

# Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos<sup>1</sup>

Inajá Marchizeli Wenzel<sup>2</sup>, Antonio Carlos Monteiro<sup>3</sup>, Gener Tadeu Pereira<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Parte da dissertação apresentada pela primeira autora à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp).

<sup>2</sup> Ex-aluna do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Unesp-FCAV. iawenzel@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Autor para correspondência. Unesp-FCAV, Departamento de Produção Vegetal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s.n, CEP 14884-900, Jaboticabal (SP), Brasil. montecar@fcav.unesp.br

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Exatas, Unesp-FCAV. genertp@fcav.unesp.br

## Resumo

O presente trabalho objetivou avaliar a produção e a viabilidade de conídios de *Lecanicillium lecanii* cultivado em diferentes substratos sólidos e líquidos, obtidos a partir de grãos. Os isolados JAB 02 e JAB 45 foram cultivados por 20 dias, a  $25 \pm 0,5$  °C, em meios naturais sólidos (alpiste, arroz-agulhinha, arroz integral, farelo de arroz, farelo de soja, farelo de trigo, lentilha em grão, lentilha moída, painço, quirela de arroz, quirela de milho, soja em grão, soja moída, sorgo em grão, sorgo moído, trigo em grão, trigo moído) e líquidos (extratos de arroz-agulhinha, batata, farelo de arroz, farelo de soja, farelo de trigo, feijão-branco, feijão-carioca e feijão-guandu, fubá, lentilha, soja em grão, sorgo em grão e trigo em grão). Avaliaram-se a produção e a viabilidade de conídios. Os meios sólidos de farelo de soja, farelo de trigo e trigo moído proporcionaram maiores produções de conídios do isolado JAB 02, e os meios com trigo moído, farelo de soja, farelo de trigo e lentilha em grão favoreceram a esporulação de JAB 45. Os meios de lentilha em grãos, farelo de soja, quirela de milho e trigo moído favoreceram a viabilidade de JAB 02 e, para JAB 45, isso ocorreu nos meios de lentilha em grãos e trigo moído e em grãos. Entre os meios líquidos, as maiores produções de conídios de JAB 02 ocorreram nas preparações com feijão-branco e soja e, para JAB 45, o mais eficiente foi o meio de farelo de trigo. Não ocorreu germinação dos conídios de ambos os isolados, produzidos em qualquer um dos meios líquidos.

**Palavras-chave adicionais:** controle biológico; controle microbiano; fungo entomopatogênico; esporulação; viabilidade.

## Abstract

WENZEL, I. M.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Conidial production of *Lecanicillium lecanii* on solid and liquid media obtained from grains. **Científica, Jaboticabal**, v.34, n.1, p.7 - 14, 2006.

This work aimed to evaluate the production and viability of conidia of *Lecanicillium lecanii* growth on solid and liquid media obtained from grains. The isolates JAB 02 and JAB 45 of the fungus were cultivated for 20 days at 25.5 °C in natural solid media (canary grass, needle and whole rice, rice, soybean and wheat bran, grain and ground lentil, Italian millet, cracked rice, cracked corn, grain and ground soybean, grain and ground sorghum, grain and ground wheat) and liquids (needle rice, potato, rice, soy and wheat bran, white bean, carioca bean and pigeon pea, corn meal, lentil, soybean grain, sorghum grain and wheat grain). The production and viability of the conidia were evaluated. The solid media of soybean bran, wheat bran and ground wheat promoted the greater sporulation of JAB 02, and the media with ground wheat, soybean bran, wheat bran and lentil grain favoured the sporulation of JAB 45. The media with lentil in grain, soybean bran, cracked corn and ground wheat favoured the viability of JAB 02 while for JAB 45 similar effect was observed with lentil in grain, grain and ground wheat. Among the liquid media, the highest sporulations were obtained with white bean and soybean for JAB 02 and wheat bran for JAB 45. The conidia produced in all the liquid media failed to germinate, both isolates considered.

**Additional keywords:** biological control; microbial control; entomopathogenic fungi; sporulation, viability.

## Introdução

Os problemas inerentes à inadequada utilização de agrotóxicos, principalmente sob o ponto de vista de resíduos e desequilíbrio ecológico, contribuíram para aumentar o interesse pelo uso de fungos entomopatogênicos na agricultura. Para que sejam utilizados em larga escala no controle de pragas, há necessidade de produzi-los em grandes quantidades (OLIVEIRA, 2000). Assim, é necessário obter meios de

cultura que proporcionem bom crescimento com alta esporulação e que sejam elaborados com substratos de baixo custo, fácil obtenção, manuseio e preparo.

O arroz em grão ainda é o substrato mais utilizado na produção de fungos entomopatogênicos no Brasil, porém várias tentativas foram feitas para avaliar a eficiência de outros substratos, como fubá de milho, farinha de arroz, soja, farelo de trigo, batata, sorgo, feijão, milho, etc. (BASTOS et al., 1976; CAMARGO, 1983; NAHAS & ARAI, 1987; ALVARENGA et al.,

1988; QUINTELA et al., 1994; VILAS BOAS et al., 1996; OLIVEIRA, 2000), na expectativa de baratear os custos de produção e aumentar a eficiência do processo.

*Verticillium lecanii* (Zimmerm.) Viégas (1939) é capaz de causar doenças em diversas espécies de insetos, como pulgões, cochonilhas, tripses, mosca-branca, entre outros. Em revisão recente (ZARE & GAMS, 2001), o fungo foi reclassificado e renomeado como *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & Gams (2001). Sua eficiência já foi comprovada em vários trabalhos (RUSSO et al., 1988; REDDY & BHAT, 1989; REIMER & BEARDSLEY, 1992; CASTALDI & NICOLI, 1993; VERHAAR & HIJWEGEN, 1993; ROVESTI et al., 1997). No Brasil, ocorre naturalmente em culturas importantes, causando epizootias, como em cochonilhas de citros, *Coccus viridis* em cafeeiro, e já foi isolado de várias espécies de pulgões (ALVES, 1998).

As condições nutricionais e ambientais para o desenvolvimento de isolados brasileiros do fungo foram investigadas por BARBOSA et al. (2002), WENZEL (2002) e MONTEIRO et al. (2004).

SOUNDARARAJAN et al. (1984) cultivaram *L. lecanii* em grãos de sorgo esterilizados e fechados em sacos de polietileno. Farelo de trigo, polpa de beterraba e a mistura de ambos umedecidos foram utilizados como suplementação ao meio de cultura sólido Sabouraud (GRAJEK, 1994). Em países do Mediterrâneo, utilizam-se o mesocarpo da amêndoa (LOPEZ-LLORCA & CARBONELL, 1998) e resíduos de folhas de palmeiras e sementes de *Phoenix dactylifera* (LOPEZ-LLORCA et al., 1999). Trabalhos enfocando a produção massal de *L. lecanii* no Brasil são praticamente ausentes na literatura. Portanto, fazem-se necessários estudos com isolados brasileiros, usando substratos de fácil obtenção e baixo custo, para viabilizar o emprego do fungo como bioagente de controle de pragas no País.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção e a viabilidade de conídios de *L. lecanii* cultivado em diferentes substratos sólidos e líquidos, obtidos a partir de grãos.

## Material e métodos

Utilizaram-se os isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii*, obtidos da cochonilha verde *Coccus viridis* Green (Hemiptera: Coccidae), coletada em pomares de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck), nos municípios de Ubirajara e São Carlos (SP). Culturas-estoque dos isolados são mantidas na coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da Unesp-FCAV. Para utilização nos ensaios, obtiveram-se culturas jovens do fungo crescidas em placas de Petri contendo BDA, incubadas a 25 °C, durante 15 dias, em ausência de luz.

O ensaio com meios sólidos foi preparado com

os seguintes substratos: alpiste, arroz-agulhinha, arroz integral, farelos de arroz, de soja e de trigo, lentilha em grão, lentilha moída, painço, quirelas de arroz e de milho, soja em grão, soja moída, sorgo em grão, sorgo moído, trigo em grão e trigo moído. Para cada substrato, realizou-se um pré-ensaio para adequar as quantidades de substrato e de água, como é mostrado na Tabela 1.

Os substratos foram colocados em frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, vedados com tampão de algodão recoberto com papel-alumínio e autoclavados, por 30 minutos, a 121 °C.

Para preparar os meios líquidos, utilizaram-se os seguintes substratos: arroz, batata, farelos de arroz, de soja e de trigo, feijão-branco, feijão-carioca e feijão-guandu, fubá de milho, lentilha, soja, sorgo e trigo. As quantidades de substrato e de açúcares usados no preparo dos meios estão na Tabela 2. A adição de sacarose foi baseada no sistema de produção de *Sporothrix insectorum* desenvolvido por JUNQUEIRA et al. (1987) e a de dextrose foi arbitrária, adicionando-se menor quantidade nos meios que, provavelmente, possuíam maior quantidade de açúcar (amido).

Os meios de cultura com feijão-branco, feijão-carioca e feijão-guandu, lentilha, soja, sorgo e trigo foram obtidos por meio de cozimento em autoclave, por 20 minutos. Em seguida, o material foi homogeneizado em liquidificador e filtrado em panos brancos de algodão, para a retirada de partes grosseiras do material, conforme método de OLIVEIRA (2000); adicionaram-se, então, as quantidades adequadas de açúcar. Os meios com farelos de trigo, de soja e de arroz, arroz, batata e fubá de milho foram cozidos em fogão, por 20 minutos (repondo-se água quando necessário), e, a seguir, filtrados em panos brancos de algodão, adicionando-se, posteriormente, o açúcar. Todos os meios foram acrescidos de cloranfenicol (300 mg L<sup>-1</sup>), para evitar a recontaminação bacteriana durante o período de incubação. O pH dos meios líquidos foi medido e padronizado em 6,5. De acordo com MONTEIRO et al. (2004), não houve diferença significativa no crescimento e esporulação dos mesmos isolados cultivados em pH variando entre 5,0 e 9,0.

Em frasco Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, foram colocados 100 mL de meio, vedado com tampão de algodão e papel-alumínio, autoclavando-se, em seguida, por 30 minutos, a 121 °C. O fungo foi inoculado nos meios, em câmara de fluxo laminar, por meio de dois discos de 8 mm de diâmetro, retirados de culturas crescidas, durante 15 dias, em placas de Petri contendo BDA. As preparações foram incubadas a 25 ± 0,5 °C e ausência de luz, durante 20 dias, sem aeração forçada.

Tabela 1 – Substratos naturais e água destilada utilizados no preparo dos meios sólidos.

Table 1 – Natural substrata and distilled water used for preparing the solid media.

Substrato / <i>Substratum</i>	Quantidade do substrato (g) / <i>Amount of substratum (g)</i>	Quantidade de água (mL) / <i>Amount of water (mL)</i>
Alpiste / <i>Canary grass</i>	50	30
Arroz-agulhinha / <i>Needle rice</i>	60	32
Arroz integral / <i>Whole rice</i>	70	30
Farelo de arroz / <i>Rice bran</i>	50	40
Farelo de soja / <i>Soybean bran</i>	50	41
Farelo de trigo / <i>Wheat bran</i>	40	60
Lentilha em grão / <i>Lentil grain</i>	70	40
Lentilha moída / <i>Ground lentil</i>	70	30
Painço / <i>Italian millet</i>	50	20
Quirela de arroz / <i>Cracked rice</i>	80	30
Quirela de milho / <i>Cracked corn</i>	75	30
Soja em grão / <i>Soybean grain</i>	70	20
Soja moída / <i>Ground soybean</i>	70	20
Sorgo em grão / <i>Sorghum grain</i>	60	35
Sorgo moído / <i>Ground sorghum</i>	70	25
Trigo em grão / <i>Wheat grain</i>	70	40
Trigo moído / <i>Ground wheat</i>	60	35

Tabela 2 – Substratos naturais e açúcares utilizados na composição dos meios líquidos. (Quantidades usadas em 1.000 mL de água destilada).

Table 2 – Natural substrata and sugars used in the composition of the liquid media. (Amounts expressed as 1000 mL of distilled water).

Substrato / <i>Substratum</i>	Quantidade do substrato (g) / <i>Amount of substratum (g)</i>	Quantidade de açúcar (g) / <i>Amount of sugar (g)</i>	
		Dextrose / <i>Dextrose</i>	Sacarose / <i>Sucrose</i>
Arroz-agulhinha / <i>Needle rice</i>	100	5	0
Batata / <i>Potato</i>	200	5	0
Farelo de arroz / <i>Rice bran</i>	50	0	10
Farelo de soja / <i>Soybean bran</i>	50	0	10
Farelo de trigo / <i>Wheat bran</i>	50	0	10
Feijão-branco / <i>White bean</i>	100	10	0
Feijão-carioca / <i>Carioca bean</i>	100	10	0
Feijão-guandu / <i>Pigeon pea</i>	100	10	0
Fubá / <i>Finely ground corn meal</i>	100	5	0
Lentilha / <i>Lentil</i>	100	10	0
Soja em grão / <i>Soybean grain</i>	100	10	0
Sorgo em grão / <i>Sorghum grain</i>	100	5	0
Trigo em grão / <i>Wheat grain</i>	100	5	0

A avaliação da produção de conídios foi feita no 20º dia de cultivo. Para os meios sólidos, transferiu-se 1 g de cada meio para tubo contendo 9 mL de uma mistura (1:1) de solução de NaCl (0,89% p v<sup>-1</sup>) e solução WXGjXXa +# # \$ i i<sup>-1</sup>). Para os meios líquidos, o conteúdo total do frasco de cultivo, incluindo a massa fúngica formada após incubação, foi triturado por 20 segundos em liquidificador, transferindo-se, em seguida, 1 mL de cada meio de cultura para 9 mL da mistura de solução de NaCl e Tween já descrita. As suspensões dos meios sólidos ou líquidos assim obtidas foram vigorosamente agitadas em agitador elétrico de tubo, determinando-se o número de conídios com auxílio da câmara de Neubauer.

Para a avaliação da viabilidade, utilizaram-se as mesmas suspensões de conídios anteriormente obtidas. Lâminas de microscopia, mantidas no interior de placas de Petri, foram recobertas com fina camada (aproximadamente 3 mL) de BDA com cloranfenicol. Na parte inferior da lâmina, foram marcados três pontos; em cada ponto, inoculou-se 0,1 mL da suspensão contendo 10<sup>5</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas a 25 ± 0,5 °C, em ausência de luz, por 15 horas. Com auxílio

de microscópio (400 aumentos), foram observados 150 conídios por ponto da lâmina, contando-se os germinados e os não-germinados, estabelecendo-se, assim, uma proporção. No ensaio com meios líquidos, a observação dos conídios foi feita até 48 horas de incubação, para a confirmação do resultado.

Tanto para esporulação como para viabilidade, fizeram-se três repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, pelo Teste F, a 1% de probabilidade, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## Resultados e discussão

A análise de variância dos dados de esporulação do fungo cultivado em meios com substratos naturais sólidos foi significativa para ambos os isolados (Tabela 3). Os melhores resultados para JAB 02 foram obtidos nos meios de farelo de soja, farelo de trigo e trigo moído, e, para JAB 45, as melhores produções de conídios foram obtidas nos meios de trigo moído, farelo de soja, farelo de trigo e lentilha em grão (Tabela 3).

Tabela 3 – Produção de conídios pelos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* após cultivo, por 20 dias, a 25 ± 0,5 °C e em ausência de luz, em diversos meios naturais sólidos.

Table 3 – Production of conidia by the isolates JAB 02 and JAB 45 of *Lecanicillium lecanii* after cultivation for 20 days at 25 ± 0.5 °C and in absence of light in several natural solid media.

Meio sólido / Solid medium	nº de conídios x 10 <sup>7</sup> g <sup>-1</sup> / number of conidia x 10 <sup>7</sup> g <sup>-1</sup>	
	JAB 02	JAB 45
Trigo moído / Ground wheat	16,00 abc	18,50 a
Farelo de soja / Soybean bran	25,75 a	17,96 a
Farelo de trigo / Wheat bran	19,30 ab	13,16 a
Lentilha em grão / Lentil grain	7,40 cd	12,16 ab
Farelo de arroz / Rice bran	6,10 cd	3,41 bc
Quirela de milho / Cracked corn	9,10 bcd	2,30 c
Painço / Italian millet	2,40 d	1,86 c
Sorgo em grão / Sorghum grain	3,40 d	1,80 c
Alpiste / Canary grass	4,80 d	1,77 c
Sorgo moído / Ground sorghum	2,50 d	1,70 c
Arroz integral / Whole rice	1,70 d	1,64 c
Lentilha moída / Ground lentil	2,20 d	1,58 c
Trigo em grão / Wheat grain	0,50 d	1,23 c
Quirela de arroz / Cracked rice	0,90 d	0,90 c
Arroz-agulhinha / Needle rice	2,10 d	0,80 c
Teste F / F test	12,74 **	13,79 **
CV (%)	52,48	56,09

Médias seguidas de, pelo menos, uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*\*: significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F. CV: Coeficiente de Variação.

Means followed by the same letter within a column are not different by the Tukey test at 5% of probability. \*\*: significant at 1% of probability by the F test. CV: coefficient of variation.

The numbers after the comma are decimals. Example: 1,1 = one and one tenth.

Com relação à viabilidade dos conídios produzidos nos meios naturais sólidos, também ocorreu diferença significativa para ambos os isolados (Tabela 4). Para JAB 02, a análise não acusou diferença na viabilidade dos conídios obtidos nos meios de farelo de soja, quirela de milho, trigo moído, sorgo em grão, sorgo moído, arroz-agulhinha, farelo de trigo e farelo de arroz, que foram estatisticamente iguais à lentilha em grão (Tabela 4). Para o isolado JAB 45, as viabilidades dos conídios produzidos nos meios de lentilha em grão, trigo em grão, trigo moído, painço, arroz integral, quirela de milho, alpiste e sorgo moído não diferiram significativamente (Tabela 4).

O isolado JAB 02 apresentou alta esporulação e alta viabilidade nos meios de farelo de soja, farelo de trigo e trigo moído. O meio de lentilha em grãos mostrou-se bastante promissor quanto à viabilidade dos conídios, pois se obteve o maior valor numérico para ambos os

isolados. Contudo, houve baixa produção de conídios do isolado JAB 02 neste meio. O isolado JAB 45 mostrou alta esporulação e viabilidade nos meios de trigo moído e lentilha em grãos, mas nos meios de farelo de soja e farelo de trigo, onde também se obteve alta produção de conídios, a viabilidade não foi suficientemente alta.

As esporulações do isolado JAB 02 nos meios líquidos preparados com feijão-branco, soja, feijão-carioca, trigo, lentilha e sorgo não apresentaram diferença estatística, mas podemos destacar os meios de feijão-branco e soja, onde se obtiveram os maiores valores numéricos da produção de conídios. Do mesmo modo, a esporulação do isolado JAB 45 obtida nos meios de farelo de trigo, lentilha e feijão-carioca não diferiu significativamente (Tabela 5), mas podemos destacar o meio de farelo de trigo, por apresentar o maior valor numérico da produção de conídios.

Tabela 4 – Viabilidade dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* após cultivo, por 20 dias, a  $25 \pm 0,5$  °C e em ausência de luz, em diversos meios naturais sólidos.

Table 4 – Viability of the isolates JAB 02 and JAB 45 of *Lecanicillium lecanii* after cultivation for 20 days at  $25 \pm 0.5$  °C and in absence of light in several natural solid media.

Meio sólido / Solid medium	Conídios viáveis (%) / Viable conidia (%)	
	JAB 02	JAB 45
Lentilha em grão / Lentil grain	91,84 a	90,37 a
Farelo de soja / Soybean bran	88,22 ab	77,40 bcde
Quirela de milho / Cracked corn	86,07 ab	83,18 abc
Trigo moído / Ground wheat	80,21 ab	86,74 ab
Sorgo em grão / Sorghum grain	79,99 abc	77,03 bcde
Sorgo moído / Ground sorghum	76,85 abc	81,33 abcd
Arroz-agulhinha / Needle rice	76,22 abc	76,44 bcde
Farelo de trigo / Wheat bran	72,73 abc	68,44 cde
Farelo de arroz / Rice bran	67,92 abc	14,81 f
Quirela de arroz / Cracked rice	64,07 bcd	60,59 e
Arroz integral / Whole rice	62,95 cd	84,22 ab
Lentilha moída / Ground lentil	42,51 cd	66,14 de
Trigo em grão / Wheat grain	23,25 de	87,18 ab
Painço / Italian millet	9,85 ef	85,92 ab
Alpiste / Canary grass	5,83 f	82,59 abc
Teste F / F test	30,36**.	35,17**.
CV (%)	8,87	5,82

Médias seguidas de, pelo menos, uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para execução do teste de Tukey, os dados foram transformados em  $\text{arc-sen } \sqrt{x/100}$ . \*\*: significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F. CV: Coeficiente de Variação.

Means followed by the same letter within a column are not different by the Tukey test at 5% of probability. Data in percentage were previously transformed in  $\text{arc-sen } \sqrt{x/100}$  for the statistical analysis. \*\*: significant at 1% of probability by the F test. CV: coefficient of variation.

The numbers after the comma are decimals. Example: 1,1 = one and one tenth.

Tabela 5 – Produção de conídios pelos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* após cultivo, por 20 dias, a 25 ± 0,5 °C e em ausência de luz, em diversos meios naturais líquidos.

Table 5 – Production of conidia by the isolates JAB 02 and JAB 45 of *Lecanicillium lecanii* after cultivation for 20 days at 25 ± 0.5 °C and in absence of light in several natural liquid media.

Meio líquido / Liquid medium	nº de conídios x 10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> / number of conidia x 10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup>	
	JAB 02	JAB 45
Feijão-branco / White bean	0,97 a	1,86cd
Soja em grão / Soybean grain	0,96 a	0,53 cd
Feijão-carioca / Carioca bean	0,92 ab	4,50 ab
Trigo em grão / Wheat grain	0,90 abc	1,84 cd
Lentilha / Lentil	0,84 abcd	4,66 ab
Sorgo em grão / Sorghum grain	0,61 abcde	4,08 b
Farelo de trigo / Wheat bran	0,56 bcdef	6,00 a
Feijão-guandu / Pigeon pea	0,52 cdef	2,10 c
Farelo de soja / Soybean bran	0,50 def	0,45 d
Farelo de arroz / Rice bran	0,35 ef	0,79 cd
Arroz-agulhinha / Needle rice	0,28 ef	0,57 cd
Fubá / Finely ground corn meal	0,28 ef	0,55 cd
Batata / Potato	0,21 f	0,25 d
Teste F / F test	13,95**	38,43**
CV (%)	21,31	25,34

Médias seguidas de, pelo menos, uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. \*\*: significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F. C.V.: Coeficiente de Variação.

Means followed by the same letter within a column are not different by the Tukey test at 5% of probability. \*\*: significant at 1% of probability by the F test. CV: coefficient of variation.

The numbers after the comma are decimals. Example: 1,1 = one and one tenth.

Não ocorreu germinação de conídios de ambos os isolados, independentemente dos meios de cultura líquidos em que foram produzidos, apesar da ampliação do tempo de observação para 30 horas.

Um fator importante na produção massal de um fungo é a seleção de um meio-padrão para o cultivo de uma espécie ou de uma linhagem em particular (KHALIL & TÁBORSKÝ, 1982), visto que a produção de esporos pode variar consideravelmente, causando problemas na obtenção de conídios para o controle biológico (VERHAAR & HIJWEGEN, 1993).

NAHAS & ARAI (1987) examinaram o crescimento e a esporulação de *Beauveria bassiana* em meios semi-sintéticos e meios naturais. Como meios naturais, avaliaram farelo de trigo, de soja e de arroz, tendo encontrado que a maior esporulação do fungo (13,4 x 10<sup>9</sup> esporos por placa de cultivo) ocorreu no meio de farelo de trigo. Analisando o custo de produção de *Metarhizium anisopliae*, QUINTELA et al. (1994) mostraram a viabilidade da utilização da quirela de arroz em substituição ao arroz-agulhinha e ao arroz parabolizado, reduzindo quatro vezes o custo de produção, em decorrência do menor preço da quirela

no mercado e em função do aumento significativo obtido na produção de esporos.

Os meios de cultura elaborados à base de arroz em grão e seus subprodutos, que são substratos bastante utilizados para a produção da maioria dos fungos entomopatogênicos no Brasil, não proporcionaram boa esporulação dos dois isolados de *L. lecanii* usados neste trabalho. Não houve diferença estatística na produção de conídios obtida nos meios de quirela de arroz, arroz-agulhinha e arroz integral, mas a menor esporulação de ambos os isolados foi obtida nestes meios.

Este resultado sugere que a produção de conídios pelas espécies de fungos entomopatogênicos pode variar em razão do substrato sólido empregado no cultivo. Isso pode ser consequência das diferenças genéticas entre as espécies, que determinam habilidades distintas na utilização dos recursos nutricionais presentes nos diversos substratos. Farelo de soja, farelo de trigo, trigo moído e lentilha em grãos foram os substratos sólidos que apresentaram os melhores resultados quanto à produção e à viabilidade dos conídios dos isolados de *L. lecanii*. O farelo de soja é particularmente interessante, pois é de fácil obtenção e, em relação ao arroz, tem baixo

custo no Brasil, que é um dos maiores produtores desta leguminosa. Assim sendo, pode ser uma alternativa viável para utilização como substrato na produção massal de *L. lecanii* no País. O trigo moído e o farelo de trigo também apresentaram boa potencialidade para a produção massal do fungo, mas o custo, provavelmente, não seria baixo, já que o Brasil é um importador deste cereal. Para a lentilha, haveria, provavelmente, restrição semelhante, pelo custo do substrato.

De acordo com ALVES & PEREIRA (1998), existem algumas dificuldades práticas para a produção de fungos entomopatogênicos em meios líquidos, mas o método pode ser empregado para a produção de grandes quantidades de patógenos. O resultado obtido neste trabalho para o isolado JAB 45 de *L. lecanii* é semelhante ao encontrado por OLIVEIRA (2000) para o fungo *S. insectorum*, já que, em ambos os casos, a maior produção de conídios foi obtida no meio feito com extrato de farelo de trigo.

ALVARENGA et al. (1988) compararam o desenvolvimento e a esporulação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em meios naturais líquidos. Utilizaram como substratos três variedades de feijão de mesa (Carioca, Carioca 80 e Jalo), feijão-guandu, soja e grão-de-bico. Os melhores resultados da produção de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram obtidos nos meios elaborados com feijão Carioca, feijão Jalo e soja. De modo similar, neste trabalho, o isolado JAB 02 de *L. lecanii* também apresentou melhores valores de esporulação nos meios de feijão-branco, feijão-carioca e soja.

As razões para a ausência de germinação dos conídios produzidos em todos os meios líquidos não são fáceis de serem encontradas. É possível que estes tenham sofrido algum tipo de dano por choque mecânico quando a massa fúngica foi triturada no liquidificador, mas este procedimento foi necessário para sua remoção e contagem. Outros fatores que poderiam contribuir seriam alteração drástica do pH ou liberação de metabólitos tóxicos no meio de cultivo, ou ainda, possível deficiência nutricional quantitativa e qualitativa do meio, ocasionando a formação de conídios com pequena capacidade germinativa. BOUCIAS & PENDLAND (1984) verificaram que, no substrato de agarose-ágar, a germinação de conídios dos isolados F1 78-6 e F1 74-6 do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* foi de apenas 5% e 32,5%, respectivamente, após 48 h de incubação à temperatura de 26 °C. SMITH & GRULA (1981) demonstraram que a germinação e o crescimento subsequente do tubo germinativo de *B. bassiana* requerem uma fonte de carbono e de nitrogênio utilizáveis.

A produção de conídios pelo isolado JAB 02 nos meios sólidos foi, na média geral de todos os meios, 115 vezes maior que a obtida nos meios líquidos e, para

JAB 45, o valor foi cerca de 25 vezes maior. Verifica-se, portanto, que há diferença entre os isolados quanto à habilidade em utilizar os substratos para a produção de conídios e que a produção foi mais eficiente nos meios sólidos. Os resultados obtidos são promissores. Contudo, para viabilizar a produção massal de *L. lecanii* e seu uso no controle de insetos-praga de culturas importantes no Brasil, são necessários novos estudos visando a conhecer os fatores diretamente envolvidos na produção de conídios, a avaliar outros isolados e a encontrar substratos de fácil obtenção, que possibilitem alta produção a baixo custo.

## Conclusões

Os meios naturais sólidos foram mais eficientes para a produção massal de *Lecanicillium lecanii*, pois produziram maior quantidade de conídios, com maior viabilidade. Farelo de soja, farelo de trigo e trigo moído foram os substratos naturais sólidos que proporcionaram a maior produção de conídios do fungo.

Os meios naturais líquidos não foram eficientes para a produção massal de *L. lecanii*, pois produziram menor quantidade de conídios, sem viabilidade detectada.

Há diferença entre isolados do fungo, quanto à habilidade de utilização dos substratos para a produção de conídios.

## Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp nº 00/08483-0), pela concessão da bolsa de mestrado à primeira autora.

## Referências

- ALVARENGA, A. R. M.; CRUZ, B. P. B.; OLIVEIRA, D. A.; SILVEIRA, A. P.; BULISANI, E. A. Novos testes de cultivo de fungos utilizados em controle biológico usando meios de cultura naturais líquidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.55, n.1/4, p.31-35, 1988.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.289-381.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.845-869.
- BARBOSA, C. C.; MONTEIRO, A. C.; CORREIA, A. do C. B.; PEREIRA, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p.375-381, 2002.

- BASTOS, C. N.; MATTA, E. A. F. da; FIGUEIREDO, J. M. Esporulação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em meios de cultura de diferentes composições. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia**, Salvador, v.15, n.1, p.9-11, 1976.
- BOUCIAS, D. G.; PENDLAND, J. C. Nutritional requirements for conidial germination of several host range pathotypes of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.43, p.288-292, 1984.
- CAMARGO, L. M. P. C. de A. Desenvolvimento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes meios de cultura naturais, sólidos. **O Biológico**, São Paulo, v.49, n.4, p.107-109, 1983.
- CASTALDI, R.; NICOLI, G. *Verticillium lecanii*. **Informatore Fitopatologico**, Bologna, v.43, n.10, p.20-24, 1993.
- GRAJEK, W. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. **Folia Microbiologica**, Prague, v.39, n.1, p.29-32, 1994.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; LIMA, M. I. P. M.; MARTINS, M. A. M.; MAGALHÃES, F. E. L. **Isolamento e cultivo do fungo *Sporothrix insectorum* (Hoog & Evans) a ser utilizado para o controle da mosca de renda da seringueira**. Manaus: Embrapa-CNPDS, 1987. 4p. (Embrapa-CNPDS. Comunicado Técnico, 56).
- KHALIL, S. K.; TÁBORSKÝ, V. The effect of different media on the growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. **Agricultura Tropica et Subtropica**, Prague, v.15, p.251-268, 1982.
- LOPEZ-LLORCA, L. V.; CARBONELL, T. Use of almond mesocarp for production of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.44, p.886-895, 1998.
- LOPEZ-LLORCA, L. V.; CARBONELL, T.; SALINAS, J. Colonization of plant waste substrates by entomopathogenic and micoparasite fungi - a SEM study. **Micron**, New York, v. 30, p.325-333, 1999.
- MONTEIRO, A. C.; BARBOSA, C. C.; CORREIA, A. do C. B.; PEREIRA, G. T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.6, p.561-565, 2004.
- NAHAS, E.; ARAI, N. N. S. Crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* em vários meios e condições de cultivo. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.18, n.1, p.77-82, 1987.
- OLIVEIRA, S. M. C. de. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos**. 2000. 45f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- QUINTELA, E. D.; YOKOYAMA, L. P.; ROBERTS, D. W. **Metodologia e custo de produção de *Metarhizium anisopliae* em quirera de arroz**. Goiânia: Embrapa-CNPAP, 1994. 20p. (Embrapa-CNPAP. Documentos, 47).
- REDDY, K. B.; BHAT, P. K. Effect of relative humidity and temperature on the biotic agents of green scale *Coccus viridis* (Green). **Journal of Coffee Research**, Balehonnur, v.19, n.2, p.82-87, 1989.
- REIMER, N. J.; BEARDSLEY, J. W. Epizootic of white halo fungus, *Verticillium lecanii* (Zimmerman), and effectiveness of insecticides on *Coccus viridis* (Green) (Homoptera: Coccidae) on coffee at Kona, Hawaii. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, Honolulu, v.31, p.73-82, 1992.
- ROVESTI, L.; GRAZZI, G.; VICCINELLI, R.; ALBAJES, R.; CARNERO, A. Use of entomopathogenic fungi for pest control in protected crops in Italy. **Bulletin Section Regionale Ouest Palearctique**, Dijon, v.20, n.4, p.285-292, 1997.
- RUSSO, A.; MAGNANO-DI-SAN-LIO, G.; CACCIOLA, S. O.; ASERO, G. *Verticillium lecanii* as a possible control agent of citrus black scale in Sicily. **Bulletin Section Regionale Ouest Palearctique**, Dijon, v.11, n.6, p.56-61, 1988.
- SMITH, R. J.; GRULA, E. A. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.37, p.222-230, 1981.
- SOUNDARARAJAN, K.; KUMARASWAMI, T.; ABDUL KAREEM, A. An easy method for mass multiplication of the entomopathogenic fungus *Cephalosporium lecanii* Zimm. **Current Science**, Bangalore, v.53, n.21, p.1152-1153, 1984.
- VERHAAR, M. A.; HIJWEGEN, T. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.99, n.2, p.101-103, 1993.
- VILAS BOAS, A. M.; ANDRADE, R. M.; OLIVEIRA, J. V. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.39, n.1, p.123-128, 1996.
- WENZEL, I. M. **Fatores nutricionais e produção em massa de *Verticillium lecanii* em meios naturais sólidos e líquidos**. 2002. 79f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- ZARE, R.; GAMS, W. A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v.73, n.1/2, p.1-50, 2001.

Recebido em 11-1-2005.

Aceito para publicação em 9-9-2005.