

PATOGENICIDADE DO FUNGO ENTOMOPATÓGENO *NOMURAEA RILEYI* (FARLOW) SAMSON APÓS SEIS ANOS DE ARMAZENAMENTO¹

LUCIANITA DA SILVA² e LUIZ CANICIO LOCH³

RESUMO – Lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae), de seis municípios, mortas, e recobertas por conídios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson foram colocadas dentro de cápsulas de gelatina. As cápsulas, dentro de vidros fechados contendo sílica, foram mantidas a -18°C, de 1984 a 1990. Os inóculos mantiveram-se viáveis e patogênicos até após este período.

Termos para indexação: *Anticarsia gemmatalis*, viabilidade, conservação de fungos, conídios, gelatina.

PATHOGENICITY OF *NOMURAEA RILEYI* (FARLOW) SAMSON STORED FOR SIX YEARS

ABSTRACT – Dead caterpillars of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep. Noctuidae) covered with spores of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson from six counties were maintained in jelly capsules and stored in capped glass containers with silica at the temperature of -18°C from 1984 to 1990. The isolates kept their viability and pathogenicity up to six years of storage.

Index terms: *Anticarsia gemmatalis*, viability, fungus conservation, conidia, gelatine.

INTRODUÇÃO

Os fatores temperatura e umidade são manipulados em diferentes técnicas de conservação de fungos, como, por exemplo, o congelamento em Nitrogênio líquido ou a manutenção em maio ágar a -20°C e a conservação em sílica-gel-anidra (Smith & Ward 1987). A formação rápida de gelo intracelular, durante o congelamento, segundo Morris et al. (1988), não foi letal para as vinte espécies de fungos testadas.

O fungo *Nomuraea rileyi* (farlow) Samson foi armazenado durante três meses, por Kish (1975), em temperaturas entre 5 e -16°C e ausência de umidade, e manteve sua patogenicidade sobre lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep. Noctuidae). Bell & Hamalle (1974) armazenaram

durante três anos os fungos *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles (= *N. rileyi*), *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em sílica, a -200°C. Eles se mantiveram viáveis e patogênicos. Para Balardin (1984), durante seis meses de armazenamento, o óleo mineral foi o que se mostrou mais eficaz na manutenção da viabilidade de esporos de *N. rileyi*, em comparação com a água e o solo.

Silva (1985) e Leão (1986) armazenaram lagartas de *A. gemmatalis* mortas e recobertas por esporos do fungo *N. rileyi*, em cápsulas de gelatina com procedência identificada. As cápsulas foram reunidas em vidros contendo sílica (CaCl₂), fechados com fita gomada e armazenados à temperatura de -18°C. Leão (1986) fez o primeiro teste da patogenicidade dos inóculos armazenados sete meses após o armazenamento, e obteve sucesso. Silva (1985) manteve os inóculos armazenados durante seis anos. O objetivo deste trabalho foi testar a viabilidade e patogenicidade dos fungos sobre lagartas de *A. gemmatalis*, juntamente com dois inóculos armazenados por Leão (1986).

¹ Aceito para publicação em 19 de fevereiro de 1993.

Trabalho apresentado no XII International Congress of Plant Protection. Rio de Janeiro, 1991.

² Eng.^o-Agr.^o, M.Sc., Fac. de Agron.-UFRGS, Bolsa CNPq/RHAE, Av. Bento Gonçalves 7712, CEP 91500 Porto Alegre, RS.

³ Eng.-Agr., Dr., Prof.-Titular, Fac. de Agron.-UFRGS

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados Londrina (LA), Caçapava do Sul (CS), Selbach (SE) e Passo Fundo (PF) haviam sido armazenados em janeiro de 1984, e os isolados Taquari (TAQ) e São Paulo das Missões (SPM) em julho de 1985, dentro de cápsulas de gelatina, conforme método descrito por Silva (1985) e Leão (1986) (Fig. 1).

Em agosto de 1990, as cápsulas armazenadas a -18°C desde 1984 e 1985 foram abertas, e os esporos, coletados com uma espátula de metal, foram depositados sobre o meio de cultura Sabouraud-maltose-água+1% de extrato de levedura + 0,001% de sulfato de estreptomicina (SMAY). Os esporos foram espalhados sobre o meio de cultura com uma alça de Drigalski,

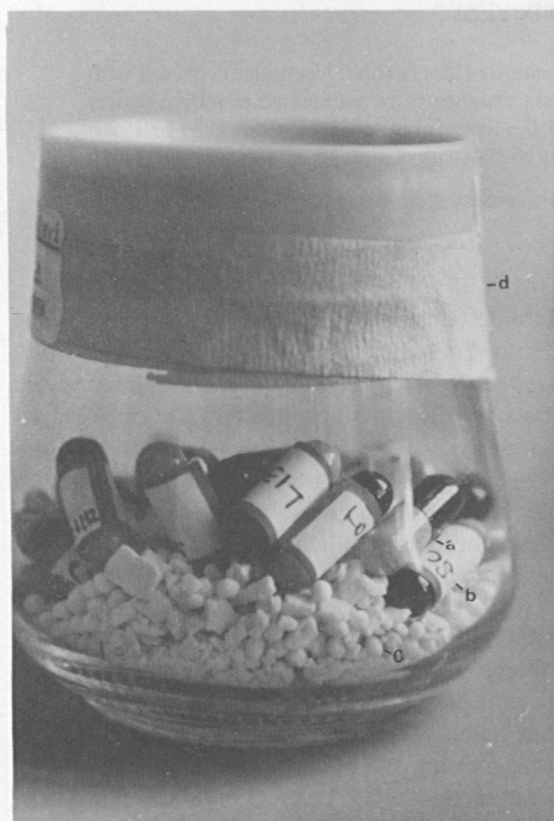


FIG. 1. Lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep. Noctuidae), recobertas com esporos de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson armazenadas a -18°C . a. cápsulas de gelatina com lagartas; b. identificação; c. sílica; d. vidros fechados. Lab. Fitopatologia-UFRGS. 1984 e 1990.

e as placas, mantidas em estufa BOD-FANEM sob regime de luz constante e temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A patogenicidade dos diferentes inóculos desenvolvidos sobre o meio SMAY foi testada através de um bioensaio com lagartas de *A. gemmatalis* de segundo e terceiro instar cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo).

Com um vazador de 0,6 cm de diâmetro, foram retirados sete círculos de cada um dos diferentes inóculos, e estes, misturados em 5 ml de água+Tween até a obtenção da suspensão dos inóculos, que foram de 10^8 esporos/ml.

Folhas de soja, previamente desinfetadas com Hipoclorito de sódio 2% durante 1 min., foram colocadas em placas-de-petri (9 cm de \varnothing), com um pedaço de algodão unedecido em água, na base do pedúnculo. Sobre cada folha foram depositados 0,2 ml de suspensão de esporos ou água e colocadas cinco lagartas. Após 24 horas em temperatura ambiente, as lagartas foram transferidas para recipientes de plástico (250 ml) contendo uma camada de 1 cm de espessura de dieta artificial (Hoffmann-Campo et al. 1985). Estes foram mantidos sob regime de quatorze horas de luz e dez horas de escuro a 25°C . Cada tratamento foi conduzido com 25 lagartas, cinco por recipiente.

Foram feitas avaliações diárias quanto ao número de lagartas mortas. Todas as lagartas mortas foram colocadas em câmara úmida, onde o desenvolvimento de esporos de *N. rileyi* foi estimulado.

Das lagartas mortas em cada tratamento foram sorteadas dez, das quais se transferiram os esporos para SMAY. O fungo desenvolvido foi identificado.

O número de lagartas mortas por *N. rileyi*, diariamente, após correção de mortalidade por Abbott, foi submetido ao programa "Sistema de Análise Estatística e Gráficos" (SAEG) para cálculo do tempo letal médio (TL_{50}), por análise de Regressão de Próbits. O TL_{50} calculado pelo método de Próbits apresenta um intervalo de confiança de 95%, sendo considerados para os cálculos dos dias necessários para causarem a mortalidade dos insetos e a mortalidade diária acumulada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os esporos de *N. rileyi* mantidos sobre cadáveres de lagartas de *A. gemmatalis*, onde foram produzidos e armazenados durante seis (isolados LA, CS, SE e PF) e cinco (isolados TAQ e SPM) anos, desenvolveram-se vegetativamente sobre o meio de cultura SMAY, onde, posteriormente, desen-

volveram-se massas de esporos. Confirmou-se, assim, a patogenicidade dos esporos de *N. rileyi* mantidos nas condições descritas anteriormente.

As lagartas de *A. gemmatalis* infectadas com conídios de *N. rileyi* originados dos inóculos armazenados durante cinco e seis anos, morreram por ação do fungo entomopatógeno. Os inóculos PF, CS, SE e TAQ causaram a morte de 96% das lagartas infectadas. Somente 4% foram mortas por outras causas, como na testemunha 2 (folhas com 0,2 ml de água). O inóculo LA chegou a causar 100% de mortes por *N. rileyi*. Além das testemunhas (100 e 96%), empuparam 4% das lagartas infectadas com SPM, sendo que 32% morreram por outras causas e apenas 64% por ação de *N. rileyi* (Tabela 1).

No bioensaio conduzido com lagartas de *A. gemmatalis*, os diferentes inóculos armazenados durante cinco e seis anos apresentaram um TL_{50} mínimo de 4,54 dias, e máximo, de 6,87 dias

(Tabela 2). O inóculo PF apresentou o menor TL_{50} (Fig. 2).

TABELA 1. Porcentagem de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae) mortas por ação dos esporos de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson provenientes do inóculo armazenado durante 5 e 6 anos.

Inóculos	Lagartas mortas (%)		Pupas (%)
	<i>N. rileyi</i>	Outras causas	
T1	0	0	100
T2	0	4	96
LA*	100	0	0
PF*	96	4	0
CS*	96	4	0
SE*	96	4	0
TAQ**	96	4	0
SPM**	64	32	4

* 6 anos de armazenamento

** 5 anos de armazenamento

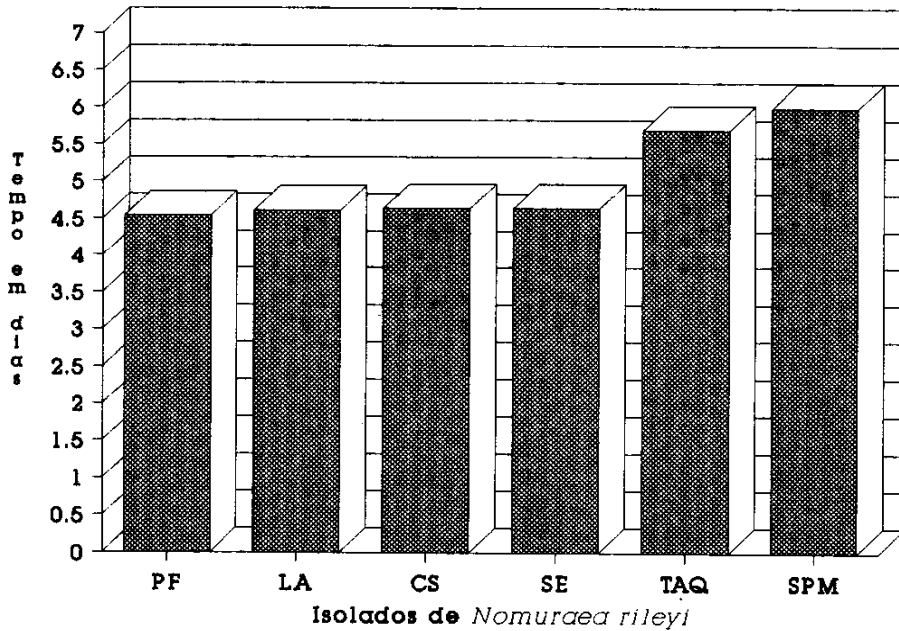


FIG. 2. Tempo Letal Médio para seis isolados de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, após armazenamento de 5 e 6 anos, em bioensaio com *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae). Lab. Fitopatologia, Faculdade de Agronomia-UFRGS. 1990.

TABELA 2. Tempo Letal Médio (TL₅₀) para lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae) infectadas com esporos de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson armazenados durante 5 e 6 anos.

Inóculo	TL ₅₀ (dias)	Intervalo de confiança (95%)		
		mínimo	-	máximo
PF*	4,54	4,20	-	4,91
LA*	4,61	4,28	-	4,89
CS*	4,64	4,34	-	4,93
SE*	4,64	4,38	-	4,89
TAQ**	5,69	5,29	-	6,02
SPM**	5,99	5,35	-	6,87

* 6 anos de armazenamento

** 5 anos de armazenamento

A viabilidade dos esporos armazenados foi comprovada pela sua germinação, formando-se colônias típicas de *N. rileyi*.

As lagartas que, após serem colocadas em câmara úmida, apresentaram desenvolvimento abundante de esporos com coloração verde-oliva, foram consideradas mortas por ação do fungo *N. rileyi*. Dez lagartas de cada tratamento tiveram os esporos isolados em meio SMAY, onde se desenvolveu o *N. rileyi*. Portanto, considera-se a esporulação de coloração verde-oliva, além de enrijecimento inicial do corpo e crescimento de micélio de coloração branca, como sinal da morte por ação do fungo *N. rileyi*. (Fig. 3)

Nas condições deste bioensaio, para qualificar os inóculos quanto ao desempenho em relação à morte das lagartas, são necessários outros bioensaios para confirmação dos dados.

CONCLUSÕES

1. É possível armazenar esporos de *N. rileyi* por um período de até seis anos, mantendo-se sua patogenicidade.



FIG. 3. Fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolado a partir das lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae) infectadas com o fungo armazenado 5 e 6 anos. a-conidióforos; b-fláides; c-conídios.

2. É possível manter um TL_{50} entre cinco e sete dias para esporos de *N. rileyi* armazenados após seis anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), pelas lagartas de *A. gemmatalis* cedidas para o bioensaio deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BALARDIN, R. S. Meios de cultura semi-sintéticos, agentes preservantes e rotina para produção massal do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Porto Alegre: Fac. de Agronomia - UFRGS, 1984. Tese de Mestrado.
- BELL, J. V.; HAMALLE, R. J. Viability and pathogenicity of entomogenous fungi after prolonged storage on silica gel at -20° . *Canadian Journal of Microbiology*, Stoneville, v.20. n.5, p.639-642, 1974.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B. de; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1985.
- KISH, L. P. The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Gainesville, USA: University of Florida, 1975. 80p. Tese Ph.D.
- LEÃO, L. L. C. Comportamento de cinco isolados de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson cultivados em laboratório. Porto Alegre: Fac. de Agronomia - UFRGS, 1986. Tese de Mestrado.
- MORRIS, G. J.; SMITH, D.; COULSON, G. E. A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi. *Journal of General Microbiology*, n.134, p.2897-2906, 1988.
- SILVA, L. da. Esporulação do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em meio de cultura à base de grãos de arroz. Porto Alegre: Fac. de Agronomia UFRGS, 1985. Tese de Mestrado.
- SMITH, D.; WARD, S. M. Notes of the preservation of fungi. London-UK: CAB International Mycological Institute, 1987.