

FITOSSANIDADE

RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E GRÃOS COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *LECANICILLIUM LECANII* ⁽¹⁾

ANA CAROLINA RIBEIRO MACHADO ^(2,4); ANTONIO CARLOS MONTEIRO ^(3*);
DINALVA ALVES MOCHI ⁽²⁾; LUCIANA YOSHIDA ⁽²⁾

RESUMO

Lecanicillium lecanii é um fungo promissor no controle biológico de pragas e para sua utilização em campo é necessária a produção de conídios em grande quantidade. Este trabalho objetivou selecionar meios de cultura líquidos feitos com resíduos ou subprodutos agroindustriais e meios sólidos pela mistura de grãos e derivados, visando à produção dos isolados JAB 02 e JAB 45 do fungo. Como substratos líquidos utilizaram-se, em diferentes concentrações, água do cozimento do arroz e da prensa da mandioca, soro de queijo, milhocina[®], melão, vinhaça e leite de levedura da indústria da cana, avaliando-se a esporulação e biomassa. Como substratos sólidos, combinaram-se, em diferentes proporções, trigo grosso, farelos de trigo e de soja com quirela de milho, lentilha e sorgo para JAB 02, e com painço, trigo em grão e lentilha para JAB 45, avaliando-se a produção e viabilidade de conídios. O meio contendo 4% de milhocina[®] favoreceu a produção de ambos os isolados. Para JAB 02, proporcionaram melhores resultados os meios com 85% de água da prensa da mandioca, 5,5% de melão e 100% de soro de queijo, além de misturas entre trigo grosso e farelo de trigo com lentilha (70:30%) e trigo grosso e farelo de trigo com sorgo (85:15%). Os meios com 100% da água da prensa da mandioca e 85% de soro de queijo, e as misturas entre farelo de trigo e painço (85:15%), trigo grosso e lentilha (55:45%) e farelo de trigo com trigo em grão e com lentilha (70:30%) favoreceram a produção de JAB 45.

Palavras-chave: controle biológico, produção massal, substratos líquidos, substratos sólidos.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 15 de abril de 2008 e aceito em 20 de março de 2009.

⁽²⁾ Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal (SP), Brasil. E-mail: biokarol@hotmail.com

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

⁽⁴⁾ Bolsista CAPES.

ABSTRACT

GRAINS AND AGROINDUSTRIAL RESIDUES AND BY-PRODUCTS AS SUBSTRATES FOR PRODUCTION OF THE *LECANICILLIUM LECANII* ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS

Lecanicillium lecanii is a fungus that shows much promise as a biological control agent against plague. To explore this possibility in field conditions conidia would have to be produced in large scale. With this aim, the present study selected substrates that could be used as media for cultivating isolates JAB 02 and JAB 45 from this fungus. Liquid media prepared with agro industrial by-products and residue, and solid media using mixtures of grain and derivatives were tested. For liquid media different concentrations of water obtained from cooking rice and from squeezing dry cassava root, besides cheese whey, milhocina[®], sugar cane molasses, vinasse and cream yeast from sugar cane milling, were assessed regarding spore production and biomass. Considering solid media, ground wheat, wheat and soy brans with broken corn, lentil seed and sorghum were all combined in different proportions for JAB 02, and with millet seed, wheat grain and lentil seed for JAB 45. These were assessed regarding conidia productivity and viability. The medium containing 4% milhocina[®] promoted good productivity from both isolates. Regarding JAB 02, the substrates containing 85% water from the squeezed cassava, 5,5% of molasses and 100% cheese whey, besides the mixtures of ground wheat and wheat bran with lentil seed (70:30%) and ground wheat and wheat bran with sorghum (85:15%) produced the best results. The media containing 100% water from the squeezed cassava with 85% cheese whey; and the mixtures of wheat bran plus millet seed (85:15%); ground wheat and lentil seed (55:45%); and wheat bran with wheat grain plus with lentil seed (70:30%) favored productivity in the JAB 45 isolate.

Key words: biological control, mass production, liquid substrates, solid substrates.

1. INTRODUÇÃO

O controle microbiano de insetos vem ganhando cada vez mais importância por tratar da utilização racional dos patógenos visando à manutenção da população de pragas em níveis não econômicos de danos (ALVES, 1998). Além disso, torna-se cada vez mais oportuno sua adoção, uma vez que o uso indiscriminado de inseticidas químicos gera como consequências a resistência de insetos, a ressurgência e o ataque de pragas antes tidas como secundárias, desequilíbrios biológicos e efeitos prejudiciais ao homem, insetos úteis e outros organismos, além de resíduos nos alimentos, água e solo (PARRA et al., 2002).

Neste contexto, os fungos entomopatogênicos têm progressivamente despertado a atenção, como no caso da espécie *Lecanicillium lecanii* considerada uma das mais promissoras no controle biológico de pragas na agricultura (LECUONA e RIBA, 1991), por possuir ampla gama de hospedeiros, que incluem insetos, ácaros e fungos fitopatogênicos (HALL, 1981). No entanto, para serem utilizados como bioinseticidas, os fungos precisam estar disponíveis em grandes quantidades (ALVES e PEREIRA, 1998; OLIVEIRA, 2000).

Novas metodologias de produção, seleção de substratos abundantes de simples composição e baixo custo, além do conhecimento das condições adequadas de cultivo, como temperatura, pH, luminosidade entre outros, são fatores que devem ser considerados para a utilização de fungos, em larga escala, no controle de pragas.

Visando à redução de custos e obtenção de grandes quantidades de propágulos viáveis, substratos naturais, tais como pão, quirela de milho, trigo em grão (EL DAMIR, 2006), farinha de tapioca, batata doce, extratos de abóbora e mamão (IBRAHIM e LOW, 1993), mistura de farelo e casca de arroz, cevada (DORTA et al., 1990; NELSON, et al., 1996), entre outros, vêm apresentando resultados promissores para produção de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Para produção de *L. lecanii*, meios de cultura compostos de arroz e farelo de arroz (FENG et al., 2002), além de farelo de trigo, polpa de beterraba e a mistura de ambos como suplementação ao meio de Sabouraud, foram utilizados na expectativa de incrementar a esporulação (GRAJEK, 1994). WENZEL et al (2006) avaliaram diversos substratos líquidos e sólidos obtidos de grãos, verificando 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.

Estudos sobre a produção de *L. lecanii* ainda são escassos no Brasil, justificando-se novas investigações para estabelecer os meios e métodos adequados visando à produção do fungo nas condições locais. Entre os métodos de produção destaca-se o cultivo bifásico, que combina o benefício da alta produção de biomassa em meio líquido com a posterior produção de conídios em meios sólidos (JENKINS e GOETTEL, 1997).

Este trabalho teve como objetivos testar diversos substratos líquidos elaborados com resíduos ou subprodutos da agroindústria, avaliar diferentes misturas entre substratos sólidos obtidos de grãos, buscando otimizar o crescimento do fungo com adequada produção e viabilidade de conídios, e ainda, selecionar meios para a produção bifásica do fungo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV/UNESP, Jaboticabal (SP) e, originalmente, obtidos da cochonilha verde *Coccus viridis* Green (Hemiptera: Coccidae) coletados em pomares de laranja nos municípios de Ubirajara e São Carlos (SP) respectivamente (BARBOSA et al., 2002).

Os isolados permaneceram armazenados em tubos de ensaio contendo meio de batata, dextrose e ágar (BDA) e acondicionados a 4 °C em geladeira. Para utilização nos ensaios foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, incubados em estufa a 25 ± 0,5 °C, durante 15 dias, com ausência de iluminação.

Utilizaram-se substratos considerados resíduos ou subprodutos da agroindústria em diferentes concentrações (%), obtidas pela diluição destes em água destilada, como segue: água do cozimento do arroz (55%; 70%; 85%; 100%), melaço de cana-de-açúcar (1%; 2,5%; 4%; 5,5%), vinhaça de cana-de-açúcar (55%; 70%; 85%; 100%), leite de levedura da indústria da cana-de-açúcar (10%; 25%; 40%; 55%), água de prensa da mandioca (55%; 70%; 85%; 100%), soro obtido na fabricação de queijo fresco (55%; 70%; 85%; 100%), milhocina® (0,5%; 1%; 2,5%; 4%). A água do cozimento do arroz foi considerada um resíduo produzido por biofábricas destinadas a produção massal de *M. anisopliae* e *B. bassiana* no Brasil. Como padrão de comparação, utilizaram-se os meios obtidos de soja em grão e farelo de trigo, conforme WENZEL et al. (2006).

Os meios preparados com arroz e farelo de trigo foram cozidos em fogão, na quantidade de 100 g de arroz e 50 g de farelo de trigo em 1.000 mL de água destilada fervente, por 5 e 20 minutos respectivamente. O meio obtido da soja em grão foi preparado cozinhando-se, em autoclave a 121 °C, 100 g do grão em 1.000 mL de água destilada, por 20 minutos, segundo metodologia proposta por WENZEL et al. (2006). Após o cozimento, a soja foi triturada em liquidificador e assim como para os outros substratos descritos anteriormente, foram filtrados em panos de algodão para a retirada das partes grosseiras.

Aos meios preparados com água de cozimento do arroz, vinhaça e leite de levedura adicionou-se 0,5% de dextrose; aos de milhocina® e soja, 1% de dextrose e ao meio feito a partir de farelo de trigo, 1% de sacarose. Todos os meios foram acrescidos de 250 mg L⁻¹ de cloranfenicol para evitar recontaminação bacteriana durante o período de incubação.

O pH de cada meio foi ajustado para 6,5 utilizando soluções de NaOH (3N) ou HCl (1N). Os meios, em quantidades de 100 mL, foram distribuídos em 6 frascos erlenmeyers com capacidade de 250 mL, vedados com tampão de algodão e papel alumínio e, posteriormente, autoclavados a 121 °C e 1 kgf cm⁻² por 20 minutos.

A escolha dos substratos foi baseada nos resultados observados por WENZEL et al. (2006), com os mesmos isolados do fungo. Utilizaram-se os substratos que proporcionaram os melhores resultados de esporulação para ambos os isolados, ou seja, trigo grosso (moído), farelo de trigo e farelo de soja, e aqueles que favoreceram a viabilidade, os quais foram, para JAB 02, sorgo em grão, quirela de milho e lentilha, e para JAB 45, trigo em grão, painço e lentilha. Os substratos que promoveram melhor esporulação e melhor viabilidade de conídios de cada isolado, foram misturados nas proporções de 85%:15%, 70%:30% e 55%:45%, usando-se o substrato que favoreceu a esporulação sempre em maior proporção. As misturas entre os substratos, nas diferentes proporções, assim como cada substrato isoladamente (100%:0% e 0%:100%) (controles) constituíram os tratamentos do ensaio.

Os substratos foram preparados separadamente segundo metodologia proposta por PENARIOL et al. (2008). Assim, trigo grosso, farelo de trigo, farelo de soja e quirela de milho foram embebidos em água destilada na proporção de 3:1 (v p⁻¹), durante 15 minutos. Os grãos de sorgo, lentilha, painço e trigo foram cozidos em água destilada fervente (3:1, v p⁻¹) por 5 minutos em fogo brando. Em seguida, todos os substratos foram coados para remoção do excesso de água e preparadas as devidas misturas, em peso úmido (g g⁻¹).

Os meios foram colocados em frascos erlenmeyers com capacidade para 250 mL, vedados com tampão de algodão e recobertos com papel alumínio. O volume do frasco ocupado pelas misturas foi arbitrariamente padronizado em 60%, em função da natureza e características dos substratos utilizados, sendo, posteriormente, vedados e autoclavados a 121 °C e 1 kgf cm⁻² por 40 minutos.

A inoculação foi realizada transferindo-se, com auxílio de agulha de níquel-cromo, 3 e 4 discos de 8 mm de diâmetro retirados de colônias do fungo crescidas em BDA por 15 dias, para os meios líquidos e sólidos respectivamente. Os frascos foram mantidos em estufa a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 dias no ensaio com meios líquidos e 15 dias no ensaio com meios sólidos, na ausência de iluminação.

Em ambos os ensaios, avaliaram-se a produção de conídios, além da biomassa micelial nos meios líquidos e a viabilidade de conídios nos sólidos.

Para determinar a produção de conídios, a massa micelial formada nos meios líquidos foi triturada em *mixer* vertical SB 40, marca Black & Decker®, por 3 segundos, para desagregação do micélio. Em seguida, o meio foi vigorosamente agitado por 3 minutos utilizando-se 20 g de pérolas de vidro para remoção dos conídios. O material foi então coado em peneira com malha de 1 mm e 1 mL do meio líquido foi transferido para tubo contendo 9 mL de uma mistura, na proporção 1:1, de solução salina (NaCl a 0,89% p v⁻¹) e solução Tween 80® (0,1% v v⁻¹).

No ensaio com meios sólidos, foram coletadas nos erlenmeyers 10 amostras do substrato com o fungo crescido de modo que totalizasse 1 g. Este material foi suspenso em 9 mL de solução salina + Tween (1:1) e vigorosamente agitado em agitador elétrico de tubos para remoção dos conídios, sendo em seguida coado em tecido *voil* para remoção da parte sólida. As suspensões preparadas, em ambos os ensaios, foram agitadas vigorosamente e o número de conídios determinado com auxílio de câmara de Neubauer. Tais suspensões foram também usadas para avaliação da viabilidade dos conídios, no ensaio com meios sólidos, conforme MARQUES et al. (2004).

Para determinação da biomassa fúngica formada nos meios líquidos, a massa micelial foi filtrada em funil de Büchner sob vácuo e em seguida mantida em estufa a 60 °C, até massa constante e então pesada em balança analítica para avaliação da massa seca do micélio.

Ambos os ensaios foram realizados no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, a 1% de probabilidade, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Na análise de variância dos dados obtidos no ensaio com meios líquidos, analisou-se o efeito de dois fatores: meio de cultura e concentração dentro dos meios. Para o ensaio com meios sólidos os dados foram analisados no esquema fatorial composto por três substratos usados em maior proporção, três usados em menor proporção e cinco proporções.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de *L. lecanii* em meios líquidos

Para JAB 02, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) na produção de conídios, quando se comparou o conjunto dos meios líquidos com o controle (meio preparado a partir de soja em grão), embora, individualmente em alguns meios tenha se notado média com maior valor numérico. Entre estes, a maior produção de conídios foi obtida utilizando-se água da prensa da mandioca, não havendo diferença significativa entre as concentrações testadas deste substrato. Nos meios preparados com melaço de cana-de-açúcar e milhocina®, a produção foi, em média, menor que a obtida com o substrato anterior, mas o meio preparado à base de 5,5% de melaço foi aquele com maior valor ($2,87 \times 10^6$ con. mL⁻¹) referente à produção de conídios pelo isolado JAB 02, não diferindo estatisticamente do obtido na concentração de 4,0%. O meio preparado com 4,0% de milhocina® também proporcionou resultado promissor para este parâmetro (Tabela 1).

A biomassa formada por este mesmo isolado, no conjunto dos meios testados, foi maior ($P > 0,01$) que a obtida no controle, destacando-se os meios preparados com água da prensa da mandioca e soro de queijo, nos quais a biomassa produzida foi 5 e 4,7 vezes maior que a obtida no controle respectivamente. A maior produção de biomassa foi obtida no meio preparado com 85% de água da prensa da mandioca (2,13 g 100 mL de meio⁻¹), não diferindo da concentração de 100% (1,66 g 100 mL de meio⁻¹). Entre as concentrações testadas de soro de queijo, as que proporcionaram maior produção de biomassa foram de 70, 85 e 100% (Tabela 1).

Pelo resultado das análises referentes ao isolado JAB 45 (Tabela 1), verificou-se que a produção de conídios obtida no controle (meio preparado a partir de farelo de trigo) foi 6,85 vezes maior do que a média obtida nos meios líquidos em conjunto. No entanto, comparando-se o controle com a média individual obtida nos meios preparados com água da prensa da mandioca e milhocina®, principalmente em algumas concentrações testadas, observa-se que a diferença na produção de conídios foi menor, sendo de apenas 1,58 e 1,02 vezes para os meios contendo 100% de água da prensa da mandioca e 4,0% de milhocina® respectivamente. Entre as concentrações testadas de água da prensa da mandioca, não houve diferença significativa quanto à produção de conídios, e entre os meios à base de milhocina®, apenas na concentração de 0,5%, observou-se resultado menor.

Tabela 1. Produção de conídios e biomassa micelial formada pelos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* em meios líquidos preparados a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais usados em diversas concentrações, após 20 dias de cultivo a 25 °C e ausência de iluminação

Tratamentos	JAB 02		JAB 45		
	N.º de conídios x 10 ⁵ con. mL ⁻¹	Biomassa g 100 mL ⁻¹	N.º de conídios x 10 ⁵ con. mL ⁻¹	Biomassa g 100 mL ⁻¹	
Controle (1, 2)	3,60 a	0,31 b	116,66 a	0,81 a	
Meios líquidos	5,84 a	0,58 a	17,03 b	0,86 a	
Teste F	1,24 ^{NS}	33,06**	58,65**	0,26 ^{NS}	
Meios líquidos					
Água do cozimento do arroz	0,00 d	0,18 d	0,91 d	0,23 c	
Vinhaça	0,00 d	0,29 d	2,00 cd	0,57 bc	
Leite de levedura	1,00 c	0,30 d	7,33 b	0,70 b	
Soro de queijo	2,00 c	1,46 b	4,33 bc	1,55 a	
Água da prensa da mandioca	18,08 a	1,55 a	41,16 a	1,49 a	
Melaço de cana-de-açúcar	11,77 b	0,64 c	4,58 bcd	0,83 b	
Milhocina®	8,07 b	0,56 c	55,90 a	0,67 b	
Teste F	83,84**	146,43**	42,47**	90,09**	
Concentração dentro de meio					
Água do cozimento do arroz	55%	0,00 a	0,10 a	0,33 a	0,18 a
	70%	0,00 a	0,10 a	0,00 a	0,26 a
	85%	0,00 a	0,18 a	0,66 a	0,26 a
	100%	0,00 a	0,32 a	2,66 a	0,20 a
Vinhaça	55%	0,00 a	0,47 a	1,33 a	0,46 a
	70%	0,00 a	0,25 a	0,33 a	0,48 a
	85%	0,00 a	0,30 a	2,66 a	0,58 a
	100%	0,00 a	0,14 a	3,66 a	0,74 a
Leite de levedura	10%	1,00 a	0,15 a	1,33 a	0,34 b
	25%	1,33 a	0,27 a	5,33 a	0,51 b
	40%	1,00 a	0,29 a	9,33 a	0,76 ab
	55%	0,66 a	0,51 a	13,33 a	1,20 a
Soro de queijo	55%	2,00 a	1,08 b	3,33 a	1,22 a
	70%	1,00 a	1,69 a	3,00 a	1,62 a
	85%	2,33 a	1,54 ab	5,33 a	1,75 a
	100%	2,66 a	1,54 ab	5,66 a	1,59 a
Água da prensa da mandioca	55%	13,83 a	1,04 c	26,33 a	1,00 b
	70%	17,66 a	1,40 bc	42,00 a	1,26 b
	85%	21,00 a	2,13 a	34,66 a	1,62 ab
	100%	19,83 a	1,66 ab	73,66 a	2,08 a
Melaço de cana-de-açúcar	1,0%	2,72 c	0,47 a	0,23 a	0,35 b
	2,5%	4,80 bc	0,59 a	2,63 a	0,71 ab
	4,0%	10,87 ab	0,65 a	4,13 a	0,93 ab
	5,5%	28,73 a	0,84 a	11,33 a	1,35 a
Milhocina®	0,5%	0,90 c	0,35 a	3,10 b	0,51 a
	1,0%	2,83 bc	0,42 a	35,23 ab	0,53 a
	2,0%	7,44ab	0,67 a	70,96 a	0,75 a
	4,0%	21,13 a	0,82 a	114,33 a	0,91 a
Teste F	-	5,97**	6,58**	4,13**	8,74**
CV (%)	-	34,41	22,05	35,55	20,50

(¹) Meio líquido preparado a partir de soja em grão, para JAB 02. (²) Meio preparado a partir de farelo de trigo, para JAB 45. Médias originais, mas análise de variância realizada com dados transformados em log (x+1). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05)

NS= não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade.

Para a produção de biomassa micelial, verificou-se que apesar de não ter havido diferença significativa entre a média do controle e dos meios líquidos em conjunto, os meios preparados com soro de queijo e água da prensa da mandioca destacaram-se, individualmente, com valores em média de 1,9 e 1,8 vezes maiores que o controle respectivamente. Entre as concentrações testadas do meio feito com soro de queijo, não se observou diferença significativa quanto à produção de biomassa, mas a concentração de 85% pode ser destacada como a mais promissora, fato que também pode ser considerado para o meio preparado com 100% de água da prensa da mandioca.

Para seleção dos substratos e respectivas concentrações adequadas à produção do fungo em um sistema bifásico, foi levado em consideração a análise conjunta dos dois parâmetros avaliados: produção de conídios e biomassa. Quando a análise estatística não identificou diferença significativa entre os tratamentos, considerou-se o maior valor numérico das médias.

Assim, para o isolado JAB 02, optou-se por escolher os meios líquidos à base de 85% de água da prensa da mandioca, 5,5% de melaço de cana-de-açúcar e 4% de milhocina[®]. Em relação ao meio preparado com soro de queijo, as concentrações de 70% e 100% foram as que proporcionaram maiores valores de produção, respectivamente, de biomassa e de conídios. Contudo, observa-se que no meio contendo 70% de soro de queijo, a produção de biomassa foi 1,1 vez maior que no meio contendo 100% deste, mas a produção de conídios foi 2,6 vezes menor, o que motivou a escolha da concentração de 100% como a mais adequada. Para JAB 45, os meios à base de 85% de soro de queijo, 100% de água da prensa da mandioca e 4,0% de milhocina[®], foram escolhidos para a produção do isolado (Tabela 1).

Os resultados observados neste trabalho referente à produção dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *L. lecanii*, obtidos em cultura líquida estacionária, utilizando resíduos ou subprodutos agroindustriais, estão de acordo com as afirmações de ROBERTS e HUMBER (1981) e ALVES e PEREIRA (1998), quando relatam o fato que a maioria dos hifomicetos entomopatogênicos não esporulam rapidamente em cultura líquida, obtendo-se grande massa micelial.

Entretanto, a produção de conídios pode ser incrementada, usando substratos sintéticos e agitação constante. Utilizando meio líquido composto por maltose, extrato de levedura e peptona, FENG et al. (2002) verificaram que o isolado F091 de *Verticillium lecanii* (= *L. lecanii*) produziu $1,2 \times 10^{10}$ conídios mL⁻¹ em cultura agitada a 150 rpm por sete dias. Em outro trabalho, esses autores avaliaram o efeito da aeração superficial, verificando que nesta condição o isolado cresceu abundantemente, mas ressaltaram que o efeito deste processo no crescimento é bastante complexo (FENG et al, 2000). A esporulação do fungo *M. anisopliae* em meios

líquidos de arroz parboilizado, extrato de levedura e extrato do percevejo da soja, suplementados com diferentes concentrações de açúcar, somente ocorreu quando a biomassa foi submetida à aeração direta, atingindo 10^7 conídios por grama de substrato (PEREIRA e EIRA, 1999). Formas mais facilmente assimiláveis de nutrientes e disponibilidade de oxigênio podem explicar a maior produção de conídios obtida nesses trabalhos.

WENZEL et al. (2006) avaliaram a esporulação de *L. lecanii* em meios líquidos feitos a partir de grãos. Os melhores resultados foram obtidos nos meios preparados com feijão-branco, feijão-carioca e soja, para o isolado JAB 02 e lentilha, feijão-carioca e farelo de trigo, para JAB 45. Comparando-se com os resultados deste trabalho, verifica-se que a produção de conídios pelos isolados JAB 45 e JAB 02 no meio preparado com 4% de milhocina[®] foi, respectivamente, em média, 2,3 e 1,5 vezes maior que os melhores resultados observados por estes últimos autores.

Os meios líquidos compostos por vinhaça e água do cozimento do arroz foram os que proporcionaram os piores resultados para a produção de conídios e biomassa pelos isolados JAB 02 e JAB 45 (Tabela 1), resultado semelhante ao obtido para *Bipolaris euphorbiae* em meio líquido preparado à base de vinhaça (PENARIOL et al., 2008) e para os mesmos isolados de *L. lecanii* cultivados em meios líquidos obtidos de farelo de arroz e arroz agulhinha (WENZEL et al., 2006). PENARIOL et al. (2008) testaram a água da prensa da mandioca para produção de *B. euphorbiae*, mas, diferentemente do ocorrido para *L. lecanii* neste trabalho, não obtiveram bom resultado. Contudo, os autores optaram por manter o pH original do meio, sem ajuste, o que pode ter contribuído para tal resultado.

WENZEL et al. (2005) verificaram que o isolado JAB 02 de *L. lecanii* produziu maior biomassa micelial em meio líquido contendo 60 g de dextrose e 40 g de extrato de levedura, atingindo valor de 0,15 g 30 mL de meio⁻¹ em 6 dias (média de 0,03 g dia⁻¹), enquanto neste trabalho o mesmo isolado cultivado por 20 dias no meio contendo 85% de água da prensa da mandioca produziu 2,13 g 100 mL⁻¹ (média de 0,11 g dia⁻¹).

Produção de *L. lecanii* em meios sólidos combinados

Examinando-se os dados contidos na tabela 2, verificou-se que farelo de trigo e lentilha, usados, respectivamente, em maior e menor proporção, foram os substratos que mais favoreceram a produção de conídios para ambos os isolados, além de trigo grosso (usado em maior proporção) e sorgo (usado em menor proporção) para JAB 02. Observou-se ainda, que o tipo de substrato não influenciou a viabilidade dos conídios produzidos pelos isolados, exceto farelo de trigo para JAB 45.

Tabela 2. Produção e viabilidade de conídios dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* cultivados em meios sólidos elaborados com diferentes misturas entre substratos, em diversas proporções

Substratos usados em maior proporção (A)	Produção		Viabilidade %
	JAB 02	JAB 45	
Trigo grosso	1,42 A	3,07 B	JAB 02 99,18 A
Farelo de Trigo	1,36 A	4,45 A	98,99 A
Farelo de Soja	0,38 B	0,96 C	99,00 A
Teste F	100,27**	142,01**	0,95 ^{NS}
DMS	0,1135	0,0951	0,6620
Substratos usados em menor proporção (B)			
Trigo em grão	-	3,13 C	-
Painço	-	2,37 B	-
Sorgo	1,12 A	-	99,16 A
Quirela de milho	0,89 B	-	99,08 A
Lentilha	1,16 A	2,98 A	98,93 A
Teste F	27,77 **	25,48**	2,58 ^{NS}
DMS	0,1135	0,0951	0,6620
Proporções entre os substratos (C)			
100% - 0%	0,87 A	2,51 B	99,11 B
85% - 15%	1,34 A	3,47 AB	98,94 B
70% - 30%	1,37 A	4,12 A	99,15 AB
55% - 45%	1,28 A	3,06 AB	99,43 A
0% - 100%	0,43 B	0,98 C	98,66 C
Teste F	43,94 **	41,86**	14,19**
DMS	0,1709	0,1432	0,9970
Interações			
A x B	2,92 *	8,22**	7,53**
A x C	11,09 **	9,55**	4,11**
B x C	15,18 **	11,44**	4,03**
A x B x C	3,20 **	2,23**	3,41**
CV (%)	3,87	3,03	1,80
			1,94

Médias com valores originais, mas análise estatística da produção de conídios e viabilidade realizadas com dados transformados em $\log(x)+7$ e $\arcsen(x/100)$, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P>0,05$). NS = não significativo; ** significativo a 1% de probabilidade. CV(%) = coeficiente de variação.

Determinar as misturas mais eficientes entre os substratos e suas respectivas proporções foram os objetivos deste experimento. O desdobramento da interação substratos usados em maior proporção (A) versus substratos usados em menor proporção (B) significativa para a produção de conídios de ambos os isolados de *L. lecanii*, está apresentada na tabela 3. Para JAB 02, as misturas de substratos que mais promoveram a esporulação foram as seguintes: entre trigo grosso e sorgo, trigo grosso e lentilha, farelo de trigo e sorgo e farelo de trigo e lentilha; para JAB 45 foram: entre trigo grosso e lentilha, e farelo de trigo misturado com todos os substratos utilizados em menor proporção. Definidas as misturas mais eficientes, foi realizada uma análise destinada a determinar as proporções mais adequadas para promover a esporulação dos isolados (Tabelas 4 e 5).

Para JAB 02, apesar de não ter havido diferença significativa na produção de conídios obtida nas três proporções (85:15%, 70:30% e 55:45%), optou-se por escolher aquelas que tiveram maior valor numérico. Assim, 85% de trigo grosso e 15% de sorgo, 70% de trigo grosso e 30% de lentilha, 85% de farelo de trigo e 15% de sorgo e 70% de farelo de trigo e 30% de lentilha, podem ser indicadas para a produção do isolado JAB 02 (Tabela 4).

Analisando a produção de conídios pelo isolado JAB 45, verificou-se que, exceto na mistura

entre farelo de trigo e painço, não houve diferença significativa entre as três proporções testadas, e entre estas e o tratamento contendo o substrato usado em maior proporção (100%-0) (Tabela 5). Destacaram-se, portanto, as misturas compostas por 55% de trigo grosso e 45% de lentilha, 70% de farelo de trigo e 30% de trigo em grão, 85% de farelo de trigo e 15% de painço e 70% de farelo de trigo e 30% de lentilha.

Segundo ALVES e PEREIRA (1998), o uso de meios sólidos representa a forma mais comum de produção de fungos entomopatogênicos, uma vez que não necessita de tecnologia aprimorada e permite a produção direta de unidades infectivas. EL DAMIR (2006) destacou que o tipo de substrato é importante para a produção massal de fungos, uma vez que está diretamente relacionado com os custos e a qualidade dos propágulos produzidos.

Em trabalhos realizados para demonstrar a produção de conídios por isolados de *L. lecanii* em meio sólido composto por arroz em grão, constataram-se resultados divergentes, variando desde $6,8 \times 10^6$ con. g^{-1} (RIVERA et al., 1998), a $2,10$ e $0,80 \times 10^7$ con. g^{-1} (WENZEL et al., 2006), chegando a até $1,5 \times 10^9$ con. g^{-1} de substrato (FENG et al., 2002). Possivelmente, as diferenças verificadas sejam em consequência dos isolados utilizados, das metodologias empregadas e até mesmo da procedência dos substratos.

Tabela 3. Desdobramento da interação substratos usados em maior proporção versus substratos usados em menor proporção para a produção de conídios dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* em meios sólidos

Substratos usados em maior proporção	Substratos usados em menor proporção			Teste F
	Sorgo	Quirela de milho	Lentilha	
n.º de conídios x 10 ⁷ g ⁻¹				
JAB 02				
Trigo Grosso	1,25 Aa	1,15 Ba	1,87 Aa	9,99**
Farelo de Trigo	1,71 Aa	1,27 Ba	1,12 ABa	5,97**
Farelo de Soja	0,40 Ab	0,27 Bb	0,48 Ab	17,65**
Teste F	34,50**	47,44**	24,18**	-
n.º de conídios x 10 ⁷ g ⁻¹				
	Trigo em grão	Painço	Lentilha	Teste F
JAB 45				
Trigo Grosso	2,74 Bb	2,69 Ba	3,78 Aa	10,25**
Farelo de Trigo	6,27 Aa	3,38 Aa	3,72 Aa	0,55 ^{NS}
Farelo de Soja	0,39 Cc	1,03 Bb	1,45 Ab	31,16**
Teste F	99,16**	33,91**	25,40**	-

Médias com valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em $\log(x)+7$. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha ou minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P>0,05$). NS = não significativo. ** significativo a 1% de probabilidade

Tabela 4. Produção de conídios pelo isolado JAB 02 de *Lecanicillium lecanii* em função das proporções usadas nos tratamentos mais eficientes, após 15 dias de cultivo a 25°C e na ausência de iluminação

Substratos (misturas)	Proporção	Produção de conídios n.º de conídios x 10 ⁷ g ⁻¹
Trigo Grosso (TG) e Sorgo (S)	100% TG + 0% S	1,01 AB
	85% TG + 15% S	2,03 A
	70% TG + 30% S	1,30 A
	55% TG + 30% S	1,55 A
	0% TG + 100% S	0,39 B
Teste F	-	8,26**
CV (%)	-	2,84
Trigo Grosso (TG) e Lentilha (L)	100% TG + 0% L	1,01 B
	85% TG + 15% L	1,67 AB
	70% TG + 30% L	4,21 A
	55% TG + 45% L	1,60 AB
	0% TG + 100% L	0,85 B
Teste F	-	5,16**
CV (%)	-	4,22
Farelo de Trigo (FT) e Sorgo (S)	100% FT + 0% S	1,25 AB
	85% FT + 15% S	2,62 A
	70% FT + 30% S	1,79 A
	55% FT + 45% S	2,50 A
	0% FT + 100% S	0,39 B
Teste F	-	9,70**
CV (%)	-	3,14
Farelo de Trigo (FT) e Lentilha (L)	100% FT + 0% L	1,25 A
	85% FT + 15% L	1,27 A
	70% FT + 30% L	1,42 A
	55% FT + 45% L	0,82 A
	0% FT + 100% L	0,82 A
Teste F	-	0,90 ^{NS}
CV (%)	-	4,76

Médias com valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05).

** significativo a 1% de probabilidade. NS = não significativo.

Apesar de o arroz ainda ser o substrato mais utilizado na produção de fungos, outros grãos e seus derivados vêm sendo testados, na expectativa de otimizar o processo. Avaliando a produção de *M. anisopliae*, DORTA et al. (1990) verificaram que em meio contendo uma mistura de farelo e casca de arroz, o fungo produziu de 5 a 15 vezes mais conídios do que em meio contendo apenas arroz. PUZARI et al. (1997), obtiveram o rendimento de 39,3 x 10⁷ conídios mL⁻¹ de água usada para avaliar a produção de *B. bassiana* em meio contendo uma mistura de casca de arroz, serragem e arroz, na razão de 75:21:100. É possível

que em meios preparados a partir da mistura de diferentes substratos, possa haver uma complementação de nutrientes exigidos pelos fungos.

PENARIOL et al. (2008) avaliaram diferentes substratos sólidos para produção de *B. euphorbiae*, obtendo melhores resultados em meios contendo casca de soja e sorgo em grão. Para os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, substratos como quirela de milho, trigo em grão e painço, em diferentes volumes de água, proporcionaram, de modo geral, grande produção de conídios (EL DAMIR, 2006).

Tabela 5. Produção de conídios pelo isolado JAB 45 de *Lecanicillium lecanii* em função das proporções usadas nos tratamentos mais eficientes, após 15 dias de cultivo a 25°C e na ausência de iluminação

Substratos (misturas)	Proporção	Produção de conídios n.º de conídios x 10 ⁷ g ⁻¹
Trigo Grosso (TG) e Lentilha (L)	100% TG + 0% L	3,28 A
	85% TG + 15% L	3,70 A
	70% TG + 30% L	4,95 A
	55% TG + 45% L	5,07 A
	0% TG + 100% L	1,91 A
Teste F	-	3,21*
CV (%)	-	2,65
Farelo de Trigo (FT) e Trigo em grão (Tg)	100% FT + 0% Tg	3,66 A
	85% FT + 15% Tg	9,08 A
	70% FT + 30% Tg	10,52 A
	55% FT + 45% Tg	7,70 A
	0% FT + 100% Tg	0,21 B
Teste F	-	24,45**
CV (%)	-	3,75
Farelo de Trigo (FT) e Painço (P)	100% FT + 0% P	3,66 AB
	85% FT + 15% P	5,62 A
	70% FT + 30% P	4,13 AB
	55% FT + 45% P	2,65 B
	0% FT + 100% P	0,82 C
Teste F	-	24,25**
CV (%)	-	1,76
Farelo de Trigo (FT) e Lentilha (L)	100% FT + 0% L	3,66 A
	85% FT + 15% L	3,50 A
	70% FT + 30% L	5,47 A
	55% FT + 45% L	4,81 A
	0% FT + 100% L	1,91 A
Teste F	-	1,66 ^{NS}
CV (%)	-	3,04

Médias com valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (P>0,05).

** . * = significativo a 1% e 5% de probabilidade respectivamente. NS: não significativo.

Avaliando a influência de substratos naturais sólidos na esporulação de isolados de *B. bassiana* e *P. fumosoroseus*, IBRAHIM e LOW (1993) observaram que a esporulação foi maior em meios contendo arroz, farinha de tapioca e batata doce, do que em meios contendo coco ralado e mamão papaia.

Na busca de substratos alternativos, WENZEL et al. (2006) obtiveram resultados promissores para produção de conídios de *L. lecanii* utilizando trigo moído e farelos de trigo e de soja. No presente trabalho, a mistura destes substratos com lentilha, sorgo, trigo

em grão e painço não proporcionou aumento significativo na produção de conídios. Entretanto, observou-se que a viabilidade dos conídios dos isolados JAB 45 e JAB 02, cultivados nos substratos combinados, atingiu, respectivamente, aumento médio de 21,94% e 23,30%, quando comparada com a viabilidade obtida no trabalho de WENZEL et al. (2006), utilizando os substratos isoladamente.

Do ponto de vista da produção comercial para utilização no controle biológico, a esporulação abundante e a viabilidade dos conídios são aspectos

importantes a serem considerados na seleção dos meios. Possivelmente, tais misturas entre substratos proporcionaram uma composição de nutrientes qualitativa e quantitativamente melhor equilibrada para permitir a conidiogênese.

4. CONCLUSÕES

1. Entre os meios líquidos, a água da prensa da mandioca, o soro de queijo, o melaço de cana-de-açúcar e a milhocina[®] são os substratos que proporcionam maior produção de conídios e biomassa por *L. lecanii*.

2. A concentração dos substratos usada para elaborar os meios líquidos influencia a produção de conídios e biomassa pelo fungo.

3. Os meios sólidos são mais eficientes do que os meios líquidos para a produção de conídios pelos isolados JAB 02 e JAB 45 de *L. lecanii*.

4. A mistura de substratos, em diferentes proporções, para a elaboração dos meios sólidos não influencia a produção de conídios por *L. lecanii*, mas promove incremento na viabilidade dos conídios.

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa à primeira autora.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: Esalq, 1998. p.289-382.
- 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.
- BARBOSA, C.C.; MONTEIRO, A.C.; CORREIA, A. do C.B.; PEREIRA, G.T. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.821-829, 2002.
- 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**, v.33, p.712-715, 1990.
- EL DAMIR, M. Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Biological Sciences**, Bombay, v.6, n.2, p.269-274, 2006.
- FENG, K.C.; LIU, B.L.; TZENG, Y.M. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.25-29, 2000.
- FENG, K.C.; LIU, B.L.; TZENG, Y.M. Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.217-224, 2002.
- GRAJEK, W. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. **Folia Microbiologica**, v.39, p.29-32, 1994.
- HALL, R.A. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p.483-498.
- IBRAHIM, Y.B.; LOW, W. Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*. **International Journal of Pest Management**, v.39, p.288-292, 1993.
- JENKINS, N.E.; GOETTEL, M.S. Methods for mass-production of microbial control agents for grasshoppers and locusts. In: GOETTEL, M.S.; JOHNSON, L. **Microbial control of grasshoppers and locusts**, v.171, p.37-48, 1997.
- LECUONA, R.E.; RIBA, G. Primeras etapas del ciclo de desarrollo de hongos entomopatógenos. Pergamino: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1991. 30p. (Boletín de Divulgación Tecnológica, 87)
- MARQUES, R.P.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações de óleo de nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v.34, p.1675-1680, 2004.
- NELSON, T.L.; LOW, L.; GLARE, T.R. Large scale production of New Zealand strain of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium sp.* In: CONFERENCE PROCEEDING. THE NEW ZEALAND PLANT PROTECTION SOCIETY INCORPORATED, 49., 1996, Hastings. **Proceedings...** Hastings: New Zealand Plant Protection Society, 1966. p.257-261.
- OLIVEIRA, S.M.C. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos**. 2000. 45f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle biológico: terminologia. In: **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p.1- 16.
- 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**, v.67, 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**, v.29, p.389-394, 1999.

PUZARI, K.C.; SARMAH, D.K.; HAZARIKA, L.K. Medium for mass production of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Journal of Biological Control**, v.11, p.97-100, 1997.

RIVERA, F.; VALDÉS, M.; MIER, T. Estudio preliminar sobre la obtención y conservación de propágulos de *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas. **Revista Mexicana de Micología**, v.14, p.33-36, 1998.

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

WENZEL, I.M.; ALMEIDA, J.E.M.; CARDOSO, E.R. Efeito de diferentes concentrações de dextrose e extrato de levedura no desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii* em fermentação líquida. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.127-131, 2005.

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