

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO MASSAL E INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS
NO CULTIVO E VIABILIDADE DE *Bipolaris euphorbiae***

Carime Moraes
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIA VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO MASSAL E INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS
NO CULTIVO E VIABILIDADE DE *Bipolaris euphorbiae***

Carime Moraes

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

M827p Moraes, Carime
Produção massal e influência de fatores físicos no cultivo e viabilidade de *Bipolaris euphorbiae* / Carime Moraes. -- Jaboticabal, 2009
x, 75 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009

Orientador: Antonio Carlos Monteiro

Banca examinadora: Marcelo Augusto Boechat Morandi, Kátia Cristina Kupper
Bibliografia

1. Plantas daninhas - controle. 2. *Euphorbia heterophylla* - controle biológico. 3. *Bipolaris euphorbiae*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PRODUÇÃO MASSAL E INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS NO CULTIVO E VIABILIDADE DE *Bipolaris euphorbiae*.

AUTORA: CARIME MORAES

ORIENTADOR: Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA pela Comissão Examinadora:

Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

Dr. MARCELO AUGUSTO BOECHAT MORANDI

Dra. KATIA CRISTINA KUPPER

Data da realização: 13 de julho de 2009.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ANTONIO CARLOS MONTEIRO

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CARIME MORAES - Filha de Osvaldo Moraes e Maria de Fátima Rizzo Moraes, nascida em 26 de outubro de 1983, na cidade de Jaboticabal - SP. Bióloga, graduada pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), em dezembro de 2005. Estagiou no Laboratório de Anatomia Animal (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal) da FCVA/UNESP de Março de 2003 a Dezembro de 2005, onde desenvolveu projetos de iniciação científica financiados pela FAPESP e publicou trabalhos em congressos e revistas científicas. Em março de 2007 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, no Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Durante o curso de Mestrado publicou trabalhos em congressos e fóruns.

AOS MEUS PAIS MARAVILHOSOS

OSVALDO E MARIA DE FÁTIMA - pelo amor, estímulo, apoio e dedicação, a quem devo minha educação e formação.

OFEREÇO

AS MINHAS IRMÃS

ANDREIA E PATRÍCIA - pela amizade, ajuda e estímulo

DEDICO

A DEUS - por toda força, coragem e sempre estar comigo em todos os momentos de minha vida.

AO LUIZ ÉZIO - pelo carinho, apoio, incentivo e companheirismo

AGRADEÇO EM ESPECIAL

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho e, em especial as seguintes pessoas:

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro, pela oportunidade de aperfeiçoamento, pela atenção, paciência e amizade;

À banca examinadora: Dr. Marcelo Augusto Boechat Morandi e Dra. Katia Cristina Kupper pelas sugestões e críticas mencionadas

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pela ajuda e precisão nas análises estatísticas.

Ao Prof Dr. Newton La Scala Júnior pelo seu indispensável auxílio na cessão do simulador solar.

Aos técnicos do laboratório de Bioclimatologia, Sandra e Pedro Pizzaro “Lambari” pelo carinho e ajuda na utilização do simulador solar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudo.

As queridas amigas Dinalva Alves Mochi, Beatriz dos Santos e Ana Carolina Ribeiro Machado pela ajuda imprescindível na última etapa do trabalho, pelo carinho e amizade.

Aos amigos do laboratório: Lucas Simi, Aline Botelho, Aline Almeida, Polyane de Sá Santos, Marcos Valério García, Nancy Prette, Mara Penariol, Manuela Teodoro, pela amizade, pelas agradáveis conversas e pela ajuda.

Ao Prof Dr. Ely Nahas por permitir a utilização de equipamentos do seu laboratório.

Ao técnico do laboratório de microbiologia do solo Luis Carlos de Assis, por ser sempre prestativo, atencioso e divertido.

A secretária da Microbiologia Edna Maria Testa Dáquila, pelo carinho e amizade.

À bibliotecária Núbia pela correção das referências bibliográficas

Às empresas: Mandioquin (Itápolis/SP), **Usina São Martinho** (Pradópolis/SP), **Á Corn Products Brasil** (Mogi Guaçu/SP) pela cessão de materiais utilizados nos experimentos.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original." (Albert Einstein)

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Características gerais de <i>Euphorbia heterophylla</i>	3
3.2 O fungo fitopatogênico <i>Bipolaris euphorbiae</i>	5
3.3 Influência de fatores nutricionais e físicos no desenvolvimento do fungo.....	6
3.4 Produção massal de fungos.....	9
4. REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO DE <i>Bipolaris euphorbiae</i> SOB O EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS E TOLERÂNCIA A RADIAÇÃO SOLAR E ULTRAVIOLETA	22
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1 Fungo.....	25
2.2 Efeito do pH do meio de cultura	26
2.3 Efeito da temperatura.....	27
2.4 Efeito da iluminação.....	27
2.5 Exposição a radiação solar e ultravioleta.....	28
2.6 Avaliação.....	29
2.7 Análise estatística.....	30

	Página
3.RESULTADOS	31
3.1 Efeito do pH do meio de cultura.....	31
3.2 Efeito da temperatura.....	32
3.3 Efeito da iluminação.....	34
3.4 Exposição a radiação solar e ultravioleta.....	35
4. DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÕES	41
6. REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DE <i>Bipolaris euphorbiae</i> EM MEIOS LÍQUIDOS E SÓLIDOS E EM SISTEMA BIFÁSICO DE CULTIVO	47
RESUMO	47
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 Fungo.....	53
2.2 Preparo dos meios líquidos.....	53
2.3 Preparo dos meio sólidos.....	54
2.4 Combinação bifásica.....	55
2.5 Cultivo e incubação do fungo nos meios sólidos e líquidos.....	55
2.6 Cultivo e incubação do fungo no sistema bifásico.....	56
2.7 Avaliação nos meios sólidos, líquidos e sistema bifásico.....	56
2.8 Análise estatística.....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 Produção de <i>Bipolaris euphorbiae</i> em meios líquidos.....	58
3.2 Produção de <i>Bipolaris euphorbiae</i> em meios sólidos.....	62
3.3 Produção de <i>Bipolaris euphorbiae</i> no sistema bifásico.....	65
4. CONCLUSÕES	68
5. REFERÊNCIAS	68
APÊNDICES	73

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

	Página
Tabela 1. Crescimento (mm) de <i>Bipolaris euphorbiae</i> durante 8 dias de cultivo a 27°C e ausência de iluminação, em meio de cultura com diferentes valores iniciais de pH.....	31
Tabela 2. Esporulação e viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> cultivado a 27°C em meio com diferentes valores iniciais de pH.....	32
Tabela 3. Crescimento (mm) de <i>Bipolaris euphorbiae</i> após 8 dias de cultivo em meio mínimo, sob diferentes valores de temperatura e em ausência de iluminação.....	33
Tabela 4. Efeito da temperatura na esporulação e viabilidade dos conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i>	34
Tabela 5. Crescimento (mm) de <i>Bipolaris euphorbiae</i> após 8 dias de cultivo em meio mínimo a 25°C, sob diferentes regimes de iluminação.....	35
Tabela 6. Esporulação e viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> incubados sob diferentes regimes de iluminação, em temperatura de 25°C.....	35

	Página
Tabela 7. Viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> submetidos à radiação emitida por simulador solar em diferentes tempos de exposição e incubados a 25°C.....	36
Tabela 8. Viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> submetidos à radiação emitida por lâmpada de luz ultravioleta germicida em diferentes tempos de exposição e incubados a 25°C.....	37

Capítulo 3

	Página
Tabela 1. Massa da matéria seca (g 100 mL de meio ⁻¹) de <i>Bipolaris euphorbiae</i> produzida em meios líquidos obtidos a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais usados em diferentes concentrações, após 10 dias de cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.....	59
Tabela 2. Produção de conídios (x 10 ⁴ con. mL de meio ⁻¹) de <i>Bipolaris euphorbiae</i> em meios líquidos obtidos a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais usados em diferentes concentrações, após 10 dias de cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.....	59
Tabela 3. Viabilidade (%) de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> em meios líquidos obtidos a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais usados em diferentes concentrações, após 10 dias de cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.....	60

	Página
Tabela 4. Produção e viabilidade de conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> em meios sólidos preparados com misturas de diferentes substratos, após 10 dias de cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.....	63
Tabela 5. Produção e viabilidade dos conídios de <i>Bipolaris euphorbiae</i> obtido no processo bifásico, após cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.....	66

LISTA DO APÊNDICE

	Página
Figura 1. Crescimento de <i>Bipolaris euphorbiae</i> em função de diferentes valores iniciais de pH do meio de cultura, após cultivo por oito dias a 27°C.....	74
Figura 2. Crescimento de <i>Bipolaris euphorbiae</i> após cultivo por oito dias em diferentes valores de temperatura.....	75

CAPÍTULO 1- PRODUÇÃO MASSAL E INFLUÊNCIA DE FATORES FÍSICOS NO CULTIVO E VIABILIDADE DE *Bipolaris euphorbiae*

RESUMO - O conhecimento das condições adequadas de cultivo e a busca por meios de cultura e métodos de produção que favoreçam o crescimento e a esporulação de fungos e, principalmente, viabilizem economicamente o processo de produção são aspectos importantes a serem considerados na produção massal de um agente de biocontrole. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento, a esporulação e a viabilidade de *B. euphorbiae* sob o efeito de diferentes valores de pH inicial do meio de cultivo, da temperatura e do regime de iluminação além de analisar a tolerância dos conídios à luz solar e a radiação ultravioleta e selecionar meios de cultura de baixo custo e fácil obtenção para produção do fungo. O fungo foi cultivado em meios de cultura com vários valores de pH (4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), exposto a diversas temperaturas (13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 e 34 °C) e distintos fotoperíodos (0, 12 e 24 hs). Conídios do fungo foram submetidos ao efeito da luz emitida por simulador solar e radiação ultravioleta germicida, e avaliou-se, em ensaios distintos, a produção de *B. euphorbiae* em diferentes concentrações de meios líquidos obtidos de resíduos e subprodutos agroindustriais (vinhaça, melaço de cana-de-açúcar, leite de levedura, soro de queijo, água da prensa da mandioca e milhocina[®]), em misturas de substratos sólidos obtidos de grãos e derivados (sorgo em grão com casca de soja e quirela de trigo e casca de soja com quirela de trigo) e, posteriormente, a combinação dos meios líquidos e sólidos que proporcionaram melhores resultados em um sistema bifásico de cultivo. Nos ensaios dos fatores ambientais, a avaliação do desempenho do fungo foi baseada no crescimento radial das colônias, na produção de conídios por unidade de área de colônia e na viabilidade dos conídios em lâminas de microscopia. A determinação dos meios líquidos mais eficientes para a produção de *B. euphorbiae* foi baseada na avaliação da produção e viabilidade dos conídios e da biomassa, e na produção e viabilidade de conídios nos meios sólidos e no sistema bifásico. O pH 6 se mostrou o mais adequado para realizar o cultivo do fungo, pois promoveu o crescimento e

estimulou a esporulação, favorecendo também a viabilidade dos conídios. As temperaturas de 16 e 22°C e o regime de fotoperíodo de 12hs proporcionaram os maiores valores de esporulação do fungo. Os conídios de *B. euphorbiae* foram pouco afetados pela radiação solar e ultravioleta, pois mantiveram-se viáveis mesmo após grandes períodos de exposição a estes raios. A produção do fungo nos meios líquidos favoreceu a viabilidade dos conídios, obtendo-se os maiores valores nos meios a base de melaço de cana-de-açúcar, leite de levedura e vinhaça. A esporulação do fungo foi acentuadamente maior nos meios sólidos do que nos meios líquidos, destacando-se a produção obtida na mistura de sorgo em grão com casca de soja (40:60%) a qual foi de $2,30 \text{ conídios} \times 10^7 \text{ g meio}^{-1}$. O método bifásico de cultivo não influenciou a produção de conídios de *B. euphorbiae*, mantendo da ordem de $10^7 \text{ conídios g meio}^{-1}$. A viabilidade dos conídios, aspecto importante a ser levado em consideração para sua utilização em programas de manejo integrado, manteve-se acima de 99,7% tanto no ensaio com meios sólidos quanto no ensaio bifásico.

Palavras-chave: controle biológico, fungo patogênico de planta daninha, produção de fungos, fatores ambientais, radiação solar e ultravioleta

CHAPTER 1 – MASSAL PRODUCTION AND INFLUENCE OF PHYSICAL FACTORS IN THE CULTIVATION AND VIABILITY OF *Bipolaris euphorbiae*

SUMMARY – The knowledge of adequate cultivate conditions, search for culture media and production methods that favor the growth and sporulation of fungi and, mainly, gain economical viability in the production process, are important aspects that must be considered in the massal production of an biocontrol agent. The objective of this work was to evaluate the growth, sporulation and viability of *Bipolaris euphorbiae* under the effects of different cultivation medium initial pH values, temperature and photoperiod, and also to analyze the tolerance of conidia to light emitted by solar and ultraviolet radiation and select media of low cost and easy purchase for the fungus production. The fungus was cultivated in media with several pH values (4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10) and exposed do different temperatures (13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 and 34°C) and photoperiods (0, 12, 24 hours). Conidia of the fungus were submitted to light effect, emitted by solar simulator and germicidal ultraviolet radiation. In a different experiment was evaluated the production of *B. euphorbiae* in different liquid media concentrations, obtained of agroindustrial residuals and byproducts (vinasse, sugar cane molasses, yeast cream, cheese whey, water of cassava bran and milhocina[®]) in combined mixtures of solid substracts obtained from different grains and derivates (sorghum grains with soybean hulls and cracked wheat and soybean hulls with cracked wheat) and, posteriorly, in combination of the liquid and solid media that demonstrated the best results in a two-phase cultivate system. In the experiments of environmental factors the fungus performance was based on the radial growth of the colonies, conidia production per colony area unit and viability of conidia in microscopic slide. The determination of the most efficient liquid media for the production of *B. euphorbiae* was based on the evaluation of production and viability of conidia and biomass, and on the production and viability of conidia in solid media and in two-phase system. pH 6 demonstrated to be the most adequate for the fungus cultivation, once that promoted the growth and stimulated sporulation, favoring the conidia viability. The temperatures of 16 and 22°C and 12 hours of photoperiod proportionated the highest values of fungus sporulation. *B. euphorbiae*

conidia were barely affected by solar and ultraviolet radiation, once that they maintained their viability after long periods of exposure to these radiations. The production of fungus in liquid media favored conidia viability, obtaining superior values in media based of sugar cane molasses, yeast cream and vinasse. The sporulation of the fungus was significantly bigger in solid media than in liquid media, distinguishing the production obtained in the mixture of sorghum grains with soybean hulls (40:60%), which was of $2,30 \text{ con.} \times 10^7 \text{ g medium}^{-1}$. The production of *B. euphorbiae* was not influenced by the two-phase system, maintaining its production in order of $10^7 \text{ g medium}^{-1}$. The conidia viability, an important aspect that must be considered in programs of integrated pest management, maintained it self above 99,7% in both solid medias as in two-phase system.

Keywords: Biological control, weed pathogenic fungi, fungus production, environmental factors, solar and ultraviolet radiation.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

As plantas daninhas são importantes componentes bióticos dos agroecossistemas, proporcionando ou condicionando uma série de fatores ecológicos que afetam as culturas agrícolas, interferindo no crescimento, na produtividade e qualidade do produto, além de afetarem o processo de produção no campo e o processamento pré-industrial (AMARAL, 2006). Assim, o homem passou a desenvolver estratégias artificiais para o controle do tamanho e crescimento dessas populações. Esses métodos se caracterizam pela drasticidade da ação, pelo grande impacto sobre as populações e pelo alto custo ambiental que representam (TOFFANELLI, 1997).

Um dos maiores impactos decorrentes da utilização sistemática e continuada de uma mesma modalidade de controle é a alteração da composição específica de comunidades infestantes que são substituídas por biótipos tolerantes da mesma espécie (TOFFANELLI, 1997).

A resistência de plantas daninhas aos herbicidas se caracteriza como fenômeno evolutivo, decorrente da seleção imposta por estes. Esse é um problema grave que vem aumentando nos últimos anos nas áreas agrícolas em todo o mundo. Novas opções de controle de pragas se tornam necessárias e, atualmente, o Manejo Integrado de Pragas (MIP), que usa diferentes métodos de controle, está ganhando adeptos no âmbito global. Diversos métodos têm sido desenvolvidos nos últimos anos, buscando diagnosticar a resistência. Dentro dessa abordagem, as tecnologias que utilizam agentes biológicos, tais como fitopatógenos, são os mais utilizados como métodos alternativos de controle e apresentam grande potencial de uso futuro (DE NARDO, 1998; TANZINI et al., 2002).

Fungos fitopatogênicos têm progressivamente despertado a atenção tendo em vista sua utilização como agentes microbianos em programas de manejo de plantas daninhas. O controle biológico utilizando fungos é uma das alternativas mais importantes, com amplo potencial de utilização sem deterioração dos recursos naturais

(PADIN et al., 1995). Há vários exemplos bem sucedidos de programas de controle biológico de plantas daninhas utilizando fitopatógenos, como o emprego do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, para o controle de *Aeschynomene virginica*, importante infestante da cultura do arroz (CHARUDATTAN, 1995).

De acordo com CHARUDATTAN (1990) CASST é um micoherbicida à base de *Alternaria cassie*, Jurair & Khan, desenvolvido nos Estados Unidos pela Mycogen Corp. O fungo se mostrou efetivo contra *Senna obtusifolia* (L.) Irwin & Barnaby em diversas condições ambientais (WALKER, 1982; WLAKER & BOYETTE, 1986; CHARUDATTAN, 1986).

O emprego de bioherbicidas, entre os quais o fungo fitopatogênico *Bipolaris euphorbiae*, inicialmente identificado como *Helminthosporium euphorbiae*, tem sido sugerido como estratégia para o controle biológico de *Euphorbia heterophylla* L., uma das piores plantas daninha na cultura da soja no Brasil (LORENZI, 2000). O fungo é um patógeno específico para a planta, provocando manchas necróticas no caule e nas folhas, evoluindo para intenso desfolhamento, podendo conduzir à sua morte. SILVA et al. (1996) observaram desfolha total da planta quando suspensões de esporos de *B. euphorbiae* ou, o filtrado do meio de cultura, onde o fungo cresceu, foram pulverizados sobre a planta.

Por ser de fácil multiplicação em laboratório e apresentar grande capacidade de esporulação, o patógeno foi considerado um candidato ideal para o desenvolvimento de bioherbicidas a ser introduzido em programas de manejo de *E. heterophylla*. Para introduzir o patógeno em programas de manejo de plantas daninhas são necessários conhecimentos básicos de sua fisiologia, como por exemplo, de suas exigências físicas, de modo a estabelecer condições favoráveis para o crescimento, esporulação e viabilidade do fungo, além de avaliar a tolerância dos conídios a radiação e desenvolver meios de cultivo de simples composição que tenham baixo custo e sejam viáveis para a sua produção em massa.

A produção de fungos representa uma fase importante no processo de desenvolvimento de um bioherbicida, uma vez que esses patógenos precisam estar disponíveis em grandes quantidades. Segundo KHALIL et al. (1985), aspectos como a

seleção de meios de cultura para produção e o conhecimento das condições adequadas de cultivo são importantes e devem ser levados em consideração na produção massal de um agente de biocontrole. No entanto, há poucos estudos sobre os fatores que podem influenciar no desenvolvimento do fungo, ou mesmo, que busquem encontrar substratos e condições adequadas para a sua produção em larga escala.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- a) Avaliar o efeito de fatores físicos no crescimento, esporulação e na viabilidade de *B. euphorbiae*;
- b) Analisar a tolerância dos conídios à luz solar e à radiação ultravioleta;
- c) Avaliar a sua produção em meios sólidos e líquidos, elaborados a partir de resíduos ou subprodutos da agroindústria;
- d) Selecionar meios para a produção em um sistema bifásico, disponibilizando-o para o controle de *E. heterophylla*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características gerais de *Euphorbia heterophylla*

Euphorbia heterophylla L. é uma planta daninha pertencente à família Euphorbiaceae e é popularmente conhecida como amendoim-bravo ou leiteiro. Segundo OLIVEIRA & SÁ (1998) o nome desta espécie é decorrente da grande diversidade de formas de folha, tipo de bordas e pilosidade. O caule é simples ou ramificado, com modificações em intervalos regulares. As folhas alternas, opostas ou

verticiladas ocorrem tanto no caule como nos ramos, com uma concentração na parte final dos ramos, abaixo da inflorescência (CRONQUIST, 1981; KISSMANN & GROTH, 1992). É uma planta anual, de porte médio de 40-60 cm, ereta e herbácea, nativa da América Tropical e subtropical e, atualmente, está amplamente difundida nas regiões temperadas do mundo (HARGER & NESTER 1980). Segundo KISMANN & GROTH (1992) o amendoim-bravo é relatado em níveis expressivos em mais de vinte países e como uma planta pouco importante em outros 40 países.

No Brasil esta espécie está amplamente distribuída na região centro-sul do país, constatando-se sua presença em 74% das áreas de soja do planalto do estado do Rio Grande do Sul (VIDAL & WINKLER, 2002). Apresenta extraordinária capacidade de multiplicação por sementes, as quais germinam em ampla faixa de condições ambiente ocorrendo mesmo na ausência de iluminação e em temperaturas de até 40°C (BRIDGES et al., 1992; BECKE, 1995), suas plantas crescem com muita rapidez e tendem a sombrear plantas de culturas anuais de desenvolvimento mais lento. Por isso competem intensamente na absorção de nutrientes do solo (KISMANN & GROTH 1999).

A capacidade de formação de densos e duradouros estoques de sementes em solos agrícolas é uma estratégia para a perpetuação da espécie nos agroecossistemas (JOWERS et al., 1986). Esta planta produz látex que adere aos grãos durante o processo de colheita, favorecendo a fixação de contaminantes. Este látex aderido pode aumentar o teor de umidade dos grãos (KISMANN & GROTH 1992). A soja é uma das culturas mais prejudicadas pela interferência desta planta daninha, porque além das características citadas, *E. heterophylla* apresenta hábito de crescimento similar à esta planta cultivada, intensificando a competição em momentos críticos da vida da leguminosa.

Os herbicidas constituem-se na principal medida de controle de plantas daninhas na cultura de soja; no entanto, a pressão de seleção causada pelo uso contínuo de produtos com o mesmo mecanismo de ação pode provocar a seleção de biótipos resistentes, como ocorreu com *E. heterophylla*, que se mostrou resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), em regiões do Centro-Oeste

(MELHORANÇA & PEREIRA, 2000), Sudeste (GELMINI et al., 2001) e Sul do Brasil (WINKLER & VIDAL, 2004).

Fungos fitopatogênicos têm progressivamente despertado a atenção tendo em vista sua utilização como agentes microbianos em programas de manejo de pragas. Em levantamentos realizados no Rio de Janeiro, BARRETO & EVANS (1998) identificaram dez patógenos de *E. heterophylla* e, dentre estes, o fungo *B. euphorbiae* foi o agente causal mais frequente. O fungo é capaz de provocar intenso desfolhamento e lesões caulinares em *E. heterophylla*, evidenciando alta eficácia de controle, especificidade ao hospedeiro e facilidade de produção massal do inóculo.

3.2 O fungo fitopatogênico *Bipolaris euphorbiae*

O fungo *B. euphorbiae* pertence à família Dematiaceae (MUCHOVEJ & CARVALHO, 1989), e anteriormente foi denominado de *Helminthosporium euphorbiae*. Segundo GAZZIERO & YORINORI (1993) sua ação se dá pela produção de uma toxina durante o processo de infecção e os sintomas se manifestam no tecido suscetível, como necroses nas folhas e caules.

Em experimentos com amendoim-bravo realizados em casa de vegetação, YORINORI (1985) observou que após 72 horas da inoculação de uma suspensão com concentração de 1×10^4 conídios mL^{-1} houve uma redução de 68% no peso fresco da planta quando comparado com plantas não inoculadas, enquanto uma redução de apenas 47,6% foi obtida utilizando-se herbicida químico. Já em condições de campo, GAZZIERO et al. (1989a) observaram que para obtenção de desfolha expressiva e melhor controle desta planta daninha foram necessárias suspensões com mais de 8×10^5 conídios mL^{-1} de *B. euphorbiae*. Resultado similar foi obtido por MARCHIORI et al. (2001) que observaram ser necessário concentrações maiores que 2×10^5 conídios mL^{-1} para ocorrer um controle eficiente do amendoim bravo.

Estudos visando o conhecimento da compatibilidade de *B. euphorbiae* com outros produtos comumente usado na cultura da soja foram realizados. TOFFANELLI (1997) determinou que os herbicidas chorimorum-ethyl, fomesafen glifosato e imazapir

e os surfactantes Energic, Triton X-100 e Herbitensil foram inibitórios para o crescimento micelial de *B. euphorbiae*. NECHET et al. (2006) verificaram que a germinação dos conídios não foi inibida pela mistura dos conídios com os herbicidas imazethapyr, glifosato, fomesafen, carfentrazone, atrazine e glifosato mais carfentrazone, estando entre 99,6 a 100% a média de germinação dos conídios.

Para verificar a possibilidade da utilização de misturas de tanque constituídas por esporos do fungo e herbicidas ou surfactantes recomendados para a cultura da soja, NEMOTO et al. (2002) verificaram que todos os surfactantes testados permitiram uma porcentagem de germinação de esporos de *B. euphorbiae* equivalente àquela alcançada na presença de água. Com relação aos herbicidas, foi observado que somente na presença de glifosato e imazetaphyr a germinação dos conídios não seguiu a tendência observada com água. GAZZIERO & YORINORI (1988) verificaram que as misturas de *B. euphorbiae* com fomesafen, lactofen e acifluorfen, resultaram em maior controle da planta daninha.

YORINORI et al. (1985) avaliaram os efeitos da mistura de *B. euphorbiae* e *Alternaria sp.* no controle de *E. heterophylla*. Os sintomas de doenças produzidos por *B. euphorbiae* foram mais rápidos em comparação com os provocados por *Alternaria sp.*

3.3. Influência de fatores nutricionais e físicos no desenvolvimento do fungo

O conhecimento da influência de fatores nutricionais e físicos no desenvolvimento de *B. euphorbiae* é de extrema importância para se estabelecer as condições ideais de cultivo para sua produção massal. Apesar da importância destes fatores para a produção de *B. euphorbiae*, poucos trabalhos foram encontrados na literatura científica.

Quanto às exigências nutricionais, PENARIOL et al. (2008) avaliaram diferentes fontes de carbono, de nitrogênio, de fósforo e a suplementação do meio de cultivo com macro e micronutrientes, para o crescimento e a esporulação de *B. euphorbiae*. Os autores observaram maior crescimento e esporulação do fungo usando amido e nitrato

de sódio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, e fosfato de potássio monobásico e fosfato de cálcio como fonte de fósforo.

Para determinar os efeitos da temperatura no crescimento micelial e germinação de conídios de *B. euphorbiae*, NECHET et al. (2006) testaram oito temperaturas (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40°C). Puderam concluir que *B. euphorbiae* cresceu bem na faixa de temperatura situada entre 10 e 30°C, com o crescimento ótimo na temperatura de 25°C, enquanto a melhor germinação dos conídios foi obtida na faixa de 20 e 30°C. Avaliando o efeito da temperatura no crescimento micelial de *Bipolaris sorokiniana*, PRATES & FERNANDES (2000) observaram que o crescimento foi maior na faixa de temperatura entre 26 e 28°C. Com a finalidade de estudar o efeito do pH na atividade da fitotoxina produzida *in vitro* por *B. euphorbiae*, BARBOSA et al. (2002) observaram maior atividade da produção da fitotoxina no pH 6.

Os efeitos das condições de luminosidade (iluminação por duas horas e escuro nas horas subseqüentes, ausência de iluminação por duas horas e exposição à luz nas horas subseqüentes e ausência total de iluminação) na germinação dos conídios de *B. euphorbiae*, foram estudados por GAZZIERO et al. (1989b) e os resultados mostraram que, no tratamento mantido no escuro o desenvolvimento dos tubos germinativos foi quatro a cinco vezes maior, quando comparado com o mantido sob as condições de iluminação descritas.

Os efeitos dos fatores físicos sobre os fungos podem variar de acordo com as espécies consideradas. Cultivando *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus* em meio de Sabouraud sob várias temperaturas (5 - 35°C) e diferentes valores de pH (3-11), HALLSWORTH & MAGAN (1996) determinaram que a temperatura ótima para o crescimento dos isolados encontra-se em 25, 30-35 e 20°C, respectivamente, e os valores ótimos de pH encontram-se na faixa situada entre 5 e 8.

ZHAO & SHAMOUN (2006) estudaram a influência do pH (2 - 12) e de várias temperaturas (0, 5, 10, 15, 20, 23, 25, 30 e 35°C) sobre o crescimento, esporulação e germinação de conídios de *Phoma exigua* e concluíram que na faixa de pH situada entre 5 e 10 não houve efeito no crescimento micelial e germinação dos conídios, e a temperatura ótima para crescimento e germinação de conídios estava entre 20 - 25°C.

A determinação das melhores condições de crescimento e esporulação de *B. bassiana*, tais como diferentes condições de iluminação (luz contínua, alternada e escuro contínuo) e de temperatura (20, 25, 30 e 35 °C) foram investigadas por NAHAS & ARAI (1987). Os regimes de escuro contínuo e luz alternada foram os que propiciaram maior velocidade de crescimento, quando comparados com o regime de luz contínua. Por outro lado, o regime de luz alternada favoreceu a produção de esporos; tanto o crescimento quanto a esporulação foram favorecidos pela temperatura de 25 °C.

Estudando os efeitos da iluminação (regimes de luz contínua, alternada e escuro) e da temperatura (4 - 40 °C) sobre o crescimento e a esporulação de *Verticillium fungicola* COETZEE & EICKER (1991) observaram que a temperatura ótima para o crescimento e esporulação situa-se entre 22 - 24 °C; o maior crescimento e a maior produção de esporos foram obtidos em regime de luz contínua.

A influência de quatro temperaturas (22, 25, 28 e 31 °C) e três regimes de luz (24, 12 horas de luz, e 24 horas de escuro) sobre o crescimento, produção e viabilidade de *Sporothrix insectorum*, foi estudada por LOUREIRO et al. (2002). De acordo com os resultados verificados por estes autores, a melhor esporulação ($2,42 \times 10^7$ conídios mL⁻¹) e viabilidade ocorreram a 28 °C; o maior crescimento, esporulação e viabilidade dos conídios ocorreram em regime de iluminação contínua.

Ao serem aplicados no campo, os fungos estão sujeitos à ação de fatores bióticos e abióticos, que podem influenciar na sua sobrevivência e propagação. Entre os abióticos, destaca-se a radiação UV (FARGUES et al., 1996; BRAGA et al., 2001a, CAGAN & SVERCEL, 2001), que pode provocar danos diretos e indiretos aos conídios, reduzindo a sua eficiência. Entre os danos diretos pode ocorrer inativação dos conídios, danos letais ao DNA e mutações. Entre os danos indiretos inclui-se, o aquecimento e a dessecação dos esporos (NICHOLSON et al., 2000).

A radiação UV pode atuar sobre a germinação dos conídios e sobre os estágios iniciais do tubo germinativo (HUNT et al., 1994; ALVES & LEUCONA, 1998; BRAGA et al., 2001a, b). Os efeitos nocivos da radiação UV-B têm sido demonstrados para várias espécies de fungos, como *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Aphanocladium*

album, *Verticillium lecanii*, *Metarhizium flavoviridie* e *M. anisopliae* (HUNT et al., 1994; INGLIS et al., 1997; SMITS et al., 1996; BRAGA et al., 2001a).

Com o objetivo de encontrar isolados tolerantes à radiação UV-B, diversos trabalhos têm sido realizados, em particular na França, Estados Unidos, Canadá e Brasil (FARGUES et al., 1996; INGLIS et al., 1997; CAGAN & SVECEL, 2001; BRAGA et al., 2001b, BRAGA et al., 2002). No entanto no Brasil, há poucos trabalhos com este intuito. Avaliando a tolerância do isolado IBCB 425 de *M. anisopliae* à radiação UV-A e UV-B, FRANCISCO et al. (2008) verificaram uma redução acentuada na viabilidade dos conídios após 3 horas de exposição à radiação. HUNT et al. (1994) e BRAGA et al. (2001a) encontraram isolados de fungos que apresentaram porcentagem de germinação em torno de 60% após 2 horas de exposição. Foi verificada uma redução de aproximadamente 100% na viabilidade das linhagens ARSEF 23 e 2575 de *M. anisopliae* após 4 horas de exposição à radiação (BRAGA et al., 2001b). Já para o isolado Bb 19 de *B. bassiana* uma redução acentuada na viabilidade foi verificada após 2 horas de exposição (FERNANDES et al., 2007).

Para se desenvolver um agente de controle biológico mais eficiente no campo é necessário conhecer a tolerância do fungo a radiação solar, visando a sua maior persistência e eficiência no controle da planta daninha.

3.4. Produção massal de fungos

Para a utilização de *B. euphorbiae* como bioherbicida além do conhecimento das condições nutricionais e físicas para um bom crescimento, esporulação e viabilidade, se faz necessária a obtenção de substratos adequados que viabilizem a sua produção que deve ser em larga escala. Segundo KHALIL et al. (1985) a seleção de meios de cultura para a produção é um aspecto a ser levado em consideração na produção massal de um agente de biocontrole.

A composição do meio pode ter uma estreita relação com o custo e a qualidade do fungo produzido, pois pode influenciar o tipo, formato e quantidade de propágulo produzido (LEITE et al. 2003). No desenvolvimento de um meio de cultura, segundo

JACKSON et al. (1996) e JACKSON (1997), três etapas devem ser consideradas: a primeira é selecionar um meio que proporcione uma boa produção da forma desejada do fungo, a segunda é variar os nutrientes e avaliar o seu impacto na produção do patógeno e a última é substituir os componentes nutricionais por um substrato complexo, barato e acessível.

Desta forma, há necessidade de estudos sobre meios que propiciem bom crescimento e esporulação, tenham baixo custo e sejam elaborados com substratos de fácil obtenção, manuseio e preparo. O arroz cozido, principalmente nos países em desenvolvimento, é um dos meios mais utilizados na produção de fungos, entretanto, devido ao elevado preço que o arroz tem alcançado no comércio, desde a década de 80, tem se procurado substituir o arroz por substratos alternativos, justamente visando à redução de custos.

Trabalhos têm sido realizados no intuito de averiguar a utilização de substratos alternativos que favoreçam o crescimento e esporulação dos fungos e, principalmente, viabilizem economicamente o processo de produção (CRUZ et al., 1983). A produção do fungo *M. anisopliae* foi verificada em caupi (*Vigna unguiculata*), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), fava (*Phaseolus lunatus* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L) substratos estes que estão facilmente disponíveis na região de Pernambuco (VILAS BOAS et al., 1996). WENZEL et al. (2006) avaliaram a produção e a viabilidade dos conídios de *Lecanicillium lecanii* em diversos substratos naturais sólidos e líquidos obtidos de grãos e verificaram que farelo de soja, farelo de trigo, trigo moído e lentilha, como substratos sólidos e extratos líquidos de feijão carioca, feijão-branco, trigo e soja, proporcionaram entre os substratos avaliados, as maiores produções de conídios.

A produção do fungo entomopatogênico *S. insectorum* foi avaliada nos seguintes meios líquidos: macerados de feijão de mesa, feijão guandu e soja, extratos de batata, fubá e soja, leite em pó, farelo de trigo e arroz (OLIVEIRA, 2000). ALVARENGA et al. (1988) utilizaram macerados de feijão de mesa (carioquinha e jalo), feijão guandu, soja e grão de bico como meios alternativos para a produção de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Na tentativa de obter melhores condições de crescimento e esporulação de *B. bassiana* NAHAS e ARAI (1987) utilizaram como substratos farelo de arroz, farelo de soja, farelo

de trigo, farelo de crisálidas e observaram que o meio de farelo de trigo favoreceu a produção do maior número de esporos ($13,4 \times 10^9$ placas de cultivo⁻¹).

No entanto, quando se trata da produção de *B. euphorbiae* utilizando substratos alternativos poucos trabalhos foram encontrados. Meios como milho de pipoca, sorgo, girassol, arroz e a mistura arroz e sorgo, arroz e milho de pipoca e sorgo mais milho de pipoca foram utilizados por MARCHIORI et al. (2001) para avaliar a esporulação e a viabilidade de *B. euphorbiae*. PENARIOL et al. (2008) avaliaram diferentes meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais para a produção do fungo. Os autores verificaram que o sorgo em grão e a casca de soja foram os substratos sólidos que proporcionaram melhores resultados quanto à esporulação, enquanto que, o farelo de trigo foi o substrato mais favorável para o preparo de meio líquido.

Os processos de produção de fungos são relatados em função da estrutura do patógeno a ser produzida e utilizada no campo, podendo ser utilizados meios sólidos, líquidos e o sistema bifásico (ALVES & PEREIRA, 1998; LEITE et al. 2003). A produção de fungos em meios sólidos é a forma mais comum em uso, por não necessitar de tecnologia sofisticada, além de permitir a produção direta de unidades infectivas. O fungo é produzido na superfície do meio, dentro de diferentes recipientes conforme o objetivo e escala de produção. Devido a sua simplicidade, esse método é usado em vários países para a produção artesanal e semi-industrial de *Beauveria* spp. e *Metarhizium* spp., além de outros hifomicetos (ALVES & PEREIRA, 1998; LEITE et al., 2003).

A produção em meios líquidos caracteriza-se pela obtenção de grandes quantidades de biomassa em um pequeno espaço físico e em pouco tempo. As principais dificuldades do processo estão na obtenção de meios de cultura adequados; na determinação de condições favoráveis para o desenvolvimento e esporulação e na prevenção de contaminações. Segundo JACKSON et al. (1996) e JACKSON (1997) a produção têm sido cada vez mais utilizada para a produção de fungos em grande escala, pois permitem um melhor controle das condições físicas e nutricionais exigidas pelo organismo.

Na produção bifásica, obtém-se na fase inicial da produção em meio líquido uma massa micelial onde o fungo recebe todos os nutrientes necessários para o crescimento e esporulação, numa segunda fase do processo essa massa é transferida para substratos sólidos, para a obtenção dos conídios (ALVES & PEREIRA, 1998). Este método combina o benefício da alta produção de biomassa obtida no cultivo em meios líquidos, com a produção de conídios estáveis em meios sólidos (JENKINS & GOETTEL, 1997). Esse sistema de produção tem sido utilizado pela companhia Mycotech dos EUA para a produção de *B. bassiana* (LEITE et al., 2003).

4. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A. R. M.; CRUZ, B. P. B.; OLIVEIRA, D. A.; SILVEIRA, A. P.; BULISANI, E. A. Novos testes de cultivo de fungos em controle biológico usando meios de cultura naturais líquidos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 55, n.1-4, p. 31-35, 1988.

ALVES, S. B.; LEUCONA, R. E. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: ESALQ-USP, 1998, cap.5, p.97-163.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Esalq, 1998, p. 845-869.

AMARAL, A. L. **Estudos genéticos e Morfológicos de Biótipos Resistentes e susceptíveis de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BARBOSA, A.M.; SOUZA, C. G. M; DEKKER, R. F. H.; FONSECA, R. C.; FERREIRA, D. T. Phytotoxin produced by *Bipolaris euphorbiae* in vitro-is effective against the weed

Euphorbia heterophylla. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.45, n.2, p. 233-240, 2002.

BARRETO, R. W.; EVANS, H. C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 141, n.1, p. 21-36, 1998.

BECKE, B.J. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) germination and emergence. **Weed Science**, Champaign, v. 43, n. 1, p. 103-106, 1995.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D.W. Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. **Journal of Invertebrate Pathology**, Duluth, v.78, p. 98-108, 2001a.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MESSIAS, C. L.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Both solar UV-A and UV-B radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v.74, p. 734-739, 2001b.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; RANGEL, D. E. N.; MILLER, C. D.; FREIMOSER, F.; St. LEGGER, R.J.; ANDERSON, A.J.; ROBERTS, D.W. Damage to fungi from solar-UV exposure, and genetic and molecular-biology approaches to mitigation. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INSECT PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 2002, Londrina, PR. **Proceedings**: p. 241-245.

BRIDGES, D. C.; BECKE, B. J.; BARBOUR, J. C. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L.) interference with peanut (*Arachis hipogaeae*). **Weed Science**, Champaign, v. 40, n. 1, p. 37-42, 1992.

CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, Konosu Saitama, v.2, n. 3-4, 2001.

CHARUDATTAN, R. Integrated control of waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*) with a pathogen, insects and herbicides. **Weed Science**, Champaign, v. 34, Suppl.1, p. 26-30, 1986.

CHARUDATTAN, R. Release of fungi: large-scale use of fungi as biological weed control agents. In: MAROIS, J.; BROWNING, A. (Ed). **Risk assessment in agricultural biotechnology**. California: University of California, 1990. p. 70-80

CHARUDATTAN, R. The use natural and genetically altered strain of pathogens for weed control. In: HOY, M. A.; HERZOG, D. C. **Biological control in agricultural IPM systems**. Nova York: Academic Press, 1995. p. 347-372.

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...** p. 417-424.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1981. 1262 p.

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.

DE NARDO, E. A. B.; CAPALBO, D. M. F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentação. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J. L. (Ed). **Controle biológico**, Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. v.1, p. 231-260.

FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A.; VIDAL, C.; LACEY, L.A.; LOMER, C. J.; ROUGIER, M. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. **Mycopathologia**, Den Haag, v.135, p. 171-181, 1996.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, p. 237-243, 2007.

FRANCISCO, E. A.; RANGEL, D. E. N.; Jr, N.L.S, BARBOSA, J. C.; CORREIA, A. C.B. Exposure of *Metarhizium anisopliae* conidia to UV-B radiation reduces its virulence. **Journal of Anhui Agricultural University**, Hefei, v.35, n. 2, p. 246-249, 2008.

GAZZIERO, D. L. P.; YORINORI, J. T. Avaliação da compatibilidade da mistura de *Helminthosporium* sp com herbicidas pós-emergentes no controle de amendoim bravo (*Euphorbiae heterophylla*). In: EMBRAPA. **Resultados de pesquisa de soja 1986/1987**. Londrina, 1988 . p. 336-338. Relatório Anual.

GAZZIERO, D. L. P.; CALÇAVARA, P. R.; YORINORI, J. T.; ARRABAL, C. A. Adequação da dose do fungo *Helminthosporium* sp. no controle biológico de amendoim-bravo (*Euphorbiae heterophylla*). In: EMBRAPA. **Resultados de pesquisa de soja**. Londrina, 1989a, p.275-278. Relatório Anual.

GAZZIERO, D.L. P.; CALÇAVARA, P. R.; YORINORI, J. T.; ARRABAL, C. A. Efeitos da luminosidade na germinação de esporos de *Helminthosporium* sp. In: EMBRAPA. **Resultados de pesquisa de soja. 1989**. Londrina, 1989b. p. 283-284. Relatório Anual.

GAZZIERO, D. L. P.; YORINORI, J. T. **Experiência sobre o controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 11p.

GELMINI, G. A.; RICARDO, V. F.; NOVO, M. C. S. S.; ADORYAN, M. L. Resistência de biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. aos herbicidas inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. **Bragantia**, Campinas, v. 60, p. 93-99, 2001.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Culture, age, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2435-2442, 1996.

HARGER, T. R.; NESTER, P. R. Wild poinsettia: a major soybean weed. **Losiana Agriculture**, Lyon, v. 23, p. 4-7, 1980.

HUNT, T. R.; MOORE, D.; HIGGINS, P. M.; PRIOR, C. Effect of sunscreens irradiance and resting periods on the germination of *Metarhizium flavoviridie*. **Entomophaga**, Paris, v.39, n.4, p.312-322, 1994.

INGLIS, G. D.; JOHNSON, D. L.; GOETELL, M. S.; Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Symptomulosporea) of grasshoppers under field conditions . **Biological Control**, Orlando, v.26, p.400-409, 1997.

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, p. 645-650, 1996.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the culture liquid production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, p. 180-187, 1997.

JENKINS, N. E.; GOETTEL, M. S. Methods for mass-production of microbial control agents for grasshoppers and locusts. In: GOETTEL, M. S.; JOHNSON, L. (Eds.) **Microbial control of grasshoppers and locusts**, Ottawa (Memoris of the Entomological Society of Canada), 1997, p. 37-48.

JOWERS, H. E.; BREMAN, J. W.; FLETCHER, J. W. Effects of several herbicide treatments on wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla* L) control in soybean. **Proceedings Soil and Crop Science Society of Florida**, Gainesville, v. 45, p. 115-117, 1986.

KHALIL, S. K, SHAN, M. A.; NAEEM, M. Laboratory studies on the compatibility of the entomopathogenic fungus fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 13, p. 329-334, 1985.

KISSMANN, K. G.; GROTH, P. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira, 1992. p.798.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e Nocivas**. São Paulo: BASF brasileira S. A., 1999, v. 2, 798p.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. de; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, 2003. 92p.

LORENZI, H. J. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odesa: São Paulo, 2000, 608p.

LOUREIRO, E. S.; FILHO, A. B.; ALMEIDA, J. E. M.; LEITE, L.G.; LAMAS, C. Efeito da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento do fungo *Sporothrix insectorum* (HOOG & EVANS). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 79-83, 2002.

MARCHIORI, R.; NACHTIGAL, G. F.; COELHO, L.; YORIONORI, J. T.; PITELLI, R. A. Comparison of culture media for the mass production of *Bipolaris euphorbiae* and its impact on *Euphorbia heterophylla* dry matter accumulation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n.4, p. 428-432, 2001.

MELHORANÇA, A. L.; PEREIRA, F. A. R. Eficiência do herbicida lactofen no controle de *Euphorbia heterophylla* resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS). **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v. 1, p. 53-56, 2000.

MUCHOVEJ, J. J.; CARVALHO, A. O. A new combination for *Helminthosporium euphorbiae*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 35, n.1, p. 159-162. 1989.

NAHAS, E.; ARAI, N. S. 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.

NECHET, K. L.; BARRETO, R. W.; MIZUBUTI, E. S. G. *Bipolaris euphorbiae* as a biological control agent for wild poinsettia (*Euphorbiae hetrophylla*): host-specificity and variability in pathogen and host populations. **BioControl**, Dordrecht, v. 51, n.2, p. 259-275, 2006.

NEMOTO, M. C. M.; NAHAS, E.; PITELLI, R. A.; COELHO, L. Germination and mycelial growth of *Bipolaris euphorbiae* MUCHOVEJ & CARVALHO as influenced by herbicides and surfactants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo. v.1, n.33, p.352-357, 2002.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.64, n. 3, p. 548-572, 2000.

OLIVEIRA, A. S.; SÁ, H. B. Taxonomic studies of the Euphorbiaceae JUSS family-I: *Euphorbia heterophylla* L. and *Euphorbia cyathophora* MURR. **Sellowia**, Itajaí, v. 150, n. 40, p. 5-31, 1998

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, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

PADIN, S.; DAL BELLO, G.M.; VASICEK, A. L. Potencial bioinseticida de hongos entomopatogenos de plagas em granos armazenados. **Revist de la Facultad de Agronomia**, Buenos Aires, v. 15, n. 1, 1995.

PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A. Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* cultivado sob diferentes condições nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1907-1913, 2008.

PRATES, L. G.; FERNANDES, J. M. C. Efeito da temperatura no crescimento micelial de *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n.4, p.661-663, 2000.

SILVA, A.; YORINORI, T.; PACCOLA, M. L. D. Utilização do fungo fitopatogênico *Helminthosporium euphorbiae* no controle de *Euphorbia heterophylla*. **Semina**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 105-111, 1996.

SMITS, N.; FARGUES, J.; ROUGIER, M.; GOUJET, R.; ITIER, B. Effects of temperature and solar radiation interactions on the survival of quiescent conidia of the entomopathogenic hyphomycete *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 135, p.163-170, 1996.

TANZINI, M. R.; ALVES, S. B.; SETTEN, A. Toxicidade de produtos fitossanitários no controle de *Leptopharsa heveae* para fungos entomoptogênicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n.4, p. 65-69, 2002.

TOFFANELLI, C. M. **Interferência de herbicidas e surfatantes na ação do fungo *Bipolaris euphorbiae* Muchovej & Carvalho para o controle de *Euphorbia heterophylla* L. (amendoim-bravo)**. 1997. 60f. Monografia (Graduação em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 1997.

VIDAL, R. A.; WINKLER, L. M. Resistência de plantas daninhas: seleção ou indução à mutação pelos herbicidas inibidores de acetolactato (ALS): pesticidas. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 12, p. 31-42, 2002.

VILAS BOAS, A. M.; ANDRADE, R. M.; OLIVEIRA, J. V. Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 39, n.1, p. 123-128, 1996.

ZHAO, S.; SHAMOUN, S. F. Effects of culture media, temperature, pH, and light on growth, sporulation, germination, and bioherbicidal efficacy of *Phoma exigua*, a potential biological control agent for salal (*Gaultheria shallon*). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 1043-1055, 2006.

WALKER, H.L. Evaluation of *Alternaria cassiae* for the biocontrol of sicklepod (*Cássia obtusifolia*). **Weed Science**, Champaign, v. 72, p. 651-654, 1982.

WALKER, H. L.; BOYETTE, C. D. Influence of sequential dew periods on biocontrol of sicklepod (*Cássia obtusifolia*) by *Alternaria cassiae*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70, p. 962-963, 1986.

WENZEL, I. M.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Produção de conídios de *Lecanillium lecanii* em substratos sólidos e líquidos obtidos de grãos. **Científica**, Jaboticabal, v. 34, n.1, p. 7-17, 2006.

WINKLER, L. M.; VIDAL, R. A. *Euphorbia heterophylla* L. resistente aos herbicidas inibidores de acetolactato sintase: Distribuição e genética de biótipos do Estado do Paraná. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 1, p. 24-29, 2004.

YORINORI, J. T. Biological control of milk weed (*Euphorbia heterophylla*) with pathogenic fungi. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 6, 1985, Ottawa. **Proceedings...** p.677-681.

YORINORI , J. T.; ASSIS, R. de.; GAZZIERO, D. L. P. Avaliação da eficiência de *Helminthosporium* sp. e *Alternaria* sp., isoladamente e em mistura no controle de *Euphorbia heterophylla*. In: EMBRAPA. **Resultados de pesquisa de soja**. 1985. Londrina, 1985 p.318-319. Relatório Anual.

CAPITULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE *Bipolaris euphorbiae* SOB O EFEITO DE FATORES AMBIENTAIS E TOLERÂNCIA A RADIAÇÃO SOLAR E ULTRAVIOLETA

RESUMO – A determinação das condições ideais de cultivo e o conhecimento da tolerância à radiação solar são aspectos importantes a serem investigados para a utilização de *Bipolaris euphorbiae* Muchovej & Carvalho como agente de controle biológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, e 10) inicial do meio de cultivo, da temperatura (13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 e 34°C) e do fotoperíodo (0, 12, 24hs) para o crescimento, esporulação e viabilidade de *B. euphorbiae*. Analisou-se, também, a tolerância dos conídios à luz emitida por simulador solar e radiação ultravioleta. Foi avaliado o crescimento radial das colônias, a produção de conídios por unidade de área de colônia e a germinação de conídios em lâmina de microscopia. A esporulação e a viabilidade de *B. euphorbiae* não foram influenciadas pelo pH do meio de cultivo, mas o pH 4,0 reduziu o crescimento. As temperaturas de 22, 25 e 28°C proporcionaram maior crescimento micelial enquanto, a esporulação e viabilidade foram favorecidas pelas temperaturas de 22 e 16°C. O regime de iluminação teve efeito apenas na esporulação que foi favorecida pela exposição do fungo a luz pelo período de 12 horas. Conídios expostos a radiação solar e ultravioleta por oito horas e 90 minutos, respectivamente, apresentaram viabilidade maior que 92%, mostrando que o fungo tem grande tolerância a radiação.

Palavras-chave: controle biológico, fungo patogênico de planta daninha, iluminação, pH, temperatura.

CHAPTER 2 - PERFORMANCE OF *Bipolaris euphorbiae* UNDER THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS AND TOLERANCE TO SOLAR AND ULTRAVIOLET RADIATION

SUMMARY – The determination of the adequate cultivate conditions and knowledge of the tolerance to solar radiation are important aspects that must be investigated for the use of *Bipolaris euphorbiae* Muchovej & Carvalho as an biological control agent. The objective of this work was to evaluate the effects of different cultivation medium initial pH values (4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10), temperature (13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 and 34°C) and photoperiod (0, 12, 24 hours) in the growth, sporulation and viability of *Bipolaris euphorbia*. The tolerance of conidia to light emitted by solar simulator and ultraviolet radiation was also analyzed. The radial growth of the colonies, conidia production per colony area unit and germination of conidia in microscopic slide were evaluated. Although, sporulation and viability of *B. euphorbiae* were not influenced by the media pH value, growth decreased in media with pH 4. The temperatures of 22, 25 and 28°C promoted a superior growth, while sporulation and viability were privileged by the temperatures of 22 and 16°C. The type of illumination only affected sporulation that was favored by the exposure of the fungus to light for a period of 12 hours. Conidia exposed to solar and ultraviolet radiation, for eight hours and 90 minutes, respectively, presented more than 92% viability, demonstrating that the fungus has big tolerance to radiation.

Keywords: biological control, weed pathogenic fungi, illumination, pH, temperature

1. INTRODUÇÃO

Euphorbia heterophylla L., popularmente denominada de amendoim bravo ou leiteiro, é pertence à família Euphorbiaceae, sendo considerada a principal planta daninha que infesta a cultura da soja na região sul do Brasil, onde foi selecionada pelo uso intensivo de herbicidas (PITELLI, 1991). É uma planta daninha muito inoportuna nas regiões em que ocorre, devido à sua extraordinária capacidade de multiplicação, rápido crescimento populacional e por competir vigorosamente com a soja em seu estágio inicial de desenvolvimento.

O amendoim-bravo vem sendo controlado de modo insatisfatório por diversos métodos, incluindo herbicidas. O controle químico é efetuado com o uso de herbicidas inibidores da enzima acetolase sintetase (ALS), mas observa-se a ocorrência de biótipos resistentes a esses herbicidas (CHRISTOFFOLETTI et al., 1994). *E. heterophylla* preenche os requisitos citados por CHARUDATTAN (1993) como uma planta-alvo adequada aos programas de controle biológico por meio da técnica de aplicação de bioherbicidas em estratégia inundativa.

Segundo GAZZIERO & YORINORI (1993), vários patógenos infectam naturalmente *E. heterophylla* no campo, como o vírus do mosaico e os fungos *Uromyces euphorbia* (Schwein.) Cooke & Peck, (1873), *Alternaria* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e *B. euphorbiae*.

Dentre esses inimigos naturais, o fungo *B. euphorbiae* é o agente causal mais freqüente em *E. heterophylla* no Brasil (BARRETO & EVANS, 1998) e tem sido relatado como eficiente e promissor agente de controle biológico desta planta daninha. É um patógeno específico para *E. heterophylla*, com grande agressividade, fácil multiplicação em laboratório e boa capacidade de esporulação, sendo considerado, portanto, um candidato ideal para o desenvolvimento de bioherbicida a ser introduzido em programas de manejo do amendoim-bravo. Entretanto, há poucos estudos quanto à sua fisiologia, como por exemplo, o conhecimento de suas exigências físicas e nutricionais, que permitam saber as condições favoráveis para o crescimento, esporulação e viabilidade, de modo a desenvolver meios de cultivo de simples composição e baixo custo que

propiciem a sua produção em larga escala, visando a aplicação em estratégia inundativa.

Com relação ao estudo das exigências nutricionais de *B. euphorbiae*, PENARIOL et al. (2008) observaram maior crescimento e esporulação do fungo usando amido e nitrato de sódio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, e fosfato de potássio monobásico e fosfato de cálcio como fonte de fósforo. A suplementação do meio de cultivo com peptona e extrato de levedura incrementou o crescimento e a esporulação, enquanto a adição de vitaminas favoreceu apenas a produção de conídios.

No que se refere às exigências físicas, pelo trabalho de NECHET et al. (2006) foi possível verificar que *B. euphorbiae* cresceu e esporulou em ampla faixa de temperatura, enquanto *Bipolaris sorokiniana* Sacc. in Sorok apresentou melhor crescimento na faixa de 26 a 28°C. BARBOSA et al. (2002) observaram que a fitotoxina produzida pela linhagem I de *B. euphorbiae* apresentou maior atividade no pH 6,0, sendo que na faixa de pH entre 3 e 9 a atividade da toxina não foi alterada. Segundo GAZZIERO et al. (1989), os tubos germinativos dos conídios de *B. euphorbiae* desenvolvidos na ausência de iluminação foram quatro a cinco vezes maiores do que aqueles formados sob iluminação contínua.

Tendo em vista a importância de se conhecer a influência de fatores físicos no cultivo de microrganismos, de modo a viabilizar a produção em larga escala, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes valores de pH, de temperaturas e regimes de iluminação no crescimento, na esporulação e na viabilidade de *B. euphorbiae*, além de analisar a tolerância dos conídios à luz solar e à radiação ultravioleta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungo

Foi utilizado o isolado FCAV#569 de *Bipolaris euphorbiae*, estocado em tubos de ensaio contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA), mantidos em refrigerador a 4°C, no laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, SP.

Para a instalação dos ensaios, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o meio Mínimo de Pontecorvo, cuja formulação descrita por AZEVEDO & COSTA (1973) foi modificada por PENARIOL et al. (2008), ficando com a seguinte composição: 6,0g de NaNO₃; 1,52g de KH₂PO₄; 0,52g de MgSO₄.7H₂O; 0,52g de KCl; 0,01g de FeSO₄; 0,01g de ZnSO₄; 10g de amido; 2,0g de peptona, 15g de ágar e 1000mL de água destilada. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave (121°C e 1kgf cm⁻² de pressão) por 15 minutos e, em seguida, foi vertido em placas de Petri. Após a solidificação do meio, fez-se a repicagem do patógeno e as culturas foram incubadas a 27 ± 0,5°C, no escuro, por oito dias. Culturas assim rejuvenescidas serviram de inóculo para a realização dos ensaios.

Três ensaios foram realizados para avaliar o crescimento, a esporulação e a viabilidade do fungo em relação aos fatores ambientais de cultivo.

2.2. Efeito do pH do meio de cultura

Neste ensaio o fungo foi cultivado em meio com diferentes valores iniciais de pH. Foram preparados e autoclavados os meios líquido e semi-sólido a base de meio mínimo de Pontecorvo modificado. O meio líquido foi utilizado como testemunha, para estabelecer, com o auxílio de um potenciômetro, as quantidades de HCl ou NaOH, necessárias para se obter os pHs 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. No meio de cultura semi-sólido autoclavado, adicionou-se, com o auxílio de uma pipeta esterilizada, quantidades suficientes de uma solução 1 ou 3,0 N de NaOH ou HCl (ambos esterilizados em vapor fluente), para estabelecer estes valores de pH.

O cultivo do fungo foi realizado em placas de Petri de 90mm de diâmetro, contendo 20mL de meio mínimo com os valores determinados de pH. As placas foram mantidas em estufa a 27 ± 0,5°C por 24 horas, para a secagem da superfície do meio

de cultura, evitando que a umidade excessiva pudesse espalhar propágulos do fungo, assim que o mesmo fosse repicado. Posteriormente, discos de 5mm de diâmetro, contendo micélio e esporos de colônias jovens do fungo, foram transferidos com o auxílio de uma alça de níquel-cromo estéril para o centro de cada placa. Após a repicagem, as culturas foram mantidas em estufa a $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por oito dias, na ausência de luz.

2.3. Efeito da temperatura

Foi avaliado a influência das temperaturas de 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31 e 34°C no desenvolvimento do fungo. Colônias de *B. euphorbiae* foram repicadas para placas de Petri de 90mm de diâmetro, contendo 20mL de meio mínimo modificado, ajustado com o pH 6, que proporcionou o melhor desempenho do fungo no ensaio anterior. Em seguida, as culturas em grupo de cinco, foram incubadas em estufa previamente aferida com as temperaturas ensaiadas, por oito dias, no escuro.

2.4. Efeito da iluminação

No terceiro ensaio, avaliou-se a influência da ausência de iluminação e dos regimes de iluminação contínua (fotoperíodo de 24h) e alternada (fotoperíodo de 12 h). Para a realização deste ensaio, as placas foram preparadas e o fungo repicado como descrito no segundo ensaio. No regime de iluminação contínua as culturas fúngicas foram submetidas à iluminação diária por 24 horas, por três lâmpadas fluorescentes (luz do dia) de 20W existentes em uma estufa com temperatura ajustada para 25°C , temperatura esta que proporcionou o melhor desempenho do fungo no ensaio anterior. Na ausência de iluminação, as placas de análise foram mantidas nas mesmas condições, mas envolvidas por papel alumínio e cobertas por pano preto durante todo o ensaio. No regime de iluminação alternada, as placas de análise foram envolvidas durante 12 horas em papel alumínio e cobertas por pano preto e, nas 12 horas

subseqüentes, foram mantidas sob a condição de iluminação contínua. As culturas foram incubadas por oito dias.

2.5. Exposição a radiação solar e ultravioleta

Analisou-se, ainda, a tolerância dos conídios do fungo a radiação incidente de um simulador solar e de uma lâmpada ultravioleta, em dois experimentos separados. No primeiro caso utilizou-se um simulador solar Oriel[®], modelo 68.820, Strafford, CT, USA, cuja potência total irradiada era de aproximadamente 1.000 W.m^{-2} , na faixa espectral de 250 – 1150 nm. A partir de medições diretas, utilizando-se um radiômetro modelo 70.260, Strafford, CT, U.S.A, foi determinada uma intensidade de $11,20 \text{ W m}^{-2}$ no local de exposição das amostras, na faixa espectral de 250-370 nm. Colônias jovens do fungo cultivadas a 25°C por oito dias em meio mínimo modificado, com pH 6, foram usadas na obtenção de suspensões ajustadas para 1×10^5 conídios mL^{-1} . Com o auxílio de pipeta esterilizada colocou-se 5mL dessas suspensões em placas de Petri de 60mm de diâmetro. Essas placas, em grupo de três (repetições), foram submetidas à luz do simulador por períodos de 1, 2, 3, 4, 6 e 8 horas, enquanto outras não foram submetidas à irradiação (placas controle). Durante a irradiação, as placas de análise ficaram dispostas dentro de outra placa de Petri de 150 mm de diâmetro, que continha gelo, para evitar aquecimento pela radiação infravermelha. A distância entre a suspensão irradiada e a luz proveniente do simulador solar foi de 17 cm. A irradiação foi realizada em temperatura ambiente (26 a 28°C).

O ensaio utilizando-se a lâmpada ultravioleta (U.V.) foi realizado em câmara asséptica. Placas de Petri de 60 mm de diâmetro contendo 5 mL das suspensões de conídios obtidas como no ensaio anterior foram submetidas à uma lâmpada germicida Toshiba de 30W. Essas placas, em grupo de três (repetições), foram submetidas à exposição por 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 240 e 360 minutos, enquanto, outras placas não foram submetidas à irradiação (placas controle). A distância entre a suspensão irradiada e a lâmpada foi de 17 cm. A potência total das ondas, irradiadas na faixa espectral de 250-370 nm, foi avaliada utilizando-se o mesmo radiômetro, modelo

70.260, Strafford, CT, USA, que registrou, neste caso, uma intensidade de $3,7 \text{ W m}^{-2}$ no local de exposição das amostras. O experimento foi conduzido em temperatura ambiente ($28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$).

2.6. Avaliação

Em todos os ensaios, com exceção do ensaio de radiação solar e ultravioleta, foi avaliado o crescimento radial das colônias de *B. euphorbiae*, medindo-se a cada dois dias, durante oito dias, com o auxílio de uma régua milimétrica, dois eixos ortogonais previamente marcados na face externa de cada placa de Petri. Após o 8º dia toda a superfície de cada colônia foi cuidadosamente raspada com espátula e o conteúdo transferido individualmente para tubo de ensaio contendo 10mL 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 esporos contidos na suspensão obtida foram quantificados em câmara de Neubauer. Para a realização da contagem não foi realizada diluição da suspensão. Calculou-se a produção de conídios por milímetro quadrado de cada colônia.

A avaliação da viabilidade foi realizada em todos os ensaios utilizando-se suspensões com concentração de 1×10^5 conídios mL^{-1} , obtidas de colônias jovens do fungo. O teste de viabilidade foi realizado em lâminas de microscopia, cuja assepsia foi feita com álcool 70%. Após demarcação de três campos na face inferior, as lâminas foram acondicionadas em placas de Petri com alta umidade relativa, proporcionada por dois chumaços de algodão umedecidos com água destilada. Para não tocar o fundo da placa, sob cada lâmina colocaram-se dois palitos paralelamente dispostos na posição horizontal.

Para analisar o efeito do pH na viabilidade de conídios de *B. euphorbiae*, a superfície de cada lâmina foi recoberta com 5mL de meio mínimo modificado com os respectivos valores de pH, e em seguida, colocou-se em cada campo uma gota (aproximadamente 0,05 mL) da suspensão de conídios. As placas foram acondicionadas em estufa a $27 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ no escuro. Após 7 horas (tempo determinado

em pré-ensaio) o processo de germinação foi interrompido, pingando-se uma gota de corante azul de algodão em cada campo. Foram preparadas quatro lâminas, para cada valor de pH e, contou-se 150 conídios por campo, entre germinados e não germinados, obtendo-se a porcentagem dos que germinaram. Foram considerados germinados os conídios cujo tubo germinativo era igual ou maior que seu comprimento.

Para analisar o efeito da temperatura e do regime de iluminação na viabilidade de conídios do fungo, a superfície de cada lâmina foi recoberta com 5mL de meio mínimo modificado, com pH de 6,0. Após a adição da suspensão de conídios, as preparações foram submetidas às condições de temperatura ou iluminação como descrito para os ensaios anteriores. A avaliação da viabilidade seguiu o mesmo procedimento para o ensaio do pH. O teste não foi realizado para o regime de iluminação com fotoperíodo de 12 horas, pois a germinação dos conídios foi avaliada após sete horas de incubação.

Para analisar o efeito da radiação solar e ultravioleta na viabilidade dos conídios, após a exposição procedeu-se avaliação como já descrito, usando meio mínimo modificado com pH 6.

2.7. Análise estatística

Os dados de crescimento foram analisados segundo o delineamento em parcelas subdividida no tempo com 5 repetições, sendo cada placa considerada como uma parcela experimental. Os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Nos experimentos de pH e temperatura foi também feita uma análise de regressão polinomial. Os dados referentes à esporulação e viabilidade foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado, com 5 e 4 repetições, respectivamente. Os dados de esporulação foram transformados em $\log(x+5)$ e os de viabilidade em arc seno. Ambos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a execução das análises foi utilizado o programa ESTAT (Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil) Versão 2.0.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do pH do meio de cultura

O pH do meio de cultivo teve pouca influência no crescimento do fungo (Tabela 1), pois apenas no pH 4,0 verificou-se redução significativa do crescimento após oito dias de cultivo. O maior crescimento micelial do fungo ocorreu na faixa de pH situada entre 7 e 8 (Figura 1 do Apêndice), mas mesmo no valor de pH 9,0, considerado crítico ao desenvolvimento de fungos (MONTEIRO et al., 2004), *B. euphorbiae* apresentou grande crescimento.

Do mesmo modo, a esporulação e a viabilidade não foram afetadas pelo pH do meio, embora o pH 6 possa ser destacado por proporcionar o maior valor de esporulação ($3,8 \times 10^1$ conídios mm^{-2}) e viabilidade dos conídios (99,7%) (Tabela 2).

Tabela 1. Crescimento (mm) de *Bipolaris euphorbiae* durante 8 dias de cultivo a 27°C e ausência de iluminação, em meio de cultura com diferentes valores iniciais de pH.

Valor de pH	Tempo de cultivo (dias)				Teste F
	2	4	6	8	
4	19,00 Db	34,00 Cc	46,80 Bd	59,20 Ab	294,48**
5	26,40 Da	61,40 Ca	84,60 Bab	91,40 Aa	852,23**
6	25,00 Da	66,20 Ca	87,00 Ba	91,60 Aa	914,50**
7	25,20 Ca	65,20 Ba	89,00 Aa	92,40 Aa	949,86**
8	24,80 Da	52,60 Cb	80,00 Bbc	89,60 Aa	844,73**
9	23,80 Dab	55,20 Cb	84,00 Bab	91,00 Aa	931,84**
10	21,80 Dab	53,40 Cb	78,60 Bc	91,00 Aa	926,07**
Teste F	4,48**	84,33**	147,54**	103,31**	

Erro padrão da média = $\pm 1,0$. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

**Significativo a 1% de probabilidade.

Tabela 2. Esporulação e viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* cultivado a 27°C em meio com diferentes valores iniciais de pH.

Valor de pH	Produção de conídios (n° x 10 ¹ mm ⁻²) ^a	Viabilidade (%) ^b
4	1,7 A	99,2 A
5	3,5 A	99,5 A
6	3,8 A	99,7 A
7	2,5 A	99,4 A
8	2,7 A	99,5 A
9	2,2 A	99,6 A
10	2,3 A	99,4 A
Teste F	1,28 ^{NS}	0,78 ^{NS}
C.V. (%)	18,06	1,45
DMS (Tukey)	1,2	2,87
EPM	0,27	0,62

^{a,b}Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+5) e arc sen, para produção de conídios e viabilidade, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. N.S.= Não significativo. C.V = Coeficiente de variação. D.M.S. = Diferença mínima significativa. E.P.M= Erro padrão da média.

3.2. Efeito da temperatura

O maior crescimento de *B. euphorbiae* ocorreu na faixa de temperatura situada entre 22 e 28°C (Tabela 3), sendo que a temperatura média ótima calculada considerando-se os vários dias de avaliação foi de 24,3°C (Figura 2 do Apêndice).

Não houve diferença significativa do crescimento nas temperaturas de 19 e 31°C, e a 13 e 34°C o crescimento do fungo foi significativamente menor (p>0,01) já a partir do segundo dia de incubação (Tabela 3).

Tabela 3. Crescimento (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após 8 dias de cultivo em meio mínimo, sob diferentes valores de temperatura e em ausência de iluminação.

Temperatura (°C)	Tempo de cultivo (dias)				Teste F
	2	4	6	8	
13	9,00 Db	16,80 Ce	24,60 Be	32,20 Ad	97,39**
16	13,00 Dab	26,20 Cd	41,80 Bd	54,40 Ac	318,23**
19	15,00 Dab	35,80 Cc	57,80 Bc	75,40 Ab	672,59**
22	19,00 Da	41,80 Cc	65,20 Bb	89,00 Aa	885,68**
25	18,80 Da	51,80 Cb	83,60 Ba	92,20 Aa	1088,64**
28	18,60 Da	58,80 Ca	87,00 Ba	91,00 Aa	1087,94**
31	14,40 Dab	38,80 Cc	60,80 Bbc	78,80 Ab	756,24**
34	13,00 Cab	16,20 Ce	21,60 Be	26,20 Ad	33,23**
Teste F	5,78**	109,99**	277,10**	325,74**	

Erro padrão da média $\pm 1,0$. Meio mínimo de Pontecorvo et al. (1953), tendo amido como fonte de carbono. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.** Significativo a 1% de probabilidade.

A esporulação de *B. euphorbiae* obtida na temperatura de 22°C ($9,7 \times 10^1$ conídios mm^{-2}), foi significativamente maior do que a observada nas temperaturas de 13 e 19°C, mas não diferiu estatisticamente das ocorridas nas temperaturas de 16, 25, 28, 31 e 34°C, embora tenha sido três vezes maior que a encontrada a 34°C (Tabela 4). Vale destacar a produção de conídios obtida na temperatura de 16°C, cujo valor ($9,3 \times 10^1$ conídios mm^{-2}) é muito próximo ao verificado a 22°C. Não houve influência da temperatura na viabilidade de *B. euphorbiae*, com valores de germinação de conídios que variaram de 97 a 99%, exceto na temperatura de 13°C onde a germinação de conídios do fungo foi de 95% (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da temperatura na esporulação e viabilidade dos conídios de *Bipolaris euphorbiae*.

Temperatura (°C)	Produção de conídios (n° x 10 ¹ mm ⁻²) ^a	Viabilidade (%) ^b
13°C	1,8 C	95,0 B
16°C	9,3 AB	99,6 A
19°C	2,8 BC	99,6 A
22°C	9,7 A	99,8 A
25°C	7,1 AB	97,8 AB
28°C	7,1 AB	97,6 AB
31°C	5,6 AB	99,0 AB
34°C	3,2 ABC	98,8 AB
Teste F	5,01**	3,86**
C.V. (%)	13,98	3,78
DMS (Tukey)	1,13	7,41
EPM	0,25	1,6

^{a,b}Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+5) e arc sen, para produção de conídios e viabilidade, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade. C.V.= Coeficiente de variação. D.M.S.= Diferença mínima significativa. E.P.M.= Erro padrão da média.

3.3. Efeito da iluminação

A luz não afetou o crescimento de *B. euphorbiae*, pois a partir do 6° dia de incubação não houve diferença no crescimento do fungo em função dos diferentes regimes de iluminação (Tabela 5). O maior valor de esporulação ocorreu no fotoperíodo de 12h apesar de não ter diferido significativamente do encontrado no regime de ausência de iluminação (Tabela 6). Merece destaque o fato da iluminação contínua ter proporcionado a menor esporulação do fungo. A viabilidade dos conídios não foi afetada pelos regimes de iluminação.

Tabela 5. Crescimento (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após 8 dias de cultivo em meio mínimo a 25°C, sob diferentes regimes de iluminação.

Regime de iluminação	Tempo de cultivo (dias)				Teste F
	2	4	6	8	
Iluminação contínua	32,00 Db	59,00 Cb	81,60 Ba	89,80 Aa	805,66**
Ausência de iluminação	36,00 Da	67,60 Ca	85,00 Ba	90,80 Aa	727,72**
Fotoperíodo de 12 horas	37,80 Da	65,60 Ca	82,40 Ba	89,60 Aa	635,53**
Teste F	7,88**	18,11**	2,83NS	0,37NS	

Erro padrão da média $\pm 0,9$. Meio mínimo de Pontecorvo et al. (1953), tendo amido como fonte de carbono. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.** Significativo a 1% de probabilidade. NS Não significativo.

Tabela 6. Esporulação e viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* incubados sob diferentes regimes de iluminação, em temperatura de 25°C.

Regime de iluminação	Produção de conídios ($n^\circ \times 10^1 \text{ mm}^{-2}$) ^a	Viabilidade (%) ^b
Iluminação contínua	3,0 B	99,9 A
Ausência de iluminação	5,2 AB	99,7 A
Fotoperíodo de 12 h	10,0 A	-
Teste F	4,07*	2,55 ^{NS}
C.V (%)	15,98	1,56
DMS	1,07	2,37
EPM	0,28	0,7

^{a,b}Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+5) e arc sen, para produção de conídios e viabilidade, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo a 5% de probabilidade. N.S.= Não significativo. C.V. = Coeficiente de variação. D.M.S. = Diferença mínima significativa. E.P.M.= Erro padrão da média.

3.4. Exposição a radiação solar e ultravioleta

O tempo de exposição dos conídios à radiação emitida pelo simulador solar não afetou a viabilidade do fungo, que manteve valores de germinação maiores que 99%,

exceto após seis horas de exposição, cuja viabilidade diferiu significativamente do controle (Tabela 7). Contudo, mesmo para este tempo de exposição a viabilidade obtida (98,5%) é bastante grande e pode ser atribuída à variação natural existente na espécie.

Tabela 7. Viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* submetidos à radiação emitida por simulador solar em diferentes tempos de exposição e incubados a 25°C.

Tempo de exposição (h)	Viabilidade ^a (%)
0	99,6 A
1	99,2 AB
2	99,0 AB
3	99,5 A
4	99,0 AB
6	98,5 B
8	99,0 AB
Teste F	3,79*
C.V. (%)	1,15
DMS (Tukey)	2,71
EPM	0,56

^aValores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em arc sen. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. *Significativo a 5% de probabilidade. C.V. = Coeficiente de variação. D.M.S.= Diferença mínima significativa. E.P.M.= Erro padrão da média.

Observou-se uma redução acentuada na viabilidade dos conídios de *B. euphorbiae* expostos a radiação ultravioleta somente a partir de 120 minutos de exposição (viabilidade menor que 90%), sendo que uma redução de 79,3% só ocorreu após 360 minutos de exposição. A maior viabilidade dos conídios ocorreu após 2, 3, 5 e 10 minutos de exposição e não diferiu da observada no controle (sem exposição) (Tabela 8).

Tabela 8. Viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* submetidos à radiação emitida por lâmpada de luz ultravioleta germicida em diferentes tempos de exposição e incubados a 25 °C.

Tempo de exposição (min)	Viabilidade ^a (%)
0	99,6 A
1	96,7 BC
2	97,3 AB
3	97,4 AB
5	97,7 AB
10	97,6 AB
20	96,6 BC
40	96,8 BC
60	93,6 BC
90	92,2 C
120	84,0 D
240	29,4 E
360	20,3 E
Teste F	234,27**
C.V. (%)	3,02
DMS (Tukey)	6,38
EPM	1,2

^aValores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em arc sen. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade C.V.= Coeficiente de variação. D.M.S.= Diferença mínima significativa. E.P.M. = Erro padrão da média.

4. DISCUSSÃO

O crescimento e muitos processos da vida de um fungo podem ser afetados pela concentração de íons de hidrogênio do meio de cultivo (CARLILE & WATKINSON, 1994). Neste trabalho, verificou-se que o pH inicial do meio de cultivo não afetou o

crescimento, a esporulação e a viabilidade de *B. euphorbiae*, mostrando que o fungo tem ampla tolerância a variação do pH do meio de cultura, exceto no pH mais ácido. Os resultados indicaram que a faixa de pH ideal para o cultivo do fungo situa-se entre 6,0 e 7,0. Segundo BARBOSA et al. (2002) o pH 6 promoveu uma maior atividade da fitotoxina produzida pela linhagem I de *B. euphorbiae*.

Muitos fungos têm habilidade de crescer e esporular em uma ampla faixa de pH. O melhor crescimento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Paecilomyces farinosus* (= *Isaria farinosa*) (Holmsk) Fr. foi obtido na faixa de pH situada entre 5,0 e 8,0 (HALLSWORTH & MAGAN, 1996). O desempenho dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Verticillium lecanii* [= *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & Gams] não foi afetado pelo pH inicial do meio de cultivo, mas houve uma redução do crescimento no pH 4,0 (MONTEIRO et al., 2004), resultado igual ao obtido com *B. euphorbiae* neste trabalho. O crescimento e a germinação de conídios de *Phoma exigua* Sacc. (1879) não foram afetados pelo pH do meio de cultivo na faixa entre 5 e 10 (ZHAO & SHAMOUN, 2006). De acordo com YANG et al. (2008) o pH 7 favoreceu o crescimento e a esporulação do isolado MA4 de *M. anisopliae*, enquanto que para o isolado MAIm o mesmo ocorreu no pH 9.

De acordo com CARLILE & WATKINSON (1994) os fungos, assim como outros microorganismos, são capazes de sobreviver em uma ampla faixa de temperatura. Os resultados deste trabalho sugerem que a faixa térmica mais favorável para o desenvolvimento de *B. euphorbiae* situa-se entre 22 e 28°C. A análise não acusou diferença no desempenho do fungo quando cultivado nesta faixa de temperatura, mas o maior valor numérico de crescimento foi obtido a 25°C, sendo que para a esporulação e viabilidade isto ocorreu na temperatura de 22°C, mostrando que a temperatura ótima para a produção de esporos e para o crescimento podem ser muito próximas, mas não necessariamente as mesmas.

Segundo NECHET et al. (2006), o isolado KLN05 de *B. euphorbiae* cresceu em temperaturas variando entre 10 e 30°C, com valor ótimo em 25°C, resultado semelhante ao obtido neste trabalho e a melhor germinação de conídios ocorreu no intervalo entre 20 e 30°C. A taxa de crescimento de *B. sorokiniana* foi maior na faixa de

temperatura de 26 a 28°C, que justifica o fato do fungo apresentar maior importância como patógeno da cultura de trigo quando este é cultivado em regiões de clima subtropical (PRATES & FERNANDES, 2000). A melhor germinação dos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* situa-se na faixa de 20 a 35°C (ISKANDAROV et al., 2006) e a temperatura ótima para o crescimento de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samsom está entre 24 e 30°C, enquanto que para a germinação de conídios situa-se entre 28 e 30°C (KIEWNICK, 2006).

Para a maioria dos organismos a luz, assim como a temperatura, é um fator ambiental que regula o desenvolvimento e os processos fisiológicos (BABITHA et al., 2008). O crescimento das várias espécies de fungos parece ser diferentemente afetado pela luz. A ausência de iluminação favoreceu o crescimento de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces marquandii* (Masse) Hughes (MONTEIRO, 1988), e de *V. lecanii* (MONTEIRO et al., 2004), enquanto que o melhor crescimento de *Metarhizium flavoviride* (Gams and Rozsypal) (ONOFRE et al., 2001) ocorreu na presença de iluminação contínua. Estudando iguais regimes de luz para obter o melhor crescimento do fungo entomopatogênico *S. insectorum* (Hoog & Evans), LOUREIRO et al. (2002) verificaram que não houve efeito da luz sobre o crescimento vegetativo do fungo. Neste estudo o crescimento de *B. euphorbiae* também não foi influenciado pela iluminação.

De acordo com CARLILE & WATKINSON (1994) a esporulação de muitos fungos é favorecida pela alternância entre períodos de presença e ausência de luz. Tal afirmação foi corroborada pelo resultado deste estudo, pois a maior esporulação de *B. euphorbiae* ocorreu no fotoperíodo de 12 h, embora não tenha diferido da obtida na ausência de iluminação. Segundo LILLY & BARNETT (1951), a alternância de luminosidade favorece determinadas reações que ocorrem somente na presença ou ausência de luz.

A produção de conídios de *B. bassiana* foi cerca de 1,6 a 2,4 vezes maior no regime de luz alternada do que a obtida sob os outros regimes de iluminação (NAHAS & ARAI, 1987). MONTEIRO (1988) observou que a produção de esporos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi maior no regime de luz alternada, semelhante ao observado para *B.*

euphorbiae. A utilização alternada de 12 horas de luz e 12 horas de escuro mostrou-se a mais adequada para a produção de *S. insectorum* (LOUREIRO et al., 2002).

Para outros fungos o efeito da iluminação é bastante distinto. A esporulação de *P. exigua* foi significativamente maior na presença de iluminação contínua (ZHAO & SHAMOUN, 2006), resultado semelhante ao verificado para *M. flavoviride* (ONOFRE et al., 2001). No entanto *B. euphorbiae* apresentou a menor produção de conídios, sob o efeito de iluminação contínua.

Segundo GAZZIERO et al. (1989) os esporos de *B. euphorbiae* mantidos somente no escuro apresentaram maior germinação do que os esporos mantidos sob duas condições: a) iluminação por duas horas e escuro nas horas subseqüentes, b) ausência de iluminação por duas horas e exposição a luz nas horas subseqüentes. Os resultados obtidos por estes autores diferem do observado neste estudo, onde o regime de iluminação não afetou a viabilidade dos conídios de *B. euphorbiae*, mas esta diferença certamente está relacionada com a composição do meio de cultura, pois os autores utilizaram o meio ágar-ágar, enquanto que neste ensaio foi utilizado o meio mínimo modificado, e com a metodologia ou tempo de exposição à iluminação.

Segundo BRAGA et al. (2006) a radiação solar é um dos principais fatores ambientais que compromete a eficiência de fungos como agente de controle de insetos. A radiação ultravioleta tem um papel importante na redução da viabilidade e até mesmo na morte de muitos esporos. Ela é facilmente absorvida pelos ácidos nucléicos causando mutações gênica e letal (CARLILE & WATKINSON, 1994).

A viabilidade dos conídios de *B. bassiana*, *M. flavoviride* e *M. anisopliae* diminuiu acentuadamente com o aumento do tempo de exposição a radiação U.V. incidente de simulador solar (MORLEY et al., 1996). CAGAN & SVERCEL (2001) observaram uma redução significativa no crescimento de *B. bassiana* a partir de 30 minutos de exposição a radiação U.V. e a redução de 99,4% na viabilidade de conídios de *B. bassiana* mantidos em suspensão aquosa ocorreu após 60 min de exposição (INGLIS et al. 1995). A exposição direta a radiação solar por apenas 4 horas inativou totalmente os conídios das linhagens ARSEF 23 e ARSEF 25 de *M. anisopliae* (BRAGA et al., 2001). FERNANDES et al. (2007) observaram uma considerável redução na germinação de

conídios do isolado Bb 19 de *B. bassiana* após 2 horas de exposição à radiação UV-B. Os resultados obtidos neste trabalho diferem do verificado por estes autores, pois *B. euphorbiae* apresentou viabilidade maior que 92% mesmo após 8 horas de exposição a radiação solar e 90 minutos de exposição a radiação U.V. A tolerância apresentada por *B. euphorbiae* a radiação solar e ultravioleta pode estar relacionada com a coloração escura das paredes de seus esporos, pois, segundo WANG & CASADEVALL (1994) e BRAGA et al. (2002), a pigmentação pode influenciar na tolerância de leveduras e fungos filamentosos à radiação. BRAGA et al. (2006) estudaram a importância da pigmentação de conídios de *M. anisopliae* na tolerância a radiação solar e verificaram que os conídios com pigmentação verde escuro foram mais tolerantes.

Pigmentos tais como melaninas e carotenóides têm sido identificados e estudados em outras espécies de fungos (LANGFELDER et al., 2003). Melaninas, que são pigmentos pretos ou marrons escuro, estão amplamente dispersos nas células e têm um papel de proteção contra a radiação UV e outros fatores tais como os oxidantes, calor e agentes microbianos (CARLILE & WATKINSON, 1994).

Quando os conídios são aplicados sobre a planta, ficam expostos à radiação solar que pode causar severos danos, inclusive, a sua morte, e a sensibilidade à radiação limita a utilização do patógeno no campo (FRANCISCO et al., 2008). A tolerância de *B. euphorbiae* à radiação é uma característica que favorece muito a sua utilização como agente de controle biológico, pois permite uma maior persistência após ser aplicado no campo, contribuindo bastante para aumentar a eficiência do fungo no controle da planta daninha.

5. CONCLUSÕES

1. O desempenho de *B. euphorbiae* é pouco afetado pelo pH inicial do meio de cultivo.
2. A temperatura afeta o desenvolvimento do fungo, sendo o crescimento o parâmetro mais afetado.

3. O regime de iluminação afeta a esporulação *B. euphorbiae.*, que é favorecida pela alternância de luminosidade.

4. *B. euphorbiae* é tolerante a radiação solar e ultravioleta.

6. REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. **Exercícios práticos de genética.** São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1973. 288p.

BABITHA, S.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 2671-2675, 2008.

BARBOSA, A. M.; SOUZA, C. M. G.; DEKKER, R. F. H.; FONSECA, R. C.; FERREIRA, D. T. Phytotoxin produced by *Bipolaris euphorbiae* in vitro is effective against the weed *Euphorbia heterophylla*. **Brazilian Archives Biology Technology**, Curitiba, v. 45, p. 233-240, 2002.

BARRETO, R. W.; EVANS, H. C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.141, p. 21-36, 1998.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Both solar UV-A and UV-B radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Photochemistry Photobiology**, Amsterdam, v. 74, n.5, p. 734-739, 2001.

BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; RANGEL, D. E. N.; MILLER, C. D.; FREIMOSER F.; LEGER, R. J. St.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Damage to fungi from solar-UV exposure, and genetic and molecular-biology approaches to mitigation. In: **INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INSET PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL**. EMPRAPA-Soja, Londrina, PR, Brazil. **Proceedings**, p. 241-245, 2002.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial Pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Photochemistry Photobiology**, Amsterdam, v. 82, p. 418-422, 2006.

CAGAN, L.; SVERCEL, M. The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin to the european corn borer, *Ostrinia Nubilalis* HBN. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Central European Agriculture**, Konossu Saitama, v.2, n. 3-4, p. 228-232, 2001.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, 1994, p.428.

CHARUDATTAN, R. **Controle biológico de plantas daninhas através de fitopatógenos**. Jaboticabal: FUNEP, 1993, p.34.

CHRISTOFFOLETTI, P. J.; VITÓRIA FILHO, R.; SILVA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta daninha**, Rio de Janeiro, v.12, n.1, p.13-20, 1994.

FERNANDES, E. K. K.; RANGEL, D. E. N.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Variability in tolerance to UB-B radiation among *Beauveria* spp. Isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, p. 237-243, 2007.

FRANCISCO, E. A.; RANGEL, D. E. N.; JUNIOR, N. L. S.; BARBOSA, J. C.; CORREIA, A. C. B. Exposure of *Metarhizium anisopliae* conidia to UV-B radiation reduces its virulence. **Journal of Anhui Agricultural University**, v. 35, p. 246-249. 2008.

GAZZIERO, D. L. P.; CALÇAVARA, P. R.; YORINORI, J. T.; ARRABAL, C. A. Efeitos da luminosidade na germinação de esporos de *Helminthosporium* sp. In: EMBRAPA. **Resultados de pesquisa de soja. 1989**. Londrina, 1989. p.283-284. Relatório Anual.

GAZZIERO, D. L. P.; YORINORI, J. T. **Experiências sobre o controle biológico de *Euphorbia heterophylla* no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. p. 11.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Culture age, temperature and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2435-2442. 1996.

INGLIS, G. D.; GOETEL, M. S.; JOHNSON, D. L. Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Biological Control**, Orlando, v.5, p. 581-590. 1995.

ISKANDAROV, U. S.; GUZALOVA, A. G.; DAVRANOV, K. D. Effects of nutrient composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 42, n. 1, p. 72-76, 2006.

KIEWNICK, S. Effect of temperature on growth, germination, germ-tube extension and survival of *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 535-546, 2006.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 143-158, 2003.

LILLY, V. G.; BARNETT, H. L. **Physiology of the fungi**. New York: MacGraw-Hill Book, 1951, 464p.

LOUREIRO, E. S.; FILHO, A. B.; ALMEIDA, J. E. M.; LEITE, L. G.; LAMAS, C. Efeito da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento do fungo *Sporothrix insectorum* (Hoog & Evans). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 79-83, 2002.

MONTEIRO, A. C. **Aspectos fisioecológicos dos 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, 1988.

MONTEIRO, A. C.; BARBOSA, C. C.; CORREIA, A. 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.

MORLEY, D. J.; MOORE, D.; PRIOR, C. Screening of *Metarhizium* and *Beauveria* spp. conidia with exposure to simulated sunlight and a range of temperatures. **Mycological Research**, Cambridge, v.100, p. 31-38, 1996.

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, p. 7-82, 1987.

NECHET, K. L.; BARRETO, R. W, MIZUBUTI, E. S. G. *Bipolaris euphorbiae* as a biological control agent for wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): host-specificity and

variability in pathogen and host populations. **BioControl**, Dordrecht, v. 51, n. 2, p. 259-275, 2006.

ONOFRE, S. B.; MINIUK, C. M.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoridie* var. *Flavoride* on culture media and lighting regimes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n. 3, p. 613-616, 2001.

PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A. Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* cultivado sob diferentes condições nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n. 7, p. 1907-1913, 2008.

PITELLI, R. A. Weed: soybean interference studies in Brazil. In: COOPING, L. G.; GREEN, M. B.; REES, R. T. (Ed.). **Pest Management in Soybean**, London: Elsevier Science Publisher, 1991, p. 282-289.

PRATES, L. G.; FERNANDES, J. M. C. Efeito da temperatura no crescimento micelial de *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.4, p. 661-663, 2000.

ZHAO, S.; SHAMOUN, S. F. Effects of culture media, temperature, pH, and light on growth, sporulation, germination, and bioherbicidal efficacy of *Phoma exigua*, a potential biological control agent for salal (*Gautheria shallon*). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.16, n. 10, p. 1043-1055, 2006.

WANG, Y.; CASADEVALL, A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.60, p. 3864-3866, 1994.

YANG, L. Y.; GAN, L.; LIU, L.; WEN, M. F.; HUANG, J. S. Optimization of environmental factors for the growth of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* strains MA4 and MALm1. **Chinese Journal of Ecology**, Taíwan, v. 27, p. 1322-1326. 2008.

CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DE *Bipolaris euphorbiae* EM MEIOS LÍQUIDOS, SÓLIDOS E EM SISTEMA BIFÁSICO DE CULTIVO

RESUMO – *Bipolaris euphorbiae* é um potencial agente de controle biológico de *Euphorbia heterophylla* e para sua utilização em campo é necessário a produção de grandes quantidades de conídios. Este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de *B. euphorbiae* em meios de cultura líquido, preparados a partir de resíduos ou subprodutos da agroindústria, avaliar diferentes misturas de substratos sólidos, obtidos de grãos e derivados e finalmente a combinação de meios líquidos e sólidos para a produção de *B. euphorbiae* pelo sistema bifásico de cultivo. Como substratos líquidos, foram utilizados diferentes concentrações de vinhaça, melão e leite de levedura da indústria da cana-de-açúcar, soro de queijo, água da prensa da mandioca e milhocina®. Como substratos sólidos, misturaram-se, em diferentes proporções, sorgo em grão, casca de soja e quirela de trigo. Para todos os ensaios avaliou-se a produção e viabilidade de conídios, além da biomassa micelial nos meios líquidos. Na produção bifásica foram utilizados como meios líquidos o melão da cana-de-açúcar e o leite de levedura. Os meios sólidos foram compostos pelas misturas de sorgo em grão com casca de soja e com quirela de trigo, e casca de soja com quirela de trigo. Avaliou-se a esporulação e a viabilidade de conídios. Pelos resultados obtidos, verificou-se que o meio líquido preparado a partir de melão de cana-de-açúcar proporcionou maior esporulação ($2,30 \times 10^5$ conídios mL de meio⁻¹), viabilidade dos conídios (99,7%) e formação de biomassa micelial do fungo ($1,26 \text{ g } 100 \text{ mL de meio}^{-1}$). A produção de conídios obtida nas misturas sólidas (10^7 conídios g de meio⁻¹) foi acentuadamente maior do que a verificada nos meios líquidos (10^4 conídios mL de meio⁻¹), destacando-se as misturas entre sorgo em grão e casca de soja (40: 60%), sorgo em grão e quirela de trigo (80: 20%) e casca de soja e quirela de trigo (40: 60%) que produziram, respectivamente, $2,30$, $1,70$ e $1,50 \times 10^7$ conídios g meio⁻¹. O cultivo do fungo em sistema bifásico não promoveu um aumento significativo na produção de conídios de *B. euphorbiae* mantendo-se da ordem de 10^7 conídios g meio⁻¹. A viabilidade de *B. euphorbiae* não foi afetada pelo preparo e composição nutricional dos meios sólidos e

das combinações bifásicas, obtendo-se valor maior que 99,7% em todos os meios sólidos e combinações bifásicas.

Palavras-chave: controle biológico, controle de plantas daninhas, produção de fungos, substratos naturais, biomassa micelial, esporulação, viabilidade.

CHAPTER 3 - PRODUCTION OF *Bipolaris euphorbiae* IN LIQUID AND SOLID MEDIA, AND TWO-PHASE CULTIVATE SYSTEM

SUMMARY - *Bipolaris euphorbiae* is a potential biological control agent of *Euphorbia heterophylla*. For its use in field conditions, it is necessary to produce large quantities of conidia. The present work had the objective of evaluating the production of *B. euphorbiae* in liquid media based on agroindustrial residual or byproducts, evaluating different mixtures of solid substrates obtained from grains and derivatives and, also, combine liquid and solid media for the production of *B. euphorbiae* by a two-phase system. As liquid substrates were used, in different concentrations, vinasse, sugar cane molasses and yeast cream, cheese whey, water of cassava bran and milhocina[®]. As solid substrates were mixed, in different proportions, sorghum grains, soybean hulls and cracked wheat. For all experiments conidia production and viability were evaluated, as well as micelial biomass in the liquid media. In the two-phase system were used, as liquid media, the sugar cane molasses and yeast cream. The solid media were composed by the mixtures of sorghum grains with soybean hulls and with cracked wheat, and soybean hulls with cracked wheat. Conidia sporulation and viability was evaluated. The liquid media of sugar cane molasses proportionated higher sporulation ($23,0 \times 10^4$ conidia mL medium⁻¹), conidia viability (99,7%) and formation of fungus micelial biomass (1,26 g 100 mL medium⁻¹). The conidia production obtained in the solid mixtures (10^7 con. g medium⁻¹) was substantially higher than observed in liquid media (10^4 con. g medium⁻¹), distinguishing the mixtures of sorghum grains with soybean hulls (40:60%), sorghum grains with cracked wheat (80:20%) and soybean hulls with cracked wheat (40:60%) that produced, respectively, 2,30, 1,70 and 1,50 $\times 10^7$ con. g medium⁻¹. The cultivation of the fungus in two-phase system did not promote a significant increase in *B. euphorbiae* conidia production, maintaining its self in the range of 10^7 con. g medium⁻¹. *B. euphorbiae* viability was not affected by preparation and nutritional composition of the solid media and of the two-phase combinations, obtaining superior value than 99,7% in all solid media and two-phase combinations.

Keywords: Biological control, weed control, fungus production, natural substracts, micelial biomass, sporulation, viability.

1- INTRODUÇÃO

Euphorbia heterophylla infesta principalmente a cultura da soja e seu controle tem sido realizado por meio de herbicidas. Contudo o uso continuado da combinação de trifluralin e metribuzin na cultura proporcionou a seleção de plantas resistentes na região sul do Brasil (VIDAL & FLECK 1997; MARCHIORI et al., 2001). Apesar de toda a tecnologia de controle químico aplicado, essa espécie persiste e mantém elevadas densidades em lavouras de soja no sul e centro-oeste brasileiro.

O emprego de bioherbicidas, entre os quais o fungo *Bipolaris euphorbiae* Muchovej & Carvalho, tem sido sugerido como estratégia para o controle biológico de *E. heterophylla*. O fungo é um patógeno específico para a planta, provocando manchas necróticas no caule e nas folhas, evoluindo para intenso desfolhamento, podendo conduzir à sua morte. Nas condições em que não ocorre a morte da planta, sua capacidade competitiva fica drasticamente reduzida (YORINORI, 1984).

Para a utilização de bioherbicidas na estratégia inundativa é necessário que ocorra a produção de grandes quantidades de propágulos infecciosos, uma vez que grandes áreas serão tratadas e mais de uma vez por ano (TEBEEEST, 1984). Segundo WENZEL et al. (2006), o uso de fungos em larga escala requer a obtenção de meios de cultura que proporcionem bom crescimento com alta esporulação e que sejam elaborados com substratos de baixo custo, fácil obtenção, manuseio e preparo.

O arroz em grão ainda é o substrato mais utilizado no Brasil para a produção de fungos, porém, visando a redução de custos e obtenção de grandes quantidades de propágulos viáveis, vários estudos estão sendo realizados para avaliar a eficiência de outros substratos, como sorgo, caupi, fava, feijão (VILAS BOAS et al., 1996), macerados de feijão de mesa, feijão guandu e soja, extratos de batata, fubá, soja, leite em pó, farelo de trigo e arroz (OLIVEIRA, 2000), painço, quirela de milho, trigo em grão (EL DAMIR, 2006), alpiste, farelo de arroz, farelo de soja, farelo de trigo, lentilha em grão, painço, quirela de arroz, quirela de milho, soja em grão, soja moída, trigo em grão, trigo moído, sorgo em grão e sorgo moído (WENZEL et al. 2006).

Para viabilizar a utilização de *B. euphorbiae* em programas de controle biológico de *E. heterophylla*, é necessário obter a produção de grandes quantidades de conídios do fungo. PENARIOL et al. (2008) avaliaram diversos meios sólidos obtidos de grãos e derivados, além de meios líquidos preparados a partir de diversos substratos e verificaram que a produção de conídios de *B. euphorbiae* foi significativamente maior nos meios sólidos formados por sorgo em grão ($4,74 \times 10^6$ conídios g^{-1}) e casca de soja ($4,72 \times 10^6$ conídios g^{-1}), enquanto que dentre os meios líquidos pode ser destacado o preparado com o farelo de trigo que produziu $1,33 \times 10^6$ conídios mL^{-1} de meio. Verificando o efeito de diferentes meios de cultura para a esporulação do fungo MARCHIORI et al. (2001) observaram que entre os meios feitos com grãos de cereais os melhores consistiram de arroz, sorgo ou a mistura de ambos.

Dependendo do tipo de propágulo desejado e da espécie a ser produzida, os fungos podem ser produzidos sobre meios artificiais utilizando-se três processos ou métodos: sólido, líquido e o sistema bifásico (ALVES & PEREIRA, 1998). Entre os métodos de produção destaca-se o cultivo bifásico, que combina o benefício da alta produção de biomassa em meio líquido com a grande produção de conídios em meios sólidos (JENKINS & GOETTEL, 1997).

Apesar do grande número de trabalho envolvendo a produção de fungos, são poucos os que tratam do sistema bifásico de cultivo. SANTORO et al. (2005) avaliaram a produção de *Beauveria bassiana* pelo sistema bifásico e verificaram que as maiores produções de conídios foram obtidas utilizando como inoculo do arroz, a biomassa fúngica produzida nos meios líquidos feitos a partir de farinha de crisálida e farinha de crisálida+batata+dextrose ($2,7 \times 10^{12}$ e $2,8 \times 10^{12}$ conídios g^{-1} de arroz, respectivamente).

Poucos trabalhos foram desenvolvidos para definição de substratos adequados para produção de *B. euphorbiae*, justificando-se novas investigações para estabelecer os meios e métodos adequados para sua produção em larga escala. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivos: a) avaliar a produção de *B. euphorbiae* em meios de cultura líquidos, elaborados a partir de resíduos ou subprodutos da

agroindústria; b) avaliar diferentes combinações de substratos sólidos obtidos de grãos e derivados, e finalmente: c) selecionar meios visando a produção bifásica do fungo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungo

Foi utilizado o isolado FCAV# 569 de *Bipolaris euphorbiae*, obtido por pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa em Soja da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNSo), localizada em Londrina-PR. O isolado permaneceu estocado em tubos de ensaio contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA), mantidos em refrigerador a 4°C, no laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, SP.

Para a utilização nos ensaios foi cultivado em placas de Petri contendo meio mínimo de Pontecorvo modificado por PENARIOL et al. (2008) ajustado com pH 6, incubado em estufa a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, durante oito dias, em ausência de iluminação.

2.2 Preparo dos meios líquidos

Os meios líquidos foram preparados a partir dos seguintes substratos considerados resíduos ou subprodutos agroindustriais de baixo custo e de fácil obtenção, usados nas concentrações especificadas a seguir: soro obtido na fabricação de queijo fresco (55, 70, 85 e 100%), milhocina[®] (1, 2, 4 e 6%), vinhaça de cana-de-açúcar (55, 70, 85 e 100%), melação de cana-de-açúcar (2, 4, 6 e 8%), leite de levedura da indústria de cana-de-açúcar (20, 40, 55 e 70%) e água de prensa de mandioca (55, 70, 85 e 100%). As diferentes concentrações utilizadas de cada substrato foram obtidas pela diluição destes em água destilada e foram baseadas em estudos realizados por MACHADO (2008).

Aos meios preparados com vinhaça, leite de levedura e soro de queijo foram adicionados 0,5% de dextrose e os de milhocina[®] receberam 1% de dextrose. Todos os meios foram acrescidos de cloranfenicol (250 mg L⁻¹), para evitar a recontaminação bacteriana durante o período de incubação. O pH de cada meio foi medido e padronizado em 6,0, valor que proporcionou melhor desempenho do fungo em ensaio anterior, utilizando soluções de NaOH (3N) e HCl (1N). Em frasco erlenmeyer, com capacidade para 250 mL, foram colocados 100mL de meio, vedado com tampão de algodão e papel-alumínio, e em seguida, autoclavado por 30 minutos a 121 °C e 1Kgf cm⁻².

2.3 Preparo dos meios sólidos

A escolha dos meios sólidos foi baseada nos resultados obtidos por PENARIOL et al. (2008) que utilizaram o mesmo fungo. Foram usados os seguintes substratos: sorgo em grão, casca de soja e quirela de trigo. O sorgo e a casca de soja proporcionaram os melhores resultados de esporulação e viabilidade, enquanto que a quirela de trigo favoreceu a viabilidade, segundo PENARIOL et al. (2008).

Os substratos foram arbitrariamente misturados nas proporções de 80:20%, 60:40%, 40:60%, 20:80%. Tais misturas, nas diferentes proporções, constituíram os tratamentos do ensaio e cada substrato foi também utilizado individualmente como controle para comparação.

O preparo dos meios foi feito segundo metodologia proposta por PENARIOL et al. (2008). Os grãos de sorgo foram cozidos em água destilada fervente na proporção 3:1 (v p⁻¹) por cinco minutos em fogo brando. A casca de soja e o farelo de trigo foram embebidos em água destilada de 3:1 (v p⁻¹), durante 15 minutos. Posteriormente, todos os substratos foram coados em peneira fina para remoção do excesso de água, e as misturas preparadas em peso seco (g g⁻¹).

Os substratos foram colocados em frascos erlenmeyers com capacidade para 250 mL, vedados com tampão de algodão e recobertos com papel alumínio e autoclavados a 121 °C e 1Kgf cm⁻² por 40 minutos. Em função da natureza e

características dos substratos utilizados, a quantidade das misturas colocadas nos frascos foi padronizada estabelecendo-se um determinado volume do frasco ocupado pelas misturas.

2.4. Combinação bifásica

A escolha dos meios líquidos e sólidos, utilizados para a produção pelo sistema bifásico de cultivo, foi realizada de acordo com os meios que proporcionaram os melhores resultados nos ensaios anteriores.

Para a seleção dos meios líquidos adequados à produção do fungo no sistema bifásico, foi levada em consideração a análise conjunta de dois parâmetros avaliados: produção de conídios e biomassa micelial. Quando a análise estatística não acusou diferença significativa entre os tratamentos e suas respectivas concentrações, optou-se pela escolha do maior valor numérico das médias.

Assim, optou-se por escolher os meios líquidos a base de 8% de melaço de cana-de-açúcar e 70% de leite de levedura e os meios sólidos, compostos pelas misturas de 60% de sorgo em grão e 40% de casca de soja, 80% de sorgo em grão e 20% de quirela de trigo e 40% de casca de soja e 60% de quirela de trigo, para a produção de *B. euphorbiae*.

O preparo dos meios líquidos e sólidos foi feito conforme já descrito. Os tratamentos no sistema bifásico foram constituídos pela combinação de cada um dos meios líquidos com cada meio sólido.

2.5. Cultivo e incubação do fungo nos meios sólidos e líquidos

A repicagem foi realizada em câmara de fluxo laminar, transferindo-se, com o auxílio de agulha de níquel-cromo, três discos de cinco milímetros de diâmetro retirados de colônias jovens do fungo crescidas em meio mínimo modificado (PENARIOL et al., 2008) com o pH 6, por 8 dias a 25 °C, no escuro. As culturas foram mantidas em estufa por 10 dias, com temperatura de 25 ± 0,5 °C, em ausência de luz.

2.6. Cultivo e incubação do fungo no sistema bifásico

Três discos de cinco milímetros de diâmetro, retirados de culturas jovens do fungo, crescidas em meio mínimo modificado com pH6, foram transferidos para frascos erlenmeyers contendo os meios líquidos. Após a transferência as culturas foram mantidas em estufa a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 7 dias na ausência de iluminação.

Em câmara asséptica, a massa micelial formada, juntamente com o meio líquido, foi transferida para um béquer com capacidade de 250mL e triturada durante 3 segundos com auxílio de um mixer Blaker & Decker®, modelo SB 40 e, em seguida, o material foi coado em peneira com malha de 1mm de espessura, de modo a padronizar o tamanho dos fragmentos de micélio. Tanto o mixer quanto a peneira foram desinfetados em álcool 96 GL. Esta suspensão foi então utilizada para inocular os meios sólidos.

Com o auxílio de um pipetador automático, em câmara de fluxo laminar, 3mL da suspensão obtida do cultivo nos meios líquidos foram transferidos para frascos erlenmeyers contendo meios sólidos, em seguida, os frascos foram acondicionados em estufa a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 10 dias no escuro. Após o período de incubação, avaliou-se a produção e viabilidade de conídios.

2.7. Avaliação nos meios sólidos, líquidos e sistema bifásico

Nos meios sólidos avaliou-se a produção de conídios e a viabilidade para todos os tratamentos. Para os meios líquidos avaliou-se a produção de conídios, a viabilidade e a biomassa micelial. Apenas para o meio de soro de queijo não foi possível avaliar a viabilidade devido à presença de grumos, possivelmente formados pela gordura do leite, que dificultaram muito a observação dos conídios.

Para avaliação da produção de conídios nos meios líquidos, a massa micelial formada foi fragmentada com auxílio de um bastão de vidro durante 5 segundos para desagregação do micélio. Em seguida, para remoção dos conídios o meio foi vigorosamente agitado em agitador magnético por 3 minutos utilizando-se 15g de

pérolas de vidro. O meio foi então coado em peneira com malha de 1mm de espessura. O material filtrado foi agitado vigorosamente e o número de conídios determinado com auxílio de câmara de Neubauer.

A avaliação da produção de conídios nos meios sólidos e no sistema bifásico foi realizada transferindo-se 1g de cada meio com o fungo crescido para tubo contendo 9mL de uma mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89% p v⁻¹) e solução de Tween 80[®] (0,1% v v⁻¹). O material foi vigorosamente agitado em agitador elétrico de tubos durante 30 segundos, para liberação dos conídios, e em seguida coado em tecido *voile* para remoção da parte sólida e 1mL do filtrado foi transferido para tubo contendo 9mL da mistura de soluções salina + Tween. Após vigorosa agitação em agitador elétrico determinou-se a quantidade de conídios presentes na suspensão com auxílio da câmara de Neubauer.

Para a avaliação da viabilidade dos conídios obtidos nos meios líquidos o material filtrado foi centrifugado por 2 minutos a 3.000 r.p.m, e o precipitado resuspendido em 7mL de solução salina. Para os meios sólidos e no sistema bifásico utilizaram-se as mesmas suspensões usadas para avaliação da produção de conídios. A avaliação foi realizada conforme descrita por FRANCISCO et al. (2006).

Para determinação da massa da matéria seca, o micélio formado foi filtrado em funil de Buchner sob bomba a vácuo, em seguida mantido em estufa a 60°C até peso constante e a determinação feita em balança analítica.

2.8 Análise estatística

Os dados dos ensaios com os meios sólidos e líquidos foram analisados utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada tratamento. A análise de variância foi realizada por meio do teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O ensaio com os meios líquidos foi analisado, segundo o modelo de classificação hierárquica analisando-se o efeito de dois fatores: meios e concentração dentro de meios.

Para o ensaio de produção bifásica utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado e os dados, obtidos através de três repetições, foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a execução das análises foi utilizado o programa ESTAT- Sistema para Análise Estatística – versão 2.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios líquidos

A maior produção de biomassa micelial pelo fungo foi obtida no meio preparado com melaço de cana-de-açúcar, sendo a concentração de 8% a que proporcionou a maior formação de matéria seca (2,18g 100 mL⁻¹ de meio), diferindo significativamente da biomassa micelial obtida nas demais concentrações. Observa-se que houve uma correlação positiva entre a produção de biomassa e o aumento da concentração de melaço. O meio contendo 100% de água da prensa da mandioca, embora tenha apresentado uma produção de biomassa (1,25g 100 mL⁻¹ de meio) menor do que a obtida no meio anterior, também foi adequado para promover o crescimento micelial do fungo, apesar deste crescimento não ter diferido do observado nas concentrações de 85 e 70% (Tabela 1).

A produção de conídios de *B. euphorbiae* obtida nos meios preparados com melaço de cana-de-açúcar e leite de levedura foi significativamente maior do que a obtida nos demais meios, não havendo diferenças significativas entre as concentrações testadas. Apesar disso, as concentrações de 4 e 20 ou 70%, respectivamente de melaço e leite de levedura, podem ser destacadas como as mais promissoras uma vez que apresentaram maior valor numérico para este parâmetro (29 x 10⁴ e 16 x 10⁴ conídios mL⁻¹ de meio, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 1- Massa da matéria seca (g 100 mL de meio⁻¹) de *Bipolaris euphorbiae* produzida em meios líquidos obtidos a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais, usados em diferentes concentrações, após 10 dias de cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.

Meios líquidos	Média dos tratamentos	Concentrações				Teste F
		C1	C2	C3	C4	
Vinhaça de cana-de-açúcar	0,55 C	0,73 a	0,50 a	0,47 a	0,49 a	1,49 ^{ns}
Soro de queijo	0,56 C	0,57 ab	0,38 b	0,44 b	0,84 a	1,24**
Água da prensa da mandioca	0,99 B	0,73 b	0,91 ab	1,06 ab	1,25 a	4,97**
Leite de levedura	0,59 C	0,53 a	0,56 a	0,51 a	0,74 a	1,14 ^{ns}
Melaço de cana-de-açúcar	1,26 A	0,36 d	1,06 c	1,44 b	2,18 a	58,46**
Milhocina	0,43 C	0,23 b	0,41 ab	0,43 ab	0,65 a	3,01*
Teste F	42,46**					

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Vinhaça, soro de queijo e água da prensa da mandioca: C1:55%; C2: 70%; C3: 85% e C4:100%. Leite de levedura:C1: 20%; C2: 40%; C3: 55% e C4: 70%. Melaço de cana-de-açúcar: C1: 2%; C2: 4%, C3: 6% e C4: 8%. Milhocina: C1: 1%; C2: 2%; C3: 4% e C4: 6%. **Significativo a 1% de probabilidade; *Significativo a 5% de probabilidade; NS: Não significativo.

Tabela 2- Produção de conídios ($\times 10^4$ con. mL de meio⁻¹) de *Bipolaris euphorbiae* em meios líquidos obtidos a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais usados em diferentes concentrações, após 10 dias de cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.

Meios líquidos	Média dos tratamentos	Concentrações				Teste F
		C1	C2	C3	C4	
Vinhaça de cana-de-açúcar	5,8 BC	11,0a	6,0a	4,3a	2,0a	0,64 ^{ns}
Soro de queijo	1,5 D	1,7a	2,3a	1,0b	1,0b	4,77**
Água da prensa da mandioca	3,2 CD	3,3a	3,7a	3,3a	2,7a	0,0 ^{3ns}
Leite de levedura	15,0 AB	16,0a	13,0a	15,0a	16,0a	0,01 ^{ns}
Melaço de cana-de-açúcar	23,0 A	14,0a	29,0a	22,0a	28,0a	0,17 ^{ns}
Milhocina	7,5A BC	15,0a	4,7a	8,3a	2,7a	0,58 ^{ns}
Teste F	10,75**					

Médias originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Vinhaça, soro de queijo e água da prensa da mandioca: C1: 55%; C2: 70%; C3: 85% e C4: 100%. Leite de levedura: C1: 20%; C2: 40%; C3: 55% e C4: 70%. Melaço de cana-de-açúcar: C1: 2%; C2: 4%; C3: 6% e C4: 8%. Milhocina: C1: 1%; C2: 2%; C3: 4% e C4: 6%. **Significativo a 1% de probabilidade; NS: Não significativo.

O resultado do teste de viabilidade mostrou que, em média, apenas os conídios produzidos nos meios elaborados com milhocina® e água da prensa da mandioca mostraram uma menor capacidade de germinação, diferindo estatisticamente da germinação dos conídios obtidos nos demais meios.

Entretanto, do ponto de vista do controle de qualidade da produção de fungos, a porcentagem de germinação obtida nestes meios (89,1 e 91,2%, respectivamente) pode ser considerada satisfatória. Para os demais tratamentos, a viabilidade manteve-se acima de 97% (Tabela 3).

A análise conjunta dos três parâmetros avaliados sugere que o meio elaborado a partir de melaço de cana-de-açúcar é o mais favorável para a produção de *B. euphorbiae*.

Tabela 3 - Viabilidade (%) de conídios de *Bipolaris euphorbiae* em meios líquidos obtidos a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais usados em diferentes concentrações, após 10 dias de cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.

Meios líquidos	Média dos tratamentos	Concentrações				Teste F
		C1	C2	C3	C4	
Vinhaça de cana-de açúcar	97,4 AB	98,4a	95,8a	97,6a	97,9a	0,10 ^{ns}
Água da prensa da mandioca	91,2 BC	86,3a	92,5a	87,7a	98,2a	0,27 ^{ns}
Leite de levedura	99,1 A	98,9a	98,7a	99,4a	99,1a	0,01 ^{ns}
Melaço de cana-de-açúcar	99,7 A	99,6a	99,7a	99,8a	99,7a	0,00 ^{ns}
Milhocina	89,1 C	94,6a	95,5a	78,5b	88,0ab	4,76 ^{**}
Teste F	7,21 ^{**}					

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Vinhaça e água da prensa da mandioca: C1: 55%; C2: 70%; C3: 85% e C4: 100%. Leite de levedura: C1: 20%; C2: 40%; C3: 55% e C4: 70%. Melaço de cana-de-açúcar: C1: 2%; C2: 4%; C3: 6% e C4: 8%. Milhocina: C1:1%; C2: 2%; C3: 4% e C4: 6%. NS: Não significativo; **Significativo a 1% de probabilidade.

Segundo ALVES & PEREIRA (1998) existem algumas dificuldades para a produção de fungos em meios líquidos, mas o método pode ser empregado para a produção de grandes quantidades de patógenos. O resultado da produção de conídios

obtido neste trabalho para *B. euphorbiae* é semelhante ao encontrado por MACHADO (2008) que analisou a produção dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* em meios líquidos obtidos a partir de resíduos ou subprodutos agroindustriais, já que, em ambos os casos verificou-se uma pequena produção de conídios nos meios líquidos.

De acordo com ROBERTS & HUMBER (1981), a maioria dos hifomicetos não esporulam rapidamente em cultura líquida obtendo-se uma grande quantidade de massa micelial. Assim, a baixa produção de conídios obtida em cultura líquida neste trabalho pode estar relacionada com a ausência de agitação constante destes meios. PEREIRA & EIRA (1999) verificaram que somente quando a biomassa de *Metarhizium anisopliae* foi submetida a aeração direta é que ocorreu a esporulação do fungo, atingindo a produção de 10^7 conídios por grama de substrato. CRUZ et al. (1983) verificaram que, dentre os meios de cultura naturais líquidos avaliados para a esporulação de *M. anisopliae*, os melhores foram os meios preparados a partir de feijão e batata.

Os meios líquidos compostos por soro de queijo e água da prensa da mandioca foram os que proporcionaram os piores resultados para a produção de conídios por *B. euphorbiae* (Tabela 2), resultado também obtido por PENARIOL et al. (2008) com o segundo meio, embora com pH de 4,3. Para os isolados JAB 02 e JAB 45 de *L. lecanii* o mesmo meio, com pH ajustado em 6,5 se mostrou o mais adequado para a produção de conídios (MACHADO, 2008). Já para os fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *L. lecanii* o meio líquido a base de água de coco proporcionou o maior crescimento e esporulação segundo SAHAYARAJ & NAMASIVAYAM (2008).

PENARIOL et al. (2008) avaliaram a biomassa micelial de *B. euphorbiae* em meio líquido preparado a partir de água de prensa de mandioca, mas diferentemente do ocorrido neste trabalho, não obtiveram resultados satisfatórios. De acordo com os autores a formação de biomassa foi pequena, provavelmente em consequência do baixo pH do meio de cultivo, que não foi corrigido. A maior biomassa micelial de *B. euphorbiae* obtida pelos autores foi produzida no meio líquido preparado à base de farelo de trigo, atingindo o valor de $0,73 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$, enquanto neste trabalho o mesmo

fungo cultivado no meio de melaço de cana-de-açúcar produziu 1,26 g 100 mL⁻¹. Enquanto que para *M. anisopliae* a maior quantidade de matéria seca foi obtida no meio elaborado com extrato do percevejo da soja (PEREIRA & EIRA 1999).

Os meios compostos por melaço de cana-de-açúcar, leite de levedura e vinhaça foram os que proporcionaram os melhores resultados para a viabilidade dos conídios, diferentemente do obtido por PENARIOL et al. (2008) que verificaram que a viabilidade dos conídios não foi afetada pela composição dos meios líquidos, resultado semelhante ao verificado para *M. anisopliae* (PEREIRA & EIRA, 1999).

3.2. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios sólidos

Analisando os dados de produção de conídios, verificou-se que apenas nas misturas de sorgo em grão e quirela de trigo, houve diferença significativa na esporulação do fungo (Tabela 4), destacando-se a produção obtida na mistura de 80:20%, que mesmo não diferindo das obtidas nas misturas de 100:0%, 60:40% e 20:80%, apresentou o maior valor numérico ($1,70 \times 10^7$ conídios g⁻¹).

Observando-se a produção de conídios nos meios preparados com as misturas de sorgo em grão com casca de soja e de casca de soja com quirela de trigo, pode-se destacar a esporulação obtida quando o fungo foi cultivado nos meios feitos com a proporção de 40:60% dos substratos, que proporciono os maiores valores das produções de conídios nestes meios ($2,30 \times 10^7$ e $1,50 \times 10^7$ conídios g de meio⁻¹, respectivamente). A viabilidade dos conídios de *B. euphorbiae* não foi influenciada pelo tipo de substrato, não havendo diferenças significativas nas porcentagens de germinação dos conídios produzidos nas diferentes combinações. Para que sejam utilizados em programas de manejo, recomenda-se que os conídios apresentem viabilidade acima de 90%. Este fato pode ser verificado para todos os tratamentos avaliados, cuja viabilidade manteve-se acima de 99% (Tabela 4).

Tabela 4 - Produção e viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* em meios sólidos preparados com misturas de diferentes substratos, após 10 dias de cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.

Meios de cultura	Mistura	Produção de conídios (n° de conídios x 10 ⁷ g meio ⁻¹)	Viabilidade (%)
Sorgo em grão (S) e Casca de soja (C)	100% S + 0% C	1,37A	99,9A
	80% S + 20% C	1,15A	99,9A
	60% S+ 40% C	1,45A	100,0A
	40% S+ 60% C	2,30A	99,8A
	20% S+ 80% C	1,35A	99,9A
	0% S + 100% C	1,40A	99,9A
Teste F		1,43 ^{ns}	1,40 ^{ns}
Sorgo em grão (S) e Quirela de trigo (Q)	100% S + 0% Q	1,17A	99,9A
	80% S + 20% Q	1,70A	99,9A
	60% S+ 40% Q	1,25A	99,9A
	40% S+ 60% Q	0,45C	100,0A
	20% S+ 80% Q	1,37AB	100,0A
	0% S + 100% Q	0,27BC	99,9A
Teste F		2,71*	0,76 ^{ns}
Casca de soja (C) e Quirela de trigo (Q)	100% C + 0% Q	1,07A	99,9A
	80% C + 20% Q	1,10A	100,0A
	60% C + 40% Q	1,00A	100,0A
	40% C + 60% Q	1,50A	100,0A
	20% C + 80% Q	0,57A	100,0A
	0% C + 100% Q	0,80A	99,9A
Teste F		0,81 ^{ns}	0,81 ^{ns}
CV(%)		4,11	0,12

Médias com valores originais, mas análise estatística da produção de conídios realizada com dados transformados em log(x). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS: Não significativo; *Significativo a 5% de probabilidade.

Segundo ALVES e PEREIRA (1998) a produção de fungos em meios sólidos é a forma mais utilizada por não necessitar de tecnologia sofisticada. A seleção de meios de cultura é um aspecto importante a ser considerado na produção (KHALIL et al., 1985).

Apesar do arroz ser o substrato mais utilizado na produção de fungos, substratos alternativos estão sendo avaliados na expectativa de obter grandes quantidades de propágulos viáveis e otimizar o processo. DORTA et al. (1990) avaliaram a produção do fungo *M. anisopliae* em meio sólido constituído por farelo de arroz, casca de arroz e a mistura de ambos e verificaram que a maior produção de esporos foi obtida no meio composto pela mistura de ambos os substratos. Segundo GRAJEK (1994), a maior produção de esporos ($3,2 \times 10^9$ conídios g^{-1}) de *L. lecanii* ocorreu quando o fungo foi cultivado em meio contendo a mistura de farelo de trigo e polpa de beterraba, enquanto que para *B. bassiana* a maior produção ($3,4 \times 10^9$ conídios g^{-1}) foi obtida no meio composto pela mistura de casca de batata e bagaço de cana-de-açúcar (SANTA et al., 2005); segundo estes autores o fungo cresce e esporula melhor em meios constituídos por misturas de resíduos.

Avaliando a esporulação de *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *L. lecanii*, em diferentes substratos sólidos SAHAYARAJ & NAMASIVAYAM (2008) verificaram que entre os grãos avaliados os melhores resultados para *P. fumosoroseus* e *L. lecanii* foram obtidos nos meios a base sorgo, enquanto que para *B. bassiana* o mesmo ocorreu no meio composto por trigo. WENZEL et al. (2006) avaliaram diversos substratos sólidos, obtidos de grãos e derivados, para produção de *L. lecanii* verificando que, farelo de soja, farelo de trigo, trigo moído e lentilha proporcionaram, entre os substratos avaliados, as maiores produções de conídios.

A produção de conídios de *B. euphorbiae*, foi verificada por MARCHIORI et al. (2001). Estes autores observaram que o meio V8-ágar e grãos de arroz e sorgo, usados como substratos, proporcionaram maior produção em relação aos grãos de girassol. Na busca de substratos alternativos para produção de *B. euphorbiae* PENARIOL et al. (2008) obtiveram resultados satisfatórios para a produção de conídios utilizando sorgo em grão e casca de soja. No presente trabalho, a mistura entre estes substratos e com quirela de trigo em diferentes proporções ocasionou um incremento na produção de esporos, sendo da ordem de 10^7 conídios g de substrato⁻¹, enquanto no trabalho de PENARIOL et al. (2008) as produções foram da ordem de 10^6 conídios g de substrato⁻¹.

A viabilidade dos conídios produzidos nos meios sólidos neste trabalho manteve-se praticamente em 100%, fato este também verificado por PENARIOL et al. (2008) com os conídios de *B. euphorbiae*, e de modo semelhante para aqueles produzidos nos meios de milho de pipoca, milho + arroz, milho + sorgo, sorgo + arroz e somente arroz nos quais a viabilidade manteve-se acima de 90% (MARCHIORI et al. 2001). No entanto, para os isolados JAB 02 e JAB 45 de *L. lecanii* somente os conídios produzidos no meio de lentilha em grão apresentaram viabilidade maior que 90% (WENZEL et al., 2006).

3.3. Produção de *Bipolaris euphorbiae* no sistema bifásico

Na tabela 5 estão contidos os dados referentes à produção e viabilidade de conídios produzidos por *B. euphorbiae* pelo sistema bifásico de cultivo.

A produção de conídios ocorrida na combinação de leite de levedura e mistura de casca de soja com quirela de trigo, que proporcionou o maior valor numérico de produção ($1,4 \times 10^7$ conídios g substrato⁻¹), diferiu significativamente apenas da ocorrência na combinação de melão e mistura de sorgo em grão e casca de soja ($0,7 \times 10^7$ conídios g substrato⁻¹)

As combinações que utilizaram o leite de levedura como meio líquido proporcionaram melhores resultados comparando-se com as que utilizaram o melão, entretanto, os valores são menores do que os obtidos na produção convencional em meios sólidos, indicando que a produção de conídios não foi incrementada pelo sistema bifásico de cultivo quando comparado com a produção em meios sólidos (Tabela 4).

Quanto à viabilidade dos conídios produzidos observa-se que, não houve diferença significativa entre os tratamentos, mantendo-se acima de 99% (Tabela 5), assim como, o observado na produção convencional em meios sólidos.

Tabela 5 - Produção e viabilidade dos conídios de *Bipolaris euphorbiae* obtido no processo bifásico, após cultivo a 25°C e em ausência de iluminação.

Combinações bifásicas (meio líquido/meio sólido)	Produção de conídios (x 10 ⁷ g meio sólido ⁻¹)	Viabilidade (%)
Melaço (8%) / Sorgo em grão + Casca de Soja (40:60%)	0,7B	99,9A
Melaço (8%) / Sorgo em grão + Quirela de trigo (80:20%)	0,8AB	99,7A
Melaço (8%) / Casca de soja + Quirela de trigo (40:60%)	1,0AB	99,9A
Levedura (70%) / Sorgo em grão + Casca de soja (40:60%)	1,3AB	99,9A
Levedura (70%) / Sorgo em grão + Quirela de trigo (80:20%)	1,0AB	99,7A
Levedura (70%) / Casca de soja+ Quirela de trigo (40:60%)	1,4A	99,9A
Test F	4,21*	1,01 ^{ns}
DMS	0,2342	0,8575
CV(%)	1,22	0,31

Médias com valores originais, mas análise estatística da produção de conídios realizada com dados transformados em log(x). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). NS: Não significativo. *Significativo a 5% de probabilidade. DMS: Diferença mínima significativa; CV : Coeficiente de variação.

Diferentemente do verificado neste estudo, MACHADO (2008) obteve um incremento na produção de conídios do isolado JAB 45 de *L. lecanii* pelo cultivo bifásico (sendo da ordem de 10⁸ conídios por grama de meio), quando comparado com o cultivo apenas no meio sólido.

DERAKHSHAN et al. (2008) avaliaram a produção de conídios do isolado V.I-7 de *V. lecanii* pelo cultivo bifásico, usando caldo de melaço e levedura (CML), caldo de batata e dextrose (CBD) e caldo de batata e sucrose (CBS) como meios líquidos e quirela de arroz, quirela de milho e sorgo moído como substratos sólidos. As combinações de CML + arroz e CBS + arroz proporcionaram as maiores produções de conídios (2,28 e 2,21 x 10⁹ conídios g⁻¹, respectivamente), enquanto que, para as demais combinações a produção de conídios foi menor do que o esperado. Para a viabilidade, não houve diferença significativa na germinação dos conídios produzidos através das combinações avaliadas. Estes achados estão de acordo com o verificado por NIRMALA et al. (2006) que relataram que a maior produção de conídios de *V.*

Iecanii no sistema bifásico ocorreu no meio constituído por CBS + arroz ($1,75 \times 10^9$ conídios mL^{-1}), após 10 dias de cultivo.

A produção de conídios de *B. bassiana* pelo cultivo bifásico foi avaliada por SANTORO et al. (2005) utilizando meios líquidos feitos com farinha de crisálida (FC), batata e dextrose (BD) e a mistura destes substratos (FCBD) e arroz pré-cozido como meio sólido. As maiores produções de conídios ($2,7 \times 10^{12}$ e $2,8 \times 10^{12}$ conídios g^{-1} de arroz) foram obtidas quando utilizou-se como inóculo do arroz, a biomassa fúngica produzida nos meios de FC e FCBD, respectivamente. Os autores concluíram que, a produção de conídios pelo processo bifásico utilizando o meio líquido FCBD tem grande potencial em processos de produção massal de *B. bassiana*.

O meio líquido feito com farinha de soja suplementada com dextrose e os meios sólidos a base de quirela de milho, arroz, cevada, sorgo, aveia, trigo e fibra de coco, foram utilizados por ACEVEDO et al. (1995), para avaliar a produção de conídios por *Hirsutella thompsonii* e *H. nodulosa*. Segundo estes autores, as maiores esporulações foram obtidas no meio feito de arroz, sendo a produção máxima de $10,9 \times 10^8$ conídios g substrato^{-1} para *H. thompsonii*, enquanto que para *H. nodulosa* foi de $8,6 \times 10^8$ conídios g substrato^{-1} . Os autores concluíram que a produção de conídios de *H. thompsonii* e *H. nodulosa* foi incrementada pelo método bifásico de cultivo.

As combinações entre os meios líquidos feito com melaço e caldo de arroz e os meios sólidos de quirela de milho e farelo de soja proporcionaram melhores resultados para a produção de conídios de *P. farinosus*, segundo MASCARIN & ALVES (2005).

Trabalhos obtidos na literatura indicam a produção bifásica como um método bastante vantajoso para promover a produção de fungos. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho para *B. euphorbiae* diferem dos encontrados pelos vários autores, mas os substratos utilizados são bastante diversos o que dificulta a comparação dos resultados. A baixa produção de conídios verificada neste trabalho pode ser devida ao tempo de incubação nos meio líquidos (7dias), que pode não ter sido suficiente para a produção de biomassa fúngica em quantidade adequada para colonizar rapidamente o meio sólido e promover a esporulação. Entretanto, este aspecto precisa ser investigado.

4. CONCLUSÕES

1- Os meios sólidos foram mais eficientes do que os meios líquidos para a produção de conídios de *B. euphorbiae*.

2- A produção de biomassa micelial foi influenciada pela concentração dos substratos utilizados para elaborar os meios líquidos.

3- As misturas entre os substratos proporcionaram um incremento na produção de conídios nos meios sólidos.

4- O sistema bifásico de cultivo não foi capaz de incrementar a produção de conídios de *B. euphorbiae*.

5- A viabilidade dos conídios de *B. euphorbiae* não é afetada pelo tipo e composição nutricional dos meios sólidos e pela produção do fungo no sistema bifásico.

5. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J. L. R.; ROSAS, R. A.; ROSAS, L. S.; CARRASCO, J. V. Esporulación de los hongos entomopatógenos *Hirsutella thompsonii* Fisher y *H. nodulosa* Petch em cultivo misto. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México City, v. 37, p. 59-64, 1995.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ-USP, 1998. p. 845-869.

CRUZ, B. P. B.; ABREU, O. C.; OLIVEIRA, D. A.; 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.

DERAKHSHAN, A.; RABINDRA, R.J.; RAMANUJAM, B.; RAHIMI, M. Evaluation of different media and methods of cultivation on the production and viability of entomopathogenic fungi, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Bangladesh, v. 11, n. 11, p. 1506-1509, 2008.

DORTA, B.; BOSCH, A.; ARCAS, J. A.; ERTOLA, R. J. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 33, v. 6, p. 712-715, 1990.

EL DAMIR, M. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Baeuaveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Biological Sciences**, Bombay, v. 6, n. 2, p. 269-274, 2006.

FRANCISO, E. A.; MOCHI, D. A.; CORREIA, A. 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.

GRAJEK, W. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 39, n.1, p. 29-32, 1994.

JENKINS, N.E.; GOETTEL, M.S. Methods for mass-production of microbial control agents for grasshoppers and locusts. In: GOETTEL, M.S.; JOHNSON, L. (Eds). **Microbial control of grasshoppers and locusts**, Ottawa (Memoris of the Entomological Society of Canada), 1997, p. 37-48.

KHALIL, S. K.; SHAN, M. A.; NAEEM, M. Laboratory on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* with certain pesticides. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 13, p. 329-334, 1985.

MACHADO, A. C. R. **Produção de *Lecanicillium lecanii* em meios líquidos, sólidos e combinação em um sistema bifásico.** 2008. 64f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MARCHIORI, R.; NACHTIGAL, G. F.; COELHO, L.; YORIONORI, J. T.; PITELLI, R. A. Comparison of culture media for the mass production of *Bipolaris euphorbiae* and its impact on *Euphorbia heterophylla* dry matter accumulation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n.4, p. 428-432, 2001.

MASCARIN, G. M.; ALVES, S. B. Produção bifásica de *Paecilomyces fumosoroseus* e *Paecilomyces farinosus*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 14, 2005, Piracicaba, **Resumo:** p. 120-120.

NIRMALA, R. B.; RAMANUJAM, B.; RABINDRA, R.J.; RAO, N. S. Growth parameters of some isolates of entomofungal pathogens and production of dust-free spores on rice medium. **Journal of Biological Control**, Índia, v. 19, n. 21, p. 129-133, 2006.

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, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

PENARIOL, M.C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R.A.; PEREIRA, G. T. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 805-814, 2008.

PEREIRA, S. R. M.; EIRA, A. F. Metodologia para produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em cultivo submerso: esporulação da biomassa, efeito da concentração de açúcar e custo do inoculante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n.3, p.389-394, 1999.

ROBERTS, D. W.; HUMBER, R. A. Entomogenous fungi. In: COLE, G. T & KENDRICK, B (Eds.) **Biology of conidial fungi**. New York: Academic Press, 1981, v. 2, p. 201-236.

SAHAYARAJ, K.; NAMASIVAYAM, S. K. R. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. **African Journal of Biotechnology**, Netherlands, v. 7, n. 12, p. 1907-1910, 2008.

SANTA, H. S. D.; SANTA, O. R. D.; BRAND, D.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p. 51-60, 2005.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J.; SILVA, R.Z.; AKIMI, S.; ZORZETTI, J. Produção de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 3, p.313-320, 2005.

TEBEEST, D. O. Biological control of weeds with microbial herbicides. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, p. 443-453, 1984.

VIDAL, R.A.; FLECK, N.G. Análise do risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 12, p. 152-161, 1997.

VILAS BOAS, A.M.; ANDRADE, R.M.; OLIVEIRA, J.V. Diversificação de meios de cultura para produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivo 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. 7-17, 2006.

YORINORI, J. T. Biological control of milk weed (*Euphorbia heterophylla*) with pathogenic fungi. In: SYMPOSIUM BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 1984, Ottawa **Proceedings**... Ottawa: Canadian Govt. Publ. Centre, 1984. p. 677-681.

APÊNDICES

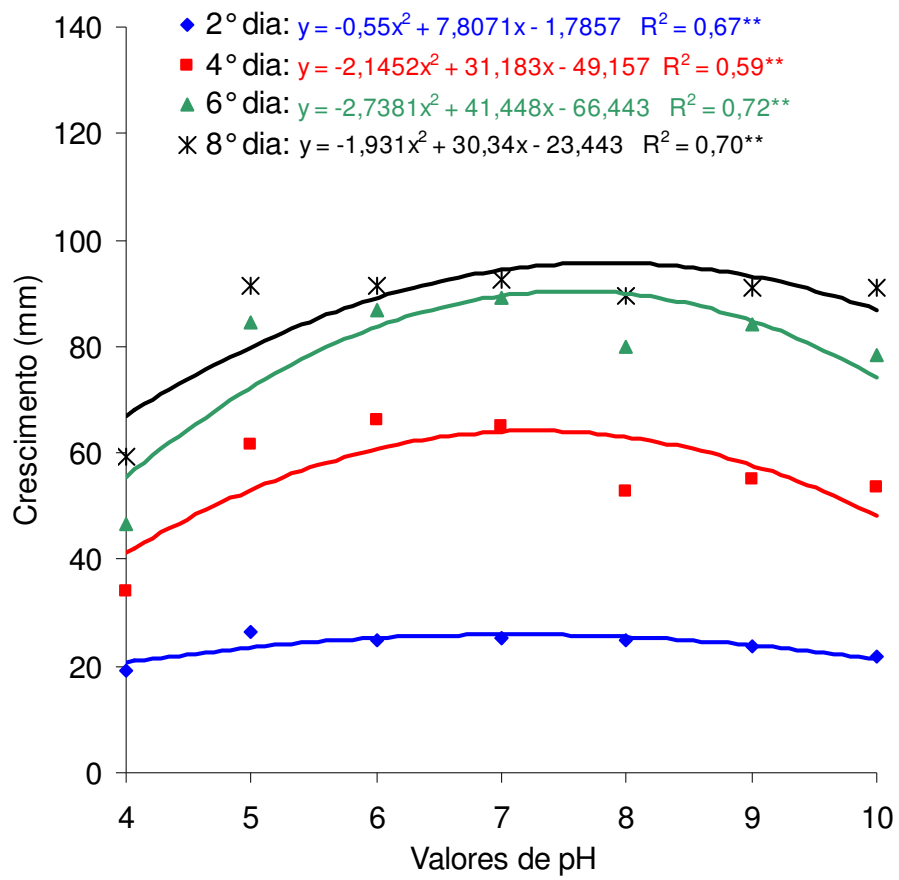


Figura 1 - Crescimento de *Bipolaris euphorbiae* em função de diferentes valores iniciais de pH do meio de cultura, após cultivo por oito dias a 27°C.

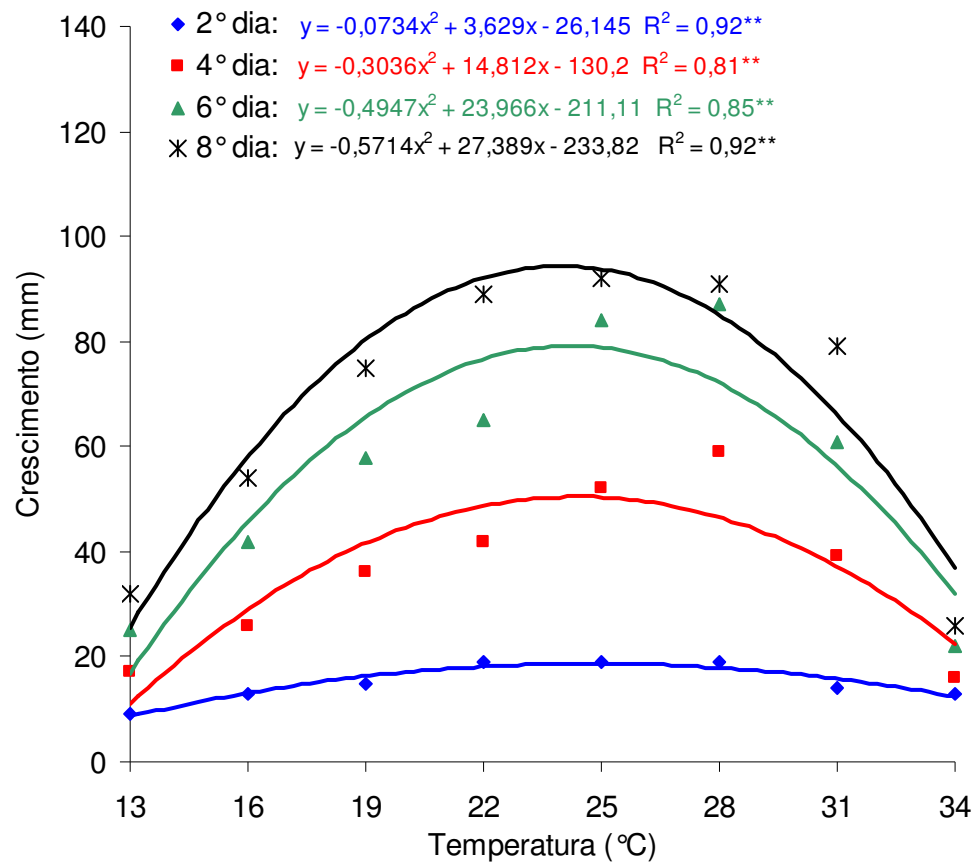


Figura 2 - Crescimento de *Bipolaris euphorbiae* após cultivo por oito dias em diferentes valores de temperatura.