

039

EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E DA LUZ NO CRESCIMENTO E NA ESPORULAÇÃO DE *Verticillium lecanii*¹

Rafaela Mazur Bizi²
Albino Grigoletti Júnior³
Celso Garcia Auer³
Maria Sílvia Pereira Leite⁴

RESUMO

Verticillium lecanii é um fungo entomopatogênico empregado no controle microbiológico de insetos, que ocorre freqüentemente sobre pulgões e cochonilhas nas regiões tropicais e subtropicais. Alguns trabalhos relatam a baixa produção de conídios de *V. lecanii* em meios sólidos, o que dificulta a produção de inóculo. Este trabalho teve como objetivo testar meios de cultura sólidos e verificar o efeito da luz na produção de conídios de *V. lecanii*. Foram testados 8 meios de cultura e dois regimes de luminosidade (luz e escuro). As placas foram incubadas em temperatura de laboratório (21 a 25°C). A avaliação foi realizada aos 25 dias por meio da medição do diâmetro das colônias em dois sentidos perpendiculares e pela contagem de conídios. Os resultados mostraram que a presença da luz favoreceu a esporulação de *V. lecanii*, em todos os meios estudados não interferindo sobre o crescimento micelial.

PALAVRAS-CHAVE: fungo, entomopatógeno, controle biológico, arroz

1. INTRODUÇÃO

Verticillium lecanii é um fungo entomopatogênico promissor, empregado no controle microbiano. Ele ocorre freqüentemente sobre pulgões e cochonilhas nas regiões tropicais e subtropicais. Esse fungo também já foi relatado sobre insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e sobre ácaros eriofiídeos (Alves, 1998).

A presença dos insetos contaminados por *V. lecanii* é facilmente determinada em função do aparecimento de um halo branco em sua volta, associado à estrutura característica do conidióforo e dos conídios do fungo (Alves, 1998).

De acordo com Mondgen (1981), citado por Melo & Azevedo (1998), o fungo *V. lecanii* se desenvolve e hiperparasita melhor seus hospedeiros em baixas temperaturas, em torno de 18-22° C, alta umidade relativa do ar, entre 95-100%, e com altas intensidades de luz. Estas condições ocorrem no Brasil em curtos períodos do ano, em áreas produtoras de café, onde o fungo pode ser visto.

V. lecanii apresenta crescimento micelial muito lento em meio sólido, como também uma baixa produção de conídios em meios semi-sólidos e líquidos, o que limita a produção de inóculo (Melo & Azevedo, 1998).

Além de entomopatógeno, *V. lecanii* vem sendo descrito como hiperparasita de ferrugens e oídios (Verhaar et al., 1998 e 1999). Segundo Spencer (1980), citado por Melo & Azevedo (1998), resultados significativos foram obtidos através do controle da ferrugem de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) utilizando conídios de *V. lecanii*.

Segundo Melo & Azevedo (1998) algumas linhagens de *V. lecanii* produzem muitos blastóporos em meio de cultura líquido, no entanto, esses esporos apresentam uma sobrevivência

¹ Trabalho desenvolvido na *Embrapa Florestas*

² Aluna de Biologia das Faculdades Integradas "Espírita"

³ Pesquisador da *Embrapa Florestas* albino@cnpf.embrapa.br

⁴ Turfal Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários Ltda.

extremamente curta, requerendo armazenamento em baixas temperaturas. Para sua utilização faz-se necessária a obtenção de boa produção de massa com abundante esporulação, possibilitando a formulação de produtos à base desse fungo visando aplicá-lo no controle de diversas pragas.

O presente trabalho tem como objetivo testar meios de cultura sólidos e verificar a influência da luz para uma maior produção de conídios de *V. lecanii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia da *Embrapa Florestas*. O fungo *Verticillium lecanii* foi obtido da região de Arapoti e isolado diretamente de pulgões infestados, em meio BDA.

Cada meio foi inoculado, no centro das placas, com um grão de arroz colonizado, obtido de culturas com 25 dias de idade. Foram utilizadas 10 placas para cada meio, onde 5 placas ficaram em ausência de luz (embrulhadas em papel alumínio) e as outras ficaram expostas à luz contínua.

A avaliação foi realizada ao vigésimo quinto dia após a inoculação, através da medição do diâmetro das colônias em duas posições perpendiculares e da contagem dos conídios nos diferentes meios de cultura. Para a contagem de conídios, retirou-se um disco (1 cm diâmetro) contendo micélio e conídios de *Verticillium lecanii* de cada placa dos diferentes meios. Cada disco foi colocado em um tubo de ensaio com 3 ml de água esterilizada e uma gota de corante (Lactoglicerol com azul de algodão) e submetido a agitação por 3 minutos, para liberação dos conídios. Em seguida foi realizada a contagem em Câmara de Neubauer, efetuando-se duas contagens por placa.

Para determinar a produção de conídios em cada meio, multiplicou-se o número de conídios obtidos pela área de crescimento em cada meio no mesmo período.

No presente estudo, foram utilizados os seguintes meios de cultura:

TRATAMENTOS		COMPOSIÇÃO
Meio 1	S.EL.A	4g de sacarose 4g de extrato de levedura 5g de ágar 200 ml de água
Meio 2	Far.A	6g de farinha de arroz 5g de ágar 200 ml de água
Meio 3	Fav.A	6g de farinha de aveia 5g de ágar 200 ml de água
Meio 4	M.EL.Pc.A	8g de maltose 4g de extrato de levedura 2g de peptona carne 5g de ágar 200 ml de água
Meio 5	M.EL.Pc.D.A	8g de maltose 4g de extrato de levedura 2g de peptona carne 4g de dextrose 5g de ágar 200 ml de água
Meio 6	Av.D.A	4g de farinha de aveia Quaker 4g de dextrose 5g de ágar 200 ml de água
Meio 7	Bda.P	7,6g de Bda comercial 5 pulgões (<i>Cinara atlantica</i>) por placa 200 ml de água
Meio 8	Arroz	150g de arroz cozido por 20 minutos 200 ml de água

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 1% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram pequenas diferenças entre os meios, com relação ao crescimento micelial. O meio 4 (Maltose + Extrato de levedura + proteína de carne + Agar), foi o que apresentou o maior crescimento, diferindo apenas do meio de arroz. Não houve efeito da luz sobre o crescimento radial do micélio, nos diferentes meios (Tabela 2). Houve um pequeno incremento no diâmetro das colônias na ausência de luz. O efeito individual da luz em cada meio pode ser melhor visualizado na Figura 1.

Com relação a produção de conídios (Tabela 3), verificou-se que o meio de arroz produziu a maior quantidade de conídios, sendo semelhante aos meios 4 (Maltose + Extrato de levedura + proteína de carne + Agar) e 2 (farinha de arroz Agar). Verifica-se também uma grande variação entre os meios, tanto na presença como na ausência de luz. Observando-se a Tabela 4, verifica-se um grande efeito da luz na produção de conídios. Na Tabela 5 pode-se observar a produção de conídios dos diferentes meios, considerando-se o crescimento individual de cada meio. O efeito da luz em cada meio pode ser visualizado na Figura 2.

Wenzel (2002), verificou que os meios com suplemento de extrato de levedura tiveram melhor desempenho no crescimento nos dois isolados testados, já com relação a esporulação, somente um isolado foi estimulado. No presente trabalho, um dos meios com extrato de levedura proporcionou um bom crescimento e esporulação.

Barbosa et al. (2002), testaram 2 isolados de *V. lecanii* em diferentes meios de cultura e concluíram que BDA em um meio completo foram os melhores. A lactose e o amido foram as fontes de Carbono que mais favoreceram os isolados. Um dos isolados apresentou boa esporulação com glicose e maltose. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente trabalho pois o amido presente no arroz e o meio com maltose favoreceram a esporulação do isolado estudado.

Tabela 1. Efeito dos meios de cultura, no diâmetro das colônias de *Verticillium lecanii*

Tratamentos	Repetições	Médias Originais (cm)	Significância (1%)*
Meio 4	10	6,41	A
Meio 5	10	5,93	AB
Meio 1	10	5,83	AB
Meio 3	10	5,74	AB
Meio 7	10	5,72	AB
Meio 6	10	5,47	AB
Meio 2	10	4,84	BC
Meio 8	10	4,14	C

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado, pelo teste Duncan.

Tabela 2. Efeito da luz no crescimento radial de *Verticillium lecanii*

Luz	Número repetições	Médias originais	Significância* (1%)
Presença	40	5,44	A
Ausência	40	5,58	A

*Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ao nível de significância indicado, pelo teste Duncan.

Tabela 3. Efeito dos meios de cultura, na produção de conídios de *Verticillium lecanii*

	Tratamentos	Repetições	Médias Originais x 10 ⁵	Significância (1%)*
1	Meio 8	10	160,40	A
2	Meio 4	10	63,00	AB
3	Meio 2	10	62,12	AB
4	Meio 3	10	57,84	B
5	Meio 1	10	51,18	B
6	Meio 7	10	42,65	B
7	Meio 6	10	38,06	B
8	Meio 5	10	27,18	B

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado, pelo teste Duncan.

Tabela 4. Efeito da presença ou ausência de luz na produção de conídios de *Verticillium lecanii*.

	Luz	Número repetições	Médias originais	Significância* (1%)
	Presença	40	110,82	A
	Ausência	40	14,80	B

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado, pelo teste Duncan.

Tabela 5. Produtividade de conídios ($\times 10^6$), em função do crescimento radial das colônias nos diferentes meios de cultura, na presença e ausência de luz.

	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Média
Luz	48,18	50,88	45,22	70,86	30,39	38,36	32,50	86,33	50,34
Escuro	6,14	3,83	9,12	7,07	1,95	2,62	13,91	4,28	6,12

Figura 1. Efeito da luminosidade sobre o desenvolvimento das colônias de *Verticillium lecanii* em diferentes meios de cultura.

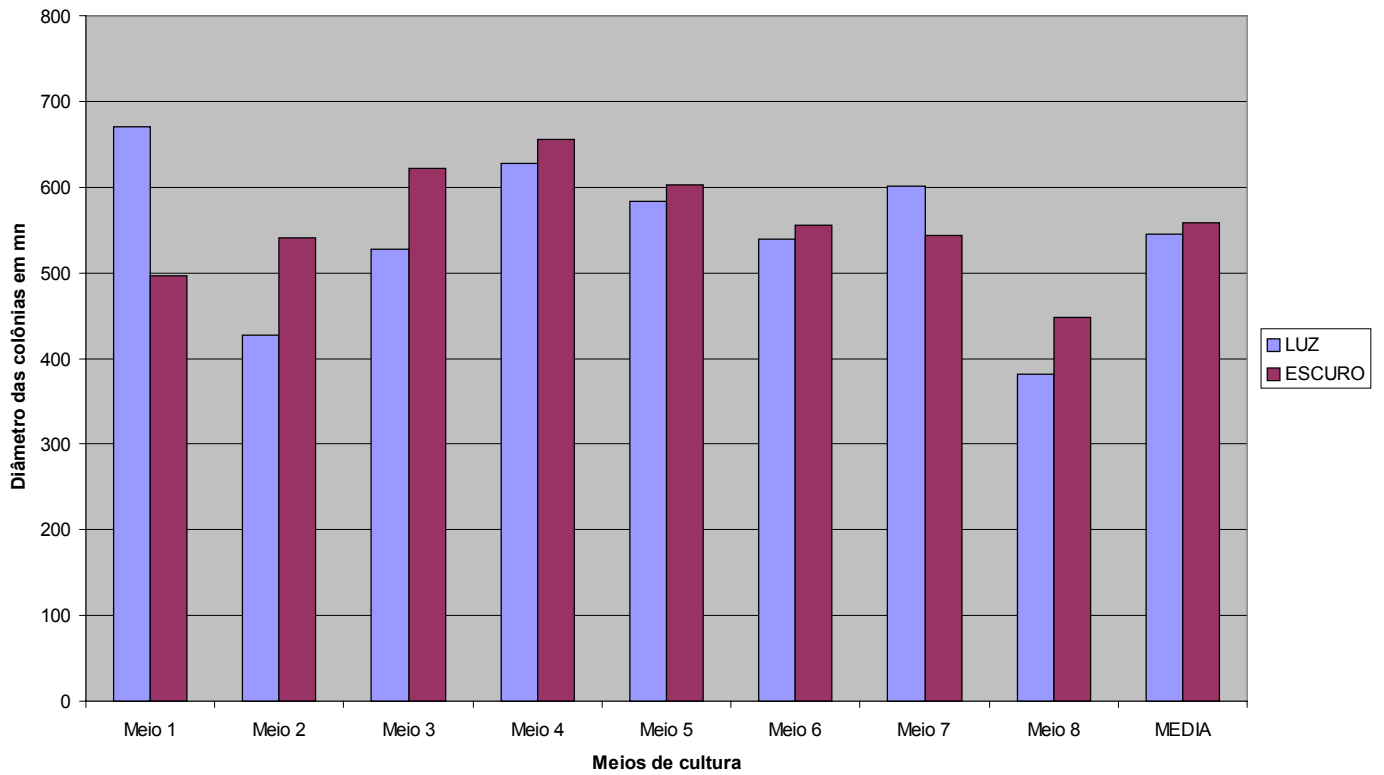
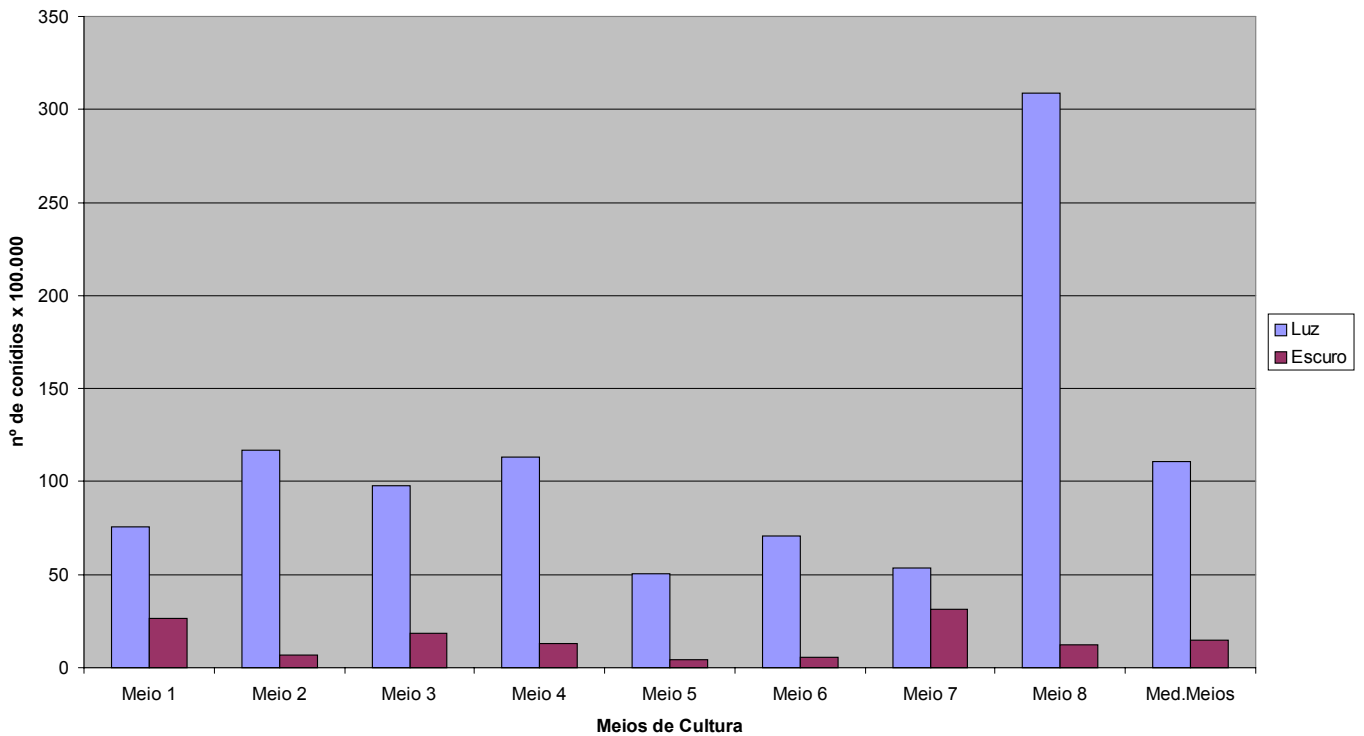


Figura 2. Produção de conídios de *Verticillium lecanii* em diferentes meios de cultura, na presença e ausência de luz



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B., Ed. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1998. 1163 p.
- BARBOSA, C.C.; MONTEIRO, A. C.; CORREIA, A. 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, jun. 2002.
- MELO, I. S. de; AZEVEDO, J.L. de, ed. **Controle biológico**: v. 1. Jaguariúna, SP, Embrapa, 1998. 262 p.
- VERHAAR, M.A.; HIJWEGEN, T. ; ZADOKS, J.C. Selection of *Verticillium lecanii* isolates with high potential for biocontrol of cucumber powdery mildew by means of components analysis at different humidity regimes. **Biocontrol Science and technology**. Wageningen, The Netherlands.n.8, p. 465-477. 1998.
- VERHAAR, M.A.; HIJWEGEN, T. ; ZADOKS, J.C. Improvement of the efficacy of *Verticillium lecanii* *Sphaerotheca fuligena*. **Biocontrol Science and technology**. Wageningen, The Netherlands.n.8, p.73-87. 1999.
- WENZEL, I. M. Fatores nutricionais e produção em massa de *Verticillium lecanii* em meios naturais sólidos e líquidos. 2002. 79 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia) – Setor de Microbiologia, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal.