

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 *Bombyx mori* L., 1758

PEDRO M. O. JANEIRO NEVES
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO BATISTA ALVES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Entomologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo
Agosto/1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

N123p Neves, Pedro Manoel Oliveira Janeiro
 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 Bombyx mori L., 1758. Piracicaba, 1991.
 135p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Farinha-de-crisálida 2. Fungo - Meio de cultura
3. Fungo - Produção I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

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 *Bombyx mori* L., 1758

PEDRO M. O. JANEIRO NEVES

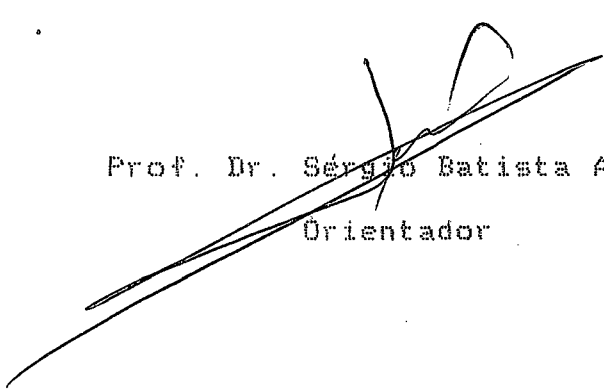
Aprovada em 23.08.91

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Batista Alves ESALQ/USP

Prof. Dr. Sinval Silveira Neto ESALQ/USP

Prof. Dr. Mohamed Ezz El-Din Habib UNICAMP


Prof. Dr. Sérgio Batista Alves
Orientador

*Aos meus Pais pelo sacrifício
e abnegação com que me cria-
ram e pelo amor que lhes te-
nho, à minha esposa Carmen,
meus filhos Francisco e Ma-
riana pelo apoio moral e es-
piritual*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior pela liberação e auxílio financeiro para realizar o curso de Pós-Graduação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves pela amizade, estímulo e orientação na elaboração deste trabalho.

Aos professores do departamento de Entomologia da ESALQ/USP pelos ensinamentos, apoio e amizade durante todo o tempo em que permaneci neste departamento.

À Prof. Dra. Marineia de Lara Haddad pela ajuda na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Jerry Stimac da Universidade da Flórida pela revisão do Summary.

A Solange Aparecida Vieira técnica do laboratório de Patologia de Insetos pelo apoio e colaboração incansáveis no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do curso em especial a Badilla, Elizabete, Orlando, Daniel, Madalena, Marilene e Ana Maria pela amizade e estímulo nas horas mais difíceis.

A todos os funcionários do departamento de Entomologia em especial à D. Cícera pela colaboração e amizade.

A todos os amigos de Piracicaba que sempre nos apoiaram nas atividades extra Universitárias.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O fungo <i>Nomuraea rileyi</i> e sua importân- cia no controle de insetos.....	3
2.2. O fungo <i>Beauveria bassiana</i> e sua impor- tância no controle de pragas.....	4
2.3. Métodos de produção de fungos entomopa- togênicos.....	6
2.3.1. Produção de <i>Nomuraea rileyi</i> e <i>Beauveria bassiana</i> em meios sólidos.....	8
2.3.2. Produção de <i>Nomuraea rileyi</i> e <i>Beauveria bassiana</i> em meios líqui- dos (fermentação submersa).....	14
2.3.3. Produção de <i>Nomuraea rileyi</i> e <i>Beauveria bassiana</i> pelo processo bifásico.....	23
2.4. Teste de patogenicidade com esporos de <i>Nomuraea rileyi</i>	25
2.5. Teste de patogenicidade com esporos de <i>B. bassiana</i>	28
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	32

3.1. Patógenos utilizados nos experimentos.....	32
3.2. Meios de cultura utilizados nos experi- mentos.....	32
3.2.1. Meios sólidos em placas de Petri.....	32
3.2.1.1. Constituição dos meios.....	33
3.2.1.2. Preparação dos meios.....	34
3.2.2. Meios sólidos no processo bifásico....	35
3.2.2.1. Constituição dos meios.....	36
3.2.2.2. Preparo dos meios.....	36
3.2.3. Meios líquidos.....	37
3.2.3.1. Constituição dos meios.....	37
3.2.3.2. Preparação dos meios.....	38
3.3. Produção de esporos e padronização das suspensões para os bioensaios.....	39
3.4. Insetos utilizados.....	39
3.4.1. Insetos utilizados nos testes de patogênicidade de <i>B. bassiana</i>	39
3.4.1.1. Formiga lava-pé <i>Solenopsis</i> <i>saevisima</i> Forel.....	40
3.4.1.2. Lagartas de <i>Diatraea</i> <i>saccharalis</i> (Fabr.).....	40
3.4.2. Insetos utilizados nos testes de patogênicidade de <i>N. rileyi</i>	40
3.4.2.1. Lagarta da soja <i>Anticarsia</i> <i>gemmatilis</i> (Hubner, 1818)....	40

3.5. Experimentos de produção e patogenicidade dos fungos entomopatogênicos.....	41
3.5.1. Produção de <i>N. rileyi</i> em diferentes meios sólidos.....	41
3.5.2. Teste de patogenicidade com <i>N. rileyi</i> produzido nos meios sólidos, sobre <i>A. gemmatalis</i>	43
3.5.3. Crescimento e produção de <i>B. bassiana</i> em diferentes meios sólidos.....	44
3.5.4. Teste de patogenicidade de <i>B. bassiana</i> produzido nos meios sólidos, sobre <i>S. saevissima</i>	45
3.5.5. Teste de patogenicidade de <i>B. bassiana</i> produzida nos meios sólidos, sobre <i>D. saccharalis</i>	47
3.5.6. Desenvolvimento de <i>N. rileyi</i> em meios líquidos.....	48
3.5.6.1. Curva de crescimento e de produção de matéria seca.....	48
3.5.7. Desenvolvimento de <i>B. bassiana</i> em meios líquidos.....	49
3.5.7.1. Curva de crescimento	

e produção de matéria seca.....	49
3.5.8. Produção de esporos de <i>N. rileyi</i> usando o processo bifásico.....	50
3.5.8.1. Produção do inóculo em meio líquido.....	50
3.5.8.2. Produção de esporos em meios sólidos.....	50
3.5.9. Teste de patogenicidade de <i>N.</i> <i>rileyi</i> produzido nos diferentes meios sólidos, do processo bifásico, usando lagartas de <i>A.</i> <i>gemmatalis</i>	52
3.5.10. Produção de <i>B. bassiana</i> uti- lizando o processo bifásico.....	52
3.5.10.1. Produção do inóculo em meio líquido.....	52
3.5.10.2. Produção dos esporos em meios sólidos.....	52
3.5.11. Teste de patogenicidade dos esporos de <i>B. bassiana</i> pro- duzidos nos diferentes meios sólidos, do processo bifásico, usando operárias de <i>S. saevissima</i> ...	53

3.5.12. Teste de patogenicidade dos esporos de <i>B. bassiana</i> produzidos nos diferentes meios sólidos, do processo bifásico, sobre lagartas de <i>D. saccharalis</i> ...	53
3.6. Custos de produção dos esporos de <i>N. rileyi</i> produzidos pelos métodos testados.....	53
3.7. Custos de produção de esporos <i>B. bassiana</i> produzidos pelos métodos testados.....	54
3.8. Análise da composição centesimal da farinha de crisálida do bicho-da-seda.....	54
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1. Análise da composição centesimal da farinha de crisálida do bicho-da-seda.....	56
4.2. Produção e crescimento de <i>N. rileyi</i> nos diferentes meios e testes de virulência e patogenicidade com os esporos produzidos.....	57
4.2.1. Produção de esporos de <i>N. rileyi</i> em meios sólidos.....	57
4.2.2. Teste de patogenicidade dos	

esporos de <i>N. rileyi</i> produzidos em diferentes meios sólidos, inoculados em lagartas de <i>A. gemmatalis</i>	65
4.2.3. Curva de crescimento de <i>N. rileyi</i> e produção de matéria seca.....	69
4.2.4. Produção de esporos de <i>N. rileyi</i> pelo processo bifásico.....	73
4.2.5. Teste de patogenicidade com esporos de <i>N. rileyi</i> , produzidos nos diferentes meios do processo bifásico, inoculados em lagartas de <i>A. gemmatalis</i>	77
4.3. Crescimento e produção de <i>B. bassiana</i> nos diferentes meios e testes de patogenicidade com os esporos produzidos.....	80
4.3.1. Crescimento radial e produção de esporos de <i>B. bassiana</i> nos diferentes meios sólidos.....	80
4.3.2. Teste de patogenicidade com os esporos de <i>B. bassiana</i> produzidos nos diferentes meios sólidos.....	89

4.3.2.1. Teste de patogenicidade utilizando operárias de <i>S. saevissima</i>	89
4.3.2.2. Teste de patogenicidade utilizando lagartas de <i>D. saccharalis</i>	92
4.3.3. Curva de crescimento e produção de matéria seca de <i>B. bassiana</i> pro- duzida em diferentes meios líquidos.....	95
4.3.4. Produção de esporos de <i>B. bassiana</i> pelo processo bifásico	99
4.3.5. Teste de patogenicidade com os esporos de <i>B. bassiana</i> produzidos pelo processo bifásico.....	103
4.3.5.1. Teste de patogenicidade utilizando operárias de <i>S. saevissima</i>	103
4.3.5.2. Teste de patogenicidade utilizando lagartas de <i>D. saccharalis</i>	105
4.4. Comparação dos custos de produção dos diferentes meios e processos utilizados...	108
4.4.1. Comparação dos custos de produção	

de <i>N. rileyi</i>	108
4.4.1.1. Nos meios sólidos.....	108
4.4.1.2. No processo bifásico.....	111
4.4.2. Comparação dos custos de produção de <i>B. bassiana</i>	112
4.4.2.1. Nos meios sólidos.....	112
4.4.2.2. No processo bifásico.	114
5- CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

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 *Bombyx mori* L., 1758

Autor: Pedro M. Janeiro Neves

Orientador: Prof. Dr. Sérgio B. Alves

RESUMO

O objetivo deste estudo foi o de desenvolver um meio eficiente e econômico para a produção de esporos de *Nomuraea rileyi* e *Beauveria bassiana*. Os meios à base de farinha de crisálida do bicho-da-seda *Bombyx mori* L. 1758 foram preparados com agar no processo sólido. A farinha foi também utilizada no processo bifásico no qual o micélio foi produzido no meio líquido e os esporos em meio sólido. A virulência dos fungos produzidos nestes meios foi comparada através de bioensaios com a virulência dos esporos produzidos nos meios comumente utilizados para estes entomopatógenos (SMAY e BDA). Para *N. rileyi* a maior produção de esporos foi obtida em SMAY (1×10^{12} esporos/litro de meio). O meio de farinha-de-crisálida-batata (FCBA) foi o mais econômico. Neste meio a formação de esporos foi mais rápida e o custo de produção foi 2,3 vezes menor do que em SMAY. No processo bifásico a maior produção de esporos de *N. rileyi* foi observada no meio de batata (Bat.). No entanto, o

meio de FCBA demonstrou ser o mais econômico para a produção de esporos e o mais produtivo em termos de massa micelial (5,4 mg/ml). Para o fungo *B. bassiana*, no processo sólido, foram produzidos mais esporos em BDA, custando menos da metade do custo de produção em FCBA. No processo bifásico, o meio de farinha de crisálida (FC) foi mais produtivo que o de BDA, sendo FC 127,8 vezes mais econômico. A produção de massa micelial seca de *B. bassiana*, em cultivo líquido foi maior no meio de farinha de crisálida batata (1064,4mg/ml). A virulência dos esporos de *N. rileyi* não foi afetada quando produzidos nos diferentes meios de cultura. No entanto esporos de *B. bassiana* produzidos no processo sólido em FCBA e no processo bifásico em FC foram mais virulentos em bioensaios com *Solenopsis saevissima* e *Diatraea saccharalis*.

Production of *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON and *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuill. utilizing culture media made with pupae of the silkworm *Bombix mori* L., 1758.

Author: Pedro M. Janeiro Neves

Adviser: Prof. Dr. Sérgio B. Alves

SUMMARY

The objective of this study was to develop an efficient and economic medium for the production of *Nomuraea rileyi* and *Beauveria bassiana*. Media with a base of *Bombix mori* pupae were prepared with agar in a solid process and also in a two-phase process in which the mycelia were produced in liquid and the spores in a solid medium. The virulences of the fungi produced in these media were compared with the virulences of the spores produced in the media commonly utilized for these entomopathogens (SMAY and PDA). For *N. rileyi*, the largest production of the conidia was obtained in SMAY (1×10^{12} conidia/liter of medium). The medium with pupae and potato (FCBA) was the most economical. In this medium the formation of spores was faster and therefore the production cost was 2.3 times less than in SMAY. In the two-phase process, the largest production of *N. rileyi* spores was observed in the potato medium (Bat). However, the FCBA was shown to be the most economical

for production of conidia and the most productive in terms of mycelial mass (5.4mg/ml). For *B. bassiana*, the most spores were produced in the solid process with PDA, costing less than one-half of the production cost with FCBA. In the two-phase process, the pupae medium (FC) was more productive than the PDA medium, being 127.8 times more economical. The production of dry mycelial mass of *B. bassiana* in liquid culture was larger in the pupa medium (1064 mg/ml). The virulence of *N. rileyi* was not affected when produced in different culture media. However, *B. bassiana* spores produced in FCBA solid process and in the FC two-phase process were more virulent in bioassays with *Solenopsis saevissima* and *Diatraea saccharalis*.

1. INTRODUÇÃO

Os entomopatógenos, parasitóides e predadores, são importantes controladores naturais de populações de insetos. Atuando em conjunto ou isoladamente, eles exercem o chamado controle biológico.

O controle dos insetos por patógenos é feito basicamente pelos fungos, vírus, bactérias e protozoários.

Dentre os diferentes patógenos, os fungos pertencem a um dos grupos mais importantes sendo responsáveis por 80% das doenças identificadas, agrupando-se em aproximadamente 90 gêneros e mais de 700 espécies (ALVES, 1986).

Entretanto, o uso de fungos no controle de insetos pragas é ainda incipiente em função de algumas desvantagens que limitam a sua aplicação. Uma das principais desvantagens dos inseticidas microbianos, em relação aos inseticidas químicos, é a relação custo/benefício, a curto prazo, para o agricultor. Esta relação está intimamente ligada ao custo de produção e à virulência do produto.

O custo de produção, bem como a virulência do produto, dependem do meio e do método utilizado para a sua produção em larga escala.

Ao contrário dos vírus e de algumas bactérias, patógenos obrigatórios, os fungos entomopatogênicos crescem e se reproduzem "in vitro", propiciando um amplo campo ao estudo de novas alternativas para o desenvolvimento de meios de cultura e métodos de produção que visem diminuir o seu custo final de modo a torná-los economicamente viáveis.

Com o objetivo de se desenvolver um meio e um método de baixo custo para a produção de *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON e *Beauveria bassiana* (BALS) VUILL., dentro de um programa de produção em larga escala, utilizou-se como ingrediente principal, neste estudo, a farinha de crisálida, um subproduto da industrialização da seda, oriunda do cozimento e maceração das crisálidas do bicho-da-seda *Bombyx mori* L. 1758.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O fungo *Nomuraea rileyi* e sua importância no controle de insetos

O fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON é citado na literatura atacando diversas pragas de importância econômica no Brasil e em várias partes do mundo.

Em lavouras algodoeiras no estado de São Paulo constatou-se um parasitismo da ordem de 50 a 60% em lagartas de *Trichoplusia ni* (Hueb., 1802) causado por *N. rileyi* (ALVES *et alii*, 1978).

Em lavouras de soja, epizootias provocadas por *N. rileyi* em populações de *Anticarsia gemmatalis* (HUBNER, 1818) e *Pseudoplusia includens* (WALKER, 1857) são frequentes. HOFFMANN *et alii* (1979) citaram *N. rileyi* como o patógeno mais importante, em lavouras de soja no Estado do Paraná, parasitando 49% das lagartas de *A. gemmatalis* e 33% de *Plusia spp.*

No Brasil, *N. rileyi* é ainda citado como parasito natural de *Bombix mori* L., 1758 e *Diatraea saccharalis* (F., 1794) e, em laboratório, de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (ALVES, 1986).

Em outros países, *N. rileyi* tem sido também citado como patógeno de outras espécies de insetos.

Na Índia três espécies de lepidópteros, *Spodoptera litura* (Fabr.), *Achaea janata* (L.) e *Strenachroia elongella* (H.) mostraram-se altamente susceptíveis a *N. rileyi* em condições de laboratório, (PHADKE & RAD, 1978).

IGNOFFO (1981), relatou que *N. rileyi*, nos Estados Unidos da América, ocorre parasitando lagartas de lepidópteros como *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1776), *A. gemmatalis*, *Heliothis zea* (Bod., 1850), *H. virescens* (Fabr., 1781), *P. includens* e *S. frugiperda*, todas importantes no Brasil, e ainda em *Ostrinia nubilalis* (Hubn. 1796) e *Platypena scabra* (F.). Este autor citou também como susceptíveis dois coleópteros, *Hypera punctata* (F.) e *Leptinotarsa decemlineata* (Say.).

Um isolado de *N. rileyi* proveniente do Japão, onde parasitava *Spilosoma* sp. um arctiideo, foi utilizado em testes para o controle de *S. frugiperda* (MANIANIA & FARGES, 1985). Também, de uma importante praga de arrozais da Ásia, *Chaphalocrosis medianalis*, isolou-se *N. rileyi* para estudos de crescimento e produção (IM *et alii*, 1988).

2.2. O fungo *Beauveria bassiana* e sua importância no controle de pragas.

O fungo *Beauveria bassiana* é um dos patógenos de insetos mais estudados. A sua ocorrência parasitando insetos em várias partes do mundo e no Brasil tem sido bastante citada.

Assim, ALVES (1986) apresentou uma relação com as espécies de insetos de importância agrícola susceptíveis a *B. bassiana*. Dentre as diversas espécies mencionadas destacam-se *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908), *Castnia licus* (Drury, 1773), *Ceratomyxa arcuata*, *Deois flavopicta*, *Diatraea saccharalis*, *Diabrotica speciosa* (Germ., 1824), *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1967), *Nezara viridula* (L., 1758), *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) e *Solenopsis* spp. Também a espécie *B. bassiana* é citada como parasitando *Euschistus heros* (Fabr., 1775) em laboratório (BARBOSA & CZEPACK, 1984).

Em lavouras algodoeiras *Anthonomus grandis* é frequentemente parasitado por *B. bassiana*.

Nos Estados Unidos, BELL & HAMALLE (1970) constataram 100% de parasitismo em larvas e 90% em adultos de *Chalcodermus aeneus*.

A broca da bananeira, *Cosmopolites sordidus* (Germ., 1824), é também parasitada por *B. bassiana* (DELATTRE & JEAN BART, 1978). No Brasil este fungo vem sendo

utilizado para o controle deste inseto em condições de campo (MELD, 1983 ; ALVES, 1986).

Uma importante praga no hemisfério norte, *Ostrinia nubilalis*, tem sido controlada com a aplicação de *B. bassiana* (FERRON, 1981 e FENG *et alii*, 1988).

FERRON (1981) citou que na União Soviética o produto Boverin (30×10^9 esporos de *B. bassiana* por grama) é usado para o controle de *L. decemlineata* combinado com pequenas dosagens de clorpirifós. O controle deste inseto na América do Norte, em lavouras de batata, usando *B. bassiana*, vem sendo também estudado (ANDERSON *et alii*, 1988).

Os insetos parasitos e predadores assim como os úteis (bicho-da-seda e abelhas) têm sido atacados por *B. bassiana*. Assim, MAGALHÃES *et alii* (1986) mostraram a patogenicidade deste fungo a *Coleomegilla maculata* (De Geer, 1775) e *Eriopsis connexa* (Germar, 1824). ALVES *et alii* (1990) constataram, em condições de laboratório, a patogenicidade de *B. bassiana* para *Apis mellifera*.

2.3. Métodos de produção de fungos entomopatogênicos.

Várias estratégias podem ser utilizadas para se introduzir, incrementar ou conservar uma doença numa população de insetos. Assim podem ser utilizadas

práticas culturais adequadas, uso de defensivos seletivos, etc..

Entretanto, nos casos de introdução inundativa há a necessidade de liberação de grandes quantidades do patógeno no agroecossistema em pulverização, como normalmente é feita com inseticida químico. Neste caso torna-se necessária a produção de grandes quantidades de inóculo por um processo economicamente viável. Basicamente, a produção do patógeno pode ser feita de dois modos: "*in vivo*" sobre o inseto hospedeiro ou "*in vitro*" utilizando-se um meio de cultivo adequado. A produção "*in vivo*", apesar de suas vantagens em relação à elevada virulência dos propágulos produzidos, torna-se impraticável pelo baixo rendimento obtido. Por outro lado, a produção "*in vitro*" é viável e altamente exequível para muitos fungos.

Um meio de cultivo ideal pode ser definido como aquele que produz uma quantidade elevada do agente infectivo (conídio), com elevados níveis de virulência, num curto espaço de tempo e a um baixo custo.

Segundo SOPER & WARD (1981), um meio deve conter uma fonte de carbono, uma de nitrogênio, sais inorgânicos e, em alguns casos, certos fatores de crescimento.

Basicamente, existem três métodos de produção de fungos "*in vitro*", que são: a) meios sólidos ou semi-sólidos; b) meios líquidos ou fermentação submersa e

c) meios líquidos ou semi-líquidos e sólidos, que é a fermentação bifásica.

Alguns autores consideram os meios sólidos e semi-sólidos como métodos distintos (ROBERTS & YENDOL, 1971 e SOPER & WARD, 1981). Entretanto, neste trabalho, seguiremos o proposto por ALVES (1986), que considera o uso destes dois tipos de meio como um método único de produção.

2.3.1. Produção de *Nomuraea rileyi* e *Beauveria bassiana* em meios sólidos.

Na maioria dos trabalhos relativos à produção em meios sólidos objetiva-se uma pequena quantidade de esporos visando testes laboratoriais sobre insetos hospedeiros. Deste modo, utilizam-se geralmente nutrientes dispendiosos misturados a agar em placas de Petri.

O fungo *N. rileyi* tem sido produzido principalmente em meio de SMAY (Sabouraud maltose agar e extrato de levedura a 1%) (BELL, 1975; GARCIA & IGNOFFO, 1978; BELL *et alii*, 1982; MOHAMED *et alii*, 1985; COUDRON *et alii*, 1985; HOLDON & VAN de KLASHORST, 1986a; ALVES, 1986; BALARDIN & LOCH, 1988 e IGNOFFO *et alii*, 1989). Alguns autores utilizaram diferentes concentrações de extrato de levedura como 0,5% (IGNOFFO, 1976a) e 0,2% (FARGES & RODRIGUEZ-RUEDA, 1980). Vários autores têm estudado a influência da concentração de extrato de levedura no desenvolvimento de *N. rileyi*. Na maioria dos trabalhos

observa-se que a adição deste nutriente tem melhorado a esporulação do fungo. Assim, IM *et alii* (1988), constataram que, em meio sólido, o extrato de levedura a 2% foi a melhor fonte de nitrogênio para o crescimento de *N. rileyi* e a dextrose, a melhor fonte de carbono. LOCH (1978) observou que *N. rileyi* não se desenvolveu em meio mínimo. Entretanto, quando se adicionou 18 gramas de extrato de levedura por litro de meio, o fungo cresceu e esporulou abundantemente, produzindo 12.23×10^9 esporos por placa de 20 ml.

CAMARGO (1981), testando diversos meios para o crescimento de *N. rileyi*, observou que, mesmo sem o extrato de levedura, SMA foi o melhor para o desenvolvimento micelial do fungo.

SILVA & LOCH (1987), ao testarem meios à base de arroz polido para o crescimento de *N. rileyi*, utilizaram para todos os tratamentos duas concentrações de extrato de levedura, 2% e 4%, e chegaram a uma equação de regressão linear que mostrou um aumento na concentração de esporos à medida que se aumentou a concentração de extrato de levedura.

Com relação à utilização de outros ingredientes que possam substituir o meio de SMAY no crescimento e esporulação de *N. rileyi* em meios sólidos, vários estudos têm sido feitos.

FARGES & RODRIGEZ-RUEDA (1980) utilizaram um meio de suco de cenoura e tomate (200ml), CaCO_3 (3g), glucose (5g), extrato de levedura (2g) e gelose (15g) em um litro de água destilada. Entretanto estes autores não citaram as produções alcançadas.

Um meio à base de arroz foi utilizado com agar (60g de arroz e 15g de agar em um litro de água destilada) por CAMARGO (1981). Entretanto, o crescimento micelial foi reduzido, não ocorrendo esporulação.

Utilizando também arroz com diferentes proporções de grãos, líquido e extrato de levedura, com ou sem fervura pré-esterilização, SILVA & LOCH (1987) observaram que as diferentes proporções de grãos e líquido não influenciaram significativamente na produção de esporos mas a fervura pré-esterilização e o extrato de levedura influenciaram significativamente. O melhor tratamento, em relação à produção de esporos, foi obtido quando se utilizou 1:1 na proporção grãos e líquido, com 4% de extrato de levedura e um minuto de fervura pré-esterilização, obtendo-se uma produção de $3,16 \times 10^{10}$ esporos por 40g de meio, sendo a produção em SMAY igual a $7,08 \times 10^9$ esporos por 40g de meio. Em relação ao custo dos dois meios, utilizando-se arroz, o melhor meio teve custo 6 vezes menor que o meio de SMAY sendo este de US\$ 3,00 e US\$ 18,00 respectivamente.

Ainda, testando nutrientes de baixo custo para a produção de diferentes isolados de *N. rileyi*, BALARDIN (1984) estudou meios à base de extrato de aveia, batata, tomate e cenoura, (extrato a 25% mais 3% de farinha de cevada maltada para aveia, cenoura e tomate e 2% de dextrose para o meio de batata adicionando a todos os meios 1,5% de agar e 1% de extrato de levedura), em comparação a SMAY. Este autor observou que, para o isolado Passo Fundo, o melhor meio foi SMAY e para o outro isolado, Camaquã, o melhor meio foi o de tomate com produções de $12.382,5 \times 10^6$, e $7024,5 \times 10^6$ esporos por 13 g, respectivamente aos 14 dias após a inoculação. O autor, entretanto, não fez uma análise de custos de produção para os diferentes meios testados.

HOLDOM & van de KLASHORST (1986b) testaram diferentes fontes de carboidratos e de proteínas para a elaboração de meios alternativos a SMAY. Observaram uma grande variação no crescimento micelial e na esporulação em todos os meios utilizados, inclusive em SMAY. Neste último meio, entretanto, a produção de esporos foi maior. Para a produção de esporos, entre os diversos nutrientes estudados, a melhor fonte de proteína foi o levedo de cerveja seguido por leite em pó desnatado e a melhor fonte de carboidratos foi amido solúvel seguido do amido de milho. Observou-se ainda que *N. rileyi* utilizou somente a parte solúvel do amido. Os custos dos meios alternativos foram dez vezes

menores que os custos de SMAY.

Ainda com relação aos custos de produção de *N. rileyi*, BELL *et alii* (1982) produziram 5,5 Kg de esporos do fungo, em meio de SMAY com 1% de extrato de levedura, a um custo de US\$ 1,75 por grama de esporos (1978-1979) com uma média de $74,2 \times 10^9$ esporos por grama.

Assim, torna-se evidente, a possibilidade da utilização de nutrientes de baixo custo, em comparação a SMAY, para a produção de esporos de *N. rileyi*.

Com relação a *B. bassiana*, para a sua produção em pequena escala, visando a utilização dos esporos em testes de laboratório, usou-se, na maioria dos trabalhos, o meio de batata, dextrose, agar (BDA) ou Sabouraud dextrose agar (TONET & REIS, 1979; SMITH & GRULA, 1981; BARBOSA & CZEPACK, 1984; ALVES *et alii*, 1985; ALVES, 1986; FOGAL *et alii*, 1986; e STIMAC *et alii*, 1987). Para a obtenção de maiores produções de esporos, alguns autores adicionaram também ao meio de BDA extrato de levedura a 1% (BELL & HAMALLE, 1970; MAGALHÃES *et alii*, 1986; FERNANDES, 1988 e FERNÁNDEZ, 1989).

O crescimento radial e a esporulação de *B. bassiana* utilizando vários meios em placas de Petri foi estudado por NAHAS & ARAI (1987). Para o crescimento radial houve um decréscimo nos diferentes meios na seguinte ordem: Pontecorvo, farelo de arroz, Tedders, farinha de crisálida, farelo de trigo, farelo de soja, Czapeck e

Sabouraud. Para a produção de esporos, os melhores meios foram : Pontecorvo e farelo de trigo com 11×10^9 e 13×10^9 esporos por placa de 7 cm de diâmetro, respectivamente. Os farelos foram usados, neste experimento, a 3% (peso/volume). Ainda segundo estes autores, para o meio de farinha de crisálida do bicho-da-seda a produção de esporos foi de $4,6 \times 10^9$ esporos de *B. bassiana* por placa. Esta foi a única citação encontrada de farinha de crisálida sendo utilizada como nutriente no desenvolvimento de um fungo entomopatogênico.

Visando o cultivo de *B. bassiana* em larga escala para aplicações a campo, têm-se utilizado meios sólidos à base de farelos ou grãos de cereais. Um dos cereais mais utilizados é o arroz que é inicialmente tratado numa pré-fervura, para que amoleça parcialmente, sendo então colocado em sacos autoclaváveis, garrafas de "soro" ou frascos de Roux, onde, após a esterilização, se inocula o fungo, ocorrendo um intenso crescimento micelial e esporulação (VILLACORTA, 1976; MARQUES *et alii*, 1981; GOETHEL, 1984; ALVES, 1986 e FOGAL *et alii*, 1986).

Assim, GOETTEL (1984), quantificou produções médias de $0,8 \times 10^8$ esporos de *B. bassiana* por cm^2 utilizando farelo de trigo.

FOGAL *et alii* (1986) utilizando também farelo de trigo observaram produções de 60 mg de esporos por grama de meio com uma concentração de $7,5-9,5 \times 10^7$

esporos por mg ou aproximadamente $4,5-5,7 \times 10^7$ esporos por grama de meio.

ALVES & PEREIRA (1989) desenvolveram o método de bandejas, utilizado o arroz como meio, colocado em sacos plásticos onde o fungo é inoculado. Após a formação do micélio, o material é transferido para bandejas especiais onde ocorre a esporulação do fungo. Estes autores observaram produções de 30,8 mg de esporos por grama de meio com uma concentração de $2,0 \times 10^8$ esporos por mg ou $6,16 \times 10^9$ esporos por grama de meio.

Além do farelo de cereais, pedaços de mandioca de 1 cm^2 misturados a farelo de arroz (8:1 peso/peso), suplementados com fontes de nitrogênio de baixo custo como uréia e extrato de farinha de peixe fervida foram também utilizados na produção de *B. bassiana* (MOHAN & PILLAI, 1982).

TONET & REIS (1979), testaram vários meios para a esporulação de *B. bassiana*. As maiores produções foram observadas no meio de semolina-agar com 414×10^7 esporos por círculo de 13 mm de diâmetro, sendo que em BDA a produção foi de $74,5 \times 10^7$ esporos por círculo.

2.3.2. Produção de *Nomuraea rileyi* e *Beauveria bassiana* em meios líquidos (fermentação submersa).

De um modo geral, a utilização de meios líquidos tem por objetivo a produção de grandes quantidades

do fungo, esse processo de produção, quando comparado à produção em meios sólidos, tem a vantagem de utilizar menor espaço e menos mão de obra.

No desenvolvimento de fungos entomopatogênicos em meio líquido, ocorre geralmente a formação de blastosporos que apresentam menor capacidade infectiva e são menos resistentes ao armazenamento e aos fatores climáticos (RIBA & GLANDARD, 1980 ; BELL, 1975).

Para a produção de *N. rileyi* em meios líquidos, BELL (1975) somente conseguiu produzir blastosporos. Estes blastosporos quando aplicados topicamente sobre lagartas de *H. zea* não provocaram mortalidade, caracterizando a falta de infectividade. Esporos do mesmo isolado produzidos em SMAY provocaram 98,4% de mortalidade para estas lagartas.

RIBA & GLANDARD (1980), utilizando um meio base constituído por : KH_2PO_4 (0,04%); Na_2HPO_4 (0,14%); MgSO_4 (0,06%); KCl (0,1%); NO_3NH_4 (0,07%); glucose (1%) e extrato de levedura (0,5%), testaram a influência da adição de Tween 80 observando um incremento na produção de blastosporos para uma concentração de 0,01% e 72 horas de fermentação. Estudando a melhor fonte de nitrogênio, estes autores observaram que o nitrogênio inorgânico (NH_4 ou NO_3) foi pouco ou nada assimilado. Por outro lado, o nitrogênio orgânico, extrato de levedura a 2%, foi o que propiciou um melhor desenvolvimento do fungo. Neste experimento

observou-se ainda que o citrato de sódio favoreceu também o desenvolvimento da massa micelial sem afetar a blastogênese. Os blastosporos produzidos quando inoculados tópicamente em *M. zea* não causaram mortalidade. Entretanto, a injeção intrahemocélica dos blastosporos foi patogênica às lagartas. Ainda com relação ao extrato de levedura, IM *et alii* (1988) citam que este nutriente a 8% foi a melhor fonte de nitrogênio para *M. rileyi*. Com relação à melhor fonte de carbono estes autores concluíram ser a sacarose.

Devido à dificuldade de se produzirem esporos em meio líquido, alguns autores testaram a possibilidade de se produzir somente a massa micelial que após um tratamento poderia ser armazenada para posterior aplicação no campo, onde ocorreria a esporulação do fungo com a conseqüente produção de esporos (Mc COY *et alii*, 1971 e McCABE & SUPER, 1985).

Com relação a *M. rileyi*, HOLDON & KLASHORST (1986a) produziram micélio, por fermentação submersa, utilizando SKY. Após colhido, o micélio sofreu vários tratamentos. Entretanto, observou-se que ocorreu maior esporulação quando o micélio foi deixado para esporular sem sofrer nenhum tratamento. Estes autores testaram ainda a aplicação do micélio do fungo sobre folhas de feijoeiro e algodoeiro pulverizando-as ou mergulhando-as numa suspensão de micélio do fungo que, após colhido, foi misturado a diversos nutrientes. As folhas, depois de tratadas, foram

deixadas sobre papel de filtro umedecido em placas de Petri. Colocaram-se, então, lagartas de *Heliothis spp.* para se alimentarem das folhas tratadas e, para todos os tratamentos, ocorreu mortalidade das lagartas pelo fungo. Observou-se que as folhas apresentavam pontos de esporulação. No tratamento no qual as folhas de feijoeiro foram mergulhadas na suspensão de micélio, com 1% de leite em pó desnatado, 4% de glicerol e 0,01% de Triton X-100, ocorreu uma mortalidade de 89,7% das lagartas. Por outro lado, quando se pulverizaram plantas de algodoeiro e feijoeiro com uma suspensão de micélio, não se observou mortalidade das lagartas de 1^o instar de *Heliothis spp.* após 2 semanas.

MORROW & BOUCIAS (1988) efetuaram uma análise comparativa do crescimento "in vitro" do corpo hifal e do estágio micelial de *N. rileyi* em meio à base de SMY. Estes autores avaliaram parâmetros de crescimento (como peso seco), parâmetros morfológicos, utilização de carbono e nitrogênio e alterações no pH, medido no sobrenadante. Neste experimento definiu-se como corpos hifais o micélio retirado de placas de Sabouraud dextrose ágar mais extrato de levedura a 2% (SDY) inoculadas com esporos de *N. rileyi* retirados de lagartas mortas pelo fungo. O estágio micelial foi definido como o micélio desenvolvido em caldo de SDY a partir de esporos de *N. rileyi* retirados de placas de SMAY. O estudo foi realizado a 27^o C em fermentadores de 6 litros,

pH inicial igual a 6, com aeração (5 litros /min.) e agitação. As amostras foram coletadas de 4 em 4 horas.

No desenvolvimento dos corpos hifais observou-se uma fase estacionária de 4 horas, com um pico no crescimento 50 horas após a inoculação. Por outro lado, o estágio micelial mostrou um crescimento linear até 23 horas após a inoculação, ocorrendo então um decréscimo de 46,6% no peso seco devido, provavelmente, à formação de agregados de hifas provocando o rompimento das células no seu interior. Entretanto, após esta fase de decréscimo no crescimento do micélio, o mesmo voltou a crescer atingindo o máximo peso seco, 15,8 mg por ml de meio, 57 horas após a inoculação.

Com relação ao pH do sobrenadante, no desenvolvimento dos corpos hifais observou-se um pH constante na fase estacionária de crescimento, diminuindo para 5,5 decorridas 48 horas após a inoculação. Para o sobrenadante do meio onde se desenvolveu o estágio micelial, houve um aumento constante do pH correlacionado com o aumento do peso seco. Neste caso, o maior pH (7,5) foi observado na fase de crescimento estacionário. Ainda, com relação ao pH, IM et alii (1988) citaram a faixa de 6 a 7 como a ideal para o desenvolvimento de *N. rileyi*, com um ótimo de 6,7.

MORROW & BOUCIAS (1988) observaram ainda que, embora ocorram formas de crescimento diferentes para

as duas culturas, corpos hifais e estágio micelial, ambas têm curvas de crescimento similares e que o máximo peso seco de ambas depende da concentração inicial de carboidratos e aminoácidos do meio de cultivo.

Estudos relativos à produção de *B. bassiana* em meio líquido são encontrados em maior número do que para *N. rileyi*.

Com relação à seleção das melhores fontes de carbono para o desenvolvimento de *B. bassiana*, SMITH & GRULA (1981) citaram que uma fonte de carbono como glucose-n-acetil glucosamine, glucosamina, quitina, amido ou lanolina, entre outras, deve estar presente para que ocorra a germinação dos esporos em meio líquido. CAMPBELL *et alii* (1983) estudaram o crescimento de *B. bassiana* utilizando meios com diferentes fontes de carboidratos observando que D-melezitose propiciou as maiores produções de massa micelial seca com 515,2 mg por 45 ml de meio ou 11,44 mg por ml de meio. SANSINÁKOVÁ *et alii* (1981) citaram o sorbitol como a melhor fonte de carbono para o desenvolvimento de *B. bassiana* em meio líquido sem agitação, onde ocorre a formação de uma nata de micélio na superfície do meio com uma subsequente esporulação.

Com relação à utilização de nitrogênio, SMITH & GRULA (1981) citam que tanto as formas orgânicas como as inorgânicas são facilmente assimiladas pelo patógeno. BARNES *et alii* (1975) referiram-se à peptona de

soja e à peptona de caseína como sendo as fontes de nitrogênio que propiciaram o maior crescimento micelial e o extrato de levedura, a maior esporulação. CAMPBELL *et alii* (1978) estudaram o desenvolvimento de *B. bassiana* em meios contendo diversos aminoácidos e relataram que as maiores produções foram observadas para L-triptofano, produzindo 222 mg por 50 ml de meio ou 4,44 mg por ml aos 20 dias após a inoculação. Por outro lado, SANSINÁKOVÁ *et alii* (1981) relataram ser peptona a melhor fonte de nitrogênio para o desenvolvimento de *B. bassiana* em meio líquido.

Para a formação de blastosporos e crescimento micelial, os meios de peptona (1%), glucose (2%) e extrato de levedura a 0,2% foram, respectivamente, os melhores (BIDOCHKA *et alii*, 1987). Estes autores observaram produções de biomassa de 2,5 mg por ml de meio no 6^o dia após a inoculação.

Assim como outros fungos *B. bassiana* em fermentação submersa produz também blastosporos quando sob agitação. Entretanto, THOMAS *et alii* (1987) produziram esporos em fermentação submersa utilizando um meio definido. Segundo estes autores, a produção de esporos depende da natureza da fonte de carbono e da presença de nitrato como fonte de nitrogênio. As maiores produções de esporos, 5×10^8 por ml de meio, foram obtidas utilizando glucose como fonte de carbono numa proporção glucose:nitrato de 5:1. Observou-se que a redução da concentração

de fosfato diminuiu a quantidade de esporos, embora estes se mostrassem morfológicamente mais semelhantes aos esporos verdadeiros. Estes autores observaram ainda que os esporos são formados a partir dos blastosporos por um microciclo de esporulação. Neste estudo não foram realizados testes de patogenicidade dos esporos produzidos.

ROMBACH (1989) produziu esporos de *B. bassiana* em meio líquido utilizando sacarose (2 %), extrato de levedura (0,5 %) e sais básicos, obtendo $73-170 \times 10^6$ esporos por ml de caldo, sendo que 95 % destes esporos germinaram.

A técnica de produção de micélio de *B. bassiana* em meio líquido visando a sua aplicação no campo, onde ocorre a esporulação, tem sido também estudada. Assim, PEREIRA (1987) tendo como objetivo desenvolver a melhor formulação para o micélio, utilizou um meio de dextrose (1%), extrato de levedura (1 %), óleo de girasol (0,1 %) e penicilina e streptomina (0,05 %).

Utilizando um meio de sacarose (3,5 %) e extrato de levedura (3,5 %), ROMBACH et alii (1988) obtiveram as maiores produções de micélio. Por outro lado, a produção de esporos por mg de micélio seco foi maior com o micélio que se desenvolveu num meio com maltose (2%) e extrato de levedura (0.75%).

Considerando-se o custo do fermentador e do meio e visando otimizar a produção de esporos por ml de

fermentador, estes autores concluíram que as maiores produções são obtidas com um meio de sacarose (3,5 %) e extrato de levedura (3,5 %). A patogênicidade dos esporos produzidos durante este experimento não foi testada.

A utilização de meios líquidos de baixo custo e facilmente disponíveis tem também sido estudada para *B.bassiana*. Assim, BATISTA FILHO *et alii* (1985) utilizaram meios à base de caldo de feijão, arroz e batata e inocularam *B.bassiana*, deixando crescer uma nata superficial onde, posteriormente, ocorreu a esporulação do fungo. Quantificando a produção de esporos, os autores observaram ser o caldo de feijão 8,8 vezes superior ao de arroz e 16,8 vezes ao de batata.

Ainda testando meios de baixo custo para o cultivo de *N.anisopliae*, ADÁMEK (1965), utilizou um meio à base de xarope de milho (3 %), glicose (4 %) e extrato de levedura (4 %) onde se produziram grandes quantidades de esporos, que causaram 50 % de mortalidade em *Galleria mellonella*.

Procurando determinar a curva de crescimento de *Hirsutella thompsoni* e visando a produção em larga escala em meio líquido, McCODY *et alii* (1975) colocaram 99ml de meio em Erlenmeyers de 250 ml dispostos num agitador a 180 rpm. Das 24 às 192 horas após a inoculação, foram retirados, a cada 24 horas, 5 Erlenmeyers onde se determinou o peso seco da massa fúngica. Observou-se, para

este fungo, um pico no crescimento micelial às 120 horas após a inoculação. Em estudos de crescimento e esporulação de *B.bassiana* e *N.anisopliae* em meio líquido, vários autores utilizaram metodologia semelhante à usada por Mc COY *et alii* (1975) para a determinação do peso seco (BARNES *et alii*, 1975; CAMPBELL *et alii*, 1978 e ROMBACH *et alii*, 1988).

McCOY *et alii* (1971) produziram o micélio seco de *H. thompsoni* em cultivo submerso. Após colhido o micélio, foi pulverizado no campo onde ocorreu a esporulação do fungo 24 horas após a aplicação.

WINKELHOFF & McCOY (1984) produziram também esporos de *H. thompsoni* var. *synnemafosa* em cultivo submerso. Estes esporos foram patogênicos ao ácaro da falsa ferrugem.

2.3.3. Produção de *Nomuraea rileyi* e *Beauveria bassiana* pelo processo bifásico.

Como já discutido no item anterior, a maioria dos fungos entomopatogênicos, deuteromicetos, não produzem esporos em meio líquido e sim blastosporos sem capacidade infectiva. Para se contornar este problema, desenvolveu-se um processo bifásico de produção, onde, numa primeira fase o micélio do fungo é produzido em meio líquido sendo posteriormente inoculado num meio sólido onde ocorre a esporulação com conseqüente produção de esporos.

Para a produção de esporos de *N. rileyi* pelo processo bifásico poucos trabalhos são encontrados.

CAMARGO (1981) retirou um pedaço de micélio de placas de SMAY e colocou-o num recipiente com meio de batata e dextrose por 7 dias. O conteúdo do frasco foi então vertido em placas com BDA, observando-se uma intensa esporulação, 6 dias após.

Culturas de 4 à 7 dias de *N. rileyi* em SMY foram utilizadas por HOLDOM & VAN DE KLASHORST (1986b) para o estudo de um processo bifásico de produção. Após centrifugada, a massa micelial foi resuspensa em diversas soluções com diferentes nutrientes. Observou-se então uma intensa esporulação em todas as placas aproximadamente 2 a 4 dias após a inoculação, sendo os melhores tratamentos SMY, seguido por extrato de levedura e neopeptona. Em outro teste, os autores utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a inoculação do micélio produzido em SMY ou em caldo de leite em pó e malte. A quantificação da produção de esporos, no bagaço, mostrou que o micélio produzido em S.M.Y, quando inoculado em bagaço, produziu em média $8,7 \times 10^9$ esporos por 5 gramas de meio, produção esta 10 vezes superior à alcançada quando se inoculou o bagaço com micélio produzido em leite em pó mais malte. Entretanto, o meio de leite em pó mais malte foi 20 vezes mais econômico.

Para a produção de *B.bassiana* através de um processo bifásico, estudos têm sido realizados principalmente na U.R.S.S.. Assim, FERRON (1981) relata que naquele país, após produzido em fermentadores, o micélio de *B.bassiana* é colhido e colocado em bandejas onde ocorre a esporulação. Este autor citou ainda que uma fábrica piloto produz anualmente 22 toneladas de Boverin, um produto comercial padronizado com 6×10^9 esporos por grama.

2.4. Teste de patogenicidade com esporos de *Nomuraea rileyi*

O cultivo de um fungo entomopatogênico "in vitro" pode aumentar ou diminuir a virulência de seus esporos quando comparada à virulência de um mesmo isolado produzido "in vivo" sobre a espécie hospedeira. Para a maioria dos fungos entomopatogênicos as sucessivas repicagens "in vitro" diminuem a sua capacidade infectiva. Deste modo, no desenvolvimento de um meio de cultivo é necessário estudar-se a influência dos meios de cultura na virulência dos esporos ali produzidos.

Entretanto, nota-se que na maioria dos trabalhos visando o desenvolvimento de um meio de cultivo, não são feitos testes comparando a virulência dos esporos produzidos nos diferentes meios.

Com relação à virulência de *N. rileyi* repicada diversas vezes "in vitro", IGNOFFO *et alii* (1982a) mostram que para o isolado estudado não houve diferença significativa na virulência sobre *T. ni* após doze repicagens em SMAY (1% extrato de levedura) em comparação a doze repicagens em *T. ni*. Mudanças na coloração ou na morfologia das colônias "in vitro" ou "in vivo" não foram observadas. A partir da 12ª repicagem até à 18ª houve um decréscimo no CL₅₀ proporcionado pelos esporos produzidos "in vitro", não sendo esta diferença estatisticamente significativa. Estes autores citaram ainda que quedas na virulência estão associadas ao crescimento do fungo em condições subótimas.

MORROW *et alii* (1989), estudando um outro isolado de *N. rileyi*, observaram que, a partir da 6ª repicagem em SMAY os esporos inoculados em *A. gemmatilis* provocaram a morte das lagartas, não ocorrendo, entretanto, conidogêneses. A partir da 10ª repicagem os esporos mostraram-se cada vez menos virulentos sendo que após a 16ª repicagem não foram mais patogênicos às lagartas. Estes autores associaram as reduções na virulência à perda de capacidade na formação do estágio leveduriforme observada após a 6ª repicagem de esporos em SMAY. Esta conclusão baseia-se nos resultados observados neste experimento, onde mais de 80 repicagens de corpos hifais no estágio leveduriforme em SMAY não diminuíram a virulência dos

esporos produzidos quando inoculados em *A. gemmatalis*.

As técnicas utilizadas para a inoculação de esporos de *N. rileyi* em bioensaios, visando testar a virulência e a patogênicidade deste fungo, são basicamente duas. Na primeira delas, a aplicação é feita topicamente por pulverização ou pincelamento dos insetos em estudo como *A. gemmatalis*, *Trichoplusia ni* ou *Heliothis spp.* (BELL, 1975; FARGES & RODRIGEZ-RUEDA, 1980; BELL & HAMALLE, 1980 e MIELITZ & SILVA, 1985). Um outro modo de inoculação de esporos de *N. rileyi* baseia-se na pulverização da superfície de um substrato como folhas da planta hospedeira do inseto (IGNOFFO *et alii* 1976b; FARGES & RODRIGEZ-RUEDA, 1980; BELL & HAMALLE, 1980; BOUCIAS *et alii*, 1984; IGNOFFO & GARCIA, 1985 e MIELITZ *et alii*, 1988) ou pulverizando-se a superfície de dietas artificiais, sem substâncias fúngicas, onde os insetos se alimentam por um certo período (BOUCIAS *et alii*, 1982 e GARCIA & IGNOFFO, 1978).

Comparando os dois métodos de inoculação, em dieta artificial e em discos de folhas, GARCIA & IGNOFFO (1978) concluíram que o tratamento de superfícies de dieta foi mais fácil de ser usado. Entretanto, esta técnica é menos sensível do que o tratamento de folhas, quando se utilizam baixas concentrações de esporos por mm².

Estudos referentes ao instar do estágio larval em que o inseto deve ser inoculado mostram que quanto mais desenvolvida a lagarta maior é a resistência ao

fungo, para uma determinada dosagem (BOUCIAS *et alii*, 1984).

Na maioria dos trabalhos em que lagartas de noctuídios foram inoculadas com *N. rileyi*, utilizaram-se lagartas de 2^o ou 3^o instar (IGNOFFO *et alii*, 1976b; GARCIA & IGNOFFO, 1978; BOUCIAS *et alii*, 1982 e BOUCIAS *et alii*, 1984).

Para a determinação do CL₅₀ de diferentes isolados de *N. rileyi*, observa-se que existe uma grande variabilidade. IGNOFFO & GARCIA (1985) determinaram o CL₅₀ de dois isolados de *N. rileyi*, sendo um do Equador e outro do Estado do Mississippi, em lagartas de *A. gemmatalis*. Observaram que o CL₅₀ foi de 62,4 e 200.000 esporos por mm², respectivamente. Em outro estudo, IGNOFFO *et alii* (1976b) testaram vários isolados, entre eles um coletado no Brasil, que na concentração de 310 esporos por mm² de folha, provocou uma mortalidade de 90% nas lagartas de 2^o instar com um TL₅₀ de 6,4 dias.

BOUCIAS *et alii* (1982), utilizaram a concentração de 7.500 esporos por mm² de dieta artificial na inoculação de lagartas de *A. gemmatalis* de 2^o instar obtendo um TL₅₀ de 5,6 dias.

BOUCIAS *et alii* (1984), testaram um isolado de origem brasileira na concentração de 500 esporos por mm² de folha, inoculando lagartas de *A. gemmatalis* do 3^o instar observando 100% de mortalidade com um tempo médio de 7,2

dias.

2.5. Teste de patogenicidade com esporos de *B. bassiana*

Assim como para outros fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* pode ter a sua patogenicidade e virulência diminuídas quando cultivado "in vitro" passando por diversas repicagens. Esta diminuição na virulência é mais acentuada quando o fungo é cultivado em condições de subnutrição "in vitro" (SANSINÁKOVÁ & KÁLOVÁ, 1983).

Como para *N. rileyi*, nos experimentos visando testar a virulência de *B. bassiana*, utilizam-se basicamente duas técnicas. Na primeira, pulveriza-se a superfície de um determinado substrato onde os insetos se alimentam ou caminham (IGNOFFO *et alii*, 1982; IGNOFFO *et alii*, 1983 e MAGALHÃES *et alii*, 1986). A segunda técnica baseia-se na pulverização direta dos insetos a serem inoculados. Com relação a esta técnica, STIMAC *et alii* (1987) testando a patogenicidade de 7 isolados de *B. bassiana* e *B. brongniartii* para operárias de *Solenopsis invicta* e *S. saevissima* pulverizaram as formigas com os diferentes isolados, utilizando uma suspensão de concentração igual a 10^7 esporos por ml, durante 3 segundos. As formigas, em número de 10, foram colocadas em um copo plástico, de 4 x 5 cm, com o fundo de gesso. Durante o experimento, conduzido a $26^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, as formigas

alimentaram-se com uma solução de água e mel a 10%. Após morrerem foram lavadas em álcool a 70% por 30', seguido de hipoclorito 2,5% por 30', passando, finalmente, por 3 lavagens em água estéril. Após a descontaminação externa foram colocadas em placas de Petri com um meio de agar água a 2% para a confirmação da mortalidade. Estes autores observaram, para os isolados estudados, um TL₅₀ que variou de 7,2 a 13,8 dias para uma dosagem de 1×10^7 esporos por ml.

Num outro teste utilizando 3 isolados de *B. bassiana*, pulverizados sobre *S. saevissima*, ALVES *et alii* (1988) observaram serem os isolados 442 e 447 os mais virulentos com um TL₅₀ de 7,1 e 6,7 dias respectivamente. Neste estudo utilizou-se uma suspensão de 1×10^8 esporos por ml.

Em um outro teste STIMAC *et alii* (1989) aplicaram *B. bassiana* sobre ninhos de formigas de *S. saevissimana* e concluíram que o isolado 447 causou mortalidade média de 67 a 100%.

BELL & HAMALLE (1970) testaram a patogenicidade de *B. bassiana*, entre outros fungos, em larvas de *Chalcodermus aeneus* misturando os esporos com areia e solo numa concentração de $1,86 \times 10^{11}$ esporos por grama de solo.

TONET & REIS (1979) testando a patogenicidade de *B. bassiana* sobre *Nezara viridula*,

pulverizaram os insetos com uma suspensão de $1,6 \times 10^7$ esporos por ml.

ALVES *et alii* (1985), determinaram o CL₅₀, $1,3 \times 10^5$ esporos por ml, de *B. bassiana* em pré-pupas de *D. saccharalis*, mergulhando as pré-pupas numa suspensão de esporos.

Por outro lado, FERNANDES *et alii* (1985) testaram a patogenicidade de *B. bassiana* para a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, utilizando três métodos de inoculação. No primeiro método, grãos de café foram tratados; no segundo, folhas de cafeeiro e no terceiro método, os insetos foram mergulhados numa suspensão de esporos do fungo.

FERNÁNDEZ (1989) utilizou, na inoculação de *Sphenophorus levis* com *B. bassiana*, um método onde os insetos a serem inoculados foram colocados em balões de vidro em contato com a massa fúngica.

GOMÉZ (1990) testou a patogenicidade e a virulência de diferentes isolados de *B. bassiana* em lagartas de 4^o instar pulverizadas com uma suspensão de $2,7 \times 10^8$ esporos por ml observando uma variação no TL₅₀ de 5,87 a 12,30 dias.

3-MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

3.1. Patógenos utilizados nos experimentos

O fungo *N. rileyi* utilizado no presente experimento foi isolado de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* em lavouras de soja na região de Campinas-SP e encontra-se armazenado em sílica gel na micoteca do laboratório de Patologia de insetos da E.S.A.L.Q., sob o número 804.

O isolado de *B. bassiana* utilizado foi coletado parasitando *Solenopsis invicta* em Cuiabá-MS e encontra-se armazenado no mesmo laboratório sob o número 447.

3.2. Meios de cultura utilizados nos experimentos

3.2.1. Meios sólidos em placas de Petri

3.2.1.1. Constituição dos meios

Meio Sabouraud maltose agar e extrato de levedura (SMAY) :

Neopeptona	10 g
Extrato de levedura	10 g
Maltose	40 g
Sulfato de estreptomomicina	0,5 g
Água destilada	1000 ml

Meio de batata (BDA) :

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
Sulfato de estreptomomicina	0,5 g
Água destilada	1000 ml

Meio de farinha de crisálida mais batata (FCBA):

Batata	200 g
Farinha de crisalida	200 g
Agar	15 g
Sulfato de estrepromicina	0,5 g
Água destilada	1000 ml

Meio de precipitado de farinha de crisálida: (PFCA)

Farinha de crisálida	200 g
----------------------	-------

Ágar	15 g
Sulfato de estreptomicina	0,5 g
Água destilada	1000 ml

Meio de sobrenadante de farinha de crisálida (SFCA):

Farinha de crisálida	200 g
Ágar	15 g
Sulfato de estreptomicina	0,5 g
Água destilada	1000 ml

3.2.1.2. Preparação dos meios:

Meio de SMAY

Os ingredientes foram misturados com água destilada sendo o agar colocado por último, aquecendo-se então a mistura até ao ponto de fervura.

Meio de BDA

A batata fatiada foi fervida em água destilada até ficar mole quando, por filtração, separou-se o caldo. A este foram adicionados dextrose e agar e seu volume completado para 1000 ml aquecendo-se até o ponto de fervura.

Meio de FCBA

A farinha de crisálida em água foi fervida por 5 minutos, sendo então filtrada, para a extração do caldo. Posteriormente, o caldo de batata, extraído do mesmo modo descrito acima, foi adicionado ao caldo de farinha de crisálida. Finalmente, adicionou-se o agar deixando-se a mistura aquecer até o ponto de fervura.

Meio de PFCA e SFCA

O meio de farinha de crisálida preparado do mesmo modo já descrito, foi então filtrado em funil de Buchner a vácuo. A suspensão resultante permaneceu em repouso até a formação de um precipitado. Posteriormente foi feita a separação do precipitado do sobrenadante completando-se o volume, para cada um dos meios, até 1000 ml e adicionando-se agar. Finalmente, os dois meios foram aquecidos até o ponto de fervura.

O sulfato de estreptomicina foi sempre adicionado com o meio ainda quente, antes da autoclavagem. Esta foi feita, para todos os meios, a 120°C sob pressão durante 30 minutos.

Após a autoclavagem os meios foram distribuídos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro vertendo-se aproximadamente uma camada de meio de 4 a 5 mm de altura por placa.

3.2.2. Meios sólidos no processo bifásico

3.2.2.1. Constituição dos meios

Meio de batata (Bat.)

Batata	200 g
Água destilada	1000 ml

Meio de batata em farinha de crisálida (BFC)

Batata	200 g
Farinha de crisálida	200 g
Água destilada	1000 ml

Meio de farinha de crisálida (FC)

Farinha de crisálida	200 g
Água destilada	1000 ml

Meio de arroz (Ar.)

Arroz	100 g
Água destilada	1000 ml

3.2.2.2. Preparo dos meios

Meio de (Bat.)

As batatas não descascadas foram cortadas em fatias de 3 a 4 mm de espessura e fervidas até ficarem moles. Foram então coadas e dispostas nos Erlenmeyers umas ao lado das outras.

Meio de (BFC)

Batatas descascadas do mesmo modo já descrito anteriormente, foram fervidas com farinha de crisálida até ficarem moles. Foram então coadas e colocadas lado a lado nos Erlenmeyers.

Meio de (FC)

A farinha foi fervida por 5 minutos em água destilada sendo então coada e distribuída nos Erlenmeyers.

Meio de (Ar.)

O arroz foi cozido em água até ficar com a camada externa mole quando apertada. O arroz foi separado da água com auxílio de uma peneira e colocado nos Erlenmeyers.

Em todos os Erlenmeyers, foram colocadas 10g dos diferentes meios. Para os meios Bat, BFC e FC adicionou-se 1 ml de água destilada a todos os Erlenmeyers e no meio de Ar adicionou-se 1,5 ml por Erlenmayer. Os meios foram autoclavados a 120°C sob pressão pelo período de 30 minutos.

3.2.3. Meios líquidos

3.2.3.1. Constituição dos meios

Meio de farinha de crisálida mais batata (FCBL)

Batata

200 g

Farinha de crisálida	200 g
Sulfato de estreptomicina	0,5 g
Água destilada	1000 ml

Meio de Sabouraud maltose mais extrato de levedura (SMY)

Neopeptona	10 g
Extrato de levedura	10 g
Maltose	40 g
Sulfato de estreptomicina	0,5 g
Água destilada	1000 ml

Meio de batata dextrose (BD)

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Sulfato de estreptomicina	0,5 g
Água destilada	1000 ml

3.2.3.2. Preparação dos meios

Meio de SMY

O preparo deste meio foi idêntico ao já descrito para o meio SMAY não se adicionando, entretanto, o agar.

Meio de FCBL

O modo de preparo deste meio foi idêntico ao já descrito para o meio de FCBA, não se acrescentando o

agar.

Meio de BD

Este meio foi preparado de forma idêntica ao meio BDA, sem a adição do agar.

Todos os meios, após colocados e misturados os ingredientes, foram filtrados em funil de Büchner a vácuo sendo então distribuídos nos Erlenmeyers e autoclavados a 120°C, sob pressão, por 30 minutos.

3.3. Produção de esporos e padronização das suspensões para os bioensaios.

Em todos os experimentos utilizou-se a câmara de Neubauer para se quantificar a produção de esporos nos diferentes meios bem como para a padronização das suspensões de esporos a serem usadas nos bioensaios.

3.4. Insetos utilizados.

3.4.1. Insetos utilizados nos testes de patogenicidade de *B. bassiana*.

3.4.1.1. Formiga lava-pé *Solenopsis saevissima*
Forel.

As formigas de *S. saevissima* utilizadas nos bioensaios foram coletadas de colônias naturais em áreas próximas ao Departamento de Entomologia da E.S.A.L.Q.-USP, Piracicaba-SF.

Nos bioensaios utilizaram-se formigas operárias de tamanho médio.

3.4.1.2. Lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabr.)

As lagartas de *D. saccharalis* utilizadas foram provenientes de criação massal da Usina Costa Pinto, Piracicaba-SF.

Nos bioensaios utilizaram-se lagartas de 4^o instar de desenvolvimento.

3.4.1. Insetos utilizados nos testes e patogenicidade de *N. rileyi* (Farlow) SAMSON.

3.4.2.1. Lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*
(Hubner, 1818)

As lagartas de *A. gemmatalis* utilizadas nos testes foram provenientes da criação massal do Centro Nacional de Pesquisas da Soja, Embrapa, em Londrina-PR.

Nos bioensaios utilizaram-se lagartas de 2^o instar.

3.5. Experimentos de produção e patogenicidade dos fungos entomopatogênicos.

3.5.1. Produção de *N. rileyi* em diferentes meios sólidos

Neste experimento utilizaram-se os meios de SMAY, FCBA, PFCA e SFCA

Os meios foram preparados de modo já descrito anteriormente e vertidos em placas de Petri.

Esporos de *N. rileyi*, de 5ª repicagem, foram usados para preparar-se uma suspensão de $9,5 \times 10^8$ esporos/ml. Todos os meios foram inoculados com 0,1 ml da suspensão espalhado sobre a superfície do meio utilizando-se uma alça de Drigalsky, utilizando-se, portanto, a técnica de placa cheia.

Após a inoculação as placas foram deixadas em estufa incubadora B.O.D., marca FANEM, a 26°C e fotoperíodo de 12 horas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 8 tratamentos (Tab.- 1) e 8 repetições por tratamento sendo feitas 2 observações por repetição. Em cada observação foi feita a quantificação do número de esporos produzidos em um círculo de 11 mm de diâmetro com 95,03 mm² de área. Este círculo foi retirado, usando-se um vasador, de uma região de pleno crescimento e

esporulação do fungo.

Tabela 1 - Tratamentos utilizados no experimento de produção de esporos de *N.rileyi* em diferentes meios

Tratamentos	*dias após a inoculação
F C B A	8
S M A Y	8
P F C A	8
S F C A	8
F C B A	16
S M A Y	16
P F C A	16
S F C A	16

*Dias em que foram retirados os círculos de meio para as quantificações.

Em todos os meios foram feitas observações diárias, em microscópio de contraste de fase, até o início da esporulação do fungo.

Após a coleta dos dados procedeu-se a análise da variância e a comparação das médias dos diferentes tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de 1% e 5% de pro-

babilidade.

3.5.2. Teste de patogenicidade com *N. rileyi*, produzido nos meios sólidos, sobre *A. gemmatilis*.

Decorridos 16 dias após a inoculação, esporos produzidos nos diferentes meios foram utilizados para se testar a patogenicidade e a virulência quando aplicados em lagartas de *A. gemmatilis*.

Para a inoculação das lagartas foram usados círculos de folhas, um por repetição, de 4,5 cm de diâmetro. Foram pulverizados ambos os lados dos círculos, com 0,1 ml de uma suspensão de esporos de concentração $6,5 \times 10^6$ esporos/ml. Deste modo foram distribuídos aproximadamente 310 esporos por mm^2 de área foliar. Para a testemunha utilizou-se água estéril mais espalhante adesivo (Tween 80, duas gotas por litro).

Os círculos de folhas de cada uma das repetições de cada tratamento foram colocados uns ao lado dos outros e pulverizados ao mesmo tempo utilizando-se um microatomizador com pressão de 15 LB/pol².

Após a pulverização, os pedaços de folhas foram colocados em placas de Petri, um círculo por placa, sobre papel de filtro esterilizado e levemente umedecido.

Finalmente, 25 lagartas de 2^o instar foram deixadas por 48 horas alimentando-se das folhas. Após este

período e durante todo o experimento, as lagartas foram alimentadas com folhas de soja. O bioensaio foi conduzido a $26^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$ C em estufa incubadora para B.O.D..

As observações relativas à mortalidade foram feitas diariamente, sendo as lagartas mortas deixadas a 26° C e sob elevada umidade relativa para a esporulação e confirmação da morte por *N. rileyi*.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos, uma testemunha e esporos produzidos nos 4 diferentes meios, com 5 repetições, 25 lagartas por repetição totalizando 100 lagartas por tratamento.

A determinação do tempo letal médio (TL₅₀), para os diferentes tratamentos, foi feita utilizando-se Probit.

3.5.3. Crescimento e produção de de *B. bassiana* em diferentes meios sólidos.

Utilizaram-se neste experimento os meios de BDA, FCBA, PFCA e SFCA Estes meios foram preparados do modo já descrito no item 3.2.1.2. e vertidos em placas de Petri.

Esporos de *B. bassiana*, foram utilizados para a inoculação dos meios. Em cada placa foram feitos 3 pontos, equidistantes, onde se inoculou o fungo. Durante o experimento as placas foram deixadas a $26^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$ C em incu-

badora para B.O.D..

Os parâmetros avaliados durante o experimento foram os seguintes:

- crescimento radial e diário das colônias em mm.

- produção de esporos retirando-se, círculos de 15 mm de diâmetro, do centro da colônia, 7 dias após a inoculação.

Para análise dos dados dos dois parâmetros, crescimento radial e produção de esporos, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 10 repetições sendo feitas 30 observações por tratamento ou 3 por repetição.

Com os dados coletados procedeu-se à análise da variância e à comparação das médias pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

3.5.4. Teste de patogenicidade de *B. bassiana* produzido nos meios sólidos, sobre *S. saevissima*.

Após a coleta de operárias de *S. saevissima*, em ninhos naturais, estas foram colocadas em recipientes plásticos, com uma camada de 1 a 1,5 cm de gesso no fundo e com as paredes untadas de floun. O objetivo do gesso foi o de manter o recipiente úmido durante o experimento e do floun foi o de evitar que as formigas escapassem por ocasião

da abertura do recipiente.

Os recipientes foram colocados em uma bandeja com uma esponja embebida em água. A alimentação das formigas foi feita usando-se um alimentador com água e mel a 10%. O alimentador e a solução foram trocados a cada dois dias.

Para a aplicação do fungo utilizou-se, para cada um dos tratamentos, uma suspensão de concentração igual a 1×10^8 esporos/ml. Para a testemunha utilizou-se água estéril mais espalhante adesivo. A pulverização foi feita em capela de fluxo vertical utilizando-se um microatomizador com pressão de 15 LB/pol². Cada recipiente contendo as formigas foi pulverizado por 3 segundos. Após a pulverização, os recipientes foram deixados, até ao final do experimento, a 26^o ± 0,5^oC em estufa incubadora para B.O. D..

O número de formigas mortas foi observado diariamente. Após morrerem foram lavadas em solução de álcool a 70% por 30 segundos e duas vezes em água estéril por um minuto. Depois da lavagem, eram plaqueadas em meio agar/água para a confirmação da mortalidade por *B. bassiana*.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 5 repetições (recipientes) contendo 10 formigas por repetição, totalizando 50 formigas por tratamento.

Após a coleta dos dados procedeu-se à determinação dos tempos letais médios, para cada um dos tratamentos, (TL₅₀), pelo método de Probit.

3.5.5. Teste de patogenicidade de *B. bassiana* produzida nos meios sólidos, sobre *D. saccharalis*.

Esporos de *B. bassiana* produzidos nos diferentes meios foram também pulverizados sobre lagartas de *D. saccharalis* para se testar sua patogenicidade e virulência.

Lagartas de 3^o instar de *D. saccharalis* foram retiradas de dieta artificial e lavadas com água para retirar-se os restos de dieta.

Grupos de 50 a 60 lagartas foram então pulverizadas com 1 ml de uma suspensão com 5×10^7 esporos por ml. Os esporos foram produzidos em placas com os diferentes meios, da 2^o repicagem de *S. saevissima*. Para a testemunha utilizou-se somente água estéril mais espalhante adesivo.

O equipamento utilizado na pulverização foi o mesmo já descrito para os itens anteriores. Após a inoculação, as lagartas foram colocadas, individualmente, em recipiente plástico e alimentadas com colmos de milho, os quais eram trocados diariamente. O experimento foi conduzido a $26^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ em câmaras de B.O.D..

Foram feitas observações diárias da mortalidade. As lagartas mortas foram deixadas em ambiente saturado, com 100 % de umidade relativa, a 26°C para a confirmação da mortalidade por *B. bassiana*.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 tratamentos, 5 repetições e 10 lagartas por repetição totalizando 50 lagartas por tratamento.

Após a coleta dos dados, procedeu-se à determinação do TL₅₀ para os tratamentos utilizando-se Probit.

3.5.6. Desenvolvimento de *N. rileyi* em meios líquidos

3.5.6.1. Curva de crescimento e de produção de matéria seca.

Utilizaram-se neste experimento os meios de SMY e FCBL preparados de modo já descrito no item 3.2.3.2..

Para cada meio foram utilizados 35 Erlenmeyers de 250 ml com 150 ml de meio. Cada um dos Erlenmeyers foi inoculado com 0,1 ml de uma suspensão com 10⁸ esporos por ml de *N. rileyi* de 4 repicagem.

Após a inoculação os recipientes foram colocados num agitador incubador orbital, marca Tecnal TE-420, a aproximadamente 100 rpm a 26°C.

No transcorrer do experimento, de acordo com o crescimento do fungo, nos diferentes meios, determinou-se o início da coleta da massa fúngica. Após o início das coletas, estas foram feitas diariamente, a intervalos de 24 horas, durante 5 dias.

Diariamente foram retirados 5 Erlenmeyers ao acaso. A massa fúngica foi então separada por filtração, a vácuo, utilizando-se um funil de Büchner e papel de filtro.

Após a filtragem, as 5 amostras retiradas diariamente, foram colocadas em placas, que foram fechadas e deixadas em geladeira até a última coleta.

Posteriormente, as 35 amostras tiveram seu peso seco determinado colocando-as a 105°C por 24 horas sendo então retiradas e deixadas em dessecador até esfriarem. Finalmente, procedeu-se à pesagem de todas as amostras em balança analítica.

O peso da massa fúngica foi determinado subtraindo-se do peso total da amostra o peso do papel de filtro.

3.5.7. Desenvolvimento de *B. bassiana* em meios líquidos.

3.5.7.1. Curva de crescimento e produção de matéria seca.

Neste experimento comparou-se o desenvolvimento de *B. bassiana* em B.D e FCBL, preparados de modo já descrito anteriormente no item 3.2.3.2..

A metodologia utilizada foi a mesma já descrita no item anterior para *N. rileyi*.

O meio dos Erlenmeyers foi inoculado com uma suspensão de 10^8 esporos de *B. bassiana* por ml, 2^o repicagem em *S. saevissima*.

3.5.8. Produção de esporos de *N. rileyi* usando o processo bifásico.

3.5.8.1. Produção do inóculo em meio líquido

Na produção do inóculo, para o processo bifásico, utilizou-se o meio FCBL seguindo-se a metodologia já descrita no item 3.5.6.1..

Após a inoculação os Erlenmeyers foram deixados por 5 dias num agitador incubador orbital, a $26^{\circ} \pm 0.5^{\circ}C$, e 100 rpm, tempo suficiente para ocorrer um crescimento vegetativo homogêneo do fungo no meio.

3.5.8.2. Produção de esporos em meios sólidos

Para o teste de produção de esporos de *N. rileyi* pelo processo bifásico, foram usados como meios sólidos

lidos Bat, BFC, FC e Ar. Estes meios foram preparados de modo já descrito no item 3.2.2.2..

Utilizando 1 ml de suspensão de micélio, produzido no meio líquido, inoculou-se o meio sólido em cada um dos Erlenmeyers. Após a inoculação, o meio sólido foi agitado de forma vigorosa para uma boa distribuição do inóculo.

O experimento foi conduzido a 26°C acompanhando-se diariamente o desenvolvimento do fungo. Observações foram feitas a olho nu e ao microscópio para se detectar o início da esporulação nos diferentes tratamentos.

Após a plena esporulação do fungo colocaram-se em cada Erlenmayer 50 ml de água destilada, estéril com espalhante adesivo. Os Erlenmeyers foram colocados em agitação por 30 minutos a 150 rpm.

Retiraram-se então 2 amostras, de 10 ml, de cada um dos Erlenmeyers onde quantificou-se a produção de esporos.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições com 2 observações por repetição.

Com os dados resultantes das quantificações procedeu-se à análise da variância e à comparação das médias pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

3.5.9. Teste de patogenicidade de *N. rileyi* produzido nos diferentes meios sólidos, do processo bifásico, usando lagartas de *A. gemmatalis*.

Testou-se a patogenicidade e virulência dos esporos produzidos nos diferentes meios sobre lagartas de *A. gemmatalis*.

A metodologia utilizada no bioensaio foi a já descrita no item 3.5.2..

3.5.10. Produção de *B. bassiana* utilizando o processo bifásico.

3.5.10.1. Produção do inóculo em meio líquido.

Utilizou-se neste teste a metodologia já descrita para *N. rileyi* no item 3.5.8.1..

3.5.10.2. Produção dos esporos em meios sólidos.

A metodologia já descrita para *N. rileyi* no item 3.5.8.2. foi também utilizada para a produção de *B. bassiana*. Entretanto, foram colocados 100 ml de água estéril por Erlenmeyer para as quantificações.

3.5.11. Teste de patogenicidade dos esporos de *B. bassiana* produzidos nos diferentes meios sólidos, do processo bifásico, usando operárias de *S. saevissima*.

Com os esporos produzidos utilizando-se o processo bifásico, testou-se a patogenicidade e a virulência sobre operárias de *S. saevissima* utilizando a metodologia já descrita no item 3.5.4..

3.5.12. Teste de patogenicidade dos esporos de *B. bassiana* produzido nos diferentes meios sólidos, do processo bifásico, sobre lagartas de *D. saccharalis*.

Testou-se a virulência e a patogenicidade dos esporos de *B. bassiana* sobre *D. saccharalis* utilizando-se a metodologia já descrita no item 3.5.5..

3.6. Custos de produção dos esporos de *N. rileyi* produzidos pelos métodos testados.

Para análise dos custos de produção dos esporos de *N. rileyi* considerou-se somente os custos relativos aos meios de cultura utilizados.

Os valores em cruzeiros foram também transformados em dólares (U.S\$) e referem-se ao custo de um litro de meio de cultura.

Para todos os meios comparados estabeleceu-se que 1 litro de meio pode ser distribuído em 40 placas de Petri de 9 cm de diâmetro, área de 2.544,7 cm².

Todas as quantificações relativas à produção de esporos nos diferentes meios foram feitas em 10 ml de água estéril como suspensão original.

3.7. Custos de produção de esporos *B. bassiana* produzidos pelos métodos testados.

Utilizou-se a metodologia já descrita no item anterior.

3.8. Análise da composição centesimal da farinha de crisálida do bicho-da-seda.

A análise da composição centesimal da farinha de crisálida foi feita seguindo-se a metodologia proposta nas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (REBOCHO, 1985).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da composição da farinha de crisálida do bicho-da-seda.

Os resultados referentes à análise da farinha de crisálida do bicho-da-seda encontram-se na tabela 2.

Tabela 2- Resultados da análise da farinha de crisálida do bicho-da-seda

Matéria seca %	Umida de %	Proteína bruta %	Extrato etéreo %	Resíduo mineral %	Extrato não nit. %	Cálcio %	Fosforo %
96.5	3.95	55.47	26.38	4.05	10.15	1.68	0.48

Os resultados mostram-nos que a farinha de crisálida (F.C) apresenta uma elevada percentagem de proteína bruta (55,47 %), ou seja, é relativamente rica em nitrogênio. A percentagem de gorduras (extrato etéreo) mostra-se também elevada (26,38 %). Por outro lado, a concen-

tração de carboidratos é baixa (10,15%). Esta baixa concentração de carboidratos na F.C levou-nos a misturá-la com o caldo da batata por ser este de baixo custo e facilmente disponível.

4.2. Produção e crescimento de *N. rileyi* nos diferentes meios e testes de patogenicidade com os esporos produzidos.

4.2.1. Produção de esporos de *N. rileyi* em meios sólidos.

O quadro de análise de variância dos resultados observados para a produção de *N. rileyi* nos diferentes meios sólidos encontra-se na tabela 3.

Os resultados referentes à comparação das médias observadas nos diferentes tratamentos na produção de esporos de *N. rileyi* em meios sólidos encontram-se na tabela 4 e estão representados graficamente na figura 1.

Nas figuras 2 e 3 observa-se o desenvolvimento de *N. rileyi* respectivamente aos 8 e 16 dias após a inoculação. As áreas circulares sem meio foram retiradas para as quantificações da produção de esporos nos diferentes tratamentos.

Tabela 3- Análise de variância das observações relativas á produção de esporos de *N. rileyi* nos diferentes meios sólidos.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	PROB > F
Tratam.	7	1589,107	227,015	126,08	0,00001
Resíduo	56	100,831	1,801		
Total	63	1689,939			

C.V. = 12,275% Dados transformados em Raiz ($x+0,5$)

A análise dos resultados da tabela 4 mostra que o meio onde obtiveram-se maiores produções foi o de SMAY aos 16 dias que diferiu estatisticamente de todos os outros tratamentos. O meio de SMAY (16) propiciou produções 47.8% maiores do que as observadas no 2º melhor meio FCBA (16).

As observações relativas ao meio de FCBA mostram que, apesar de não ter havido diferença significativa para a colheita aos 8 e 16 dias após a inoculação, com produções de $19,5 \times 10^6$ esporos por ml e $25,68 \times 10^6$ esporos por ml respectivamente, a colheita aos 16 dias foi 31,7 % maior do que aos 8 dias.

Tabela 4- Produção média de esporos de *N. rileyi* nos diferentes meios sólidos aos 8 e 16 dias após a inoculação.

Dias		Numero médio de esporos			
Meios	após inoc	Por ml ($\times 10^6$)		Por placa**	Por ml de
		médias			meio
		transf.	origin.	($\times 10^{10}$)	($\times 10^9$)***
SMAY	16	19,43 a*	37,96	2,5	1
FCBA	16	15,85 b	25,68	1,7	0,69
FCBA	8	13,96 b	19,5	1,3	0,52
PFCA	16	10,06 c	10,18	0,68	0,27
SFCA	16	9,04 c	8,16	0,54	0,21
PFCA	8	8,55 c	7,29	0,48	0,19
SFCA	8	8,38 c	7,03	0,47	0,188
SMAY	8	2,18 d	0,61	0,04	0,016

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

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

** Placas de 9cm de diâmetro.

*** Considerando cada placa de 9cm de diâmetro com 25 ml de meio

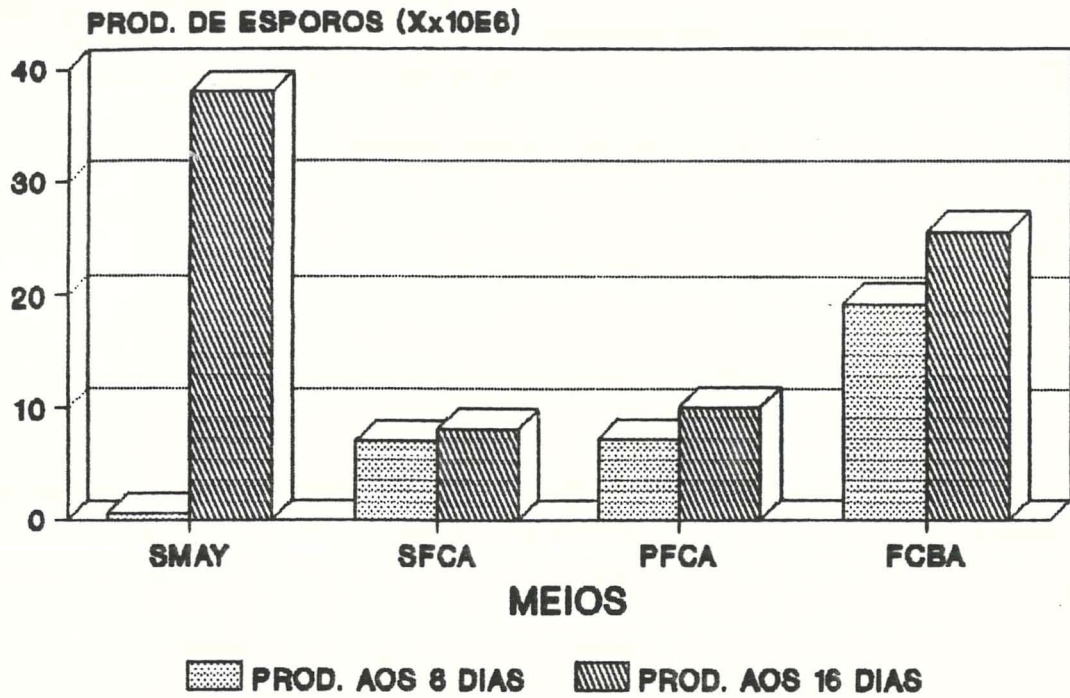


Figura 1- Produção de esporos de *N. rileyi* nos diferentes meios (Xx10⁶).



Figura 2- Aspeto da produção de esporos de *N. rileyi* nos diferentes meios aos 8 dias após a inoculação.



Figura 3- Aspeto da produção de esporos de *N. rileyi* nos diferentes meios após 16 dias da inoculação.

Fica portanto evidente que, considerando-se somente a variável tempo, num processo de produção em larga escala o meio de FCBA produz aos 8 dias após a inoculação uma quantidade de esporos igual à metade da produzida por SMAY aos 16 dias. Sob este aspecto o meio de FCBA (8) é também mais produtivo do que o de FCBA (16).

Comparando-se os resultados obtidos nos tratamentos de PFCA e SFCA nota-se que estes foram estatisticamente inferiores aos meios de SMAY (16) e FCBA(16) e (8) para qualquer uma das épocas. Esta diferença está provavelmente associada à menor quantidade de carboidratos nestes dois meios em relação a SMAY e FCBA, isto é, concordam com

os resultados de HOLDON & KLASHORST (1986), os quais mostraram a importância do amido solúvel no desenvolvimento de *N. rileyi*.

Pelos resultados, verifica-se também que, apesar de não ter havido diferença significativa entre os tratamentos PFCA e SFCA, para qualquer uma das épocas, o meio de PFCA foi sempre superior ao de SFCA. Esta superioridade deve-se, provavelmente, ao fato de o meio de PFCA apresentar maiores concentrações de nitrogênio. Isto porque este elemento, na farinha de crisálida, encontra-se principalmente em substâncias quitinosas não se solubilizando em água.

Finalmente, o meio onde foram observadas menores produções foi o de SMAY (8). A justificativa para a ocorrência de menores produções está relacionada com uma característica apresentada por *N. rileyi* em SMAY, onde no início de desenvolvimento do fungo ocorre a formação de um estágio leveduriforme, bastante característico, e com uma duração de 4 a 5 dias quando, então, inicia-se o crescimento micelial do fungo. Deste modo, o início da formação de conidióforos e esporos de *N. rileyi* em SMAY ocorreu por volta do 7º dia após a inoculação sendo que no 8º dia a produção de esporos foi bastante reduzida. Por outro lado, nos meios de FC o estágio leveduriforme foi mais rápido, variando de 1 a 2 dias, propiciando uma maior precocidade no desenvolvimento micelial e na formação de conidióforos

e esporos.

Ainda comparando os meios de SMAY e FCBA pode-se supor que o meio de SMAY propiciou maiores produções de esporos devido à presença do extrato de levedura e da peptona, fontes ricas em nitrogênio e importantes na esporulação de *N. rileyi*. Isto é confirmado pelos resultados obtidos por LOCH (1978) que não observou o desenvolvimento de *N. rileyi* em meio mínimo. Entretanto, quando se adicionou 1% de extrato de levedura ocorreu crescimento micelial e esporulação intensa do fungo. CAMARGO (1981) confirmou também a importância do extrato de levedura observando que no meio de SMA o fungo cresceu vegetativamente não ocorrendo entretanto esporulação. Ainda SILVA & LOCH (1978) demonstraram um aumento na produção de esporos à medida que se aumentou a concentração de extrato de levedura. Apesar de rico em nitrogênio, o meio de FCBA não apresentou uma esporulação tão intensa como a observada em SMAY, provavelmente pelo modo de disponibilidade deste elemento no extrato de levedura ou devido à presença de outros elementos importantes neste nutriente para a esporulação de *N. rileyi*. Como um dos principais objetivos deste estudo foi o de se desenvolver um meio alternativo a SMAY, de baixo custo, não se testou a adição deste nutriente aos meios à base de FC. Entretanto, estudos futuros deverão ser desenvolvidos no sentido de se estudar a influência da adição deste nutriente ao meio de FCBA. Esta discussão também pode ser aplicada

para a peptona e para a maltose, nutrientes importantes no meio de SMAY.

A comparação dos resultados deste experimento com os obtidos por outros autores, torna-se difícil, na medida em que existe uma grande variação nas unidades utilizadas para a quantificação da produção de esporos, além de terem sido utilizados isolados diferentes. Entretanto, LOCH (1978) obteve produções de $1,2 \times 10^{10}$ esporos por placa utilizando meio de SMAY, com 8 g de extrato de levedura por litro de meio, 14 dias após a inoculação. Esta produção ficou abaixo da observada neste experimento nos tratamentos de SMAY(16), FCBA(16) e FCBA(8) que foi respectivamente de 2,5; 1,7 e $1,3 \times 10^{10}$ esporos por placa.

Por outro lado, BALARDIN (1984) observou para o isolado Passo Fundo, produções de $1,2 \times 10^{10}$ esporos por 13 ml de meio de SMAY em uma área de $7,56 \text{ cm}^2$, ou $3,24 \times 10^{10}$ esporos para a área de uma placa de 9cm de diâmetro, produção superior à alcançada pelo melhor tratamento neste experimento. Já para o isolado Camaquã, o autor observou que o melhor meio foi o de extrato de tomate com produções correspondentes a $1,9 \times 10^{10}$ esporos por placa de 9cm de diâmetro. Nota-se, portanto, que as melhores produções para este isolado foram inferiores às observadas para SMAY (16) e bastante próximas às alcançadas no meio de FCBA. Entretanto, BALARDIN (1984) utilizou nos meios alternativos a SMAY, extrato de levedura a 1,5% e quantificou a produção

de esporos 14 dias após a inoculação.

Finalmente, SILVA & LOCH (1987) obtiveram produções de esporos de *N. rileyi*, em meio de SMAY, de $7,08 \times 10^9$ por 40 g de meio, produção esta inferior à observada neste estudo para os tratamentos SMAY (16), FCBA (16) e (8).

Torna-se, portanto evidente que, em termos quantitativos, o meio de FCBA mostrou-se competitivo quando comparado ao meio de SMAY, na produção de *N. rileyi*.

4.2.2. Teste de patogenicidade dos esporos de *N. rileyi* produzidos em diferentes meios sólidos, inoculados em lagartas de *A. gemmatalis*.

Os resultados para este bioensaio encontram-se na tabela 5. A porcentagem de mortalidade corrigida e acumulada é representada graficamente na figura 4.

Pela análise dos resultados observa-se que não ocorreram diferenças relevantes nos TL₅₀ dos diferentes tratamentos. Entretanto, ao analisar-se o TL₉₀ observa-se que o tratamento de SMAY foi o que produziu esporos mais virulentos, propiciando um TL₉₀ bastante inferior ao observado nos outros tratamentos.

Para o meio de FCBA os esporos produzidos foram os menos virulentos em comparação com os produzidos

nos outros meios com um TL₅₀, e um TL₉₀ respectivamente de 7,6 e 15,1 dias.

Já o tratamento de SFCA produziu esporos que provocaram o menor TL₅₀ igual a 5,8 dias. Por outro lado o TL₉₀ foi elevado em comparação ao dos esporos produzidos em SMAY e igual a 11,24 dias.

Os esporos produzidos no meio de PFCA apresentaram um comportamento mediano quando comparado ao dos outros meios.

Através da figura 4 pode-se observar que para o tratamento SMAY entre o 7º e o 8º dias após a inoculação morreram 85% das lagartas, sendo que no mesmo período para SFCA, PFCA e FCBA morreram 82%, 76%, e 65% respectivamente. Fica, portanto, evidente a maior virulência dos esporos produzidos em SMAY em comparação aos produzidos nos meios de PFCA e FCBA.

A maior virulência associada aos esporos produzidos em SMAY deve-se, provavelmente, ao fato de ter ocorrido neste meio um estágio leveduriforme mais característico e prolongado do que nos outros meios. Este estágio já foi correlacionado com a virulência por MORROW *et alii* (1989).

Tabela 5- Tempos letais medianos, em dias, intervalo de confiança e equação da reta resultantes da inoculação de lagartas de *A. gemmatalis* com esporos de *N. rileyi* produzidos em diferentes meios sólidos.

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

Estes autores observaram que sucessivas repicagens de *N. rileyi* em SMAY provocaram uma redução na virulência dos esporos, que está associada à perda de capacidade de formação do estágio leveduriforme do patógeno.

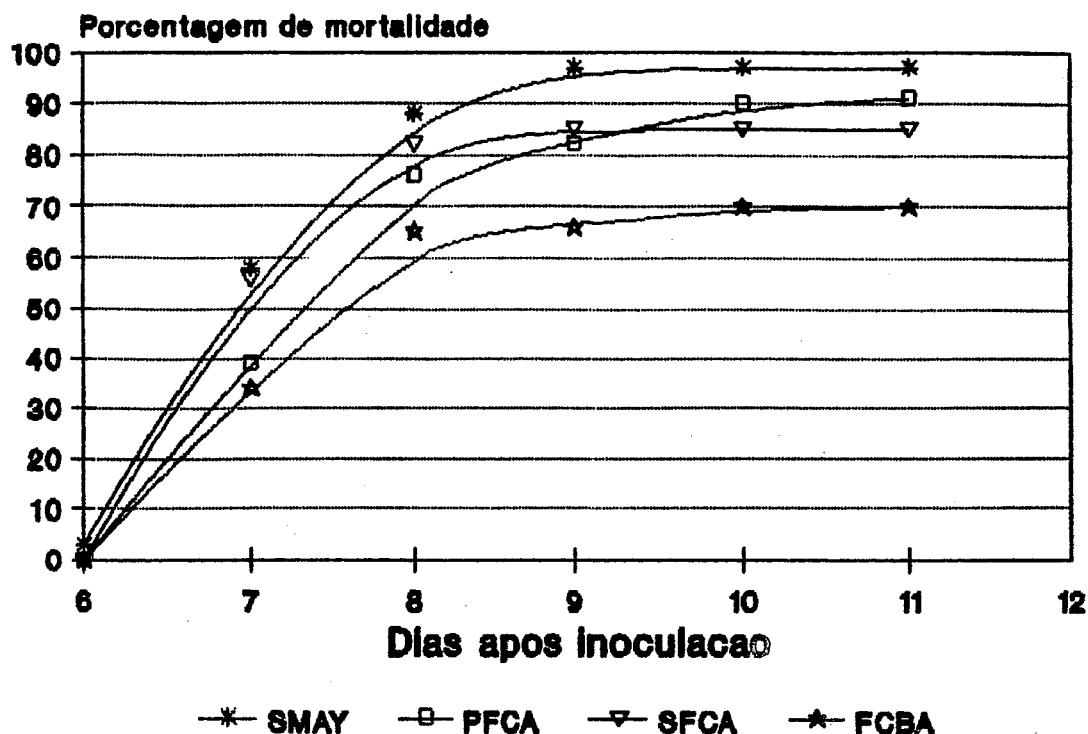


Figura 4- Mortalidade corrigida e acumulada de lagartas de *A. gemmatalis* inoculadas com esporos de *N. rileyi* produzidos nos diferentes meios sólidos.

No tratamento à base de FCBA constatou-se uma maior mortalidade de lagartas devido a outros fatores que não o fungo, deixando as lagartas com sintomas de morte provocada por bactérias. Isto pode ter ocorrido por contaminação do meio de FCBA onde, apesar da esterilização e do uso de antibiótico no meio, algumas bactérias possam ter se desenvolvido. Também este fato pode estar correlacionado com a maior produção de exotoxinas proporcionado por estes meios.

Os TL_{50} observados apresentam uma baixa variação quando comparados aos obtidos por outros autores, na

inoculação de *N. gemmatilis*. Assim, IGNOFFO *et alii* (1976b), utilizando metodologia idêntica à usada neste experimento, obtiveram um TL₅₀ de 6,4 dias para um isolado Brasileiro. BOUCIAS *et alii* (1982) utilizando uma concentração de esporos de 7500 por mm² de dieta observaram um TL₅₀ de 5,6 dias. Já na inoculação de um isolado Brasileiro na concentração de 500 esporos por mm² de folha, BOUCIAS *et alii* (1984) observaram um tempo médio de mortalidade de 7,2 dias.

4.2.3. Curva de crescimento de *N. rileyi* e produção de matéria seca

O quadro de análise da variância para as observações relativas à produção de matéria seca encontra-se na tabela 6.

Os dados referentes à produção de matéria seca e à curva de crescimento de *N. rileyi* nos meios de FCBL e SMY encontram-se, respectivamente, na tabela 7 e figura 5.

Analisando-se os resultados observa-se que o meio de FCBL propiciou uma maior produção de massa fungica com um pico no 9º dia (216 horas) após a inoculação. Entretanto, estatisticamente não houve diferença significativa na produção de matéria seca, no meio de FCBL, a partir do 7º dia após a inoculação.

Tabela 6 - Análise da variância para as observações de produção de matéria seca de *N. rileyi* em meios líquidos.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Meios	1	3577670,82	3577670,82	430,196	0,00001
Dias	6	313681,81	52280,30	6,286	0,00001
Resíduo	62	515614,85	8316,37		

Total 69 4406967,47

C.V. = 18,729

Tabela 7 - Produção média de matéria seca de *N. rileyi* em meios líquidos.

Dias após a inoculação	Meios	
	Produção média de matéria seca* FCBL	SMY
6	404,2 b**	-----
7	723,7 a	-----
8	774,4 a	-----
9	818,5 a	-----
10	768,5 a	-----
11	795,7 a	-----
12	719,7 a	-----
13	-----	250,8 c
14	-----	238,0 c
15	-----	256,8 c
16	-----	252,4 c
17	-----	250,8 c
18	-----	271,3 c
19	-----	305,1 c
20	-----	263,3 c

* Média de 5 repetições em mg de matéria seca.

** Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade

D.M.S. 1% = 208,95 (Para comparação das médias dentro de tratamentos)

D.M.S. 1% = 153,22 (Para comparação das médias entre tratamentos)

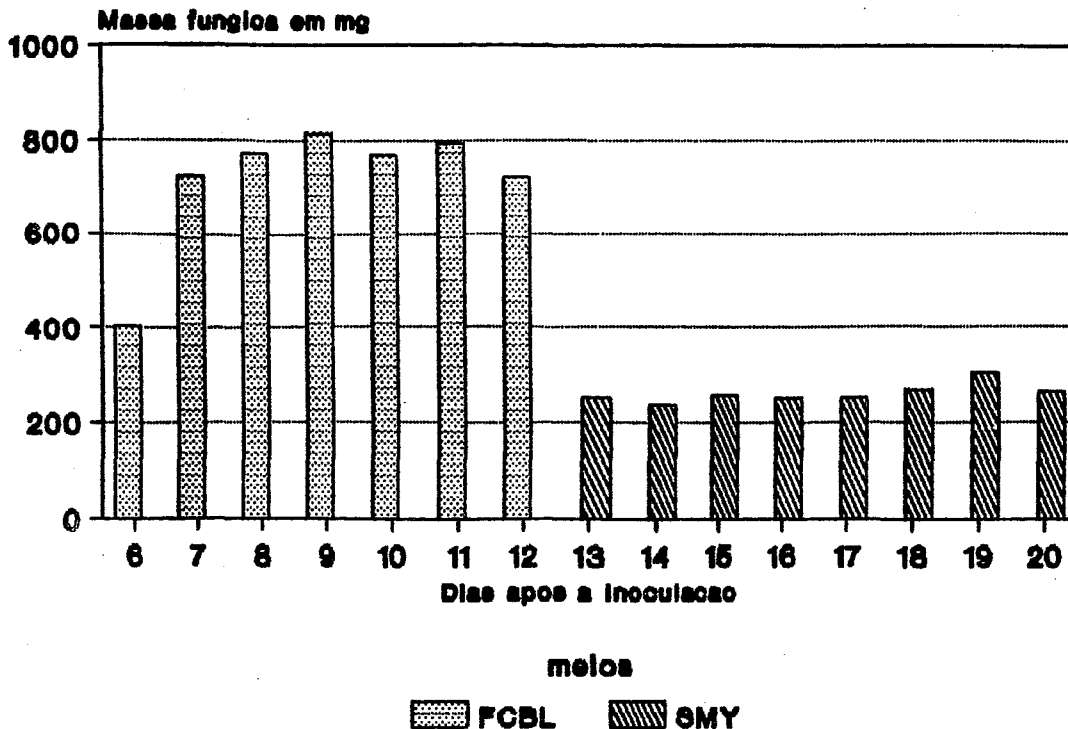


Figura 5- Produção de matéria seca de *N. rileyi* em meios líquidos.

Observando-se a curva de crescimento na figura 5, nota-se que para o meio de FCBL ocorreu um aumento bastante elevado e estatisticamente significativo, na produção de matéria seca, do 6^o para o 7^o dia após a inoculação variando de 404,2 mg para 723,2 mg, respectivamente. Também após o 9^o dia a curva mostra uma tendência a baixar provavelmente devido ao esgotamento dos nutrientes do meio bem como à formação de agregados de hifas em "pellets" provocando um rompimento das células do seu interior.

Ao se analisarem os dados referentes à produção de matéria seca de *N. rileyi* no meio de SMY, nota-se que o crescimento foi bastante lento em comparação ao meio de FCBL, sendo as produções significativamente menores. A elevada diferença entre as produções dos dois meios provavelmente ocorreu devido à maior disponibilidade de nitrogênio do meio de FCBL, o que propiciou um maior crescimento micelial. Este crescimento mais rápido do micélio do fungo no meio de FCBL foi também observado nos meios sólidos, provavelmente devido às mesmas causas.

Para o meio de SMY, a produção de matéria seca atingiu um pico no 19^o dia após a inoculação. Entretanto, a comparação das médias não mostrou diferença estatística em nenhum dos dias observados.

Fica, portanto, evidente que, num método de produção bifásico, o meio de FCBL em comparação a SMY é mais produtivo, devendo por isso ser utilizado na fase de produção do micélio.

A comparação dos resultados obtidos para FCBL com os de MORROW & BOUCIAS (1988) para o crescimento micelial de *N. rileyi* em SDY (Sabouraud, dextrose, extrato de levedura), onde foram alcançadas produções máximas de 15,8 mg por ml de meio, mostra-nos que as maiores produções conseguidas em FCBL foram 3 vezes menores com um máximo de 5,4 mg por ml de meio. Entretanto, estes autores conduziram o seu estudo em fermentadores com condições ótimas de aera-

ção e agitação, bem como utilizando um outro meio de cultura.

4.2.4. Produção de esporos de *N. rileyi* pelo processo bifásico

Na tabela 8 encontra-se o quadro de análise da variância referente aos dados de produção de esporos de *N. rileyi* nos diferentes meios no processo bifásico de produção.

Os dados referentes à produção de esporos de *N. rileyi* nos diferentes meios do processo bifásico encontram-se na tabela 9 e estão representados graficamente na figura 6.

Tabela 8 - Quadro de análise da variância dos dados de produção de esporos de *N. rileyi* no processo bifásico de produção

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Tratam	1	79,02	79,02	5,35	0,04779
Resíduo	8	118,16	14,77		

C.V. = 56,267%

Dados transformados em raiz de $(x+0,5)$

Tabela 9 - Produção média de esporos de *N. rileyi* no processo bifásico de produção

Meios	Produção de esporos**	
	Médias transf.	Médias originais
Bat.	9,64 a*	115,36
BFC	4,02 b	16,38

D.M.S. 5% = 5,60

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Produção média de 5 repetições $\times 10^5$

Observa-se que somente ocorreu esporulação nos meios de Bat. e BFC. No meio de arroz observou-se, ao microscópio, a formação de conidióforos e de pequena quantidade de esporos e no meio de FC houve somente um reduzido crescimento micelial de *N. rileyi* (Tabela 9).

A comparação dos resultados obtidos para os meios onde ocorreu produção de esporos mostra que o meio de Bat. foi significativamente superior ao de BFC, com produções médias de 115×10^5 esporos por ml e de $16,38 \times 10^5$ esporos respectivamente.

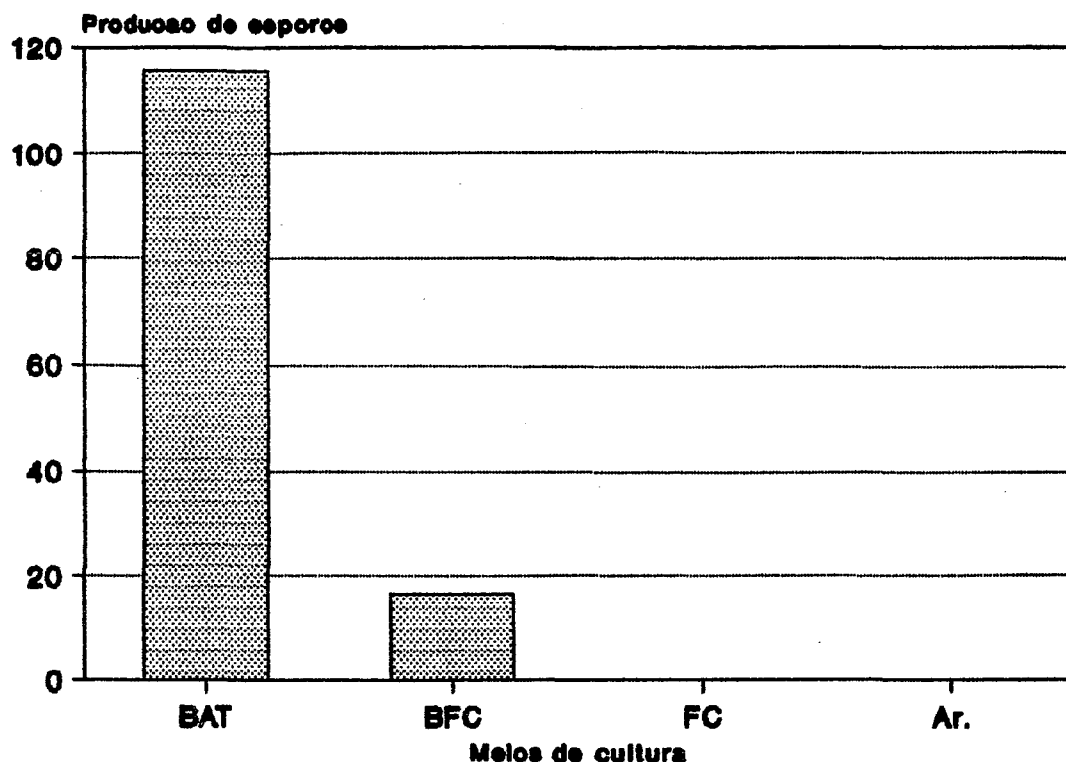


Figura 6- Produção de esporos de *N. rileyi* nos diferentes meios do processo bifásico de produção ($\times 10^5$).

Analisando a constituição dos dois meios observa-se que o meio de BFC é mais rico e com uma maior diversidade de nutrientes do que o meio de Bat.. Entretanto, as maiores produções foram obtidas no meio de Bat. e não no meio de BFC. Isto pode ter ocorrido devido à incorporação de alguma substância desfavorável ao desenvolvimento e esporulação do fungo quando do cozimento da batata com a farinha de crisálida na elaboração do meio de BFC.

O melhor desenvolvimento do fungo no meio de Bat. reforça a importância do amido solúvel deste tubérculo no desenvolvimento de *N. rileyi*. Deste modo é importante que em estudos de meios para o desenvolvimento de *N. rileyi*

a batata ou o seu caldo sejam considerados. A importância do amido de batata, é confirmada por CAMARGO (1981) que produziu *N. rileyi* em meio líquido de batata e dextrose vertendo a massa micelial juntamente com o meio em placas de BDA, obtendo uma intensa esporulação do fungo.

Um exame microscópico feito nos diferentes meios durante o desenvolvimento de *N. rileyi* mostrou o aparecimento de um estágio leveduriforme nos meios de BFCe FC no primeiro dia após a inoculação sendo que no segundo dia somente se observou a presença de micélio do fungo. Já nos meios de Bat. e Ar. não ocorreu o estágio leveduriforme, mas somente o micélio do fungo. Assim como para os meios sólidos, o estágio leveduriforme parece estar associado à presença de alguma fonte de nitrogênio, no presente caso a farinha de crisálida.

O aparecimento dos primeiros conidióforos e esporos foi observado no 4º dia após a inoculação no meio de Bat. e no 5º dia para o meio de BFC.

Com relação ao crescimento micelial notou-se um maior desenvolvimento em BFC em comparação ao meio de Bat.. Isto vem a reforçar a hipótese de que, apesar do meio de BFC ser mais rico em nutrientes propiciando um maior crescimento vegetativo, algum fator do meio contribuiu para a inibição da esporulação de *N. rileyi*.

Utilizando SMY como meio para a produção de micélio de *N. rileyi*, HOLDON & van de KLASSHORST (1986),

inocularam o micélio produzido em bagaço de cana-de-açúcar, obtendo uma produção média de $8,7 \times 10^9$ esporos por 5 g de bagaço. Neste estudo foi feito um teste com a utilização do bagaço mas somente observou-se um leve crescimento micelial. Entretanto, a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com os obtidos em bagaço mostram-nos que o bagaço foi consideravelmente mais produtivo do que os meios de Bat. e BFC.

4.2.5. Teste de patogenicidade com esporos de *N. rileyi*, produzidos nos diferentes meios do processo bifásico, inoculados em lagartas de *A. gemmatalis*.

Os resultados referentes ao teste de patogenicidade e virulência dos esporos de *N. rileyi* inoculados em lagartas de *A. gemmatalis* encontram-se na tabela 10. A porcentagem de mortalidade corrigida e acumulada é representada graficamente na figura 7.

Pelos resultados observa-se que o meio de BFC, apesar de menos produtivo, foi mais virulento do que o meio de Bat..

Tabela 10 - Tempos letais medianos , em dias, intervalo de confiança e equação da reta resultantes da inoculação de lagartas de *A. gemmatalis* com esporos de *N. rileyi* produzidos nos diferentes meios do processo bifásico de produção.

Meios	TL ₅₀	I.C.	TL ₉₀	Equa. da reta
Bat.	8,0*	7,3-8,7	10,6	$y = -4,3 + 10,3 \text{Log}x$
BFC	6,5	5,8-7,4	7,7	$Y = -10,08 + 18,5 \text{Log}x$

* TL₅₀ e TL₉₀ em dias

Como já discutido no item 4.2.2., a formação de um estágio leveduriforme, apesar de rápido, no meio de BFC pode ter contribuído para o aumento da virulência do fungo em comparação ao meio de Bat..

Ao se compararem os resultados aqui obtidos com os observados no teste com esporos produzidos em meios sólidos, em placas de Petri, nota-se que os TL₅₀ dos diferentes tratamentos dos dois bioensaios são bastante semelhantes. Entretanto, ao analisarmos o TL₉₀ para os esporos produzidos em BFC, observa-se que este foi consideravelmente inferior aos TL₉₀ obtidos com os esporos produzidos nos meios sólidos, principalmente em comparação com os esporos obtidos do meio de FCBA. Esta diferença é provavelmente devida à baixa mortalidade causada por bactérias quando da inoculação das lagartas com os esporos do meio de BFC. Isto

pode ser confirmado analisando-se a figura 7, onde, para o tratamento BFC, a mortalidade total foi de 99 %. Destes 99 % a mortalidade foi maior no 6^o, 7^o, e 8^o dias após a inoculação, com respectivamente de 23, 47 e 29 %.

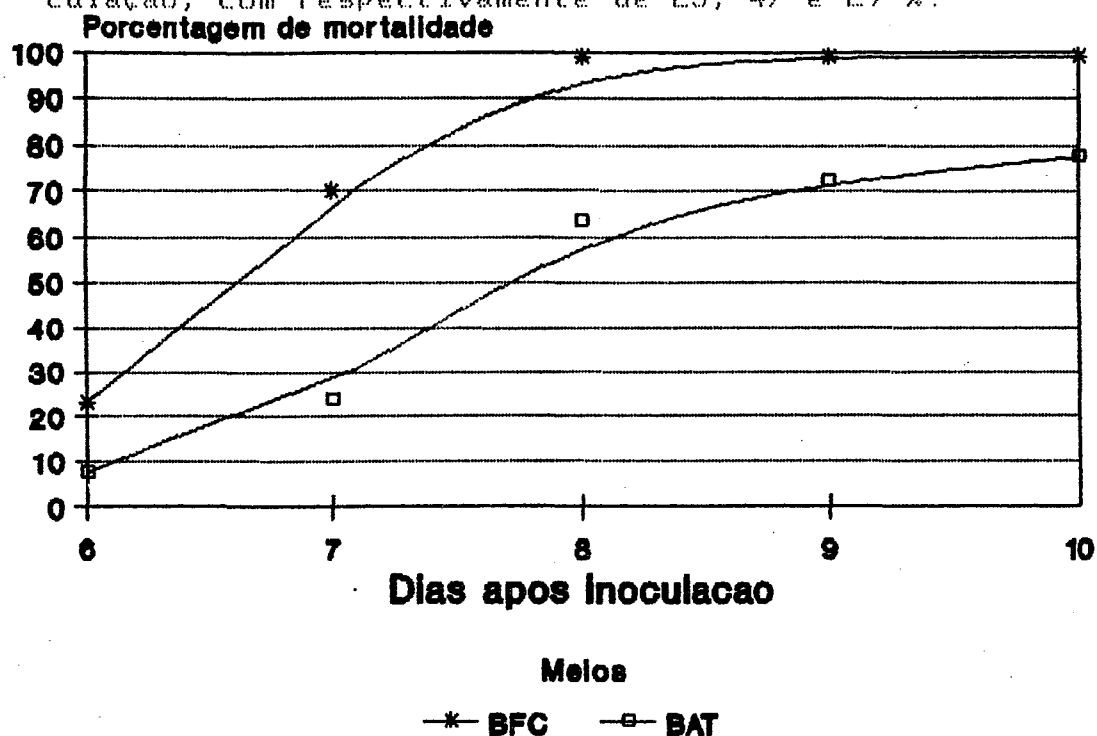


Figura 7- Mortalidade corrigida e acumulada de *A. gemmatilis* inoculada com esporos de *N. rileyi* produzidos pelo processo bifásico de produção.

Pelo discutido fica, portanto, evidente que não ocorreu uma diminuição na virulência dos esporos de *N. rileyi* quando produzidos pelo processo bifásico aqui testado em relação aos esporos produzidos por outros métodos por diferentes autores.

4.3. Crescimento e produção de *B. bassiana* nos diferentes meios e testes de patogenicidade com os esporos produzidos

4.3.1. Crescimento radial e produção de esporos de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos

Os quadros de análise da variância para as observações do crescimento radial de *B. bassiana* nos diferentes meios encontram-se nas tabelas 11, 12, 13, 14 e 15 respectivamente para o 2^o, 3^o, 4^o, 5^o e 7^o dia após a inoculação.

Tabela 11-Quadro de análise da variância para as observações relativas ao crescimento radial de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos no 2^o dia após a inoculação.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Meios	3	12,97	4,32	19,76	0.00001
Resíduo	36	7,88	0,22		
Total	39	20,85			

C.V. = 9,427

Tabela 12- Quadro de análise da variância para as observações relativas ao crescimento radial de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos no 3^o dia após a inoculação.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Meios	3	64,44	21,48	99,62	0,00001
Resíduo	36	7,76	0,22		
Total	39	72,20			

C.V. = 4,868

Tabela 13 -Quadro de análise da variância para as observações relativas ao crescimento radial de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos no 4^o dia após a inoculação.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Meios	3	93,24	31,08	70,38	0,00001
Resíduo	36	15,90	0,44		
Total	39	109,14			

C.V. = 4,508

Tabela 14 - Quadro de análise da variância para as observações relativas ao crescimento radial de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos no 5º dia após a inoculação.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Meios	3	165,95	55,32	95,45	0,00001
Resíduo	36	20,87	0,58		
Total	39	186,82			

C.V. = 3,611

Tabela 15 - Quadro de análise da variância para as observações relativas ao crescimento radial de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos no 7º dia após a inoculação.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Meios	3	253,09	84,36	85,60	0,00001
Resíduo	36	35,47	0,98		
Total	39	288,57			

C.V. = 3,993

Na tabela 16 encontram-se os dados médios do crescimento radial de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos, sendo que a representação gráfica destes dados está na figura 8. A figura 9 mostra o crescimento de *B. bassiana* em cada um dos meios.

Tabela 16- Dados médios do crescimento radial, (mm), de *B. bassiana* em diferentes meios de cultura sólidos e em diferentes dias após a inoculação.

Meios	Dias após a inoculação				
	2	3	4	5	7
FCBA	5,30a*	11,13a	16,19a	24,06a	29,13a
BDA	5,66a	10,30b	15,20b	21,80b	24,13b
SFCA	4,73b	8,90c	13,93c	19,69c	23,45bc
PFCA	4,16bc	7,83d	13,93c	18,80c	22,73c
D.M.S. =	0,70122	0,696	0,99606	1,14125	1,4880

* Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Assim os meios de FCBA e BDA apresentaram um maior crescimento radial das colônias de *B. bassiana* em relação aos meios de SFCA e PFCA (Tabela 16).

Comparando-se o meio de FCBA com o de BDA pode-se observar que o meio de FCBA apresentou, a partir do 3^o dia após a inoculação, um crescimento radial significativamente superior. Esta diferença em relação ao meio de BDA pode ter ocorrido por ser FCBA mais rico em nutrientes, principalmente em nitrogênio. A importância da presença de uma fonte de nitrogênio para o rápido desenvolvimento micelial de *B. bassiana* foi confirmado por SMITH & GRULA

(1981) em meio líquido. Estes autores também constataram a importância de uma fonte de carbono e energia, representada nestes meios pelo amido que estava presente em maiores concentrações nos meios de BDA e FCBA, sendo assim, provavelmente um dos fatores que contribuíram para um crescimento significativamente maior destes dois meios em relação a SF-CA e PFCA.

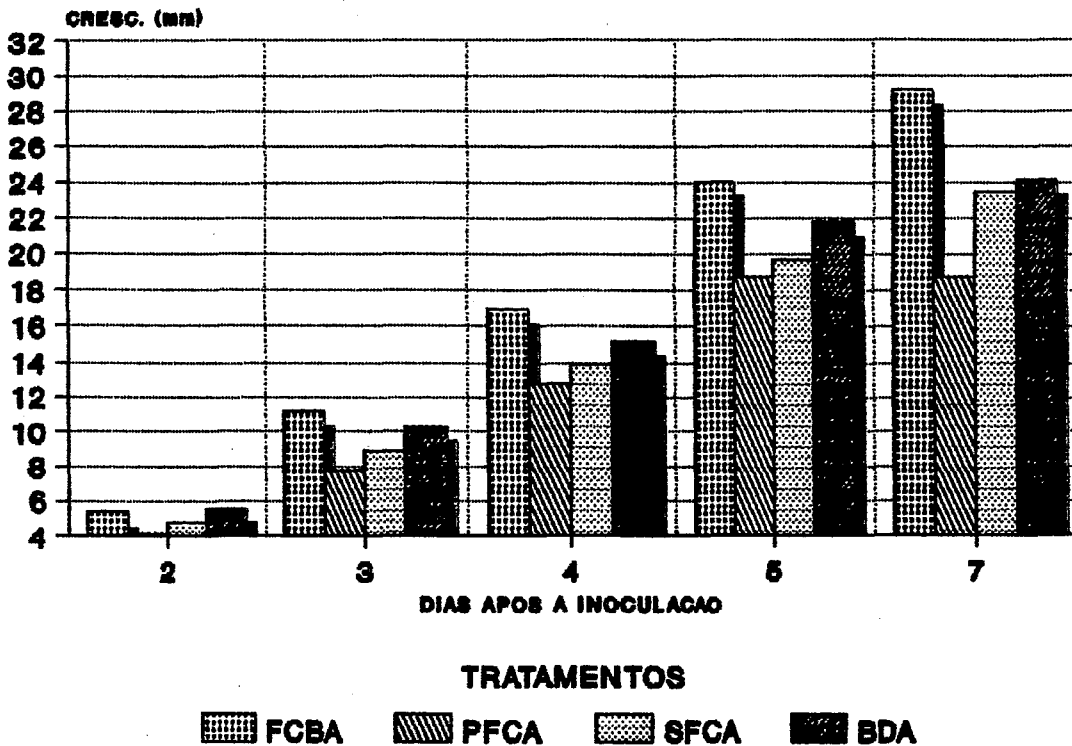


Figura 8 - Crescimento radial (mm) de *B. bassiana* nos diferentes meios de cultura

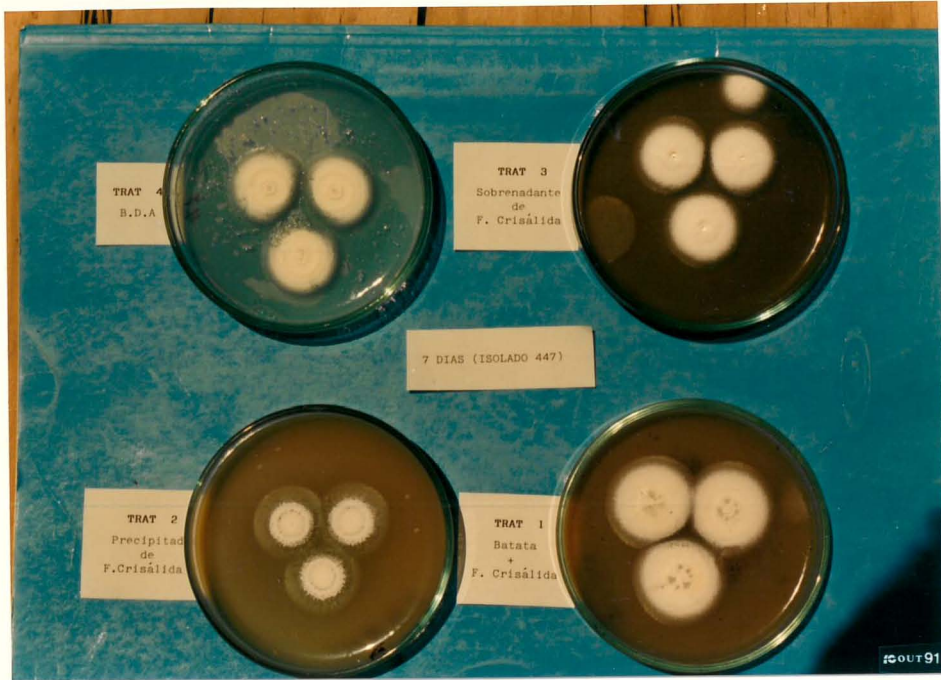


Figura 9 - Desenvolvimento de *B. bassiana* em diferentes meios de cultura no 7^o dia após a inoculação.

Ainda, com relação ao meio de FCBA, as colônias de *B. bassiana* apresentaram um crescimento radial que variou de 12mm a 32mm no período de 3 a 7 dias após a inoculação. Estes resultados estão de acordo com os de NAHAS & ARAI (1987) os quais, no entanto, utilizaram a farinha de crisálida a 3 % sem a adição de batata.

O quadro de análise de variância para os dados de produção de esporos de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos encontra-se na tabela 17.

A produção média de esporos em cada um dos diferentes tratamentos encontra-se na tabela 18 e estão graficamente representados na figura 10.

Tabela 17 - Quadro de análise da variância para as observações relativas à produção de esporos de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob.) F
Meios	3	5,79	1,93	57,16	0.00001
Resíduo	36	1,21	0,03		
Total	39	7.00			

C.V. = 9,299%

Dados transformados em raiz ($x+\theta.5$)

Tabela 18- Produção de esporos de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos.

Produção de esporos				
Meios	Médias** transf.	Médias Originais ($\times 10^7$ /ml)	No círculo*** ($\times 10^7$)	Na placa **** ($\times 10^9$)
BDA	3,57a*	12,18	121,8	43,77
FCBA	2,94b	8,24	82,49	29,70
PFCA	2,25c	4,58	45,87	16,51
SFCA	2,24c	4,56	45,60	16,42

D.M.S. 1% = 0,40146

* Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

** Médias transformadas em Raiz($x+\theta.5$)

***Círculos de 15mm de diâmetro.

****Placas de 9 cm de diâmetro

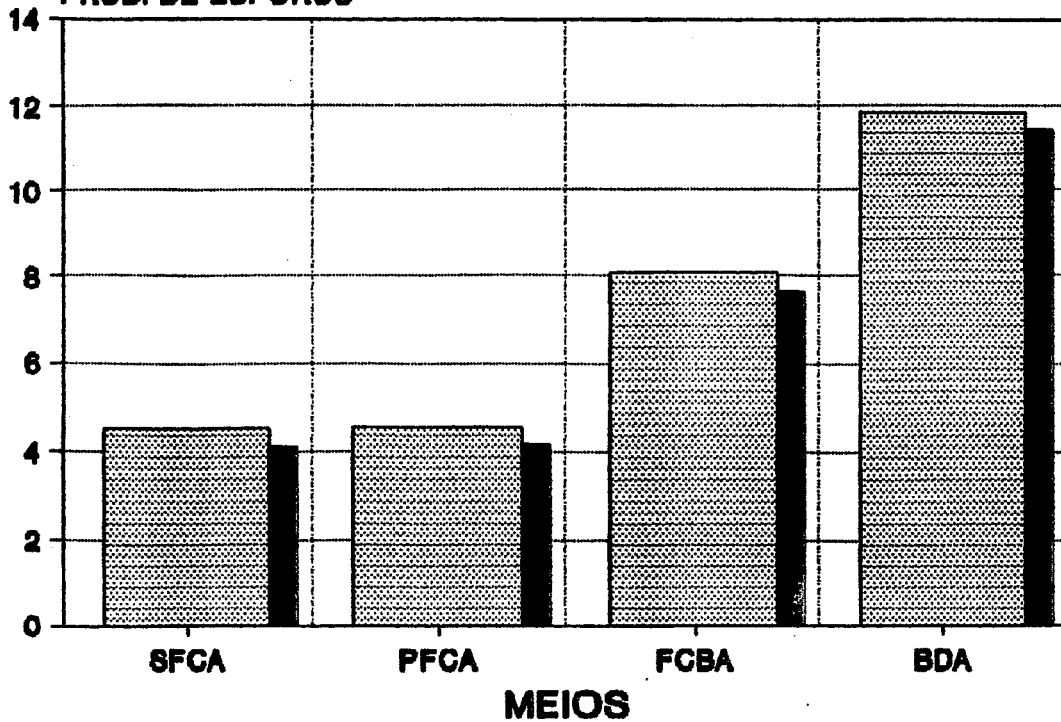


Figura 10 - Produção média de esporos de *B. bassiana* nos meios sólidos ($\times 10^7$ esporos/ml).

O meio de FCBA, que apresentou o maior crescimento radial, não foi o que propiciou a maior produção de esporos, observada no meio de BDA com uma produção 47,4 % superior à obtida em FCBA, apesar de o meio de BDA apresentar uma menor concentração de nitrogênio do que a do meio de FCBA (Figura 10). Esta maior produção de esporos pode estar correlacionada com uma resposta de sobrevivência de *B. bassiana* quando os níveis de nitrogênio estão abaixo dos níveis satisfatórios. Esta resposta à sobrevivência foi também sugerida por CAMPBELL *et alii* (1978) que estudaram o crescimento e a esporulação de *B. bassiana* em meios contendo diferentes tipos de aminoácidos. Estes autores sugere-

rem também que as fontes de nitrogênio importantes para o crescimento micelial podem não ser necessariamente também eficientes para a esporulação do fungo. Provavelmente este fato pode ter ocorrido no desenvolvimento de *B. bassiana* em FCBA, que, apesar de apresentar o melhor crescimento micelial, não propiciou as melhores produções de esporos.

Comparando-se a produção de esporos de *B. bassiana* nos meios de PFCA e SFCA com o de FCBA, observa-se que para este último as produções foram superiores e significativamente diferentes. Esta diferença pode estar relacionada com a presença do amido de batata no meio de FCBA, confirmando a importância deste nutriente não só na esporulação do fungo mas também no seu desenvolvimento vegetativo.

Ao se comparar os resultados obtidos neste estudo com os de outros autores, observa-se que os meios de BDA e FCBA proporcionaram maiores produções do que as obtidas por NAHAS & ARAI (1987), onde os melhores meios para a esporulação de *B. bassiana* foram farelo de trigo, Pontecorvo e farinha de crisálida com produções, para uma área de 7 cm de diâmetro, respectivamente de 13,41; 11,31 e 4,6 x 10⁹ esporos. Se forem extrapoladas as produções atingidas neste estudo para uma igual área, obteríamos produções de 26,47; 17,96; 9,99 e 9,93 x 10⁹ esporos, respectivamente, para BDA, FCBA, PFCA e SFCA.

Para o meio de BDA, TONET & REIS (1979) observaram produções de $74,5 \times 10^7$ esporos por círculo de 13mm de diâmetro, o que daria, para um círculo de 15mm, $99,2 \times 10^6$ esporos, sendo esta produção inferior à obtida neste estudo para o mesmo meio. Estes autores observaram ser o meio de semolina-agar o melhor para a esporulação de *B. bassiana* com $556,5 \times 10^7$ esporos por círculo de 15 mm de diâmetro, produção bastante superior aos melhores meios aqui testados. Por outro lado, GOETTEL (1984) obteve produções inferiores às observadas para qualquer um dos meios testados neste estudo. Já FOGAL *et alii* (1986) e ALVES & PEREIRA (1989), utilizando respectivamente farelo de trigo e arroz, obtiveram produções de 4,5 a $5,7 \times 10^9$ e $6,16 \times 10^9$ esporos por grama de meio respectivamente. A comparação com os resultados aqui obtidos fica difícil pois neste estudo as produções de esporos foram expressas por área.

4.3.2. Teste de patogenicidade com os esporos de *B. bassiana* produzidos nos diferentes meios sólidos.

4.3.2.1. Teste de patogenicidade utilizando operárias de *S. saevissima*.

Os resultados referentes à inoculação de operárias de *S. saevissima* com esporos de *B. bassiana* encontram-se na tabela 19 e figura 11.

Pelos resultados, observa-se que o meio de SFCA foi o que produziu esporos mais virulentos com um TL₅₀ de 4,8 dias, consideravelmente inferior aos outros meios. Entretanto, ao analisarmos o TL₉₀ observamos que os esporos produzidos em FCBA foram os mais virulentos com 13,63 dias, valor bastante inferior ao dos esporos dos outros meios.

Os resultados aqui observados estão de acordo com os obtidos por ALVES *et alii* (1988), que observaram um TL₅₀ que variou de 7,1 a 6,7 dias para diferentes isolados de *B. bassiana* aplicados em igual dose à aqui utilizada, através da mesma metodologia de inoculação.

Entretanto, STIMAC *et alii* (1982) obtiveram TL₅₀ que variaram de 7,2 a 13,8 dias, para a inoculação de diferentes isolados de *B. bassiana* e *B. brongniartii*, resultados maiores do que os observados no presente estudo, provavelmente devido à utilização de uma dose menor e igual a 1×10^7 esporos por ml.

Tabela 19- Tempos latentes medianos, intervalos de confiança e equação da reta resultantes da inoculação de *S. saevissima* com esporos de *B. bassiana* produzidos nos diferentes meios sólidos.

Meios	TL ₅₀ [*]	I.C.	TL ₉₀ [*]	Equa. da reta
FCBA	6,2	5,6-6,8	13,63	$Y=2,0 + 3,75 \log X$
BDA	7,9	7,4-8,4	17,81	$Y=1,8 + 3,6 \log X$
PFCA	9,0	8,4-9,5	23,7	$Y=2,1 + 3,0 \log X$
SFCA	4,8	3,7-6,2	19,5	$Y=3,6 + 2,1 \log X$

* em dias.

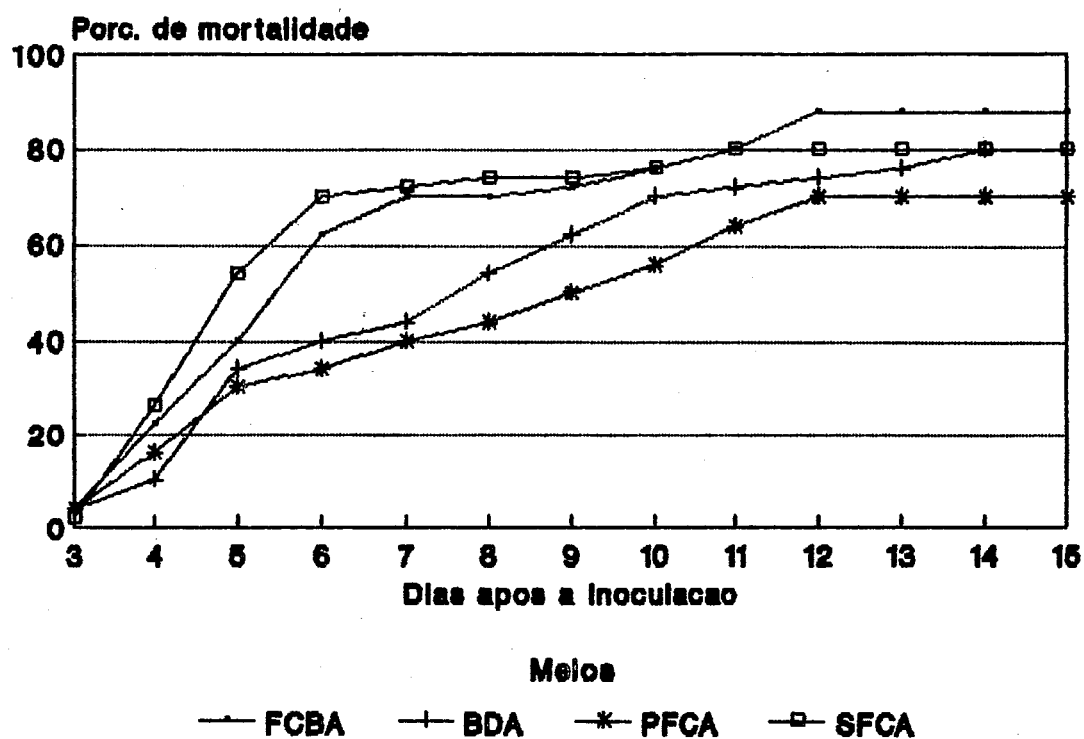


Figura 11 -Porcentagem de mortalidade corrigida e acumulada de operárias de *S. saevissima* inoculadas com *B. bassiana*.

Nota-se, portanto, que os meios aqui testados para a produção de *B. bassiana* não alteraram a virulência dos esporos quando inoculados em operárias de *S. saevissima*.

Com relação à mortalidade observada o meio de FCBA foi onde ocorreu uma maior mortalidade com um total de 88 %, sendo que desse total 70 % das operárias morreram até ao 7º dia após a inoculação. Para todos os tratamentos o maior número de formigas mortas foi observado entre o 4º e o 6º dia após a inoculação com 68 %, 58 %, 36 % e 28 % de mortalidade, respectivamente, para SFCA, FCBA, BDA e PFCA.

4.3.2.2. Teste de patogenicidade utilizando lagartas de *D. saccharalis*.

Os resultados referentes à mortalidade de lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com esporos de *B. bassiana* produzidos nos diferentes meios sólidos encontram-se na tabela 20, sendo graficamente representados na figura 12.

Tabela 20- Tempos letais medianos, intervalos de confiança e equação da reta resultantes da inoculação de lagartas de *D. saccharalis* com esporos de *B. bassiana* produzidos nos diferentes meios sólidos.

Meios	TL ₅₀ [*]	I.C.	TL ₉₀ [*]	Equa. da reta
FCBA	8,3	7,39-9,35	16,47	Y=1,03 + 3,21logX
BDA	7,8	6,74-9,05	19,85	Y=2,2 + 3,16logX
PFCA	10,4	9,3-11,6	30,49	Y=2,2 + 2,75logX
SFCA	14,8	11,7-16,9	47,07	Y=2,2 + 2,4logX

* em dias.

Os esporos produzidos nos meios de BDA e FCBA foram os mais virulentos, apresentando os menores TL₅₀ e TL₉₀ iguais a 7,8 e 8,3 dias, respectivamente. Nota-se que os esporos produzidos em FCBA, apesar de apresentarem um TL₅₀ maior em relação aos produzidos em BDA, não mostraram uma queda relevante na virulência sendo mais virulentos quando analisamos o TL₉₀.

Por outro lado, os esporos produzidos nos meios de PFCA e SFCA mostraram-se menos virulentos apresentando uma queda considerável em relação aos outros dois meios. Devido a esta diferença acentuada entre FCBA e os outros dois meios à base de farinha de crisálida, pode-se levantar a hipótese de que o amido solúvel de batata ou a sua interação com outros nutrientes do meio aumentou a vi-

culência dos esporos produzidos em FCBA e em BDA em relação aos outros dois meios.

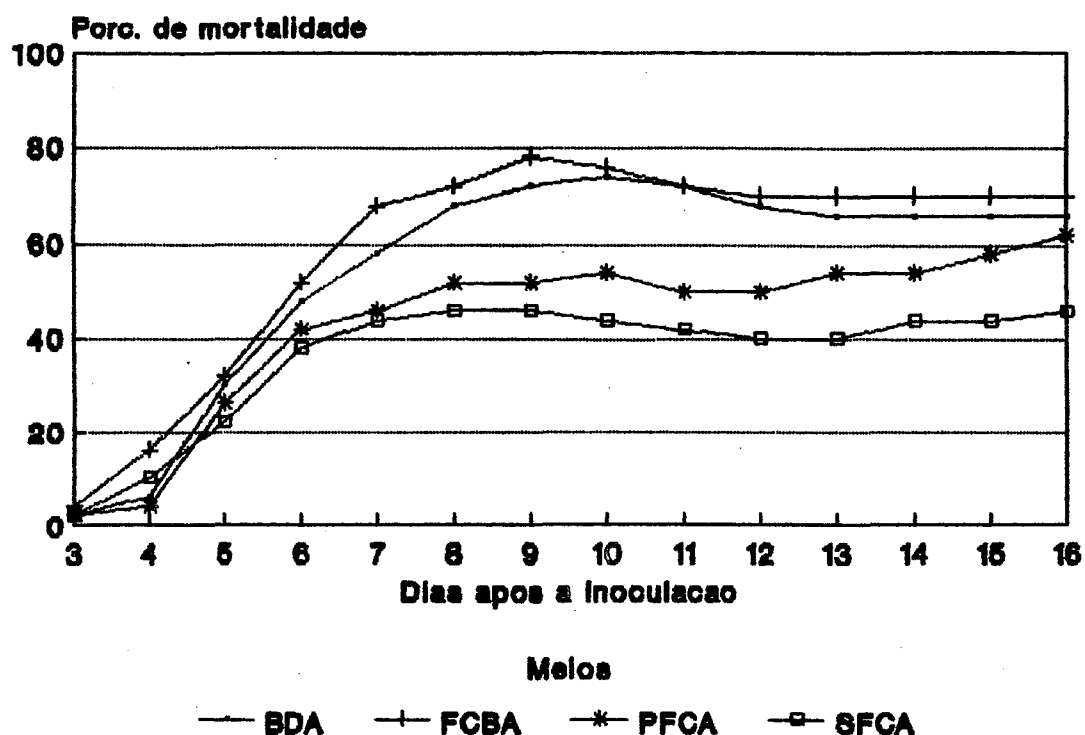


Figura 12- Porcentagem de mortalidade corrigida e acumulada de lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com esporos de *B. bassiana*.

Pelos dados da figura 14 pode-se deduzir que as maiores porcentagens de mortalidade ocorreram para todos os meios entre o 5º e o 8º dia após a inoculação. A mortalidade total corrigida e acumulada foi baixa para todos os tratamentos variando de 56 a 80%.

Comparando-se os dados de TL obtidos neste estudo com os observados por SOSA GÓMEZ (1990) na inocula-

ção de lagartas de *D. saccharalis*, nota-se que não ocorreu uma variação apreciável, mesmo considerando que este autor utilizou uma dosagem de $2,7 \times 10^8$ esporos por ml, bastante superior à aqui usada bem como isolados diferentes.

4.3.3. Curva de crescimento e produção de matéria seca de *B. bassiana* produzida em diferentes meios líquidos.

O quadro de análise da variância para as observações relativas à produção de matéria seca encontra-se na tabela 21.

Tabela 21 - Análise da variância para as observações de produção de matéria seca de *B. bassiana* em meios líquidos.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Meios	1	0,0171	0,0171	672,20	0,0001
Dias	6	0,00004	0,00008	3,06	0,0110
Resíduo	62	0,0015	0,000025		
Total	69	1,73,83			
C.V. = 4,288 % Dados transformados em raiz (x+100)					

Os dados referentes à produção de matéria seca e à curva de crescimento de *B. bassiana* nos meios de FCBL e BD encontram-se respectivamente na tabela 22 e figura 13.

Tabela 22 - Produção média de matéria seca de *B. bassiana* em meios líquidos.

Dias após a inoculação	Produção de matéria seca*							
	Meios							
	FCBL				BD			
	Transf.		Orig.		Transf.		Orig.	
4	10,037	c**	a***	748,3	10,014	a**	b***	287,6
5	10,039	bc	a	789,5	10,016	a	b	317,9
6	10,044	abc	a	890,6	10,017	a	b	342,9
7	10,048	abc	a	964,6	10,014	a	b	284,7
8	10,050	ab	a	1005,1	10,014	a	b	276,9
9	10,053	a	a	1064,4	10,014	a	b	279,7
10	10,050	ab	a	1021,1	10,014	a	b	288,0

* Média de 5 repetições em mg de matéria seca.

** Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade para dias dentro de meios. D.M.S. 1% = 0,01157.

*** Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade para meios dentro de dias. D.M.S. 1% = 0,0849.

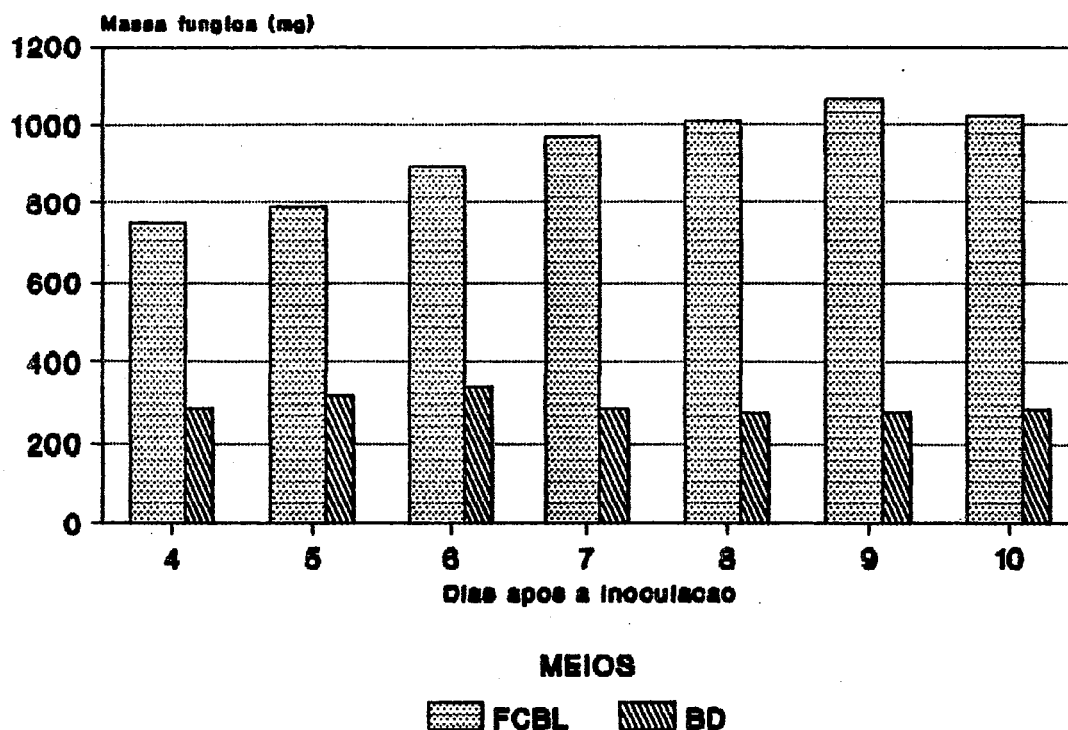


Figura 13 -Produção de matéria sêca (mg) e curva de crescimento de *B. bassiana* em meio líquido.

Ao compararem-se as produções de matéria seca nos dois meios observa-se que FCBL foi sempre mais produtivo do que BD, sendo a maior produção de FCBL 3,1 vezes superior à maior produção de BD.

Assim como no estudo de crescimento de *N. rileyi*, a maior diversidade e riqueza de nutrientes no meio FCBL em relação ao de BD, principalmente a maior concentração de nitrogênio, propiciaram um maior crescimento micelial de *B. bassiana* em meio líquido. A importância de uma fonte de N para o desenvolvimento de *B. bassiana* foi confirmada por SMITH & GRULA (1981), os quais observaram a au-

tólise das células quando este elemento não está presente. BIDOCHKA *et alii* (1987) confirmaram também a importância deste elemento.

Os resultados obtidos neste estudo coincidem com os observados no item 4.3.1., onde o fungo alcançou o maior crescimento radial ou vegetativo no meio de FCBA.

Observa-se também que para o meio de FCBL o pico na produção de matéria seca ocorreu no 9^o dia após a inoculação com 1064,4 mg ou 7,09 mg por ml de meio (Figura 13). Entretanto, este resultado não diferiu estatisticamente da produção aos 6, 7, 8 e 10 dias.

Por outro lado, para o meio de BD não se observou diferença estatística para a produção de massa fúngica em nenhum dos dias testados. Entretanto, as maiores produções foram atingidas no 6^o dia após a inoculação, com uma produção média de 342 mg ou 2,28 mg por ml de meio.

A comparação dos resultados observados neste estudo com os de outros autores para a produção de massa fúngica de *B. bassiana* não nos parece confiável no sentido de que na maioria dos trabalhos realizados o principal objetivo foi o de se testarem várias fontes de nutrientes dentro de grupos como carboidratos, aminoácidos e peptonas.

Assim, o meio de FCBL é mais produtivo do que o de BD, devendo ter preferência num processo de produção bifásico para o crescimento da massa micelial de *B. bassiana* em meio líquido.

4.3.4. Produção de esporos de *B. bassiana* pelo processo bifásico .

O quadro de análise da variância para as observações de produção de esporos de *B. bassiana* nos diferentes meios sólidos do processo bifásico encontram-se na tabela 23.

Tabela 23- Quadro de análise da variância dos dados de produção de esporos de *B. bassiana* no processo bifásico de produção.

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Prob. > F
Meios	3	2,6668	0,8889	59,971	0,00001
Resíduo	16	0,2372	0,0148		
Total	19	2,9040			
C.V. = 6,756%					

A comparação das médias obtidas para cada um dos tratamentos faz parte da tabela 24, sendo os dados graficamente representados na figura 14.

Pode-se observar que o melhor meio foi o de FC, seguido do de Ar., Bat. e BFC, com produções médias de 1,6 a $5,2 \times 10^9$ esporos por grama de meio.

Tabela 24 - Produção média de esporos de *B. bassiana* em diferentes substratos no processo de produção biológico.

Meios	Produção de esporos		
	Médias transf. *	Médias orig. **	por g de meio ***
FC	2,384 a****	5,184	5,2
Ar.	1,828 b	2,856	2,9
Bat.	1,569 bc	1,976	2,0
BFC	1,427 c	1,560	1,6

D.M.S. 1% = 0,28258

* Médias transformadas em raiz($x + 0.5$)

** $x * 10^8/ml$

*** $x * 10^9$

**** Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

As maiores esporulações de *B. bassiana* em FC ocorreram, provavelmente, devido à maior diversidade de nutrientes neste meio e também em função dos maiores teores de nitrogênio. Entretanto, o maior crescimento micelial no 2º, 3º e 4º dias foi observado, a olho nu, em ordem decrescente nos meios de Bat., BFC, Ar. e FC. Esta foi justamente a ordem inversa das maiores produções de esporos. Como já discutido no item 4.3.1., a elevada produção de esporos pode estar relacionada com a falta de algum nutriente, obri-

gando o fungo a maiores produções como forma de garantir a sua sobrevivência, principalmente no caso do nitrogênio. Entretanto, isto parece não se aplicar no presente caso para este nutriente, uma vez que o meio de FC é rico neste elemento.

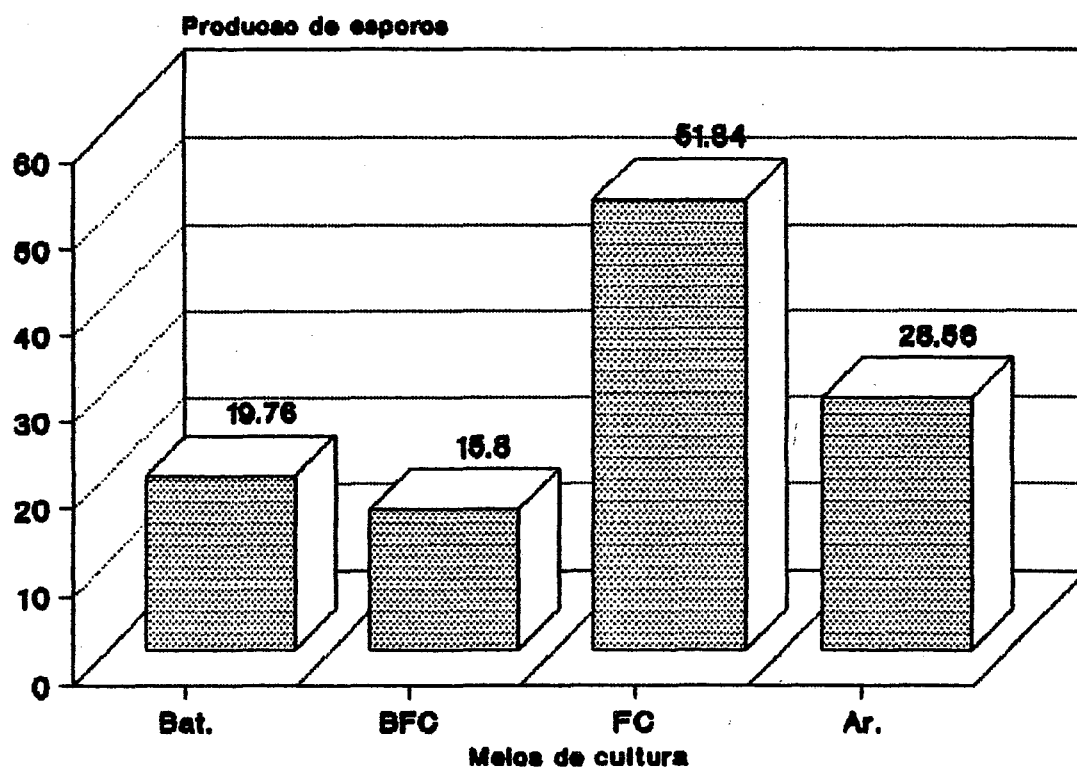


Figura 14 - Produção de esporos de *B. bassiana* nos diferentes meios do processo bifásico de produção.

Portanto algum outro fator não identificado deve estar influenciando no aumento de esporulação, apesar de ter ocorrido menor crescimento micelial. Deste modo, estudos devem ser efetuados no sentido de se esclarecer quais

os mecanismos fisiológicos envolvidos neste processo.

Ào se compararem os resultados obtidos neste estudo com os relatados por ALVES & PEREIRA (1989), pode-se observar que as produções em arroz empregando o método das bandejas foram de $6,16 \times 10^9$ esporos por grama de meio, 1,2 vezes superiores às observadas para o melhor meio testado FC, com $5,2 \times 10^9$ esporos por grama de meio, e 2,2 vezes superiores ao 2º melhor, Ar. com $2,8 \times 10^9$ esporos por grama de meio. Estas diferenças devem-se, provavelmente, aos diferentes isolados utilizados bem como às condições de cultivo do fungo no método das bandejas onde as condições de arejamento são provavelmente melhores. Portanto uma comparação segura entre estes dois meios, FC e Ar. deveria ser feita pelo método das bandejas uma vez que o meio de FC além de mais produtivo é também economicamente mais viável.

A comparação dos resultados em FC com os obtidos por THOMAS *et alii* (1987), utilizando meio líquido, mostram-nos que a produção de esporos por ml de meio foi 10 vezes inferior à de FC por grama de meio. As produções conseguidas por ROMBACH (1989) em meio líquido, $73-170 \times 10^6$ esporos por ml foram também menores do que as de *B. bassiana* em FC.

Considerando que o meio de FC propiciou maiores produções de esporos do que os outros meios testados, e principalmente, que seu custo é economicamente mais viável, sugere-se, num método de produção bifásico de *B.*

bassiana, optar pelo uso deste meio de cultura principalmente em programas de produção em larga escala.

4.3.5. Teste de patogenicidade com os esporos de *B. bassiana* produzidos pelo processo bifásico.

4.3.5.1. Teste de patogenicidade utilizando operárias de *S. saevissima*.

Os resultados referentes à inoculação de operárias de *S. saevissima* com esporos de *B. bassiana* encontram-se na tabela 25 e figura 15.

Tabela 25- Tempos letais medianos, intervalos de confiança e equação da reta resultantes da inoculação de *S. saevissima* com esporos de *B. bassiana* produzidos pelo processo bifásico.

Meios	TL ₅₀ [*]	I.C.	TL ₉₀ [*]	Equa. da reta
Bat.	9,0	8,2-10	24,7	y=2,2+2,9Logx
BFC	6,2	5,5-7,1	15,8	y=2,5+3,2Logx
Ar.	8,2	7,3-9,0	22,65	y=2,3+2,9Logx
FC	6,4	6,0-6,8	12,85	y=1,6+4,2Logx

* em dias.

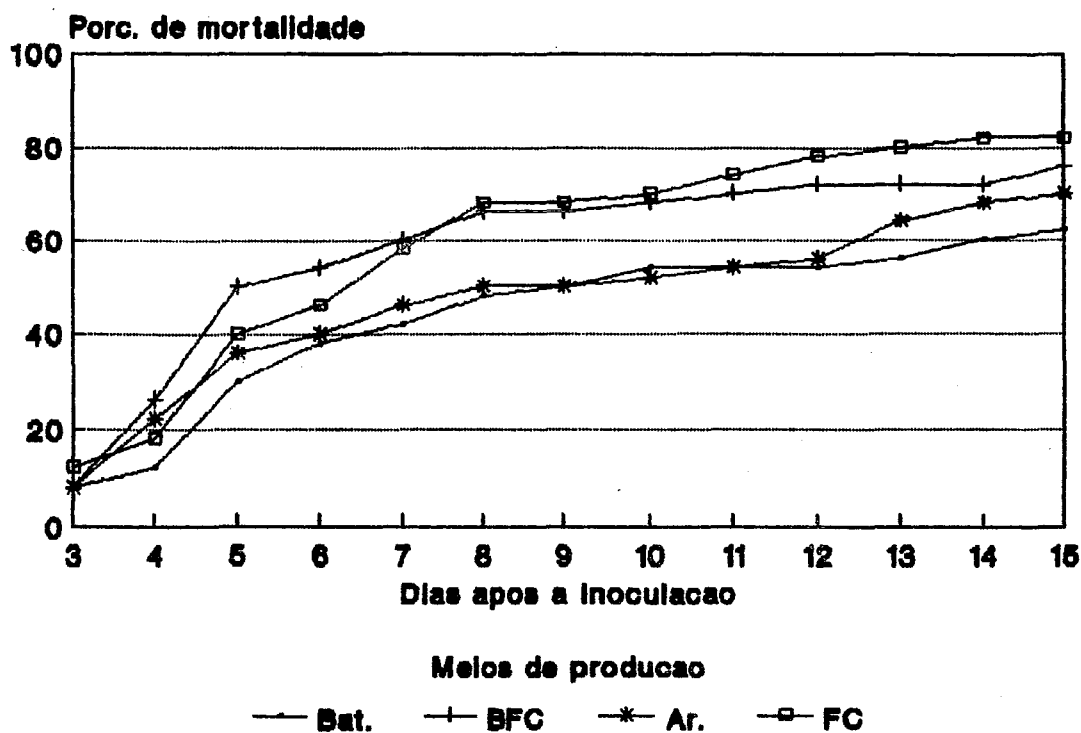


Figura 15 -Porcentagem de mortalidade corrigida e acumulada de operárias de *S. saevissima* inoculadas com esporos de *B. bassiana*.

Através da análise dos resultados observamos que os meios de BFC e FC foram os que produziram esporos mais virulentos com TL_{50} de 6,2 e 6,4 dias, respectivamente. Ao considerarmos em conjunto o TL_{50} e o TL_{90} , os meios de FC e BFC foram também os mais virulentos com 12,85 e 15,8 dias, respectivamente. Assim, os meios confeccionados com a farinha de crisálida foram consideravelmente mais virulentos do que os outros dois meios. Deste modo, a utilização de farinha de crisálida em meios de cultura para *B. bassiana* não diminui a virulência dos esporos mas, ao con-

trário, conforme observou-se houve um incremento na virulência.

Ao se comparar os resultados obtidos neste estudo com os de ALVES *et alii* (1988) e os de STIMAC *et alii* (1982) confirma-se que o uso da farinha de crisálida não alterou a virulência dos esporos produzidos.

Também a comparação dos resultados da inoculação de esporos de *B. bassiana* produzidos em FCBA nos meios sólidos e produzidos em BFC no processo bifásico com os resultados observados da inoculação dos esporos dos outros meios, tanto sólidos como no método bifásico, evidenciaram que os meios onde se utilizou a farinha de crisálida foram mais virulentos.

A maior mortalidade ocorreu para todos os tratamentos entre o 4^o e o 8^o dia após a inoculação e variou 48 % a 66%, sendo as maiores mortalidades provocadas pelos meios de BFC e FC (Figura 15).

4.3.5.2. Teste de patogenicidade utilizando lagartas de *D. saccharalis*.

Os resultados referentes à mortalidade de lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com esporos de *B. bassiana* produzidos nos diferentes meios no processo bifásico encontram-se na tabela 26 estando graficamente representados na figura 16.

Tabela 26- Tempos letais mediamos, intervalos de confiança e equação da reta resultantes da inoculação de lagartas de *D. saccharalis* com esporos de *B. bassiana* produzidos nos diferentes meios no processo bifásico de produção.

Meios	TL ₅₀ [*]	I.C.	TL ₉₀ [*]	Equa. da reta
FC	7,5	7,0-8,1	30,4	$y=3,1+2,1\text{Log}x$
Ar.	9,1	8,1-10,3	36,1	$y=2,9+2,1\text{Log}x$
BFC	10,8	9,6-12,2	44,7	$y=2,8+2,1\text{Log}x$
Bat.	12,3	11,3-13,5	56,3	$y=2,9+1,9\text{Log}x$

* em dias.

Os esporos produzidos em FC foram os mais virulentos em comparação com os produzidos nos outros meios. Como já discutido nos itens anteriores, o meio de FC não causou diminuição na virulência, ficando evidente um acréscimo desta nos meios com este nutriente. Isto reforça o que já foi constatado nos outros bioensaios com esporos de *B. bassiana*.

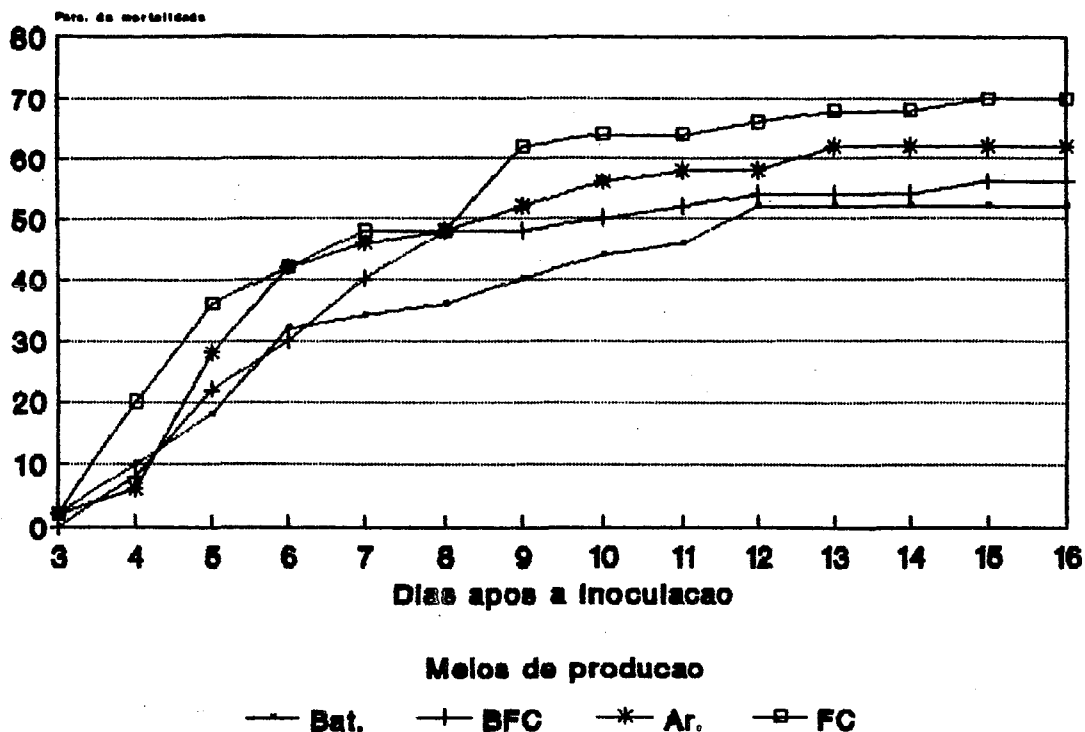


Figura 16 - Porcentagem de mortalidade corrigida e acumulada de lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com esporos de *B. bassiana*.

Ao se analisar a virulência dos esporos produzidos em Bat. contra *D. saccharalis* nota-se a mesma tendência da observada no teste anterior com *S. saevissima*. Entretanto para os esporos produzidos nos meios de Ar. e BFC ocorreu uma inversão na virulência em relação à tendência observada para o teste com *S. saevissima*.

Assim, como para os esporos produzidos nos meios sólidos, os resultados obtidos quando comparados com os de SOSA GÓMEZ (1990) não mostraram uma grande variação, apesar deste autor ter utilizado uma maior dosagem e vários isolados, como discutido no item 4.3.2.2..

Com relação aos TL₉₀ observados neste teste, notou-se que estes foram bastante elevados. Isto deveu-se ao fato de ter ocorrido uma elevada mortalidade de lagartas causada por bactérias, diminuindo a mortalidade total causada pelo fungo. As maiores mortalidades para todos os tratamentos ocorreram entre o 4^o e o 7^o dia após a inoculação (Figura 16). Observa-se que a mortalidade variou de 52 a 70% sendo a maior mortalidade observada no meio de FC seguido por Ar. e BFC

4.4. Comparação dos custos de produção dos diferentes meios e processos utilizados

4.4.1. Comparação dos custos de produção de *N. rileyi*

4.4.1.1. Nos meios sólidos

Os preços de 500g de cada um dos nutrientes utilizados no meio de SMAY encontram-se na tabela 27.

Tabela 27 - Custos (US\$) de 500g dos nutrientes utilizados no meio de SMAY (Marca DIFCO^R)

Nutriente	Custo (US\$)
Maltose	105
Extrato de levedura	131
Neopeptona	310
Agar-Agar	195

* US\$ 1 = cr\$ 250 em 01/03/91

Para o meio de SMAY, utilizando-se maltose (40g), Ext. de levedura (10g), Neopeptona (10g) e agar (15g), tem-se o custo de US\$ 23,05 por litro de meio.

Os preços de 500g dos nutrientes utilizados no meio de FCBA encontram-se na tabela 28.

Tabela 28 - Custo de 500g dos nutrientes utilizados no meio de FCBA em US\$.

Nutrientes	Custos (US\$)
Farinha de crisálida	0,07
Batata	0,16
Agar (DIFCO ^R)	195

Deste modo, utilizando-se 200g de FC, 200g de batata e 15 g de agar para um litro de FCBA tem-se o custo de 5,94 dólares, sendo, portanto 3,9 vezes mais econômico do que o meio de SMAY.

Entretanto, dependendo do preço do agar a ser utilizado, esta diferença entre os custos dos dois meios pode aumentar. Isto é confirmado pois se não se considerar o preço do agar, que é utilizado nos dois meios em igual concentração, o meio de FCBA terá um custo de 9,2 centavos de dólar por litro e o de SMAY US\$ 17,2 ou seja

186,9 vezes mais caro.

Considerando-se que um litro de SMAY distribuído em 40 placas de 9 cm de diâmetro, produzirá 1×10^{12} esporos por litro a um custo de US\$ 23,05 e que um litro de FCBA(8), em 40 placas, produziria $5,2 \times 10^{11}$ esporos a um custo de US\$ 5,94, precisaríamos de 1,7 litros de FCBA para se produzir a mesma quantidade de esporos obtidas com 1 litro de SMAY gastando US\$ 10. Deste modo, utilizando a metade do tempo, o meio de FCBA produziria a mesma quantidade de esporos obtida em SMAY a um custo 2,3 vezes menor.

A comparação dos resultados observados neste estudo com os obtidos por BELL *et alii* (1982), onde em SMAY a um custo de US\$ 1,75, produziram $74,2 \times 10^9$ esporos ou $7,4 \times 10^{11}$ esporos por US\$ 17,5 mostra-nos que este custo foi igual ao observado para SMAY. Deste modo, o meio de FCBA foi mais econômico do que o meio utilizado por BELL *et alii* (1982).

Com relação ao trabalho de SILVA & LOCH (1987), onde para os meios de SMAY e Arroz (4% de ext. levedura) observaram-se produções de $1,77 \times 10^{11}$ esporos por litro e $7,9 \times 10^{11}$ esporos por kg, respectivamente, observa-se, que a valores atuais, um quilograma de Arroz (4% ext. levedura) ficaria ao redor de US\$ 11,48, produtividade inferior à obtida para o meio de FCBA(8).

Fica, deste modo, evidente que o meio de FCBA(8) é economicamente mais viável do que os meios de SMAY e ar-

roz.

4.4.1.2. No processo bifásico.

Pelos resultados obtidos no item 4.2.4., observa-se que *N. rileyi* somente esporulou nos meios de Bat. e BFC, sendo que as maiores produções foram observadas em Bat. que apresenta um custo inferior ao de BFC. Deste modo, serão analisados aqui somente os custos de produção de *N. rileyi* em Bat..

Para o meio de Bat. observaram-se produções de $1,15 \times 10^7$ esporos por 10 g de meio ou $1,15 \times 10^9$ esporos por quilograma de meio, a 32 centavos de dólar o quilo. Com esta produtividade seriam obtidas, a um custo de US\$ 5,94, produções de $2,13 \times 10^{10}$ esporos, produtividade esta menor do que a observada para o meio de FCBA.

Comparando-se a produtividade em Bat. com a observada por SILVA & LOCH (1987) em arroz (4% ext. levedura) que foi de $7,9 \times 10^{11}$ esporos a um custo de US\$ 11,48, nota-se que a este custo poderiam ser produzidos em Bat $4,11 \times 10^{10}$ esporos, produtividade inferior à observada em arroz por aqueles autores.

Nota-se, portanto, que na comparação da produção nos meios sólidos como no processo bifásico, o meio de FCBA foi o mais produtivo.

Vale, ressaltar que nas comparações feitas entre os resultados observados neste estudo com os obtidos por outros autores, deve-se considerar que os experimentos foram desenvolvidos em diferentes condições e principalmente, utilizando-se isolados diferentes.

4.4.2. Comparação dos custos de produção de *B. bassiana*

4.4.2.1. Nos meios sólidos

Os custos de 500 g de cada um dos nutrientes utilizados no meio de BDA encontram-se na tabela 29.

Tabela 29- Custos de 500g de cada um dos nutrientes do meio de BDA

Nutrientes	Custos(US\$)*
Dextrose(Dextrosol ^R)	3,00
Batata	0,16
Agar-Agar	195

* 1 US\$ = cr\$ 250 em 01/03/91

Considerando que utilizaram-se 20g de dextrose, 200 g de batata e 15 g de agar, o custo de 1 litro

de BDA é igual a US\$ 6,03. Conforme o item 4.1.1., o custo de um litro de FCBA é de US\$ 5,94. Deste modo, considerando-se que um litro de meio é distribuído em 40 placas de 9 cm de diâmetro, teremos uma produção de $1,75 \times 10^{12}$ esporos por litro de BDA e $1,19 \times 10^{12}$ esporos por litro de FCBA, a um custo de US\$ 8,73. Deste modo, o meio de BDA é 1,45 vezes mais econômico do que o de FCBA.

Comparando os custos dos meios utilizados no processo sólido com os do processo bifásico, observa-se que o processo bifásico é extremamente mais econômico. Isto é comprovado considerando que para a produção de *B. bassiana* em BDA gastariam-se US\$ 17,9 para produzir a mesma quantidade de esporos obtidas com um quilo de FC, custo este 127,8 vezes maior.

Ao se comparar os custos de produção de *B. bassiana* em FC com os observados por ALVES & PEREIRA (1989), nota-se que para se produzir $6,16 \times 10^{12}$ esporos, quantidade obtida por aqueles autores utilizando um quilo de arroz no processo de bandejas, necessitaríamos 1,2 quilos de FC a um custo de 16,8 centavos de dólar, custo este 5,95 vezes menor do que o observado em arroz.

Com relação às produções observadas por outros autores utilizando diferentes meios de cultura, como já discutido no item 4.3.4., todas foram inferiores às aqui obtidas para FC, sendo que os meios utilizados apresentaram custos superiores aos de FC.

Nota-se, portanto, que o meio de FC foi o mais produtivo e o mais econômico.

4.4.2.2. No processo bifásico

Na produção de *B. bassiana* pelo processo bifásico, as melhores produções foram obtidas no meio de FC com $5,2 \times 10^9$ esporos por g de meio ou $5,2 \times 10^{12}$ esporos por quilograma de meio a um custo de 14 centavos de dólar.

Para o meio de arroz, as produções foram de $2,9 \times 10^{12}$ esporos por quilo de meio a um custo de US\$ 1,00. Deste modo, para obtermos a mesma quantidade de esporos produzida em FC seriam necessários 1,8 quilos de arroz a um custo de US\$ 1,8. Portanto o meio de FC foi 12,8 vezes mais econômico do que o de arroz.

5- CONCLUSÕES

É possível concluir o seguinte:

- 5.1. O meio de Farinha de crisálida batata (FCBA) é economicamente mais vantajoso na produção de *N. rileyi* quando comparado com os outros meios utilizados.
- 5.2. No processo bifásico o meio de Batata (Bat.) é o que apresenta as maiores produtividades na produção de *N. rileyi*.
- 5.3. Para a produção de massa micelial seca de *N. rileyi*, em meio líquido, o meio de Farinha de crisálida, batata líquido (FCBL) é o mais adequado com um pico na produção aos 7 dias após a inoculação.
- 5.4. Não há decréscimo na virulência dos esporos de *N. rileyi* produzidos em meios à base de farinha de crisálida, nos processos sólido e bifásico, em relação aos esporos produzidos nos outros meios.

- 5.5. Nos meios sólidos o maior crescimento radial de *B. bassiana* ocorre no meio de Farinha de crisálida batata (FCBA) e a maior produção de esporos em B.D.A. a um custo 0.45 vezes menor do que em Farinha de crisálida batata.
- 5.6. No processo bifásico, para a produção de *B. bassiana*, o meio de Farinha de crisálida (FC) é o mais produtivo e quando comparado ao meio de B.D.A. mostra-se 127,8 vezes mais econômico.
- 5.7. Para a produção de matéria seca de *B. bassiana*, o melhor meio é Farinha de crisálida batata líquido (FCBL) em comparação ao meio de B.D.A..
- 5.8. Com relação à virulência os esporos de *B. bassiana* produzidos em Farinha de crisálida batata (FCBA) são mais virulentos para operárias de *S. saevissima* e lagartas de *D. saccharalis* do que os esporos produzidos em B.D.A..
- 5.9. No processo bifásico para a produção de *B. bassiana* os esporos produzidos em Farinha de crisálida (FC) são os mais virulentos em relação aos esporos produzidos nos outros meios.

5.10. Na comparação dos meios e métodos para a produção de esporos de *B. bassiana* o meio de Farinha de crisálida (FC) no processo bifásico, é o economicamente mais vantajoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADÁMEK, L. Submerse cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.). *Folia Microbiol.*, Prague, 10: p. 255-257, 1965.
- ALVES, S. B. ; NAKANO, O. ; NAKAYAMA, K. *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, eficiente patógeno de *Trichoplusia nii* (Hubner, 1802). *Ecossistema*, Piracicaba, 2(3):p. 77, 1978.
- ALVES, S. B. ; PÁDUA, L. E. M. ; AZEVEDO, E. M. V. M. ; ALMEIDA, L. C. Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 20(4): p.403-406, 1985.
- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B., (coord.) *Controle Microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. cap. 6, p. 72-126.
- ALVES, S. B. ; STIMAC, J. L. ; CAMARGO, M. T. V. Suscetibilidade de *Solenopsis invicta* Buren e *S. saevissima* Fr. Smith. a isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Porto Alegre, 12(2): p. 379-387, 1988.

- ALVES, S. B. & PEREIRA, R. M. Produção do *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok em bandejas. *Ecossistema*, Piracicaba, 14: p. 188-192, 1989.
- ALVES, S. B. ; MARCHINI, L. C. ; STIMAC, J. L. ; PEREIRA, R. M. ; BAUNGRATZ, L. L. Effects of some insect pathogens against the africanised honeybee, *Apis mellifera*. In : INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, V th., Adelaide, 1990. Proceedings and abstracts. Adelaide, editor (Society for Invertebrated Pathology) 1990. p.403.
- ANDERSON, T. E. ; ROBERTS, D. W. ; SOPER, R. S. Use of *Deauveria bassiana* for supression of Colorado Potato Beetle populations in New York State (Coleoptera: Crysomelidae). *Environmental Entomology*, College Park, 12 (1): 140-145, 1988.
- BALARDIN, R. S. Meios de cultura semi-sintéticos, agentes preservantes e rotina para a produção massal do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Piracicaba, 1984. 104p. (M.S.-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP)

- BALARDIN, R. S. & LOCH, L. C. Metodologia para a produção e preservação de inóculo de *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 14 (1): p. 144-151, 1988.
- BARBOSA, F. R. & CZEPAK, C. Patogenicidade do fungo entomogeno *Beauveria bassiana* (BALLS.) Vuill. para o percevejo marrom *Euschistus heros* Fabricius. Goiânia, Emgo, 1984. 4 p. (Pesquisa em Andamento, 10).
- BARNES, G. L. ; BOETHEL, D. J. ; 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, New York, 25: p. 301-305, 1975.
- BATISTA FILHO, A. ; CRUZ, B. P. B. ; CAMARGO, L. M. P. C. A. ; OLIVEIRA, D. A. Crescimento de *Beauveria* sp., isolado de bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman), em meios de cultura naturais, líquidos. Biológico, São Paulo, 51(1):p. 17-21, 1985.
- BELL, J. V. Production and pathogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid media. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 24: p. 129-130, 1975.

BELL, J. V. & HAMALLE, R. J. Three fungi tested for control of the Cowpea Curculio, *Chalcoedermus senensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 15 : p. 447-450, 1970.

BELL, J. V. & HAMALLE, R. J. *Heliothis zea* larval mortality time from topical and per Os dosages of *Nomuraea rileyi* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 35 : p. 182-185, 1980.

BELL, J. V. ; HAMALLE, R. J. ; IGNOFFO, C. M. Methods and costs of producing *Nomuraea rileyi* conidiospores. New Orleans, U.S. Department of Agriculture, 1982. 7 p. (Southern Series, 24).

BIDOCHKA, M. J. ; PFEIFER, T. A. ; KHACHATOURIANS, G. G. Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia*, Dordrecht, 22: p. 77-83, 1987.

BOUCIAS, D. G. ; SCHOBORG, E. A. ; ALLEN, G. E. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 39: p. 238-240, 1982.

- BOUCIAS, D. G. ; BRADFORD, D. L. ; BARFIELD, C. S.
Susceptibility of the velvetbean caterpillar and soybean
looper (Lepidoptera: Noctuidae) to *Nomuraea rileyi*:
effects of pathotype, dosage, temperature, and host age.
Journal of Economic Entomology, Menasha, 77(1): p.
247-253, 1984.
- CAMARGO, M. Crescimento e esporulação do fungo
entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em
diferentes meios de cultura. Piracicaba, 1981. 51p. (M.s.
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP.
- CAMPBELL, R. K. ; PERRING, T. M. ; BARNES, G. L. ;
EIKENBARY, R. D. ; GENTRY, C. R. Growth and sporulation
of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on media
containing various amino acids. *Journal of Invertebrate
Pathology*, New York, 31: p. 289-295, 1978.
- CAMPBELL, R. K. ; BARNES, G. L. ; CARTWRIGHT, B. O. ;
EIKENBARY, R. D. Growth and sporulation of *Beauveria
bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium
containing various carbohydrate sources. *Journal of
Invertebrate Pathology*, New York, 41: p. 117-121, 1983.
- COUDRON, T. A. ; KROHA, M. J. ; EL-SAYED, G. N. A novel
semiliquid technique for propagating entomopathogenic

- fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, **44**: p.335-336, 1985.
- DELATTRE, P. & JEAN-BART, A. Activités des champignons enthomopathogènes (Fungi imperfecti) sur les adultes de *Cosmopolites sordidus* Germ. (Coleoptera, Curculionidae). *Turrialba*, San José, **22** (4) : 287-93, 1978.
- FARGUES, J. & RODRIGUEZ-RUEDA, D. Sensibilité des larves de *Spodoptera littoralis* [Lep.: Noctuidae] aux hyphomycètes entomopathogènes *Nomuraea rileyi* et *Paecilomyces fumoso-roseus*. *Entomophaga*, Paris, **25**(1): p. 43-45, 1980.
- FENG, Z. ; CHARRUTHERS, R. ; LARKIN, T. ; ROBERTS, D. A phenology model and field evaluation of *Beauveria bassiana* (BALS.) vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) mycosis of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (HBN.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Canadian Entomologists*, Ottawa, **120**: 133-144, 1988.
- FERNANDES, P. M. ; LECUONA, P. E. ; ALVES, S. B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (BALS) Vuill. à broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae, Ecossistema, Piracicaba, **10** ; p. 176-181, 1985.

FERNANDES, P. M. Influência da temperatura, umidade relativa do ar e dose, na eficiência de *Beauveria bassiana* (BALS) Vuill. sobre *Cerofoma arcuata* Oliv. (Col. ; Chrysomelidae). Piracicaba, 1988. 70 p. (M.s. - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).

FERNÁNDEZ, F. B. Controle microbiano do gorgulho da cana-de açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae) com *Beauveria* spp. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, 1983. Piracicaba, 1989. 118 p. (M.S.- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP)

FERRON, P. Pest control by the Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*. In: BURGESS, H. D. , Ed. Microbial Control of Pests And Plant Diseases. 1970-1980. London; Academic Press, 1981. p. 465-482.

FOGAL, W. H. ; MITTAL, R. K. ; THURTON, G. S. Production and evaluation of *Beauveria bassiana* for control of white spruce cone and seed insects. Qué., 1986. 15p. Information Report PI-X-69.

GARCIA, C. ; IGNOFFO, C. M. A simplified diet-surface treatment technique for determining the infectivity of

conidia of *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 32: p. 398-399, 1978.

GOETTEL, M. S. A simple method for mass culturing entomopathogenic hyphomycete fungi. Journal of Microbiological Methods, Amesterdan, 3: p. 15-20, 1984.

GÓMEZ, D. R. S. Caracterização de isolados de *Beauveria* spp. e determinação das exigências térmicas e hídricas de *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuill. Piracicaba 1990. 98 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP)

GOPALAKRISHNAN, C. & NARAYANAN, K. Occurrence of two entomofungal pathogens, *Metarrhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *minor* Tulloch and *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, on *Heliothis armigera* Hubner (Noctuidae: Lepidoptera). Current Science, Bangalore, 52(15): p.867-868, 1988.

HOFFMANN, C. B. ; NEWMAN, G. G. ; FOERSTER, L. A. Incidência estacional de doenças e parasitas em populações naturais de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 e *Plusia* spp. em soja. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Porto Alegre, 9 (1) : 115-124, 1979.

HOLDOM, D. G. & van de KLASHORST, G. Sporulation by hyfal bodies of *Nomuraea rileyi* and subsequent infection of *Heliothis* spp. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 48: p. 242-245, 1986 a.

HOLDOM, D. G. & van de KLASHORST, G. Inexpensive culture media and methods for *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate Pathology, New York. 48: p. 246-248, 1986 b.

IGNOFFO, C. M. , MARSTON, D. L. ; HOSTETTER, D. L. ; PUTTLER, B. Natural and induced epizootics of *Nomuraea rileyi* in soybean caterpillars. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 22: p. 191-198, 1976 a.

IGNOFFO, C. M. ; GARCIA, C. ; HOSTETTER, D. L. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Environmental Entomology, College Park, 5(5): p. 935-936, 1976 b.

IGNOFFO, C. M. ; PUTTLER, B. ; HOSTETTER, D. L. ; DICKERSON, W. A. Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate pathology, New York, 28: p. 259-262, 1976 a.

IGNOFFO, C. M. The fungus *Nomuraea rileyi* as a Microbial Insecticide. In: BURGESS, H. D., Eds. Microbial Control of Pests and Plants Diseases. London, Academic Press, 1981, p. 513-538.

IGNOFFO, C. M. ; GARCIA, C. ; KROHA, M. ; COUCH, T. L. Use of larvae of *Trichoplusia ni* to bioassay conidia of *Beauveria bassiana*. Journal of Economic Entomology, Menasha, 25(2): p. 275-276, 1982 b.

IGNOFFO, C. M. ; McINTOSH, A. H. ; GARCIA, C. ; KROHA, M. ; JOHNSON, J. M. Effects of successive *In vitro* and *In vivo* passages on the virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Entomophaga, Paris, 22(4): p. 371-378, 1982 a.

IGNOFFO, C. M. ; GARCIA, C. ; KROHA, M. ; SAMSINÁKOVÁ, A. ; KÁLOVÁ, S. A leaf surface treatment bioassay for determining the activity of conidia of *Beauveria bassiana* against *Leptinotarsa decemlineata*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 41: p. 385-386, 1983.

IGNOFFO, C. M. ; GARCIA, C. Host spectrum and relative virulence of an Ecuadoran and a Mississippian biotype of *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 45: p. 352-364, 1985.

- IGNOFFO, C. M. & GARCIA, C. Relative virulence of *Nomuraea* spp (*N. rileyi*, *N. atypicola*, *N. anemonoides*) originally isolated from an insect, a spider, and soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 54: p. 373-378, 1989.
- IM, D. J. ; LEE, M. H. ; AGUDA, R. M. ; ROMBACH, M. C. Effect of nutrients and pH on the growth and sporulation of four entomogenous hyphomycetes fungi (Deuteromycotina). *Korean Journal of Applied Entomology*, Suwon, 22 (1): p. 41-46, 1988.
- LOCH, L. C. Exigências nutricionais e ambientais do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e seu comportamento na presença de defensivos agrícolas. Piracicaba, 1978. 65p. (M.S.-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP)
- MAGALHÃES, B. P. ; LORD, J. C. ; WRAIGHT, S. P. ; DAUDST, R. A. ; ROBERTS, D. W. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Erynia radicans* aos predadores *Coleomegilla maculata* e *Eriopsis connexa*. Goiânia, Embrapa, 1986. 3p. (Pesquisa em andamento, 57).
- MANIANIA, N. K. & FARGES, J. Spécificité des Hyphomycètes Entomopathogènes pour les larves de Lepidoptères

Noctuidae. Entomophaga, Paris, 22(4): p. 451-464, 1984.

MANIANIA, W. K. & FARGES, J. Susceptibility of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to the fungal pathogens *Paecilomyces fumosõ-roseus* and *Nomuraea rileyi*. Florida Entomologist, Gainesville, 48 (1) : 178-183, Março. 1985.

MARQUES, E. J.; VILAS BOAS, A.M.; PEREIRA, C. E. F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomógeno *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) em laboratórios setoriais. Piracicaba, Planalsucar, 1981. 23p. 3(2), Bol. Técnico.

MCCABE, D. & SOPER, R. S. Preparation of an entomopathogenic fungal insect control agent. United States Patente 4.530.834, 1985.

MCCOY, C. W. ; SELHIME, A. G. ; KANAUEL, R. F. ; HILL, A. J. Suppression of citrus rust mite populations with application of fragmented mycelia of *Hirsutiella thompsonii*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 12: p. 270-276, 1971.

MCCOY, C. W. ; HILL, A. J. ; KANAUEL, R. F. Large-scale production of the fungal pathogen *Hirsutiella thompsonii* in submerged culture and its formulation for application in

- the field. *Entomophaga*, Paris, 20(3): p. 229-240, 1975.
- MELO, G. S. Controle biológica da broca da bananeira com o fungo entomógeno *Beauveria bassiana*. Recife, Mimeografado, 15p, 1983.
- MIELITZ, L. R. & SILVA, L. da. Patogenicidade do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Porto Alegre, 14(1): p. 67-73, 1985.
- MIELITZ, L. R. ; SOARES, C. M. S. ; LEÃO, L. L. C. Determinação do LC₅₀ de um isolado de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em *Anticarsia gemmatalis* Hubner 1818 Lepidoptera Noctuidae. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Porto Alegre, 17(1): p. 113-118, 1988.
- MOHAMED, A. K. A. ; BELL, J. V. ; SIKOROWSKI, P. P. Field cage tests with *Nomuraea rileyi* against corn earworm larvae on sweet corn. *Journal of Economic Entomology*, Menasha, 71 (1): p. 102-104, 1978.
- MOHAN, K. S. & PILLAI, G. B. A Method for Laboratory Scale Mass Cultivation of *Metarrhizium anisopliae*. *Folia Microbiol.*, Prague, 22: p. 281-283, 1982.

- MORROW, B. J. ; BOUCIAS, D. G. Comparative analysis of in vitro growth of the hyphal body and mycelial stage of entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 51: p. 197-206, 1988.
- MORROW, B. J. ; BOUCIAS, D. G. ; HEATH, M. A. Loss of virulence in an isolate of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* after serial in vitro passage. Journal of Economic Entomology, New York, 82(2): p. 404-407, 1989.
- NAHAS, E. & ARAI, N. N. S. Crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* em vários meios e condições de cultivo. Rev. de Microbiologia, São Paulo, 18(1): p. 77-88, 1987.
- PEREIRA, R. M. Dry micelium formulations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, with inclusion of ultraviolet-radiation protectants. Cornell, 1987. 98p. (M.s.- Faculty of the graduate school of Cornell University)
- PHADKE, C.H. & RAD, V. G. Studies on the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON I. Current Science, Bangalore, 42 (14): 511-512, Julho. 1978.

REBOCHO, D.D.E.. Normas Analíticas do Instituto Adolfo-Lutz. In: Coord. PREGNOLATTO, W; PREGNOLATTO, W. P. Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. 1985. 3^o Edição. São Paulo.

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

ROBERTS, D. W. & YENDOL, W. Use of fungi for Microbial Control of Insects and Mites. In: BURGESS, H. D. & HUSSEY, N. W., Eds. Microbial Control of Insects And Mites. London, Academic Press, 1971, p. 125-149.

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, 33(3): p. 315-324, 1988.

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

- SAMSINÁKOVÁ, A. ; KÁLALOVÁ, S. ; VLCEK, V. ; KYBAL, J.
Mass production of *Beauveria bassiana* for regulation of
Leptinotarsa decemlineata populations. *Journal of*
Invertebrate Pathology, New York, 32: p. 169-174, 1981.
- SAMSINÁKOVÁ, A. & KÁLALOVÁ, S. The influence of a single-
spore isolate and repeats subculturing on the
pathogenicity of conidia of the entomophagous fungus
Beauveria bassiana. *Journal of Invertebrate Pathology*,
New York, 42: p. 156-161, 1983.
- SILVA, L. & LOCH, L. C. Esporulação do fungo
entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em meio
de cultura à base de grãos de arroz polidos. *Anais da*
Socied. Entomológica do Brasil, Porto Alegre, 16(1): p.
213-220, 1987.
- SMITH, R. J. & GRULA, E. A. Nutricional requeriments for
conidial germination and hyphal growth of *Beauveria*
bassiana. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York,
32: p.222-230, 1981.
- SOPER, R. S. & WARD, M. G. Production, formulation and
application of fungi for insect control. In: PAPAIVIZAS,
G. C. , ed . *Biological Control in Crop Production*. New
York. Allanheld & Osmun Publis., 1981. Cap. 12, p.

161-179.

STIMAC, J. L.; ALVES, S. B. ; CAMARGO, M. T. V.
Suscetibilidade de *Solenopsis* spp. a diferentes espécies
de fungos entomopatogênicos. Anais da Soc. Entomológica
do Brasil, Porto Alegre, 16 (2): p.377-387, 1987.

STIMAC, J. L. ; ALVES, S. B. ; CAMARGO, M. T. V. Controle
de *Solenopsis* spp (Hymenoptera: Formicidae) com *Beauveria*
bassiana (Bals.) Vuill. em condições de laboratório e
campo. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Porto
Alegre, 19(1): p. 95-103, 1989.

THOMAS, K. C. ; KHACHATOURIANS, G. G. ; INGLEDEW, W. M.
Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia
cultivated in submerged culture. Canadian Journal of
Microbiology, Ottawa, 33: p. 12-20, 1987.

TONET, G. L. & REIS, E. M. Patogenicidade de *Beauveria*
bassiana em insetos-pragas da soja. Pesq. Agropec. Bras.,
Brasília, 14(1): p.89-95, 1979.

VILLACORTA, A. Técnica para cultura maciça do fungo
entomófago *Metarrhizium anisopliae* (Metch) em forma
granulada. Anais Soc. Entomológica do Brasil, Porto
Alegre, 5(1): p. 102-104, 1976.

WINKELHOFF, A. J. van & MCCOY, C. W. Conidiation of *Hirsutiella thompsonii* var. *symmetrifera* in submersed culture. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 43: p.54-68, 1984.