

ANÁLISE DE PATOGENICIDADE E GERMINAÇÃO DO FUNGO *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON ISOLADO NO DISTRITO FEDERAL

Myrian S. Tigano-Milani¹, Marcos R. de Faria¹, Roberto E. Lecuona², Maria R. Sartori¹, Eugênio Y. Arima¹ e Beatriz M. Diaz²

ABSTRACT

Pathogenicity and Germination of the Fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Isolated in Brazilian Federal District

Monosporal isolates of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson were obtained in the region of Federal District (Brazil) from infected fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith) and velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Hueb.). They were collected in a same agricultural area, submitted to crop rotation (soybean/corn), in two consecutive seasons (1989/1990 and 1990/1991). Bioassays conducted with *S. frugiperda* showed that isolates obtained originally from this noctuid species were much more virulent (53.3 to 82.2% mortality), than those isolated from *A. gemmatilis* (11.1 to 26.7% mortality). The median lethal time (LT₅₀) of the isolates on *S. frugiperda* varied from 4.8 to 8.5 days. Values of median germination time (GT₅₀) on solid artificial media (SWAY) varied from 24h:31min to 36h:43min and from 37h:16min to 40h:59min for *A. gemmatilis* and *S. frugiperda* isolates, respectively. However, there was low correlation between LT₅₀ (r=-0,3848) or GT₅₀ (r=0,0762) and virulence of *S. frugiperda* isolates.

KEY WORDS: Insecta, entomopathogenic fungus, *Anticarsia gemmatilis*, *Spodoptera frugiperda*, genetic variability.

RESUMO

Culturas monospóricas de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson foram obtidas na região do Distrito Federal a partir de lagartas do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Smith), e de lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* (Hueb.), coletadas em uma mesma área de cultivo, submetida à rotação de culturas (soja/milho), durante duas safras agrícolas consecutivas (1989/1990 e 1990/1991). Em bioensaios conduzidos com lagartas de *S. frugiperda*, os isolados obtidos originalmente deste noctídeo apresentaram virulência significativa (53,3 a 82,2%), ao contrário daquelas isoladas de *A. gemmatilis* (11,1 a 26,7%). Os valores de tempo

Recebido em 04/01/94. Aceito em 06/02/95.

¹EMBRAPA/CENARGEN, Caixa postal 02372, 70849-970, Brasília, DF.

²IMYZA, CICA, INTA, Castelar, Casilla de correo 25, 1712 Castelar, Buenos Aires, Argentina.

letal médio (TL_{50}) para os isolados testados variaram de 4,8 a 8,5 dias. Na análise da velocidade de germinação de conídios em meio artificial sólido (SWAY), foram obtidos valores de tempo médio de germinação (TG_{50}) de 24h:31min a 336h:43min e de 37h:16min a 40h:59min para linhagens isoladas de *A. gemmatilis* e *S. frugiperda*, respectivamente. Entretanto, houve baixa correlação entre TL_{50} ($r=-0,3848$) ou TG_{50} ($r=0,0762$) com a virulência dos isolados obtidos de *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, fungo entomopatogênico, *Anticarsia gemmatilis*, *Spodoptera frugiperda*, variabilidade genética.

INTRODUÇÃO

Existem cerca de 30 espécies de lepidópteros já registradas como suscetíveis ao fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, com epizootias sobre lagartas verificadas em várias culturas, pastagens e plantas daninhas (Ignoffo et al. 1976). As lagartas da família Noctuidae estão entre as mais sensíveis a este patógeno, e sob certas condições ambientais este fungo é capaz de reduzir drasticamente populações destes insetos nos EUA, Brasil, Argentina e Austrália (Corrêa & Smith 1975, Carner 1980, Ignoffo 1981, Lecuona 1990).

A consistência de ocorrência e os altos índices de controle obtidos, fazem de *N. rileyi* um candidato promissor aos programas de manejo integrado de pragas. No Brasil, dentre os hospedeiros suscetíveis, destacam-se *Anticarsia gemmatilis* (Huebner) e *Spodoptera frugiperda* (Smith), pragas importantes das culturas de soja e milho, respectivamente (Kogan et al. 1977, Mielitz & Silva 1985). Isolados de *N. rileyi*, obtidos de diferentes hospedeiros e localidades, apresentam variabilidade no que se refere à especificidade e virulência (Ignoffo et al. 1976, Boucias et al. 1982, Maniania & Fargues 1985, Ignoffo & Boucias 1992, Moscardi et al. 1992). No entanto, nada se conhece sobre a relação entre isolados obtidos de populações epizooticas de *N. rileyi*. Na região Centro-Oeste do Brasil, este patógeno ocorre naturalmente infectando lagartas de *A. gemmatilis* (Faria et al. 1993) e *S. frugiperda* (Valicente 1989). Este trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética entre isolados de *N. rileyi* obtidos destes hospedeiros, na mesma área de plantio, em dois anos agrícolas consecutivos, na região do Distrito Federal.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem a Campo. Foram realizados levantamentos populacionais de *S. frugiperda* em cultivo de milho na safra 1989/1990, e de *A. gemmatilis* em cultivo de soja no ano agrícola 1990/1991, na mesma área de plantio, localizada em Planaltina - DF e submetida à rotação soja/milho. Demarcou-se uma área de amostragem de 1500 m² (30 x 50m) para levantamentos periódicos da incidência de *N. rileyi*. Para determinação do nível de infecção sobre a população de *S. frugiperda*, foram observadas em média 100 plantas com sinal de ataque da praga por data de amostragem. Para *A. gemmatilis*, avaliou-se, ao acaso, 10 pontos da área, utilizando-se o método do pano de batida. Em ambos os casos, as lagartas coletadas, quando vivas, foram levadas para o laboratório e mantidas individualizadas em dieta natural até se tornarem pupas. Observações diárias permitiram a determinação do número total de lagartas mortas pelo fungo *N. rileyi*.

Obtenção dos Isolados. Lagartas infectadas foram utilizadas para isolamento de culturas monospóricas de *N. rileyi*. Para cada hospedeiro, *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, foram selecionadas sete culturas monospóricas de lagartas diferentes, em cinco datas de amostragem.

Tabela 1. Origem dos isolados de *Nomurea rileyi* utilizados nos testes de patogenicidade e germinação.

Isolado	Hospedeiro	Data de coleta
CG 378	<i>Spodoptera frugiperda</i>	27/11/89
CG 379	<i>Spodoptera frugiperda</i>	22/12/89
CG 380	<i>Spodoptera frugiperda</i>	27/12/89
CG 381	<i>Spodoptera frugiperda</i>	27/12/89
CG 382	<i>Spodoptera frugiperda</i>	04/01/90
CG 383	<i>Spodoptera frugiperda</i>	04/01/90
CG 384	<i>Spodoptera frugiperda</i>	10/01/90
CG 385	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	23/01/91
CG 386	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	30/01/91
CG 387	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	30/01/91
CG 388	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	06/02/91
CG 389	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	06/02/91
CG 390	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	14/02/91
CG 391	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	20/02/91

(Tabela 1). O cultivo do fungo foi realizado em meio de cultura Sabouraud Maltose Agar com 1% de extrato de levedura (SWAY). Para o isolamento a partir da lagarta, adicionou-se 500 ppm de cloranfenicol ao meio.

Teste de Germinação de Conídios. Fez-se a inoculação de 50 µl de uma suspensão com 10⁶ conídios/ml de cada linhagem em placas de Petri contendo meio SWAY. As observações foram realizadas a cada duas horas sobre um total de 400 conídios (100 por repetição). Os dados de percentagem de germinação foram utilizados para o cálculo de TG₅₀ (tempo para germinação de 50% dos conídios) pelo método de Probit, e as diferenças entre as médias calculadas pelo teste de Duncan.

Teste de Patogenicidade. A partir de conídios obtidos em meio sólido, preparou-se uma suspensão com 10⁸ conídios/ml para cada linhagem ou mistura de linhagens. Vinte lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda* foram imersas em cada suspensão, durante 6 segundos. Realizou-se três repetições para cada tratamento, sendo as lagartas-testemunha imersas em água estéril. Após a inoculação as lagartas foram mantidas em recipientes individuais contendo dieta artificial. Nos três primeiros dias utilizou-se uma dieta sem produtos anti-fúngicos. Os resultados foram observados diariamente até o décimo quinto dia após a inoculação, sendo os insetos mortos colocados em câmara úmida para confirmação da micose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados sobre flutuação populacional de lagartas de *S. frugiperda* em cultura de milho no ano agrícola 89/90, bem como a incidência natural de *N. rileyi*, encontram-se na Fig. 1. O levantamento a campo foi iniciado em 20/12/89, quando a densidade populacional da praga já se encontrava elevada. No período analisado, o nível de infecção por *N. rileyi* no total de lagartas coletadas variou de aproximadamente 30 a 92%. Em outras regiões, como Minas Gerais (Valicente 1989), ou em outros países, como Colômbia e Estados Unidos (Gardner & Fuxa 1980, Ignoffo 1981), levantamentos populacionais mostraram que *N. rileyi* apresenta um comportamento enzoótico com relação à populações de *S. frugiperda* na cultura do milho. No entanto, para melhor avaliar a incidência de *N. rileyi* em populações de *S. frugiperda* no Distrito Federal, seria necessário a realização de amostragens mais completas durante todo o ciclo da cultura.

No mesmo campo de amostragem, avaliou-se no ano agrícola 90/91 a flutuação populacional de lagartas de *A. gemmatilis* em cultivo de soja, e a ocorrência de *N. rileyi* nessa população (Fig. 2). Os dados de lagartas infectadas representados neste gráfico não correspondem a uma curva epizootica clássica, conforme já observado anteriormente em outra área da mesma região (Faria et al. 1993). A ação de *N. rileyi* provocou a mortalidade de 88% das lagartas em 06/02/91, após o primeiro pico populacional. As lagartas remanescentes levaram a um

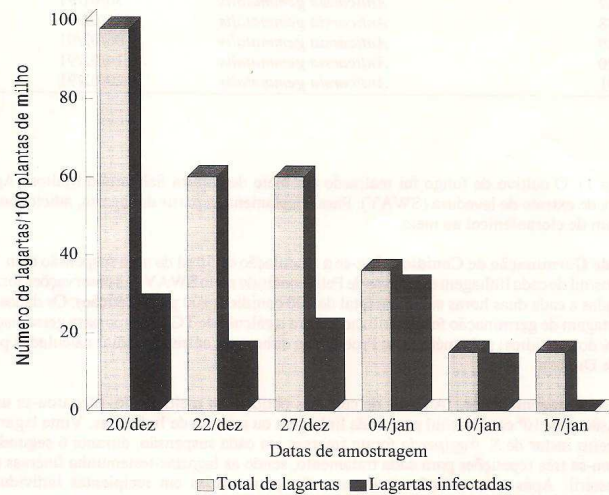


Figura 1. Incidência de *Nomuraea rileyi* em *Spodoptera frugiperda*, Planaltina, DF, 1989/1990.

segundo pico populacional (20/02/91), e da mesma forma que anteriormente, houve uma ação retardada do patógeno. A ocorrência tardia de *N. rileyi* em populações de *A. gemmatalis* já foi observada com frequência em culturas de soja nos Estados Unidos (Fuxa 1974, Ignoffo *et al.* 1975, Kish & Allen 1978).

Catorze isolados obtidos desses levantamentos, quando avaliados com relação à virulência contra lagartas de *S. frugiperda*, mostraram que aqueles originalmente isolados de *S. frugiperda* foram mais virulentos contra o hospedeiro de origem (53,3 a 82,2%) que a maioria dos isolados obtidos originalmente de *A. gemmatalis* (11,1 a 26,7%). O isolado CG 385 (84,4%), obtido no início da ocorrência de *N. rileyi* em lagartas da soja (Tabelas 1 e 2), foi o único que se mostrou virulento ao hospedeiro heterólogo. Esses dados sugerem que os isolados que infectaram *S. frugiperda* na mesma área no ano anterior, podem ter iniciado o foco de infecção na população de *A. gemmatalis*. A variabilidade observada quanto à virulência entre isolados obtidos em diferentes fases epizooticas ficou também muito evidente quando se estimou o TL₅₀, que variou de 4,8 a 8,5 dias para os isolados obtidos de *S. frugiperda* contra

Tabela 2. Germinação e patogenicidade de *Nomuraea rileyi* isolado na região do Distrito Federal.

Isolado	TG 50 (h:min) ¹	Mortalidade de <i>S. frugiperda</i> (%) ²	TL 50 (dias) ³
CG 378	38:38 C	75,50	8,02
CG 379	40:59 A	73,33	8,35
CG 380	39:49 B	82,22	8,07
CG 381	37:34 DE	77,77	4,77
CG 382	37:16 DE	77,77	7,22
CG 383	37:40 DE	80,00	8,00
CG 384	37:59 CD	53,33	7,43
CG 385	35:43 F	84,44	8,52
CG 386	34:20 G	20,00	-
CG 387	35:27 F	26,67	-
CG 388	31:31 H	17,78	-
CG 389	24:31 J	13,33	-
CG 390	36:43 E	17,78	-
CG 391	25:45 I	11,11	-
Mistura a ⁴	-	84,00	-
Mistura b ⁵	-	33,33	-

¹Tempo para germinação de 50% dos conídios em meio sólido SWAY, calculado sobre um total de 400 conídios. Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

²Percentagem de infecção confirmada pelo fungo, calculada sobre 60 lagartas do 3º instar.

³Tempo para morte de 50% das lagartas.

⁴Mistura dos isolados obtidos de *S. frugiperda* (CG 378 a CG 384).

⁵Mistura dos isolados obtidos de *A. gemmatalis* (CG 385 a CG 391).

o inseto de origem. No entanto esses valores não se correlacionaram significativamente com os índices de infecção observados ($r=0,3848$). A virulência diferenciada observada com relação ao hospedeiro de origem confirma resultados anteriores, que demonstram a especificidade de *N. rileyi* em isolados obtidos de locais diferentes. Moscardi *et al.* (1992) encontraram grande especificidade de três isolados de *N. rileyi* sobre seus hospedeiros originais (*A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *Pseudoplusia includens* Walker), e reduzida atividade sobre as outras espécies. Assim como Boucias *et al.* (1982) e Ferraz *et al.* (1991) mostraram que

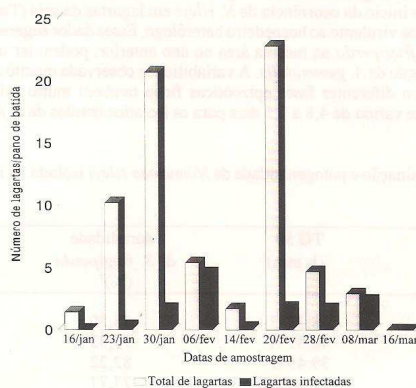


Figura 2. Incidência de *Nomuraea rileyi* em *Anticarsia gemmatalis*, Planaltina, DF, 1990/1991. O número de lagartas por pano de batida correspondente à média em 10 batidas.

isolados virulentos a *A. gemmatalis* não causam mortalidade significativa em *S. frugiperda*, e vice-versa.

A mistura de isolados obtidos de *S. frugiperda* (mistura a, Tabela 2) mostrou resultados semelhantes aos obtidos com cada isolado separadamente (84,0%). Conforme esperado, a mistura de isolados obtidos originalmente de *A. gemmatalis* (mistura b, Tabela 2) provocou reduzida mortalidade em *S. frugiperda* (33,3%), apesar da presença do isolado CG 385, que quando analisado individualmente apresentou alta virulência (Tabela 2).

A análise de uma outra característica biológica, velocidade de germinação em meio de cultura sólido (SWAY), mostrou variação entre isolados, mesmo os obtidos de uma mesma população de hospedeiro (Tabela 2). O tempo para germinação de 50% dos conídios (TG50) variou de 24:31 a 36:43 e 37:16 a 40:59 h:min para os isolados de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, respectivamente, indicando uma maior habilidade de germinação dos primeiros. A velocidade de germinação "in vitro" dos isolados de *N. rileyi* obtidos de *S. frugiperda* não correlacionou-se com a virulência dos mesmos ($r=0,0762$), ao contrário do que foi observado com isolados de *Verticillium lecanii* (Hall 1984) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. (Samuels *et al.* 1989) em outros hospedeiros.

Neste estudo, a análise da patogenicidade e da velocidade de germinação "in vitro" dos isolados de *N. rileyi* de uma mesma área de cultivo, mostrou a existência de variabilidade genética entre isolados obtidos de uma mesma população de hospedeiro, sobretudo, entre isolados obtidos de hospedeiros que se sucedem numa mesma área agrícola. No entanto, para melhor avaliar a relação entre isolados de populações de *N. rileyi*, assim como a relação patógeno-hospedeiro, outras características mais simples de serem analisadas deveriam ser avaliadas. Resultados obtidos com isoenzimas (Joslyn & Boucias 1981, dados não publicados), demonstraram que esses marcadores são pouco polimórficos para essa espécie, dificultando assim a diferenciação de isolados próximos como os encontrados em uma população. Entretanto, marcadores moleculares estão atualmente sendo analisados em isolados de *N. rileyi*, empregando-se técnicas rápidas e simples que permitiram a detecção de variabilidade genética de outros fungos entomopatogênicos (Fegan *et al.* 1993, Tigano-Milani *et al.* 1995).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Heloísa S. Frazão e a Irene Martins pelo apoio na condução dos experimentos, ao Dr. Bonifácio Magalhães e a Edison Sujii pela revisão do manuscrito, e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

LITERATURA CITADA

- Boucias, D.G., E.A. Schoborg & G.E. Allen. 1982. The relative susceptibility of six noctuid species to infection by *Nomuraea rileyi* isolated from *Anticarsia gemmatilis*. J. Invertebr. Pathol. 39: 238-240.
- Carner, G.R. 1980. Sampling pathogens of soybean insect pests, p.559-574. In M. Kogan & D.C. Herzog (eds.), Sampling methods in soybean entomology. New York, Springer-Verlag, 587p.
- Corrêa, B.S. & J.G. Smith. 1975. *Nomuraea rileyi* attacking the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hubner, in Paraná. Fla. Entomol. 58: 280.
- Faria, M.R. de, M.S. Tigano-Milani & R.E. Lecuona. 1993. Incidência natural de *Nomuraea rileyi* Farlow em população de *Anticarsia gemmatilis* Hubner no Distrito Federal. An. Soc. Entomol. Brasil 22: 385-388.
- Fegan, M., J.M. Manners, D.J. Maclean, J.A.G. Irwin, K.D.Z. Samuels, D.G. Holdom & D.O. Li. 1993. Random amplified polymorphic DNA marks reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. J. Gen. Microbiol. 139: 2075-2081.
- Ferraz, J.M.G., P.M. Patel & M.E.M. Habib. 1991. Cross infection of *Nomuraea rileyi* isolated from *Spodoptera frugiperda* and *Anticarsia gemmatilis*. In Abstracts International Plant Protection Congress, 12, Rio de Janeiro.
- Fuxa, J.R. 1974. Dispersion and spread of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Moniliales: Moniliaceae) in a soybean field. Environ. Entomol. 13: 252-258.
- Gardner, W.A. & J.R. Fuxa. 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. Fla. Entomol. 63: 439-447.
- Hall, R.A. 1984. Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus *Verticillium*

- lecanii*. Entomophaga 29: 311-321.
- Ignoffo, C.M. 1981.** The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide, p.513-538. In H.D. Burgess (ed.), Microbial control of pests and plant diseases: 1970-1980. London, Academic Press, 949p.
- Ignoffo, C.M., B. Puttler, N.L. Marston, D.L. Hostetter & W.A. Dickerson. 1975.** Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria rileyi* associated with noctuid pests of soybeans. J. Invertebr. Pathol. 25: 135-137.
- Ignoffo, C.M., B. Puttler, D.L. Hostetter & W.A. Dickerson. 1976.** Susceptibility of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, to several isolates of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 28: 259-262.
- Ignoffo, C.M. & D.G. Boucias. 1992.** Relative activity of geographical isolates of *Nomuraea* bioassayed against the cabbage looper and velvetbean caterpillar. J. Invertebr. Pathol. 59: 215-217.
- Joslyn, D.J. & D.G. Boucias. 1981.** Isozyme differentiation among three pathotypes of the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. Can. J. Microbiol. 27: 364-366.
- Kish, L.P. & G.E. Allen. 1978.** The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatilis* in soybean. Univ. Fla. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. 795: 1-58.
- Kogan, M., S.G. Turnipseed, M. Shepard, E.B. de Oliveira & A. Borgo. 1977.** Pilot insect pest management program for soybean in southern Brazil. J. Econ. Entomol. 70: 659-663.
- Lecuona, R.E. 1990.** El control microbiano como regulador poblacional de insectos plagas. INTA. Serie Agricultura Sostenible 4, 24p.
- Maniania, N.K. & J. Fargues. 1985.** Susceptibility of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to the fungal pathogens *Paecilomyces fumoso-roseus* and *Nomuraea rileyi*. Fla Entomol. 68: 178-183.
- Mielitz, L.R. & L. da Silva. 1985.** Patogenicidade do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). An. Soc. Entomol. Brasil 14: 67-73.
- Moscardi, F., J.G. Kastelic & D.R. Sosa Gómez. 1992.** Suscetibilidade de três espécies de lepidópteros associados à soja a três isolados do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. An. Soc. Entomol. Brasil 21: 93-100.
- Samuels, K.D.Z., J.B. Heale & M. Llewellyn. 1989.** Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. J. Invertebr. Pathol. 53: 25-31.
- Tigano-Milani, M.S., R.A. Samson, I. Martins & B.W.S. Sobral. 1995.** DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. Microbiology 141: 000-000.
- Valicente, F.H. 1989.** Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. An. Soc. Entomol. Brasil 18: 119-130.