, ao analisar os meios com diferentes concentrações de melaço e extrato de levedura a maior quantidade de biomassa foi atingida na combinação 20 mL.L⁻¹ de melaço e 20 mg.L⁻¹ de extrato de levedura, onde a relação de carbono e nitrogênio era igual.

Observando a produção de biomassa de *M. rileyi* em quatro meios de cultivo líquidos: caldo de batata; batata e extrato de levedura; batata, extrato de levedura e cloreto de cálcio; e batata e cloreto de cálcio, Méndez, Pozo e Garcia (2007), encontraram que o meio batata e extrato de levedura apresentaram melhores resultados, produzindo aos sete e nove dias de cultura 5,46 e 8,24 g.L⁻¹ de massa seca, respectivamente. Ainda nesse íterim da procura de meios com boa produção de biomassa de *M. rileyi*, Méndez, Pozo e García (2009) avaliaram cinco meios líquidos á base de: melaço/extrato de levedura, melaço/torula, extrato de levedura, melaço e torula, tendo destaque o meio de melaço e extrato de levedura, que produziu aos três dias de cultura 11,67 g.L⁻¹ de massa seca. Tais resultados abrem a possibilidade do uso do melaço em substituição a glicose, de acordo com a disponibilidade.

Por fim, todos os estudos feitos a partir desta técnica, visam manipular as condições nutricionais e ambientais durante todo o crescimento do fungo entomopatogênico no meio de cultura líquido, a fim de induzir um padrão de crescimento desejado ou avaliar o potencial do organismo selecionado para a produção de propágulos apropriados e eficientes no controle biológico da espécie alvo (JARONSKI; JACKSON, 2012).

3.4.1.3 Produção via fermentação bifásica

Diante dos problemas de contaminação expostos acima para a produção em substrato sólido, Jaronski e Jackson (2012) recomendam o uso de cultura líquida de blastosporos como inóculo para o meio sólido. Tal processo é denominado fermentação bifásica, pois nele são utilizados meios líquidos ou semi-líquidos para crescimento vegetativo e, em seguida,

substratos sólidos para esporulação e obtenção de conídios (ALVES; PEREIRA, 1998), além de evitar a contaminação, este método permite a produção do fungo em menor tempo quando comparada a fermentação sólida, pois inocula-se uma grande quantidade de blastosporos e estes germinam e esporulam rapidamente.

O primeiro passo da fermentação bifásica consiste, portanto, da escolha de um meio que proporcione uma cultura abundante de blastosporos (JARONSKI; JACKSON, 2012). Os meios a serem utilizados devem promover a produção de blastosporos em detrimento ao micélio, pois uma suspensão contendo blastosporos se mistura mais facilmente e de maneira mais rápida ao substrato sólido, produzindo um crescimento mais uniforme e promovendo melhor aproveitamento do substrato (JARONSKI; JACKSON, 2012). Para tanto, Jaronski e Jackson (2012) sugerem um meio composto de glicose, caseína ácida hidrolisada, sais basais suplementados com traços de metais e vitaminas, além de antibiótico, sendo esse último importante para evitar a contaminação por bactérias. Alves e Faria (2010), por sua vez, recomendam que o meio líquido para produção de inóculos da fermentação bifásica seja formulado com extrato de levedura e glicose.

Já os substratos sólidos utilizados na fase final de produção podem ou não conter nutrientes para o fungo. Em certos casos, materiais não-nutritivos, como papel, vermiculita, bagaço de milho, palha de arroz e outros são utilizados com bons resultados (ALVES; PEREIRA, 1998). De acordo com Alves e Pereira (1998), nesse sistema o fungo recebe do meio líquido todos os nutrientes para o crescimento vegetativo e esporulação, pois, com a transferência da cultura para o substrato sólido, o resíduo do meio líquido ou as reservas acumuladas durante a cultura permitem a esporulação.

Especificamente para *M. rileyi*, Holdon e Klasshorst (1986) recomendam o meio SMY, composto de Sabouraud, maltose e extrato de levedura que, associado ao bagaço da cana, pode produzir aproximadamente $1,7 \times 10^8$ conídios.g⁻¹ de meio. Também o meio de batata pode ser utilizado, obtendo-se cerca de $1,2 \times 10^6$ conídios.g⁻¹ de meio, a custo relativamente baixo (NEVES, 1991). Finalmente, Mendéz et al. (2010), testando arroz inteiro, milho moído e trigo, todos cozidos por 5 minutos em água fervente, como substratos sólidos para produção de *M. rileyi* em processo bifásico, tendo produzido os inóculos em meio líquido à base de melaço e extrato de levedura, constataram que o arroz inteiro foi o melhor substrato para produção de conídios dessa espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil.

4.1 Procedência dos isolados de *Metarhizium rileyi* e preparação do inóculo

Foram utilizados dois isolados de *M. rileyi*, ESALQ 1305 do Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP, proveniente de *Spodoptera frugiperda* coletado em Piracicaba, SP. O outro isolado, Embrapa Nr 27, é oriundo da Coleção de Fungos Entomopatogênicos da Embrapa Soja, Londrina, PR que foi isolado a partir de *Anticarsia gemmatilis*, em Londrina, PR. Durante os experimentos, os isolados permaneceram preservados em tubos criogênicos com glicerol 10%. O isolado ESALQ 1305 é mantido em freezer -80 °C na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba/SP. Já, o isolado Embrapa Nr 27 encontra-se preservado na Coleção de Culturas de Fungos Entomopatogênicos da Embrapa Soja, Londrina/PR.

Para obter a suspensão inicial de inóculo, os isolados de *M. rileyi* foram multiplicados em Placas de Petri (90 x 15 mm) em Meio Completo – MC (0,36 g de KH_2PO_4 ; 1,05 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,60 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de KCl; 10,0 g de glicose; 1,58 g de NaNO_3 ; 5,0 g de extrato de levedura; 20,0 g de ágar e 1000 mL de água destilada) e os conídios foram espalhados com auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas contendo os isolados do fungos foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) por um período de 15 dias, a 26 ± 1 °C e 12 horas de fotofase para esporulação.

4.2 Produção de conídios do fungo *Metarhizium rileyi* por fermentação sólida

Nesse experimento foi utilizado o isolado ESALQ 1305. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, sendo composto por oito tratamentos e três repetições cada, e o experimento repetido três vezes no tempo. Os tratamentos pré-autoclavegem dos grãos e cereais testados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 - Processos de pré-autoclavagem e autoclavagem aplicados sobre os tratamentos utilizados na produção em substrato sólido do isolado ESALQ 1305 de *Metarhizium rileyi*

Tratamento	Grãos/cereais	Pré-autoclavagem	Autoclavagem*
1	Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) parboilizado grão inteiro	Água fervente por 5 minutos	Após escorrer a água
2	Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) parboilizado grão inteiro	Imersão em água por 50 minutos	Após escorrer a água
3	Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) parboilizado grão inteiro	Imersão em água por 60 minutos, escorrendo por 30 minutos e em água fervente por 5 minutos	Após escorrer a água
4	Feijão fradinho (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.) moído e sem peneirar	-	Com 10 mL de água destilada
5	Lentilha (<i>Lens culinaris</i> Medik.) grão inteiro	Imersão em água por 50 minutos	Após escorrer a água
6	Proteína de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) texturizada	Imersão em água por 50 minutos	Após escorrer a água
7	Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) grão inteiro moído e peneirado	-	Com 10 mL de água destilada
8	Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) moído (para quibe marca Hikari)	Imersão em água por 10 minutos	Após escorrer a água

* Todos os substratos foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C

Em todos os tratamentos, 50 g dos grãos ou cereais foram acondicionados em frasco de vidro redondos para reagentes em vidro borosilicato, graduado, com tampa rosqueável e dispositivo anti-gota da marca Schott com capacidade de 250 mL. Os frascos foram então fechados e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Após o resfriamento os grãos/cereais foram inoculados, em câmara de fluxo vertical, com 5 mL de uma suspensão com concentração de 1×10^8 conídios.mL⁻¹, excetos nos tratamentos com arroz parboilizado onde foram inoculados a concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹. Para uma completa distribuição da suspensão nos substratos sólidos os frascos foram agitados manualmente.

As unidades experimentais foram incubadas por 15 dias em câmara climatizada do tipo B.O.D. com temperatura de 26 ± 1 °C e 12 horas de fotofase. Os tratamentos foram estabelecidos baseado em estudos prévios onde foram ajustados parâmetros para determinar o melhor teor de unidade e aeração para cada substrato, evitando-se a aglutinação de partículas. Após este período, em cada frasco contendo os tratamentos foram adicionados 100 mL de água destilada mais 0,05% de espalhante adesivo Tween 80®. Para desprender os conídios do substrato, os frascos foram agitados manualmente e em seguida colocados em uma mesa

agitadora orbital (MARCONI – MA 140 CFT) programada para 300 rotações por minuto (R.P.M), onde permaneceram por 30 minutos. A contagem de conídios foi feita em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio (ZEISS AXIOSKOP PHASE CONTRAST DARKFIELD MICROSCOPE) a partir de diluições da suspensão original. A quantidade de conídios produzidos foi expressa por grama de substrato.

4.3 Produção de blastosporos do fungo *Metarhizium rileyi* por fermentação líquida

Experimento 1

Inicialmente, foram escolhidos dois isolados de *M. rileyi* (ESALQ 1305 e Embrapa Nr 27), para se testar a produção de blastosporos e de biomassa em quatro meios: MC (0,36 g de KH_2PO_4 ; 1,05 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,60 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g de KCl; 10,0 g de glicose; 1,58 g de NaNO_3 ; 5,0 g de extrato de levedura e 1000 mL de água destilada), este meio foi escolhido por ser um meio rico em nutrientes que poderia satisfazer as necessidades nutricionais do fungo (ALVES et al., 1998); SMY (10,0 g de neopeptona; 40,0 g de maltose; 2,0 g de extrato de levedura e 1000 mL de água destilada), meio citado na literatura como o ideal para o crescimento e esporulação desse fungo (ALVES et al., 1998); meio contendo extrato de levedura + melaço (20 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 20 mL.L⁻¹ de melaço), também descrito na literatura como bom para a produção de biomassa de blastosporos (GARCÍA et al., 2006); e o meio Serum Free Media (SF-900) Gibco® suplementado com 150 µL de Yeastolate Ultrafiltrado Gibco®, meio muito rico usado para culturas de células de insetos.

Os meios descritos acima, exceto o SF-900 foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos. O meio SF-900 já vem esterilizado pelo fabricante. Depois de resfriados foram transferidos 50 mL de cada meio em Erlenmeyer de 250 mL com três defletores que criam um fluxo turbulento, aumentando a superfície do líquido e permitindo uma maior troca gasosa (*Erlenmeyer baffled cell culture flasks*). Os meios foram inoculados, em câmara de fluxo vertical, com 2 mL de uma suspensão com concentração de 5×10^6 conídios.mL⁻¹ resultando em uma concentração final de $3,7 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹. Em seguida, os frascos foram acondicionados em incubadora refrigerada (Shaker) (MARCONI – MA 830) programada para 200 rotações por minutos (R.P.M) durante 10 dias, com temperatura controlada de 25 ± 1 °C, no escuro.

Dois, quatro, seis, oito e dez dias após a inoculação, foram tomadas amostras de 1 mL do meio + fungo em condições assépticas. Essas amostras foram utilizadas para medir a concentração de blastosporos produzidos utilizando-se câmara de Neubauer com auxílio de um

microscópio (ZEISS AXIOSKOP PHASE CONTRAST DARKFIELD MICROSCOPE). O acúmulo de biomassa foi quantificado no final da cultura no décimo dia de fermentação líquida. Para tanto, a biomassa foi separada do meio utilizando-se uma bomba de vácuo (PRISMATEC) acoplada a um funil de Buchner forrado com disco de papel filtro qualitativo (UNIFIL) de 12,5 cm de diâmetro. O peso seco da biomassa foi determinado pela secagem do papel filtro contendo a biomassa em estufa regulada para 60 °C, por 24 horas e depois novamente pesado. Os experimentos foram totalmente aleatorizados e foram realizados três vezes no tempo com três repetições cada.

Experimento 2

Na segunda série de experimentos foram testados meios para fermentação líquida para o isolado Embrapa Nr 27 (a escolha desse isolado ocorreu pela observação de que o seu crescimento e esporulação em placa era maior que a do outro isolado). Neste experimento foram utilizados dois meios para pré-cultura do fungo, e diferentes combinações de carbono e nitrogênio na cultura, como sugerido na literatura para produção metacíclica de blastosporos. Um dos meios usados na pré-cultura foi o meio proposto por Jaronski e Jackson (2012), que consiste em 81.0 g.L⁻¹ de glicose, 9.0 g.L⁻¹ de caseína ácido hidrolisada (SIGMA®) e sais basais suplementados com traços de metais que continham por litro: 4.0 g de KH₂PO₄; 0.8 g de CaCl₂.2H₂O; 0.6 g MgSO₄.7H₂O; 0.1 g FeSO₄.7H₂O; 37 mg CoCl₂.6H₂O; 16 mg MnSO₄.H₂O; 14 mg de ZnSO₄.7H₂O; além de vitaminas (SIGMA®): 500 mg de tiamina, riboflavina, pantotenato, niacina, piridoxamina, ácido tiótico, cada; 50 mg de ácido fólico, biotina, vitamina B12, cada, com um pH de 5,5 (JARONSKI; JACKSON, 2012). O outro meio usado na pré-cultura foi o meio SF-900 (Serum Free Media - Gibco®) suplementado com 150 µL de Yeastolate Ultrafiltrado Gibco®. Vinte cinco mililitros de cada meio foram acondicionados em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL com defletores. A fermentação da pré-cultura foi conduzida por quatro dias.

Os meios da pré-cultura foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos, exceto o meio SF-900 que já vem esterilizado pelo fabricante. Na sequência, os meios foram inoculados, em câmara de fluxo vertical, com 2 mL de uma suspensão com concentração de 5 x 10⁶ conídios.mL⁻¹. Finalizada a inoculação, os frascos com os meios permaneceram em incubadora refrigerada (Shaker) (MARCONI – MA 830) programada para 200 rotações por minutos (R.P.M) durante 4 dias, com temperatura controlada de 25 ± 1 °C.

Na tabela 2, é apresentada a concentração de carbono e a relação C:N correspondente a quantidade de glicose e caseína ácida hidrolisada. Nestes meios de cultura foi utilizada a mesma

solução basal de sais com traço de metais e vitaminas descrita anteriormente (JARONSKI; JACKSON, 2012).

Todas as culturas foram inoculadas com as pré-culturas numa razão 1:1 totalizando um volume de 50 mL em cada frasco de cultura, sem quantificar a concentração de blastosporos. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada (Shaker) (MARCONI – MA 830) programada para 200 rotações por minutos (R.P.M) com uma temperatura controlada de 25 ± 1 °C por mais oito dias. Para a quantificação dos blastosporos durante a fermentação da cultura, foi retirado 1 mL do meio líquido no segundo, quarto e oitavo dia. A biomassa foi quantificada no último dia da fermentação líquida. Para tanto, esta foi recuperada do meio utilizando-se uma bomba de vácuo (PRISMATEC) acoplada a um funil de Buchner forrado com disco de papel filtro qualitativo (UNIFIL) de 12,5 cm de diâmetro. O peso seco foi determinado pela secagem do papel filtro contendo a biomassa em estufa regulada para 60° C, por 24 horas e depois novamente pesado. Os experimentos foram totalmente aleatorizados e foram realizados três vezes no tempo sobre a condição de três repetições cada.

Tabela 2 - Concentrações de carbono, relações Carbono:Nitrogênio, glicose e caseína usadas na produção de blastosporos do isolado Embrapa Nr 27 de *Metarhizium rileyi* em fermentação líquida

Concentração de Carbono (g.L⁻¹)	Relação Carbono:Nitrogênio*	Glicose (g.L⁻¹)	Caseína hidrolisada (g.L⁻¹)
8	10:1	10.0	10.0
8	30:1	16.6	3.4
8	50:1	18.0	2.0
36	10:1	45.0	45
36	30:1	75.0	15.0
36	50:1	81.0	9.0

*Considerando-se: 40% de carbono na Glicose, 50% de carbono e 8% de nitrogênio na Caseína, 50% de carbono

Experimento 3

Para a sequência dos experimentos foi utilizada somente a pré-cultura proposta por Jaronski e Jackson (2012), já que esta apresentou resultados mais promissores para se alcançar concentrações desejadas de blastosporos. Nesta fase, foram testadas três novas concentrações de carbono, mantendo-se a razão C:N 50:1. Além disso, foram usadas duas diferentes fontes de nitrogênio, a caseína hidrolisada e o extrato de levedura (ACUMEDIA[®]) (Tabela 3).

As novas combinações de meios foram testadas para os dois isolados, Embrapa Nr 27 e ESALQ 1305, com a intenção de se fazer uma comparação da produção de blastosporos de ambos os isolados. A metodologia empregada foi a mesma relatada anteriormente, sendo o pré-

cultivo de 4 dias, variando apenas os período de cultivo que totalizaram cinco dias, sendo retiradas alíquotas para quantificação de blastosporos diariamente durante os cinco dias de cultivo.

Tabela 3 – Relações Carbono:Nitrogênio avaliadas na produção de blastosporos de *Metarhizium rileyi* em fermentação líquida após pré-cultivo com o meio de Jaronski e Jackson (2012)

Concentração de Carbono (g.L⁻¹)	Razão Carbono:Nitrogênio*	Glicose (g.L⁻¹)	Caseína hidrolisada (g.L⁻¹)	Extrato de Levedura (g.L⁻¹)
8	50:1	18	2	1,5
12	50:1	27	3	2,2
16	50:1	36	4	2,9
20	50:1	45	5	3,6

*Considerando-se: 40% de carbono na Glicose, 50% de carbono e 8% de nitrogênio na Caseína, 50% de carbono e 10% de nitrogênio no Extrato de Levedura

Experimento 4

Baseado nos resultados do teste anterior optou-se em trabalhar com meios com concentrações de glicose maiores do que as concentrações até então testadas (Tabela 4). Estudos recentes de Mascarin et al. (2015a, 2015b), revelaram também que maiores osmolaridade do meio poderiam propiciar maiores produções de blastosporos para outros fungos. Desta forma, neste experimento testou-se concentrações de carbono de 8, 20, 40 e 80 g.L⁻¹ e duas fontes de proteína, caseína hidrolisada e extrato de levedura (Tabela 4). Os experimentos seguiram a metodologia citada *a priori* exceto que neste estudo a concentração de blastosporos oriundos do pré-cultivo foi padronizada (para 1 x 10⁵ conídios.mL⁻¹ e 1 x 10⁶ conídios.mL⁻¹ em duas fermentação no tempo) e nas condições de fermentação que neste estudo foram efetuadas em frascos mantidos em mesa agitadora orbital (MARCONI – MA 140 CFT) programada para 300 rotações por minuto (R.P.M) em sala climatizada com temperatura de 25C e luz ambiente. Foi realizado apenas com o isolado ESALQ 1305, pois este foi o isolado que produziu maior concentração de blastosporos nos meios testados anteriormente. Foram utilizadas três repetições, mas o experimento não foi repetido no tempo.

Tabela 4 - Relações Carbono:Nitrogênio elaboradas para produção de blastosporos de *Metarhizium rileyi* em fermentação líquida

Concentração de Carbono (g.L⁻¹)	Razão Carbono:Nitrogênio*	Glicose (g.L⁻¹)	Caseína hidrolisada (g.L⁻¹)	Extrato de Levedura (g.L⁻¹)
8	50:1	18	2	1,5
20	50:1	45	5	3,6
40	50:1	90	10	7,2
80	50:1	180	20	14,4

*Considerando-se: 40% de carbono na Glicose, 50% de carbono e 8% de nitrogênio na Caseína, 50% de carbono e 10% de nitrogênio no Extrato de Levedura

4.4 Análise dos resultados

Foram analisados dados referentes a produção de conídios em substrato sólido, concentração de blastosporos produzidos em meio líquido e peso seco da produção em meio líquido, através da análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo Teste de Tukey com 5% de significância pelo software PaSt 3.08 (HAMMER, 2015). Para o isolado ESALQ1305 utilizado no experimento 3, observou-se uma grande variância entre as repetições e dentro de cada ensaio. Desta forma, os dados não foram analisados estatisticamente sendo apenas apresentados descritivamente através de regressões lineares elaboradas com auxílio do software Excel® do pacote Office 2010.

5 RESULTADOS

5.1 Produção de conídios do fungo *Metarhizium rileyi* por fermentação sólida

Os tratamentos que proporcionaram maiores produções de conídios de *M. rileyi* entre os substratos testados foram feijão fradinho moído sem peneirar ($74,0 \pm 28,2 \times 10^7$ conídios.g⁻¹ e trigo moído peneirado ($33,0 \pm 12,5 \times 10^7$ conídios.g⁻¹) (Tabela 5). A proteína de soja texturizada foi o substrato que proporcionou a menor quantidade de conídios, resultando em $0,2 \pm 0,1 \times 10^7$ conídios.g⁻¹. Os demais substratos, incluindo arroz parboilizado usado usualmente para a produção de outros fungos entomopatogênicos, apresentaram quantidades intermediárias quanto a produção de conídios.

Tabela 5 - Produção de conídios do isolado ESALQ 1305 de *Metarhizium rileyi* em diferentes substratos sólidos

Tratamento	Conídios por grama de substrato seco (x10 ⁷)*
1- Arroz parboilizado fervura por 5 min	2,6 ± 1,0 C
2- Arroz parboilizado umedecido por 50 min	12,3 ± 6,9 B
3- Arroz parboilizado umedecido por 60 min + fervura por 5 min	1,1 ± 0,3 C
4- Feijão fradinho moído sem peneirar umedecido por 50 min	74,0 ± 28,2 A
5- Lentilha em grão umedecida por 50 min	2,2 ± 0,8 C
6- Proteína de soja texturizada umedecida por 5 min	0,2 ± 0,1 D
7- Trigo em grão moído peneirado umedecido por 50 min	33,0 ± 12,5 A
8- Trigo moído umedecido por 10 min	3,1 ± 1,2 C

* Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, p < 0,05

5.2 Produção de blastosporos do fungo *Metarhizium rileyi* por fermentação líquida

Experimento 1

O meio que proporcionou a maior produção de blastosporos para ambos isolados foi o meio SFM (Serum Free Media) – SF-900, sendo que as maiores concentrações de blastosporos foram obtidas no quarto dia com $17,40 (\pm 0,95) \times 10^7$.mL⁻¹ e $8,52 (\pm 0,93) \times 10^7$.mL⁻¹ para o isolado ESALQ 1305 e Embrapa Nr 27, respectivamente (Tabela 6). O segundo melhor no meio foi aquele à base de Extrato de Levedura + Melaço (EL + Me). Entre o 4º e o 6º dia de cultivo do isolado ESALQ 1305, houve redução significativa na concentração de blastosporos do meio SF-900. Em nenhum dos meios foi observado aumento da concentração de blastosporos para este isolado a partir do 4º dia de fermentação.

A superioridade do meio SF-900 foi evidente para o isolado Embrapa Nr 27, sendo a produção neste meio superior aos outros meios em todos os dias de avaliação. O tempo de

cultivo ideal para o isolado Embrapa Nr 27, seria de 6 dias no meio EL + Me e de 4 dias para o outros meios.

Os maiores valores de peso seco de biomassa, que foi mensurado após 10 dias, foram encontrados nos meios EL + Me e SF-900 para o isolado ESALQ 1305 e no meio EL + Me para o isolado Embrapa Nr 27, seguido de SF-900.

Tabela 6 - Peso seco da biomassa e concentração de blastosporos de dois isolados de *Metarhizium rileyi* em quatro meios de cultura líquidos

<u>Isolados de</u> <u><i>Metarhizium</i></u> <u><i>rileyi</i></u>	<u>Tempo de</u> <u>cultivo (dias)</u>	<u>Meios de Cultura</u>			
		MC	SMY	EL + Me	SF-900
ESALQ 1305	Blastosporos ($10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	2	0,02 $\pm$ 0,01 Bb	0,01 $\pm$ 0,06 Bb	0,03 $\pm$ 0,07 Bc	0,15 $\pm$ 0,04 Ac
	4	3,53 $\pm$ 0,74 Ca	0,69 $\pm$ 0,28 Da	13,77 $\pm$ 3,33 Ba	17,40 $\pm$ 0,95 Aa
	6	5,04 $\pm$ 0,85 Ba	0,93 $\pm$ 0,29 Ca	10,84 $\pm$ 2,69 Aa	6,88 $\pm$ 1,38 Bb
	8	3,87 $\pm$ 0,41 Aa	1,10 $\pm$ 0,29 Ba	7,37 $\pm$ 1,53 Ab	4,83 $\pm$ 1,29 Ab
	10	3,65 $\pm$ 0,84 Ba	2,64 $\pm$ 1,38 Ba	5,58 $\pm$ 1,11 Ab	6,02 $\pm$ 2,11 Ab
	Peso seco ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	10	2,33 $\pm$ 0,26 B	2,31 $\pm$ 0,38 B	3,95 $\pm$ 0,15 A	4,21 $\pm$ 0,41 A
	Blastosporos ($10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	2	0,00 $\pm$ 0,00 Cc	0,00 $\pm$ 0,00 Cb	0,12 $\pm$ 0,00 Bd	0,25 $\pm$ 0,00 Ac
EMBRAPA Nr 27	4	1,10 $\pm$ 0,00 Ba	0,58 $\pm$ 0,03 Ca	1,84 $\pm$ 0,32 Bb	8,52 $\pm$ 0,93 Aa
	6	0,10 $\pm$ 0,05 Cb	0,17 $\pm$ 0,06 Ca	2,97 $\pm$ 0,43 Ba	6,32 $\pm$ 0,22 Aa
	8	0,29 $\pm$ 0,19 Cb	0,12 $\pm$ 0,10 Ca	1,38 $\pm$ 0,31 Bb	3,90 $\pm$ 0,92 Ab
	10	0,25 $\pm$ 0,13 Cb	0,92 $\pm$ 0,04 Ba	0,42 $\pm$ 0,09 Cc	3,28 $\pm$ 0,68 Ab
	Peso seco ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	10	1,92 $\pm$ 0,18 C	1,97 $\pm$ 0,45 C	5,07 $\pm$ 0,44 A	3,58 $\pm$ 0,40 B

MC – meio completo, SMY – Sabouraud Maltose Extrato de Levedura, EL + Me – Extrato de Levedura e Melaço, SF-900 – Gibco® Sf-900 II SFM Serum Free-Media. Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes entre si (Teste de Tukey, $p < 0,05$), onde, para cada isolado: letras maiúsculas referem-se à comparação entre os meios (linhas) e letras minúsculas entre os dias (colunas), quando aplicável

Experimento 2

As maiores concentrações de blastosporos nos meios com concentração de carbono e relação C:N iguais a ([C]-C:N) [8]-10:1; [8]-30:1; [36]-30:1 e [36]-50:1 foram obtidas quando o pré-cultivo foi realizado no meio SF-900, enquanto que nos meios [8]-50:1 e [36]-10:1, as maiores concentrações de blastosporos foram obtidas quando o pré-cultivo foi realizado no meio de Jaronski e Jackson (2012) [36]-50:1 (Tabela 7). As maiores concentrações de blastosporos foram observadas no 4º dia para todos os meios, havendo redução drástica d 4º para o 8º dia.

O maior rendimento de blastosporos foi observado nos meios [8]-50:1 e [36]-10:1 com a produção de $27,62 (\pm 0,12) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ e $24,44 (\pm 2,81) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ de blastosporos, respectivamente, com pré-cultivo em meio [36]-50:1. Quando o pré-cultivo foi efetuado em meio SF-900 não houve diferença significativa na produção de blastosporos em função do meio de cultivo no 4º dia.

Os maiores pesos de biomassa seca foram obtidos nos meios com pré-cultivo em SF-900 e cultivo em [C]= 36- C:N 30:1 e com pré-cultivo em [36]-50:1 e cultivo em [36]-30:1, obtendo $5,21 (\pm 0,75) \text{ mg mL}^{-1}$ e $6,08 (\pm 0,42) \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente.

Experimento 3

Considerando-se o alto custo do meio SF-900 e os resultados promissores com o pré-cultivo e cultivo nos meios descritos por Jaronski e Jackson (2012), decidimos continuar apenas com adaptações aos meios de Jaronski e Jackson (2012). O ingrediente mais caro no meio de Jaronski e Jackson (2012) é a caseína hidrolisada e neste experimento foi comparada a produção desta fonte de proteínas com o extrato de levedura, tanto no pré-cultivo quanto no cultivo. Para o isolado Embrapa Nr 27, a produção de blastosporos em meios com extrato de levedura foi superior aos mesmos meios com caseína como fonte proteica (Tabela 8). Com relação aos dias de cultura notou-se que para todos os meios, não há diferenças estatísticas na produção entre o 3º, 4º e 5º dias.

Não foram observadas diferenças significativas na produção de blastosporos entre os meios com caseína, sendo que a produção atingiu $10,04 (\pm 4,07) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ no meio [C] = 12- C:N 50:1, apenas no 5º dia. Para o extrato de levedura, a concentração de blastosporos foi de $14,7 (\pm 6,10) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ no 3º dia e $17,00 (\pm 7,30) \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ no 5º dia em meio [C] = 8- C:N 50:1.

Na avaliação do peso seco todos os meios obtiveram médias que não diferiram estatisticamente.

Tabela 7 - Peso seco da biomassa e concentração de blastosporos do isolado Embrapa Nr 27 de *Metarhizium rileyi* utilizando dois meios para pré-cultura e para cultura dois meios basais contendo seis variações de concentração de carbono e relação C:N

<u>Meios de Pré-Cultura</u>												
Jaronski e Jackson (2012) – [36]-50:1							SF-900					
[C]- C:N	[8]- 10:1	[8]- 30:1	[8]- 50:1	[36]- 10:1	[36]- 30:1	[36]- 50:1	[8]- 10:1	[8]- 30:1	[8]- 50:1	[36]- 10:1	[36]- 30:1	[36]- 50:1
Dias	Blastosporos (10^7 .mL ⁻¹)											
2	0,02±0,00 Db	0,01±0,00 Db	0,01±0,00 Db	0,01±0,00 Dc	0,01±0,00 Db	0,02±0,00 Db	3,81±0,62 Ab	2,00±0,36 Bb	2,37±0,42 Bb	3,00±0,17 Bb	1,12±0,26 Cb	1,87±0,30 Bb
4	0,66±0,11 Da	5,76±1,52 Ca	27,62±0,12 Aa	24,44±2,81 Aa	3,81±0,81 Ca	3,81±0,44 Ca	12,87±5,25 Ba	9,25±0,12 Ba	11,12±2,37 Ba	10,00±0,25 Ba	7,25±3,00 Ba	8,81±0,56 Ba
8	1,12±0,37 Ba	0,87±0,12 Bb	0,12±0,00 Cb	1,99±0,39 Bb	0,89±0,07 Cb	0,13±0,00 Cb	3,47±1,47 Ab	3,00±0,00 Ab	2,75±0,25 Ab	3,68±0,31 Ab	3,06±1,06 Ab	2,68±0,06 Ab
Peso seco (mg.mL ⁻¹)												
8	2,97±0,49 D	3,06±0,21 C	3,62±0,50 B	4,03±0,20 B	6,08±0,42 A	4,41±1,44 B	2,10±0,61 D	2,06±0,30 D	3,20±0,40 C	3,58±0,24 C	5,21±0,75 A	3,39±0,48 C

[Concentração de carbono]-relação C:N considerando-se: 40% de carbono na glicose, 50% de carbono e 8% de nitrogênio na caseína. SF-900 – Gibco® Sf-900 II SFM Serum Free-Media. Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$, onde letras maiúsculas referem-se à comparação entre os meios (linhas) e letras minúsculas entre os dias (colunas)

Tabela 8 - Peso seco da biomassa e concentração de blastosporos do isolado Embrapa Nr 27 de *Metarhizium rileyi* em quatro variações do meio (JARONSKI; JACKSON, 2012), utilizando duas fontes de nitrogênio, caseína hidrolisada e extrato de levedura, e diferentes concentrações de carbono e relações C:N

Meios de pré-cultura								
Caseína hidrolisada [36]-50:1					Extrato de Levedura [36]-50:1			
Meios de cultura								
Caseína hidrolisada					Extrato de Levedura			
[C]- C:N	[8]- 50:1	[12]- 50:1	[16]- 50:1	[20]- 50:1	[8]- 50:1	[12]- 50:1	[16]- 50:1	[20]- 50:1
Dias	Blastosporos (10 ⁷ .mL ⁻¹)							
2	0,14±0,12 Cb	0,47±0,36 Cb	0,58±0,31 Cb	1,41±0,48 Cb	4,97±1,13 Bb	6,38±169,4 Ab	2,70±16,0 Bb	6,41±269,0 Ab
3	8,24±7,75 Ba	7,96±3,86 Ba	7,43±4,61 Ba	9,74±4,61 Ba	14,70±6,10 Aa	13,75±4,94 Aa	10,62±3,55 Ba	14,03±4,98 Aa
4	8,60±7,72 Ba	9,88±4,35 Ba	8,10±4,60 Ba	8,77±4,61 Ba	11,61±3,86 Ba	11,53±4,83 Ba	13,28±3,86 Aa	14,46±4,94 Aa
5	8,50±6,55 Ba	10,04±4,07 Ba	9,51±4,28 Ba	8,72±4,01 Ba	17,00±7,30 Aa	13,66±3,77 Aa	15,91±5,22 Aa	14,46±5,67 Aa
Peso Seco (mg.mL ⁻¹)								
5	3,34±0,23 A	3,59±0,40 A	3,51±0,40 A	3,69±0,55 ^a	2,61±0,85 A	2,96±0,85 A	3,40±0,37 A	3,01±0,31 A

[Concentração de carbono]-relação C:N considerando-se: 40% de carbono na glicose, 50% de carbono e 8% de nitrogênio na caseína, 50% de carbono e 10% de nitrogênio no extrato de levedura. Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$, onde letras maiúsculas referem-se à comparação entre os meios (linhas) e letras minúsculas entre os dias (colunas)

Para o isolado ESALQ 1305, devido à grande variação nos valores encontrados entre os experimentos repetidos em diferentes datas e entre repetições ao longo do tempo, as quais inviabilizaram o cumprimento das premissas para análise de variância e dificultou ajustar os dados aos modelos, optou-se por utilizar regressões da produção de blastosporos no tempo para expressar descritivamente os resultados encontrados (Figura 1). Nas regressões, é possível observar uma tendência de aumento da concentração de blastosporos ao longo dos dias nos meios com caseína, sendo os picos obtidos no 4º ou 5º dia de cultura. Já para os meios a base de extrato de levedura a mesma tendência não foi observada. A grande variabilidade nos resultados pode estar associada à falta de padronização da concentração de células do pré-cultivo inoculados no cultivo.

Dentro os meios que continham caseína como fonte de nitrogênio, o valor máximo de blastosporos foi observado no meio [C] = 16- C:N 50:1, com produção de $55 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ no 5º dia. Para os meios com extrato de levedura a produção máxima de blastosporos foi no meio [C] = 16- C:N 50:1, com $49,75 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ no 5º dia.

Não houve diferença significativa na biomassa do isolado ESALQ 1305, sendo que o peso seco obtido variou de $2,68 (\pm 1,05) \text{ mg.mL}^{-1}$ a $5,29 (\pm 0,68) \text{ mg.mL}^{-1}$ (Tabela 9).

Tabela 9 - Peso seco da biomassa (mg.mL^{-1}) do isolado ESALQ 1305 aos 5 dias de cultivo de *Metarhizium rileyi* em quatro meios com diferentes concentrações de carbono e relações C:N. (JARONSKI; JACKSON, 2012), utilizando caseína hidrolisada e extrato de levedura como fontes de nitrogênio

Fonte de nitrogênio								
Caseína hidrolisada					Extrato de Levedura			
[C]- C:N	[8]- 50:1	[12]- 50:1	[16]- 50:1	[20]- 50:1	[8]- 50:1	[12]- 50:1	[16]- 50:1	[20]- 50:1
	$3,24 \pm 0,79^{\text{ns}}$	$3,27 \pm 0,96$	$2,68 \pm 1,05$	$4,12 \pm 0,43$	$4,96 \pm 0,69$	$4,32 \pm 1,87$	$5,29 \pm 0,68$	$4,82 \pm 0,70$

[Concentração de carbono]-relação C:N considerando-se: 40% de carbono na glicose, 50% de carbono e 8% de nitrogênio na caseína, 50% de carbono e 10% de nitrogênio no extrato de levedura. ^{ns} Médias não significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$

Figura 1 - Regressões que indicam a concentração de blastosporos do isolado ESALQ 1305 de *Metarhizium rileyi* ao longo dos cinco dias de cultivo. A) caseína hidrolisada, [C] = 8- C:N 50:1. B) caseína hidrolisada, [C] = 12- C:N 50:1. C) caseína hidrolisada, [C] = 16- C:N 50:1. D) caseína hidrolisada, [C] = 20- C:N 50:1. E) extrato de levedura, [C] = 8- C:N 50:1. F) extrato de levedura, [C] = 12- C:N 50:1. G) extrato de levedura, [C] = 16- C:N 50:1. H) extrato de levedura, [C] = 20- C:N 50:1. Concentração de C e N considerando-se: 40% de carbono na glicose, 50% de carbono e 8% de nitrogênio na caseína, 50% de carbono e 10% de nitrogênio no extrato de levedura

Experimento 4

Para o isolado ESALQ 1305, tanto na padronização do pré-cultivo para cultivo em 1×10^5 blastosporos.mL⁻¹ quanto em 1×10^6 blastosporos.mL⁻¹ a produção de blastosporos nos meios com extrato de levedura foi superior aos mesmos meios com caseína hidrolisada como fonte proteica, em todas as concentrações de carbono testadas (Tabela 10 e 11). Para a concentração inicial de 1×10^5 blastosporos.mL⁻¹, os meios mais produtivos foram [40]-50:1 e [80]-50:1, que alcançaram produção de blastosporos de $3,86 (\pm 0,15) \times 10^9$ e $4,27 (\pm 0,44) \times 10^9$ no 5º dia de cultivo, respectivamente, e não diferiram entre si. Apesar de esses valores numericamente serem maiores, não diferiram estatisticamente dos valores alcançados pelos mesmos meios no 4º dia de cultura, que foram $3,59 (\pm 1,58) \times 10^9$ para o meio [40]-50:1 e $4,04 (\pm 0,66) \times 10^9$ para o [80]-50:1.

Avaliando os meios a base de extrato de levedura padronizados para a concentração inicial de 1×10^6 blastosporos.mL⁻¹, foi observado que os meios [40]-50:1 e [80]-50:1 também resultaram nas maiores densidades de blastosporos. Os valores neste meio [40]-50:1 variaram de $2,20 (\pm 0,41) \times 10^9$ no 3º dia até $2,69 (\pm 0,25) \times 10^9$ no 5º dia, porém nenhuma diferença foi notada ao longo do tempo de cultivo para este meio de cultivo, tendo atingido alta concentração de blastosporos já no 2º dia de cultivo.

O peso seco da biomassa dos meios [80]-50:1 e [40]-50:1, nas duas fontes de nitrogênio e em ambas as padronizações, também se destacaram superando as concentrações mais baixas. A maior peso seco foi observado no meio [80]-50:1 com extrato de levedura como fonte de nitrogênio, alcançando $23,04 (\pm 2,46)$ mg.mL⁻¹ para padronização de 1×10^5 blastosporos.mL⁻¹ e $20,28 (\pm 1,93)$ mg.mL⁻¹ para 1×10^6 blastosporos.mL⁻¹ (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 - Peso seco da biomassa e concentração de blastosporos do isolado ESALQ 1305 de *Metarhizium rileyi* em quatro variações do meio (JARONSKI; JACKSON, 2012), utilizando duas fontes de nitrogênio, caseína hidrolisada e extrato de levedura, e diferentes concentrações de carbono e relações C:N com padronização de $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ blastosporos do pré-cultivo para o cultivo

Meios de pré-cultura								
Caseína hidrolisada [36]-50:1					Extrato de Levedura [36]-50:1			
Meios de cultura								
Caseína hidrolisada					Extrato de Levedura			
[C]- C:N	[8]- 50:1	[20]- 50:1	[40]- 50:1	[80]- 50:1	[8]- 50:1	[20]- 50:1	[40]- 50:1	[80]- 50:1
Dias	Concentração de Blastosporos (x 10 ⁷ mL ⁻¹)							
2	5,29±3,62 Ca	3,21±0,31 Cc	7,38±0,90 Cc	9,29±0,94 Cc	52,50±6,37 Bb	135,42±8,13 Aa	172,92±67,94 Ac	74,17±12,48 Bc
3	8,21±1,56 Ca	8,92±2,57 Cc	23,21±2,97 BCb	22,96±10,38 BCc	52,92±1,90 Bb	202,08±83,86 Aa	305,83±135,00 Ab	219,17±36,10 Ab
4	5,50±1,05 Da	27,21±7,84 CDb	32,83±4,20 CDb	43,88±19,84 Cc	64,58±2,33 Cb	154,58±64,15 Ba	358,75±158,35 Aa	404,17±66,57 Aa
5	5,04±2,76 Ca	40,54±5,20 BCa	59,17±25,69 Ba	67,17±10,75 Ba	85,83±13,36 Ba	225,42±23,47 Ba	385,83±14,81 Aa	427,29±44,25 Aa
Peso Seco (mg.mL ⁻¹)								
5	5,77±0,74 CD	8,87±0,34 C	16,61±0,33 B	18,71±1,95 B	3,58±0,05 D	7,81±1,20 C	17,17±0,59 B	23,04±2,46 A

[Concentração de carbono]-relação C:N considerando-se: 40% de carbono na glicose, 50% de carbono e 8% de nitrogênio na caseína, 50% de carbono e 10% de nitrogênio no extrato de levedura. Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$, onde letras maiúsculas referem-se à comparação entre os meios (linhas) e letras minúsculas entre os dias (colunas)

Tabela 11 - Peso seco da biomassa e concentração de blastosporos do isolado ESALQ 1305 de *Metarhizium rileyi* em quatro variações do meio (JARONSKI; JACKSON, 2012), utilizando duas fontes de nitrogênio, caseína hidrolisada e extrato de levedura, e diferentes concentrações de carbono e relações C:N com padronização de $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ blastosporos do pré-cultivo para o cultivo

<u>Meios de pré-cultura</u>								
Caseína hidrolisada [36]-50:1					Extrato de Levedura [36]-50:1			
<u>Meios de cultura</u>								
Caseína hidrolisada					Extrato de Levedura			
[C]- C:N	[8]- 50:1	[20]- 50:1	[40]- 50:1	[80]- 50:1	[8]- 50:1	[20]- 50:1	[40]- 50:1	[80]- 50:1
Dias	Concentração de Blastosporos (x 10 ⁷ mL ⁻¹)							
2	3,00±1,00 Fa	1,54±0,69 Fd	3,46±0,80 Fd	11,38±2,38 Ed	52,92±5,05 Da	153,75±7,6 Ba	232,50±16,90 Aa	97,92±19,09 Cb
3	5,96±3,83 Ea	4,75±0,66 Ec	11,58±1,58 Ec	27,17±7,51 Dc	62,50±6,61 Ca	111,25±6,96 Ba	220,42±40,89 Aa	153,33±64,26 ABab
4	7,04±2,76 Da	8,83±0,92 Dd	40,88±2,51 CDb	54,17±6,88 CDb	64,17±4,73 Ca	160,00±28,14 Ba	264,17±36,96 Aa	195,42±24,25 ABa
5	7,50±2,14 Da	19,50±0,45Da	90,83±11,88 Ca	81,67±27,46 Ca	77,08±20,97 Ca	167,08±39,33 Ba	269,17±25,62 Aa	247,08±19,62 Aa
Peso Seco (mg.mL ⁻¹)								
5	5,62±0,81 D	8,10±2,57 CD	15,91±0,92 B	15,80±1,48 B	5,15±0,79 D	10,75±2,56 C	14,57±2,49 B	20,28±1,93 A

[Concentração de carbono]-relação C:N considerando-se: 40% de carbono na glicose, 50% de carbono e 8% de nitrogênio na caseína, 50% de carbono e 10% de nitrogênio no extrato de levedura. Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$, onde letras maiúsculas referem-se à comparação entre os meios (linhas) e letras minúsculas entre os dias (colunas)

6 DISCUSSÃO

No presente estudo os substratos usados na fermentação sólida que apresentaram melhor produção de conídios foram o feijão fradinho moído sem peneirar e o trigo em grão moído peneirado, sendo superiores ao arroz que é o substrato mais utilizado para a produção de conídios de fungos entomopatogênicos no Brasil e no mundo (ALVES; PEREIRA, 1998; ALVES et al., 2008; PRAKASH; PADMAJA; KIRAN, 2008; SAHAYARAJ; KARTHICK, 2008; JARONSKI; JACKSON, 2012). A produção de conídios nestes substratos foram inferiores a 1×10^9 conídios.g⁻¹, valores estes inferiores ao obtido em nosso laboratório para outros fungos entomopatogênicos e obtidos para *M. rileyi* por outros autores. Os meios à base de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) em grão suplementado com 1% de extrato de levedura resultaram nas maiores produções de conídios ($1,4 \times 10^9$ conídios.g⁻¹) (DEVI, 1994). Em outro estudo, Devi et al. (2003) demonstraram a superioridade do meio à base de cevada com extrato de levedura. Méndez et al. (2010) concluíram que o arroz inteiro foi o substrato que proporcionou maior produção de conídios para esta espécie, superando milho moído e trigo.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos objetivando avaliar substratos alternativos e mais baratos que o arroz, como: fubá de milho, farinha de arroz, soja, farelo de trigo, batata, sorgo, feijão, milho, arroz úmido, melaço, farinha de aveia, sais minerais, entre outros (CRUZ et al., 1983; NAHAS; ARAI, 1987; ALVARENGA et al., 1988; VERHAAR; HIJWEGEN, 1993; VILAS BOAS; ANDRADE; OLIVEIRA, 1996; OLIVEIRA, 2000). Em relação ao feijão fradinho, substrato que resultou em elevada produção de conídios no presente estudo, existe pouca informação disponível na literatura a respeito da utilização desta leguminosa como substrato para esporulação de fungos entomopatogênicos. Apenas Vilas Boas, Andrade e Oliveira (1996) citam que o feijão fradinho e a fava permitiram concentração de conídios de *M. anisopliae* significativamente maior que outros substratos testados: arroz, feijão e sorgo. Vale destacar que essa variedade de feijão apresenta altos teores nutritivos, com destaque para as proteínas, em torno de 25%, carboidratos, cerca de 50%, e minerais (sódio, potássio, fósforo, magnésio, cálcio, ferro, zinco, manganês) (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008). Os carboidratos e as proteínas são nutrientes de suma importância para o crescimento, desenvolvimento e esporulação de fungos entomopatogênicos. Já os minerais, sódio e potássio, tem papel essencial no desenvolvimento, enquanto, o magnésio, cálcio, ferro, sódio, zinco e manganês são micronutrientes também necessários para o crescimento dos fungos (REZENDE, 2009).

O trigo moído que também apresentou bons resultados no presente estudo foi estudado por outros autores. Ottati-de-Lima et al. (2010) testando a eficiência de 17 substratos,

encontraram que trigo moído e fubá de milho promoveram maior produção de conídios de *Metarhizium anisopliae*. Tais autores, relacionando seus resultados e os da literatura (WENZEL; MONTEIRO; PEREIRA, 2006), postularam que substratos à base de trigo são boas alternativas, desde que sejam economicamente viáveis. Wenzel, Monteiro e Pereira (2006) verificaram que para *Lecanicillium lecanii*, o arroz (tanto na forma integral quanto agulhinha) não foi o substrato mais produtivo, sendo que as maiores produções de conídios ocorreram nos substratos com trigo moído, farelo de soja e farelo de trigo. Ainda, Machado et al. (2009) notaram que farelo de trigo e lentilha em grão, além de trigo grosso moído e sorgo em grão, favoreceram a produção de conídios de *L. lecanii*.

A proteína de soja texturizada foi o tratamento que obteve o pior resultado neste trabalho. Este substrato não tem sido usado nos estudos sobre produção de fungos. Wenzel, Monteiro e Pereira (2006) terem obtido as melhores contagens de conídios para dois isolados de *L. lecanii* usando como substrato de esporulação farelo de soja. Já no trabalho de Machado et al. (2009) com os mesmos isolados estudados por Wenzel, Monteiro e Pereira (2006), o farelo de soja esteve entre os tratamentos com pior desempenho. Os baixos valores alcançados pela proteína de soja texturizada, parecem estar relacionados com a relação carbono nitrogênio presente neste substrato, uma vez que a proteína de soja texturizada apresenta cerca de 50% de proteínas e apenas 30% de carboidratos (GARCÍA et al., 1998), o que resulta em uma relação C:N muito baixa. Diversos autores relatam que meios com baixa relação C:N não favorecem a esporulação, enquanto substratos com alta relação C:N, como o trigo [70% de carboidratos e 10% de proteínas, segundo Miranda (2006)], induzem a conidiogênese resultando em maior produção de conídios pelo fungo (AQUINO, 1974; CAMPBELL et al., 1983; FRIGO; AZEVEDO, 1986; LI; HOLDOM, 1995; KAMP; BIDOCHKA, 2002).

M. rileyi não tem sido utilizado comercialmente para o controle de pragas. Uma dos problemas é dificuldade na produção pela fermentação sólida, especialmente quanto a estabilidade do fungo na produção em arroz. A produtividade nos substratos avaliados, assim como em farelos (dados não apresentados) não encorajaram a continuidade desta linha de pesquisa e foi dado ênfase a fermentação líquida.

A produção de blastosporos por entomopatógenos via fermentação sólida é desejável, pois este propágulo fúngico pode ser infectivo, produzido em curto período de tempo comparado ao sistema de fermentação sólida, além da grande quantidade de inóculo produzida por volume de meio (TORRE; CÁRDENAS-COTA, 1996). Além disso, blastosporos podem germinar e penetrar no hospedeiro mais rapidamente do que conídios, em aproximadamente seis horas (JACKSON, 1997). No presente estudo avaliamos a produção de blastosporos de *M.*

rileyi em diferentes meios líquidos. Não há até o momento estudos de fermentação líquida de *M. rileyi* visando a produção de blastosporos e sua aplicação para o controle de lagartas desfolhadoras. Somente os estudos de García et al. (2006), Méndez, Pozo e García (2007) e Méndez, Pozo e García (2009), que visavam a produção de blastosporos para inoculação em substrato sólido, mas eles não quantificaram a produção de blastosporos.

O crescimento de fungos dimórficos em culturas submersas é mediado por uma série de fatores, que incluem tempo de incubação, características inerentes ao isolado, composição do meio, relação C:N, condições ambientais durante a fermentação (pH, pressão osmótica, temperatura, oxigênio dissolvido) e tamanho do inóculo (RUIZ-HERRERA, 1985). No caso de *M. rileyi*, este é um fungo descrito como altamente sensível as condicionais nutricionais e ambientais, quando comparado com os outros entomopatógenos (TRUMPER; EDELSTEIN; LEUCONA, 2004), ou seja, necessita de um meio rico e equilibrado para que o seu crescimento ocorra de maneira satisfatória.

Embora seja constante a busca por meios mais simples e de menor custo, faz-se necessária uma criteriosa avaliação do que se deseja produzir, uma vez que determinado meio pode favorecer o crescimento de uma fase do ciclo de vida do fungo dimórfico (ALVES; PEREIRA, 1998), sendo que meios que incrementem o crescimento de blastosporos em detrimento de massa micelial são mais desejáveis (JARONSKI; JACKSON, 2012).

Os resultados apresentados neste estudo representam um grande avanço na produção de blastosporos de *M. rileyi*. Os três primeiros experimentos usando meios de cultura padrão e meio de cultura de insetos (SF-900) apresentaram resultados insatisfatórios. Entretanto, a densidade de blastosporos obtidas a cada experimento foi superior ao anterior até atingir no experimento 4 um nível superior a 2×10^9 blastosporos.mL⁻¹ que é uma produção elevada comparado ao reportado na literatura para outros fungos.

Alguns estudos de fermentação líquida objetivavam a produção de biomassa e não apenas de blastosporos. O meio formulado apenas com extrato de levedura e melaço (EL + Me), usado no presente estudo, obteve destaque na produção de biomassa também nos trabalhos de García et al. (2006) e Méndez, Pozo e García (2009), alcançando as maiores médias quando comparadas com outros meios. Adicionalmente, Méndez, Pozo e García (2007), encontraram que um meio a base de batata e extrato de levedura apresentaram os melhores resultados para produção de biomassa quando comparados com outros três meios analisados. Entretanto, apesar de o extrato de levedura ser uma excelente fonte de vitaminas do complexo B e outros fatores para o crescimento e esporulação dos fungos (BARNES et al., 1975), postula-se aqui que este composto, suplementado apenas com melaço, parece não fornecer os nutrientes necessários

para a formação de blastosporos, favorecendo, em contrapartida, o desenvolvimento de massa micelial, a qual relaciona-se diretamente com os valores de biomassa atingidos. Tais observações se expressaram mais fortemente nos resultados obtidos pelo isolado Embrapa Nr 27 e mais moderadamente para o isolado ESALQ 1305.

Em relação ao meio SMY, mesmo sendo recomendado para o desenvolvimento e esporulação de *M. rileyi* (ALVES et al., 1998) e de haver um trabalho reportando bons resultados de sua utilização associado ao bagaço de cana para produção de conídios dessa espécie (HOLDOM; KLASSHORST, 1986), este não obteve bom desempenho tanto para biomassa quanto para concentração de blastosporos. O mesmo foi observado para o meio MC, considerado um meio rico em nutrientes (ALVES et al., 1998). Talvez a adaptação desses meios e consequente utilização de nutrientes pelo fungo em cultura submersa seja diferente ao que ocorre na cultura em placas, já que estes favorecem ótima esporulação quando utilizados dessa maneira. Adicionalmente, as exigências nutricionais devem ser diferentes para produção de conídios e blastosporos, e as características dos isolados podem ter influenciado os resultados.

O meio de cultura que apresentou melhor resultado na primeira fase do projeto foi o meio SF-900, que é usado para o crescimento de células de insetos. Esse meio contém variadas fontes de açúcares (glicose, maltose e sacarose) que fornecem carbono e de proteínas (19 aminoácidos) que fornecem nitrogênio e são fundamentais para síntese de estruturas celulares (SWIECH, 2007; VIEIRA, 2010) e aqui foi suplementado com Yeastolate Ultrafiltrado (extrato de levedura) que consiste de uma profusa fonte protéica, além de possuir vitaminas e minerais (DZIEZAK, 1987; YAMADA et al., 2003). Levando em consideração a diversidade de fontes e a quantidade de nutrientes desse composto, é possível supor que, contrariamente ao exposto acima para os demais meios, a combinação SF-900 + Yeastolate Ultrafiltrado foi capaz de suprir as necessidades nutricionais do fungo no que diz respeito a produção de blastosporos. Todavia, há indicativos de esgotamento de nutrientes a partir do quarto dia, uma vez que houve uma queda brusca da contagem de blastosporos no sexto dia, fenômeno este já reportado quando houve utilização do SF-900 para cultura de células insetos, com indicações de esgotamento de alguns aminoácidos presentes no meio (BATISTA et al., 2008; BOVO et al., 2008; SWIECH et al., 2008).

Devido ao desempenho apresentado pelo SF-900 no quarto dia de cultivo, pensou-se em confrontá-lo com o meio desenvolvido por Jaroniski e Jackson (2012) para pré-cultura. Esta é uma técnica utilizada para que se tenha uma produção metacíclica dos blastosporos, ou seja, para que ocorra a conversão dos conídios (inóculo inicial) em blastosporos, sendo recomendada

duração de até quatro dias (JARONSKI; JACKSON, 2012), que coincidiu com o pico de produção no meio SF-900 e permitiu a comparação com o meio recomendado por tais autores.

Os resultados obtidos mostraram que as associações do meio SF-900 suplementado com as diferentes concentrações de carbono e relações C:N não proporcionaram incremento na produção de blastosporos para nenhum meio. Já o meio desenvolvido por Jaronski e Jackson (2012) para pré-cultura associado aos meios de cultura desses autores mostrou-se eficiente, alcançando valores duas a três vezes maiores que o SF-900. Provavelmente esses valores estão relacionados ao desequilíbrio nas condições nutricionais, em especial na relações C:N, causado pela adição de SF-900 aos meios de Jaronski e Jackson (2012), o que parece não ter acontecido quando houve a junção dos meios desenvolvidos conjuntamente por estes autores. É importante lembrar que enquanto o meio SF-900 foi desenvolvido para cultivos de células de insetos, o meio de Jaronski e Jackson (2012) foi formulado para produção induzida da produção de blastosporos e microescleródios de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales.

Para *M. rileyi* as primeiras observações indicaram que os meios com [C]= 8 e C:N 50:1, e o meio com [C]= 36 e C:N 10:1 foram os que produziram maiores concentrações de blastosporos. No trabalho de Rombach (1989) utilizando sacarose e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio para *Beauveria bassiana*, observou-se que na proporção de 4:1 houve um aumento na produção de conídios submersos, enquanto na proporção de 1:1 ocorreu a produção máxima de blastosporos. Avaliando diferentes concentrações de C e N na produção de *Sporothrix insectorum*, Batista Filho et al. (2003) testaram o ácido casamino como fonte de N e a glicose como fonte de C, e observaram que a combinação 20 g.L⁻¹ de glicose e 60 g.L⁻¹ de ácido casamino permitiu maior número de corpos hifais. Para *M. anisopliae* o melhor resultado encontrado por Rocha et al. (2001) foi no meio que continha levedo de cerveja na seguinte proporção, 20g de carbono.L⁻¹ e 60 g de nitrogênio.L⁻¹.

A relação entre carbono e nitrogênio é considerada de grande importância no balanço do meio de cultura (SOPER; WARD, 1981; JARONSKI; JACKSON, 2012) e o desenvolvimento de um meio para cultivo de uma linhagem ou isolado é importante, já que diz respeito à sua subsequente produção massal e ao conhecimento das condições adequadas de cultivo, possibilitando a obtenção de alta esporulação (KHALIL; SHAH; NAEEM, 1985). Isso permite trabalhar a estreita relação entre o custo e a qualidade do fungo produzido que, por sua vez, influencia no tipo, no formato e na qualidade do propágulo, além da sua estabilidade após secagem e sua agressividade, medida em termos de virulência e patogenicidade (OTTATI-DE-LIMA, 2007).

As fontes de carbono mais utilizadas são: amido, glicose, sacarose e diversos outros açúcares, enquanto que as fontes de nitrogênio são geralmente componentes ricos em proteína e/ou aminoácidos, como é o caso do extrato de soja e outros subprodutos vegetais, extrato de levedura e peptona, bem como componentes inorgânicos como o ácido casamino (LEITE et al., 2003). Segundo Carlile e Watkinson (1994), para que um meio esteja balanceado, ele deve conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio. O carbono é necessário como fonte de energia, enquanto que o nitrogênio é essencial na síntese de componentes celulares, tais como ácidos nucleicos e quitina (OTTATI-DE-LIMA, 2007).

Dentre as relações C:N testadas, a de 50:1 foi selecionada para os experimentos com variações nas concentrações de carbono e fontes de nitrogênio. Como fonte alternativa de carbono a caseína hidrolisada, o extrato de levedura foi escolhido com base no bom desempenho relatado na literatura e nos resultados alcançados pelo meio EL + Me no experimento anterior. Como já discutido acima, esse componente consiste em uma boa fonte de nutrientes e sua inclusão em um meio rico como o desenvolvido por Jaronski e Jackson (2012) pode render bons resultados. Em uníssono com tais suposições, pesam ainda as sugestões de Jackson et al. (1996), Jackson (1997) e Mascarin et al. (2015a) que apontam para a necessidade de se buscar a substituição, no meio desenvolvido, de componentes de custo elevado por outros mais baratos e acessíveis.

De acordo com o que foi postulado anteriormente para o extrato de levedura, os resultados indicaram a sua eficiência como fonte de nitrogênio neste trabalho, quando comparado com a caseína, já que dos quatro meios com extrato de levedura, três foram superiores aos meios com caseína para o isolado Embrapa Nr 27.

Baixas concentrações de carbono ($\leq 50 \text{ g.L}^{-1}$) costumam produzir baixas contagens de blastosporos e prolongar o tempo de fermentação (≥ 5 dias) de *B. bassiana* (VEGA et al., 2003; PHAM; KIM; KIM, 2009; CHONG-RODRIGUEZ et al., 2011). Os resultados do presente estudo com os isolados de *M. rileyi* avaliados indicaram que existe uma maior produção de blastosporos em meios com maior concentração de glicose. Foram alcançadas produções superiores a 1×10^8 blastosporos.mL⁻¹ em apenas 3 dias de fermentação o que é considerado altamente promissor de acordo com as indicações de Mascarin, Alves e Lopes (2010), Jackson (2012) e Mascarin et al. (2015a, 2015b). Ressaltando que reduzir o tempo de produção dos propágulos é de grande interesse quando se tem em vista a viabilidade econômica da produção massal de fungos entomopatogênicos (JARONSKI; JACKSON, 2012).

Portanto, finalizando para o isolado Embrapa Nr 27, pode-se pontuar que o meio [C]= 8 e C:N 50:1, tendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio, seria o mais indicado para

produção de blastosporos pela redução dos custos do meio, tanto pelo uso da fonte alternativa mais barata quanto pela quantidade de glicose a ser adicionada (8 g.L⁻¹). Diante dos resultados recentes que apontam que altas concentrações de carbono promovem maior produção de blastosporos do que aquelas baixas (MASCARIN et al. 2015a, 2015b), também foi conduzido estudo com concentrações de carbono mais altas (40 e 80 g.L⁻¹), juntamente com outras duas já testadas (8 e 20 g.L⁻¹), para o isolado ESALQ 1305, que se mostrou mais produtivo em relação ao outro, alcançando contagens até quatro vezes maiores.

Concentrações de carbono mais altas simulam o ambiente hipertônico encontrado pelo fungo dentro da hemolinfa do inseto hospedeiro, local onde ocorre a multiplicação dos blastosporos em seu ciclo natural (WANG; DUAN; ST LEGER, 2008; CHAPMAN, 2013). *In vitro*, essas concentrações atuam inclusive sobre a morfologia dos blastosporos, tornando-os menores (MASCARIN et al., 2015b), fato também observado para *M. rileyi* nesse estudo. Em relação ao ocorrido nos testes com tais condições, foi possível notar incremento na produção dos blastosporos, bem como capacidade de continuar elevando a concentração até o quinto dia de cultura, principalmente nos meios com extrato de levedura. Ressalta-se também, que valores maiores para o peso seco da biomassa foram alcançados.

Portanto, ficou claro que concentrações de carbono mais altas podem propiciar aumento, tanto na produção de blastosporos quanto na produção de biomassa, o que é relatado no trabalho de Mascarin et al. (2015b), elevando tais parâmetros a valores até então não observados para nenhum meio no presente estudo. Ainda, vale destacar que os valores observados nessas condições (contagens próximas de 4×10^9 blastosporos.mL⁻¹ e biomassa seca pesando 20 e 30 mg.mL⁻¹) são próximos aos alcançados nos melhores tratamentos do estudo de Mascarin et al. (2015b) com *B. bassiana*, sendo considerados promissores quando se busca meios para produção massal de fungos entomopatogênicos.

7 CONCLUSÕES

O feijão fradinho e o trigo em grão moído peneirado foram os substratos que para o isolado ESALQ 1305 de *M. rileyi* apresentaram as maiores produções de conídios por fermentação sólida. Para a fermentação líquida, os melhores resultados foram atingidos pelo isolado ESALQ 1305 nos meios onde o pré-cultivo foi feito com 36 g.L⁻¹ de concentração de carbono e relação C:N de 50:1 e o cultivo com 40 g.L⁻¹ e 80 g.L⁻¹ de carbono e relação C:N de 50:1, tendo como fonte de nitrogênio o extrato de levedura e uma padronização de 10⁵ blastosporos.mL⁻¹ entre o pré-cultivo e o cultivo.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, N.; VILLAMIZAR, L.R.; ESPINEL, C.C.; COTES, A.M. Effect of pH and water activity over *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes) development. **Revista Colombiana de Entomología**, Santafé de Bogotá, v. 35, n. 2, p. 138-144, 2009.
- ALVARENGA, A.R.M.; CRUZ, B.P.B.; OLIVEIRA, D.A.; SILVEIRA, A.P.; BULISANI, E.A. Novos testes de cultivo de fungos utilizados em controle biológico usando meios de cultura naturais líquidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 55, n. 1/4, p. 31-35, 1988.
- ALVES, R.T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010. 50 p.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 637-711.
- ALVES, S.B.; ALMEIDA, J.E.M.; MOINO Jr, A.; ALVES, L.F.A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 845-869.
- ALVES, S.B.; LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, F.E.M.; MARQUES, E.J. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 215-237.
- AQUINO, M.L.N. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, no Estado de Pernambuco. **Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas**, Recife, v. 72, p. 1-26, 1974.
- BARBOSA, F.L.; FERNANDES, P.M.; MOREIRA, W.A.; SANTOS, G. Efeito de inseticidas na infecção natural da lagarta-da-soja por *Nomuraea rileyi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 133-136, 1997.
- BARLLET, M.C.; JARONSKI, S.T. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In: BURGE, M.N. **Fungi in biological control systems**. Manchester: Manchester University Press, 1984. p. 61-85.
- BARNES, G.L.; BOETHEL, D.L.; EIKENBARY, R.D.; CRISWELL, J.T.; GENTRY, C.R. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 25, n. 3, p. 301-305, 1975.
- BATISTA, F.R.X.; PEREIRA, C.A.; MENDONÇA, R.Z.; MORAES, A.M. Formulation of a protein-free medium based on IPL-41 for the sustained growth of *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 57, n. 1, p. 11-22, 2008.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; FRANKLIN, C.; LEITE, L.G.; ALVES, L.F.A. Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio e na produção do fungo *Sporothrix insectorum* em fermentação líquida aeróbica. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 491-496, 2003.

BING, S.; YU, H.; CHEN, A.; LIU, X. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 11, p. 1421-1426, 2008.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 43, n. 2, p. 288-292, 1984.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGÈ, J.P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1795-1805, 1988.

BOVO, R.; GALESI, A.L.L.; JORGE, S.A.C.; PICCOLI, R.A.M.; MORAES, A.M.; PEREIRA, C.A.; AUGUSTO, E.F.P. Kinect response of *Drosophila melanogaster* cell line to different medium formulations and culture conditions. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 57, n. 1, p. 23-35, 2008.

CAMPBELL, R.K.; BARNES, G.L.; CARTWRIGHT, B.O.; EIKENBARY, R.D. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various carbohydrate sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 41, n. 1, p. 117-121, 1983.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. Fungal cells and vegetative growth. In: _____. **The fungi**. London: Academic Press, 1994. p. 125-128.

CHAPMAN, R.F. **The insects**: structure and function. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. 959 p.

CHONG-RODRIGUEZ, M.J.; MALDONADO-BLANCO, M.G.; HERNANDEZ-ESCARENO, J.J.; GALAN-WONG, L.J.; SANDOVAL-CORONADO, C.F. Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 30, p. 5736-5742, 2011.

CONNORS, N.C. Culture medium optimization and scale-up for microbial fermentations. In: VINCI, V.A.; PAREKH, S.R. **Handbook of industrial cell culture**: mammalian, microbial, and plant cells. New Delhi: Humana Press, 2002. p. 171-193.

CRUZ, B.P.B.; ABREU, O.C.; OLIVEIRA, D.A.; CHIBA, S. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em meios de cultura naturais, líquidos. **Biológico**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 111-116, 1983.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DEVI, P.S.V. Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab) on *Ricinus communis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 63, n. 2, p. 145-150, 1994.

DEVI, P.S.V.; PRASAD, Y.G.; CHOWDARY, D.A.; RAO, L.M.; BALAKRISHNAN, K. Identification of virulent isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson for the management of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Mycopathologia**, Albany, v. 156, n. 4, p. 365-373, 2003.

DURAN, R.; CARY, J.W.; CALVO, A.M. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 367-381, 2011.

DZIEZAK, J.D. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 2, p. 104-21, 1987.

EDELSTEIN, J.D. **Epizootiología de *Nomuraea rileyi* (Deuteromycetes) sobre lepidópteros defoliadores en el cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 2002. 85 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidad Nacional Córdoba, Córdoba, 2002.

EDELSTEIN, J.D.; TRUMPER, E.V.; LECUONA, R.E. Temperature-dependent development of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 593-599, 2005.

FARIA, M.R.; TIGANO-MILANI, M.S.; LECUONA, R.E. Incidência natural de *Nomuraea rileyi* Farlow em população de *Anticarsia gemmatalis* Hübner no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 385-388, 1993.

FRIGO, S.M.; AZEVEDO, J.L. Meios de cultura e produção de conídios em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 43, n. 1, p. 285-293, 1986.

FROTA, K.M.G.; SOARES, R.A.M.; ARÊAS, J.A.G. Composição química do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.

GAO, L.; SUNA, M.H.; LIU, X.Z.; CHEA, Y.S. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 11, n. 1, p.87-92, 2007.

GARCÍA, M.C; MARINA, M.L.; LABORDA, F.; TORRE, M. Chemical characterization of commercial soybean products. **Food Chemistry**, London, v. 62, n. 3, p. 325-331, 1998.

GARCÍA, I.; POZO, E. del; MÉNDEZ, A.; CÉSPEDES, Y. Producción de biomassa de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, aislamiento NR-003, en diferentes medios de cultivo líquidos, con agitación. **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 21, n. 3, p. 173-177, 2006.

GARDNER, W.A. Effect of temperature on the susceptibility of *Heliothis zea* larvae to *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 46, n. 3, p. 348-349, 1985.

GAZZONI, D.L.; SOSA-GOMÉZ, D.R.; MOSCARDI, F.; HOFFMAN-CAMPO, C.B.; CORREA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J. de; CORSO, I.C. Insects. In: EMBRAPA.

CNPSo. **Tropical soybean: improvement and production**. Roma: FAOUN, 1994. p. 81-108. (FAO Plant Production and Protection Series, 27).

GIESE, H.; AZIZAN, A.; KÜMMEL, A.; LIAO, A.; PETER, C.P.; FONSECA, J.A.; HERMANN, R.; DUARTE, T.M.; BÜCHES, J. Liquid films on shake flask walls explain increasing maximum oxygen transfer capacities with elevating viscosity. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 111, n. 2, p. 295-308, 2013.

HAJEK, A.E.; CARRUTHERS, R.I.; SOPER, R.S. Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga mainaiga* (Zygomycetes: Entomophthoraceae), a fungal pathogen of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 19, n. 1, p. 85-90, 1990.

HAMMER, O. **PAST – PArentological Statistics 3.08**. Oslo: Natural History Museum, University of Oslo, 2015. Disponível em: <<http://folk.uio.no/ohammer/past/>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

HATTING, J.L. Comparison of three entomopathogenic fungi against the bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), employing topical *vs per os* inoculation techniques. **African Entomology**, Pretoria, v. 20, n. 1, p. 91-100, 2012.

HAY-ROE, M.M.; MEAGHER, R.L.; NAGOSHI, N. Effect of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strain and diet on oviposition and development of the parasitoid *Euplectrus platyhypenae* (Hymenoptera: Eulophidae). **Biological Control**, Orlando, v. 66, n. 1, p. 21-26, 2013.

HOLDOM, D.G. Sporulation by hyphal bodies of *Nomuraea rileyi* and subsequent infection of *Heliothis* spp. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 48, n. 2, p. 242-245, 1986.

HOLDOM, D.G.; KLASHORST, V. de. Inexpensive culture media and methods for *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 48, n. 2, p. 246-248, 1986.

HUMBER, R.A. Fungi: Identification. In: LACEY, L.A. **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 153-185.

HUMPHREYS, A.M.; MATEWELE, P.; TRINCI, A.P.J.; GILLESPIE, A.T. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, n. 3, p. 257-264, 1989.

IGNOFFO, C.M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: BURGESS, H.D. **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. New York; London: Academic Press, 1981. p. 523-538.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. Conidial germination of two biotypes of *Nomuraea rileyi*. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 74, n. 4, p. 587-589, 1991.

INCH, J.M.; TRINCI, A.P.J. Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. **Journal of General Microbiology**, London, v. 113, n. 2, p. 247-252, 1987.

ISSALY, N.; CHAUVEAU, H.; AGLEVOR, F.; FARGUES, J.; DURAND, A. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviridae* Mf189 blastospores in submerged batch culture. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 3/4, p. 1425-1431, 2005.

JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 19, n. 3, p. 180-87, 1997.

_____. Dissolved oxygen levels affect dimorphic growth by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 67-79, 2012.

JACKSON, M.A.; CLIQUET, S.; ITEN, L.B. Media and fermentation process for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 23-33, 2003.

JACKSON, M.A.; SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BOYETTE, C.D.; SILMAN, R.W.; BOTHAST, R.J. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. **Weed Technology**, Champaign, v. 10, n. 3, p. 645-650, 1996.

JARONSKI, S.T.; JACKSON, M.A. Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In: LACEY, L. A. **Manual of techniques in invertebrate pathology**. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. p. 255-284.

KAMP, A.M.; BIDOCHKA, M.J. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 74-77, 2002.

KAMPEN, W.H. Nutritional requirements in fermentation. In: TODARO, C.C.; VOGEL, H.C. **Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design, and equipment**. 3rd ed. Oxford: William Andrew, 2014. p. 37-57.

KEPLER, R.M.; HUMBER, R.A.; BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, New York, v. 106, n. 4, p. 811-829, 2014.

KEPLER, R.M.; SUNG, G.-H.; BAN, S.; NAKAGIRI, A.; CHEN, M.-J.; HUANG, B.; LI, Z.; SPATAFORA, J.W. New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps*. **Mycologia**, New York, v. 104, n. 1, p. 182-197, 2012.

KHALIL, S.K.; SHAH, M.A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 13, n. 3/4, p. 329-334, 1985.

KISH, L.P.; ALLEN, G.E. **The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatilis* in soybean**. Gainesville: University of Florida, Agricultural Experiment Stations, 1978. 58 p. (Technical Bulletin, 795).

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Alexandre de Sene Pinto, 2003. 92 p.

LI, D.P.; HOLDOM, D.G. Effects of nutrientes on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 65, n. 3, p. 253-260, 1995.

LI, Q.; BAI, Z.; O'DONNELL, A.; HARVEY, L.M.; HOSKISSON, P.A.; McNEIL, B. Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, n. 3, p. 457-467, 2011.

LOPES, M.N.L.; BARROS, N.M. de. Virulência de conídios armazenados do fungo *Nomuraea rileyi* à lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p. 197-2000, 1995.

MACHADO, A.C.R.; MONTEIRO, A.C.; MOCHI, D.A.; YOSHIDA, L. Resíduos e subprodutos agroindustriais e grãos como substratos para a produção do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii*. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 3, p. 703-714, 2009.

MASCARIN, G.M.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 4, p. 753-761, 2010.

MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; KOBORI, N.N.; BEHLE, R.W.; DELALIBERA, I. Jr. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 127, p. 11-20, 2015a.

MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; KOBORI, N.N.; BEHLE, R.W.; DUNLAP, C.A.; DELALIBERA Jr., I. Jr. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 99, n. 16, p. 6653-6665, 2015b.

McCOY, C.W.; KANAVEL, R.F. Isolation of *Hirsutella thompsonii* from the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*, and its cultivation on various synthetic media. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 14, n. 3, p.386-390, 1969.

MÉNDEZ, A.; POZO, E. del; GARCÍA, I. Producción de biomassa del aislamiento (Nr-003) de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson en diferentes medios de cultivo líquidos con agitación y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 22, n. 2, p. 118-123, 2007.

_____. Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 24, n. 3, p. 156-161, 2009.

MÉNDEZ, A.; POZO, E. del; GARCÍA, I.; GONZÁLEZ, A. Evaluación de sustratos sólidos para la producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. **Revista de Protección Vegetal**, La Habana, v. 25, n. 2, p. 108-112, 2010.

MIRANDA, M.Z. de. **Trigo**: germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 12 p.

- MORROW, B.J.; BOUCIAS, D.G. Comparative analysis of the in vitro growth of the hyphal body and mycelial stage of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 51, n. 3, p. 197-206, 1988.
- MOSCARDI, F.; BUENO, A.de F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.;ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; POMARI, A.F.; CORSO, I.C.; YANO, S.A.C. Artrópodes que atacam as folhas de soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Londrina: Embrapa Soja, 2012. p. 213-334.
- NAHAS, E.; ARAI, N.N.S. Crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* em vários meios e condições de cultivo. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 77-82, 1987.
- NATIONAL DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **A guide for the control of plant pests**. 40th ed. Pretoria: Department of Agriculture, 2007. 220 p.
- NEVES, P.M.O.J. **Produção de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. utilizando meios de cultura à base de farinha-de-crisálida do bicho-da-seda *Bombix mori* L., 1758**. 1991. 68 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.
- OLIVEIRA, S.M.C. de. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos**. 2000. 45 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2000.
- OTTATI-DE-LIMA, E.L. **Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos**. 2007. 92 p. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.
- OTTATI-DE-LIMA, E.L.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; GASSEN, M.H.; WENZEL, I.M. ALMEIDA, AM.B. de; ZAPPELLINI, L.O. Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 651-659, 2010.
- PAVONE, D.; DÍAZ, M.; TRUJILLO, L.; DORTA, B. A granular formulation of *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Interciência**, Caracas, v. 34, n. 2, p. 130-134, 2009.
- PENDLAND, J.C.; BOUCIAS, D.G. In vitro growth of the entomopathogenic hyphomycete *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 1, p. 66-71, 1997.
- PERDIKIS, D.C.; LYKOURESSIS, D.P. Thermal requirements for development of the polyphagous predator *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 31, n. 4, p. 661-667, 2002.
- PERINOTTO, W.M.S.; TERRA, A.L.M.; ANGELO, I.C.; FERNANDES, É.K.K.; GOLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; BITTENCOURT, V.R.E.P. *Nomuraea rileyi* as biological control

agents of *Rhipicephalus microplus* tick. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 4, p. 1743-1748, 2012.

PETER, C.P.; LOTTER, S.; MAIER, U.; BÜCHS, J. Impact of out-of-phase conditions on screening results in shaking flask experiments. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 205-215, 2004.

PHAM, T.A.; KIM, J.J.; KIM, K. Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. **Mycobiology**, Seoul, v. 37, n. 3, p. 218-224, 2009.

PRAKASH, G.V.S.B.; PADMAJA, V.; KIRAN, R.R.S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 6, p. 1530-1537, 2008.

REZENDE, J.M. **Influência da qualidade de diferentes tipos de arroz e inibidores de proteínases no rendimento e na virulência de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales)**. 2009. 56 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

RIBA, G.; GLANDARD, A. Mise au point d'un milieu nutritif pour la culture profonde du champignon entomopathogène *Nomuraea rileyi*. **Entomophaga**, Paris, v. 25, n. 3, p. 317-322, 1980.

RIZZO, H.F.; LA ROSSA, F.R. Aspectos morfológicos y biológicos de una especie argentina poco conocida, *Plusia bonaeriensis* Berg. (Lep. Noctuidae). **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v. 14, n. 1, p. 13-16, 1994.

ROCHA, T.C.; ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; CINTRA, E.R.R. Produção de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio líquido. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, resumo 35, 2001. Suplemento. Apresentado no REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 14., 2001, São Paulo. 1 CD-ROM.

ROMBACH, M.C. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in sympoduloconidia in submerged culture. **Entomophaga**, Paris, v. 34, n. 1, p. 45-52, 1989.

ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; ROBERTS, D.W. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. **Entomophaga**, Paris, v. 33, n. 3, p. 315-324, 1988.

RUIZ-HERRERA J. Dimorphism in *Mucor* species with emphasis on *M. rouxii* and *M. bacilliformis*. In: SZANISZLO, P.J.; HARRIS, J.L. **Fungal dimorphism with emphasis on fungi pathogenic for humans**. New York: Springer, 1985. p. 361-384.

SAHAYARAJ, K.; KARTHICK, S. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and byproducts. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 12, p. 1907-1910, 2008.

SAUTOUR, M.; ROUGET, A.; DANTIGNY, P.; DIVIES, C.; BENSOUSSAN, M. Prediction of conidial germination of *Penicillium chrysogenum* as influenced by temperature, water activity and pH. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 131-134, 2001.

SONG, Z.; YIN, Y.; JIANG, S.; LIU, J.; WANG, Z. Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a microinsecticide. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 59, n. 5, p. 597-605, 2014.

SOPER, R.S.; WARD, M.G. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAIVIZAS, C.G. **Biological Control in Crop Production**. New York: Allanheld & Osmun Publ., 1981. p. 161-180.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; MOSCARDI, F.; NOZAKI, M. de.H. The Impact of Fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Epizootics and on Populations of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on Soybean. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 287-291, 2003.

SRISUKCHAYAKUL, P.; WIWAT, C.; PANTUWATANA, S. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. **ScienceAsia**, Bangkok, v. 31, p. 273-276, 2005.

ST LEGER, R.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinat in the expression of cuticle – degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p. 709-713, 1998.

SUJII, E.R.; CARVALHO, V.A.; TIGANO, M.S. Cinética da esporulação e viabilidade de conídios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre cadáveres da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), em Condições de Campo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 85-90, 2002.

SWIECH, K. **Caracterização cinética e fisiológica de células de *Drosophila melanogaster* S2 para produção de Glicoproteína de Vírus da Raiva (GPV) recombinante**. 2007. 152 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

SWIECH, K.; ROSSI, N.; SILVA, B.G.; JORGE, S.A.C.; ASTRAY, R.M.; SUAZO, C.A.T. Bioreactor culture of recombinant *Drosophila melanogaster* S2 cells: characterization of metabolic features related to cell growth and production of the rabies virus glycoprotein. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 57, n. 1, p. 61-66, 2008.

TANG, L.G.; HOU, R.F. Potential application of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, for control of the corn earworm, *Helicoverpa armigera*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Washington, v. 88, n. 1, p. 25-30, 1998.

_____. Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, Washington, v. 125, n. 5, p. 243-248, 2001.

TORRE; M. de la; CÁRDENAS-COTA, H.M. Production of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia in submerged culture. **Entomophaga**, Paris, v. 41, n. 3/4, 443-453, 1996.

TRUMPER, E.; EDELSTEIN, J.; LECUONA, R. Selection of culture media and *in vitro* assessment of temperature-dependent development of *Nomuraea rileyi*. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 737-742, 2004.

- VEGA, F.E.; JACKSON, M.A.; MERCADIER, M.; POPRAWSKI, T.J. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 363–368, 2003.
- VERHAAR, M.A.; HIJWEGEN, T. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaeroteca fuliginea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 99, n. 2, p. 101-103, 1993.
- VIEIRA, P.B. **Cultura de células de *Drosophila melanogaster* (S2) em processo contínuo**. 2010. 135 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- VILAS BOAS, A.M.; ANDRADE, R.M.; OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 39, n. 1, p. 123-128, 1996.
- WANG, C.; DUAN, Z.; ST LEGER, R.J. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 7, p. 302–309, 2008.
- WENZEL, I.M.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* substratos sólidos obtidos de grãos. **Científica: Revista de Ciências Agrárias**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 7-14, 2006.
- YAMADA, E.A.; ALVIM, I.D.; SANTUCCI, M.C.C.; SGARBIERI, V.C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.
- YPSILOS, I.K.; MAGAN, N. Impact of water-stress and washing treatments on production, synthesis and retention of endogenous sugar alcohols and germinability of *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 11, p. 1337–1345, 2004.
- ZABRISKIE, D.W.; ARMIGER, W.B.; PHILLIPS, D.H.; ALBANO, P.A. **Traders' guide to fermentation media formulation**. Memphis: Traders Protein, 2008. 60 p.