

AVALIAÇÃO DA ESPORULAÇÃO DE *Bionectria ochroleuca* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURAS

EVALUATION OF THE *Bionectria ochroleuca* SPORULATION IN DIFFERENT CULTURE MEDIA

Haroldo Antunes CHAGAS¹; Daniel Dias ROSA²; Marco Antonio BASSETO²; Mauricio Dutra ZANOTTO³; Edson Luiz FURTADO³

1. Engenheiro Agrônomo, Mestrando do curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Agrônomicas – FCA, campus Botucatu, Botucatu, SP, Brasil. 2. Engenheiro Agrônomo, Doutorando do curso de Pós-graduação em Agronomia UNESP- FCA, Botucatu, SP, Brasil. 3. Professor, Doutor, UNESP – FCA, Botucatu, SP, Brasil. elfurtado@fca.unesp.br.

RESUMO: O controle biológico de uma doença fúngica consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) para o controle do agente causal da doença. Dentre os possíveis agentes de biocontrole, um fungo vem se destacando como promissor, sendo conhecido como *Clonostachys rosea*, forma assexuada de *Bionectria ochroleuca*. Para isto há a necessidade da produção *in vitro* de esporos deste fungo. Efetuaram-se ensaios objetivando verificar meio de cultura que melhor favorece-se a produção de conídios pelo fungo. O trabalho foi realizado no Setor de Defesa Fitossanitária, do Departamento de Produção Vegetal, FCA – UNESP, campus Botucatu. Foi utilizado o isolado CCR64 (EMBRAPA-CNPMA). Os meios de culturas testados foram: BDA; Aveia-Ágar; Mazeína-Ágar; Arroz-Ágar; V8-5%; V8-10%; V8-20%; TJ-5%; TJ-10; TJ-20%. A esporulação do fungo, nos diferentes meios de culturas, foi avaliada no 8º dia de incubação. Os dados foram analisados utilizando método de comparação entre médias, através do teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo os dados transformados para $(X+1)^{0.5}$. Todos os meios de culturas testados se mostraram aptos para a produção de conídios, verificou-se que o melhor meio para produção de conídios de *Bionectria ochroleuca* é o TJ-5%, seguido do TJ-20%, com uma esporulação média de $3,5 \times 10^6$ conídios/mL.

PALAVRAS-CHAVE: Controle Biológico. Inoculante. Multiplicação.

INTRODUÇÃO

O controle biológico de doenças de causas fúngicas, em plantas, consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) que afeta de forma direta ou indireta o fungo fitopatogênico. Existem diferentes estratégias de controle, dentre as quais se destacam: (1) redução do inóculo do fungo através do decréscimo de sua sobrevivência na cultura, decréscimo da produção ou liberação de propágulos viáveis, ou decréscimo da sua expansão pela redução do crescimento micelial; (2) redução da infecção no hospedeiro causada pelo fungo; e (3) redução da severidade da doença (JAMES, DUMROESE, WENNY, 1992; FOKKEMA, 1993; PUNJA, UTKHEDE, 2003). Muitos microrganismos têm sido utilizados como potenciais antagonistas, no controle de fungos fitopatogênicos, dentre eles destacam-se o fungo conhecido como *Clonostachys rosea*.

Clonostachys rosea (sin. *Gliocladium roseum*, teleomórfico *Bionectria ochroleuca* (Schwein.) Schroers & Samuels), é um ascomiceto, da ordem Hypocreales (Schroers 2001), que na sua fase anamorfa produz conídios unicelulares em duas

formas distintas, penicilado e verticilado. As colônias do fungo são geralmente esbranquiçadas, laranjadas ou salmão, sendo este um micoparasita destrutivo contra alguns fungos fitopatogênicos, incluindo neste grupo o gênero *Botrytis* spp. (LI et al., 2002), por essa característica, passou no final da década de 80, do século XX, ser amplamente utilizado no controle de *B. cinerea* em moranguero (*Fragaria x ananassa* Bailey) (PENG, SUTTON, KEVAN, 1990). Atualmente é considerado um micoparasita de um amplo espectro de fungos, o que demonstra sua natureza cosmopolita e sua extraordinária versatilidade ecológica (SUTTON et al., 1997).

Este promissor agente de biocontrole de doenças fúngicas está sendo estudado para ser utilizado contra diversos patógenos em diferentes culturas, e em sua maioria, tem demonstrado alta eficiência (LI et al., 2002). SURGEONER (1998) relata que *C. rosea* é o principal meio de controle biológico contra doenças fúngicas utilizados no setor de horticultura no Canadá, sendo o principal método de controle contra as doenças causadas pelo gênero *Botrytis* spp. No Brasil, inúmeros testes vêm sendo efetuados com o intuito de substituir o controle

químico desse grupo de patógeno, na cultura do morango, pelo controle biológico com uso de *C. rosea* (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 1997). Atualmente, as recomendações são para o uso de aplicações semanais do fungo *C. rosea*, utilizando uma concentração de 10^6 esporo/mL, na cultura do morango (SUTTON et al., 1997).

Para que o uso de *Clonostachys rosea* seja feito de forma eficiente no controle biológico de fungos fitopatogênicos, um passo importante é o seu cultivo *in vitro* para a produção massal de suas estruturas infectivas, os conídios, visando a utilização destes como agentes dispersivos do biocontrole.

Com base nessa necessidade, efetuaram-se ensaios objetivando verificar o meio de cultura que melhor favorece a produção de conídios pelo fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Botucatu, junto ao Departamento de Produção Vegetal, setor de Defesa Fitossanitária.

Utilizou-se o isolado CCR64(EMBRAPA-CNMA), o qual vem sendo usado como agente de biocontrole, sendo esse mantido em meio de cultura BDA, a 25°C, no escuro.

Os meios de culturas testados foram: BDA (39 g/L (Acumedia Co.)); Aveia-Ágar (20 g/L de aveia em flocos (Quaker®), 18 g/L de ágar); Maizena-Ágar (20 g/L de amido de milho (Maizena®), 18 g/L de Agar); Arroz-Ágar (20 g/L de arroz cozido moído, 18 g/L de Agar); V8-5%(5%(v/v) de suco V-8 (Suco concentrado de tomate, adicionado do sucos de vegetais (cenoura, aipo, beterraba, salsa, alface, agrião e espinafre), sal, antioxidante ácido ascórbico, acidulante ácido cítrico e aromatizante - Campbell Co. ®), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); V8-10% (10%(v/v) de suco V-8(Campbell Co. ®), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar), V8-20% (20%(v/v) de suco V-8 (Campbell Co. ®), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar); TJ-5% (5%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom®), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar) ; TJ-10% (10%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar) ; TJ-20% (20%(v/v) de suco de tomate natural (Superbom), 3,2 g/L de CaCO₃, 18 g/L de ágar). Os meios foram então esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120°C, vertendo-os em placas de Petri para a utilização.

Para a inoculação dos meios utilizou-se um disco, de 5 mm de diâmetro colonizado, obtido da cultura crescida em BDA, a 25°C no escuro, por 5 dias, em placa de Petri. O experimento foi inteiramente casualizado, com 12 repetições, considerando uma unidade amostral uma placa de Petri contendo o meio a ser avaliado. As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD, a 25°C, por 8 dias, no escuro.

A esporulação do fungo, nos diferentes meios de culturas, foi avaliada no 8º dia de incubação. Cada placa de Petri, individualmente, foi lavada com um volume de 10 mL de água destilada autoclavada, precedendo-se a coleta da suspensão, a qual foi utilizada para determinar a concentração dos conídios (conídios/mL), através de quatro leituras em câmara de Neubauer.

Os dados foram analisados utilizando método de comparação entre médias, através do teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo os dados transformados para $(X+1)^{0.5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os meios de culturas testados se mostraram aptos para a produção de conídios, sendo que a produção média variou de $0,053 \times 10^6$ conídios/mL, para o meio Maizena-Ágar, até $4,41 \times 10^6$ conídios/mL, no meio TJ-5%, (Figura 1). Foi verificado que o melhor meio para produção de conídios de *Bionectria ocloleuca* é o TJ-5%, seguido pelo TJ-20%, com uma esporulação média de $4,04 \times 10^6$ conídios/mL, sendo também os meios que levaram ao maior crescimento micelial (Figura 2).

Quando analisado estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, os meios de cultura maizena-ágar e arroz-ágar não diferiram entre si, assim como o meio BDA e o Arroz-ágar, o meio de cultura V8 -20% se manteve isolado em uma classe estatística, ficando com uma produção de conídios abaixo da encontrada no meio V8-10%, o qual não diferiu estatisticamente do meio Aveia-agar (Figura 1).

Na Figura 1 verifica-se que o aumento da concentração do suco V8 no meio de cultura, de 5% para 20%, exerceu uma influência direta na produção de conídios, sendo que o aumento do suco no meio levou a uma redução proporcional a produção de conídios, saindo de $3,7 \times 10^6$ conídios/mL na concentração de 5% para $2,2 \times 10^6$ conídios/mL na concentração de V8-10% e $1,7 \times 10^6$ conídios/mL no meio V8-20%.

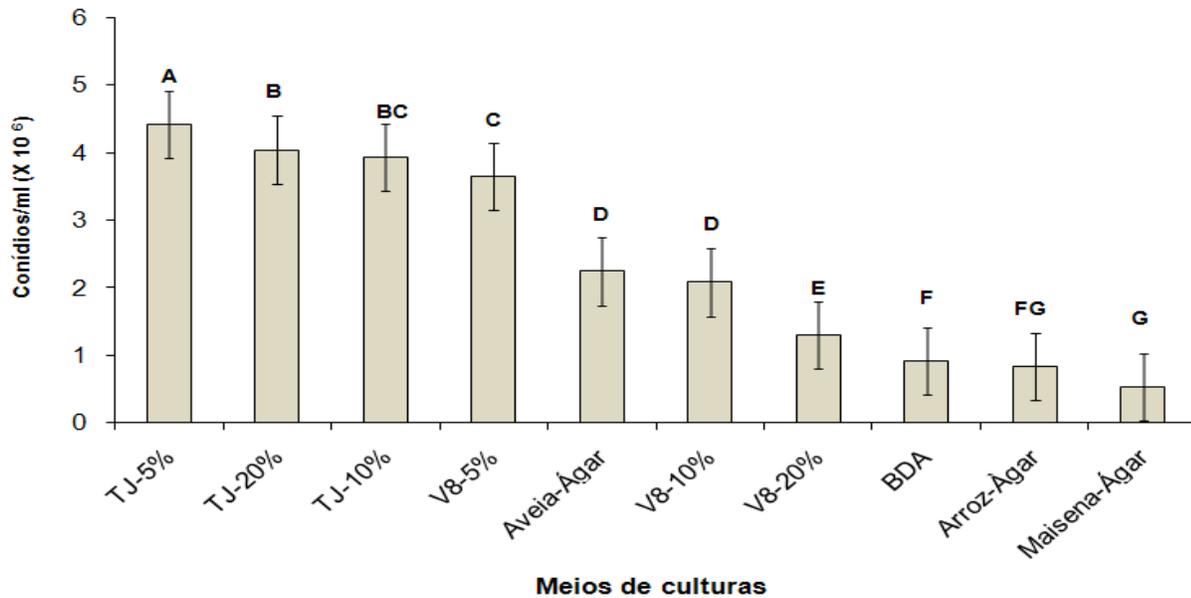


Figura 1. Esporulação média do *Bionectria ochroleuca* em diferentes meios de culturas, após 8 dias de incubação em câmara de crescimento, a 25°C, no escuro. Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

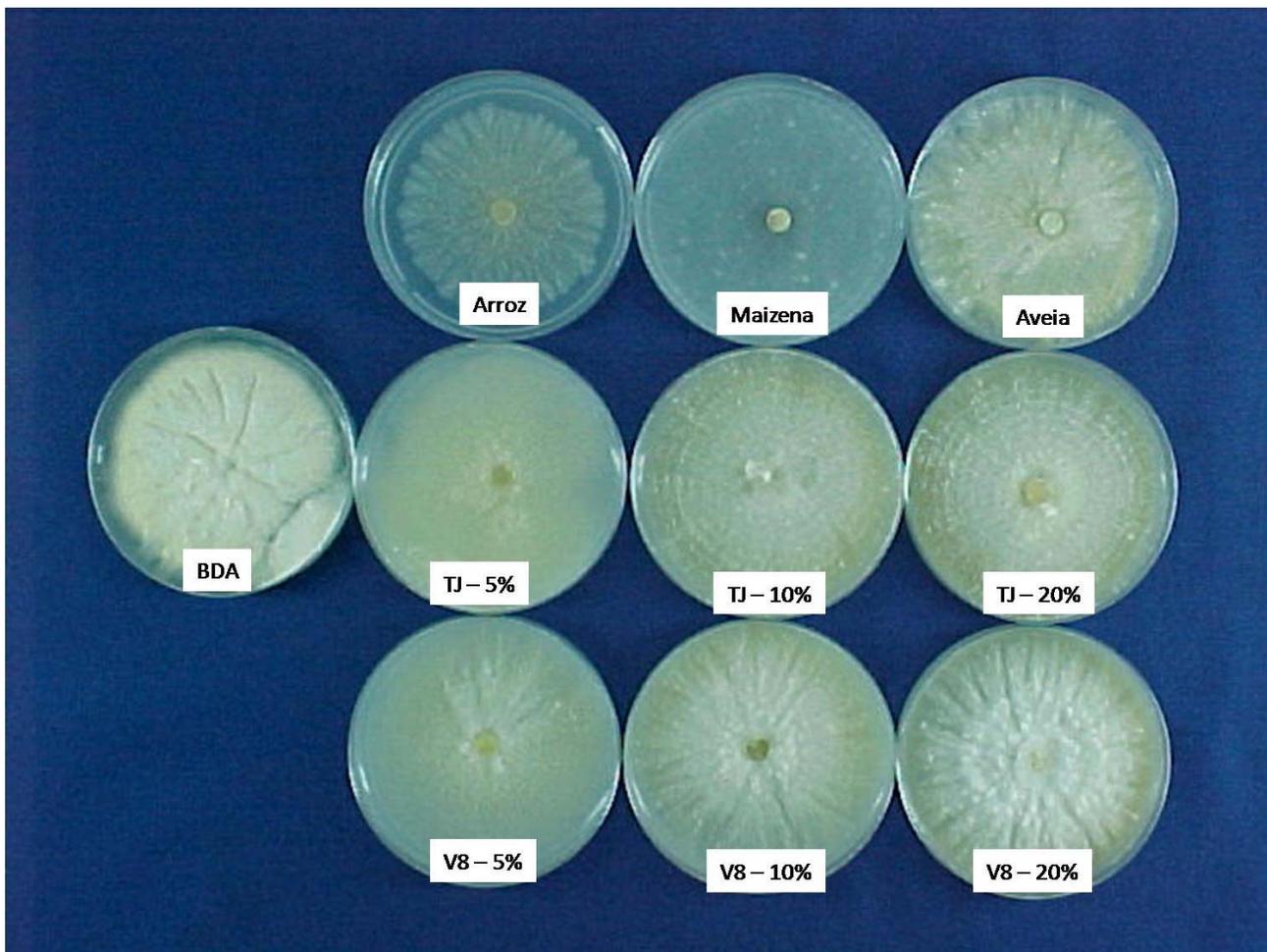


Figura 2. Crescimento do fungo *Clonostachys rosea* em diferentes meios de cultura, a 25°C no escuro, por 8 dias

O mesmo comportamento é observado para os meios de culturas a base de suco de tomate (TJ), onde o fungo produziu $4,4 \times 10^6$ conídios/mL no meio TJ-5%, $3,8 \times 10^6$ conídios/mL no TJ-10% e $4,0 \times 10^6$ conídios/mL no TJ-20%, sendo a única diferença entre o meio a base de TJ e o V8, que a redução observada no TJ foi menos acentuada do que a verificada no V8.

Ao contrário do observado na literatura para outros fungos, como *Diplodia* spp. (BIZETTO et al., 2000), o meio arroz-ágar não estimulou a

esporulação, demonstrando que nesse meio falta algum fator nutricional que estimule a esporulação de *Bionectria ochroleuca*.

CONCLUSÃO

O meio de cultura TJ-5% foi o que proporcionou a melhor esporulação para o fungo *Bionectria ochroleuca*, para as condições testadas, devendo ser utilizado para produção de conídios em ensaios de controle biológico de outros organismos.

ABSTRACT: The biological control of the plants diseases, caused by fungi, is carried out using others organisms (predator, parasite or pathogen). Among the possible agents of biocontrol, a fungus has been highlighting as promising and it is known as *Clonostachys rosea*, asexual form of *Bionectria ochroleuca*. For that, it is necessary the *in vitro* production of spores of this fungus. In this study were tested several culture media to select those with better conidia production. The study was conducted at Plant Protection Division, in the Plant Production Department, FCA - UNESP, Botucatu campus, São Paulo state, Brazil. We used the isolated CCR64 (EMBRAPA-CNPMA). The means of crops were: BDA; Oats-Agar; Mazeina-Agar; Rice-Agar; V8-5%; V8-10%; V8-20%; TJ-5 %; TJ-10, TJ-20%. The sporulation of the fungus in different culture media was estimated at 8° days after of the incubation. The data were analyzed using method of comparing averages, using the Tukey test, at 5% probability, and the data processed, using (X +1)0.5 transformation. All culture media tested were able to produce conidia. It was found that the best culture media for production of conidia of *Bionectria ochroleuca* is the TJ-5%, followed by TJ-20%, with an sporulation average of $3,5 \times 10^6$ conidia / ml.

KEYWORDS: Biological Control. Inoculant. Multiplication.

REFERÊNCIAS

- BIZETTO, A.; HOMECHIN, M.; SILVA, H. P. *Diplodia maydis* e *Gibberella zae*. Produção micelial e esporulação em substratos naturais e meios de cultura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, n. 1, p. 88-91, 2000.
- FOKKEMA, N. J. Opportunities and problems of control of foliar pathogens with micro-organisms. **Pesticide Science**, Tóquio, v. 37, n. 4, p. 411-416, 1993.
- JAMES, R. L.; DUMROESE, R. K.; WENNY, D. L. Principles and potential for biocontrol of diseases in forest and conservation nurseries. In: Proceedings, WESTERN FOREST NURSERY ASSOCIATION, Meeting, Fallen Leaf Lake, CA. Disponível em: <<http://www.fcnanet.org/proceedings/1992/james.pdf>>. Acesso em 12 out. 2008.
- LI, G. Q.; HUANG, H. C.; KOKKO, E. G.; ACHARYA, S. N. Ultrastructural study of mycoparasitism of *Gliocladium roseum* on *Botrytis cinerea*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taiwan, v. 43, n. 2, p. 211-218, 2002.
- PENG, G.; SUTTON, J. C.; KEVAN, P. G. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 14, n. 2, p. 114-129, 1992.
- PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Londres, v. 21, n. 9, p. 400-407, 2003.
- SURGEONER, G. **Pest management research**: plant program. University of Guelph, 1998. 162 p.

SCHROERS H. J. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 46, p. 80-82, 2001.

SUTTON, J. C.; LI, DE-WEI; PENG, G.; YU, H.; ZHANG, P.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 2, p. 316-328, 1997.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; SUTTON, J. C.; PERAZZOLO, I.; CZERMAINSKI, A. B. C. Controle biológico de *Botrytis cinerea* em morangueiros cultivados em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 69-73, 1997.