

MEIOS DE CULTURA SEMI-SINTÉTICOS PARA PRODUÇÃO MASSAL DO FUNGO *NOMURAEA RILEYI*¹

RICARDO SILVEIRO BALARDIN e LUIZ CANICIO LOCH³

RESUMO - Foram conduzidos quatro experimentos na Faculdade de Agronomia/UFRGS, em 1983, com o objetivo de desenvolver meios de cultura semi-sintéticos para produção massal do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Foram testados os meios de cultura cenoura-malte-ágar (CMA), aveia-malte-ágar (AMA), tomate-malte-ágar (TMA), batata-dextrose-ágar (BDA modificado) e sabouraud-maltose-ágar mais extrato de levedura (SMAY), utilizando-se os isolados Passo Fundo, Camaquã e Londrina. Em todos os meios de cultura foram estudados o efeito de níveis de pH, período de incubação, quantidade de extrato vegetal, de farinha de cevada maltada e tempo de esterilização, sobre a esporulação dos isolados do fungo. Foi possível observar diferenças na esporulação dos isolados utilizados, sendo que os meios de cultura CMA e AMA mostraram-se aptos à esporulação de *N. rileyi*. Níveis de pH próximo a 7,0 favoreceram o crescimento dos isolados Passo Fundo e Camaquã. Após 14 e 17 dias de incubação, AMA e CMA não permitiram incrementos significativos, respectivamente na esporulação do fungo. O ajustamento dos componentes de CMA indicou com ótimos, para esporulação do isolado Londrina, os níveis de 340 ml/l de extrato de cenoura, 22 g/l de cevada maltada e de 12 min no tempo de esterilização.

Termos para indexação: fungo entomógeno, cenoura-malte-ágar, aveia-malte-ágar.

SEMISYNTHETIC CULTURE MEDIA FOR *NOMURAEA RILEYI* MASSAL PRODUCTION

ABSTRACT - During 1983, four experiments were carried out at the Agricultural School/UFRGS, in Porto Alegre, RS, Brazil, in order to test semisynthetic culture media for massal spore production by the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. The carrot-malt-agar (CMA), oats-malt-agar (OMA), tomato-malt-agar (TMA), potato-dextrose-agar (modified PDA) and Sabouraud-maltose-agar plus yeast extract (SMAY) culture media were associated for the Passo Fundo, Camaquã and Londrina isolates of *N. rileyi*. pH levels of the media, incubation time, plant extract and malt meal amount were studied and the effects on sporulation determined. Differences in the amount of sporulation were observed among the isolates. CMA and OMA were effective sporulation media for *N. rileyi*. pH levels near 7,0 enhanced growth of Passo Fundo and Camaquã isolates of the fungus. After 14 and 17 days of incubation, OMA and CMA did not favour significant increases in the fungus sporulation. *N. rileyi* grew well on AMA and CMA. The best combination components of CMA for sporulation of Londrina isolate was as follows: 340 ml/l of carrot extract, 22 g/l of malt meal and 12 min of sterilization.

Index terms: entomogenous fungus, carrot-malt-agar, oats-malt-agar.

INTRODUÇÃO

A aplicação de inseticidas de largo espectro de ação representa uma constante ameaça à vida dos animais e do homem, com danos incalculáveis ao ambiente. Por outro lado, esta estratégia de ação tem induzido o fenômeno do ressurgimento. Têm-se estudado alternativas biológicas para controle de pragas, destacando-se, em particular, o fungo

entomógeno *Nomuraea rileyi*. Sua utilização isolada em programas de controle biológico de pragas é restringida pela incapacidade do homem de controlar os fatores ambientais, argumentam Kish & Allen (1976). De fato, um complexo conjunto de eventos meteorológicos é necessário para que o fungo atinja proporções epizooticas. Entretanto, segundo estes autores, o alto grau de controle das populações de insetos e o nível de ocorrência em condições favoráveis de ambiente qualificam este fungo como promissor em programas de controle integrado de pragas. Entre os inúmeros aspectos a considerar, no desenvolvimento de uma rotina de produção massal de inóculo, o fator nutricional do fungo é preponderante. Diversos estudos sobre as exigências nutricionais de *Nomuraea rileyi* apontam Sabouraud-maltose-ágar mais 1% de ex-

¹ Aceito para publicação em 22 de dezembro de 1988. Parte da dissertação apresentada pelo primeiro autor para obtenção do grau de Mestre em Agronomia pela Fac. de Agron., UFRGS.

² Eng. - Agr., M.Sc., Dep. de Defesa Fitossanitária, Campus Camobi, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), CEP 97119 Santa Maria, RS.

³ Eng. - Agr., Dr., Fac. de Agron., UFRGS, CEP 90000 Porto Alegre, RS.

trato de levedura (Bell 1975) como o mais adequado ao seu crescimento, e o extrato de levedura parece exercer efeito pronunciado na esporulação do fungo. Loch (1978) observou um condicionamento do regime de luz à capacidade nutritiva dos meios de cultura, pois com 8 g/l de extrato de levedura a esporulação do fungo ocorreu sob qualquer regime luminoso e, em valores inferiores, apenas em regime de luz contínua.

Neste trabalho, procurou-se avaliar o comportamento dos isolados Passo Fundo, Camaquã e Londrina do fungo *N. rileyi* quando cultivados em meios de cultura semi-sintéticos de baixo custo e alternativos a SMAY. Neste sentido, testaram-se diferentes níveis de pH, períodos de incubação, e o ajustamento dos componentes destes meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

No ano de 1983 foram conduzidos quatro experimentos, em laboratório, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, em Porto Alegre, com o objetivo de desenvolver meios de cultura para cultivo do fungo entomógeno *N. rileyi*. O inóculo utilizado foi obtido de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lep., Noctuidae), isolados Passo Fundo e Camaquã, e *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) isolado de Londrina. O cultivo do fungo foi feito em recipientes cilíndricos de vidro, diâmetro de 5,5 cm, altura de 7,0 cm, com capacidade para 136 ml, referenciado no decorrer deste trabalho como frascos de cultivo. Os meios de cultura foram colocados nos frascos de cultivo antes da esterilização, dispensando o processo de plaqueamento e aumentando a assepsia do método. Suas tampas de metal foram perfuradas para permitir o preparo, coleta e inoculação das suspensões de inóculo, através de uma seringa com graduação milimétrica, sem a necessidade de abri-los. Para preparação da suspensão ou remoção de inóculo, adicionou-se uma alíquota de água mais Tween 80 em um frasco de cultivo com cultura pura do fungo. Tanto para remover o inóculo como para uniformizá-lo sobre o meio de cultura, os frascos de cultivo foram submetidos a uma agitação linear. Por ocasião das avaliações dos experimentos, os períodos de agitação, intercalados por uma hora de repouso, foram fixados em 10 min. Os meios de cultura utilizados e sua composição/litro foram: Sabouraud-maltose-ágar mais extrato de levedura (SMAY) - maltose 4%, neopeptona 1%, extrato de levedura 1% e ágar 1,5%; batata-dextrose-ágar mais extrato de levedura (BDA modificado), extrato de batata 25%, dextrose, 2%, ágar 1,5% e extrato de levedura 1%; aveia-malte-ágar mais extrato de levedura (AMA) - extrato de aveia 25%, extrato de levedura 1%, farinha de cevada maltada 3% e ágar 15%; cenoura-malte-ágar mais extrato de levedura (CMA) -

extrato de cenoura 25%, farinha de cevada maltada 3% e ágar 1,5% e extrato de levedura 1%; tomate-malte-ágar mais extrato de levedura (TMA) - extrato de tomate 25%, farinha de cevada maltada 3%, extrato de levedura 1%, ágar 1,5% e CaCO₃ 0,45%. A quantidade de meio de cultura em cada frasco foi de 13 ml, e o tempo de esterilização dez minutos, à temperatura de 121°C. Em todos os meios de cultura foram utilizadas 50 a 100 ppm de sulfato de estreptomicina. Em todos os experimentos inoculou-se uma suspensão com 10⁶ esporos/ml. A avaliação destes esporos foi feita após 14 dias de inoculação, exceto no experimento em que este era o fator estudado. Coletou-se 1 ml da suspensão de inóculo preparada, em cada frasco de cultivo, para ser contado o número de esporos/ml da suspensão em Câmara de Neubauer.

No primeiro experimento, estudou-se a esporulação dos isolados Passo Fundo e Camaquã, ambos com três repicagens, sobre os meios em estudo; no segundo, corrigiu-se o pH desses meios para 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0, determinando-se a esporulação dos mesmos isolados, com sete repicagens; no terceiro, determinou-se o período ótimo de incubação para o isolado Londrina, com duas repicagens, em cada um dos meios de cultura, considerando-se períodos de 8, 11, 14, 17 e 20 dias; finalmente, utilizando o isolado Londrina com uma repicagem, buscou-se uma melhor combinação dos meios de cultura através do Delineamento Central Composto, estudando-se os seguintes fatores: extrato de batata, aveia, cenoura e tomate/l de meio (50, 250, 350, e 450 ml); farinha de cevada maltada/l de meio (10, 20, 30, 40 e 50 g) e tempo de esterilização (5, 10, 15, 20 e 25 min.), cuja combinação de tratamentos obedeceu à seqüência proposta pelo Delineamento de Superfície de Resposta. Para ajustamento do BDA modificado, substituiu-se a farinha de cevada maltada por extrato de levedura (0, 5, 10, 15 e 20 g).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esporulação de *Nomuraea rileyi*, isolados Passo Fundo e Camaquã, cultivados sobre meios de cultura semi-sintéticos e SMAY.

A análise das observações experimentais mostrou que a esporulação diferiu significativamente, entre os isolados, quando cultivados sobre os meios de cultura testados. Verifica-se, na Tabela 1, que a esporulação do isolado Passo Fundo sobre BDA modificado, CMA e TMA não diferiu da esporulação sobre SMAY, que foi a mais elevada, enquanto o isolado Camaquã apresentou a maior esporulação sobre TMA e AMA, e a menor, sobre SMAY.

Deve-se considerar o fato de os meios de cultura apresentarem faixas-limites para esporula-

TABELA 1. Esporulação de *Nomurnea rileyi*, isolados Passo Fundo e Camaquã, cultivados em meios de cultura semi-sintéticos e SMAY. Porto Alegre, julho de 1984.

Meios de cultura	Número de esporos ($\times 10^6$) produzidos por frasco de cultivo* dos isolados com a procedência indicada em 14 dias de incubação	
	Passo Fundo	Camaquã
SMAY	a 12.382,50 a	b 121,95 c
BDA modificado	a 6.921,00 ab	b 2.477,25 b
AMA	a 4.273,50 b	a 4.023,00 ab
CMA	a 11.242,50 ab	b 1.986,75 b
TMA	a 7.327,50 ab	a 7.024,50 a

CV = 11,01%.

Médias precedidas de mesma letra (linha) e seguidas de mesma letra (coluna) não diferem significativamente ($P > 0,05$) pelo teste de Duncan.

* Os dados representam a média de três repetições.

ção dos organismos, provavelmente em decorrência da rapidez de esgotamento da sua capacidade nutritiva, bem como possível inadequação de suas fontes nutritivas. Várias evidências experimentais nortearam o estabelecimento das formulações dos meios de cultura semi-sintéticos. Rangel (1940) observou que os fungos teriam preferência por meios ricos em carboidratos; Lilly & Barnett (1951) verificaram que a inclusão de compostos naturais, entre outros, poderiam influenciar a esporulação de alguns fungos; Ignoffo et al. (1976) utilizaram, satisfatoriamente, Sabouraud-maltose-ágar mais 1% de extrato de levedura para cultivos de *Nomuraea rileyi*; Barnes et al. (1975) verificaram que o extrato de levedura, quando comparado com diferentes fontes de peptona, permitiu a melhor esporulação de vários fungos entomógenos.

Efeito de níveis de pH nos meios de cultura semi-sintéticos e SMAY sobre a esporulação de *Nomuraea rileyi*, isolados Passo Fundo e Camaquã

A esporulação do isolado Camaquã foi significativamente superior à do isolado Passo Fundo, conforme mostrado na Tabela 2, observando-se um comportamento distinto entre os isolados, confirmando os resultados do primeiro experimento.

SMAY e BDA modificado permitiram maior esporulação do isolado Passo Fundo em pH 6,0 e 7,0, respectivamente. Por outro lado, AMA com pH 6,0 e 7,0 e SMAY com pH 7,0 favoreceram o isolado Camaquã. Em todos os níveis de pH, TMA apresentou-se favorável a este isolado. Quando os isolados foram cultivados sobre CMA, não houve diferenças significativas quanto à esporulação, sendo que o isolado Passo Fundo mostrou maior produção de esporos no intervalo de pH 6,0 e 7,0 e o isolado Camaquã, no intervalo de pH 5,5 a 6,5.

Lilly & Barnett (1951) observaram que variações no pH dos substratos influenciam diretamente o comportamento dos fungos; Tuite (1969) verificou que o pH em torno de 6,0 favoreceu o processo de dissolução dos sais minerais, sendo que as alterações nestes níveis podem propiciar a precipitação destes sais.

A utilização de uma maior amplitude nos níveis de pH poderia indicar os limites a partir dos quais haveria um prejuízo efetivo da esporulação dos isolados.

Efeito de períodos de incubação sobre a esporulação de *Nomuraea rileyi*, isolado Londrina, cultivado sobre os meios de cultura semi-sintéticos e SMAY

O isolado atingiu mais rapidamente o período ótimo de incubação sobre CMA, em torno de 17 dias, a partir do que, ocorrem apenas incrementos decrescentes na esporulação do fungo; com relação à AMA, o isolado apresentou esporulações crescentes até 20 dias de incubação, conforme é mostrado na Tabela 3. Estes resultados podem indicar diferenças na capacidade nutritiva dos meios de cultura, comprovando o fato de que, a partir de um determinado período de tempo, o fungo não mais aumentaria significativamente sua esporulação.

Loch (1978), em experimentos que trataram da interação entre dias de incubação e dosagens de extrato de levedura, observou que ao aumentar-se a dosagem do extrato ocorria maior esporulação do fungo durante um maior período de incubação, mostrando que aumentos na capacidade nutritiva do meio de cultura prolongam o período de crescimento e esporulação do fungo.

TABELA 2. Efeito de níveis de pH nos meios de cultura semi-sintéticos e SMAY sobre a esporulação de *Nomuraea rileyi*, isolados Passo Fundo e Camaquã. Porto Alegre, julho de 1984.

Meios de cultura	Número de esporos ($\times 10^6$) produzidos por frascos de cultivo* dos isolados Passo Fundo e Camaquã, nos níveis de pH indicados com 14 dias de incubação							
	Passo Fundo				Camaquã			
	5,5	6,0	6,5	7,0	5,5	6,0	6,5	7,0
SMAY	a 47,0 d	a 77,5 c	ab 32,5 c	a 7,5 d	b 65,0 b	ab 67,5 c	b 22,5 c	a 100,0 c
BDA modificado	ab 6707,0 a	b 1389,0 ab	a 5358,7 a	ab 8102,0 a	a 2297,0 a	a 1262,0 b	a 842,0 b	a 1557,0 b
AMA	a 2317,0 ab	a 3077,5 a	a 662,5 b	a 837,5 b	a 3357,5 a	a 11262,5 a	a 5977,5 a	a 14680,0 a
CMA	bc 795,0 bc	b 1810,0 a	a 5242,5 a	a 2775,0 a	a 981,2 a	a 3915,0 ab	a 2205,0 ab	a 1015,0 b
TMA	a 165,0 cd	a 195,0 bc	a 117,5 c	a 72,5 c	a 1152,5 a	a 1310,0 b	a 750,8 b	a 1177,5 b

CV = 15,62%.

Médias precedidas da mesma letra (linha) e seguidas de mesma letra (coluna) não diferem significativamente ($P > 0,05$) pelo teste de Duncan.

* Os dados representam a média de três repetições.

TABELA 3. Efeito de períodos de incubação sobre a esporulação de *Nomuraea rileyi*, isolado Londrina, cultivado sobre os meios de cultura semi-sintéticos e SMAY. Porto Alegre, julho de 1984.

Meios de cultura	Número de esporos ($\times 10^6$) produzido por frasco de cultivo* nos períodos de incubação indicados (dias)				
	8	11	14	17	20
SMAY	d 21,50 b	c 106,50 b	b 407,50 b	b 1065,00 b	a 12297,50 a
BDA modificado	d 1,50 c	c 4,50 c	c 11,00 c	b 37,50 d	a 142,50 c
AMA	c 1010,50 a	b 2792,50 a	ab 4915,00 a	ab 6499,50 a	a 10442,50 a
CMA	d 1050,00 c	c 2982,50 a	bc 5635,00 a	ab 12592,50 a	a 16757,50 a
TMA	C 67,50 b	c 72,50 b	b 262,50 b	b 252,50 c	a 1620,00 b

CV = 8,68%.

Médias precedidas de mesma letra (linha) e seguidas de mesma letra (coluna) não diferem significativamente ($P > 0,05$) pelo teste de Duncan.

* Os dados representam a média de três repetições.

Ajustamento dos meios de cultura semi-sintéticos para cultivo de *Nomuraea rileyi*, isolado Londrina

A análise dos dados obtidos mostrou que a regressão foi significativa apenas para CMA (Tabelas 4, 5 e 6). Os resultados obtidos mostram que a combinação ótima dos fatores estudados foi: 340 ml/l de extrato de cenoura, 22 g/l de farinha de cevada maltada e 12 min. de esterilização. Acréscimos na quantidade de extrato de cenoura a partir de 340 ml/l aumentaram a esporulação do fungo, ao passo que abaixo desta quantidade ela foi reduzida.

Variações a mais ou a menos no tempo de esterilização a partir de 12 min, para qualquer quantidade de farinha de cevada maltada, aumentaram a esporulação do fungo. Considerando os efeitos da autoclavagem sobre os constituintes do meio de cultura (Tuite 1969), torna-se preferível a utilização de tempos de esterilização inferiores a 12 min. Por outro lado, a utilização combinada da farinha de cevada maltada acima de 22 g/l e de extrato de cenoura acima de 340 ml/l maximizou a esporulação do fungo.

TABELA 4. Ajustamento dos fatores de CMA para esporulação de *Nomuraea rileyi*, isolado Londrina. Porto Alegre, julho de 1984.

X ₁	X ₂	Número de esporos produzidos (X.10 ⁶) por frasco de cultivo				
		X ₃				
		5	10	15	20	25
	10	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-
50	30	-	-	13	-	-
	40	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	20	-	195	-	109	-
150	30	-	-	-	-	-
	40	-	935	-	176	-
	50	-	-	-	-	-
	10	-	-	800	-	-
	20	-	-	-	-	-

TABELA 4. Continuação.

X ₁	X ₂	Número de esporos produzidos (X.10 ⁶) por frasco de cultivo				
		X ₃				
		5	10	15	20	25
250	30	4.905	-	1.248*	-	4.670
	40	-	-	-	-	-
	50	-	-	13.554	-	-
	10	-	-	-	-	-
	20	-	1.200	-	3.040	-
350	30	-	-	-	-	-
	40	-	1.665	-	8.745	-
	50	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-
450	30	-	-	4.365	-	-
	40	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-

* Médias de seis repetições.

X₁ - extrato de cenoura (ml/l).

X₂ - farinha de cevada maltada (g/l).

X₃ - Tempo de esterilização (min.).

TABELA 5. Determinação da combinação ótima dos fatores de CMA, para esporulação de *Nomuraea rileyi*, isolado Londrina.

$$\hat{Y} = 27995,74 - 46,40733 X_1 - 924,133 X_2 - 1718,666 X_3 + 0,0067784 X_1^2 + 13,13659 X_2^2 + 28,69636 X_3^2 + 0,670375 X_1 X_2 + 11,41750 X_2 X_3 + 2,44125 X_1 X_3$$

$$\frac{\partial \hat{Y}}{\partial X_1} = -46,40733 + 0,013568 X_1 + 0,670375 X_2 + 2,44125 X_3$$

$$\frac{\partial \hat{Y}}{\partial X_2} = -924,133 + 26,27318 X_2 + 0,670375 X_1 + 11,41750 X_3$$

$$\frac{\partial \hat{Y}}{\partial X_3} = -1718,666 + 57,3927 X_3 + 2,44125 X_1 + 11,41750 X_2$$

X₁S = 339,98546 = 340 ml/l de extrato de cenoura

X₂S = 21,64107 = 22 g/l de farinha de cevada maltada

X₃S = 11,5463 = 12 min. de esterilização

TABELA 6. Estimativa da esporulação de *Nomuraea rileyi*, isolado Londrina, para determinação da natureza do ponto estacionário.

X ₁	X ₂	X ₃					
		5	10	12	15	20	25
50	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	444,17	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
150	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	343,33	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
250	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	378,06	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
340	10	-	-	2.191,12	-	-	-
	20	-	-	540,14	-	-	-
	22	1.572,55	537,49	504,66	937,26	2.771,84	6.041,24
	30	-	-	1.516,48	-	-	-
	40	-	-	5.120,14	-	-	-
	50	-	-	11.351,12	-	-	-
350	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	548,35	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-
450	10	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	857,19	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-	-

X₁ - extrato de cenoura (ml/l).X₂ - farinha de cevada maltada (g/l).X₃ - tempo de esterilização (min.).

CONCLUSÕES

1. Os isolados Passo Fundo e Camaquã, do fungo entomógeno *Nomuraea rileyi*, apresentaram es-

porulações diferenciadas quando cultivados sobre os meios de cultura semi-sintéticos e SMAY.

2. CMA e AMA constituíram-se em meios de cultura capazes de propiciar esporulações de *N.*

rileyi semelhantes ou superiores a SMAY.

3. Os isolados Passo Fundo e Camaquã apresentaram-se favorecidos por pH entre 6,0 e 7,0.

4. CMA e AMA permitiram aumentos crescentes na esporulação do isolado Londrina até os 17 e 20 dias de incubação, respectivamente.

5. Os dados obtidos evidenciam a existência de variabilidade fisiológica em *N. rileyi*.

6. O método de cultivo foi eficiente, tendo em vista os resultados obtidos durante a realização destes experimentos.

REFERÊNCIAS

- BARNES, G.L.; BOETHEL, D.J.; EIKENBARY, R.D.; CRISWELL, J.T.; GENTRY, C.R. Growth and Sporulation of *Metarrhizium anisopliae*, and *Beauveria bassiana* on Media Containing various Peptone Sources. *J. Inverteb. Pathol.*, Stoneville, 26:129-30, 1975.
- BELL, J.V. Production and Pathogenicity of the fungus *Spicaria rileyi* from solid and liquid media. *J. Inverteb. Pathol.*, Stoneville, 26:129-30, 1975.
- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; HOSTETTER, D.L. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Environ. Entomol.*, Columbia, 5:935-6, 1976.
- KISH, L.P. & ALLEN, G.C. The Biology and Ecology of *Nomuraea rileyi* and Program for Predicting its Incidence on *Anticarsia gemmatilis* in Soybean. Gainesville, Universidade da Flórida, 1976. 46p.
- LILLY, V.G. & BARNETT, H.L. *Physiology of the fungi*. New York, McGraw-Hill, 1951. 464p.
- LOCH, L.C. Exigências Nutricionais e Ambientes do Fungo Entomógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson e seu Desenvolvimento na Presença de Defensivos Agrícolas. Piracicaba, ESALQ, 1978. 65p. Tese Doutorado - Fitopatologia.
- RANGEL, J.F. *Técnicas Fitopatológicas*. Rio de Janeiro, s. ed., 1940. 68p. il.
- TUITE, J. *Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria*. Lafayette, Burgess, 1969. 239p.