

ÁREAS BÁSICAS

PRODUÇÃO DE *BIPOLARIS EUPHORBIAE* EM MEIOS DE CULTURA SÓLIDOS E LÍQUIDOS OBTIDOS DE GRÃOS E RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS ⁽¹⁾

MARA CRISTINA PENARIOL ⁽²⁾; ANTONIO CARLOS MONTEIRO ^(3*);
ROBINSON ANTONIO PITELLI ⁽⁴⁾; GENER TADEU PEREIRA ⁽⁵⁾

RESUMO

A introdução de *Bipolaris euphorbiae* como bioagente de controle de *Euphorbia heterophylla* é dependente da produção de conídios em grande quantidade. No presente trabalho, objetivou-se definir meios de cultura sólidos e líquidos, obtidos de grãos ou resíduos da agroindústria, eficazes para a produção de conídios de *B. euphorbiae*. No preparo dos meios sólidos utilizaram-se grãos de arroz, trigo e sorgo, quirelas de arroz, milho e trigo, sorgo moído, farelos de arroz, trigo e soja, cascas de mandioca e soja, casca de mandioca + farelo de soja, bagaço de cana e bagaço de cana + amido solúvel. No preparo dos meios líquidos, utilizaram-se grãos de arroz, sorgo e trigo, quirela de milho, farelos de trigo, soja e arroz, casca de mandioca e soja, vinhaça de cana e água de prensa da mandioca. Avaliaram-se a produção e a viabilidade dos conídios e a virulência do fungo e, nos meios líquidos, também a biomassa. A produção de conídios é influenciada pelo tipo de meio de cultura, sendo acentuadamente maior nos meios sólidos, destacando-se, como substratos, o sorgo em grão (474×10^6 conídios g^{-1}) e a casca de soja (472×10^6 conídios g^{-1}). Dentre os meios líquidos obteve-se mais produção usando-se farelo de trigo ($1,33 \times 10^6$ conídios mL^{-1}). A virulência e a viabilidade de *B. euphorbiae* não são afetadas pelo preparo de meios sólidos ou líquidos e pela composição nutricional dos meios de cultura. Na maioria dos meios sólidos ou líquidos obteve-se viabilidade de conídios maior que 98%; apenas os conídios produzidos nos meios sólidos de quirela de arroz, casca de mandioca + farelo de soja e farelo de soja estavam com viabilidade significativamente menor.

Palavras-chave: controle biológico, planta daninha, substratos naturais, esporulação, viabilidade, virulência.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 18 de setembro de 2006 e aceito em 27 de maio de 2008.

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

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

⁽⁴⁾ Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV/UNESP, Jaboticabal (SP). E-mail: pitelli@fcav.unesp.br

⁽⁵⁾ Departamento de Ciências Exatas, FCAV/UNESP, Jaboticabal (SP). E-mail: genertp@fcav.unesp.br

ABSTRACT

PRODUCTION OF *BIPOLARIS EUPHORBIAE* IN SOLID AND LIQUID CULTURE MEDIA OBTAINED FROM GRAINS AND AGRICULTURAL INDUSTRY RESIDUES

The introduction of *Bipolaris euphorbiae* as a bioagent for *Euphorbia heterophylla* control depends on fungal conidia production in large amount. This work evaluate to solid and liquid culture media obtained from grains and residues from agriculture industries for conidial production of *B. euphorbiae*. The fungus was cultivated in different solid media obtained from grains of rice, wheat and sorghum, cracked rice, corn and wheat, ground sorghum, rice, wheat and soybean brans, cassava and soybean peels, cassava peel + soybean bran, sugar-cane bagasse and sugar-cane bagasse + soluble starch. The liquid media were obtained from grains of rice, sorghum and wheat, cracked corn, wheat, soybean and rice bran, cassava and soybean peels, sugar-cane vinasse and water from cassava bran production. The production and viability of conidia and virulence of the fungus were evaluated, and in liquid media assay the micelial biomass was also mesuared. The conidial production is influenced by the type of culture medium and was higher on solid media. The larger productions were obtained using sorghum grains and soybean peel as substrates (474×10^6 conidia g^{-1} and 472×10^6 conidia g^{-1} , respectively). Among the liquid media, the larger conidial production was verified using wheat bran as substrate (1.33×10^6 conidia ml^{-1}). The fungal virulence and viability of *B. euphorbiae* is not affected by the preparation of solid or liquid media and by the composition of the culture medium. The conidial viability obtained from most solid and liquid media was greater than 98%. Only conidia produced in the solid media obtained from cracked rice, cassava + soybean peels and soybean bran showed significantly lower viability.

Keys word: biological control, weed, natural substrates, sporulation, viability, virulence.

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Bipolaris euphorbiae* é considerado um potencial agente para o controle biológico do amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) em cultivos de soja. Embora seja de fácil multiplicação em laboratório (GAZZIERO e YORINORI, 1993), para sua introdução em programas de manejo de plantas daninhas, é essencial que sejam realizados estudos básicos de sua biologia e de interação com o hospedeiro. Além disso, é de fundamental importância a determinação das condições favoráveis para o crescimento e a esporulação do fungo e o estabelecimento de um método eficiente para a produção massal.

A composição nutricional do meio de produção pode ter efeito marcante na eficácia dos propágulos, destacando-se o biocontrole e a estabilidade durante o armazenamento (JACKSON et al., 1996). Segundo BOYETTE et al. (1991), a produção de inóculo de agentes de biocontrole de plantas daninhas, em pequena escala, pode ser obtida em meios de cultura como suco V8 ou ágar-nutriente. Embora a técnica de cultivo em placas seja utilizada para a realização de estudos relacionados à nutrição e à relação patógeno-hospedeiro, ela é de escopo limitado para a produção em grande escala.

Para a estratégia inundativa de controle biológico são requeridos métodos para a produção de grandes quantidades de propágulos infecciosos, uma vez que grandes áreas serão tratadas, uma ou mais vezes anualmente (TEBEEST, 1984). O material usado

para obtenção de inóculo deve ser de baixo custo e com ele serem proporcionadas grandes concentrações de propágulos viáveis bastante eficazes (ALBOUVETTE et al., 1993). Dentre os produtos da agricultura disponíveis e acessíveis destacam-se as farinhas de soja, milho, amendoim, trigo e peixe, caroço de algodão, água de maceração de milho, resíduos solúveis de destilarias, leveduras de panificação e plantas forrageiras (BOYETTE et al., 1991; CHURCHILL, 1982; MORAES et al., 1991).

Na literatura, há vários trabalhos em que se analisou a utilização de diversos substratos para a produção de fungos. VILAS BOAS (1996) trabalhou com quatro substratos facilmente disponíveis na região de Pernambuco, como caupi (*Vigna unguiculata*), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), fava (*Phaseolus lunatus* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) para a produção de *Metarhizium anisopliae*. BASTOS et al. (1976) empregaram farinha de milho, de arroz, de trigo e a mistura desses amiláceos, visando obter mais produção de esporos do mesmo fungo e, também, substituir os componentes do meio até então utilizado, por serem caros e algumas vezes difíceis de serem obtidos. OLIVEIRA (2000) avaliou a produção do fungo entomopatogênico *Sporothrix insectorum* em meios líquidos, obtidos a partir de macerados de feijão, guandu (*Cajanus cajan* L. e soja (*Glycine max* L.), extratos de batata, fubá e soja, leite em pó, farelo de trigo e arroz.

A introdução de *B. euphorbiae* em programas de manejo integrado de *E. heterophylla* é dependente da produção de conídios em larga escala, mas poucos

trabalhos foram desenvolvidos para a definição de substratos adequados para a produção massal e para o estabelecimento das condições necessárias à manutenção da qualidade do produto por longo tempo. MARCHIORI (1996) verificou que, em meio V8-água e grãos de arroz mais sorgo, houve mais produção e melhor qualidade de conídios do fungo em relação àquele com grãos de girassol. GAZZIERO e YORINORI (1990) constataram que, após 14 meses de armazenamento a 4 °C, a germinação de esporos armazenados puros foi lenta e menor em relação àquela obtida com esporos formulados em lactose.

No presente trabalho, o objetivo foi o de se definirem meios de cultura sólidos e líquidos, obtidos de grãos ou resíduos da agroindústria, eficazes para a produção de conídios de *B. euphorbiae*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), localizada em Jaboticabal (SP), no período de setembro de 2005 a março de 2006.

Em todos os ensaios realizados, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Avaliaram-se 15 meios sólidos feitos com grãos de arroz, trigo e sorgo, quirelas de arroz, milho e trigo, sorgo moído, farelos de arroz, trigo e soja, cascas de mandioca e soja, casca de mandioca + farelo de soja, bagaço de cana e bagaço de cana + amido solúvel, e 12 meios líquidos obtidos de grãos de arroz, sorgo e trigo, quirela de milho, farelos de trigo, soja e arroz, casca de mandioca e soja, vinhaça de cana e água de prensa da mandioca, que constituíram os tratamentos dos ensaios. Para a execução das análises, usou-se o programa SAS (1995). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

Foi usado o isolado FCAV# 569 de *B. euphorbiae*, cedido pelo Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas Prof. Giorgio de Marinis, da FCAV/UNESP, originalmente obtido por pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa em Soja, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNPSo), localizado em Londrina (PR).

O fungo foi cultivado em placas de Petri, contendo o Meio Mínimo de Pontercorvo (1953), cuja formulação, descrita por AZEVEDO e COSTA (1973), foi modificada pela troca do açúcar e adição de peptona (PENARIOL, 2006), estabelecendo-se a seguinte

composição: 6,0 g de NaNO₃, 1,52 g de KH₂PO₄, 0,52 g de MgSO₄.7H₂O, 0,52 g de KCl, 0,01 g de FeSO₄, 0,01 g de ZnCl₄, 10 g de amido, 2,0 g de peptona, 15 g de água e 1000 mL de água destilada. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 20 minutos e a vidraria em estufa a 180 °C por três horas.

Para o preparo dos meios sólidos, utilizaram-se os seguintes substratos: grãos de sorgo, trigo e arroz, quirelas de arroz, milho e trigo, sorgo moído, farelos de arroz, trigo e soja, cascas de soja e mandioca, casca de mandioca (70%) + farelo de soja (30%), bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar + amido solúvel (1%). O sorgo moído foi obtido pela trituração rápida de grãos em liquidificador, usando-se a tecla pulsar. A casca de mandioca foi secada em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C por 48 horas e, em seguida, manualmente triturada; essa casca e o bagaço de cana-de-açúcar foram peneirados em malha de 4 mm.

Os grãos de sorgo (280 g), trigo (240 g) e arroz (240 g) foram cozidos em água destilada fervente, por cinco minutos, em fogo brando. As quirelas de arroz (320 g), milho (320 g) e trigo (200 g), o sorgo moído (280 g), os farelos de trigo (160 g) e soja (200 g) e a casca de soja (80 g) foram embebidos em água destilada, correspondente a três vezes a quantidade de cada substrato, durante 15 minutos. Ao bagaço de cana-de-açúcar, a casca de mandioca, a casca de mandioca + farelo de soja e o farelo de arroz foram adicionados, respectivamente, 20, 30, 25 e 40 mL de água destilada, quantidades determinadas em pré-ensaios.

Os substratos foram colocados em frascos erlenmeyers com capacidade para 250 mL, vedados com tampão de algodão, recobertos com papel alumínio e colocados em autoclave por 30 minutos. Foram usadas diferentes quantidades de cada substrato, de acordo com suas características, conforme segue: 70 g de sorgo em grão, 60 g de trigo em grão, 60 g de arroz em grão, 80 g de quirela de arroz, 80 g de quirela de milho, 50 g de quirela de trigo, 70 g de sorgo moído, 50 g de farelo de arroz, 40 g de farelo de trigo, 50 g de farelo de soja, 20 g de casca de soja, 30 g de casca de mandioca, 21 g de casca de mandioca + 9 g de farelo de soja, 20 g de bagaço de cana, 20 g de bagaço de cana + 0,20 g de amido solúvel.

Determinaram-se as quantidades de carboidratos solúveis e totais, e de nitrogênio e fósforo (Tabela 1), respectivamente no Laboratório de Tecnologia de Produtos Agrícolas e no Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP, sendo tais análises realizadas após submeter os meios à autoclave.

Os meios líquidos foram preparados de acordo com método descrito por WENZEL et al. (2006), com as seguintes quantidades de substratos em 1000 mL de água destilada: a) 100 g: grãos de arroz, de sorgo e de trigo, quirela de milho, cascas de mandioca e de soja; b) 50 g: farelos de trigo, de soja e de arroz; c) 100 mL: vinhaça e água de prensa de mandioca.

Os meios preparados com grãos de sorgo e trigo e de cascas de mandioca e de soja, foram obtidos por meio do cozimento dos respectivos substratos, em autoclave, por 20 minutos. Os meios preparados com quirela de milho, farelos de arroz, trigo e soja foram obtidos por cozimento em água destilada fervente por 10 minutos. Com o arroz obtiveram-se dois meios líquidos: o primeiro pelo cozimento em água destilada fervente por 10 minutos, e o segundo, pelo cozimento em iguais condições, por 30 minutos. Em seguida, todas as preparações foram homogeneizadas em liquidificador, por um minuto, e filtradas em pano

branco de algodão para retirada das partes grosseiras do material. Aos meios de farelos de trigo, de soja e de arroz foram adicionados 10 g de sacarose e, aos demais 5g de dextrose. A vinhaça e água de prensa da mandioca foram usadas "in natura", sem adição de açúcar.

A todos os meios foi acrescentado cloranfenicol (300 mg L^{-1}) para se evitar a recontaminação bacteriana durante o período de incubação. Os pHs dos meios foram determinados com ajuda de um potenciômetro, optando-se pela manutenção dos valores originais, sem ajuste. Em cada erlenmeyer, com capacidade para 250 mL, foram adicionados 100 mL de meio, sendo vedado com tampão de algodão e papel alumínio e autoclavado, em seguida, por 30 minutos. Na tabela 1 tem-se a composição dos meios líquidos autoclavados, conforme as análises químicas realizadas pelos laboratórios já mencionados.

Tabela 1. Composição nutricional e meios de cultura sólidos e líquidos elaborados com grãos e resíduos agroindustriais. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal (SP), 2006

Meio de cultura	pH	Carboidratos	Carboidratos	Nitrogênio	Fósforo
		solúveis*	totais**		
		g 100g ⁻¹		mg Kg ⁻¹	g Kg ⁻¹
Sólido					
Sorgo em grão	-	0,97	68,16	872,40	3,08
Trigo em grão	-	2,01	32,36	715,90	4,84
Arroz em grão	-	0,77	63,85	489,20	2,60
Quirela de arroz	-	0,87	71,01	496,40	2,52
Quirela de milho	-	0,97	58,90	843,50	2,88
Quirela de trigo	-	2,30	54,68	1327,90	4,32
Sorgo moído	-	1,59	31,71	913,30	3,16
Farelo de arroz	-	7,70	32,32	1937,60	4,28
Farelo de trigo	-	3,80	21,07	537,40	5,46
Farelo de soja	-	3,30	13,36	882,00	5,43
Casca de soja	-	2,37	18,18	284,50	2,95
Casca de mandioca	-	4,76	54,21	327,70	1,07
Casca de mandioca + farelo de soja	-	6,66	41,71	532,60	2,59
Bagaço de cana-de-açúcar	-	1,28	1,28	273,00	2,55
Bagaço de cana-de-açúcar + amido solúvel	-	1,20	11,25	315,00	2,98
Líquido					
Arroz em grão (cozido por 5 minutos)	6,70	0,51	-	383,30	0,48
Arroz em grão (cozido por 30 minutos)	6,38	0,53	-	417,10	0,63
Sorgo em grão	6,19	1,09	-	229,10	0,91
Trigo em grão	6,34	0,99	-	219,40	1,12
Quirela de milho	5,88	0,59	-	870,20	2,24
Farelo de trigo	6,54	2,44	-	1439,00	2,91
Farelo de soja	6,32	1,62	-	470,10	5,53
Farelo de arroz	6,75	1,23	-	1012,40	4,49
Casca de mandioca	6,08	1,92	-	200,00	0,91
Casca de soja	5,58	0,68	-	344,80	2,63
Vinhaça de cana-de-açúcar	4,77	4,13	-	229,10	0,13
Água de prensa da mandioca	4,30	2,37	-	708,70	-

* Carboidratos solúveis (glicose 100g⁻¹).

** Carboidratos totais (amido 100g⁻¹).

A inoculação dos meios sólidos e líquidos foi realizada em câmara de fluxo laminar, por meio de três discos de cinco milímetros de diâmetro, retirados de culturas jovens do fungo, cultivado em placa de Petri contendo Meio Mínimo de Pontercorvo modificado. A incubação foi realizada a 27 °C, em ausência de iluminação, por 15 dias e, nos meios líquidos, não se usou aeração forçada.

Em ambos os ensaios a avaliação foi feita no 15.º dia de cultivo. A produção de conídios nos meios sólidos foi verificada, transferindo-se 1 g de cada meio para tubo contendo 9 mL de uma mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89% p/v) e solução de Tween 80 (0,1% v/v). Para os meios líquidos, a massa micelial formada no frasco foi vigorosamente agitada por três minutos com 15 g de pérolas de vidro e, a seguir, coada em peneira com malha de 1 mm. O filtrado foi então centrifugado por dois minutos a 3.000 r.p.m. e o precipitado novamente disposto em 10 mL de solução salina estéril. Tanto para os meios sólidos como líquidos, determinou-se a quantidade de conídios presentes na suspensão com auxílio da câmara de Neubauer, após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, usando-se diluição adequada quando necessário.

No ensaio com meios líquidos determinou-se a biomassa fúngica. A massa micelial formada em frascos distintos dos usados para avaliação da produção de conídios, foi cuidadosamente removida, filtrada em funil de Büchner sob bomba de vácuo e, em seguida, desidratada a 60 °C até massa constante, determinada em balança analítica.

A viabilidade dos conídios foi avaliada por meio de microcultivo e exame direto em lâmina de microscopia, segundo método descrito por MARQUES et al. (2004). Utilizaram-se as suspensões obtidas para determinação da produção de conídios nos meios sólidos e líquidos, padronizando-as na concentração de 10^5 conídios mL⁻¹. O período de incubação foi de 12 horas.

Em ensaio realizado para avaliação da virulência de *B. euphorbia* para *E. heterophylla*, semeou-se o amendoim-bravo em vasos de plástico, contendo mistura de solo e substrato PlantMax, na proporção de 2:3, com uma planta por vaso. A irrigação foi realizada uma vez por dia, mantendo-se a umidade adequada ao crescimento das plantas. Quando as plantas estavam com quatro a oito folhas foram submetidas à inoculação com 9 mL de suspensão do fungo, padronizada em 10^5 conídios mL⁻¹, pulverizada sobre toda a parte aérea da planta com auxílio de pulverizador manual. Foram utilizadas as suspensões de conídios obtidas nos ensaios de produção em meios sólidos e líquidos já descritos. As

aplicações foram feitas no fim do dia para se evitar temperatura elevada. Em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 14 horas e transferidas para ambiente protegido, cuja temperatura foi variável entre 23,5 e 27,5 °C e entre 22,0 e 25,5 °C, nos ensaios realizados com conídios obtidos nos experimentos anteriores com meio sólido e líquido respectivamente. Após sete dias, as plantas foram removidas dos vasos, sendo separadas as raízes, caules e folhas. Efetuaram-se as determinações de quantidade da matéria fresca de cada parte, e da biomassa seca, em estufa com renovação forçada de ar a 60 °C, até massa constante, determinada em balança analítica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de conídios do fungo foi significativamente maior nos meios sólidos elaborados à base de sorgo em grão e casca de soja, quando comparados com os demais substratos. Entre estes não se verificou diferença significativa quanto à promoção da produção de conídios (Tabela 2).

Em *B. euphorbiae* há grande habilidade na utilização de amido como fonte de carbono (PENARIOL, 2006). Pela tabela 1 verifica-se grande variação no conteúdo de carboidratos solúveis, carboidratos totais, nitrogênio e fósforo dos meios. No meio de sorgo em grão constatou-se grande conteúdo de carboidratos totais - amido (68,16 g 100 g⁻¹), de nitrogênio (872,4 mg kg⁻¹) e de fósforo (3,08 g kg⁻¹), mas esses valores foram acentuadamente menores no meio de casca de soja - 18,18 g 100 g⁻¹, 284,5 g kg⁻¹ e 2,95 g kg⁻¹ respectivamente. Apesar desse fato, é provável que, em ambos, as relações nutricionais sejam mais balanceadas para o desenvolvimento do fungo, pois são proporcionadas as maiores produções de conídios.

Segundo CARLILE e WATKINSON (1994), em um meio de cultura balanceado deverão estar contidos cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio. Nos outros meios, como por exemplo, em arroz em grão, em quirelas de arroz e de trigo e em casca de mandioca, observou-se grande variação nos conteúdos de carboidratos totais, de nitrogênio e de fósforo, possivelmente resultando em relações nutricionais menos balanceadas para o fungo, o que não foi favorável à produção de conídios.

Avaliando-se a produção massal de *B. euphorbiae*, MARCHIORI (1996) constatou que, em meio V8-ágar e grãos de arroz e sorgo, houve mais produção e qualidade dos esporos em relação ao de grão de girassol.

Tabela 2. Produção e germinação de conídios de *Bipolaris euphorbiae* obtidos em meios de cultura sólidos preparados com grãos e resíduos agroindustriais. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal (SP), 2006

Meio sólido	Conídios	Germinação
	n° x 10 ⁶ g de substrato	%
Sorgo em grão	474,0A	99,63A
Arroz em grão	2,9B	99,41A
Trigo em grão	1,6B	99,35A
Sorgo moído	5,7B	98,71A
Quirela de arroz	5,7B	85,10B
Quirela de milho	3,5B	99,27A
Quirela de trigo	21,5B	99,69A
Farelo de trigo	8,1B	99,05A
Farelo de arroz	6,2B	99,19A
Farelo de soja	6,2B	19,38D
Casca de mandioca + farelo de soja	2,8B	61,02C
Casca de mandioca	13,5B	98,82A
Casca de soja	472,0A	99,46A
Bagaço de cana-de-açúcar	1,8B	99,38A
Bagaço de cana-de-açúcar + amido solúvel	1,7B	99,30A
F	17,38**	89,4**
CV (%)	115,1	5,2

Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+1).

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

** Significativo a 1% probabilidade.

NAHAS e ARAI (1987) avaliaram a esporulação do fungo *Beauveria bassiana* em meios elaborados com farelo de trigo, farelo de soja e farelo de arroz; no de farelo de trigo, a esporulação do fungo foi maior - $13,40 \times 10^9$ esporos placa de cultivo⁻¹. WENZEL et al. (2006) verificaram produção de mais quantidade de conídios dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Verticillium lecanii* nos meios obtidos de farelo de soja - $25,75$ e $17,96 \times 10^7$ conídios g⁻¹ respectivamente; farelo de trigo - $19,30$ e $13,16 \times 10^7$ conídios g⁻¹ respectivamente; trigo moído - $16,0$ e $18,50 \times 10^7$ conídios g⁻¹ respectivamente.

No resultado do teste de viabilidade, nos conídios produzidos nos meios feitos com farelo de soja, casca de mandioca + farelo de soja e quirela de arroz, obteve-se menos capacidade de germinação, com diferenças significativas entre si e dos conídios produzidos nos demais meios (Tabela 2). Tal fato foi mais evidente nos meios contendo farelo de soja, sugerindo-se carência de algum fator nutricional importante para a conidiogênese neste substrato, com o que pode ter sido ocasionada deficiência morfológica ou fisiológica, com conseqüente redução da porcentagem de germinação. De acordo com FRANCISCO et al. (2006), há influência da composição do meio de cultura na germinação de conídios de *L. lecanii*, *B. bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*, com diferença entre espécies e variações entre isolados de

mesma espécie. A porcentagem de germinação dos conídios produzidos nos demais meios foi variável entre 98,7% e 99,7%, não havendo diferença significativa na viabilidade.

Para que possam ser utilizados em programas de manejo integrado, recomenda-se viabilidade superior a 90% dos conídios dos fungos. Esse valor foi constatado com os conídios produzidos na maioria dos meios avaliados neste trabalho, resultado semelhante ao obtido por MARCHIORI (1996), com os meios feitos com milho de pipoca, milho + arroz, milho + sorgo, sorgo + arroz, além de sorgo e arroz isoladamente. No entanto, no estudo de WENZEL et al. (2006), apenas os conídios dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *V. lecanii* produzidos no meio de lentilha em grão, estavam com viabilidade maior que 90%.

A virulência do fungo não foi afetada pela produção nos meios sólidos pois, no 7º dia após a inoculação, em todas as plantas pulverizadas com conídios produzidos nos diferentes meios, identificaram-se os sintomas característicos de infecção pelo fungo, como necrose nas folhas e desfolhamento parcial; tais sintomas não foram verificados nas plantas-testemunha. Os resultados referentes à massa da quantidade das matérias fresca e seca das raízes, dos caules e das folhas de *E. heterophylla* estão relacionados na tabela 3.

Tabela 3. Quantidades de matéria fresca e seca da raiz, caule e folhas de *Euphorbia heterophylla*, aos sete dias após a inoculação com conídios de *Bipolaris euphorbiae* produzidos em meios sólidos. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal (SP), 2006.

Meio sólido	Matéria fresca			Matéria seca		
	Raiz	Caule	Folha	Raiz	Caule	Folha
	g					
Testemunha (¹)	1,95AB	2,48AB	2,55A	0,15A	0,13A	0,38A
Sorgo em grão	2,65A	1,91AB	0,47B	0,17A	0,10A	0,08B
Arroz em grão	0,85B	1,62AB	0,54B	0,06A	0,06A	0,07B
Grão de trigo	2,09AB	1,73AB	0,80AB	0,17A	0,07A	0,13AB
Sorgo moído	1,82AB	3,50A	1,01AB	0,13A	0,17A	0,14AB
Quirela de arroz	1,82AB	1,70AB	0,91AB	0,07A	0,07A	0,12AB
Quirela de milho	1,11AB	2,28AB	1,12AB	0,07A	0,10A	0,12AB
Quirela de trigo	0,83B	1,84AB	0,62AB	0,09A	0,11A	0,13AB
Farelo de trigo	1,55AB	2,90AB	1,92AB	0,13A	0,15A	0,25AB
Farelo de arroz	1,27AB	2,91AB	1,42AB	0,11A	0,15A	0,20AB
Farelo de soja	1,27AB	1,45B	0,92AB	0,15A	0,09A	0,13AB
Casca de mandioca + farelo de soja	1,11AB	2,32AB	1,62AB	0,10A	0,13A	0,20AB
Casca de mandioca	1,64AB	3,11AB	1,46AB	0,13A	0,17A	0,18AB
Casca de soja	1,35AB	2,85AB	1,17AB	0,10A	0,07A	0,24AB
Bagaço de cana-de-açúcar	1,32AB	2,63AB	1,81AB	0,10A	0,13A	0,24AB
Bagaço de cana-de-açúcar + amido solúvel	1,01AB	1,81AB	1,44AB	0,07A	0,10A	0,18AB
F	2,57**	2,85**	2,39**	1,98*	2,72**	2,31*
CV (%)	28,7	18,2	42,1	40,9	37,4	49,9

(¹) Plantas pulverizadas com o veículo da suspensão de conídios.

Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+1).

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

** , * : Significativo a 1% e 5% de probabilidade respectivamente.

Analisando-se a massa da quantidade das matérias fresca e seca das raízes e do caule não se verificou diferença significativa entre os diversos tratamentos e a testemunha. Esse fato é indicativo que, durante o período avaliado, a ação do fungo foi insuficiente para serem ocasionados danos severos nessas partes das plantas, independentemente dos meios em que os conídios foram produzidos. Em alguns tratamentos, como o dos conídios produzidos em quirela de trigo e arroz em grão, constatou-se uma ação mais pronunciada do fungo em relação à massa da quantidade de matéria fresca das raízes, mas ainda insuficiente para ser diferente da testemunha.

Quando se considerou a massa da quantidade de matérias fresca e seca da folha, verificou-se ação mais intensa do fungo produzido nos meios de sorgo e arroz em grão, reduzindo-se significativamente as respectivas massas, em relação à testemunha. Com esse fato, sugere-se efeito do meio de cultura na virulência do fungo, mas esses dados são insuficientes para melhor avaliação do fenômeno, visto que foram

obtidos apenas com a folha da planta, mas não com o caule e a raiz. GAZZIERO e YORINORI (1993) verificaram que, nas doses de 2×10^5 e 1×10^6 conídios mL^{-1} são provocadas mais reduções na matéria seca do caule do que nas menores, enquanto com a aplicação de surfactantes em mistura com *B. euphorbiae* não houve redução significativa na matéria seca da raízes, caule e folhas de *E. heterophylla* em relação à da testemunha (TOFFANELLI, 1997). Contudo, não foram constatados na literatura trabalhos em que se tenha analisado a influência de meios de cultivo na virulência de *B. euphorbiae*.

Nos meios líquidos preparados com farelo de arroz, de soja e de trigo, proporcionou-se a formação de mais biomassa micelial de *B. euphorbiae*, sendo os valores diferentes significativamente dos demais. Nos meios preparados à base de vinhaça de cana-de-açúcar e de água de prensa da mandioca, a formação de biomassa foi muito reduzida e não houve esporulação, mas isso foi, provavelmente, consequência do baixo pH dos meios sem correção.

A produção de conídios verificada nos meios líquidos foi acentuadamente menor do que aquela nos meios sólidos, destacando-se apenas a obtida no meio de farelo de trigo. Nos meios de farelo de soja, arroz em grão cozido por cinco minutos e casca de soja, os valores da produção de conídios foram acentuadamente menores, mas não se observou diferença significativa em relação à produção obtida nos demais meios, exceto no do farelo de trigo (Tabela 4).

De acordo com as informações contidas na tabela 1, as maiores quantidades de carboidratos solúveis, nitrogênio e fósforo foram determinadas no meio de farelo de trigo, em que se proporcionou a

maior formação de biomassa e conídios, sugerindo-se que, neste meio, as quantidades e proporção entre tais nutrientes são mais equilibradas para o desenvolvimento do fungo. As quantidades desses nutrientes nos demais meios foram bastante variáveis, não sendo possível verificar-se com clareza, a adequação de suas composições para o crescimento e a esporulação do fungo. O conteúdo de carboidratos totais dos meios líquidos não pode ser determinado, devido à sua pequena concentração nos meios. É possível que a maior parte desses carboidratos tenha sido retida durante a filtragem, em panos de algodão, embora esse procedimento tenha sido necessário para a remoção de partes grosseiras do material.

Tabela 4. Biomassa micelial seca, produção e germinação de conídios de *Bipolaris euphorbiae* em diferentes meios líquidos. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal (SP), 2006

Meio líquido	Biomassa seca	Conídios	Germinação
	g	n° x 10 ⁶ mL de meio	%
Sorgo em grão	0,35BC	0,35AB	99,38A
Arroz em grão (cozido por 5 min.)	0,26C	0,04B	82,71AB
Arroz em grão (cozido por 30 min.)	0,30BC	0,34AB	99,66A
Trigo em grão	0,36BC	0,21AB	99,38A
Quirela de milho	0,42B	0,18AB	98,96AB
Farelo de arroz	0,61A	0,17AB	99,82A
Farelo de soja	0,70A	0,06B	99,66A
Farelo de trigo	0,73A	1,33A	99,85A
Casca de mandioca	0,36BC	0,34AB	99,51A
Casca de soja	0,23C	0,02B	98,74AB
Água de prensa da mandioca	0,09D	-	-
Vinhaça de cana-de-açúcar	0,06D	-	-
F	55,22**	68,36**	2,43*
CV (%)	13,8	4,5	7,0

Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+1).

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

**, *: Significativo a 1% e 5% de probabilidade respectivamente.

O crescimento e a esporulação de fungos em meios líquidos foram investigados por vários autores. CRUZ et al. (1983) verificaram a melhor esporulação de *M. anisopliae* em meio à base de feijão. ALVARENGA et al. (1988) avaliaram a produção de conídios de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em meios líquidos feitos com variedades Carioca, Carioca 80 e Jalo de feijão, guandu, soja e grão de bico, obtendo as maiores produções nos meios preparados com as variedades Carioca e Jalo de feijão e de soja. Resultado semelhante foi obtido por WENZEL et al. (2006) para o isolado JAB 02 de *V. lecanii*, cultivado em meio de feijão branco e soja, enquanto, para o isolado JAB 45, o meio de farelo de trigo foi destacadamente o mais

promissor. THOMAS et al. (1987) determinaram produção de conídios de *B. bassiana* em meio líquido isento de fósforo dez vezes menor que aquela em meio de cultivo com fosfato.

A viabilidade não foi afetada pela produção do fungo em diferentes meios líquidos, pois não houve diferença significativa na porcentagem de germinação (Tabela 4). O mesmo ocorreu em relação à virulência, pois em todas as plantas pulverizadas com conídios produzidos nos diferentes meios manifestaram-se os sintomas característicos de infecção no 7.º dia após a inoculação, fato não constatado nas plantas-testemunha.

Pela análise dos resultados referentes à massa da quantidade de matérias fresca e seca das raízes, do caule e das folhas de *E. heterophylla* (Tabela 5), a ação do fungo foi detectada apenas em relação à massa da quantidade de matéria fresca das folhas; nos tratamentos com conídios produzidos nos meios de trigo em grão, arroz cozido por 30 minutos, casca de soja e farelo de soja, observaram-se valores significativamente menores

que os obtidos na testemunha. O mesmo fato havia sido detectado quando esses três últimos substratos foram utilizados para elaboração dos meios sólidos; ainda assim, não pode ser considerada explicação suficiente para argumentação em favor de possível efeito da composição dos meios na virulência do fungo, pois se constatou em apenas um dos parâmetros avaliados, a matéria fresca das folhas.

Tabela 5. Quantidades de matéria fresca e seca da raiz, caule e folhas de *Euphorbiae heterophylla* aos sete dias após ser submetida à inoculação com conídios de *Bipolaris euphorbiae* produzidos em meios líquidos. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal (SP), 2006

Meio líquido	Matéria fresca			Matéria seca		
	Raiz	Caule	Folhas	Raiz	Caule	Folhas
	g					
Testemunha (1)	1,69AB	2,55A	2,31A	0,33A	0,24A	0,33A
Sorgo em grão	2,28AB	3,51A	0,63AB	0,41A	0,41A	0,15A
Arroz em grão (cozido 5 min.)	2,90A	3,86A	0,85AB	0,36A	0,35A	0,33A
Arroz em grão (cozido 30 min.)	0,63B	1,94A	0,46B	0,21A	0,24A	0,18A
Trigo em grão	1,11AB	2,73A	0,46B	0,28A	0,28A	0,19A
Quirela de milho	2,16AB	4,03A	0,97AB	0,34A	0,34A	0,27A
Farelo de trigo	2,14AB	3,66A	0,69AB	0,33A	0,33A	0,25A
Farelo de arroz	1,38AB	3,75A	0,94AB	0,20A	0,39A	0,25A
Farelo de soja	1,38AB	2,30A	0,37B	0,20A	0,20A	0,24A
Casca de mandioca	2,22AB	3,43A	0,84AB	0,33A	0,33A	0,26A
Casca de soja	1,70AB	4,17A	0,46B	0,37A	0,37A	0,27A
F	1,84 ^{ns}	1,63 ^{ns}	2,63*	0,67 ^{ns}	1,18 ^{ns}	0,86 ^{ns}
CV (%)	37,0	21,0	52,2	64,7	37,0	38,5

(1) Plantas pulverizadas com o veículo da suspensão de conídios.

Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+1).

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

^{ns} Não significativo; * Significativo a 5% de probabilidade.

B. euphorbiae tem sido destacado como promissor agente de controle de *E. heterophylla*. Para viabilizar seu emprego em condições de campo há a necessidade de se produzirem grandes quantidades de conídios, que são os propágulos infectivos adequados para promoção do desenvolvimento da doença na planta. Desse modo, a utilização de meios sólidos foi mais adequada, tendo em vista que neles resultaram produção de quantidades substancialmente maiores de conídios do que nos meios líquidos.

4. CONCLUSÕES

1. A produção de conídios por *Bipolaris euphorbiae* é influenciada pelo tipo de meio de cultura e substrato.

2. A esporulação do fungo *Bipolaris euphorbiae* é bastante favorecida em meio de cultura sólido com sorgo em grão e casca de soja e em meio de cultura líquido obtido de farelo de trigo.

3. A viabilidade e a virulência do fungo *Bipolaris euphorbiae* não são afetadas pelo tipo e composição nutricional de meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos alimentícios e de resíduos da agroindústria.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado à primeira autora.

REFERÊNCIAS

ALBOUVETTE, C.; LEMANCEAU, P.; STEIBERG, C. Recent advances in the biological control of Fusarium wilts. *Pesticide Science*, Barking, v.37, n.4, p.365-373, 1993.

- 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.
- AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios Práticos de Genética**. 1.ed. São Paulo: Editora Nacional e EDUSP, 1973. 288p.
- 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.
- BOYETTE, C.D.; QUIMBY JR, P.C.; CONNICK JR., W. J.; DAIGLE, D.J.; FULGHAM, F.F. Progress in the production, formulation and application of mycoherbicides. In: TEBEEST, D.O. (Ed.). **Microbial control of weeds**. New York: Chapman and Hall, 1991. p.209-222.
- CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. Fungal cells and vegetative growth. **The Fungi**. London: Academic Press, 1994. p.125-128.
- CHURCHILL, B.W. Mass production of microorganisms for biological control of weeds with plant pathogens. In: CHARUDATTAN, R.; WALKER, H.L. (Eds.). **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Willy & Sons, 1982. p.139-156.
- CRUZ, B.P.B.; ABREU, O.C.; OLIVEIRA, A.D.; CHIBA, S. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em meios de cultura naturais líquidos. **Biológico**, São Paulo, v. 49, n.5, p.111-116, 1983.
- FRANCISCO, E.A.; MOCHI, D.A.; CORREIA, A. do C.B.; MONTEIRO, A.C. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1309-1312, 2006.
- GAZZIERO, D.L.P.; YORINORI, J.T. Control of milk weed *Euphorbia heterophylla* with *Helminthosporium sp.* In: DELFOSSE, E.S. (Ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 7., 1990, Rome. **Proceedings...** Rome: Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, 1990, p.571-576.
- GAZZIERO, D.L.P.; YORINORI, J.T. **Experiência sobre o controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 1993. 11p.
- JACKSON, M.A.; SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BOYETTE, C.D.; SILMAN, R.W.; BOTHAST, R.J. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. **Weed Technology**, Champaign, v.10, n.3, p.645-650, 1996.
- MARCHIORI, R. **Produção de inóculo de *Bipolaris euphorbiae* (Muchovej & Carvalho, 1989) e sua atividade no controle biológico de *Euphorbiae heterophylla* L. (amendoim-bravo)**. 1996. 61f. Monografia (Graduação em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP, Jaboticabal.
- MARQUES, R.P.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.6, p.1675-1680, 2004.
- MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, R. de O. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.253-272. (Documentos, 15)
- 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. **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.
- PENARIOL, M.C. **Requisitos nutricionais e produção massal de *Bipolaris euphorbiae***. 2006. 49f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.
- S.A.S. INSTITUTE INC. **S.A.S./ATAT - User's guide, release 6, 12 TS LEVEL 0020**. Cary, 1995, p.519-548.
- TEBEEST, D.O. Biological control of weeds with microbial herbicides. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.3, p.443-453, 1984.
- THOMAS, K.C.; KHACHATOURIANS, 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.
- TOFFANELLI, C.M. **Interferência de herbicidas e surfatantes na ação do fungo *Bipolaris euphorbiae* Muchovej & Carvalho para o controle de *Euphorbiae heterophylla* L. (amendoim-bravo)**. 1997. 60f. Monografia (Graduação em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP, Jaboticabal.
- 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.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Produção de conídios de *Lecanicillium lecanii* em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, Jaboticabal, v.34, n.1, p.7-14, 2006.