

UMA CEPA FITOPATOGÊNICA DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* PENZ, PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO*R Cesnik¹, M.F.S. Teixeira², M.L. Vera³, R. de O. Moraes⁴, T.C. Vidaurre⁵¹Embrapa Meio Ambiente, CP, 69, CEP: 13820-970, Jaguariúna, SP, Brasil. E-mail: cesnik@cnpma.embrapa.br

RESUMO

Colletotrichum gloeosporioides tem sido empregado, com sucesso, no controle de *Orthezia praelonga*, um inseto que tem causado inúmeros prejuízos à cultura dos citros em todo Brasil. Ele causa o enfraquecimento das plantas diminuindo o valor econômico do pomar. Como forma de contribuir para um melhor conhecimento sobre a morfologia e desenvolvimento desse fungo, por fermentação no estado sólido, realizou-se um experimento com arroz pré-cozido e esterilizado a 120° C, durante 20 minutos, em três repetições, seguindo delineamento experimental que incluiu concentrações diferentes de açúcar e quantidades de água, no meio de cultivo. A inoculação com esporos do fungo, produzido em meio sólido, foi seguida da fermentação a 28° C durante seis dias, em estado estacionário. Após esse período, as estruturas vegetativas e de reprodução foram desintegradas manualmente. Os resultados de concentração de conídios indicaram que as proporções de água e açúcar influenciaram na produtividade e na viabilidade dos esporos.

PALAVRAS-CHAVE Fermentação no estado sólido, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Ortheziapraelonga*.

ABSTRACT

ENTOMOPATHOGEN STRAIN OF *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* PENZ, PRODUCED BY SOLID FERMENTATION. *Colletotrichum gloeosporioides* has been used successfully for the control of *Orthezia praelonga*, an insect that causes several damages to citrus crops all over Brazil. It causes plant weakness, reducing the orchard economic value. As a contribution to a better knowledge on the morphology and the development of this fungus, by solid fermentation, an experiment was carried out, utilizing pre-cooked rice, sterilized at 120° C, for 20 minutes, in three repetitions, according to an experimental design that included different sugar concentrations and different water quantities in the culture media. The inoculation with fungi spores, produced in a solid media, was followed by a 28° C fermentation, for six days, in a stationary state. After this period, the vegetative structures and the reproductive ones were manually disintegrated. The results of the conidia concentration showed that the proportions of water and sugar influenced the productivity and the viability of the spores.

KEY WORDS: Semi solid fermentation, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Orthezia praelonga*.

INTRODUÇÃO

Uma cepa entomopatogênica de *Colletotrichum gloeosporioides*, produzida por fermentação sólida, tem sido empregada com sucesso, como bioinseticida, na forma de suspensão aquosa de 10⁶ esporos/mL, no controle da *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 (Hemiptera, Ortheziidae). A ortézia é uma cochonilha

que tem causado inúmeros prejuízos à cultura dos citros principalmente nos Estados do Rio de Janeiro, de São Paulo e de Sergipe (CESNIK & FERRAZ, 2000). Há registros também de estragos em limão 'Tahiti' no sul de Minas Gerais e em acerola no Estado do Ceará.

Os danos causados por essa cochonilha são decorrentes não só devido à sucção da seiva e da introdução de toxinas nas plantas, mas também por pro-

²Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.³PROIMI - Biotecnología (Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos) San Miguel de Tucumán, Argentina.⁴Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ FCF, São Paulo, SP, Brasil.⁵Cyrbe do Brasil Ltda., Sumaré, SP, Brasil.

*Trabalho parcialmente financiado pelo CNPq e Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia.

porcionar o aparecimento e a multiplicação do *Capnodium* sp., conhecido vulgarmente como 'fumagina', fungo preto que utiliza a exudação do inseto, como fonte de nutrientes para a sua manutenção. A fumagina ao recobrir as partes verdes do vegetal dificulta a realização da fotossíntese e de suas trocas gasosas. A somatória dessas ações prejudicam direta e indiretamente a cultura, reduzindo a qualidade dos frutos, causando o enfraquecimento da planta. Por isso, o valor econômico do pomar fica diminuído (CESNIK, 2002).

Entre as diversas medidas fitossanitárias indicadas para combater insetos, o controle biológico com fungos entomopatogênicos é uma estratégia que reduz os danos causados por eles sem agredir o meio ambiente. O biocontrole de *O. praelonga* vem sendo realizado através da aplicação de fungos entomopatogênicos, tais como: *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Metarhizium anisopliae* e *Verticillium lecani* (PRATES et al., 2002). Dos fungos citados, *C. gloeosporioides* tem demonstrado ser um eficiente biocontrolador de *O. praelonga* quando pulverizado na forma de bioinseticida, contendo 10^6 esporos/mL, na dosagem de cerca de um litro por planta (CESNIK & FERRAZ, 2000). Deve-se repetir as aplicações de 3 em 3 meses por causa das reincidências. *C. gloeosporioides* ainda não foi constatado controlando qualquer outro inseto que não seja a *O. praelonga*. Como forma de contribuir sobre fungos utilizados em controle biológico, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo preliminar da morfologia em diferentes meios e a produção de *C. gloeosporioides* por fermentação no estado sólido.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas culturas de *C. gloeosporioides*, existentes no Laboratório de Entomologia da Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna, SP. Uma cultura estoque de 4 meses e 5 dias, mantida em meio natural (ágar, batata e dextrose) e preservada sob refrigeração, foi utilizada como ponto de partida.

Os meios de cultura utilizados para o estudo da morfologia de *C. gloeosporioides*, neste experimento, foram: ágar, batata e dextrose (BDAn); ágar, batata e dextrose - produto sintético (BDAs) e ágar, peptona e glicose (GPA). Os meios foram esterilizados a 120°C, durante 20 minutos. Na superfície dos diferentes meios, em placas de Petri de 100 mm x 9 mm, foi semeado um disco de cultura tendo um diâmetro de 13,6 mm. Os cultivos foram mantidos a 28°C por 5 dias e o crescimento do fungo observado a cada 24 horas e determinado através de um medidor de área da marca LI-COR, modelo 3100.

No processo de fermentação no estado sólido, *C. gloeosporioides* foi cultivado em 50 g de arroz, pré-cozido e esterilizado a 120°C, durante 20 minutos, em bolsas plásticas próprias para autoclavagem com o seguinte delineamento experimental: 1) 0,0 g de açúcar e 10 mL de água; 2) 0,0 g de açúcar e 20 mL de água; 3) 3,0 g de açúcar e 10 mL de água; 4) 3,0 g de açúcar e 20 mL de água; 5) 1,5 g de açúcar e 15 mL de água; 6) 1,5 g de açúcar e 15 mL de água; 7) 1,5 g de açúcar e 15 mL de água. Foi utilizada água destilada.

Para obtenção dos cultivos foram retirados 2,0 mL de uma suspensão de esporos (10^6) e inoculados em 50 g de arroz (ensaios: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7). O inóculo foi homogeneizado, manualmente, no substrato. A fermentação foi realizada a 28°C, mantida em estado estacionário e após 6 dias, nos diferentes tratamentos, as estruturas vegetativas e de reprodução foram desintegradas.

A estimativa da produtividade de *C. gloeosporioides* foi determinada por contagem de esporos (conídios) em Câmara de Neubauer, numa suspensão de esporos (diluição 10^{-2}) preparada a partir da diluição do fermentado em quirera de arroz, colocada em 100 mL de água destilada esterilizada.

A viabilidade dos conídios foi determinada na suspensão utilizada para inoculação no substrato sólido e na diluição do fermentado em quirera.

Os dados foram obtidos através de um planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central. Sua análise foi feita através do programa computacional Statistica for Windows (Statsoft, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no cultivo de *C. gloeosporioides* estão demonstrados na Figura 2 e as análises estatísticas realizadas para a determinação do seu crescimento, em diferentes meios de cultura sólida estão anotados na Tabela 1 e na Figura 1.

Tabela 1 - Produção e viabilidade de conídios de *C. gloeosporioides* em arroz.

Tratamentos	Conídios/g de substrato seco (Con/g)	log (Con/g)	Viabilidade 5%
1	$1,0 \times 10^7$	7,0000	19,0
2	$1,9 \times 10^7$	7,2788	22,0
3	$1,8 \times 10^7$	7,2553	11,0
4	$4,1 \times 10^7$	7,6128	51,4
5	$2,5 \times 10^7$	7,3979	26,0
6	$2,7 \times 10^7$	7,4314	27,0
7	$3,3 \times 10^7$	7,5185	35,0

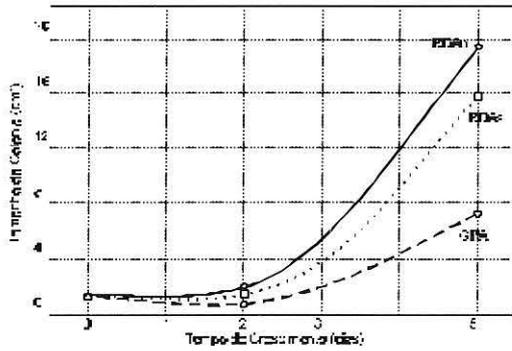


Fig. 1 - Crescimento de *C. gloeosporioides* em diferentes meios de cultura.

Pela análise estatística o meio que favoreceu melhor o crescimento foi o BDAa, meio no qual a colônia atingiu 19,34 cm² de área, em dias (Fig. 1). Comparando as características morfológicas observou-se que a textura do micélio em BDAa, BDAe e BDAc apresentou coloração e textura distintas, sendo que o micélio em BDAa se apresentou em dois setores, um de textura glabrosa e outro algodinoso. Essa morfologia que a espécie expressou em BDAs indica variabilidade genética, característica de isolados não monospóricos.

A análise estatística demonstrou que há diferenças significativas, ao nível de confiança de 95%, para os níveis de água e açúcar utilizados nos tratamentos. Assim sendo, à medida em que se aumentou a concentração do açúcar e o volume da água, houve uma produção maior do fungo estudado. A partir dos resultados foi possível construir um modelo empírico para prever a produtividade do sistema dentro dos níveis estudados, qual seja:

$$\log(\text{Con/g}) = 7,3564 + 0,1473 \times \text{água} + 0,1591 \times \text{açúcar}$$

± 0,01012 ± 0,1339 ± 0,1339

onde:

Con/g = conídios por grama de substrato seco;

água = valor codificado da água (de -1 a 1);

açúcar = valor codificado do açúcar (de -1 a 1);

Obs: os valores abaixo de cada coeficiente são seus erros embutidos no modelo.

Ao sexto dia, o valor de produção de conídios foi mais expressivo no tratamento 4, onde se utilizou 3,0 g de açúcar e 20 mL de água, ou seja o tratamento com

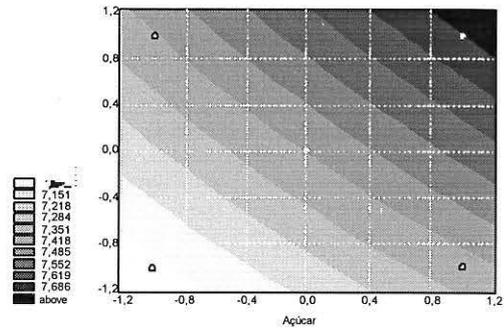


Fig. 2 - Produção de *C. gloeosporioides* em diferentes meios de cultura.

maior quantidade de açúcar e volume de água, condição essa que viabilizou a maior produtividade de *C. gloeosporioides*.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que: 1) trata-se de um isolado que apresentou variabilidade de estruturas vegetativas e de reprodução; 2) para melhor visualizar os resultados, deve-se preferir tratamentos a partir de culturas monospóricas; 3) as proporções de água e de açúcar têm efeito significativo na produtividade e na viabilidade dos esporos, dentro do campo estudado para o nível de confiança de 95%; 4) é possível obter um modelo empírico para prever a produção do sistema dentro do campo estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CESNIK, R. Disseminação da *Orthezia praelonga* em pomares de citros e seu controle biológico. *Citricultura Atual*, v.5, n.26, p.6-7, 2000.
- CESNIK, R. & FERRAZ, J.M.G. *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 (Hemiptera: Ortheziidae: biologia, controle químico e biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 27p. (Boletim de Pesquisa, 9)
- PRATES, H.S.; CESNIK, R.; ALVES, S.B. Controle da *Orthezia praelonga* em citros. *Coopercitrus Informativo Agropecuário*, v.16, n.183, p.16-17, 2002.
- STATSOFT. *Statistica for windows* (Programa Computacional para Análise Estatística). Versão 5.0. Oklahoma: Microsoft, 1995.