

FISIOLOGIA VEGETAL

DESEMPENHO DE *LECANICILLIUM LECANII* EM MEIOS DE CULTURA CONTENDO VITAMINAS E CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO DE LEVEDURA ⁽¹⁾

INAJÁ MARCHIZELI WENZEL⁽²⁾; ANTONIO CARLOS MONTEIRO^(3*); GENE TADEU PEREIRA⁽⁴⁾

RESUMO

Para viabilizar a produção massal de fungos entomopatogênicos a serem usados no controle biológico de pragas é importante conhecer as características nutricionais e fisiológicas das espécies e as condições de cultivo que permitam obter bom crescimento com alta esporulação. O presente trabalho objetivou avaliar o desempenho de *Lecanicillium lecanii* cultivado em meios de cultura contendo diferentes vitaminas e concentrações de extrato de levedura. Cultivaram-se os isolados JAB 02 e JAB 45 em meio salino contendo uma solução de vitaminas (tiamina, biotina, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, ácido p-aminobenzóico) ou em meio contendo cada vitamina separadamente. Em seguida, os mesmos isolados foram cultivados em meios suplementados com as seguintes concentrações de extrato de levedura: 0,0; 0,5%; 1,0%; 2,0%; 3,0% e 5,0%. Avaliou-se o crescimento radial medindo-se, a cada três dias, durante dezoito dias, o diâmetro das colônias. A esporulação foi avaliada no 18.º dia, pela contagem de conídios. O meio de cultura contendo todas as vitaminas e aquele apenas com tiamina proporcionaram maior crescimento dos isolados do fungo, mas reduziram a esporulação de JAB 45. O ácido nicotínico estimulou em 38,5% a esporulação deste isolado, mas não houve diferença significativa ($P>0,05$) em relação ao controle. O isolado JAB 02 produziu poucos conídios nos tratamentos com vitaminas, mas houve um incremento da esporulação com a adição de riboflavina, biotina e piridoxina. A suplementação com extrato de levedura, em qualquer concentração, estimulou o crescimento de ambos os isolados e a esporulação de JAB 02, mas não influenciou a produção de conídios por JAB 45, pois não houve diferença significativa ($P>0,05$) nesta produção, nos meios suplementados com quaisquer concentrações do extrato. A concentração de 1,0% pode ser considerada a mais favorável, pois proporcionou os maiores valores de esporulação usando uma das menores quantidades do suplemento.

Palavras-chave: controle biológico, controle de pragas, fisiologia de fungos, fungo entomopatogênico, requisitos nutricionais.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 5 de maio de 2005 e aceito em 13 de fevereiro de 2007.

⁽²⁾ Ex-aluna do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, FCAV/Unesp, Jaboticabal (SP). E-mail: iawenzel@yahoo.com.br

⁽³⁾ Departamento de Produção Vegetal, FCAV/Unesp, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 Jaboticabal (SP). E-mail: montecar@fcav.unesp.br (*) autor correspondente.

⁽⁴⁾ Departamento de Ciências Exatas, FCAV/Unesp. E-mail: genertp@fcav.unesp.br

ABSTRACT

PERFORMANCE OF *LECANICILLIUM LECANII* ON CULTURE MEDIA CONTAINING VITAMINS AND YEAST EXTRACT CONCENTRATIONS

Massal production of entomopathogenic fungi for the biological control of insects should be based on the species' nutritional and physiological characteristics and the conditions that favor high growth and sporulation. The performance of *Lecanicillium lecanii* on culture media with various vitamin and yeast extract concentrations was assessed. The JAB 02 and JAB 45 isolates were grown on media containing a vitamins solution (thiamin, biotin, riboflavin, pyridoxine, nicotinic acid, ρ -amino benzoic acid) or other containing one vitamin at a time. The same isolates were then cultivated on media supplemented with yeast extract concentrations at 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 5.0 %. Mycelia growth was evaluated measuring two colonies diameters, every three days, during the eighteen days incubation period. Sporulation was assessed on the 18th day, by counting the conidia. The culture media containing the all-vitamins and that containing thiamin only provided greater growth of the fungus isolates but decreased JAB 45 sporulation. Nicotinic acid stimulated JAB 45 sporulation by 38.5% but did not differ ($P>0.05$) from the control. Little conidial production was observed for JAB 02 isolate on media containing vitamins, but an increased sporulation was observed with the addition of riboflavin, biotin and pyridoxine. Yeast extract stimulated growth of the isolates JAB 02 and JAB 45 and sporulation of JAB 02 at all concentrations but did not affect ($P>0.05$) conidia production by JAB 45 at any concentration. Concentration of 1.0% led to the highest sporulation values and can, therefore, be considered the most favorable since it represent one of the smaller amounts of supplement used.

Key words: biological control, entomopathogenic fungi, nutritional requirements, fungi physiology, pest control.

1. INTRODUÇÃO

Lecanicillium lecanii (Zimmerman) Zare and Gams [= *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viégas] é um patógeno de várias espécies de hospedeiros como afídeos, coccídeos e aleirodídeos. Por atacar cochonilhas de café e citros, pragas importantes de duas culturas de grande expressão no Brasil, o fungo tem amplo potencial de uso no país, mas há necessidade de conhecer as características nutricionais e fisiológicas de isolados brasileiros, para encontrar meios e condições de cultivo que propiciem bom crescimento com alta esporulação, visando a sua produção em escala comercial.

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, e a influência do pH, temperatura e fotoperíodo foi estudada por MONTEIRO et al. (2004). WENZEL (2002) verificou que o crescimento e a esporulação desses isolados não foram determinados pelas fontes de fósforo nem estão vinculados às relações C:P e C:N:P do meio. Sugeriu-se que outros fatores nutricionais como vitaminas ou outros nutrientes possam estar envolvidos na produção de conídios por *L. lecanii*.

As vitaminas se destacam como importantes fatores de crescimento, pois atuam como mediadores de reações químicas-chave no metabolismo, fazem parte da constituição de coenzimas e são necessárias na síntese de materiais celulares importantes. Todos os fungos necessitam de vitamina, porém divergem bastante

quanto às exigências a elas, podendo diferir no que diz respeito à síntese, quantidade requerida, componentes que constituem etc (GARRAWAY e EVANS, 1984).

Dentre as vitaminas exigidas pelos fungos, a tiamina é freqüentemente a mais requerida (JENNINGS, 1995). A deficiência pode ocorrer em alguns grupos taxonômicos e em fungos de muitos ambientes naturais diferentes. Sua demanda, assim como para outras vitaminas, é influenciada por condições como tempo de incubação, temperatura e composição do meio (GARRAWAY e EVANS, 1984).

A biotina pode afetar a reprodução de vários fungos. É requerida por muitas leveduras e fungos filamentosos. Segundo YAMAGUCHI (1974), pode afetar a composição e estrutura das paredes celulares. O requerimento total é em geral menor do que 5,0 $\mu\text{g/L}$, mas em certos fungos a necessidade pode muitas vezes surpreender (MILTON e ISAAC, 1967). Três isolados de *Phialophora asteris* tiveram crescimento lento em meio definido ausente em biotina, e a adição de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ resultou em marcante estimulação no crescimento, na pigmentação e esporulação (BURGE e ISAAC, 1977). A riboflavina é diretamente formada por muitas leveduras e fungos filamentosos (GARRAWAY e EVANS, 1984), e a piridoxina é menos requerida pelos fungos em relação à biotina e tiamina (JENNINGS, 1995).

Outros nutrientes podem ser acrescentados aos meios de cultivo com o objetivo de incrementar o crescimento e a esporulação dos fungos. O extrato de levedura é bastante utilizado por ser excelente fonte de

vitaminas do complexo B, nitrogênio, aminoácidos entre outros. Analisando o efeito de difenóis no crescimento de três fungos entomopatogênicos, HSIAO et al. (1992) verificaram que o meio com extrato de levedura favoreceu o crescimento de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, sendo menor apenas que o controle e o meio suplementado com difenol. A suplementação do meio de cultivo com extrato de levedura aumentou a produção de conídios e porcentagem de germinação de *Nomuraea rileyi* (BARROS et al., 1988) promoveu maior esporulação do isolado Passo Fundo do mesmo fungo (BALARDIN e LOCH, 1989) e do fungo *Sporothrix insectorum* (OLIVEIRA, 2000).

Poucos trabalhos na literatura enfocaram as necessidades nutricionais de fungos entomopatogênicos, não sendo encontrada nenhuma informação acerca das necessidades de *L. lecanii* em vitaminas ou sobre o efeito da suplementação do meio de cultivo do fungo com extrato de levedura. O presente trabalho teve por objetivo avaliar, por meio do crescimento e esporulação, o desempenho de *L. lecanii* cultivado em meios contendo diferentes vitaminas e concentrações de extrato de levedura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se os isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii*, obtidos da cochonilha verde *Coccus viridis* Green (Hemiptera: Coccidae) coletados em pomares de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck) nos municípios de Ubirajara e São Carlos (SP) respectivamente. Os isolados pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/UNESP.

O cultivo dos isolados foi realizado em placas de Petri de 12 x 80 mm contendo 15 mL dos meios salinos de Czapeck-Dox (composição por litro: NaNO₃ - 0,38g, H₃HPO₄ - 1,19mL, MgSO₄7H₂O - 0,50g, KCl - 0,50g, FeSO₄7H₂O - 0,01g, Maltose - 10,00g, Ágar - 15,00g) para JAB 02 e meio Mínimo de Pontecorvo (composição por litro: NaNO₃ - 0,24g, NH₄H₂PO₄ - 2,97g, MgSO₄7H₂O - 0,52g, KCl - 0,52g, FeSO₄7H₂O - 0,01g, ZnSO₄7H₂O - 0,01g, Glicose - 10,00g, Ágar - 15,00g) para JAB 45, com pH ajustado para 6,5. A escolha dos meios para cultivo dos isolados, bem como o uso de maltose como fonte de carbono no meio de Czapeck-Dox, foi feita de acordo com o trabalho de BARBOSA et al. (2002). Em ambos os meios, modificou-se a fonte de fósforo e usaram-se as relações C:N:P de 60:1:6 para o meio de Czapeck-Dox e de 10:1:2 no meio Mínimo de Pontecorvo, de acordo com o estudo de WENZEL (2002), feito com os mesmos isolados do fungo. As quantidades dos respectivos componentes do meio, necessárias para obter tais relações, foram determinadas por meio de cálculos estequiométricos. Esporos e fragmentos de micélio,

obtidos de culturas jovens do fungo, foram transferidos para o centro da placa, com auxílio de uma agulha de níquel-cromo, em ponto previamente marcado. Em seguida, as culturas foram incubadas a 25 0,5 °C, por 18 dias, em ausência de luz.

No primeiro experimento, prepararam-se, individualmente, em água destilada, soluções de cada uma das seguintes vitaminas (PONTECORVO et al., 1953), adicionadas aos meios de cultura nas concentrações finais de: biotina (Merck) - 0,002 µg/mL de meio, tiamina (Sigma) - 0,5 µg/mL de meio, ácido p-aminobenzóico (para) (Carlo Erba) - 0,1 µg/mL de meio, riboflavina (Merck) - 1 µg/mL de meio, ácido nicotínico (Carlo Erba) - 1 µg/mL de meio e piridoxina (Merck) - 0,5 µg/mL de meio. Após o preparo, cada solução foi acondicionada em frasco escuro, fervida em banho-maria por 15 minutos e conservada em refrigerador após receber uma gota de clorofórmio. Cada solução de vitamina foi individualmente adicionada ao meio de cultivo, constituindo os tratamentos do experimento. Uma solução contendo todas as vitaminas, usadas nas mesmas concentrações e com mesmo preparo, constituiu outro tratamento. Os meios salinos sem a adição de qualquer vitamina serviram como controle. As soluções de vitaminas foram adicionadas aos meios após sua autoclavação.

No segundo ensaio, suplementaram-se os meios salinos com as seguintes concentrações de extrato de levedura (Biobrás): 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0%.

Para a avaliação do crescimento radial das colônias, em ambos os ensaios, dois diâmetros foram marcados na parte externa do fundo das placas de Petri. Mediram-se esses diâmetros com régua milimétrica graduada, a cada três dias, por 18 dias de incubação.

A avaliação da produção de esporos foi realizada no 18.º dia de incubação. Aleatoriamente, escolheram-se três placas (repetições) de cada tratamento. Da região central e periférica de cada colônia retiraram-se, com auxílio de um furador metálico de rolha, dois discos de 8 mm de diâmetro. Os discos foram transferidos individualmente para tubos de ensaio contendo 10 mL de uma mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89% p/v) e Tween 80® (0,1% v/v). Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, os conídios foram contados em câmara de Neubauer. Com os valores das contagens de conídios obtidos de discos retirados de uma mesma colônia, obteve-se uma média. Com essa média, calculou-se a densidade de conídios por unidade de área (mm²) de disco, e a partir desta, calculou-se a quantidade de conídios produzidos pela área total da colônia, usando-se para isso seu diâmetro no 18.º dia de incubação. A quantidade de conídios obtida para a área total de cada colônia de um mesmo tratamento foi considerada uma repetição do experimento.

Os experimentos foram organizados segundo o delineamento inteiramente casualizado e para a execução das análises estatísticas utilizaram-se os programas ESTAT 2.0; SAS 6.0 (1995). Para avaliação do crescimento radial da colônia foram feitas cinco repetições e os dados analisados por meio de regressão linear, seguida de teste de paralelismo (Teste T) e coincidência (Teste F) entre retas (DIXON e MASSEY JR, 1969). Para a esporulação, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 1% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio do desdobramento da interação significativa ($P < 0,01$) entre vitaminas e o tempo, verificou-se que o crescimento dos isolados nos meios com as diversas vitaminas, diferiu nos tempos de cultivo (Tabela 1). Concordando com o desdobramento da interação, o teste de Paralelismo e Coincidência entre retas (Figura 1) revelou que a solução com todas as vitaminas ($T = -3,07^{**}$ para JAB 02 e $T = -2,93^{**}$ para JAB 45) e a solução com tiamina ($T = -2,05^*$ para JAB

02 e $T = -3,72^{**}$ para JAB 45) proporcionaram melhor desempenho dos isolados no fim dos dezoito dias de cultivo, embora a adição da maior parte das vitaminas separadamente não tenha incrementado o crescimento dos isolados em relação ao controle.

A esporulação de JAB 45 foi influenciada pela adição de vitaminas ao meio de cultivo (Tabela 2). No tratamento com tiamina ocorreu redução da esporulação. As demais vitaminas não incrementaram a esporulação de JAB 45, mas com o ácido nicotínico ocorreu um pequeno estímulo, pois nesse tratamento o fungo produziu 38,5% mais conídios que o controle, apesar de não ter sido detectada diferença significativa ($P > 0,05$) em relação a este. Nesse experimento, a esporulação do isolado JAB 02 foi acentuadamente menor que a obtida por JAB 45 nos mesmos tratamentos (Tabela 2). As colônias de JAB 02 cresceram, na média de todos os tratamentos, 4,8 mm a mais que as colônias do isolado JAB 45 no 18.º dia de cultivo, mas com aspecto bastante cotonoso, evidenciando pequena esporulação. Apesar disso, nos tratamentos com riboflavina, biotina e piridoxina se observou um incremento na esporulação de JAB 02.

Tabela 1. Valores do crescimento radial médio (mm) no desdobramento dos graus de liberdade da interação dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii*, pelo tempo, em meio de cultura contendo diferentes vitaminas. $T = 25 \pm 0,5$ °C e em ausência de luz

Vitamina	Dias de cultivo					
	3	6	9	12	15	18
JAB 02 (1)						
Biotina	5,7 a	12,9 a	19,3 a	26,6 a	31,4 a	37,1 b
Tiamina	6,7 a	14,1 a	20,7 a	27,4 a	33,3 a	40,1 a
Ácido p-aminobenzóico	6,2 a	12,1 a	18,7 a	24,6 a	29,9 a	34,7 b
Piridoxina	5,7 a	12,0 a	17,7 a	26,0 a	30,6 a	35,7 b
Riboflavina	6,6 a	13,6 a	19,9 a	26,0 a	30,1 a	36,0 b
Ácido nicotínico	6,1 a	11,7 a	17,6 a	23,5 a	27,7 b	32,9 bc
Todas as vitaminas	6,2 a	14,0 a	21,1 a	27,7 a	34,1 a	40,8 a
Ausência de vitaminas	5,5 a	12,6 a	17,9 a	24,0 a	29,1 a	33,9 b
JAB 45 (2)						
Biotina	6,7 a	12,7 a	18,1 a	23,1 a	27,4 a	32,0 b
Tiamina	7,6 a	13,1 a	18,9 a	24,9 a	30,0 a	35,2 a
Ácido p-aminobenzóico	7,0 a	12,4 a	17,0 a	22,0 b	6,5 b	30,6 b
Piridoxina	7,2 a	12,2 a	17,4 a	22,4 a	6,3 b	30,6 b
Riboflavina	7,8 a	11,3 a	16,0 b	20,8 b	4,8 b	29,2 b
Ácido nicotínico	7,4 a	12,1 a	16,8 a	21,4 b	5,8 b	30,1 b
Todas as vitaminas	8,2 a	13,3 a	19,4 a	24,7 a	9,9 a	35,3 a
Ausência de vitaminas	7,5 a	12,2 a	17,1 a	21,3 b	5,5 b	30,0 b

(1) Cultivado em meio de Czapeck-Dox, contendo maltose como fonte de carbono; NaNO_3 como fonte de nitrogênio, H_3HPO_4 como fonte de fósforo e relação C:N:P de 60:1:6.

(2) Cultivado em meio Mínimo de Pontecorvo, contendo glicose como fonte de carbono; NaNO_3 como fonte de nitrogênio; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como fonte de fósforo e relação C:N:P de 10:1:2.

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

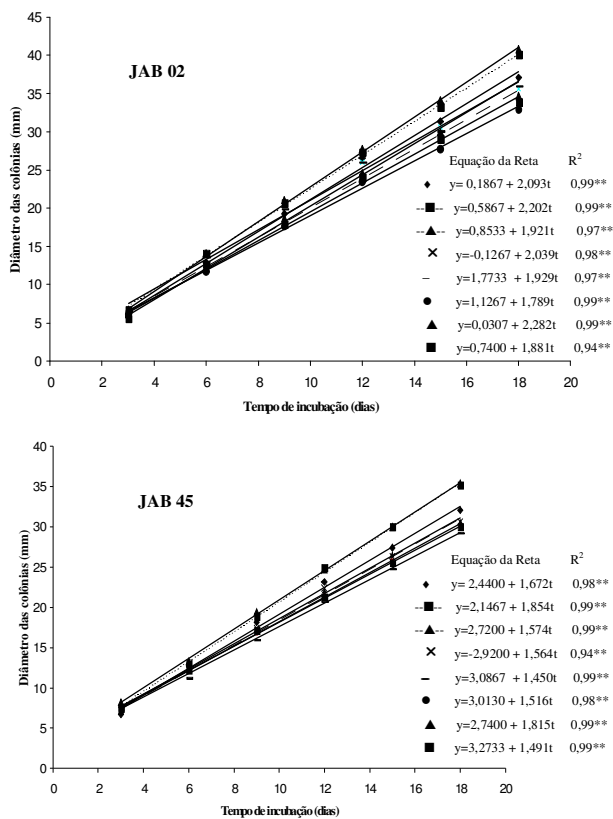


Figura 1. Crescimento de *Lecanicillium lecanii* cultivado por dezoito dias a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e em ausência de luz, em meios contendo diferentes vitaminas [Biotina (\blacklozenge); Tiamina ($- \blacksquare -$); Ácido ρ -aminobenzóico ($- \blacktriangle -$); Piridoxina (\times); Riboflavina ($-$); Ácido Nicotínico (\bullet); Todas as vitaminas (\blacktriangle); Ausência de vitaminas (\blacksquare)]. ** significativo a 1% de probabilidade.

O resultado sugere que o estímulo metabólico da adição de vitaminas foi prioritariamente canalizado para incrementar o crescimento, e que, possivelmente, outro fator nutricional seja necessário para promover a esporulação de JAB 02.

Os meios de Czapeck-Dox e Mínimo de Pontecorvo, usados para o cultivo dos isolados, são meios salinos com limitada disponibilidade em nutrientes. Com a adição das vitaminas esperava-se detectar, por meio de um possível incremento no crescimento e na esporulação, a exigência do fungo por algum desses nutrientes, mas isso não ocorreu. A evidência mais clara foi a de que tiamina pode favorecer o crescimento do fungo. Contudo, efeito inverso obteve-se quando a esporulação do isolado JAB 45 foi reduzida em presença dessa vitamina. O mesmo fenômeno ocorreu usando-se a solução com todas as vitaminas, mas, nesse caso, a presença de tiamina na solução certamente foi o fator determinante do resultado. É possível que a tiamina tenha favorecido a ocorrência de reações químicas do

Tabela 2. Esporulação dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* após cultivo, por 18 dias, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e em ausência de luz, em meio contendo diferentes vitaminas

Vitamina	n.º de conídios $\times 10^5$ (¹)	
	JAB 02 (²)	JAB 45 (³)
Ausência de vitamina	0,07 c	16,87 ab
Ácido nicotínico	0,70 bc	23,37 a
Piridoxina	1,16 ab	15,47 abc
Biotina	1,16 ab	15,40 abc
Riboflavina	1,77 a	11,03 bc
Ácido ρ -aminobenzóico	0,70 bc	10,73 bc
Todas as vitaminas	0,97 abc	11,43 bc
Tiamina	0,63 bc	8,53 c
Teste F	7,12**	8,16**
C.V. (%)	36,05	20,29

(¹) Valores calculados para a área total da colônia.

(²) Cultivado em meio de Czapeck-Dox, contendo maltose com fonte de carbono; NaNO_3 como fonte de nitrogênio; H_3HPO_4 como fonte de fósforo e relação C:N:P de 60:1:6.

(³) Cultivado em meio Mínimo de Pontecorvo, contendo glicose como fonte de carbono; NaNO_3 como fonte de nitrogênio; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como fonte de fósforo e relação C:N:P de 10:1:2.

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.

metabolismo do fungo que resultaram em melhor exploração dos recursos nutricionais do meio de cultura, promovendo o crescimento, o que pode ter diminuído a disponibilidade de nutrientes para a produção de conídios. Contudo, muitos fungos esporulam quando não há mais nutrientes para o crescimento vegetativo. De acordo com JENNINGS (1995), fungos são frequentemente auxotróficos para tiamina. As exigências em vitaminas e sua ação no metabolismo dos fungos são bastante diversificadas e generalizações são difíceis de serem feitas.

O efeito de vitaminas no desempenho de outros fungos foi investigado por alguns autores, mas os resultados são diversos e por vezes discrepantes. GREGHI (1987) observou que a adição de solução de vitaminas ao meio de cultivo incrementou a produção de conídios pelo isolado E9 de *M. anisopliae*. CAMERON (1966) verificou que espécies do gênero *Phytophthora* cresceram melhor em meio contendo tiamina, mas reduziram o crescimento quando o ácido nicotínico foi colocado com esta vitamina. Segundo BARNETT e AYERS (1981), o isolado CS-1 de *Sporidesmium sclerotivorum* não cresceu em meio com ausência de tiamina, pois há necessidade absoluta dessa vitamina para o crescimento do fungo.

A adição de biotina com tiamina incrementou o crescimento, indicando uma deficiência parcial dessa vitamina.

Os resultados contidos neste trabalho estão congruentes com os obtidos por esses autores, pois a presença de tiamina no meio de cultivo incrementou o crescimento de ambos os isolados de *L. lecanii*. Entretanto, SILVA e MELO (1999) verificaram que a adição de tiamina ao meio sintético resultou em menor crescimento de *Alternaria alternata* do que o obtido com biotina e piridoxina, mas favoreceu a esporulação do fungo. Em nossos ensaios, a presença de tiamina reduziu a esporulação de JAB 45. De acordo com LI e HOLDON (1995), o crescimento e a esporulação dos isolados EF 25 e EF 55 de *M. anisopliae* não foram incrementados pela adição de várias vitaminas, entre as quais a tiamina. A presença de piridoxina reduziu significativamente o crescimento de EF 25 e a esporulação desse isolado e de EF 55, enquanto biotina e riboflavina reduziram a esporulação de EF 55.

O crescimento dos isolados de *L. lecanii* avaliados neste trabalho não foi afetado pela presença de piridoxina, biotina e riboflavina, mas houve um

incremento na esporulação de JAB 02 em presença dessas vitaminas.

O efeito da suplementação do meio de cultivo com as diferentes concentrações de extrato de levedura, no crescimento radial do isolado JAB 02, pode ser mais bem analisado por meio do desdobramento da interação significativa ($P < 0,01$) entre o extrato e o tempo. A análise do desdobramento dessa interação revelou que já na primeira medição (três dias), houve efeito da suplementação, pois no meio isento de extrato de levedura o crescimento do isolado foi menor (Tabela 3).

Esse resultado foi ratificado pelo teste de Paralelismo e Coincidência entre retas que mostrou maior desenvolvimento do isolado nas concentrações de 0,5 ($T = -5,15^{**}$), 1,0 ($T = -6,19^{**}$), 2,0 ($T = -8,97^{**}$), 3,0 ($T = -7,90^{**}$) e 5,0 % ($T = -9,10^{**}$) de extrato de levedura quando comparados com a testemunha. Entretanto, quando os crescimentos obtidos nessas concentrações foram comparados dois a dois pelo teste de Paralelismo e Coincidência entre retas verificou-se que o crescimento do isolado JAB 02 foi mais efetivo com a adição de 5% de extrato de levedura (Figura 2).

Tabela 3. Valores do crescimento radial médio (mm) no desdobramento dos graus de liberdade da interação dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii*, pelo tempo, em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de extrato de levedura. $T = 25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e em ausência de luz

Concentração de extrato de levedura (%)	Dias de cultivo					
	3	6	9	12	15	18
JAB 02⁽¹⁾						
0,0	6,6 b	11,7 b	16,7 b	21,8 b	26,5 b	28,4 b
0,5	8,5 a	13,3 a	20,5 a	26,1 a	31,1 a	36,1 a
1,0	8,7 a	14,2 a	20,9 a	26,5 a	31,9 a	36,8 a
2,0	8,5 a	14,5 a	21,5 a	27,1 a	32,6 a	38,2 a
3,0	7,4 a	13,4 a	20,3 a	26,0 a	31,4 a	37,1 a
5,0	7,5 a	13,1 a	20,7 a	27,3 a	32,9 a	38,3 a
JAB 45⁽²⁾						
0,0	8,5 a	12,9 a	17,6 b	21,3 b	24,9 b	28,0 b
0,5	8,9 a	14,5 a	20,7 a	26,0 a	31,5 a	37,4 a
1,0	9,0 a	14,3 a	21,0 a	26,3 a	32,2 a	37,6 a
2,0	8,3 a	14,1 a	21,2 a	26,8 a	32,5 a	38,0 a
3,0	7,6 a	12,8 a	19,5 a	24,9 a	31,5 a	37,0 a
5,0	7,2 a	12,4 a	19,7 a	25,6 a	32,7 a	38,3 a

(¹) Cultivado em meio de Czapeck-Dox, contendo maltose com fonte de carbono; NaNO_3 como fonte de nitrogênio; H_3HPO_4 como fonte de fósforo e relação C:N:P de 60:1:6.

(²) Cultivado em meio Mínimo de Pontecorvo, contendo glicose como fonte de carbono; NaNO_3 como fonte de nitrogênio; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como fonte de fósforo e relação C:N:P de 10:1:2.

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

O crescimento do isolado JAB 45 foi influenciado ($P < 0,05$) pela suplementação do meio de cultivo com as diferentes concentrações de extrato de levedura, e a análise do desdobramento da interação significativa ($P < 0,01$) entre o extrato e o tempo permitiu verificar que a partir do 9.º dia, a suplementação estimulou o crescimento do isolado (Tabela 3). Esse resultado foi confirmado pelo teste de Paralelismo e Coincidência entre retas quando se constatou melhor desempenho do isolado nas concentrações de 0,5 ($T = -9,13^{**}$), 1,0 ($T = -14,31^{**}$), 2,0 ($T = -14,33^{**}$), 3,0 ($T = -14,18^{**}$) e 5,0 % ($T = -14,58^{**}$), ao ser comparado à testemunha. Quando os crescimentos obtidos nessas concentrações foram comparados dois a dois, verificou-se que 5,0% foi mais favorável ao desenvolvimento desse isolado (Figura 2).

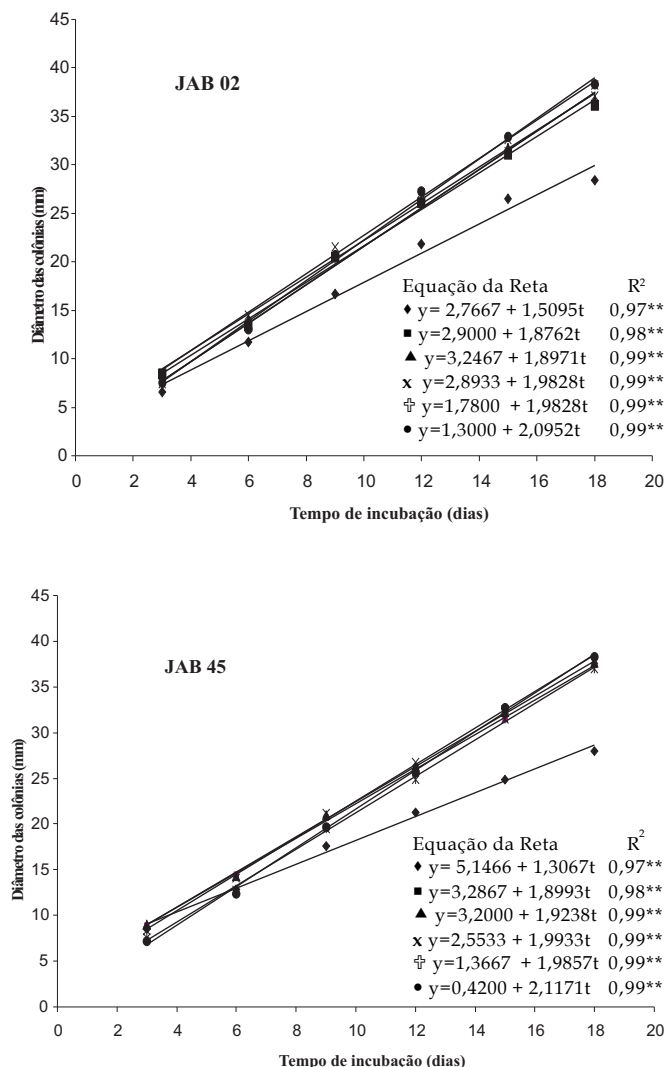


Figura 2. Crescimento de *Lecanicillium lecanii* cultivado por dezoito dias a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e em ausência de luz, em meios suplementados com diferentes concentrações de extrato de levedura [0,0% (◆); 0,5% (■); 1,0% (▲); 2,0% (×); 3,0% (♠); 5,0% (●)]. ** significativo a 1% de probabilidade.

A suplementação com as diferentes concentrações de extrato de levedura teve efeito significativo apenas na esporulação do isolado JAB 02 (Tabela 4), estimulando a produção de conídios. Não houve diferença entre as concentrações de 0,5 e 2,0%, mas pode se destacar a concentração de 1,0% que propiciou a melhor esporulação ($14,87 \times 10^5$ conídios), utilizando uma das menores quantidades do suplemento. A suplementação com o extrato de levedura afetou a esporulação do fungo de modo diverso do observado para a adição de vitaminas.

Quando se consideraram todos os tratamentos com o extrato de levedura, os crescimentos médios das colônias de ambos os isolados, no 18.º dia de incubação, foram bastante semelhantes (35,82 mm para JAB 02 e 36,05 mm para JAB 45). Para JAB 02 verificaram-se maiores valores de esporulação do que em JAB 45, diferentemente do que ocorreu no experimento com vitaminas.

Tabela 4. Esporulação dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* após cultivo, por 18 dias, a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e em ausência de luz, em meio suplementado com diversas concentrações de extrato de levedura

Concentração de extrato de levedura %	n.º de conídios $\times 10^5$ (1)	
	JAB 02 (2)	JAB 45 (3)
0,0	0,32 c	3,45 a
0,5	11,80 ab	6,97 a
1,0	14,87 a	6,50 a
2,0	12,64 ab	5,90 a
3,0	7,62 b	3,83 a
5,0	6,59 bc	4,59 a
Teste F	14,00**	2,67n.s.
C.V. (%)	27,16	29,67

(1) Valores calculados para a área total da colônia.

(2) Cultivado em meio de Czapeck-Dox, contendo maltose como fonte de carbono; NaNO_3 como fonte de nitrogênio; H_3HPO_4 como fonte de fósforo e relação C:N:P de 60:1:6.

(3) Cultivado em meio Mínimo de Pontecorvo, contendo glicose como fonte de carbono; NaNO_3 como fonte de nitrogênio; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como fonte de fósforo e relação C:N:P de 10:1:2.

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.

n.s: não significativo.

C.V: Coeficiente de Variação.

O extrato de levedura incrementou o crescimento de ambos os isolados e a esporulação de JAB 02. Esses resultados se assemelham aos obtidos por outros autores. Estudando a produção em larga escala de *Hirsutella thompsonii*, em cultura submersa, McCoy et al. (1972) obtiveram melhor desempenho na presença do extrato de levedura em relação a peptona, ambos utilizados em concentrações iguais. Também verificaram aumento na produção quando a concentração do extrato de levedura passou para 5mg/mL, mas em concentração maior, o extrato teve efeito inibitório. DEVI (1994) verificou que a adição de 1,0% do extrato de levedura ao meio de cultura com sorgo moído aumentou acentuadamente a esporulação de *N. rileyi*.

MONTEIRO (1988) obteve maior crescimento e esporulação de *B. bassiana*, e ainda maior esporulação de *M. anisopliae* e *Paecilomyces marquandii*, em meio contendo extrato de levedura. ROMBACH et al. (1988) observaram que o maior número de conídios/mg de micélio seco de *B. bassiana* foi produzido no meio com concentração de 0,75% de extrato de levedura. BARROS et al. (1988) verificaram que o meio contendo este extrato foi o que induziu maior porcentagem de germinação de conídios de três linhagens de *N. rileyi*, em comparação a outros meios testados. OLIVEIRA (2000) obteve aumento significativo na esporulação do fungo *S. insectorum* suplementando o meio com o mesmo extrato na concentração de 0,5%. KAMP e BIDOCHKA (2002) observaram que *V. lecanii* produziu maior quantidade de conídios em meio de peptona-agar-extrato de levedura.

O incremento no crescimento dos isolados e o fato de JAB 02 ter produzido mais conídios em presença de extrato de levedura, sugere que algum fator nutricional presente neste substrato seja necessário para promover o crescimento e a esporulação do fungo. O extrato de levedura, excelente fonte de vitaminas do complexo B e outros fatores para o crescimento e a esporulação dos fungos (BARNES et al., 1975), é usado como fonte de nitrogênio para o crescimento de fungos (KULKARNI e NIELSEN, 1986) e contém aminoácidos, peptídeos, vitaminas e carboidratos solúveis em água (SIKYTA, 1983). Provavelmente, a utilização de alguns destes nutrientes ou o seu conjunto pelo fungo, foi responsável pelo incremento obtido no crescimento e na produção de conídios.

Pelos resultados, verifica-se que a adição de vitaminas não contribuiu para incrementar a esporulação, mas a suplementação do meio de cultivo com baixa concentração de extrato de levedura (1,0%) pode favorecer o crescimento e a esporulação de *L. lecanii*. A produção comercial do fungo em larga escala

deve ser feita empregando-se substratos de baixo custo e fácil obtenção, geralmente grãos ou resíduos agroindustriais. Alguns desses substratos podem necessitar de suplementação com nutrientes importantes para o crescimento e a esporulação do fungo. Para a utilização no controle biológico é importante que a produção massal resulte na maior quantidade possível de conídios, que são as unidades infectivas mais adequadas para a formulação de bioprodutos e o desenvolvimento da doença em insetos. Desse modo, o uso de baixa concentração de extrato de levedura é um aspecto interessante a ser considerado, pois permitiria incrementar a produção de conídios, sem onerar demasiadamente os custos de produção. Os isolados do fungo possuem algumas diferenças nas respostas à adição dos nutrientes ao meio de cultivo. Provavelmente, essas diferenças se devem à variabilidade genética entre os isolados.

4. CONCLUSÕES

1. A adição ao meio de cultura da solução de tiamina e solução com todas as vitaminas favorece o crescimento dos isolados, mas reduz a produção de conídios por JAB 45.

2. A adição das soluções de riboflavina, biotina e piridoxina incrementam a esporulação de JAB 02 e a de ácido nicotínico estimula a produção de conídios por JAB 45.

3. A suplementação do meio com extrato de levedura promove o crescimento de ambos os isolados e a esporulação de JAB 02, mas não tem efeito na produção de conídios pelo isolado JAB 45. A concentração de 1% é a mais favorável para suplementar o meio de cultivo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº 00/08483-0) pela concessão de bolsa de mestrado à primeira autora.

REFERÊNCIAS

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.
- BARNES, G.L.; BOETHEL, D.J.; EIKENBARY, R.D.; CRISWELL, J.T.; GENTRY, C.R. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 25, p. 301-305, 1975.
- BARNETT, E.A.; AYERS, W.A. Nutricional and environmental factors affecting growth and sporulation of *Sporidesmium sclerotivorum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, p. 685-691, 1981.
- BARROS, N.M.; RICARDO, K.R.; FACCHIN, I. Estudo do crescimento e germinação conidial de linhagens do fungo *Nomuraea rileyi* em diferentes substratos. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 163-167, 1988.
- BURGE, M.N.; ISAAC, I. Growth responses to biotin by *Phialophora asteris*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 68, p. 451-453, 1977.
- CAMERON, H.R. Viability in the genus *Phytophthora*. II. Effects of vitamins on growth. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 56, p. 812-815, 1966.
- DEVI, P.S.V. Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera litura* (Fab.) on *Ricinus communis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v. 63, p. 145-150, 1994.
- DIXON, W.J.; MASSEY JR., F.J. **Introduction to statistical analysis**. 3.ed. Tóquio: Mc Graw-Hill Kogakusha, 1969. 638p.
- ESTAT - Sistema para análises estatísticas, V. 2.0 (livre), 1995, Departamento de Ciências Exatas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download2/softweres/estat/>
- GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. Vitamins and growth factors. In: GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. (Ed.). **Fungal Nutrition & Physiology**. New York: John Willey, 1984. p. 171-212.
- GREGHI, J.E. **Efeitos de diferentes meios de cultura sobre o desenvolvimento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, 1883 e sua virulência sobre lagartas da broca da cana (*Diatraea saccharalis* Fabricius, 1974)**. 1987. 101f. Trabalho de Graduação (Curso de Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Jaboticabal, 1987.
- HSIAO, W.F.; BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Effects of diphenols on the growth of three entomopathogenic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.1000-1003, 1992.
- JENNINGS, D.H. **The physiology of fungal nutrition**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, 622p.
- KAMP, A.M.; BIDOCHKA, M.J. Conidium production by three species of insect pathogenic fungi on commercially available agars. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, p. 74-77, 2002.
- KULKARNI, R.K.; NIELSEN, B.D. Nutritional requirements for growth of a fungus endophyte of tall fescue grass. **Mycologia**, New York, v. 78, n. 5, p. 781-786, 1986.
- LI, D.P.; HOLDOM, D.G. Effects of nutrients on colony formation, growth, and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.65, p.253-260, 1995.
- McCOY, C.W.; HILL, A.J.; KANAVAL, R.F. A liquid medium for the large-scale production of *Hirsutella thompsonii* in submerged culture. **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.19, p.370-374, 1972.
- MILTON, J.M.; ISAAC, I. Studies on a biotin requiring strain of *Verticillium dahliae*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.50, p.539-547, 1967.
- MONTEIRO, A.C. **Aspectos fisiológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus)**. 1988. 233f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- 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.
- OLIVEIRA, S.M.C. **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 - Unesp, Jaboticabal, 2000.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; MacDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v.5, p.141-238, 1953.
- ROMBACH, M.C.; AGUDA, R.M.; ROBERTS, D.W. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. **Entomophaga**, Paris, v. 33, n. 3, p. 315-324, 1988.
- S.A.S. INSTITUTE INC. S.A.S./STAT. **User's guide release 6, 12 TS level 0020**. Cary, 1995, p. 519-548.
- SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S.. Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria alternata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.3, p. 499-503, 1999.
- SIKTA, B. **Methods in industrial microbiology**. Chichester: Ellis Horwood, 1983, 349p.
- 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 - Unesp, Jaboticabal, 2002.
- YAMAGUCHI, E. Effect of biotin insufficiency on the composition and ultrastructure of cell walls of *Candida albicans* in relation to its mycelial morphogenesis. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v.20, p.217-228, 1974.