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

# REQUISITOS NUTRICIONAIS E PRODUÇÃO MASSAL de *Bipolaris euphorbiae*

**Mara Cristina Penariol**
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Junho de 2006

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

# REQUISITOS NUTRICIONAIS E PRODUÇÃO MASSAL de *Bipolaris euphorbiae*

**Mara Cristina Penariol**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli

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

Junho de 2006

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**MARA CRISTINA PENARIOL -** Filha de Auster Vitório Penariol e Lourdes Cerutti Penariol, nasceu em 27 de Abril de 1974, em Jaboticabal. Em 1997 iniciou o curso de Ciências Biológicas na Faculdade Barão de Mauá de Ribeirão Preto, concluindo em dezembro de 2001, recebendo o título de Bióloga. Em 2004 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, no Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal.

Este trabalho eu dedico às pessoas mais especiais de minha vida...

Meus pais, **Auster** e **Lourdes**, pelo amor, amizade, dedicação, exemplo de vida e por sempre acreditar em mim.

Meu marido, **Thiago**, por todo amor, carinho, estímulo e compreensão.

Aos meus irmãos, **Marisa e José**, pela amizade, carinho e pelo apoio e estímulo oferecidos esses anos.

Aos meus sobrinhos, **Amanda e João Vitor**, com todo meu carinho.

Aos meus cunhados, **Gustavo e Lucinara**, pela amizade e carinho.

A minha sogra **Fátima** e meu sogro **Benedito** pelo afeto e incentivo.

A todos meus familiares que direta ou indiretamente me apoiaram durante esta caminhada.

# Agradecimentos

A DEUS, em primeiro lugar, por todas oportunidades.

Ao professor Dr. Antonio Carlos Monteiro, pela oportunidade de aperfeiçoamento, apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao professor Dr. Robinson Antonio Pitelli, pelo estímulo e pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, pelo importante auxilio nas análises estatísticas.

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

Aos meus grandes amigos e companheiros, Dinalva Mochi, Luciana Yoshida , Ana Carolina R. Machado, Claudia Demétrio e Claudia Tofanelli, Elaine Vieira, Robinson Pitelli, Flávia Rezende, Angélica Pitelli e Alessandro, por todo o auxilio dado à condução deste trabalho.

À funcionária da Microbiologia Edna, pelo apoio e amizade em todos os momentos.

Ao Departamento de Microbiologia Agropecuária por todo auxilio dada a condução deste trabalho.

Aos amigos: Marcos Valério, Nancy Prette, Ana Maria Guideli, Karina, Manuela, Lucas Simi, Carime, Taís, Assis e Cíntia.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Aqueles que direta ou indiretamente, me ajudaram neste trabalho e com os quais tive o privilégio de conviver e trocar experiências.

# SUMÁRIO

Página

**LISTA DE TABELAS** ..... v

**RESUMO** ..... viii

**ABSTRACT** ..... x

**CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais** ..... 1

**1. INTRODUÇÃO** ..... 1

**2. REVISÃO DE LITERATURA** ..... 3

**2.1** Importância dos fungos patogênicos as plantas daninhas ..... 3

**2.2** Características nutricionais dos fungos fitopatogênicos ..... 4

**2.3** Produção massal do fitopatógeno ..... 5

**3. REFERÊNCIAS** ..... 7

**CAPÍTULO 2 – Desempenho de** *Bipolaris euphorbiae* **sob diferentes condições nutricionais do meio de cultivo** ..... 12

**RESUMO** ..... 12

**ABSTRACT** ..... 13

**1. INTRODUÇÃO** ..... 14

**2. MATERIAL E MÉTODOS** ..... 15

**2.1** Fontes de Carbono ..... 16

**2.2** Fontes de Nitrogênio ..... 17

**2.3** Fontes de Fósforo ..... 17

**2.4** Suplementação do meio de cultura ..... 17

**2.5** Análise estatística ..... 18

**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... 18

**4. CONCLUSÕES** ..... 25

**5. REFERÊNCIAS** ..... 26

Página

**CAPÍTULO 3 - Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios sólidos e líquidos obtidos de grão e resíduos da agroindústria** 30
**RESUMO** 30
**ABSTRACT** 31
**1. INTRODUÇÃO** 32
**2. MATERIAL E MÉTODOS** 33
**2.1** Fungo 33
**2.2** Produção em meios sólidos 34
**2.3** Produção em meios líquidos 35
**2.4** Inoculação, incubação e avaliação 37
**2.5** Análise estatística dos dados 39
**3. RESULTADOS E DISCUSSÃO** 39
**3.1** Produção em meios sólidos 39
**3.2** Produção em meios líquidos 43
**4. CONCLUSÕES** 46
**5. REFERÊNCIAS** 46

## LISTA DE TABELAS

Página

**Capítulo 2**

**Tabela 1.** Crescimento em diâmetro (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após cultivo por 21 dias a 27 °C e ausência de iluminação, em diferentes fontes de carbono 19
**Tabela 2.** Esporulação de *Bipolaris euphorbiae* após 21 dias de cultivo a 27 °C e ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes fontes de carbono 19

**Tabela 3**. Crescimento em diâmetro (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após cultivo por 21 dias a 27 °C e ausência de iluminação, em diferentes fontes de nitrogênio ..... 20

**Tabela 4.** Esporulação de *Bipolaris euphorbiae* após 21 dias de cultivo a 27°C em ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes fontes de nitrogênio ..... 21

**Tabela 5**. Crescimento em diâmetro (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após cultivo por 15 dias a 27 °C e ausência de iluminação, em diferentes fontes de fósforo ..... 22

**Tabela 6.** Esporulação de *Bipolaris euphorbiae* após 21 dias de cultivo a 27 °C em ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes fontes de fósforo ..... 23

**Tabela 7**. Crescimento em diâmetro (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após cultivo por 9 dias a 27 °C e ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes suplementos ..... 24

**Tabela 8.** Esporulação de *Bipolaris euphorbiae* após 21 dias de cultivo a 27 °C e ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes suplementos ..... 24

**Capítulo 3**

**Tabela 1.** Composição dos meios sólidos preparados a partir de grãos e resíduos agroindustriais ..... 35

**Tabela 2.** Substratos e açúcares utilizados para elaboração dos meios líquidos preparados a partir de grãos e resíduos da agroindústria ..... 36

**Tabela 3.** Composição dos meios líquidos preparados a partir de grãos e resíduos da agroindústria ..... 37

**Tabela 4-** Produção e viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* obtidos em meios sólidos preparados a partir de grãos e resíduos agroindustriais ..... 41

**Tabela 5.** Peso fresco e seco da raiz, caule e folhas de *Euphorbia heterophylla* obtidos sete dias após a inoculação com o fungo ..... 42

**Tabela 6.** Biomassa micelial, produção e viabilidade dos conídios de *Bipolaris euphorbiae* em diferentes meios líquidos ..... 43

**Tabela 7.** Peso fresco e seco das partes da planta que restaram 7 dias após a inoculação com o fungo ..... 45

**REQUISITOS NUTRICIONAIS E PRODUÇÃO MASSAL de** *Bipolaris euphorbiae*

**RESUMO –** Um dos grandes entraves para utilização a campo, de agentes de controle biológico de plantas daninhas reside na dificuldade de produção de inóculo em grande quantidade, sem perda de virulência. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes fontes de C, N, P e suplementos para o crescimento e esporulação do fungo *Bipolaris euphorbiae* e encontrar substratos naturais de baixo custo e fácil obtenção que permitam otimizar a produção massal do fungo. Foram avaliadas cinco fontes de carbono (glicose, amido, sacarose, lactose e maltose), cinco fontes inorgânicas de nitrogênio (nitrato de sódio, nitrato de amônio, sulfato de amônio, fosfato de amônio di-básico, cloreto de amônio), seis fontes de fósforo (fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio bi-básico, fosfato de cálcio, fosfato de sódio, ácido fosfórico e fosfato de amônio). Em seguida avaliou-se o efeito da suplementação do meio com fontes orgânicas de macro e micronutrientes e com vitaminas. A avaliação do desempenho do fungo foi baseada no crescimento radial das colônias e na produção de conídios por unidade de área de colônia. Com base dos resultados destes ensaios foram utilizados diversos substratos naturais, preferencialmente grãos (arroz, sorgo, trigo) ou resíduos agroindustriais (quirelas, farelos, cascas, bagaços e resíduos líquidos de processamento) com o objetivo de obter meios de cultura sólidos ou líquidos que permitam bom crescimento do fungo com alta esporulação, visando a produção massal para o controle biológico de plantas daninhas. O amido pode ser considerado a fonte de carbono mais apropriada para o fungo, pois promoveu crescimento significativamente maior com alta esporulação. O melhor desempenho de *B. euphorbiae* foi obtido usando nitrato de sódio e fosfato de potássio monobásico como fontes de nitrogênio e fósforo, respectivamente. A suplementação do meio com peptona e extrato de levedura incrementou o crescimento e esporulação do fungo. Nos meios sólidos a esporulação do fungo foi acentuadamente maior do que nos meios líquidos. Os meios sólidos feitos a partir de sorgo em grão ($474 \times 10^6$ conídios $g^{-1}$) e casca de soja ($472 \times 10^6$

conídios $g^{-1}$) se mostraram mais adequados para a produção de conídios, enquanto nos meio líquidos pode ser destacado o farelo de trigo que produziu 1,33 x $10^6$ conídios $mL^{-1}$ de meio. A utilização de diferentes substratos, assim como a elaboração de meios sólidos ou líquidos, não afetou a viabilidade dos conídios que na maioria dos tratamentos foi maior que 98%. Apenas nos meios sólidos de quirela de arroz, farelo de soja e casca de mandioca + farelo de soja, a viabilidade foi menor (85,10%,19,38%, e 1,02%, respectivamente) e no meio líquido de arroz cozido por 5 minutos, foi de 82,7%, mas não diferiu estatisticamente dos demais. A virulência do fungo também não foi afetada pela utilização de diferentes substratos e tipos de meios, sólidos ou líquidos.

**Palavras-chave**: controle biológico*,* controle de plantas daninhas, *Euphorbia heterophylla,* fisiologia de fungos, produção de fungos.

# NUTRICIONAL REQUIREMENTS AND CONIDIA MASSIVE PRODUCTION OF *Bipolaris euphorbiae*

**ABSTRACT** – One of the great problems of using biological control in field conditions relies on the difficulty of production of large quantities of inoculum, without loosing virulence. The objective of this work was to evaluate different sources of C, N, P and supplements for the growth and sporulation of *Bipolaris euphorbiae.* It is also an objective to find natural substrates with low cost and easly obtained that allows the optimization of the massive production of the fungus. In this experiment were evaluated five sources of carbon (glucose, starch, sucrose, lactose and maltose), five inorganic sources of nitrogen (sodium nitrate, ammonium nitrate, ammonium sulfate, dibasic ammonium phosphate, ammonium chloride) and six phosphorus sources (monobasic potassium phosphate, dibasic potassium phosphate, calcium phosphate, sodium phosphate, phosphoric acid and ammonium phosphate). Additionally was evaluated the effect of macro and micronutrients and vitamins by supplementing of culture media with organic sources. The evaluation was based on the radial growth of fungi colonies and on conidia production per area of colony. Based on the results of these experiments, several natural substrates were tested, preferentially grains (rice, sorghum, wheat) and residues of the agriculture industry (chopped corn, bagass and liquid residues of processing industry). The objective was to obtain solid or liquids culture media that allows good growth of the fungus with high sporulation, allowing massive production for the biological control of weeds. The starch can be considered the source of carbon more appropriate for the fungus, because it promoted significantly higher growth and sporulation. The best development of *B. euphorbiae* was obtained using sodium nitrate and monobasic potassium phosphate as nitrogen and phosphorus sources, respectively. The supplementation of the medium with peptone and yeast extract increased the growth and sporulation of the fungus. In the solid medium the sporulation of the fungus was greater than in the liquid media.

The solid media made from sorghum grain (474 x $10^6$ conidia $g^{-1}$) and soybean peel (472 x $10^6$ conidia $g^{-1}$) were more adequate for conidia production, while the wheat bran was more efficient in the liquid media producing 1,33 x $10^6$ conidia $mL^{-1}$ of medium. The utilization of different substrates, as well as the elaboration of solid or liquid media, didn't affect the viability of the conidia that were in most of the treatments greater than 98%. Just in solid media of chopped rice, soybean bran and cassava peel + soybean bran (85,10%,19,38%,61,02%, respectively) the viability was smaller, while in the rice liquid media (5 minutes cooking) it was of 82,7%, not differing statistically from the other media. The virulence of the fungus also was not affected by the use of different substrates and types of media, solid or liquid.

**Key words**: biological control, conidial production, *Euphorbia heterophylla*, fungus physiology, weeds,

# CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÃO GERAIS

## 1. INTRODUÇÃO

*Euphorbia heterophylla L.* é uma planta daninha, conhecida por outras sinonímias como *E. geniculata* Ort; *E. prunifolia* Jacq; *Poinsettia heterophylla* (L.) Klozsch e Garcke; *Poinsettia geniculata* Klotzsch e Garcke (WILSON, 1981; KISSMANN e GROTH, 1992). A planta recebe um grande número de nomes populares, dependendo da região de ocorrência, como leiteiro, amendoim-bravo, café-do-diabo, mata-Brasil, adeus-Brasil e flor-de-poeta (KISSMANN & GROTH, 1992).

*E. 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 da planta na região sul do Brasil (CERDEIRA & VOLL, 1982; PITELLI, 1991). A introdução de herbicidas do grupo químico das imidazolinonas que atuam inibindo a formação de alguns aminoácidos por meio de bloqueio de uma reação comum à síntese destas substâncias, foi considerada altamente eficaz no controle da planta. Porém, devido a aplicações sucessivas de produtos do mesmo modo de ação, os indivíduos tolerantes da população dessa planta voltaram a crescer, mas com estrutura genética alterada, com predomínio dos indivíduos dotados de capacidade de tolerar as imidazolinonas (VIDAL, 1997). Apesar de toda tecnologia moderna do controle químico, essa espécie persiste e mantém elevadas densidades populacionais em lavouras de soja no sul e, agora no centro-oeste brasileiro. Dessa forma, *E. heterophylla* preenche os requisitos citados por CHARUDATAN (1993) como uma planta-alvo adequada aos programas de controle biológico por meio da técnica de aplicação de bioherbicidas em estratégia inundativa.

Há vários exemplos bem sucedidos de programas de controle biológico de plantas daninhas utilizando fitopatógenos. SMITH JÚNIOR (2001) apontou inúmeras estratégias de controle biológico de plantas daninhas, incluindo micoherbicidas usados comercialmente em arroz nos EUA. Nesse contexto, o emprego do fungo *Colletrotrichum gloeosporioides* f. sp. a*eschynomene*, causador de antracnose em

angiquinho (*Aeschynomene virginica*) vem sendo comercializado nos Estados Unidos pela Ecogen Inc (CHARUDATTAN, 1995). O produto comercial, conhecido como COLLEGGO consiste de uma formulação de esporos secos (15%) e ingredientes inertes (85%) acompanhados de um hidratante inerte (MELLO e RIBEIRO, 1998).

CASST é outro micoherbicida à base de *Alternaria cassie*, Jurair & Khan, desenvolvido nos Estados Unidos pela Mycogen Corp. (CHARUDATTAN, 1990; MITCHELL et al., 1994). O fungo se mostrou efetivo contra *Senna obtusifolia (L.)* Irwin & Barnaby em diversas condições ambientais (WALKER, 1982; WALKER & BOYETTE, 1986; CHARUDATTAN, 1986). Apresentou faixa restrita de hospedeiros sendo, no entanto, capaz de controlar outras duas espécies economicamente importantes, *Cassia accidentalis* L. e *Crotalaria spectabilis Roth* (CHARUDATTAN, 1990).

*Colletotrichoum orbiculare* v. Arx está sendo reavaliado como agente de controle biológico para *Xantbium spinosum H*alst., na Austrália. Esse fungo foi previamente identificado como *C. xantbii* Halst e avaliado em 1951 na abordagem clássica, ou seja o agente de biocontrole foi liberado em pontos determinados visando seu estabelecimento e autoperpetuação na nova área, sem nenhum manipulação após a inoculação inicial. Quando aplicado como bioherbicida, controlou 50 a 100% de plântulas (TEBEEST et al., 1992).

Segundo GAZZIERO & YORINORI (1993), vários patógenos infectam naturalmente a *E. heterophylla* no campo, como o vírus do mosaico e os fungos *Uromyces euphorbia, Aternaria* sp, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Bipolaris euphorbiae*. Em levantamentos realizados no Rio de Janeiro BARRETO & EVANS (1998), identificaram dez patógenos de *E. heterophylla* e *Euphorbia hirta*.

Levantamentos sistemáticos iniciados na década de 80 por um grupo pesquisadores de Centro Nacional de Pesquisa de Soja, da EMBRAPA (1986) permitiram identificar o fungo *Bipolaris euphorbiae* Muchovej & Carvalho, capaz de provocar intenso desfolhamento prematuro e lesões caulinares em *E. heterophylla*. Posteriormente, este fungo foi estudado evidenciando alta eficácia de controle, especificidade ao hospedeiro e facilidade de produção massal de inóculo. Foi considerado candidato ideal para o desenvolvimento de bioherbicidas. Desde então,

tem sido alvo de pesquisas que avaliam as estratégias de sua introdução nos programas de manejo desta planta daninha, nas culturas e locais em que ocorre em altas densidades.

Para introduzir o patógeno em programas de manejo de plantas daninhas, são necessários conhecimentos básicos de sua fisiologia, como por exemplo, de suas características nutricionais, de modo a estabelecer condições favoráveis para o crescimento e esporulação do fungo. São necessários ainda estudos de sua relação com o hospedeiro e o estabelecimento de metodologia adequada que permita sua produção massal. Assim, o presente trabalho objetivou estudar as características nutricionais de *B. euphorbiae* e a produção de conídios utilizando diferentes substratos obtidos a partir de grãos ou resíduos agroindustriais, de modo a contribuir para seu uso em estratégia inundativa, como bioherbicida no controle de *E. heterophylla*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância dos fungos patogênicos as plantas daninhas

*Bipolaris euphorbiae,* pertencente à família Dematiaceae, é um fitopatógeno de fácil multiplicação em laboratório com uma alta virulência e boa capacidade de esporulação (GAZZIERO & YORINORI, 1993). Esses autores descreveram que o efeito de *B. euphorbiae* nos tecidos de *E. heterophylla* se dá pela ação de uma micotoxina produzida no processo de infecção. SILVA et al. (1996) observaram desfolha total da planta quando suspensões de esporos de *B. euphorbiae* ou o filtrado de meio de cultura onde o fungo cresceu foram pulverizados sobre a planta. MARCHIORI (1996) determinou que a suscetibilidade da planta ao fungo é maior em estágios mais avançados do seu ciclo de desenvolvimento, correspondente à fase de 6 a 10 folhas.

YORINORI et al. (1985) estudaram os efeitos da mistura de *B. euphorbia* e *Alternaria sp.* no controle de *E. heterophylla*. Os sintomas de doença provocada por *Alternaria* foram bastante lentos em comparação com os de *B. euphorbiae* e, com

isso, não melhorou a ação de controle promovido por este último isoladamente. Verificaram também que a aplicação na concentração $3x10^5$ con. $mL^{-1}$, foi responsável pela redução de 53% da massa verde da planta nove dias após a aplicação.

Estudando os efeitos de diversas concentrações de esporos de *B. euphorbiae,* aplicado sobre plantas de *E. heterophylla* em condições de campo, GAZZIERO et al. (1989) observaram que suspensões com mais de 8 x $10^5$ con. $mL^{-1}$ foram necessárias para obtenção de desfolha expressiva e, consequentemente, melhor controle da planta daninha. Resultado similar foi obtido por MARCHIORI (1996), cuja concentração mínima observada para a ocorrência de danos significativos ao amendoim-bravo foi de $10^5$ con. $mL^{-1}$.

Em estudos realizados por GAZZIERO et al. (1989), que avaliaram a influência da luminosidade na germinação de esporos de *B. euphorbiae*, verificou-se que o desenvolvimento dos tubos germinativos foi quatro a cinco vezes superior no tratamento mantido no escuro, em relação ao mantido sob luminosidade. Com relação aos programas de manejo de *E. heterophylla*, vários trabalhos relataram a compatibilidade do *B. euphorbiae* aos agroquímicos utilizados na lavoura. GAZZIERO et al. (1989) constataram que a formulação de esporos de *B. euphorbiae* com Naturl'óleo a 1,5%, reduziu, após três horas, a germinação dos conídios em 90%, enquanto Energic a 0,2%, reduziu em 1%, aproximadamente.

Ao analisar a ação de diversos agroquímicos no crescimento micelial e germinação de esporos de *B. euphorbiae* TOFFANELLI (1997), observou que os herbicidas chlorimuron-ethyl, fomesafen, glyphosate e imazethapyr, usados nas doses recomendadas pelos fabricantes, e os surfatantes Energic, Silwet, Triton x-100 e Herbitensil, na metade e nas concentrações recomendadas, exerceram efeito inibidor do crescimento micelial do fungo em meio sólido. A autora ainda observou que glifosate reduziu em 45% a germinação de conídios em relação à testemunha, o que inviabilizaria uma mistura de tanque dos dois agentes de controle.

## 2.2 Características nutricionais dos fungos fitopatogênicos

De modo geral, a água e os nutrientes minerais ou orgânicos são absorvidos pelos fungos a partir do substrato onde crescem. A absorção é feita através da parede celular das hifas, as quais constituem o talo vegetativo da maioria dos fungos e, comumente, as hifas liberam enzimas que atuam na decomposição das substâncias mais complexas presentes no substrato, tornando-se assimiláveis. As celulases, por exemplo, atuam sobre a celulose, principal componente das paredes celulares das plantas, transformando-a em glicose que, por sua vez, é absorvida pelo fungo (KRUGNER & BACHI, 1995).

Os fungos necessitam de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes para o crescimento e esporulação, e podem variar quanto a essas exigências. BARBOSA (2000) verificou o efeito de várias fontes de carbono e nitrogênio no desempenho dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Verticillium lecanii.* Para JAB 02, o melhor crescimento foi obtido em presença de lactose e fosfato de amônio ou nitrato de sódio, mas em qualquer caso houve pouca esporulação do isolado. O amido foi a fonte de carbono que favoreceu o crescimento do isolado JAB 45, enquanto glicose e maltose promoveram maior esporulação. Avaliando o efeito da nutrição fosfatada no crescimento e esporulação dos mesmos isolados de *V. lecanii*, WENZEL (2002) verificou que não houve influência da fonte de fósforo e da relação C:P do meio de cultura, no desenvolvimento dos isolados.

A suplementação com nitrogênio, fósforo e potássio em tortas orgânicas proporcionou aumento da massa micelial, do período de crescimento e da esporulação de *V. lecanii* (NAGESH & REDDY, 1997). GARRAWAY & EVANS (1984) verificaram que o aumento da concentração de $KH_2PO_4$ de 125 para 150ug $mL^{-1}$ resultou em mais de 50% de decréscimo na esporulação de *Claviceps purpurea*. BARROS et al. (1988) obtiveram maior produção de conídios de *Nomuraea rileyi* suplementando o meio de cultivo com extrato de levedura. Contudo, tais aspectos são pouco conhecidos para *B. euphorbiae* e por isso precisam ser estudados.

## 2.3 Produção massal do fitopatógeno

Um fator importante na introdução de *B. euphorbiae* como bioherbicida é a produção massal do fungo que deve ser em larga escala utilizando preferencialmente, substrato abundantes e de baixo custo, sem contudo, perder a virulência e eficácia.

A composição nutricional do meio de produção pode ter um efeito marcante na eficácia dos propágulos, destacando-se o biocontrole e a estabilidade durante o armazenamento (JACKSON et al., 1996). Segundo BOYETTE et al. (1991), um meio de crescimento com taxa de carbono e nitrogênio balanceada geralmente produz melhor crescimento vegetativo, mas existem fontes de carbono que aumentam a esporulação. Esses autores relataram que a produção de inóculo de agentes de biocontrole, em pequena escala, pode ser obtida em meio de cultura como suco V-8 ou ágar-nutriente. Embora a técnica de cultivo em placas seja utilizada para a realização de estudos relacionados a nutrição e a relação patógeno-hospedeiro, ela tem limitado escopo para produção em grande escala.

Nesse contexto, estudos sobre meios de cultura que proporcionem bom crescimento e esporulação em larga escala, além de terem baixo custo e serem elaborados com materiais de fácil obtenção, manuseio e preparo do bioherbicida, são necessários mas escassos.

Entre os substratos mais utilizados na produção de fungos destaca-se o arroz, porém desde a década de 1980 se tem procurado substituir esse material por substratos mais baratos. Essa tentativa de barateamento dos custos estimulou os pesquisadores a testarem diferentes substratos como fubá de milho, farinha de arroz e soja, farelo de trigo, batata, sorgo e milho, e melaço entre outros (ALVARENGA et al. 1988).

A produção de *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultivo foi avaliada por alguns autores que utilizaram os seguintes substratos: lascas de mandioca misturadas com farelo de arroz (MOHAN & PILLAI, 1982), arroz brunido, arroz integral, quirelas de milho e de soja (CAMARGO, 1983) e água de côco (DANGAR et al., 1991). *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* também foram cultivados em macerados de feijão carioquinha e jalo, feijão guandú, soja e grão de bico (ALVARENGA et al., 1988), enquanto CRUZ et al. (1983) encontraram que o meio de cultura líquido à base de feijão foi o melhor para a esporulação de *M. anisopliae*.

WENZEL (2002) constatou que os meios sólidos proporcionaram maior esporulação e viabilidade dos isolado JAB 02 e JAB 45 de *V. lecanii,* enquanto nos meios líquidos ocorreu menor esporulação, não sendo verificada a germinação dos conídios.

Pela literatura consultada, pode-se observar que *B. euphorbia*, embora altamente eficiente, foi ainda pouco estudado e vários aspectos importantes para o seu desenvolvimento como bioherbicida não estão devidamente esclarecidos. Nesse trabalho investigou-se uma tecnologia para produção massal de esporos a baixo custo e com satisfatório poder de infecção, estudando métodos de produção em diferentes substratos e avaliação da severidade de doença, quando o fungo foi aplicado sobre as plantas de amendoim-bravo.

## 3. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A R. M. et al. Novos testes de cultivo de fungos utilizados em controle biológico usando meios de cultura naturais líquidos. **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v.55, n.1-4, p.31-35, 1988.

BARBOSA, C. C. **Caracterização fisiológica de isolados de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas obtidos de Coccus viridis Green (Hemiptera: Coccidae) em pomares cítricos**. 2000. 52 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

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

BARROS, N. M. et al. Estudo do crescimento e germinação conidial de linhagens do fungo *Nomuraea rileyi* em diferentes substratos. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v.18, n.2, p.163-167, 1988.

BOYETTE, C. D. et al. Progress in the production, formulation and application of mycoherbicides. In: TEBEEST, D.O**. Microbial control of weeds.** New York: Chapman and Hall, 1991. p.209-22.

CERDEIRA, A. L.; VOLL, E. Controle do amendoim-bravo (*Euphorbiae heterophylla* L.) através de herbicidas pós-emergentes. IN: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOUZA, 2., 1982, Londrina. **Anais...** Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1982. v.2, p.311-316.

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.

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

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

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

CRUZ, B. P. B. et al. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em meios de culturas naturais, líquidos. **Biológico**, São Paulo, v.49, n.5, p.111–116, 1983.

DANGAR, T. K. et al. Mass production of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* in coconut water wasted from copra making industry. **Journal of Plantation Crops,** Kasangod, v.19,n.1, p.54-69, 1991.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Amendoim bravo já tem controle biológico. Londrina:** EMBRAPA/CNPSo, 1986. 8p.

GARRAWAY, M. O.; EVANS, R. C. Vitaminas and growth factors. **Fungal Nutrition & Physiology**. New York: John Willey & Sons, 1984. p.171–212.

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

GAZZIERO , D. L. P. et al. Adequação da dose do fungo *Helminthosporium* sp. No controle biológico de amendoim-bravo *(Euphorbiae heterophyla).* In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Resultados de pesquisa de soja 1989**. Londrina, 1989. p.275–278. (Relatório Anual).

GAZZIERO, D. L. P. et al. Efeitos da luminosidade na germinação de esporos de Helminthosporium sp. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA**. Resultados de pesquisa de soja 1989**. Londrina, 1989. p.283-284. (Relatório Anual).

JACKSON, M. A., et al. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. **Weed Technology**, v.10, n.3, p.645–50, 1996.

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

KRUGNER, T. L.; BACHI, M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A. KIMATI, H. AMORIM. L. **Manual de Fitopatologia 3**. Ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995.

MARCHIORI, R. **Produção de inóculo de Bipolaris euphorbiae (Muchovej & Carvalho, 1989) e sua atividade no controle biológico de** *Euphorbia heterophylla* **L.**

**(amendoim-bravo).** 1996. 70f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

MELLO, S. C. M.; RIBEIRO, Z. M. de A. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Fitopatógenos como agente de controle de planta daninhas**: Jaguariúma, S.P.: EMBRAPA, 1998. p.97– 128.

MITCHELL, D. J. et al. Biological control of plant pathogens and weeds in Florida. In: ROSEN, D,; BENNETT, F. D.; CAPINEIRA, J. L. Ed. **Pest Management in the subtropics:** biological control – a Florida perspective. Andover: Intercept, 1994.

MOHAN, K. S.; PILLAI, G. B. A method for laboratory scale mass cultivation of *Metarhizium anisopliae*. **Folia Microbiologia,** Prague, v.27, p.281-283, 1982.

NAGESH. M., REDDY. P. P. Influence of oil cakes in combination with inorganic fertilizers on growth and sporulation of *Verticillium lecanii*. **Nematologia Mediterranea,** Bari, v.25, p.9–11, 1997.

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 Publishers, 1991. p. 282-289.

SILVA, A. et al. Utilização do fungo fitopatogênico *Helminthosporium euphorbiae* no controle de *Euphorbia heterophylla*. **Semina**, Londrina, v.17, n.1, p.105-111, 1996.

SMITH JUNIOR, R. J. Biological controls as components of integrated weed management for rice in the United States. 2001. Disponível em: < www.agriet.org> Acesso em 2002.

TEBEEST, D. O. et al. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.637-57, 1992.

TOFFANELLI, C. M. **Interferência de herbicidas e surfatantes na ação de fungo** *Bipolaris euphobiae* **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. **Herbicidas:** mecanismo de ação e resistência de plantas. Porto Alegre: Palotti, 1997. 165p.

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

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

WENZEL, I. M. **Fatores nutricionais e produção em massa de *Verticillium lecanii* em meios naturais sólidos e líquidos.** 2002. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

WILSON, A. K. *Euphorbia heterophylla*: a review of distribution, importance and control. **Tropical Pest Management**, London, v.27, p.32-38, 1981.

YORINORI, J. T., et al. Avaliação da eficiência de *Helminthosporium* sp. e *Alternaria* sp., isoladamente e em mistura no controle de *Euphorbia heterophylla.* In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Resultados de pesquisa de soja 1985**. Londrina, 1985. p.318-319. (Relatório Anual).

## CAPÍTULO 2 - DESEMPENHO DE *Bipolaris euphorbiae* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS DO MEIO DE CULTIVO

**RESUMO** - O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes, para o crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae.* Foram avaliadas cinco fontes de carbono (glicose, amido, sacarose, lactose e maltose), cinco fontes inorgânicas de nitrogênio (nitrato de sódio, nitrato de amônio sulfato de amônio, fosfato de amônio di-básico, cloreto de amônio) e seis fontes de fósforo, (fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio bi-básico, fosfato de cálcio, fosfato de sódio, ácido fosfórico, fosfato de amônio). Em seguida, estudou-se o efeito da suplementação do meio com fontes orgânicas de macro e micronutrientes. Avaliou-se o crescimento e a produção de conídios. O amido foi à fonte de carbono com a qual se obteve crescimento significativamente maior que as demais e pode ser considerada a fonte mais favorável para a esporulação. O melhor desempenho do fungo foi obtido usando o nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e o fosfato de potássio monobásico como fonte de fósforo, embora o crescimento de *B. euphorbiae* obtido com fosfato de cálcio não tenha diferido do observado com a fonte anterior. A suplementação do meio de cultivo com peptona e extrato de levedura resultou em melhor crescimento e esporulação do fungo.

**Palavras chave:** fatores nutricionais, fonte de carbono, fonte de fósforo, fonte de nitrogênio, fungo fitopatogênico.

**PERFORMANCE OF *Bipolaris euphorbiae* UNDER DIFFERENT MEDIUM NUTRITIONAL CONDITIONS**

**ABSTRACT** - The aim of this work was to evaluate the effect of different sources of carbon, nitrogen and phosphorus as well as other nutrients on the growth and sporulation of *Bipolaris euphorbiae*. Five sources of carbon (glucose, starch, sucrose, lactose and maltose), five sources of inorganic nitrogen (sodium nitrate, ammonia nitrate, ammonia sulfate, dibasic ammonia phosphate and ammonia chloride), six sources of phosphorus (monobasic potassium phosphate, dibasic potassium phosphate, calcium phosphate, sodium phosphate, phosphoric acid and ammonium phosphate), and the supplementation with micro and macronutrients organic were accessed. The growth and the production of conidium were evaluated. The carbon source that promoted the most significantly growth was the starch. It also can be considered the most favorable to sporulation. The nitrogen source sodium nitrate promoted better performance of the fungus. The monobasic potassium phosphate was the phosphorus source that caused a greater growth and sporulation of the fungus, although it did not differ from the calcium phosphate regarding the fungus growth. The supplementation of the culture medium with peptone and yeast extract promoted a better growth and sporulation of the fungus and the addition of vitamins favored the production of conidia.

**Key words**: carbon sources, nitrogen sources, nutritional factors, phosphorus sources, phytopathogenic fungus, supplements.

## 1. INTRODUÇÃO

*Euphorbia heterophylla*, conhecida popularmente como amendoim bravo ou leiteiro, é uma planta daninha pertencente à família Euphorbiaceae, amplamente distribuída no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Centro-Oeste onde se cultiva a soja (OLIVEIRA & SÁ, 1998; PITELLI, 1991). O rápido crescimento inicial desta planta exerce uma forte competição por luz, nutrientes do solo e água, além de produzir grande quantidade de sementes que germinam numa ampla faixa de condições ambientais (ETEJERE & OKOKO, 1989). Segundo BRIDGES et al. (1992) e BECKE (1995) o amendoim bravo se desenvolve bem mesmo em ausência de iluminação e sob temperaturas superiores a 40°C.

O controle do amendoim bravo é difícil devido a sua tolerância à maioria dos herbicidas disponíveis (CAFÉ FILHO et al., 1987). O controle químico de *E. heterophylla* é efetuado principalmente usando herbicidas inibidores da enzima acetolase sintetase (ALS), mas se observam falhas no controle devido ao aparecimento de biótipos resistentes a estes herbicidas (CHRISTOFFOLETTI et al., 1994).

O emprego de bioherbicidas, entre os quais o fungo *Bipolaris euphobiae,* tem sido sugerido como estratégia para o controle biológico de *E. heterophylla*. O fungo é 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). GAZZIERO & YORINORI (1993) constataram que com aplicações altamente concentradas de suspensão de esporos, o fungo provocou intenso desfolhamento e lesões caulinares em *E. heterophylla*. Por ser de fácil esporulação, o patógeno foi considerado pelos autores candidato um ideal para o desenvolvimento de bioherbicidas a ser introduzido em programas de manejo do amendoim-bravo.

Um dos grandes entraves para utilização a campo de agentes de controle biológico de plantas daninhas reside na produção de inóculo em grandes quantidades, sem perda de virulência. Mesmo quando se dispõe de uma técnica eficiente de

propagação de inóculo, a necessidade de suplementação do substrato com compostos de alto valor nutritivo torna o produto inviável economicamente.

Para se produzir um fungo em larga escala é importante conhecer as condições de cultivo que permitam obter um bom crescimento com alta esporulação (KHALIL et al.,1985). Assim, é necessário conhecer sua habilidade em usar diferentes fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, e suas necessidades em termos de outros macro ou micronutrientes e fatores de crescimento. TABER et al. (1968) demonstraram que *Alternaria brassicae e Alternaria raphani* cresceram rapidamente quando uma fonte de carbono, o amido, foi adicionada ao meio de cultura, enquanto que *Alternaria brassicicola* cresceu melhor em meio contendo galactose.

A produção de $5 \times 10^3$ e $4 \times 10^3$ con. $mL^{-1}$ de *Alternaria alternata* foi obtida usando galactose e arabinose, respectivamente, como fonte de carbono (SILVA & MELO, 1999). No entanto, os autores não verificaram diferenças significativas em relação às fontes de nitrogênio avaliadas. BARBOSA et al. (2002) avaliaram o efeito de várias fontes de carbono (glicose, maltose, lactose, sacarose e amido) no crescimento e esporulação dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *Verticillium lecanii*. Para o isolado JAB 02, o melhor crescimento e esporulação foram encontrados em meio contendo lactose e para JAB 45, em meio contendo glicose. Casitona e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio proporcionaram os melhores resultados para JAB 02, e peptona, extrato de carne e fosfato de amônio bi-básico para JAB 45.

Trabalhos que analisaram as exigências nutricionais de *B. euphorbiae* não foram encontrados na literatura. No entanto, o conhecimento destas exigências nutricionais é importante para encontrar substratos que propiciem crescimento vigoroso do fungo com grande esporulação. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo avaliar diferentes fontes de carbono, nitrogênio e fósforo e outros nutrientes, para o crescimento e esporulação de *B. euphorbiae*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se o isolado FCAV# 569 de *B. euphorbiae*, cedido pelo Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas “Prof. Giorgio de Marinis” da Faculdade de

Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, isolado por pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa em Soja da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNPSo), localizado em Londrina – PR.

O isolado permaneceu estocado em tubos de ensaios contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), mantidos a 4 °C. Para utilização nos ensaios, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o Meio Mínimo de Pontecorvo (PONTERCORVO et al., 1953), com a seguinte composição: 6,0 g de $NaNO_3$, 1,52g de $KH_2PO_4$, 0,52 g de $MgSO_4$. $7H_2O$, 0,52 g de KCl, 0,01 g de $FeSO_4$, 0,01 g de $ZnCl_4$, 10 g de glicose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 $^oC$ e 1 Kgf $(cm^2)^{-1}$, por 20 minutos e a vidraria em estufa a 180 °C por três horas. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri que foram mantidas em BOD a 27±0,5 $^oC$, por 24 horas, para secagem da superfície do meio, evitando dessa forma que a umidade excessiva pudesse espalhar propágulos do fungo após a inoculação. Discos de 5mm de diâmetro, contendo micélio e esporos obtidos de colônias jovens de *B. euphorbiae* foram transferidos com o auxílio da uma alça de níquel-cromo esterilizada para o centro de cada placa de Petri, contendo 20 mL de meio mínimo. As placas foram mantidas em BOD a 27±0,5 °C, por 21 dias.

Avaliou-se a influência de diferentes fontes de carbono, de nitrogênio, de fósforo e da suplementação do meio de cultura no desenvolvimento de *B. euphorbiae*. Para cada fonte avaliada organizou-se um ensaio e o meio mínimo foi utilizado em todos os ensaios, substituindo a fonte a ser estudada, conforme as seguintes etapas.

## 2.1 Fontes de Carbono

Preparou-se o meio mínimo contendo glicose como fonte de carbono e também amido, sacarose, lactose e maltose, sempre na concentração de 10 g/L. Tais preparações, realizadas com cinco repetições (placas de Petri), constituíram os tratamentos do ensaio.

Avaliou-se o crescimento radial das colônias de *B. euphorbiae*, medindo-se a cada três dias, durante 21 dias, com o auxílio de uma régua milimétrica, quatro eixos ortogonais previamente demarcados na face externa de cada placa de Petri. Após 21

dias de incubação, a superfície de cada colônia foi cuidadosamente raspada com espátula e o conteúdo transferido individualmente para tubos de ensaio contendo 10 mL de uma mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89%) e Tween 80 (0,1%). Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, os esporos contidos na suspensão foram quantificados em câmara de Neubauer, ao microscópio ótico, usando diluição da suspensão quando necessário.

## 2.2 Fontes de Nitrogênio

Foram avaliadas cinco fontes de nitrogênio: nitrato de sódio ($NaNO_3$), nitrato de amônio ($NH_4NO_3$), sulfato de amônio ($(NH_4)H_2SO_4$), fosfato de amônio di-básico ($(NH_4)_2HPO_4$), cloreto de amônio ($NH_4Cl$). Assim, no meio mínimo utilizou-se uma das fontes referidas, na concentração de 6,0 g $L^{-1}$. A fonte de carbono utilizada foi a que proporcionou o melhor desempenho do fungo no experimento anterior, sendo a instalação, condução e avaliação do ensaio realizadas conforme descrito no item 2.1.

## 2.3 Fontes de Fósforo

Utilizou-se seis fontes: fosfato de potássio monobásico ($KH_2PO_4$), fosfato de potássio bi-básico ($K_2HPO_4$), fosfato de cálcio ($CaHPO_4$), fosfato de sódio ($NaH_2PO_4$), ácido fosfórico ($H_3PO_4$) e fosfato de amônio di-básico $(NH_4)_2HPO_4$. Cada uma das fontes foi adicionada ao meio mínimo, na concentração de 1,52 g $L^{-1}$.

As fontes de carbono e nitrogênio utilizadas foram as que proporcionaram melhor desempenho do fungo nos ensaios anteriores, e a instalação, condução e avaliação foram feitas de acordo com o descrito no item 2.1.

## 2.4 Suplementação do meio de cultura

Avaliou-se o efeito da suplementação do meio de cultivo adicionando-se ao meio mínimo, elaborado com as fontes de carbono, nitrogênio e fósforo que proporcionaram melhor desempenho do fungo nos ensaios anteriores, os demais

nutrientes usados na composição do Meio Completo de Pontecorvo (Pontecorvo et al., 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973), com exceção do hidrolisado de ácido nucléico de levedura, compondo os seguintes tratamentos do ensaio: meio mínimo adicionado de 2,0g de peptona; meio mínimo adicionado de 1,5g de caseína hidrolisada; meio mínimo adicionado de 0,5g de extrato de levedura; meio mínimo adicionado de 1,0 mL de solução de vitaminas; meio mínimo adicionado de todos os ingredientes anteriores, que corresponde ao Meio Completo

A solução de vitaminas foi assim composta: 0,2mg de biotina; 10,0mg de ácido β - aminobenzóico; 50,0mg de tiamina; 50,0mg de piridoxina; 100,0mg de ácido nicotínico; 100,0mg de riboflavina; 100,0 mL de água destilada. A solução foi submetida a esterilização fracionada e em seguida conservada em frasco escuro no refrigerador a 4 °C, sob clorofórmio. A instalação, condução e avaliação do ensaio foram feitas conforme anteriormente descrito.

### 2.5 Análise estatística

Os dados de crescimento foram analisados segundo o delineamento em parcelas subdivididas no tempo e os valores médios foram comparados pelo teste Tukey ($P > 0,05$). Os dados referentes à esporulação foram transformados em log ($x + 1$) e submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probalidade. Para execução das análises utilizou-se o programa SAS (1995). Tanto para a avaliação de crescimento como da esporulação foram feitas cinco repetições por tratamento.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O amido foi a fonte de carbono que promoveu um crescimento significativamente maior que as demais (Tabela 1). Esta fonte foi a mais adequada para o crescimento do fungo, pois com apenas nove dias de cultivo as hifas de *B. euphorbiae* quase haviam atingido a borda da placa de Petri, fato que limitou o crescimento a partir de então. Até o sexto dia de cultivo o crescimento do fungo obtido

em presença de maltose, lactose, sacarose e glicose não diferiram estatisticamente. A partir do nono dia iniciou-se uma diferenciação no crescimento com estas fontes, destacando-se maltose e sacarose como as mais promissoras, e ao final do 21º de cultivo, a sacarose promoveu maior crescimento do fungo, diferindo das demais.

**Tabela 1**. Crescimento em diâmetro (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após cultivo por 21 dias a 27 °C e ausência de iluminação, em diferentes fontes de carbono.

| Fonte de carbono | Tempo de cultivo (dias) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 |
| Maltose | 16,0 B | 22,8 B | 32,6 B | 42,2 B | 49,2 B | 53,40 B | 54,0 C |
| Lactose | 13,6 B | 18,0 B | 24,8 C | 31,2 C | 37,2 C | 43,60 C | 52,6 C |
| Sacarose | 12,8 B | 20,0 B | 28,8 BC | 40,0 B | 49,8 B | 57,20 B | 59,4 B |
| Glicose | 14,4 B | 21,4 B | 27,6 BC | 34,4 C | 41,4 C | 47,40 C | 51,4 C |
| Amido | 33,0 A | 62,0 A | 88,6 A | 90,0 A | 90,0 A | 90,00 A | 90,0 A |

Médias seguidas por pelo menos uma letra igual, dentro da coluna de cada fator avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não se verificou diferença estatística na produção de conídios de *B. euphorbiae* obtida nos tratamentos contendo amido, sacarose, glicose, maltose e lactose (Tabela 2), mas o amido é provavelmente, a fonte mais favorável, pois estimulou a esporulação. Este fato, aliado ao resultado de crescimento, sugere que *B. euphorbiae* tenha boa capacidade de desdobrar amido como fonte de carbono, produzindo diversas amilases.

**Tabela 2**. Esporulação de *Bipolaris euphorbiae* após 21 dias de cultivo a 27 °C e ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes fontes de carbono[1].

| Fonte de carbono | Número de conídios x $10^5$ $mL^{-1}$ |
|---|---|
| Maltose | 52,3 |
| Lactose | 26,6 |
| Sacarose | 75,9 |
| Glicose | 84,5 |
| Amido | 194,9 |
| Valor de F | 2,56NS |
| C.V. (%) | 20,67 |

[1]Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x + 1). Médias seguidas por pelo menos uma letra igual, dentro da coluna de cada fator avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo CARLILE & WATKINSON (1994), muitos fungos utilizam glicose como fonte de carbono, porém vários outros açúcares podem ser aproveitados. O amido foi a fonte de carbono que proporcionou rápido crescimento de *A. brassicae e A. raphani* (TABER et al, 1968). *Helminthosporium oryzae* pode utilizar frutose, arabinose, sacarose, maltose e amido como fontes de carbono (DIAZ, 1995). MONTEIRO (1988) verificou que glicose e amido favoreceram o crescimento de *Metarhizium anisopliae e Beauveria bassiana*, enquanto glicose e sacarose foram as fontes de carbono mais adequadas para o crescimento e esporulação de *Paecilomyces marquandii*. COETZEE & EICKER (1991) comparam 15 fontes de carbono para determinar o efeito de fatores nutricionais e ambientais no crescimento e esporulação de *Verticillium fungicola*. As melhores fontes de carbono foram glicose, manitol e sacarose.

O crescimento de *B. euphorbiae* foi significativamente maior em meio contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (Tabela 3). Neste tratamento a colônia do fungo colonizou toda a área da placa já no nono dia de cultivo, e a partir daí o crescimento ficou limitado ao diâmetro da placa. O meio contendo fosfato de amônio di-básico também favoreceu o crescimento de *B. euphorbiae,* mas o mesmo efeito ocorrido com nitrato de sódio só foi verificado no vigésimo primeiro dia de incubação. Quando se utilizaram as fontes cloreto de amônio, sulfato de amônio e nitrato de amônio se obteve menor crescimento do fungo, o que ficou evidente a partir do nono dia de incubação.

**Tabela 3**. Crescimento em diâmetro (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após cultivo por 21 dias a 27 °C e ausência de iluminação, em diferentes fontes de nitrogênio[1].

| Fonte de nitrogênio | Tempo de cultivo (dias) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 |
| $NaNO_3$ | 28,8 A | 76,8 A | 90,0 A | 90,0 A | 90,0 A | 90,0 A | 90,0 A |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | 16,1 C | 30,0 C | 46,5 B | 62,9 B | 77,5 B | 86,6 B | 90,0 A |
| $NH_4Cl$ | 12,9 D | 18,2 D | 20,0 D | 21,2 D | 22,6 D | 22,6 D | 22,9 C |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 13,2 C | 18,9 D | 18,9 D | 20,8 D | 20,9 D | 21,3 D | 21,5 C |
| $H_4NO_3$ | 19,9 B | 33,1 B | 33,1 C | 33,1 C | 33,2 C | 33,2 C | 33,3 B |

[1]Meio de cultura contendo amido com fonte de carbono. Médias seguidas por pelo menos uma letra igual, dentro da coluna de cada fator avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O nitrato de sódio também foi a fonte que melhor promoveu a esporulação de *B. euphorbiae* (Tabela 4), diferindo significativamente das produções de conídios obtidas nos meios com as demais fontes. Na presença de sulfato de amônio, cloreto de amônio e nitrato de amônio a esporulação do fungo foi acentuadamente menor.

Os resultados mostraram que *B. euphorbiae* teve maior capacidade de utilizar nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, do que os demais sais que contém o ion amônio como fonte de nitrogênio. Este fato sugere que o fungo tenha habilidade de sintetizar enzimas envolvidas no mecanismo de redução do nitrato, como nitrato redutase, nitrito redutase e hidroxiamino redutase (GARRAWAY & EVANS (1984). Segundo estes autores, o nitrogênio é indispensável para o desenvolvimento de fungos, sendo necessário para a síntese de componentes celulares importantes, tais como aminoácidos, ácidos nucléicos e quitina. Analisando o efeito de fontes de nitrogênio no crescimento e esporulação de isolados de *V. lecanii*, BARBOSA et al. (2002) encontraram que nitrato de sódio e fosfato de amônio favoreceram o seu desenvolvimento.

**Tabela 4.** Esporulação de *Bipolaris euphorbiae* após 21 dias de cultivo a 27 °C em ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes fontes de nitrogênio[1,2].

| Fonte de nitrogênio | Número de conídios x $10^5$ $mL^{-1}$ |
|---|---|
| $NaNO_3$ | 189,8A |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | 44,2B |
| $NH_4Cl$ | 1,4C |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 3,8C |
| $NH_4NO_3$ | 0,3C |
| Valor de F | 51,8** |
| C.V. (%) | 30,7 |

[1]Meio de cultura contendo amido com fonte de carbono. [2]Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x + 1). Médias seguidas por pelo menos uma letra igual, dentro da coluna de cada fator avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*B. euphorbiae* se desenvolveu rapidamente na presença de fosfato de cálcio e fosfato de potássio monobásico, atingindo a borda da placa de Petri no nono dia de cultivo (Tabela 5). Nos meios contendo fosfato de sódio e fosfato de potássio bi básico o fungo atingiu o diâmetro da placa no décimo segundo e décimo quinto dias de cultivo, respectivamente, suportando bom crescimento. A partir do 15º não se verificou

diferença estatística no crescimento obtido nestas quatro fontes de fósforo, mas a limitação imposta pelo diâmetro da placa de Petri foi o fator responsável. Os menores desempenhos do fungo foram obtidos em presença de fosfato de amônio e ácido fosfórico, cujos crescimentos diferiram estatisticamente dos demais.

**Tabela 5**. Crescimento em diâmetro (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após cultivo por 15 dias a 27 °C e ausência de iluminação, em diferentes fontes de fósforo[1].

| Fonte de fósforo | Tempo de cultivo (dias) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 |
| $KH_2PO_4$ | 23,7 B | 62,3 B | 90,0 A | 90,0 A | 90,0 A |
| $K_2HPO_4$ | 18,5 C | 41,7 D | 67,2 C | 80,2 B | 90,0 A |
| $CaHPO_4$ | 26,7 A | 73,4 A | 90,0 A | 90,0 A | 90,0 A |
| $NaH_2PO_4$ | 19,3 C | 45,5 C | 71,9 B | 90,0 A | 90,0 A |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | 15,3 C | 35,3 CD | 53,4 C | 63,9 B | 67,5 B |
| $H_3PO_4$ | 5,0 D | 5,0 E | 12,1 D | 17,6 C | 23,2 C |

[1]Meio de cultura contendo amido e nitrato de sódio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, dentro da coluna de cada fator avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise estatística mostrou que a esporulação do fungo foi significamente influenciada pela fonte de fósforo (Tabela 6). Contudo, apenas o ácido fosfórico promoveu menor produção de conídios e não se observou diferença significativa na esporulação obtida na presença das demais fontes de fósforo. O fosfato de potássio monobásico pode ser destacado como a fonte mais favorável, pois estimulou acentuadamente a produção de conídios.

Os resultados obtidos sugerem que o fosfato de potássio monobásico e o fosfato de cálcio sejam as fontes mais facilmente assimiláveis por *B. euphorbiae*. O fósforo é um elemento indispensável para a síntese de importantes componentes celulares (CARLILE & WATKINSON, 1994).

A adição de fosfatos de cálcio, de sódio, de potássio e de amônio a meios com carência de fósforo aumentou acentuadamente o crescimento de *A. tenuis* (SINGH & TANDON, 1967a,b). No entanto, quando cultivada em meios que continham fosfato de potássio, fosfato de potássio tri-básico, fosfato de sódio e fosfato de cálcio *A. tenuis* Autc. não produziu conídios (SINGH & TANDON, 1967a). *B. bassiana* produziu dez

vezes mais conídios em meio líquido contendo fósforo do que no mesmo meio isento de fósforo (THOMAS et al., 1987).

**Tabela 6.** Esporulação de *Bipolaris euphorbiae* após 21 dias de cultivo a 27 °C em ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes fontes de fósforo[1,2].

| Fonte de fósforo | Número de conídios x $10^5$ $mL^{-1}$ |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 290,7 A |
| $K_2HPO_4$ | 241,3 A |
| $CaHPO_4$ | 202,0 A |
| $NaH_2PO_4$ | 188,1 A |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | 132,0 A |
| $H_3PO_4$ | 0,4 B |
| Valor de F | 102,4** |
| C.V. (%) | 0,05 |

[1]Meio de cultura contendo amido e nitrato de sódio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. [2]Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em (x + 1). Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, dentro da coluna de cada fator avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo WENZEL (2002), *V. lecanii* não foi influenciado pelas fontes de fósforo, mas o isolado JAB 02 mostrou maior habilidade em utilizar os fosfatos de amônio, de potássio bi-básico e de sódio, enquanto para JAB 45 os fosfatos de amônio, de potássio monobásico e bi-básico foram as fontes mais favoráveis.

No ensaio de suplementação do meio de cultivo o crescimento do fungo foi muito rápido atingindo a borda da placa de Petri no nono dia de cultivo em todos os tratamentos, pois o meio mínimo foi elaborado utilizando-se amido, nitrato de sódio e fosfato de potássio monobásico, respectivamente, como as fontes de carbono, nitrogênio e fósforo que mais favoreceram o crescimento e a esporulação do fungo. Contudo, é possível distinguir que a adição de peptona e extrato de levedura estimularam o crescimento do fungo (Tabela 7); no terceiro e sexto dias de cultivo promoveram maior crescimento que o meio mínimo e não diferiram do meio completo, que contém todos os suplementos. A partir do nono dia, não se verificaram diferenças no crescimento do fungo obtido em todos os tratamentos pela limitação imposta pelo diâmetro da placa de Petri.

**Tabela 7**.Crescimento em diâmetro (mm) de *Bipolaris euphorbiae* após cultivo por 9 dias a 27 °C e ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes suplementos[1].

| Suplemento | Tempo de cultivo (dias) | | |
|---|---|---|---|
| | 3 | 6 | 9 |
| Meio mínimo | 23,5 B | 76,4 CD | 90,0 A |
| MM + E.L. | 33,0 A | 84,5 AB | 90,0 A |
| MM + Caseína | 32,8 A | 76,0 D | 90,0 A |
| MM + Vitamina | 24,1 B | 81,2 BC | 90,0 A |
| MM + Peptona | 31,7 A | 86,0 A | 90,0 A |
| Meio Completo | 36,3 A | 88,0 A | 90,0 A |

[1]Meio de cultura contendo amido, nitrato de sódio e fosfato de potássio monobásico como fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, respectivamente. Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, dentro da coluna de cada fator avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. MM: meio mínimo. EL: extrato de levedura.

Aspecto semelhante se observou em relação à esporulação obtida em presença de peptona, que não diferiu da verificada no meio completo, mas foi maior que a ocorrida no meio mínimo (Tabela 8). A produção de conídios obtida em presença do extrato de levedura e solução de vitaminas se igualou à ocorrida no meio completo e em presença de peptona, mas não diferiu da obtida no meio mínimo.

Carbono, nitrogênio e fósforo são elementos indispensáveis na nutrição de fungos (CARLILE & WATKINSON, 1994). Contudo, outros nutrientes são necessários como vitaminas e fatores de crescimento. A presença destes nutrientes no meio de cultivo pode incrementar o crescimento e a esporulação dos fungos.

**Tabela 8.** Esporulação de *Bipolaris euphorbiae* após 21 dias de cultivo a 27 °C e ausência de iluminação, em meio mínimo contendo diferentes suplementos[1,2].

| Suplemento | Número de conídios x $10^5$ $mL^{-1}$ |
|---|---|
| Meio mínimo | 202,2 B |
| MM + E.L. | 508,0 AB |
| MM + Caseína | 303,7 B |
| MM + Vitamina | 431,0 AB |
| MM + Peptona | 719,4 A |
| Meio Completo | 734,0 A |
| Valor de F | 7,99** |
| C.V. (%) | 6,15 |

[1]Meio de cultura contendo amido, nitrato de sódio e fosfato de potássio monobásico como fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, respectivamente. [2]Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em (x + 1) Médias seguidas por pelo menos uma letra em comum, dentro da coluna de cada fator avaliado, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. MM: meio mínimo. EL: extrato de levadura.

Para a utilização no controle biológico de plantas daninhas é importante que a produção massal do fungo resulte na maior quantidade possível de conídios, que são as unidades infectivas mais adequadas para a formulação de bioprodutos e desenvolvimento da doença nas plantas. A produção comercial em larga escala, deve empregar substratos de baixo custo e fácil obtenção, mas alguns destes podem necessitar de suplementação com nutrientes importantes para o crescimento e esporulação do fungo.

Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que a suplementação do meio com peptona e extrato de levedura estimularam o fungo. Este fato sugere que outros nutrientes possam incrementar o crescimento e esporulação. Peptonas contém mistura de fontes de carbono e nitrogênio que podem ser facilmente utilizáveis por fungos. O extrato de levedura é usado como fonte de nitrogênio para o crescimento de fungos (KULKARNI & NIELSEN, 1986) e contém aminoácidos, peptídeos, vitaminas e carboidratos solúveis em água (SIKYTA, 1983). Provavelmente, alguns destes nutrientes foram utilizados pelo fungo, promovendo o crescimento e a produção de conídios. A adição de vitaminas incrementou a esporulação, sugerindo que sua presença no meio de cultivo possa favorecer o fungo. Todos os fungos precisam de vitaminas, porém diferem bastante em suas exigências a elas (GARRAWAY & EVANS, 1984).

## 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

a) Amido, nitrato de sódio e fosfato de potássio monobásico são, respectivamente, as melhores fontes de carbono, nitrogênio e fósforo para o crescimento e esporulação de *B. euphorbiae*.

b) O desempenho de *B. euphorbiae* é incrementado pela suplementação do meio de cultivo com peptona e extrato de levedura, e a adição de vitaminas favorece a produção de conídios.

## 5. REFERÊNCIAS

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

BARBOSA, C. C. **Caracterização fisiológica de isolados de *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas obtidos de *Coccus viridi* Green (Hemipetera: Coccidae) em pomares cítricos**. 2002. 52f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

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

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

CAFÉ FILHO, A. C. et al. Dados preliminares sobre controle biológico de amendoim-bravo *(Euphorbia heterophylla)* por fungos. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.2, p.138, 1987.

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

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

COETZEE, J. C.; EICKER, A. The effect of nutricional and environmental factors on the growth and sporulation of a Southern African isolate of *Verticillium fungicola*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 13., 1991, Dublin. **Proceedings…** Dublin: Balkema, 1991. v. 2, p. 417-424.

DIAZ, C. G. **Comparação entre isolados de *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan quando a exigências nutricionais e padrão isoenzimático de esterases.** 1995. 49f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ETEJERE, E. O.; OKOKO, T. A. Seed production, germination and emergence of *Euphobiae heterophylla* L. **Nigerian Journal of Botany**, Ibadan, v.2, p.143–147, 1989.

GARRAWAY, M. O.: EVANS. R. C. **Fungal nutrition and physiology**. New York: J. Wiley, 1984. 401p.

GAZZIERO, D. L. R., YORINORI, J. T. **Experiência sobre controle biológico de *Euphorbiae heterophylla* no Brasil.** Jaboticabal: FUNEP – UNESP, 1993. 11p.

KHALIL, S. K. et al**.** Laboratory on the compatibility of the entomopathogenic fungus *Verticilluim lecanii* with certain pesticides**. Agriculture, Ecosystems and Environment,** Amsterdam, v.13, p.329-334, 1985.

KULKARNI, R. H.; Nielsen, B D. Nutritional requirements for growth of a fungus endophyte of tall fescue grass. **Micology**, New York, v.78, n.5, p.781-786, 1986.

MONTEIRO, A. C. **Aspectos fisioecológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus).** 1988. 233 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

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

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

PONTECORVO, G. et al. The genetics of Aspergillus nidulans. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.

S.A.S. INSTITUTE INC. **User`s guide, release 6, 12 TS LEVEL 0020**. Cary, 1995, p.519-548.

SIKYTA, B. **Methods in industrial microbiology.** Chichester: Ellis Horwood, 1983, 349p.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria Alternta*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.3, p.499-503, 1999.

SINGH, B. P.; TANDON, R. N. Sulfur and phosphorus requirements of *Alternaria tenuis* Auct. Isolated from papaya (Carica papaya L) leaf. **Proceedings of National Academy of Sciences India B,** Allahabad, v.37, p.199-203, 1967a.

SINGH, B. P.; TANDON, R. N. Phosphorus requirements of certain isolates of *Alternaria tenuis* Autct. **Proceedings of National Academy of Sciences India B**, Allahabad, v.37, p.131-134, 1967b.

TABER, R. A. et al. A comparative Nutritional Study of *Alternaria raphani*, *A brassicae*, and *A brassicicola* with Special Reference to *A raphani***. Phytopathology,** v.58, p.607–16, 1968.

THOMAS, K. C. et al. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.33, n.1, p.12-20, 1987.

WENZEL, I. M. **Fatores nutricionais e produção em massa de *Verticillium lecanii* em meios naturais sólidos e líquidos.** 2002. 78f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de Paulista, Jaboticabal, 2002.

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

## CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO DE *Bipolaris euphorbiae* EM MEIOS SÓLIDOS E LÍQUIDOS OBTIDOS DE GRÃO E RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA

**RESUMO –** O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de meios sólidos e líquidos obtidos a partir de grãos ou resíduos da agroindústria, para a produção de *B. euphorbiae*. O fungo foi cultivado por 15 dias a 27 $^{o}$C em ausência de iluminação em meios sólidos obtidos de grãos de arroz, trigo e sorgo, quirela de arroz, milho e trigo, sorgo moído, farelos de arroz, trigo e soja, cascas de mandioca e soja, casca de mandioca + farelo de soja, bagaço de cana e bagaço de cana + amido solúvel, e meios líquidos obtidos de grãos de arroz, sorgo e trigo, quirela de milho, farelos de trigo soja e arroz, cascas de mandioca e soja, vinhaça de cana e água de prensa da mandioca. Para cada tipo de meio organizou-se um ensaio e em cada ensaio avaliou-se a produção, viabilidade e virulência dos conídios. No ensaio com meios líquidos avaliou-se ainda a produção de biomassa micelial. Os meios sólidos se mostram mais adequados em promover a esporulação do fungo, tendo em vista que resultaram na produção de quantidades maiores de conídios do que os meios líquidos. Nos meios sólidos as maiores produções foram obtidas utilizando-se sorgo em grão (474 x $10^6$ con. $g^{-1}$) e casca de soja (472 x $10^6$ con. $g^{-1}$) como substrato, enquanto nos meio líquidos pode ser destacado o farelo de trigo que produziu 1,33 x $10^6$ con. $mL^{-1}$ de meio. A utilização de diferentes substratos e a elaboração de meios sólidos ou líquidos não afetou a viabilidade dos conídios que na maioria dos tratamentos foi maior que 98%. Apenas conídios produzidos nos meios sólidos à base de quirela de arroz, farelo de soja e casca de mandioca + farelo de soja, a viabilidade foi menor e no meio líquido feito a partir de arroz cozido por 5 minutos, foi de 82,7%, mas não diferiu estatisticamente dos demais. Do mesmo modo, a virulência do fungo não foi afetada pela utilização de diferentes substratos e produção dos conídios em meios sólidos ou líquidos.

**Palavras-chaves:** controle biológico, controle de plantas daninhas, produção de conídios, substratos naturais, viabilidade, virulência.

**PRODUCTION OF *Bipolaris euphorbiae* IN SOLID AND LIQUID MEDIUM OBTAINED FROM GRAINS AND AGRICULTURAL INDUSTRY RESIDUES**

**ABSTRACT** - The present work aimed to evaluate the use of residues from agriculture industries as solid and liquid culture media for the production of *B. euphorbiae.* The fungus was cultivated in the dark for 15 days at 27 ºC in different solid media composed by grains of rice, shopped rice, wheat, chopped sorghum, corn, wheat and soybean brans, cassava and soybean peels, cassava peel + soybean bran, sugar-cane bagasse and sugar-cane bagasse + soluble starch. The liquid media were obtained from grains of rice, sorghum and wheat, chopped corn, wheat and soybean, cassava and soybean peels, sugarcane vinasse and water from cassava bran production. For each type of medium a trial was organized and in each trial was evaluated the production, viability and virulence of the produced conidia. In the trial with liquid media it was also evaluated the biomass of micelial. The solid media promoted greater sporulation of the fungus, producing larger amounts of conidia than the liquid media. In the solid media the largest productions were obtained using sorghum grains and soybean peel as substrates (474 x $10^6$ conidia $g^{-1}$ and 472 x $10^6$ conidia $g^{-1}$, respectively), while the wheat bran was the best liquid medium producing 1,33 x $10^6$ conidia $mL^{-1}$ of medium. The use of different substrates and the elaboration of solid or liquid media didn' t affect the viability of the conidia that in most treatments was greater than 98%. Only conidia produced in the solid media composed by chopped rice, soybean bran and cassava + soybean peels the viability was smaller. Conidia produced in liquid media composed by cooked rice presented a viability of 82,7%, but it didn' t differ statistically from the other media. The fungus virulence was not affected by the use of different substrates and the conidial production was also not affected by using either solid or liquid medium.

**Word-keys**: biological control, natural substrates, sporulation, viability, virulence, weed.

## 1- INTRODUÇÃO

O fungo *Bipolaris euphorbiae* é considerado um potencial agente para o controle biológico de *Euphorbia heterophylla.* Embora seja de fácil multiplicação em laboratório (GAZZIERO & YORINORI, 1993), para a introdução de patógeno em programas de manejo de plantas daninhas em cultivos agrícolas é essencial que sejam realizados estudos básicos de sua biologia e interação com o hospedeiro. Além disso, é de fundamental importância que se determine as condições favoráveis para o crescimento e a esporulação do fungo e que seja estabelecida uma metodologia eficiente para a produção massal.

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

A estratégia inundativa de controle biológico requer métodos para a produção de grandes quantidades de propágulos infecciosos, uma vez que grandes áreas serão tratadas, uma ou mais vezes anualmente (TEBEEST,1984). O material usado para obtenção de inóculo deve ser de baixo custo e proporcionar altas concentrações de propágulos viáveis altamente efetivos (ALBOUVETTE et al., 1993). Entre os produtos da agricultura disponíveis e acessíveis destacam as farinhas de soja, milho, amendoim, trigo e peixe, caroço de algodão, água de maceração de milho, resíduos solúveis de destilarias, leveduras de panificação e plantas forrageiras (BOYETTE et al. 1991; CHURCHILL, 1982; MORAES et al. 1991).

Estão disponíveis na literatura trabalhos que estudaram a utilização de substratos alternativos para a produção massal de fungos. VILAS BOAS (1996) utilizou quatro substratos facilmente encontrados em larga escala em Pernambuco, como caupi (*Vigna unguiculata L.*), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), fava (*Phaseolus lunatus* L.) e sorgo (*Sorgum bicolor* L.) para a produção de *Metarhizium anisopliae*. BASTOS et al.

(1976) estudaram o comportamento do mesmo fungo em diferentes meios (farinhas de milho, arroz, trigo e a mistura destes amiláceos) visando obter maior produção de esporos e também substituir os componentes do meio até então utilizados, por serem mais caros e algumas vezes difíceis de serem obtidos. OLIVEIRA (2000) avaliou a produção do fungo entomopatogênico *Sporothrix insectorum* nos seguintes meios líquidos: macerados de feijão de mesa, feijão guandú e soja, extratos de batata, fubá e soja, leite em pó, farelo de trigo e arroz.

Contudo, quando se trata da produção em larga escala de *B. euphorbiae* poucos trabalhos foram realizados. MARCHIORI (1996) verificou que o meio V8-ágar e grãos de arroz mais sorgo, usados como substrato, proporcionaram maior produção e melhor qualidade de conídios do fungo em relação a grãos de girassol. Estudando a viabilidade de esporos de *B. euphorbiae,* GAZZIERO & YORINORI (1990) verificaram que após 14 meses de armazenamento em condições de refrigeração (4º C) a germinação dos esporos puros foi mais lenta e menor em relação àquela obtida com esporos formulados em lactose mantidos em condições de refrigeração.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a utilização de diferentes substratos obtidos a partir de grãos ou resíduos da agroindústria, para a produção de conídios de *B. euphorbiae* em cultura sólida e líquida.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Fungo

Foi utilizado o isolado FCAV# 569 de *B. euphorbiae*, cedido pelo Laboratório de Controle Biológico de Plantas Daninhas Prof. Giorgio de Marinis da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal, inicialmente obtido por pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa em Soja da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNSo), localizado em Londrina - PR .

Para a utilização nos ensaios o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo o Meio Completo de PONTECORVO et al. (1953), cuja formulação descrita por AZEVEDO & COSTA (1973), foi modificada pela troca do açúcar e pela supressão do

extrato de levedura e solução de vitaminas, ficando com a seguinte composição: 6,0g de $NaNO_3$, 1,52g de $KH_2PO_4$, 0,52g de $MgSO_4.7H_2O$, 0,52g de KCl, 0,01g de $FeSO_4$, 0,01g de $ZnCl_4$, 10g de amido, 2,0g de peptona, 15g de ágar e 1000 mL de água destilada. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121 ºC e 1 Kgf $(cm^2)^{-1}$ de pressão, por 20 minutos e a vidraria foi esterilizada em estufa, na temperatura de 180 ºC, durante três horas.

## 2.2 Produção em meios sólidos

Utilizou-se os seguintes substratos: grãos de sorgo, trigo e arroz, quirelas de arroz, milho, trigo, sorgo moído, farelos de arroz, trigo e soja, cascas de soja e mandioca, casca de mandioca (70%) + farelo de soja (30%), bagaço de cana-de-açúcar, bagaço cana-de-açúcar + amido solúvel (1%). O sorgo moído foi obtido pela trituração rápida de grãos em líquificador usando a tecla pulsar. A casca de mandioca foi seca em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C por 48h e em seguida foi manualmente triturada. Esta casca e o bagaço de cana foram peneirados em malha de 4 mm.

Os grãos de sorgo (280g), trigo (240g) e arroz (240g) foram cozidos em água destilada fervente por cinco minutos em fogo brando. As quirelas de arroz (320g), milho (320g) e trigo (200g), sorgo moído (280g), farelos de trigo (160g) e soja (200g) e a casca de soja (80g) foram embebidos em água destilada durante 15 minutos. Para cada substrato utilizou-se água correspondente a três vezes a quantidade de substrato. Em seguida os substratos foram coados em peneira fina para remoção do excesso de água. O bagaço de cana-de-açúcar, a casca de mandioca, a casca de mandioca + farelo de soja e o farelo de arroz receberam as seguintes quantidades de água destilada, respectivamente: 20mL, 30mL, 25mL e 40mL. Tais quantidades foram determinadas em pré-ensaios.

Os substratos foram colocados em frascos erlenmeyers com capacidade para 250 mL, vedados com tampão de algodão recobertos com papel alumínio e autoclavados por 30 minutos. Foram usadas diferentes quantidades de cada substrato, de acordo com suas características, conforme segue: 70g de sorgo em grão, 60g de

trigo em grão, 60g de arroz em grão, 80g de quirela de arroz, 80g de quirela de milho, 50g de quirela de trigo, 70g de sorgo moído, 50g de farelo de arroz, 40g de farelo de trigo, 50g de farelo de soja, 20g de casca de soja, 30g de casca de mandioca, 21g de casca de mandioca + 9g de farelo de soja, 20g de bagaço de cana, 20g de bagaço de cana-de-açúcar + 0,20g de amido solúvel.

Análises químicas realizadas após a autoclavação dos meios sólidos, mostraram a composição expressa na Tabela 1. As determinações de carboidratos solúveis e totais foram realizadas pelo Laboratório de Tecnologia de Produtos Agrícolas do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP e as determinações de nitrogênio e fósforo foram realizadas pelo Laboratório de Química Analítica do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP.

**Tabela 1.** Composição dos meios sólidos preparados a partir de grãos e resíduos agroindustriais.

| Meio sólido | Nutrientes | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Carboidratos solúveis* (g $100g^{-1}$) | Carboidratos totais** (g $100g^{-1}$) | Nitrogênio (mg $Kg^{-1}$) | Fósforo (g $Kg^{-1}$) |
| Sorgo em grão | 0,97 | 68,16 | 872,4 | 3,08 |
| Trigo em grão | 2,01 | 32,36 | 1715,9 | 4,84 |
| Arroz em grão | 0,77 | 63,85 | 489,2 | 2,60 |
| Quirela de arroz | 0,87 | 71,01 | 496,4 | 2,52 |
| Quirela de milho | 0,97 | 58,90 | 843,5 | 2,88 |
| Quirela de trigo | 2,30 | 54,68 | 1327,9 | 4,32 |
| Sorgo moído | 1,59 | 31,71 | 913,3 | 3,16 |
| Farelo de arroz | 7,70 | 32,32 | 1937,6 | 4,28 |
| Farelo de trigo | 3,80 | 21,07 | 537,4 | 5,46 |
| Farelo de soja | 3,30 | 13,36 | 882,0 | 5,43 |
| Casca de soja | 2,37 | 18,18 | 284,5 | 2,95 |
| Casca de mandioca | 4,76 | 54,21 | 327,7 | 1,07 |
| Casca de mandioca + farelo de soja | 6,66 | 41,71 | 532,6 | 2,59 |
| Bagaço de cana-de-açúcar | 1,28 | 1,28 | 273,0 | 2,55 |
| Bagaço de cana-de-açúcar + amido solúvel | 1,20 | 11,25 | 315,0 | 2,98 |

* Carboidratos solúveis (g. glicose $100g^{-1}$)
** Carboidratos totais (g. amido $100g^{-1}$)

## 2.3 Produção em meios líquidos

Os meios líquidos foram preparados a partir dos seguintes substratos naturais: grãos de arroz, sorgo e trigo, quirela de milho, farelos de trigo, soja e arroz, cascas de

mandioca e soja, vinhaça e água de prensa de mandioca. As quantidades de substrato e açúcar utilizados na composição dos meios estão na Tabela 2.

Os meios preparados a partir de grãos de sorgo e trigo, cascas de mandioca e soja foram obtidos por meio do cozimento dos respectivos substratos em autoclave, por 20 minutos. Os meios preparados a partir de quirela de milho, farelos de arroz, trigo e soja foram obtidos por cozimento em água destilada fervente por 10 minutos. Com o arroz se obteve dois meios líquidos, o primeiro pelo cozimento em água destilada fervente por 10 minutos e o segundo pelo cozimento em iguais condições por 30 minutos. Em seguida, todas as preparações foram homogeneizadas em liquidificador por um minuto e filtradas em panos brancos de algodão para retirada das partes grosseiras do material; adicionou-se então as quantidades adequadas de açúcar. A vinhaça e água de prensa da mandioca foram usadas "in natura".

**Tabela 2.** Substratos e açúcares utilizados para elaboração dos meios líquidos preparados a partir de grãos e resíduos da agroindústria. Quantidades usadas em 1.000 mL de água destilada.

| Substrato | Quantidade de substrato (g) | Quantidade de açúcar (g) | |
|---|---|---|---|
| | | Dextrose | Sacarose |
| Arroz em grão (cozido por 5 min.) | 100 | 5 | 0 |
| Arroz em grão (cozido por 30 min.) | 100 | 5 | 0 |
| Sorgo em grão | 100 | 5 | 0 |
| Trigo em grão | 100 | 5 | 0 |
| Quirela de milho | 100 | 5 | 0 |
| Farelo de trigo | 50 | 0 | 10 |
| Farelo de soja | 50 | 0 | 10 |
| Farelo de arroz | 50 | 0 | 10 |
| Casca de mandioca | 100 | 5 | 0 |
| Casca de soja | 100 | 5 | 0 |
| Vinhaça | 100[1] | 0 | 0 |
| Água de prensa da mandioca | 100[1] | 0 | 0 |

[1]Quantidades usadas em mililitros, em lugar de gramas.

Todos os meios foram acrescentados de cloranfenicol (300 mg $L^{-1}$) para evitar a recontaminação bacteriana durante o período de incubação. O pH dos meios foi determinado com ajuda de um potenciômetro, optando-se por manter os valores

originais, sem ajuste. Em cada frasco erlenmeyer com capacidade para 250 mL foram colocados 100 mL de meio, vedados com tampão de algodão e papel alumínio, autoclavando-se em seguida por 30 minutos a 121 ºC.

Análises químicas realizadas após autoclavação dos meios líquidos mostraram a composição expressa na Tabela 3. Tais análises foram realizadas pelos laboratórios mencionados no item 2.2.

**Tabela 3.** Composição dos meios líquidos preparados a partir de grãos e resíduos da agroindústria.

| Meio líquido | pH | Nutrientes | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Carboidratos solúveis* (g 100g$^{-1}$) | Nitrogênio (mg L$^{-1}$) | Fósforo (g L$^{-1}$) |
| Arroz em grão (cozido por 5 min.) | 6,7 | 0,51 | 383,3 | 0,48 |
| Arroz em grão (cozido por 30 min.) | 6,38 | 0,53 | 417,1 | 0,63 |
| Sorgo em grão | 6,19 | 1,09 | 229,1 | 0,91 |
| Trigo em grão | 6,34 | 0,99 | 219,4 | 1,12 |
| Quirela de milho | 5,88 | 0,59 | 870,2 | 2,24 |
| Farelo de trigo | 6,54 | 2,44 | 1439,0 | 2,91 |
| Farelo de soja | 6,32 | 1,62 | 470,1 | 5,53 |
| Farelo de arroz | 6,75 | 1,23 | 1012,4 | 4,49 |
| Casca de mandioca | 6,08 | 1,92 | 200,0 | 0,91 |
| Casca de soja | 5,58 | 0,68 | 344,8 | 2,63 |
| Vinhaça | 4,77 | 4,13 | 229,1 | 0,13 |
| Água de prensa da mandioca | 4,30 | 2,37 | 708,7 | - |

* Carboidratos solúveis (g. glicose 100g$^{-1}$)

## 2.4 Inoculação, incubação e avaliação

A inoculação dos meios sólidos e líquidos foi realizada em câmara de fluxo laminar, por meio de três discos de cinco milímetros de diâmetro, retirados de culturas jovens do fungo, cultivado em placa de Petri contendo Meio Completo de Pontercorvo modificado. A incubação foi realizada a 7 ºC, em ausência de iluminação, por 15 dias. Nos meios líquidos não se usou aeração forçada.

Em ambos os ensaios a avaliação foi feita no 15º dia de cultivo. A produção de conídios nos meios sólidos foi verificada transferindo-se 1g de cada meio de cultura para tubo contendo 9mL de uma mistura (1:1) de solução salina (NaCl a 0,89% p v$^{-1}$) e solução Tween 80 (0,1% v v$^{-1}$). Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos,

determinou-se a quantidade de conídios presentes na suspensão com auxílio da câmara de Neubauer, usando-se diluição adequada quando necessário. Para os meios líquidos a massa micelial formada no frasco de vidro foi vigorosamente agitada por 3 minutos com 15g de pérolas de vidro, e a seguir coada em peneira de 1mm de espessura. O filtrado foi então centrifugado por 2 minutos a 3.000 r.p.m, e o precipitado resuspendido em 10 mL de solução salina esterilizada. Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubos, o número de conídios foi determinado como já descrito.

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

Para a avaliação da viabilidade foram utilizadas as mesmas suspensões de conídios anteriormente preparadas. Usou-se lâminas de microscopia, cuja assepsia foi realizada 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 colocou-se dois palitos paralelamente dispostos na posição horizontal. A superfície de cada lâmina foi então recoberta com 3 mL de BDA, e em seguida colocou-se em cada campo uma gota (aproximadamente 0,05 mL) da suspensão de conídios. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada a 27 ºC. Após 12 horas o processo de germinação foi interrompido, pingando-se uma gota de corante (1g de azul de metileno em 20 mL de ácido lático transferindo-se, em seguida, 1 mL desta solução estoque para 29 mL de ácido lático) em cada campo. Foram contados 150 conídios por campo, entre germinados e não germinados, estabelecendo-se uma proporção.

A virulência de *B. euphorbia* para *E. heterophylla*, foi avaliada utilizando as mesmas suspensões de conídios anteriores, com diluições quando necessário. O teste foi conduzido em casa-de-vegetação; as sementes de amendoim bravo foram semeadas em vasos de plástico, contendo mistura de solo e substrato PlantMax, na proporção de 2:3. A irrigação foi realizada uma vez por dia, procurando-se manter a

umidade adequada ao crescimento das plantas. Quando as plantas apresentavam de quatro a oito folhas foram inoculadas com 9mL de suspensão padronizada em $10^5$ con. $mL^{-1}$, pulverizada sobre toda a parte aérea da planta com auxílio de pulverizador manual. As aplicações foram efetuadas no final do dia para evitar a ocorrência de temperaturas muito elevadas, que no período experimental, variaram de 22 a 24 ºC. Feita a inoculação, as plantas foram acondicionadas em câmara úmida por 14 horas. Após sete dias**,** as plantas foram cuidadosamente removidas dos vasos e separadas as raízes, caules e folhas. Efetuaram-se determinações do peso da matéria fresca de cada parte, as quais foram em seguida colocadas em estufa de renovação forçada de ar a 70 ºC, para avaliação da biomassa seca até peso constante.

### 2.5 Análise estatística dos dados

Em todos os ensaios foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e para execução das análises utilizou o programa SAS. Todos os ensaios foram conduzidos usando-se quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% probabilidade.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Produção de conídios em meios sólidos

A produção de conídios pelo fungo foi significativamente maior nos meios elaborados à base de sorgo em grão e casca de soja, quando comparado com os demais substratos. Entre estes não se verificou diferença estatística quanto a promoção da produção de conídios (Tabela 4).

Conforme verificado no capítulo 2, *B. euphorbiae* apresentou alta habilidade de usar amido como fonte de carbono. Pela Tabela 1 se verifica que houve uma grande variação no conteúdo de carboidratos solúveis, carboidratos totais, nitrogênio e fósforo dos meios. O meio de sorgo em grão apresentou alto conteúdo de carboidratos totais (amido) (68,16g $100g^{-1}$), nitrogênio (872,4g $kg^{-1}$) e fósforo (3,08g $kg^{-1}$), mas estes

valores foram acentuadamente menores para o meio de casca de soja (18,18g $100g^{-1}$, 284,5g $kg^{-1}$ e 2,95g $kg^{-1}$, respectivamente). Apesar deste fato, é provável que ambos apresentem as relações nutricionais mais balanceadas para o desenvolvimento do fungo, pois proporcionaram as maiores produções de conídios.

Segundo CARLILE & WATKINSON (1994), um meio balanceado deverá conter cerca de dez vezes mais carbono do que nitrogênio. Nos meios de arroz em grão, quirelas de arroz e trigo e casca de mandioca, se observou uma grande variação principalmente nos conteúdos de carboidratos totais e nitrogênio, possivelmente resultando em relações nutricionais menos balanceadas para o fungo, o que não favoreceu a produção de conídios.

Avaliando a produção massal de *B. euphorbiae,* MARCHIORI (1996) observou que o meio V8-agar e grãos de arroz e sorgo, usados como substratos, proporcionaram maior produção e qualidade dos esporos em relação aos grãos de girassol. NAHAS & ARAI (1987) testaram diferentes meios semi-sintéticos e meios naturais para o crescimento e esporulação do fungo entomopatogênico *B. bassiana*. Entre os meios naturais foram testados farelos de trigo, soja e arroz, sendo que o farelo de trigo proporcionou a maior esporulação do fungo (13,40 x $10^9$ esporos placa de $cultivo^{-1}$). WENZEL (2002) verificou que os isolados JAB 02 e JAB 45 de *V. lecanii* produziram maior quantidade de conídios nos meios obtidos a partir de farelo de soja (25,75 e 17,96 x $10^7$ con. $g^{-1}$, respectivamente), farelo de trigo (19,30 e 13,16 x $10^7$ con. $g^{-1}$, respectivamente) e trigo moído (16,0 e 18,50 x $10^7$ con. $g^{-1}$, respectivamente).

O resultado do teste de viabilidade mostrou que os conídios produzidos nos meios elaborados com farelo de soja, casca de mandioca + farelo de soja e quirela de arroz apresentaram menor capacidade de germinação, diferindo estatisticamente entre si e dos conídios produzidos nos demais meios (Tabela 4). Tal fato foi mais evidente nos meios contendo farelo de soja, sugerindo que este substrato tenha carência de algum fator nutricional importante para a conidiogênese, o que pode ter ocasionado deficiência morfológica ou fisiológica, que levou à baixa porcentagem de germinação. A porcentagem de germinação dos conídios produzidos nos demais meios foi alta, não havendo diferença estatística na viabilidade.

Para que possam ser utilizados em programas de manejo integrado, recomenda-se que os conídios dos fungos tenham viabilidade acima de 90%. Este fato ocorreu com os conídios produzidos na maioria dos meios avaliados neste trabalho, assim como nos meios de milho de pipoca, milho + arroz, milho + sorgo, sorgo + arroz, além de sorgo e arroz somente (MARCHIORI, 1996). No entanto, no estudo de WENZEL (2002) apenas os conídios dos isolados JAB 02 e JAB 45 de *V. lecanii* produzidos no meio de lentilha em grão, apresentaram viabilidade maior que 90%.

**Tabela 4-** Produção e viabilidade de conídios de *Bipolaris euphorbiae* obtidos em meios sólidos preparados a partir de grãos e resíduos agroindustriais.

| Meio sólido | N° de conídios x $10^6$ (g de substrato)$^{-1}$ | Viabilidade (%) |
|---|---|---|
| Sorgo em grão | 474,0A | 99,63A |
| Arroz em grão | 2,9B | 99,41A |
| Trigo em grão | 1,6B | 99,35A |
| Sorgo moído | 5,7B | 98,71A |
| Quirela de arroz | 5,7B | 85,10B |
| Quirela de milho | 3,5B | 99,27A |
| Quirela de trigo | 21,5B | 99,69A |
| Farelo de trigo | 8,1B | 99,05A |
| Farelo de arroz | 6,2B | 99,19A |
| Farelo de soja | 6,2B | 19,38D |
| Casca de mandioca + farelo de soja | 2,8B | 61,02C |
| Casca de mandioca | 13,5B | 98,82A |
| Casca de soja | 472,0A | 99,46A |
| Bagaço de cana-de-açúcar | 1,8B | 99,38A |
| Bagaço de cana-de-açúcar + amido solúvel | 1,7B | 99,30A |
| Valor de F | 17,38** | 89,4** |
| C.V.(%) | 115,10 | 5,18 |

Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+1).
Médias seguidas por pelo menos uma letra maíuscula em comum, dentro da coluna de cada fator analisado, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.
**Significativo 1% probabilidade.

A virulência do fungo não foi afetada pela produção nos diferentes meios sólidos, pois todas as plantas pulverizadas com conídios produzidos nos diferentes meios manifestaram sintomas característicos de infecção pelo fungo, como necrose nas folhas e desfolhamento parcial, no 7° dia após inoculação. Tais sintomas, entretanto, não foram verificados nas plantas testemunhas. Os resultados referentes ao

peso da matéria fresca e seca das raízes, dos caules e das folhas de *E. heterophylla,* encontram-se na Tabela 5.

Quando se considerou o peso da matéria fresca e seca das raízes e do caule verificou-se que não houve diferença estatística entre os diversos tratamentos e a testemunha. Isso significa que a ação do fungo, durante o período avaliado, foi insuficiente para ocasionar maiores danos nestas partes da plantas, independentemente dos meios em que os conídios foram produzidos. Em alguns tratamentos, como conídios produzidos em quirela de trigo e arroz em grão, observou-se uma ação mais pronunciada do fungo em relação ao peso fresco das raízes, mas ainda insuficiente para diferir da testemunha.

**Tabela 5.** Peso fresco e seco da raiz, caule e folhas de *Euphorbia heterophylla* obtidos sete dias após a inoculação com *Bipolaris euphorbiae*.

| Meio sólido | Peso fresco (g) | | | Peso seco (g) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Raízes | Caule | Folha | Raízes | Caule | Folha |
| Testemunha | 1,95AB | 2,48AB | 2,55A | 0,15A | 0,13A | 0,38A |
| Sorgo em grão | 2,65A | 1,91AB | 0,47B | 0,17A | 0,10A | 0,08B |
| Arroz em grão | 0,85B | 1,62AB | 0,54B | 0,06A | 0,06A | 0,07B |
| Grão de trigo | 2,09AB | 1,73AB | 0,80AB | 0,17A | 0,07A | 0,13AB |
| Sorgo moído | 1,82AB | 3,50A | 1,01AB | 0,13A | 0,17A | 0,14AB |
| Quirela de arroz | 1,82AB | 1,70AB | 0,91AB | 0,07A | 0,07A | 0,12AB |
| Quirela de milho | 1,11AB | 2,28AB | 1,12AB | 0,07A | 0,10A | 0,12AB |
| Quirela de trigo | 0,83B | 1,84AB | 0,62AB | 0,09A | 0,11A | 0,13AB |
| Farelo de trigo | 1,55AB | 2,90AB | 1,92AB | 0,13A | 0,15A | 0,25AB |
| Farelo de arroz | 1,27AB | 2,91AB | 1,42AB | 0,11A | 0,15A | 0,20AB |
| Farelo de soja | 1,27AB | 1,45B | 0,92AB | 0,15A | 0,09A | 0,13AB |
| Casca de mandioca + farelo de soja | 1,11AB | 2,32AB | 1,62AB | 0,10A | 0,13A | 0,20AB |
| Casca de mandioca | 1,64AB | 3,11AB | 1,46AB | 0,13A | 0,17A | 0,18AB |
| Casca de soja | 1,35AB | 2,85AB | 1,17AB | 0,10A | 0,07A | 0,24AB |
| Bagaço de cana-de-açúcar | 1,32AB | 2,63AB | 1,81AB | 0,10A | 0,13A | 0,24AB |
| Bagaço de cana-de-açúcar + amido solúvel | 1,01AB | 1,81AB | 1,44AB | 0,07A | 0,10A | 0,18AB |
| Valor de F | 2,57** | 2,85** | 2,39** | 1,98* | 2,72** | 2,31* |
| C.V.(%) | 28,67 | 18,22 | 42,05 | 40,86 | 37,41 | 49,92 |

Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+1).
Médias seguidas por pelo menos uma letra maíuscula em comum, dentro da coluna de cada fator analisado, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.
*Significativo a 5%, **Significativo 1% probabilidade.

Analisando o peso fresco e seco das folhas verificou-se que a ação do fungo produzido nos meios de sorgo e arroz em grão foi mais intensa, pois ocasionou redução

dos respectivos pesos, que diferiram estatisticamente em relação à testemunha. Este fato sugere que o meio de cultura possa afetar a virulência do fungo, mas estes dados são insuficientes para uma melhor avaliação do fenômeno.

Trabalhos que analisaram a ação de meios de cultivo na virulência de B. euphorbiae não foram encontrados na literatura. GAZZIERO & YORINORI (1993) verificaram que as concentrações de 2 x $10^5$ e 1 x $10^6$ con. $mL^{-1}$ provocam maiores reduções na matéria seca do caule que concentrações menores, enquanto a aplicação de surfatantes em mistura com *B. euphorbiae* não promoveu redução significativa na matéria seca de raízes, caules e folhas de *E. heteroplylla* em relação à testemunha (TOFFANELLI, 1997).

### 3.2 Produção de biomassa micelial e de conídios em meios líquidos

Como se observa pela Tabela 6, houve diferença significativa entre os meios líquidos quanto a capacidade de promover o crescimento do fungo.

**Tabela 6.** Biomassa micelial, produção e viabilidade dos conídios de *Bipolaris euphorbiae* em diferentes meios líquidos

| Meio líquido | Peso seco (g) | Nº de conídios x $10^6$ (mL de meio)$^{-1}$ | Viabilidade (%) |
|---|---|---|---|
| Sorgo em grão | 0,35BC | 0,35AB | 99,38A |
| Arroz em grão (cozido por 5 min.) | 0,26C | 0,04B | 82,71AB |
| Grão de arroz (cozido por 30 min.) | 0,30BC | 0,34AB | 99,66A |
| Trigo em grão | 0,36BC | 0,21AB | 99,38A |
| Quirela de milho | 0,42B | 0,18AB | 98,96AB |
| Farelo de arroz | 0,61A | 0,17AB | 99,82A |
| Farelo de soja | 0,70A | 0,06B | 99,66A |
| Farelo de trigo | 0,73A | 1,33 A | 99,85A |
| Casca de mandioca | 0,36BC | 0,34AB | 99,51A |
| Casca de soja | 0,23C | 0,02B | 98,74AB |
| Água de prensa da mandioca | 0,09D | - | - |
| Vinhaça | 0,06D | - | - |
| Valor de F | 55,22** | 68,36** | 2,43* |
| C.V.(%) | 13,75 | 4,5 | 6,95 |

Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+1).
Médias seguidas por pelo menos uma letra maíuscula em comum, dentro da coluna de cada fator analisado, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.*Significativo a 5%, **Significativo 1% probabilidade.

Os meios elaborados a partir de farelo de arroz, de soja e de trigo proporcionaram formação de maior biomassa micelial de *B. euphorbiae*, diferindo estatisticamente dos demais. Com relação a esporulação a produção de conídios obtida nos meios de arroz em grão cozido por 5 minutos, farelo de soja e casca de soja, foram significativamente menores.

Nos meios preparados à base de vinhaça e água de prensa da mandioca a formação de biomassa foi muito reduzida e não houve produção de conídios, mas isso provavelmente foi conseqüência do baixo pH dos meios que não foram corrigidos.

Analisando o crescimento de *M. anisopliae* em meios de cultura líquidos CRUZ et al. (1983) verificaram que o meio à base de feijão proporcionou a melhor esporulação do fungo. ALVARENGA et al. (1988) avaliaram a produção de *M. anisopliae e B. bassiana* em meios líquidos feitos a partir de três variedades de feijão de mesa (Carioca, Carioca 80 e Jalo), feijão guandú, soja e grão de bico. Os melhores meios para produção de conídios dos fungos foram feijão carioca, feijão jalo e soja. Resultado semelhante foi obtido por WENZEL (2002) para o isolado JAB 02 de *V. lecanii* cultivado em meio de feijão branco e soja, enquanto para o isolado JAB 45 o meio de farelo de trigo foi destacado com o mais promissor. THOMAS et al. (1987) observaram que a produção de conídios de *B. bassiana* em meio líquido isento de fósforo, foi dez vezes menor que a observada quando fosfato estava presente em meio de cultivo.

De acordo com a Tabela 3, as maiores quantidades de carboidratos solúveis, nitrogênio e fósforo foram encontradas no meio de farelo de trigo, que proporcionou maior formação de biomassa e conídios, sugerindo que neste meio a proporção entre tais nutrientes seja mais equilibrada para o desenvolvimento do fungo. As quantidades destes nutrientes nos demais meios variaram bastante, o que não permitiu identificar, com clareza, uma maior adequação de suas composições para o crescimento e esporulação do fungo. O conteúdo de carboidratos totais dos meios líquidos não pode ser determinado durante a análise, devido a sua baixa concentração. É possível que a maior parte destes carboidratos tenha sido retida durante a filtragem em panos de algodão, mas este procedimento foi necessário para remover partes grosseiras do material.

A composição dos meios líquidos não afetou a viabilidade dos conídios, pois, como se observa pela Tabela 6, não houve diferença significativa na porcentagem de germinação dos conídios produzidos nos diversos meios.

Como já havia sido observado para os meios sólidos, a virulência do fungo não foi afetada pela produção nos diferentes meios líquidos, pois todas as plantas pulverizadas com conídios produzidos nos diferentes meios manifestaram sintomas característicos de infecção no 7º dia após inoculação, fato este não observado nas plantas testemunhas.

Os resultados referentes ao peso da matéria fresca e seca das raízes, dos caules e das folhas de *E. heterophylla,* encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7.** Peso fresco e seco das partes da planta que restaram 7 dias após a inoculação com *Bipolaris euphorbiae*.

| Substrato | Peso fresco (g) | | | Peso seco (g) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Raízes | Caule | Folhas | Raízes | Caule | Folhas |
| Testemunha | 1,69 | 2,55 | 2,31A | 0,33 | 0,24 | 0,33 |
| Sorgo em grão | 2,28 | 3,51 | 0,63AB | 0,41 | 0,41 | 0,15 |
| Arroz em grão (cozido 5 min.) | 2,90 | 3,86 | 0,85AB | 0,36 | 0,35 | 0,33 |
| Arroz em grão (cozido 30 min.) | 0,63 | 1,94 | 0,46B | 0,21 | 0,24 | 0,18 |
| Trigo em grão | 1,11 | 2,73 | 0,46B | 0,28 | 0,28 | 0,19 |
| Quirela de milho | 2,16 | 4,03 | 0,97AB | 0,34 | 0,34 | 0,27 |
| Farelo de trigo | 2,14 | 3,66 | 0,69AB | 0,33 | 0,33 | 0,25 |
| Farelo de arroz | 1,38 | 3,75 | 0,94AB | 0,20 | 0,39 | 0,25 |
| Farelo de soja | 1,38 | 2,30 | 0,37B | 0,20 | 0,20 | 0,24 |
| Casca de mandioca | 2,22 | 3,43 | 0,84AB | 0,33 | 0,33 | 0,26 |
| Casca de soja | 1,70 | 4,17 | 0,46B | 0,37 | 0,37 | 0,27 |
| Valor de F | 1,84NS | 1,63NS | 2,63* | 0,67NS | 1,18NS | 0,86NS |
| C.V. (%) | 37 | 20,99 | 52,18 | 64,71 | 37,01 | 38,49 |

Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em log (x+1).
Médias seguidas por pelo menos uma letra maíuscula em comum, dentro da coluna de cada fator analisado, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.
NS Não significativo, *Significativo a 5%.

A análise desta tabela mostrou que a ação do fungo foi detectada apenas em relação ao peso fresco das folhas, onde se observou valores significativamente menores que os

obtidos na testemunha, nos tratamentos com conídios produzidos nos meios trigo em grão, arroz cozido por 30 minutos, casca de soja e farelo de soja.

Para os três últimos meios, o mesmo fato já havia sido detectado quando estes substratos foram usados para elaboração de meios sólidos, mas não podem ser considerados suficientes para argumentar em favor de um possível efeito da composição dos meios na virulência do fungo.

*B. euphorbiae* tem sido destacado como um promissor agente de controle de *E. heterophylla*. Para viabilizar o seu emprego em condições de campo há necessidade de produzir grandes quantidades de conídios do fungo que são os propágulos adequados para infectar e promover o desenvolvimento da doença na planta. Neste sentido, a utilização de meios sólidos se mostrou mais adequada, tendo em vista que resultou na produção de quantidades maiores de conídios do que os meios líquidos.

## 4. CONCLUSÕES

a) A produção de conídios por *B. euphorbiae* é influenciada pelo tipo de meio de cultura e substrato utilizados para elaboração dos meios. O sorgo em grão e a casca de soja mostraram ter a composição nutricional mais adequada para promover a esporulação do fungo em cultura sólida, e em meio líquido o farelo de trigo pode ser destacado como o substrato mais satisfatório.

b) A viabilidade e a virulência do fungo não são afetadas pelo tipo e composição nutricional dos meios de cultura avaliados neste trabalho.

## 5. REFERÊNCIAS

ALBOUVETTE, C. et al. Recent advances in the biological control of *Fusarium*. **Pesticide Science**, v.37, p.365–73, 1993.

ALVARENGA, A.R.M. et al. Novos testes de cultivo de fungos utilizados em controle biológico usando meios de cultura naturais líquidos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.55, n.1-4, p. 31-35, 1988.

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

BASTOS, C. N. et al. Esporulação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., em meios de cultura de diferentes composições. **Boletim do Instituto Biológico da Bahia,** v.15, n.1, p.9-11, 1976.

BOYETTE, C. D. et al. Progress in the production, formulation and application of mycoherbicides. IN: TEBEEST, D. O. **Microbial control of weeds.** New York: Chapman and Hall, 1991, p.209–222.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. Fungal cells and vegetative growth. **The Fungi**. London: Academic Press, 1994, p.125-128.

CHURCHILL, B. W. Mass production of microoganisms for biological control of weeds with plant pathogens. IN: CHARUDATTAN, R.; Walker, H. L. **Biological control of weeds with plant pathogens**. New York: John Wily & Sons, 1982, p.139–56.

CRUZ, B. P. B. et al. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em meios de cultura naturais, líquidos. **Biológico**, São Paulo, v.49, n.5, p.111-116, 1983.

GAZZIERO, D. L. P.; YORINORI, J. T. Control of milk weed (*Euphorbia heterophylla*) with *Helminthosporium* sp. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTRL OF WEEDS, 8., 1990, Roma. **Proceeding**... Roma. 1990. p.571-576.

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

JACKSON, M. A. et al. Fermentation strategies for improrring the fitness of a bioherbicide. **Weed Technology**, v.10, n.3, p.645–50, 1996.

MARCHIORI, R. **Produção de inóculo de** *Bipolaris euphorbia* **(Muchovey & Carvalho, 1989) e sua atividade no controle biológico de** *Euphorbiae heterophylla* **L. (amendoim-bravo)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MORAES, I. O. et al. Multiplicação de agentes de controle biológico. In: BETTIOL, W**. Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguaríuma. EMBRAPA – CNPDA, 1991. p.253-272. (Documentos, 15).

NAHAS, E.; ARAI, N. N. S. Crescimento e esporulação de *Beauveria bassiana* em vários meios e condições de cultivo. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.18, n.1, p.77-82, 1987.

OLIVEIRA, S. M. C. de. **Exigências físicas e nutricionais para produção de** *Sporothix insectorum* **em meios de cultura líquidos**. 2000. 45f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in genetics**, V.5, p.141-238, 1953.

*S*.A.S. INSTITUTE INC. **User`s guide, release 6, 12 TS LEVEL 0020**. cary, 1995. p.519-548.

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

THOMAS, K. C. et al. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.33, n.1, p.12-20, 1987.

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

VILAS BOAS, A. M. et al. Diversificação de meios de cultura para a produção de fungos entomopatogênicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia,** Curitiba, v.39, n.1, p.123-128, 1996.

WENZEL, I. M. **Fatores Nutricionais e Produção em massa de** *Verticillium lecanii* **em meios naturais sólidos e líquidos.** 2002. 78f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de Paulista, Jaboticabal, 2002.

# Livros Grátis

( http://www.livrosgratis.com.br )

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo