

## Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes fatores ambientais

Antonio Carlos Monteiro<sup>(1)</sup>, Claudio Camargo Barbosa<sup>(1)</sup>, Antônia do Carmo Barcelos Correia<sup>(2)</sup> e Gener Tadeu Pereira<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Estadual Paulista (Unesp), Fac. de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Dep. de Produção Vegetal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/nº, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP. E-mail: montecar@fcav.unesp.br, ccbcamargo@uol.com.br <sup>(2)</sup>Unesp, FCAV, Dep. de Fitossanidade. E-mail: antoniac@fcav.unesp.br <sup>(3)</sup>Unesp, FCAV, Dep. de Ciências Exatas. E-mail: genertp@fcav.unesp.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e a esporulação de dois isolados (JAB 02 e JAB 45) de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas, submetidos a diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7, 8, 9) inicial do meio de cultivo sólido, de temperatura (19, 22, 25, 28 e 31°C) e fotoperíodo (0, 12 e 24 horas). Após 20 dias de cultivo, não se observou efeito do pH inicial do meio no crescimento e esporulação dos isolados, exceto no pH 4,0 que reduziu o crescimento. A ausência de iluminação proporcionou a melhor condição para o crescimento de JAB 02 (32,70 mm) e JAB 45 (32,67 mm). Não houve efeito do fotoperíodo na produção de esporos. As melhores temperaturas para o crescimento de JAB 02 foram 19, 22 e 25°C e para JAB 45 foram 19 e 25°C. Este último isolado apresentou melhor esporulação a 19 e 22°C, mas a temperatura não influenciou a esporulação de JAB 02. Não houve desenvolvimento dos isolados a 31°C.

Termos para indexação: fungo entomopatogênico, pH, temperatura, fotoperíodo, controle de pragas.

## Growth and sporulation of *Verticillium lecanii* isolates under different environmental conditions

**Abstract** – This research aimed to evaluate the growth and sporulation of two *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas isolates cultivated on solid medium with different initial pH values (4, 5, 6, 7, 8 and 9), exposed to different temperatures (19, 22, 25, 28 and 31°C) and photoperiods (0, 12 and 24 hours). There was no substantial effect of the initial pH values on growth and sporulation of both isolates twenty days after inoculation, except at pH 4.0 in which the growth was significantly reduced. Absence of light promoted the best growth of JAB 02 (32.70 mm) and JAB 45 (32.67 mm) isolates but there was no effect of photoperiod on sporulation. The best temperatures for growth of JAB 02 were 19, 22 and 25°C and for JAB 45, 19 and 25°C. The latter isolate sporulated most at 19 and 22°C and there was no effect of temperature on sporulation of JAB 02. None of the isolates developed at 31°C.

Index terms: entomopathogenic fungi, pH, temperature, photoperiod, pest control.

### Introdução

O fungo *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas é patógeno de várias espécies de insetos (Ferron, 1981; Alves, 1998) e um dos mais promissores no controle biológico de pragas na agricultura (Lecuona & Riba, 1991). Entretanto, para a formulação de bioinseticida à base desse fungo é necessária a obtenção de boa produção massal com abundante esporulação.

Um fator importante na produção massal de um fungo é a seleção de um meio padrão para seu cultivo e a determinação das condições adequadas que permitam bom crescimento com alta esporulação (Khalil et al.,

1985). A seleção de um meio padrão pressupõe o conhecimento das condições nutricionais ideais para o cultivo do fungo. Barbosa et al. (2002) avaliaram diferentes meios de cultura, fontes de C, de N e relações C:N no desenvolvimento dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *V. lecanii*. Wenzel (2002) analisou diversas fontes de P e a influência de relações C:P e C:N:P no crescimento e esporulação dos mesmos isolados.

Na determinação das condições ambientais necessárias para otimizar a produção do fungo, fatores como pH, iluminação e temperatura podem se tornar limitantes. A temperatura tem influência significativa no desenvolvimento de *V. lecanii* (Verhaar & Hijwegen, 1993;

Hanlon et al., 1994). As faixas térmicas ideais para o crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios do fungo são de 23–28, 23–25 e 15–32°C, respectivamente (Li et al., 1991). O cultivo de *V. lecanii* em meio líquido alterou o pH do meio (Galani, 1987), e o pH 7 favoreceu a produção do fungo (Hanlon et al., 1994). O regime de iluminação contínua proporcionou maior crescimento e esporulação de *V. fungicola*, em comparação com a ausência de iluminação (Coetzee & Eicker, 1991).

*Verticillium lecanii* pode ser considerado um complexo de espécies que abrange isolados com grande variação nos aspectos morfológicos e bioquímicos (Steenberg & Humber, 1999). Estudos que visam determinar as condições ideais de cultivo de isolados obtidos no Brasil podem viabilizar a produção massal do fungo no país.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes valores de pH do meio de cultivo, de temperatura e fotoperíodo no crescimento e esporulação de dois isolados de *V. lecanii*.

### Material e Métodos

Foram utilizados os isolados JAB 02 e JAB 45 de *Verticillium lecanii*, mantidos na coleção do Laboratório de Microbiologia da FCAV/Unesp, obtidos da Cochonilha Verde *Coccus viridis* Green (Hemiptera: Coccidae), coletada em pomares de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck), nos municípios paulistas de Ubirajara e São Carlos, respectivamente. Os isolados foram cultivados em tubos de ensaio contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), por dez dias a 27±0,5°C e fotofase de 14 horas, e as culturas estocadas em refrigerador a cerca de 4°C.

Alíquotas do fungo, retiradas da cultura estoque, foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BDA e incubadas a 27±0,5°C, com fotofase de 14 horas, por 20 dias. Culturas assim rejuvenescidas serviram de inóculo para os ensaios.

O cultivo foi realizado em placas de Petri de 12x80 mm, contendo 15 mL de meio BDA para JAB 02 e meio completo de Pontecorvo para JAB 45 (Barbosa et al., 2002). A inoculação foi efetuada com agulha de níquel-cromo mediante simples picada, transferindo-se esporos e fragmentos de micélio para o ponto central das placas. Após inoculação, o fungo foi incubado em estufa a 27±0,5°C, por 20 dias, no escuro.

A avaliação do crescimento radial da colônia foi realizada com régua milimétrica, medindo-se, a cada dois dias, durante 20 dias, dois diâmetros previamente marcados na face externa do fundo de cada placa de Petri. Foram feitas seis repetições por tratamento, considerando-se cada placa uma repetição. A produção de esporos foi avaliada no 20º dia de incubação. Para tanto, escolheram-se, ao acaso, três placas de cada tratamento (três repetições por tratamento), retirando-se de cada uma, com auxílio de um furador de rolha metálico, três discos de 8 mm de diâmetro, sendo um da região central, outro da região mediana e outro da região periférica das colônias. 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 solução de Tween 80 (0,1% v/v). Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, extraíram-se os conídios e procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer.

Três ensaios foram realizados para avaliar o crescimento e a esporulação do fungo em relação aos fatores ambientais de cultivo. No primeiro, analisou-se o efeito do pH inicial do meio, cujos valores, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, foram obtidos mediante adição ao meio de cultivo de uma solução 0,5 ou 1,0 N de NaOH ou HCl, quando se pretendeu aumentar ou diminuir o pH, respectivamente. Os valores de pH foram medidos com auxílio de um potenciômetro.

No segundo ensaio, avaliou-se a influência do fotoperíodo. No regime de iluminação contínua, três lâmpadas fluorescentes de 40W foram posicionadas 50 cm acima das placas com fungos, expondo-as aos raios luminosos. Na iluminação alternada, as placas foram envolvidas, a cada 12 horas, em um tecido negro de algodão e, nas 12 horas subsequentes, foram mantidas sob a condição anterior de iluminação. A ausência de iluminação foi obtida pelo envolvimento contínuo das placas com fungo em tecido negro. O ensaio foi conduzido em uma sala ambiente, com temperatura mantida entre 25 e 28°C.

No terceiro ensaio, avaliou-se o efeito das temperaturas de 19, 22, 25, 28 e 31°C no desenvolvimento dos isolados. As placas com fungo foram acondicionadas em câmaras climatizadas BOD previamente aferidas com as temperaturas ensaiadas.

Os ensaios foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado. Os dados de crescimento foram analisados por meio de regressão linear, seguida de teste de paralelismo (teste t) e coincidência (teste F)

entre as retas (Dixon & Massey Junior, 1969). Os valores obtidos na produção de esporos 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.

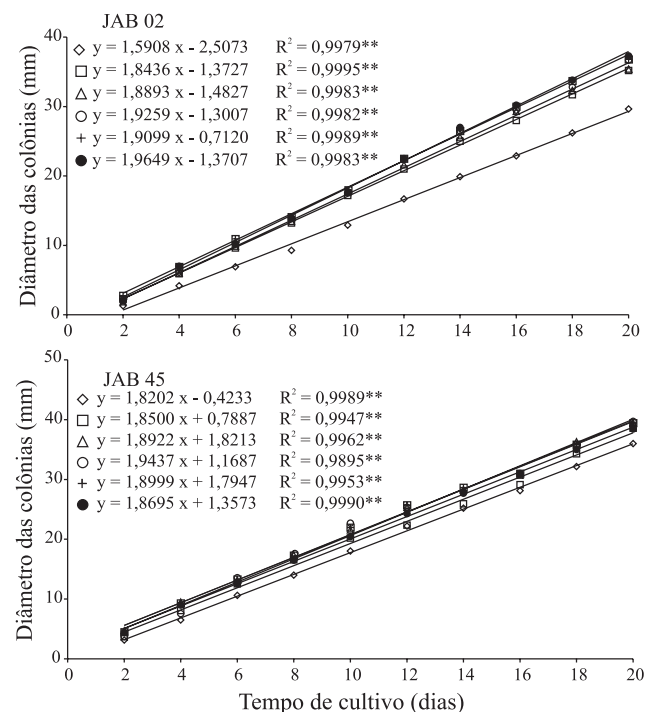
### Resultados e Discussão

O crescimento dos isolados no meio com pH inicial 4,0 diferiu significativamente ( $p < 0,01$ , pelos testes t e F entre as retas) dos demais meios, os quais, por sua vez, não diferiram significativamente entre si, para ambos os isolados, até mesmo no valor de pH 9,0, considerado crítico ao desenvolvimento de fungos (Figura 1). Quanto à esporulação, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores de pH avaliados (Tabela 1).

*V. lecanii* produziu a maior biomassa ( $14,82 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em meio de cultura com pH 7,0 (Hanlon et al., 1994). Segundo estes autores, raramente o pH do meio se mantém inalterado durante o crescimento, por causa da degradação de proteínas que produzem compostos alcalinos e da fermentação de carboidratos. Após cultivar *V. lecanii* em meios líquidos com 10 valores de pH iniciais varian-

do entre 4 e 8,5, Galani (1987) verificou que, nos meios com pH inicial mais alto, ocorreu queda acentuada de alcalinidade, mas de modo geral o pH aumentou, ficando na faixa entre 5 e 7 após 96 horas de cultivo. Magalhães et al. (1994) observaram que a variação do pH estava relacionada com a concentração inicial de conídios de *Metarhizium anisopliae* inoculados em meio líquido, indicando a utilização de fonte nitrogenada pelo fungo. Segundo Hallsworth & Magan (1996), a melhor faixa de pH para o crescimento de *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces farinosus* situa-se entre 5,0 e 8,0. Os resultados indicam que não houve grande influência do pH inicial sobre o fungo, que foi capaz de superar possíveis restrições impostas pelos diferentes pH do meio, apresentando igual desempenho em todos os tratamentos, exceto no pH mais ácido.

Ambos os isolados apresentaram melhor crescimento em ausência de luz com diâmetro de colônias significativamente maiores ( $p < 0,01$ , pelos testes t e F entre as retas) do que quando mantidos na presença dos outros dois tratamentos. A fotofase de 12 horas ocasionou ligeira redução do crescimento. A maior redução foi observada com o isolado JAB 45 submetido à presença constante de luz (Figura 2). Não houve efeito da iluminação na esporulação de ambos os isolados (Tabela 1).



**Figura 1.** Crescimento radial de *Verticillium lecanii* cultivado a pH 4 ( $\diamond$ ), 5 ( $\square$ ), 6 ( $\triangle$ ), 7 ( $\circ$ ), 8 (+) e 9 ( $\bullet$ ). **\*\*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.**

**Tabela 1.** Esporulação dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Verticillium lecanii* ( $n^\circ$  de conídios  $\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ ) no vigésimo dia de cultivo em meios com diversos valores de pH inicial, diferentes fotoperíodos e temperaturas<sup>(1)</sup>.

Fator físico	JAB 02	JAB 45
pH inicial do meio		
4	119,10a	64,17a
5	48,27a	124,33a
6	109,38a	120,56a
7	77,78a	101,39a
8	107,29a	128,34a
9	61,46a	105,00a
CV (%)	48,83	48,24
Fotoperíodo (h)		
24	19,72a	25,55a
12	17,22a	23,33a
0	36,39a	117,22a
CV (%)	91,52	74,69
Temperatura (°C)		
19	9,17a	180,83ab
22	78,33a	304,17a
25	73,05a	28,61b
28	102,50a	21,67b
CV (%)	65,16	64,51

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

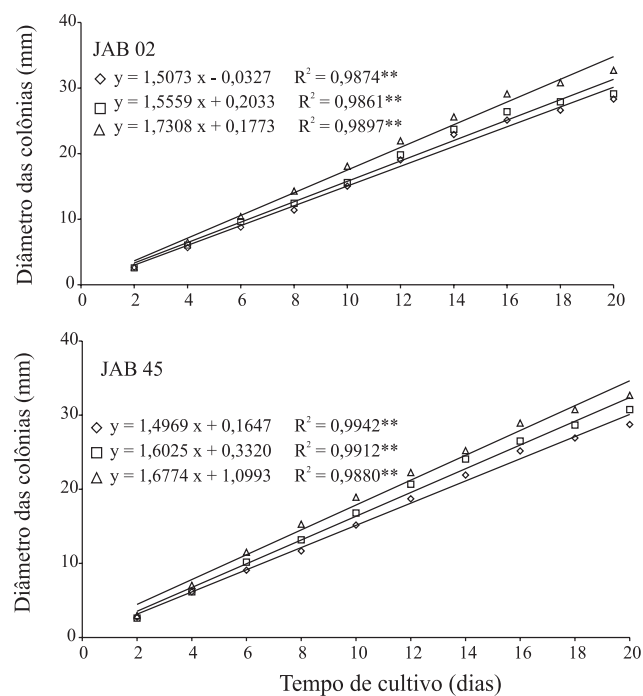
*V. fungicola* cresceu e esporulou melhor em regime de luz contínua (Coetzee & Eicker, 1991). Segundo Nahas & Arai (1987), o melhor crescimento e esporulação de *B. bassiana* foi observado em fotófase de 12 horas. Monteiro (1988) obteve melhor crescimento de *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *Paecilomyces marquandii* em ausência de luz, mas a melhor esporulação foi obtida em fotófase de 12 horas, exceto para *P. marquandii*, cuja produção de esporos foi favorecida pela ausência de iluminação. O crescimento reduzido em presença de luz é uma característica constante em fungos (Cochrane, 1958) e a alternância entre períodos de presença e ausência de luz favorece determinadas reações químicas que contribuem para o desenvolvimento de fungos (Lilly & Barnett, 1951). Contudo, a fotófase de 12 horas não proporcionou melhor desempenho dos isolados avaliados neste trabalho.

O crescimento de ambos os isolados foi favorecido pelas temperaturas de 19, 22 e 25°C que apresentaram diferença significativa ( $p < 0,01$ , pelos testes t e F entre as retas) em relação ao crescimento obtido na temperatura de 28°C. Contudo, em relação ao JAB 45, o desempenho a partir do 18º dia de cultivo a 22°C foi inferior ao verificado a 19°C (Figura 3). Não se observou

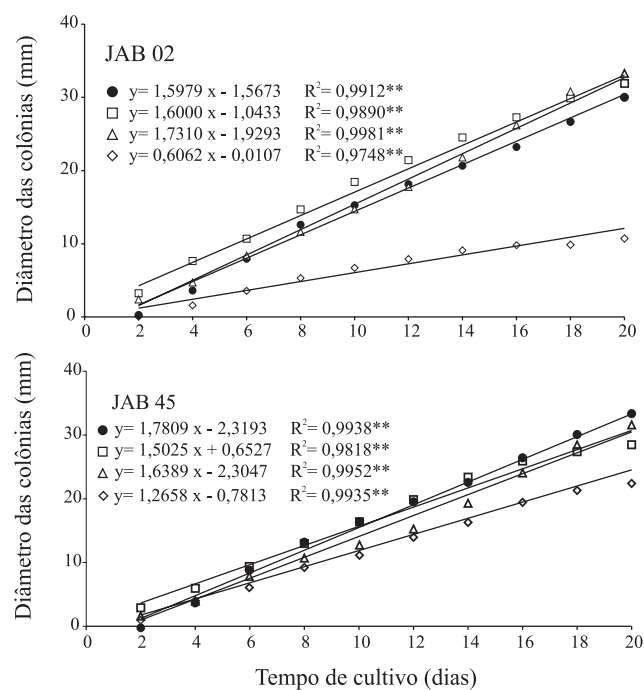
efeito da temperatura na esporulação do isolado JAB 02, embora o valor verificado a 28°C tenha sido 11 vezes superior ao encontrado a 19°C. Possivelmente, a redução do crescimento deste isolado na temperatura de 28°C provocou maior empenho em aumentar a esporulação como tentativa de garantir a sobrevivência do fungo no ambiente. As maiores esporulações de JAB 45 ocorreram a 19 e 22°C, embora apenas a ocorrida a 22°C tenha diferido significativamente das verificadas a 25 e 28°C (Tabela 1). Não houve desenvolvimento dos isolados quando cultivados a 31°C.

Os dados encontrados sugerem que a faixa térmica mais favorável para o desenvolvimento de *V. lecanii* em laboratório situa-se entre 20 e 25°C. De acordo com Li et al. (1991), o melhor crescimento e a melhor esporulação do fungo ocorreram, respectivamente, a 23–28°C e 23–25°C. A melhor produção de biomassa ocorreu a 24°C (Hanlon et al., 1994). Segundo Verhaar & Hijwegen (1993), *V. lecanii* não produziu conídios quando cultivado a 30°C por dez dias e a maior esporulação foi obtida a 25°C.

Os resultados do presente trabalho são semelhantes aos obtidos por estes autores e indicam que a faixa térmica mais favorável ao desenvolvimento do fungo si-



**Figura 2.** Crescimento radial de *Verticillium lecanii* cultivado por 24 (◇), 12 (□) e 0 hora (△). \*\*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.



**Figura 3.** Crescimento radial de *Verticillium lecanii* cultivado a 19 (●), 22 (□), 25 (△) e 28°C (◇). \*\*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

tua-se entre 19 e 25°C. Houve redução do crescimento de ambos os isolados na temperatura de 28°C. Com relação à esporulação, observa-se diferença na preferência entre os isolados, tendo JAB 45 esporulado melhor nas temperaturas mais baixas, enquanto JAB 02 tendeu a aumentar a produção de conídios nas temperaturas mais altas. Esta diferença na preferência pode ser atribuída à variabilidade genética existente na espécie, com grande variação nos aspectos morfológicos e bioquímicos entre os isolados, como referido por Steenberg & Humber (1999).

### Conclusões

1. O pH inicial do meio de cultivo não afeta severamente o desempenho dos isolados, mas o pH 4,0 reduz o crescimento.
2. O isolados crescem melhor em ausência de luz e o fotoperíodo não afeta a esporulação.
3. A faixa térmica favorável para o crescimento e esporulação dos isolados situa-se entre 19 e 25°C.

### Agradecimentos

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes) pela concessão da Bolsa de Mestrado ao segundo autor.

### Referências

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.289-382.
- 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**, v.24, p.375-381, 2002.
- COETZEE, J.C.; EICKER, A. The effect of nutritional and environmental factors on the growth and sporulation of a Southern African isolate of *Verticillium fungicola*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 13., 1991, Dublin. **Proceedings**. Dublin: Balkema, 1991. v.2, p.417-424.
- COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York: J. Wiley, 1958. 524p.
- DIXON, W.J.; MASSEY JUNIOR, F.J. **Introduction to statistical analysis**. 3rd ed. Tokyo: McGraw-Hill Kogakusha, 1969. 638p.
- FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria bassiana*. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of pest and plant diseases**. London: Academic, 1981. p.465-482.
- GALANI, G. Cultivarea unor specii de ciuperi entomopatogene in medii lichide cu valori de pH initial diferite. **Analele Institutului de Cercetari Pentru Protectia Plantelor**, v.21, p.45-54, 1987.
- HALLSWORTH, J.E.; MAGAN, N. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2435-2442, 1996.
- HANLON, G.W.; KOOLOOBANDI, A.; HUTT, A.J. Microbial metabolism of 2-arypropionic acid: effect of environmental on the metabolism of ibuprofen by *Verticillium lecanii*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.442-447, 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**, v.13, p.329-334, 1985.
- LECUONA, R.E.; RIBA, G. **Primeras etapas del ciclo de desarrollo de hongos entomopatogénos**. Pergamino: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1991. 30p. (Boletín de Divulgación Tecnológica, 87).
- LI, G.; YUHUA, Y.; LIYING, W. Influence of temperature and nutrition on growth of the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* (Beijing strain). **Chinese Journal of Biological Control**, v.7, p.115-119, 1991.
- LILLY, V.G.; BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi**. New York: MacGraw-Hill Book, 1951. 464p.
- MAGALHÃES, B.P.; DIAS, J.M.C.S.; FERREIRA, C.M. Mycelial production of *Metarhizium anisopliae* in liquid culture using different sources of carbon and nitrogen. **Revista de Microbiologia**, v.25, p.181-187, 1994.
- MONTEIRO, A.C. **Aspectos fisioecológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus)**. 1988. 233p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- NAHAS, E.; ARAI, N.N.S. Crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* em vários meios e condições de cultivo. **Revista de Microbiologia**, v.18, p.77-82, 1987.
- STEEBERG, T.; HUMBER, R.A. Entomopathogenic potencial of *Verticillium lecanii* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.309-314, 1999.
- VERHAAR, M.A.; HIJWEGEN, T. Efficient production of phialoconidia of *Verticillium lecanii* for biocontrol of cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.99, p.101-103, 1993.
- WENZEL, I.M. **Fatores nutricionais e produção em massa de *Verticillium lecanii* em meios naturais líquidos e sólidos**. 2002. 70p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.