

# Crescimento e esporulação de *Lecanicillium lecanii* cultivado sob diferentes fontes de fósforo e relações C:P e C:N:P <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. Departamento de Produção Vegetal, Unesp-FCAV. 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

Objetivando estudar a influência da nutrição fosfatada no crescimento e na esporulação de *Lecanicillium lecanii*, os isolados JAB 02 e JAB 45 foram cultivados em meios com diferentes fontes de fósforo (fosfato de amônio, fosfatos de potássio monobásico e bibásico, ácido fosfórico, fosfatos de sódio e de cálcio), diversas relações C:P (5:1, 10:1, 50:1, 100:1 e 200:1) e C:N:P (60:1:6, 60:1:12, 120:2:1,2 e 240:4:1,2 para JAB 02, e 10:1:2, 10:1:1, 50:5:1 e 200:20:1 para JAB 45). Avaliaram-se o crescimento micelial, a cada três dias, durante dezoito dias após a inoculação, e a esporulação no décimo oitavo dia de incubação. As fontes de fósforo e as relações C:P não afetaram significativamente o desempenho dos isolados. Contudo, JAB 02 mostrou maior habilidade em utilizar os fosfatos de amônio, de potássio bibásico e de sódio e as relações 5:1, 10:1, 100:1 e 200:1, enquanto, para JAB 45, obteve-se evidência semelhante com os fosfatos de amônio, de potássio monobásico e bi-básico e as relações 5:1, 10:1, 50:1 e 200:1. As relações C:N:P não influenciaram o crescimento de JAB 02 e JAB 45, mas, nas relações 10:1:2 e 10:1:1, a esporulação deste último foi significativamente maior (33,4 x 10<sup>4</sup> e 26,4 x 10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

**Palavras-chave adicionais:** fisiologia de fungos; fungo entomopatogênico; nutrição fosfatada.

## Abstract

WENZEL, I. M.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Growth and sporulation of *Lecanicillium lecanii* cultivated under different sources of phosphorous, C:P and C:N:P ratios. **Científica**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.15 - 24, 2006.

This work aimed to study the growth and sporulation of *Lecanicillium lecanii* (isolates JAB 02 and JAB 45) cultivated in media with different sources of phosphorus (ammonium phosphate, monobasic and dibasic potassium phosphates, phosphoric acid, sodium and calcium phosphates), C:P (5:1, 10:1, 50:1, 100:1, and 200:1) and C:N:P (60:1:6, 60:1:12, 120:2:1,2 and 240:4:1,2 for JAB 02, and 10:1:2, 10:1:1, 50:5:1 and 200:20:1 for JAB 45) ratios. The micelial growth was measured every three days during eighteen days after inoculation whereas the sporulation was evaluated only on the eighteenth day of incubation. The sources of P and C:P ratio did not influence the growth and sporulation of both isolates. However, the data suggest that ammonium phosphate, potassium and sodium phosphates, and 5:1, 10:1, 100:1 and 200:1 C:P ratios favor the development of JAB 02, while ammonium phosphate, potassium monobasic and dibasic phosphates and C:P ratios 5:1, 10:1, 50:1, and 200:1 favor the development of JAB 45. The C:N:P ratio did not influence JAB 02 performance and JAB 45 growth but JAB 45 sporulation reached the peak values of 33.4 x 10<sup>4</sup> and 26.4 x 10<sup>4</sup> conidia mL<sup>-1</sup> when submitted to the ratios of 10:1:2 and 10:1:1, respectively.

**Additional keywords:** entomopathogenic fungus; phosphorus nutrition; physiology of fungi.

## Introdução

O controle microbiano de pragas ganha cada vez mais importância, por tratar da utilização racional de patógenos, visando à manutenção da população de insetos em níveis não-econômicos de dano (ALVES, 1998), destacando-se o controle com fungos entomopatogênicos, pelo amplo potencial de utilização, sem deterioração dos recursos naturais (PADIN et al., 1995).

*Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas (1939) é um fungo com grandes possibilidades para uso no controle microbiano de insetos (LECUONA & RIBA, 1991), por

causa do efeito parasitário que produz sobre várias espécies de hospedeiros, como afídeos, coccídeos e aleirodídeos (KHALIL & TABORSKY, 1982; GRAJEK, 1994). Em revisão recente sobre o gênero *Verticillium*, seção *Prostrata*, ZARE & GAMS (2001) renomearam o fungo como *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & Gams (2001). Há relatos de seu uso com sucesso, tanto em casa de vegetação como no campo (KHALIL et al., 1985). REDDY & BHAT (1989) observaram que este patógeno apresentou altas porcentagens de infecção e de parasitismo na cochonilha-verde *Coccus viridis*. No Havaí, dizimou populações desta cochonilha em cafeeiros (REIMER & BEARDSLEY, 1992) e, na Itália, onde

foi avaliado como agente de controle de *Saissetia oleae*, infectou cerca de 80% dos coccídeos nas laranjeiras infestadas (Russo et al., 1988).

*V. lecanii* (= *L. lecanii*) é uma espécie complexa que inclui isolados com muitas variações em características morfológicas e bioquímicas (STEENBERG & HUMBER, 1999). Por atacar cochonilhas de café e citros, duas culturas de grande expressão no cenário agrícola brasileiro, o fungo tem grande potencial de uso no País. Contudo, para viabilizar sua produção em escala comercial, é necessário, entre outros aspectos, estudar as condições ideais de cultivo de isolados brasileiros. BARBOSA et al. (2002) avaliaram meios de cultura, fontes de carbono, de nitrogênio e relações C:N para o desenvolvimento dos isolados JAB 02 e JAB 45. A influência de condições ambientais como pH, temperatura e fotoperíodo, foi estudada por MONTEIRO et al. (2004). Entretanto, ainda são escassos trabalhos sobre fatores envolvidos na produção do fungo.

Um fator importante na produção massal de um fungo é a seleção de um meio padrão para o cultivo de uma espécie ou linhagem e o conhecimento das condições que permitam obter bom crescimento com alta esporulação (KHALIL et al., 1985), já que a produção de esporos pode variar consideravelmente, causando dificuldades na obtenção de conídios para o controle biológico (VERHAAR & HIJWEGEN, 1993). O estabelecimento de um bom meio nutritivo depende, entre outros fatores, de fontes adequadas de carbono, nitrogênio e fósforo e do estabelecimento de uma relação otimizada entre eles. Nitrogênio e fósforo são indispensáveis para a síntese de importantes componentes celulares, e o carbono é requerido como fonte de energia. Um meio balanceado deverá conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio (CARLILE & WATKINSON, 1994).

Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar a influência de fontes de fósforo e relações C:P e C:N:P no crescimento e na esporulação de *Lecanillium lecanii*.

## Material e métodos

Utilizaram-se os isolados JAB 02 e JAB 45 de *L. lecanii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), obtidos da cochonilha-verde *Coccus viridis* Green (Hemiptera: Coccidae), coletada em pomares de laranjeiras (*Citrus sinensis* Osbeck) nos municípios de Ubirajara e São Carlos (SP). Tais isolados são mantidos em culturas-estoque pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da Unesp-FCAV.

Conduziram-se três ensaios, nos quais se avaliaram o crescimento radial e a esporulação do fungo. No primeiro, os isolados foram cultivados em meio contendo

as seguintes fontes inorgânicas de fósforo: fosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de potássio bibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e fosfato de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ). O isolado JAB 02 foi cultivado no meio de Czapeck (AARONSON, 1970), tendo maltose ( $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ) como fonte de carbono, e JAB 45 foi cultivado no meio Mínimo de Pontecorvo, tendo glicose ( $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ) como fonte de carbono. Para ambos os isolados, utilizou-se de nitrato de sódio ( $6,0 \text{ g L}^{-1}$ ) como fonte de nitrogênio (BARBOSA et al., 2002). No meio de Czapeck, utilizou-se de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  da fonte de fósforo e no Meio Mínimo,  $1,52 \text{ g L}^{-1}$ , que são as quantidades da fonte de fósforo previstas nos respectivos meios.

No segundo ensaio, cultivaram-se os isolados sob diferentes relações C:P (5:1, 10:1, 50:1, 100:1 e 200:1) do meio de cultura, utilizando-se dos mesmos meios e fontes de carbono e nitrogênio, e, com base no resultado do ensaio anterior, fosfato de amônio como fonte de fósforo. No terceiro ensaio, os isolados foram cultivados em meio contendo as seguintes relações C:N:P: 60:1:6, 60:1:12, 120:2:1,2 e 240:4:1,2 para JAB 02, e 10:1:2, 10:1:1, 50:5:1 e 200:20:1 para JAB 45. Tais relações foram estabelecidas associando as melhores relações C:N para o crescimento e a esporulação de JAB 02 (60:1) e JAB 45 (10:1) (BARBOSA et al., 2002) às melhores relações C:P obtidas para cada isolado no ensaio anterior. Para ajustar tais relações, tomamos por base a quantidade de carbono. Os meios e fontes de carbono, nitrogênio e fósforo foram os mesmos utilizados no segundo ensaio. As quantidades em gramas das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo adequadas para obter as diferentes relações C:P ou C:N:P foram determinadas por meio de cálculo estequiométrico.

O cultivo foi realizado em placas de Petri de  $12 \times 80 \text{ mm}$ , contendo  $15 \text{ mL}$  de meio de cultura. A inoculação foi feita por meio de picada central no meio de cultivo, transferindo-se esporos e fragmentos de micélio, obtidos de culturas jovens do fungo. A incubação ocorreu a  $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 18 dias, no escuro.

O crescimento radial da colônia foi avaliado com régua milimétrica, medindo-se a cada três dias, por dezoito dias, dois diâmetros marcados na face externa do fundo da placa. A esporulação foi avaliada no 18º dia de incubação. Três colônias de cada tratamento foram escolhidas ao acaso e, de cada uma, retirou-se um disco de  $8 \text{ mm}$  de diâmetro da região central e outro da região periférica. Transferiu-se cada disco, isoladamente, para tubo contendo  $10 \text{ mL}$  de uma mistura (1:1) de solução salina ( $\text{NaCl}$  a  $0,89\% \text{ p v}^{-1}$ ) e solução de Tween  $+ \# \text{ } i^{-1}$ ). Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, extraíram-se os conídios e procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer.

Os dados de crescimento foram submetidos à análise de variância com um fator principal (fontes

de fósforo ou relação C:P ou relação C:N:P), com seis níveis, e outro fator secundário (tempo), também com seis níveis, no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições (placas de Petri) em cada grupo. Para as diferenças significativas no tempo, utilizou-se da análise de regressão, comparando-se as retas pelos testes de Paralelismo (teste T) e Coincidência (teste F) (DIXON & MASSEY Jr., 1969). Os dados de esporulação 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

O cultivo dos isolados nos meios contendo as diferentes fontes de fósforo, analisado por meio do teste de Paralelismo e Coincidência de Retas e comparação dos

coeficientes angulares das retas (Figura 1), mostrou que o crescimento do isolado JAB 02 nos meios com fosfato de amônio (T=2,26\*), fosfato de potássio bibásico (T=2,08\*) e fosfato de sódio (T=2,44\*) foi maior quando comparado ao crescimento obtido no meio com fosfato de cálcio, sugerindo que o isolado tem maior habilidade em utilizar fósforo nas primeiras formas citadas. Fato semelhante foi observado para JAB 45 nos meios com fosfato de amônio (T=-5,45\*\*), fosfato de potássio monobásico (T=-2,49\*) e fosfato de potássio bibásico (T=3,35\*\*) em relação ao meio contendo fosfato de sódio. Entretanto, a análise de variância do crescimento dos isolados nos meios contendo diferentes fontes de fósforo não revelou diferença significativa (Tabela 1).

SINGH & TANDON (1967a,b) verificaram que o crescimento de *Alternaria tenuis* aumentou acentuadamente adicionando-se fosfatos de cálcio, de

Tabela 1 – Análise de variância do crescimento radial dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* após cultivo, por 18 dias, a 25 °C e em ausência de luz, em meio de cultura contendo diferentes fontes de fósforo, relações C:P e C:N:P.

Table 1 – Variance analysis of the radial growth of the isolates JAB 02 and JAB 45 of *Lecanicillium lecanii* after cultivation for 18 days at 25 °C and absence of light in culture medium containing phosphorus of various sources, and different C:P and C:N:P ratios.

Fator de variação / Sources of variation	G.L. / Degrees of freedom	Quadrado Médio / Mean square	
		Isolado JAB 02 / Isolate JAB 02	Isolado JAB 45 / Isolate JAB 45
Fontes de fósforo / Sources of phosphorus	5	5,55 ns	5,79 ns
Erro (a) / Error (a)	6	8,12	6,62
Tempo / Time	5	1468,53**	1810,96**
Fontes X Tempo / Sources X Time	25	1,63 ns	1,22 ns
CV (%)		10,06	6,36
R <sup>2</sup>		0,97	0,99
Relações C:P / Relations C:P	4	17,98 ns	13,80 ns
Erro (a) / Error (a)	5	7,79	3,54
Tempo / Time	5	979,14**	1133,08**
Relações C:P X Tempo / Relations C:P X Time	20	1,72**	6,77**
CV (%)		10,25	12,47
R <sup>2</sup>		0,98	0,96
Relações C:N:P / Relations C:N:P	3	7,55ns	3,01ns
Erro (a) / Error (a)	4	28,09	3,31
Tempo / Time	5	8145,86**	1544,04**
Relações C:N:P X Tempo / Relations C:N:P X Time	15	1,28 ns	0,94 ns
CV (%)		6,59	6,95
R <sup>2</sup>		0,98	0,98

ns: não-significativo pelo teste F. \*\*: significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. CV: Coeficiente de Variação. R<sup>2</sup>: Coeficiente de Determinação

ns: non-significant by the F test . \*\*: significant at 1% of probability by the F test. CV: Coefficient of variation. R<sup>2</sup>: Coefficient of determination

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

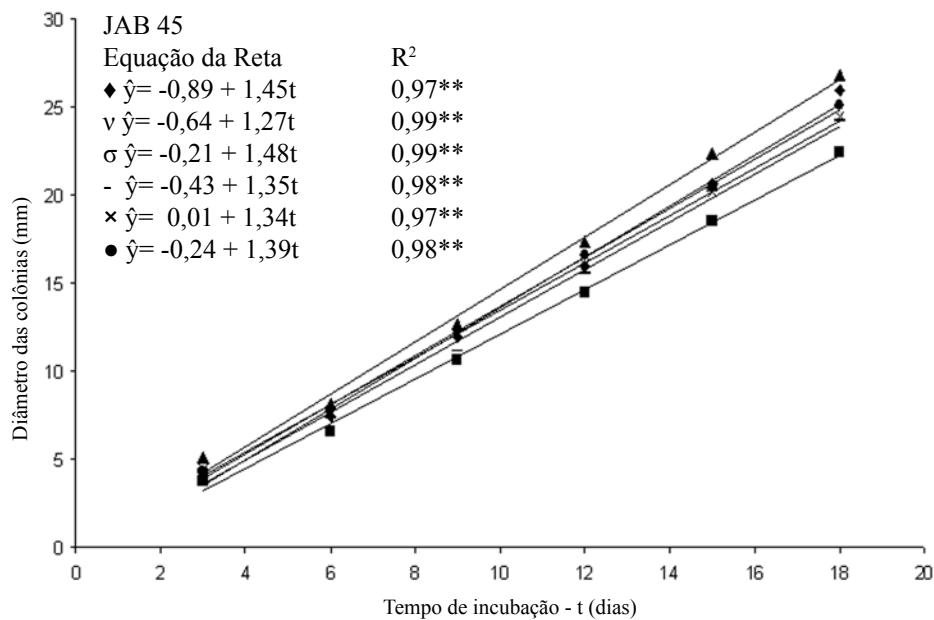
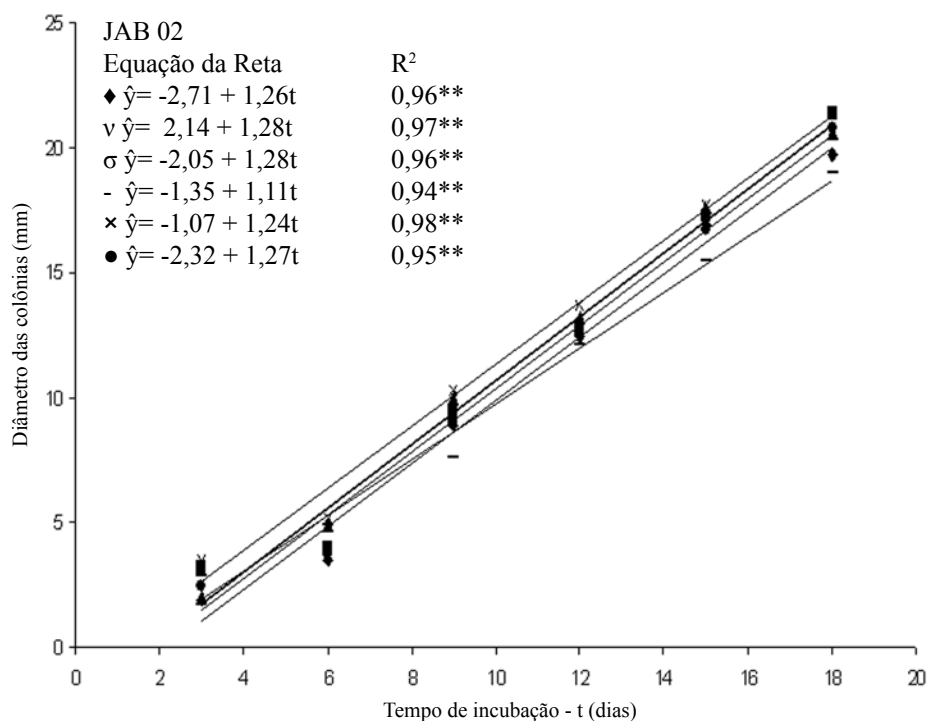


Figura 1 – Crescimento de *Lecanicillium lecanii* cultivado por dezoito dias, a 25 °C e em ausência de luz, em meio contendo diferentes fontes de fósforo. \*\*: significativo a 1% de probabilidade pelo teste T.

Figure 1 – Growth of *Lecanicillium lecanii* cultivated for 18 days at 25 °C and absence of light in culture medium containing phosphorus of different sources. \*\*: significant at 1% of probability by the T test. Vertical axis: diameter of the colonies (mm). Horizontal axis: time of incubation (t-days). Equação da reta: straight line equation. The numbers after the comma are decimals. Example: 1,1 = one and one tenth.

sódio, de potássio e de amônio a meios com carência de fósforo. No entanto, o aumento da concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de 125 para  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  reduziu em mais de 50% a esporulação de *Claviceps purpurea* (GARRAWAY & EVANS, 1984).

Os resultados obtidos para o isolado JAB 45 (Tabela 2) mostram que não houve efeito da fonte de fósforo na esporulação. THOMAS et al. (1987) observaram que a produção de conídios de *Beauveria bassiana* em meio líquido isento de fósforo foi dez vezes menor que a observada quando fosfato estava presente. *Alternaria tenuis* Autc. não produziu conídios quando cultivada em meios que continham fosfato de potássio, fosfato de potássio tribásico, fosfato de sódio e fosfato de cálcio (SINGH & TANDON, 1967a). Segundo BARBOSA et al. (2002), o desempenho dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *V. lecanii* em meios nutricionalmente limitados (meios de Czapeck e Mínimo de Pontecorvo) foi inferior ao obtido em meios ricos.

Tabela 2 – Esporulação do isolado JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* após cultivo, por 18 dias, a 25 °C e em ausência de luz, em meio contendo diversas fontes de fósforo, relações C:P e C:N:P.

Table 2 – Sporulation of the JAB 45 isolate of *Lecanicillium lecanii* after cultivation for 18 days at 25 °C and absence of light in culture medium containing phosphorus of various sources, and different C:P and C:N:P ratios.

Fator de variação / Sources of variation	nº de conídios x $10^5 \text{ mL}^{-1}$ / number of conidia x $10^5 \text{ mL}^{-1}$
Fonte de fósforo / Sources of phosphorus	
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	4,71 a
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,20 a
$\text{CaHPO}_4$	2,88 a
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	2,88 a
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2,23 a
$\text{H}_3\text{PO}_4$	1,18 a
Teste F / F test	1,81ns
CV (%)	52,53
Relação C:P / C:P ratio	
100:1	4,36 a
50:1	3,45 a
10:1	3,11 a
200:1	2,88 a
5:1	2,03 a
Teste F / F test	1,21ns
CV (%)	42,22
Relação C:N:P / C:N:P ratio	
10:1:2	3,63 a
10:1:1	2,35 ab
50:5:1	1,30 b
200:20:1	0,63 b
Teste F / F test	8,41**
CV (%)	39,54

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

Means followed by the same letter in the column are not different by the Tukey test at 5% of probability.

ns: non-significant by the F test. \*\*: 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 3 – Valores do crescimento radial médio (mm) do desdobramento dos graus de liberdade da interação dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii*, pelo tempo, em meio com diferentes relações C:P.

Table 3 – Interactive effects of C:P ratio and time of cultivation on the growth of *Lecanicillium lecanii* isolates JAB 02 and JAB 45.

Relação C:P / C:P ratio	Dias de cultivo / Days of cultivation					
	3	6	9	12	15	18
JAB 02						
5:1	0,0 a	4,4 a	7,5 ab	11,0 ab	15,1 a	17,2 a
10:1	0,0 a	2,5 ab	6,4 ab	9,8 ab	13,3 a	16,2 a
50:1	0,0 a	2,2 b	5,5 b	8,3 b	11,8 b	15,1 b
100:1	0,0 a	3,7 ab	7,7 a	11,3 a	15,0 a	17,1 a
200:1	0,0 a	2,3 b	5,7 ab	8,8 b	13,1 a	16,6 a
JAB 45						
5:1	2,5 a	6,2 a	10,2 a	14,3 a	19,0 a	23,5 a
10:1	2,7 a	6,2 a	10,7 a	14,3 a	18,3 a	22,1 a
50:1	2,9 a	6,7 a	10,2 a	14,6 a	17,0 a	20,3 a
100:1	2,5 a	5,8 a	9,2 a	11,4 a	13,9 b	16,0 b
200:1	2,6 a	5,3 a	9,6 a	13,3 a	16,2 a	21,1 a

Médias seguidas de mesma letra em comum, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Means followed by the same letter in the column are not different by the Tukey test at 5% of probability.

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

da comparação dos coeficientes angulares das retas (Figura 2), em que se observou que o crescimento de JAB 02 nos meios de cultura contendo as relações 5:1 (T=3,78\*\*), 10:1 (T=2,15\*\*), 100:1 (T=-2,87\*\*) e 200:1 (T=-2,06\*\*), ao longo dos dezoito dias de cultivo, foi maior que o desempenho obtido na relação 50:1. O mesmo ocorreu com o crescimento de JAB 45 nos meios com relações 5:1 (T=5,76\*\*), 10:1 (T=8,77\*\*), 50:1 (T=4,49\*\*) e 200:1 (T=-5,03\*\*), comparados com o cultivo em meio contendo a relação 100:1.

As relações C:P avaliadas não influenciaram na esporulação de JAB 45 (Tabela 2), pois não houve diferença estatística entre elas. Investigando o efeito de diferentes relações C:N no desenvolvimento de *V. lecanii*, BARBOSA et al. (2002) verificaram que o melhor desempenho de JAB 02 ocorreu na relação mais alta (60:1) e, para JAB 45, isso aconteceu em relações mais baixas (10:1 e 5:1), tendo JAB 02 produzido poucos esporos em qualquer uma das relações C:N avaliadas.

O crescimento dos isolados não sofreu influência das relações C:N:P (Tabela 1). Entretanto, para JAB 02, os testes de Paralelismo e Coincidência de Retas (Figura 3) mostraram que há melhor desempenho na relação 60:1:6, quando comparada com as relações 60:1:12 (T=-2,23\*) e 240:4:1,2 (T=2,70\*\*). A esporulação de JAB 45 obtida nas relações 10:1:2 e 10:1:1 (Tabela 2) não diferiu significativamente, sugerindo que, para

este isolado, estas são as relações C:N:P otimizadas para a produção de conídios.

Não ocorreu esporulação do isolado JAB 02 em nenhum dos ensaios. Este fato pode ser atribuído à composição do meio de Czapeck, que tem limitações quantitativas e qualitativas de nutrientes; o cultivo em diferentes fontes de fósforo e relações C:P e C:N:P não foi suficiente para promover a esporulação deste isolado. BARBOSA et al. (2002) verificaram que a esporulação de JAB 02 variou bastante quando testaram diversas fontes de carbono e nitrogênio. No ensaio com fontes inorgânicas de nitrogênio, a esporulação do isolado foi quase nula, ao contrário do ocorrido com a adição de fontes orgânicas de nitrogênio (casitona, extrato de carne e peptona). A rica composição desses substratos parece favorecer a esporulação, justificando o resultado.

Os meios de cultura apresentam faixas-limite para esporulação dos fungos, provavelmente decorrentes da rapidez de esgotamento de sua capacidade nutritiva, assim como da possível inadequação de suas fontes nutricionais (BALARDIN & LOCH, 1989). Segundo VAN WINKELHOFF & McCOY (1984), a conidiação é obtida em uma grande variedade de meios, mas uma fonte e concentração específica de nitrogênio é requerida para a conidiogênese. Para DAHLBERG & VAN ETEN (1982), a esporulação é um processo complexo e pode

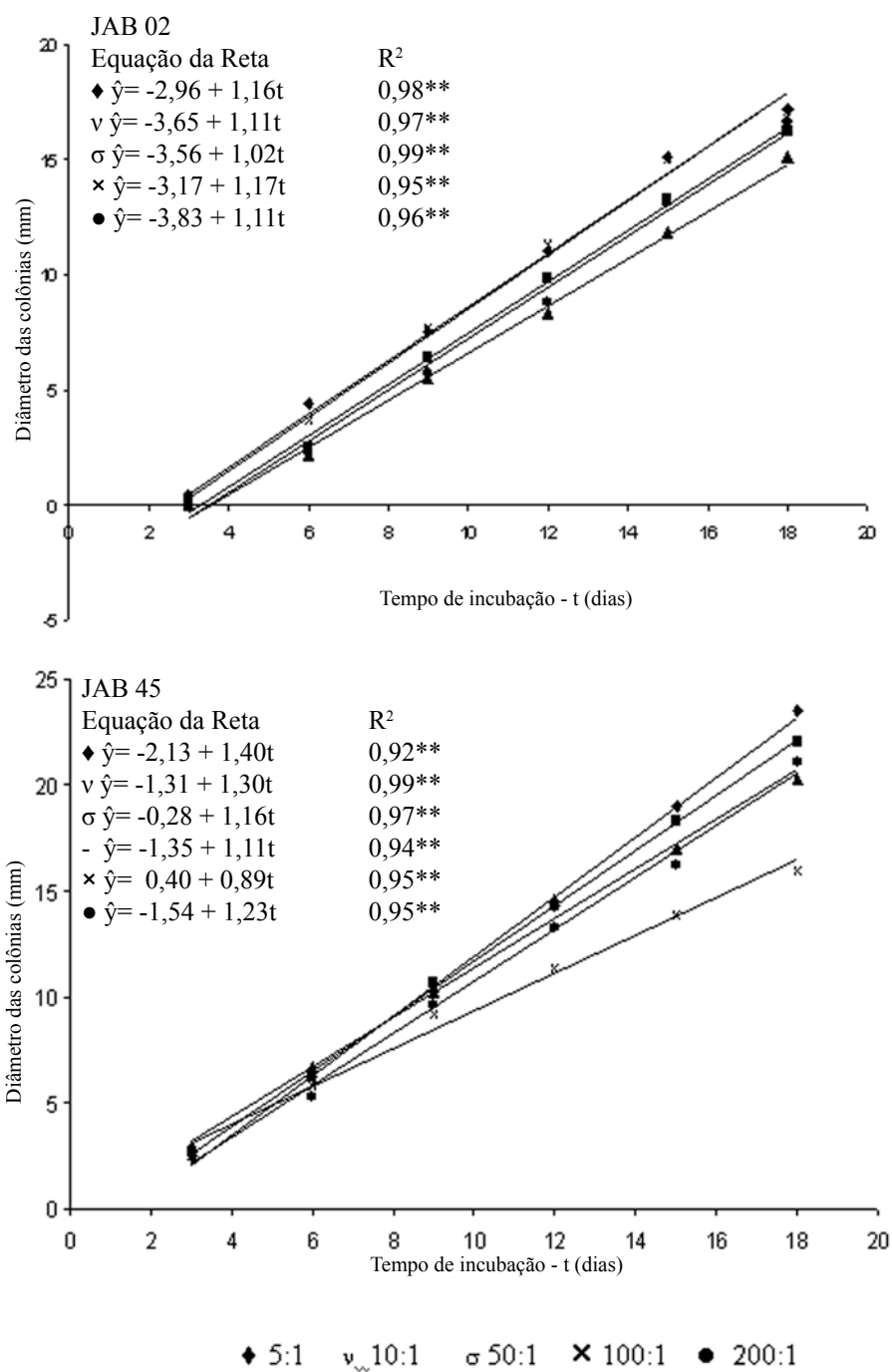


Figura 2 – Crescimento de *Lecanicillium lecanii* cultivado por dezoito dias, a 25 °C e em ausência de luz, sob diferentes relações C:P do meio de cultivo. \*\*: significativo a 1% de probabilidade pelo test T.

Figure 2 – Growth of *Lecanicillium lecanii* cultivated for 18 days at 25 °C and absence of light in culture medium with different C:P ratios. \*\*: significant at 1% of probability by the T test. Vertical axis: diameter of the colonies (mm). Horizontal axis: time of incubation (t-days). Equação da reta: straight line equation. The numbers after the comma are decimals. Example: 1,1 = one and one tenth.

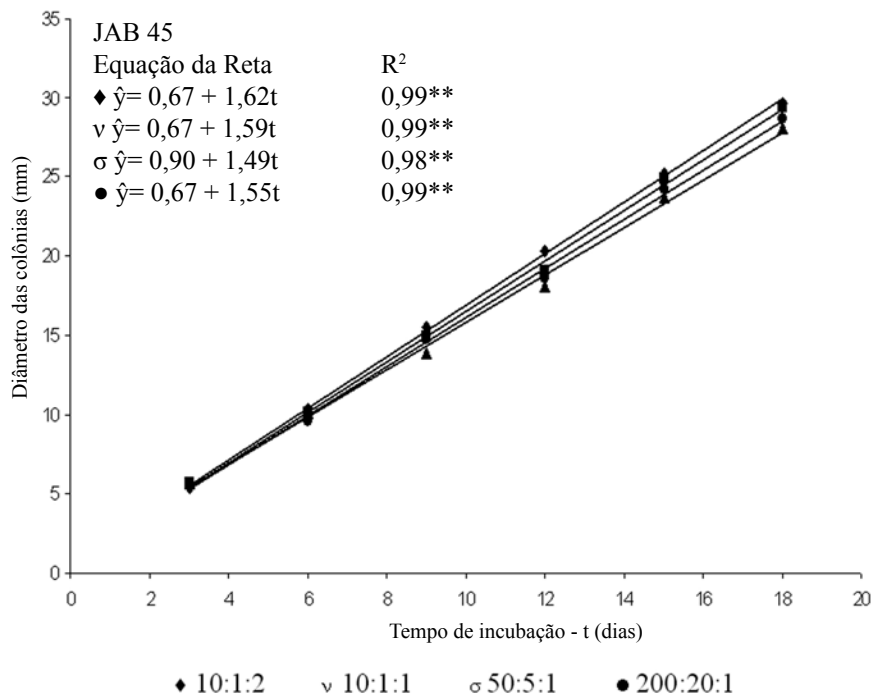
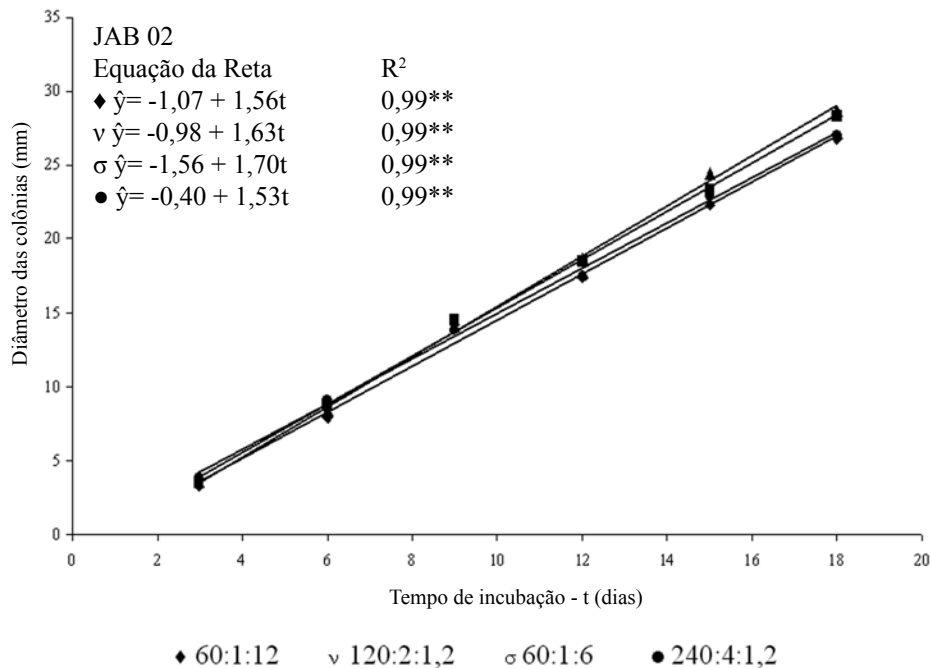


Figura 3 – Crescimento de *Lecanicillium lecanii* cultivado por dezoito dias, a 25 °C e em ausência de luz, sob diferentes relações C:N:P do meio de cultivo. \*\*: significativo a 1% de probabilidade pelo teste T.

Figure 3 – Growth of *Lecanicillium lecanii* cultivated for 18 days at 25 °C and absence of light in culture medium with different C:N:P ratios. \*\*: significant at 1% of probability by the T test. Vertical axis: diameter of the colonies (mm). Horizontal axis: time of incubation (t-days). Equação da reta: straight line equation. The numbers after the comma are decimals. Example: 1,1 = one and one tenth



ser influenciada por qualquer variação ambiental ou nutricional.

O fósforo é um elemento essencial na nutrição, e seu fornecimento em formas químicas adequadas, assim como numa relação otimizada com outros nutrientes fundamentais, como carbono e nitrogênio, pode ser importante para promover o crescimento e a esporulação de fungos. Contudo, os resultados deste trabalho sugerem que outros fatores nutricionais, como vitaminas e aminoácidos ou, mesmo, outros macro e micronutrientes, podem ser necessários para promover o crescimento e a produção de conídios de *L. lecanii*.

## Conclusões

O crescimento e a esporulação dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *L. lecanii* não foram afetados pelas fontes de fósforo utilizadas nos meios de cultura nem estão vinculados às relações C:P e C:N:P do meio. Contudo, as relações C:N:P 10:1:2 e 10:1:1 favoreceram a esporulação do isolado JAB 45.

## Agradecimentos

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp: 00/08483-0), pela concessão de Bolsa de Mestrado à primeira autora.

## Referências

- AARONSON, S. **Experimental microbial ecology**. New York: Academic, 1970. 236p.
- ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.21-37.
- BALARDIN, R. S.; LOCH, L. C. Meios de cultura semi-sintéticos para a produção massal do fungo *Nomuraea rileyi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p.375-381, 1989.
- 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.37, n.6, p.821-829, 2002.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. Fungal cells and vegetative growth. In: CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic, 1994. p.125-128.
- DAHLBERG, K. R.; VAN ETEN, J. L. Physiology and biochemistry of fungal sporulation. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.20, p.281-301, 1982.
- DIXON, W. J.; MASSEY JR., F. J. **Introduction to statistical analysis**. 3.ed. Tokio: McGraw-Hill Kogakusha, 1969. 638p.
- GARRAWAY, M. O.; EVANS, R. C. Inorganic nutrients. In: GARRAWAY, M. O.; EVANS, R. C. **Fungal nutrition & physiology**. New York: John Wiley, 1984. p.124-170.
- GRAJEK, W. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. **Folia Microbiologica**, Prague, v.39, n.1, p.29-32, 1994.
- KHALIL, S. K.; SHAH, M. A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.13, p.329-334, 1985.
- KHALIL, S. K.; TÁBORSKÝ, V. The effect of different media on the growth and sporulation of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. **Agriculture Tropica et Subtropica**, Prague, v.15, p.251-268, 1982.
- LECUONA, R. E.; RIBA, G. **Primeiras etapas del ciclo de desarrollo de hongos entomopatogénos**. Pergamino: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 1991. 30p. (Boletín de Divulgación Tecnológica, 87).
- 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.
- PADIN, S. B.; DAL BELLO, G. M.; VASICEK, A. L. Potencial bioinsecticida de hongos entomopatogénos de plagas en granos almacenados. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v.15, n.1, p.1-7, 1995.
- REDDY, K. B.; BHAT, P. K. Effect of relative humidity and temperature on the biotic agents of green scale *Coccus viridis*. **Journal of Coffee Research**, Balehonnur, v.19, n.2, p. 2-87, 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, Havai. **Proceedings of Hawaiian Entomological Society**, Honolulu, v.31, p.73-82, 1992.
- 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 Paleartique**, Dijon, v.11, n.6, p.56-61, 1988.
- SINGH, B. P.; TANDON, R. N. Phosphorus requirements of certain isolates of *Alternaria tenuis* Auct. Proceedings of the National Academy of Sciences India, Section B, **Biological Sciences**, Allahabad, v.37, p.131-134, 1967a.
- SINGH, B. P.; TANDON, R. N. Sulfur and phosphorus requirements of *Alternaria tenuis* Auct. Isolated from papaya (*Carica papaya* L.) leaf. **Proceedings of the National Academy of Sciences India**, Section B, Biological Sciences, Allahabad, v.37, p.199-203, 1967b.

STEENBERG, T.; HUMBER, R. A. Entomopathogenic potencial of *Verticillium* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.73, p.309-314, 1999.

THOMAS, K. C.; KACHATOURIANS, G. G.; INGLEDEW, W. M. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.33, n.1, p.12-20, 1987.

VAN WINKELHOFF, A .J.; McCOY, C. W. Conidiation of *Hirsutella thompsonii* var. *synnematososa* in submerged culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.43, p.59-68, 1984.

VERHAAR, M. A.; HIJWEGEN, T. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaeroteca fuliginea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v.99, n.2, p.101-103, 1993.

ZARE, R.; GAMS, W. A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The genera **Lecanicillium** and **Simplicillium** gen. nov<sup>o</sup>. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v.73, n.1/2, p.1-50, 2001.

Recebido em 19-1-2005.

Aceito para publicação em 20-9-2005.