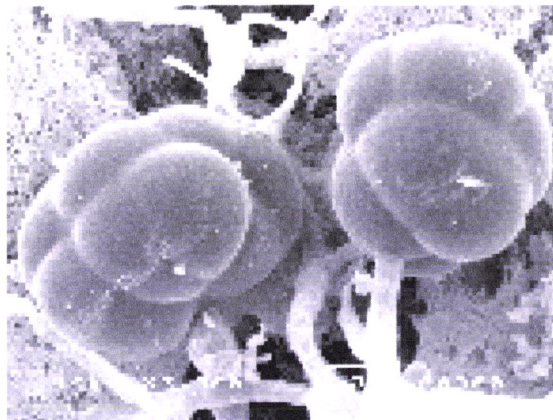




Universidade de Évora

Mestrado em Biologia das Pragas e Doenças de Plantas

**“Estudo dos elementos nutritivos associados à
produção de esporos do fungo *Pochonia
chlamydosporia*”**



Trabalho elaborado por: Susana Isabel Nunes Magriço

Orientador: Profª Drª Celeste Silva

Évora, 2007

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri



Universidade de Évora

Mestrado em Biologia das Pragas e Doenças de Plantas

**“Estudo dos elementos nutritivos associados à
produção de esporos do fungo *Pochonia
chlamydosporia*”**

Trabalho elaborado por: Susana Isabel Nunes Magriço

Orientador: Prof^ª Dr^a Celeste Silva

Évora, 2007



169 246

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri

PREFÁCIO

Esta dissertação foi realizada no âmbito do Mestrado em Biologia das Pragas e Doenças das Plantas e encontra-se redigida sobre a forma de artigo científico.

O trabalho experimental aqui referido teve como principal objectivo o estudo dos elementos nutritivos associados à produção de esporos, em particular clamidósporos, pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* em cultura líquida. Assim, com vista a apresentar a base teórica e a resolução do problema de um modo claro e adequado, estruturou-se esta dissertação em diferentes capítulos.

Todo o fundamento teórico relacionado com o fungo *Pochonia chlamydosporia* assim como assuntos relacionados com o combate ao nemátode-das-galhas radiculares (NGR) através da utilização do controlo biológico, encontram-se descritos no capítulo I. No capítulo II é apresentado o artigo científico que descreve o trabalho experimental efectuado para determinar os elementos nutritivos do meio de cultura líquido que maximize a produção de clamidósporos. As considerações finais são apresentadas no capítulo III.

RESUMO

O nemátode das galhas radiculares (NGR) (*Meloidogyne* spp.) é responsável por um dos principais problemas fitossanitários da rizosfera em Portugal e em vários outros países europeus. São utilizados vários pesticidas no combate a este problema, contudo, muitos têm sido retirados do mercado devido à sua extrema toxicidade. Como exemplo temos o brometo de metilo que foi banido do mercado em 2005 devido à sua forte acção depletora da camada de ozono. Desta forma, tem sido estimulado o aparecimento de alternativas ao uso de pesticidas, nomeadamente no âmbito do controlo biológico. O fungo *Pochonia chlamydosporia* encontra-se entre os organismos antagonistas que têm suscitado maior interesse e os estudos efectuados apontam para a possibilidade da sua comercialização num futuro próximo. Entre os dois tipos de esporos produzidos pelo fungo, os clamidósporos são os mais adequados a serem usados como inóculo em processos de controlo biológico. Contudo, para que a sua produção e posterior utilização como princípio activo seja um processo rápido e rentável, é necessário o desenvolvimento e aperfeiçoamento de meios de cultura líquida. O desenvolvimento deste tipo de meios implica o estudo dos nutrientes envolvidos na produção de grandes quantidades deste tipo de esporos. O trabalho experimental realizado no âmbito desta dissertação permitiu clarificar alguns dos aspectos mais importantes relacionados com os nutrientes envolvidos na produção de clamidósporos, pelo fungo *P. chlamydosporia*, em cultura líquida. Os resultados obtidos indicam que, para que a produção de clamidósporos seja iniciada pelo fungo, é necessário que o meio de cultura possua uma fonte adequada de proteína e de lípidos. Enquanto que a fonte de proteína pode ser variável, a fonte de lípidos restringe-se a ácidos gordos insaturados, preferencialmente por fosfolípidos e não por triglicéridos. Foi também possível verificar que existe uma proporção, entre estes dois nutrientes, que favorece a produção máxima de clamidósporos. O esclarecimento das necessidades nutricionais do fungo envolvidas na produção de clamidósporos, é essencial ao desenvolvimento de processos fermentativos que possam ser associados aos processos de extracção de esporos já desenvolvidos.

ABSTRACT

The root-knot nematode (*Meloidogyne spp.*) is responsible for one of the most important phytosanitary problems of rhizosphere in Portugal and several other European countries. It is frequent the use of several pesticides in order to solve this problem, however, some of them have been banned from the market due to their high toxicity. As example, we have methyl bromide, banned in 2005 due to its ozone deleterious effect. Thus, it has been encouraged the utilization of alternatives to pesticide use, namely, biological control. *Pochonia chlamydosporia* is one of the antagonists that incite more interest. The studies already performed, point to the possibility of its commercialization as biocontrol agent. Between the two kinds of spores produced by the fungus, those who have been considered more reasonable to use as inoculum in biological control, were chlamydospores. Although, to attain a rentable large scale production adequate liquid cultures have to be developed. The development of this liquid media involves the study of the nutrients necessary to chlamydospore production in liquid media. The aim of this work is to clarify the nutritional requirements of chlamydospore production by *Pochonia chlamydosporia* in liquid media. The results obtained show that chlamydospore production is only achieved when the culture media has, on its composition, an adequate lipid and protein source. Although the protein source can vary, the lipid source is peremptorily an adequate unsaturated fatty acid source, rather phospholipids than triglycerides. It was also shown that to chlamydospore production be allowed or induced, there is necessary an adequate proportion between this lipid an protein source. Elucidating those nutritional needs by the fungus, allows the development of fermentation techniques that could be coupled to the already existing chlamydospore extraction processes.

Índice

I- Introdução	1
1.1 Caracterização do fungo <i>Pochonia chlamydosporia</i>	2
1.1.1 Classificação taxonómica	2
1.1.2 Distribuição e modo de vida	2
1.1.3 Caracterização morfológica	3
1.1.3.1 Esporos de reprodução assexuada	3
1.1.3.1.1 Fialósporos	3
1.1.3.1.2 Aleuriósporos	3
1.1.3.2 Crescimento vegetativo	4
1.2 <i>Pochonia chlamydosporia</i> como agente de controlo biológico	4
1.2.1 A doença causada pelo nemátode-das-galhas-radiculares	4
1.2.1.1 Importância e caracterização do nemátode	4
1.2.1.2 Medidas de controlo biológico	6
1.2.1.3 Parasitismo sobre o nemátode das galhas radiculares	8
1.3 Nutrição do fungo	9
1.3.1 Fontes de carbono	9
1.3.2 Fontes de azoto	11
1.3.3 A razão Carbono:Azoto (C:N)	11
1.3.4 Outras fontes de nutrição	12
1.4 Produção de esporos	12
1.4.1 Esporos como fonte de inóculo em controlo biológico	14
1.4.2 Meios sólidos para a produção de esporos em massa	14
1.4.3 Produção de clamidósporos em meio líquido	16
1.5 Referências bibliográficas	17
II- Artigo científico	19
III- Considerações finais	44

Index

I- Introdução	1
1.1 <i>Pochonia chlamydosporia</i> characterization	2
1.1.1 Taxonomic characterization	2
1.1.2 Distribution and ecological aspects	2
1.1.3 Morfologic characterization	3
1.1.3.1 Assexuated reproduction spores	3
1.1.3.1.1 Phialospores	3
1.1.3.1.2 Aleuriospores	3
1.1.3.2 Vegetative growth	4
1.2 <i>Pochonia chlamydosporia</i> as biological control agent	4
1.2.1 The disease caused by the root-knot nematode	4
1.2.1.1 Importance and characterization of nematode	4
1.2.1.2 Medidas de controlo biológico	6
1.2.1.3 Parasitismo sobre o nemátode das galhas radiculares	8
1.3 Fungus nutrition	9
1.3.1 Carbon sources	9
1.3.2 Nitrogen sources	11
1.3.3 Ratio Carbon:Nitrogen (C:N)	11
1.3.4 Other nutrition sources	12
1.4 Spore production	12
1.4.1 Spores as inocula on biological control	14
1.4.2 Solid media to large-scale spore production	14
1.4.3 Chlamydospore production in liquid media	16
1.5 References	17
II- Papper	19
III- Concluding remarks	44

I- Introdução

1.1 Caracterização do fungo *Pochonia chlamydosporia*

1.1.1 Classificação taxonómica

Esta espécie foi inicialmente identificada em 1913 por Goddard quando recolheu um fungo do seu jardim ao qual chamou *Verticillium chlamydosporium*. De seguida foi designado de *Diheterospora chlamydosporia* por Barron & Onions no ano de 1966. O nome actual de *Pochonia chlamydosporia*, assim como a classificação da variedade *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* foram atribuídos por Zare & Gams no ano de 2001. Foi também nesse ano que foi descrita pela primeira vez a forma de reprodução sexuada *Cordyceps chlamydosporia* (Evans, 2001).

Classificação Taxonómica	Teleomorfo (Fase sexuada)	Anamorfo (Fase assexuada)
REINO	FUNGI	FUNGI
FILO	ASCOMYCOTA	DEUTEROMYCOTA
CLASSE	ASCOMYCETES	HYPHOMYCETES
ORDEM	Hypocreales	Moniales
FAMÍLIA	Clavicipitaceae	Moniliaceae
GÉNERO	<i>Cordyceps</i>	<i>Pochonia</i>
ESPÉCIE	<i>Cordyceps chlamydosporia</i>	<i>Pochonia chlamydosporia</i>
VARIEDADE	-	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>

Tabela 1: Classificação taxonómica do fungo *Pochonia Clamydosporia* (Zare et al, 2001; Kirk et al, 2001; Zare & Gams, 2001)

1.1.2 Distribuição e modo de vida

Pochonia chlamydosporia é um fungo endoparasita facultativo que vive no solo (Goddard, 1913). Embora o crescimento do fungo no solo seja limitado, com a excepção dos solos orgânicos, a rizosfera de várias plantas é susceptível de ser colonizada por este fungo (Kerry, 2001). A colonização é mais abundante em raízes infectadas por nemátodes (Kerry, 2000). Esta espécie é conhecida pela sua capacidade de colonizar ovos de nemátodes, tendo sido isolada de ovos de nemátode-dos-quistos (*Globodera* e *Heterodera* spp.) e nemátode-das-galhas-radiculares (*Meloidogyne* spp.) em variados locais do mundo (Kerry, 2001). Existem também registos de ter sido isolada de ovos de caracol e hifas de outros fungos (Rao et al, 1997).

1.1.3 Caracterização morfológica

1.1.3.1 Esporos de reprodução assexuada

Relativamente às estruturas de reprodução assexuada, conhecem-se dois tipos de esporos. Os conídios do tipo fialósporos são normalmente designados apenas por conídios e os conídios do tipo aleuriósporos designam-se geralmente por dictioclamidósporos ou clamidósporos (Gams, 1988).

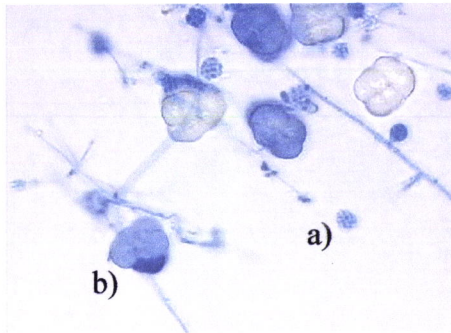


Fig. 1: Fialósporos (a) e aleuriósporos (b) do fungo *Pochonia chlamydosporia*.

Fonte: LabMic

1.1.3.1.1 Fialósporos

Os fialósporos são produzidos em hifas verticiladas, os conidióforos. Possuem cerca de $2.5-4.5 \mu\text{m} \times 1.2-2.2 \mu\text{m}$ e apresentam forma oval ou subglobosa e superfície lisa (Zare et al, 2001). Os conidióforos são geralmente prostrados e produzem fialides simples (Kerry & Bourne, 2002) ou verticiladas com 2 ou 3 fialides ao longo do conidióforo, ou conjuntos terminais de 4 ou 5 fialides. Estas consistem em estruturas finas e tubulares com cerca de $12-26 \mu\text{m}$ de comprimento e $1.0-1.5 \mu\text{m}$ de diâmetro (Zare et al, 2001) e possuem nas suas extremidades os conídios em agregados mucilaginosos (Gams, 1988) ou em cadeia (Zare et al, 2001).

1.1.3.1.2 Aleuriósporos

Os conídios de tipo aleuriósporos são esporos de parede espessa cuja função se pensa ser de resistência (Kerry & Bourne, 2002). Estes possuem cerca de $15-25 \mu\text{m}$ de diâmetro e contêm no seu interior substâncias de reserva que lhes permitem manter-se viáveis durante mais tempo que os fialósporos e, conseqüentemente, sobreviver mais facilmente em condições adversas (Kerry & Bourne, 2002; Zare et al, 2001). Estas estruturas são produzidas em pequenos pedúnculos com cerca de $15-25 \mu\text{m}$ de comprimento

e consistem numa estrutura hialina formada por um grupo de 6 a 9 células com paredes que se vão espessando ao longo do tempo. Estes podem ser produzidos em grande quantidade no micélio aéreo ou, em menor quantidade, submersos em agar (Kerry & Bourne, 2002; Zare et al, 2001; Gams, 1988).

O termo que se utiliza para designar este tipo de esporos mais frequentemente é clamidósporos. Assim, será esse o termo que passaremos a utilizar de agora em diante.

1.1.3.2 Crescimento vegetativo

As hifas vegetativas são hialinas e septadas e geralmente o micélio é aéreo



Fig. 2: Colónia de *P. chlamydosporia* em MEA.
Fonte: LabMic

e fino (Zare et al, 2001; Gams, 1988). As colónias do fungo *Pochonia chlamydosporia* possuem em geral 20-38 mm de diâmetro em 10 dias. No meio MEA (malt extract agar) são inicialmente brancas, adquirindo posteriormente uma cor bege e um aspecto pulverulento devido à produção de clamidósporos (Kerry & Bourne, 2002; Zare et al, 2001). A parte inferior da colónia pode apresentar

uma cor bege ou amarelo pálido a laranja (Gams, 1988).

Os indivíduos da espécie *Pochonia chlamydosporia* podem formar conídios de dois tipos, sendo por isso agrupados em duas variedades distintas. Estamos na presença de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* quando os conídios se encontram em aglomerados mucilaginosos e na presença de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* quando estão em cadeia. Em ambas as variedades os conídios são produzidos nas extremidades das fialides (Kerry & Bourne, 2002; Zare et al, 2001).

1.2 *Pochonia chlamydosporia* como meio de controlo biológico

1.2.1 A doença causada pelo nemátode das galhas radiculares

1.2.1.1 Importância e caracterização do nemátode

As espécies fitopatogénicas do género *Meloidogyne* são as que têm maior importância económica em tudo mundo. Constituem para além disso, uma ameaça particularmente importante para a agricultura dos países em vias de desenvolvimento, porque a maioria das espécies deste género, desenvolve-se



Fig. 3: Raízes infectadas pelo NGR. Fonte: LabMic

melhor em climas com temperaturas mais elevadas. Em termos quantitativos, estima-se que os nemátodes fitófagos causem uma redução de 10 a 15% da produção agrícola mundial, e que o género *Meloidogyne*, em particular, seja responsável por 5% dessa redução. No entanto, em situações particulares,

os nemátodes fitopatogénicos podem originar prejuízos muito mais elevados e até causar a destruição total de uma cultura (Whitehead, 1997). Estes prejuízos são ainda agravados pelo facto dos nemátodes poderem causar doenças associadas a outros fitoparasitas (Agrios, 2005). Assim, compreende-se que o género de nemátodes fitoparasitas em questão seja um dos mais estudados em todo o mundo. Para além de possuírem uma vasta distribuição, ocorrendo em quase todo o mundo, a sua presença torna-se especialmente problemática, conforme já foi referido, em países de climas temperados a quentes e de Invernos curtos e pouco rigorosos (Agrios, 2005; Whithead, 1997). O género *Meloidogyne* engloba nemátodes que são não só extremamente comuns como também bastante destrutivos. A sua acção fitopatogénica produz sintomas dramáticos e reduz substancialmente a produção das culturas. Esta virulência é sustentada por uma grande diversidade genética, estando actualmente descritas mais de 80 espécies pertencentes a este género (Karssen, 2002; Carneiro & Almeida, 2000).

Os nemátodes pertencentes ao género *Meloidogyne* spp., vulgarmente designados por nemátodes-das-galhas-radiculares, são endoparasitas obrigatórios necessitando de uma planta hospedeira para concluir o seu ciclo de vida (Eisenback, 1998; Hussey, 1985). Morfologicamente caracterizam-se por apresentarem um acentuado dimorfismo sexual. Os machos possuem uma estrutura filiforme e encontram-se livres no solo enquanto que as fêmeas se tornam sedentárias e passam a apresentar uma forma piriforme ou ovóide com um estreitamento na zona anterior. Um aspecto bastante interessante da alimentação do nemátode é o facto de induzir a cariocinese sem citocinese nas células de que se alimenta, levando ao seu alargamento que se observa pela formação das galhas que caracterizam a doença (Fig.3). O ciclo de vida do nemátode está representado na figura que se segue.

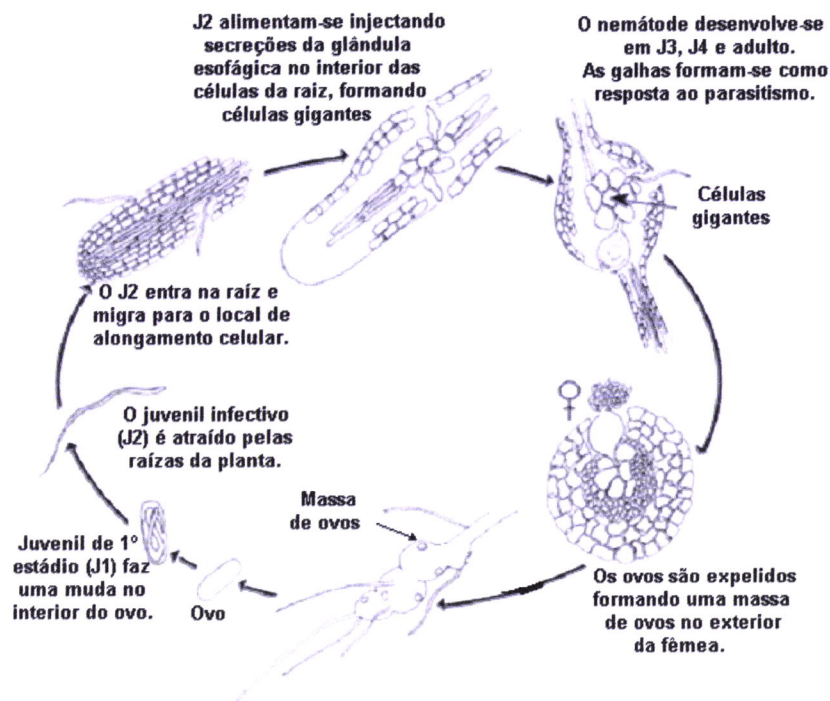


Fig. 4: Ciclo de vida dos nemátodes pertencentes ao género *Meloidogyne* spp.

(Adaptado de Agrios, 2005; Eisenback, 1985)

A fêmea expelle os ovos para o interior de uma bolsa externa ao corpo, formada a partir de secreções excretadas pela glândula rectal. A matriz gelatinosa que envolve os ovos tem como função protegê-los contra a dessecação, assim como de possíveis antagonistas e predadores. O conjunto dos ovos com a matriz gelatinosa designa-se por massa de ovos e é geralmente depositado no exterior da raiz. Caso a fêmea se encontre profundamente inserida na raiz, a massa de ovos pode ficar retida no seu interior. O ciclo de vida tem a duração aproximada de 25 dias a 27°C, podendo durar mais tempo caso as temperaturas permaneçam abaixo ou acima deste valor (Agrios, 2005).

1.2.1.2 Medidas de controlo biológico

O controlo de nemátodes tem como principal objectivo evitar perdas significativas em culturas de plantas susceptíveis, assim como a obtenção de produtos de boa qualidade através da manutenção de baixos níveis das suas populações a longo prazo (Eilenberg & Hokkanem, 2006; Whitehead, 1998; Siddiqui & Mahmood, 1996).

Estão disponíveis diversos meios para o controlo de nemátodes fitoparasitas. Em geral, é aplicada uma combinação de vários métodos tais como, o pousio e solarização, fumigação com nematodocidas, rotação com plantas não hospedeiras, utilização de plantas resistentes ou plantas transgénicas que produzem inibidores de proteases dos nemátodes e até mesmo a alelopatia com óleos essenciais (Agrios, 2005; Whitehead, 1998).

O custo, eficácia dos meios de controlo e o tipo de cultura em questão são alguns dos factores que influenciam a escolha dos meios a adoptar (Agrios, 2005).

Apesar dos nematodocidas serem um dos mais importantes e fiáveis meios de controlo de uma grande variedade de nemátodes, incluindo o género *Meloidogyne*, a sua aplicação tem um impacto considerável ao nível ambiental, repercutindo-se na a saúde humana e animal. Um destes exemplos são os produtos contendo brometo de metilo, um biocida de largo espectro muito utilizado em horticultura intensiva. Trata-se de uma substância muito volátil, facilmente libertada para a atmosfera e que é um forte destruidor da camada de ozono, daí que tenha sido retirado do mercado em 2005 (EPA, 2005). Assim, torna-se necessário encontrar alternativas eficazes com menores efeitos secundários.

Controlo biológico pode ser definido como sendo a introdução intencional de um agente de controlo biológico, normalmente co-evoluído, com o objectivo do seu estabelecimento permanente e controlo a longo prazo da doença ou praga (Eilenberg & Hokkanem, 2006).

Os nemátodes fitoparasitas, em particular o género *Meloidogyne*, desenvolvem uma complexa relação com o hospedeiro e o seu ciclo de vida oferece variadas possibilidades de perturbação. Torna-se portanto necessário determinar e estudar os antagonistas naturais que existem no solo e que podem ser responsáveis pela eventual supressão das populações de nemátodes de forma a encontrar potenciais agentes de controlo biológico e a desenvolver novas estratégias para a sua utilização (Kerry & Evans, 1987). Existe um grande interesse na exploração de uma grande variedade de antagonistas como parasitas entre os quais se encontram vírus, bactérias, protozoários e fungos. Temos também predadores como por exemplo protozoários, ácaros, tardígrados, colêmbolos, fungos e mesmo outros

nemátodes no combate de nemátodes fitoparasitas (Pyrowolakis et al, 2002; Sayre & Walter, 1991). Entre os organismos que parasitam nemátodes e com potencial como agentes de controlo biológico, os fungos ocupam um lugar de destaque, tendo sido encontrados cerca de 70 géneros e 160 espécies de fungos associadas a nemátodes (Siddiqui & Mahmood, 1996). Contudo, apenas um pequeno número tem sido explorado. Os fungos nematófagos podem ser divididos em três categorias segundo o seu modo de actuação. Podemos encontrar fungos formadores de armadilhas (Kerry & Jaffee, 1997; Jatala, 1986), fungos endoparasitas de nemátodes vermiformes (Kerry & Evans, 1987) e fungos parasitas de ovos ou formas fixas do nemátode que possuem a capacidade de colonizar ovos e fêmeas sedentárias de nemátodes fitoparasitas. Os principais meios envolvidos na supressão de nemátodes são a danificação de elementos estruturais dos ovos e da cutícula do nemátode, através de actividade enzimática (Nahar et al, 2004; Berto et al, 2001; Lopez-Llorca & Olivares-Bernabeu, 1998), bem como o distúrbio fisiológico do hospedeiro através da síntese e difusão de metabolitos tóxicos (Morgan-Jones & Rodriguez-Kabana, 1987).

Um agente de controlo biológico deverá cumprir requisitos como por exemplo possuir uma capacidade parasítica elevada, ter como principal hospedeiro o nemátode e não ser patogénico para as plantas cultivadas e animais superiores, possuir um crescimento óptimo em intervalos adequados, apresentar crescimento em meio artificial, possuir um modo de acção conhecido, ser possível formulá-lo numa forma utilizável e conseguir competir com outros microrganismos autóctones (Eilenberg & Hokknem, 2006; Siddiqui & Mahmood, 1996; Kim & Riggs, 1991).

1.2.1.3 Parasitismo sobre o nemátode das galhas radiculares

O fungo *Pochonia chlamydosporia* tem a capacidade de parasitar, entre outros, ovos do nemátodes pertencentes ao género *Meloidogyne* sem produzir toxinas nem armadilhas. Contudo, é incapaz de parasitar estádios móveis (Kerry & Bourne, 2002; Kerry & Bourne, 1996). O processo de parasitismo dos ovos de nemátode pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* foi estudado e apresenta algumas semelhanças relativamente ao modo de parasitismo de

outros parasitas de animais, principalmente no que diz respeito aos enzimas envolvidos (Tikhonov et al, 2002; Segers et al, 1994).

Embora o crescimento do fungo no solo seja limitado, com a exceção dos solos orgânicos, a rizosfera de várias plantas é susceptível de ser colonizada por este fungo (Kerry, 2001). O seu mecanismo de acção inicia-se com a proliferação no solo e exterior das raízes das plantas, dispersando-se na matriz gelatinosa das massas de ovos (Bourne et al, 1996; Kerry, 1995). O fungo adere à superfície do ovo do nemátode e forma-se uma estrutura de penetração, o apressório, que se desenvolve a partir de uma hifa indiferenciada (Bourne et al, 1996). A penetração é o resultado da pressão física e actividade enzimática desenvolvidas pelo apressório. Após a entrada no ovo, o fungo desenvolve-se radialmente colonizando na totalidade o seu interior. O parasitismo dos ovos do nemátode induz a produção de clamidósporos e aumenta a sobrevivência no solo a longo prazo (Kerry, 2001).

1.3 Nutrição do fungo

1.3.1. Fontes de carbono

Os fungos podem utilizar como fontes de carbono os hidratos de carbono, hidrocarbonetos, ácidos orgânicos e álcoois, lípidos, aminoácidos e proteínas (Fig. 5). Os hidratos de carbono são uma fonte de energia bastante importante e de rápida assimilação nas células vivas. Para além disso, podem funcionar como moléculas estruturais da parede celular e componentes de numerosos percursos metabólicos. São as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza, sendo que mais de metade do carbono orgânico se encontra nestas moléculas. Provavelmente todos os fungos podem utilizar a glucose, o monossacárido que funciona como unidade estrutural dos hidratos de carbono, possuindo por isso, um papel central no metabolismo. Uma série de outros açúcares podem servir de fontes de carbono para os fungos, dependendo do modo como se alimentam ou no ambiente em que se inserem. A interconversão das hexoses no interior da célula permite que o seu metabolismo siga a via da glicólise ou da pentose monofosfato, sendo que a última permite a produção de pentoses para a biossíntese de nucleótidos, caso estes não estejam disponíveis (Mckee & Mckee, 1999).

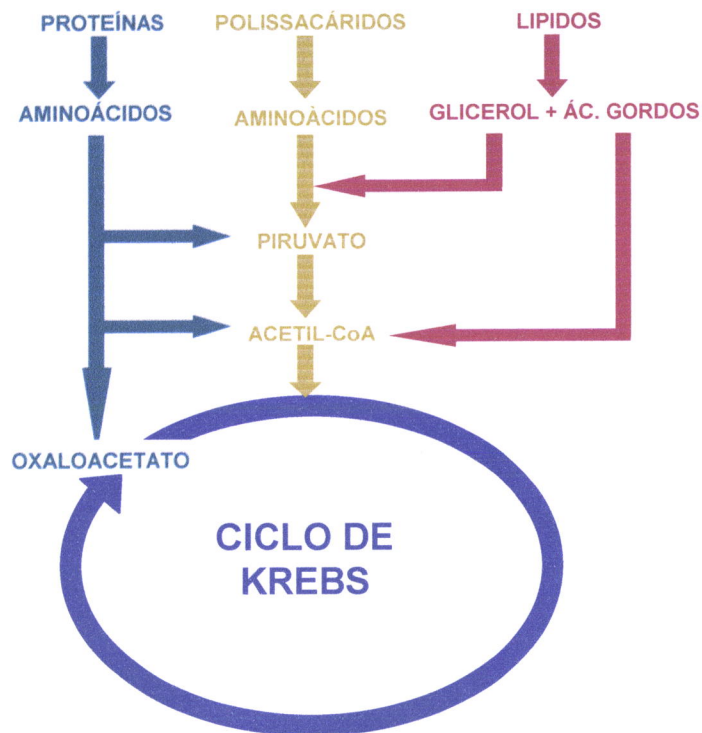


Fig. 5: Esquema representativo das formas de obtenção de energia a partir de outras moléculas que não a glicose. (Adaptado de Mckee & Mckee, 1999).

Quando os fungos utilizam outras fontes de carbono que não hidratos de carbono e tenham necessidade destes para fins biossintéticos, poderá ocorrer a gluconeogénese (Carlile et al, 2001).

Muitos fungos produzem amilases extracelulares que degradam o amido. Alguns fungos conseguem ainda degradar a lenhina e a celulose. A quitina é um dos maiores polissacarídeos e é um constituinte da parede celular de fungos e do exoesqueleto de artrópodes, daí que tenham sido encontradas quitinases, principalmente em fungos do solo (Tikhonov et al, 2001).

A produção de lipases e fosfolipases extracelulares também tem sido relatada em alguns fungos. As lipases são produzidas por muitos microrganismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e *Actinomyces*. O papel das lipases extracelulares está relacionado com o crescimento celular, sendo que a lipólise pode providenciar fontes de carbono mais facilmente assimiláveis pelo organismo (Stehr et al, 2003).

Alguns fungos, podem até mesmo utilizar a agarose como fonte de carbono, o que inviabiliza a utilização de meios com agar em estudos relacionados com o consumo de carbono (Carlile et al, 2001).

1.3.2 Fontes de azoto

O azoto é um elemento essencial que pode ser encontrado em proteínas, ácidos nucleicos e entre uma série de outras moléculas biológicas. Apesar da sua importância para os organismos vivos, as suas formas disponíveis são escassas. Existem microrganismos que conseguem fazer a fixação do azoto gasoso (N_2), ou seja, conseguem reduzi-lo a amónia (NH_3). É a amónia e o seu produto de oxidação, nitrato (NO_3^-), que as plantas e os microrganismos conseguem absorver e utilizar posteriormente na síntese de compostos de azoto (Prescot et al, 1996). Assim, as fontes de azoto mais utilizadas são o nitrato e a amónia, aminas e amidas, aminoácidos, polipéptidos e proteínas. São também conhecidos enzimas envolvidos nas reacções enzimáticas de conversão da amónia em ácido glutâmico ou glutamina que sofrem transaminação e dão origem a outros aminoácidos (Mckee & Mckee, 1999). A amónia é o maior regulador da assimilação de azoto e na sua presença, a utilização de outras fontes de azoto como o nitrato, aminoácidos e proteínas, é suprimida. Os péptidos pequenos podem, por vezes, ser transportados para o interior da célula através de uma série de péptido permeases, sendo posteriormente hidrolisados por peptidases intracelulares. Os péptidos maiores têm de sofrer hidrólise enzimática por proteases e peptidases extracelulares para que possam entrar na célula (Mckee & Mckee, 1999).

Em meios sintéticos, o nitrato é normalmente fornecido como sal de sódio, potássio ou amónio. Os sais de amónio são utilizados como fonte de amónia na elaboração de meios sintéticos (Prescot et al, 1996). A maioria dos fungos é capaz de assimilar uma série de aminoácidos, aminas e amidas. O ácido glutâmico, a glutamina, o ácido aspártico e a aspargina são assim componentes úteis dos meios de cultura. Um outro constituinte comum dos meios de cultura é a caseína hidrolisada que contém todos os aminoácidos à excepção do triptofano que se perde durante o processo de hidrólise ácida (Carlile et al, 2001).

1.3.3 A razão Carbono:Azoto (C:N)

Enquanto que o azoto é necessário à síntese de componentes celulares, como ácidos nucleicos e proteínas, o carbono é necessário como fonte de

energia. Um meio equilibrado deverá conter cerca de dez vezes mais carbono que azoto. Uma razão C:N de 10:1 ou menos irá assegurar um conteúdo em proteína elevado, mas taxas mais elevadas, na ordem dos 50:1 iram potenciar a acumulação de álcool, metabolitos secundários derivados do acetato, lípidos ou polissacáridos extracelulares. A razão C:N é de extrema importância na tecnologia das fermentações, principalmente quando se pretende obter um metabolito como produto final da fermentação (Carlile et al, 2001).

1.3.4 Outras fontes de nutrição

O carbono (C), hidrogénio (H), oxigénio (O), azoto (N), enxofre (S), fósforo (P), magnésio (Mg) e potássio (K) são elementos necessários a todos os microorganismos em grandes quantidades. Os três primeiros (C, H e O) são obtidos através de compostos orgânicos. Os restantes quatro (S, P, Mg e K) podem ser obtidos maioritariamente através de sais. Os microelementos podem por vezes suprimir as necessidades de alguns macroelementos como é o caso dos iões sódio (Na) que podem reduzir a quantidade de potássio (K) necessário. Os microelementos ferro (Fe), cobre (Cu), cálcio (Ca), manganês (Mn), zinco (Zn) e molibdénio (Mo) também são necessários a todos, ou quase todos, os microorganismos, pois funcionam como co-factores dos enzimas ou de outras proteínas funcionais. Contudo, as quantidades necessárias são bastantes reduzidas. As vitaminas são substâncias necessárias também em quantidades reduzidas, embora sejam imprescindíveis à sobrevivência de muitos fungos. A tiamina e a biotina são exemplos das mais utilizadas nos meios de cultura artificiais (Carlile et al, 2001; Prescott et al, 1996).

1.4 Produção de esporos

O substrato ou uma planta hospedeira deverão suportar o crescimento vegetativo de um fungo durante um período considerável de tempo. Quando se verifica a carência de alimento, o fungo terá de procurar outra zona de alimentação ou sobreviver até que se reúnam novamente condições favoráveis ao seu desenvolvimento (Carlile et al, 2001). Quando existe abundância de alimento, os fungos desencadeiam um elevado crescimento vegetativo acompanhado de uma elevada produção de esporos de dispersão. No caso

particular do fungo *P. chlamydosporia*, são os fialósporos que funcionam como esporos de dispersão (Gams, 1988). O fim do crescimento vegetativo dá-se como consequência da exaustão de nutrientes. Em condições adversas, para sobreviver, o fungo terá de entrar em dormência ou formar esporos de resistência que lhe permitam sobreviver e dispersar-se. A produção de esporos de resistência está normalmente associada a condições adversas, por exemplo a carência de alimentos (Carlile et al, 2001). O fungo *P. chlamydosporia* produz como esporos de resistência os clamidósporos (Kerry & Bourne, 2002; Gams, 1988). Tendo em conta a fisiologia do desenvolvimento do fungo, podemos facilmente depreender que as condições nutricionais para induzir a esporulação e o crescimento vegetativo não são normalmente as mesmas.

Os meios de cultura artificiais utilizados com maior frequência são normalmente mais ricos em nutrientes que o ambiente natural do fungo. Nesta situação, o metabolismo do fungo será de tal forma elevado que poderá resultar na acumulação de substâncias tóxicas como iões hidrogénio ou amónia em quantidades superiores às que este normalmente encontra em condições naturais. Assim, quando a carência de nutrientes começa a estimular a esporulação, as condições para o crescimento do fungo serão desfavoráveis. Esta situação ocorre com frequência nos meios sintéticos sólidos. Meios pobres em nutrientes ou com uma fonte de carbono que seja dificilmente degradada, como o amido, ocasionarão um crescimento vegetativo mais lento, estimulando a esporulação. Uma razão C:N elevada poderá facilitar a acumulação de materiais de reserva como o glicogénio, que poderá ser posteriormente utilizado como fonte de energia para a esporulação (Carlile et al, 2001).

A exaustão de um dos vários elementos ou compostos orgânicos necessários ao fungo irá levar ao término do seu crescimento. Esta situação poderá acontecer na região central da colónia ou afectar o micélio na sua totalidade. Os eventos subsequentes irão ser determinados pelo nutriente em falta. Em muitos fungos, a depleção de azoto é um pré-requisito para a esporulação, para além de que nestes fungos, a depleção das fontes de carbono ainda na presença de azoto pode levar à lise celular ou morte. Este facto indicia que estes fungos vivem em ambientes em que o crescimento é limitado pela disponibilidade de azoto. No fungo fitoparasita *Fusarium*

oxysporum uma razão C:N baixa pode conduzir à produção de esporos de resistência, clamidósporos, enquanto na situação inversa apenas são produzidos conídios (Carlile et al, 2001). Está bem claro que para várias formas de esporulação, a exaustão de um nutriente “chave”, geralmente azoto assimilável, é essencial. Assim, serão de esperar diferentes necessidades nutricionais consoante o tipo de esporos que se pretende produzir.

Uma vez que conhecer o metabolismo associado à produção deste tipo de esporos é um passo bastante importante para a sua produção em massa, seria importante investir mais no seu estudo.

1.4.1 Esporos como fonte de inóculo em controlo biológico

Quando se pretende utilizar um fungo como agente de controlo biológico, as inoculações no terreno deverão ser efectuadas com um inóculo que resista a condições adversas e se mantenha viável durante o tempo necessário para que se dê o processo de infecção. Geralmente, os clamidósporos são esporos maiores, mais resistentes e conseguem germinar e colonizar o solo e a raiz mesmo na ausência de açúcares simples ao contrário do que sucede com os fialósporos. Logo, são considerados mais adequados para serem utilizados como alvo de processos biotecnológicos desenhados para a sua produção e posterior utilização como princípio activo em meios de controlo biológico (Kerry & Bourne, 2002).

Existem vários processos tecnológicos já desenvolvidos no Laboratório de Micologia-ICAM (LabMic), em fase de patente, nomeadamente um processo de extracção e separação de clamidósporos a partir de suspensões aquosas. Este avanço tecnológico permite perspectivar o sucesso da biotecnologia aplicada à produção de esporos assexuados, nomeadamente de clamidósporos do fungo *Pochonia chlamydosporia*.

1.4.2 Meios sólidos para a produção de esporos em massa

Como já foi referido anteriormente, os clamidósporos são o inóculo mais eficiente para o estabelecimento do fungo no solo e na rizosfera, uma vez que não requerem nutrientes adicionais (Kerry & Bourne, 2002; Zare et al, 2001). A produção em grande escala de biomassa é geralmente conseguida através de

fermentação líquida (Powell, 1993), contudo, o fungo *P. chlamydosporia* não produz clamidósporos em cultura líquida (Kerry et al, 1993). Quando se pretende utilizar o fungo como agente de controlo biológico, este deve ser aplicado como inóculo de clamidósporos para assegurar o estabelecimento no solo e na rizosfera (Kerry et al, 1993). A aplicação de fialósporos e hifas não têm efeito na população de nemátodes, à excepção de quando aplicados com uma fonte de nutrientes (Kerry, 1995), o que pode não surtir o efeito desejado devido à grande quantidade de material a aplicar no solo, e à proliferação de outros microrganismos competitivos.

A taxa de crescimento e capacidade de esporulação do fungo em meio artificial são características importantes para o avaliar como agente de controlo biológico, uma vez que este organismo é extremamente influenciado pelos componentes do substrato e condições de cultura.

Existem alguns meios descritos para o incremento da produção de conídios, como PDA ou V8 agar, nutriente agar com extractos de carne e peptona (Tsao, 1970), contudo, com estes meios apenas se observa a indução da produção de fialósporos e não de clamidósporos.

O meio sólido mais comum para a produção de clamidósporos é constituído por cevada ou milho moídos misturados com areia esterilizada. A cevada e o milho podem ainda ser substituídas por trigo. A farinha de arroz e de soja também já foram testados mas não suportam uma produção adequada de clamidósporos (Kerry & Bourne, 2002). No entanto, é necessário o desenvolvimento de meios para cultura líquida, que permitam produções de esporos em grandes quantidades (Mo et al, 2005). Apesar dos esforços que têm vindo a ser efectuados no sentido da produção de fungos em cultura submersa, ainda não foi possível compreender o processo para muitos dos fungos testados, o que tem levado a que não seja possível produzir iguais quantidades de biomassa em meios sólidos e meios líquidos (Wraight et al, 2001).

A compreensão do metabolismo do fungo associado à produção de grandes quantidades de clamidósporos será um passo importante que permitirá desenvolver processos fermentativos que possam ser associados aos processos de extracção já desenvolvidos pelo LabMic.

1.4.3 Produção de clamidósporos em meio líquido

A fermentação líquida submersa é um sistema preferencial para a produção de biomassa de *Gliocladium virens*, um fungo utilizado em controlo biológico, uma vez que promove quase exclusivamente a produção de clamidósporos. Foram identificados vários factores que influenciam as características de crescimento de fungos utilizados em controlo biológico. Os nutrientes presentes no meio de cultura são importantes, especialmente a razão carbono:azoto (C:N), uma vez que afecta a capacidade dos fungos relativamente ao processo de infecção do hospedeiro. Para além disso, foram examinados factores específicos por forma a definir as condições óptimas para a produção de clamidósporos. Esses factores específicos incluem o meio de fermentação, taxa de agitação, pH e tempo da fermentação (Eyal et al, 1997).

Alguns isolados de *Trichoderma* spp. produzem clamidósporos em meio líquido, especialmente em licor de melaço de milho (Lewis & Papavizas, 1983). O agente patogénico humano *Candida albicans* também produz clamidósporos em meio de leite líquido (Vidotto et al, 1986). Como já foi referido anteriormente, os clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* têm sido utilizados como inóculo oferecendo uma colonização do solo e da raiz efectiva e persistente. Contudo, o fungo *P. chlamydosporia* não produz clamidósporos em meio líquido (Kerry et al, 1993). O crescimento micelial e a esporulação do fungo *P. chlamydosporia* são influenciados pelos componentes do meio e condições de cultura. O efeito de vários nutrientes no crescimento e na esporulação foram testados recentemente, incluindo variações na composição em hidratos de carbono, compostos nitrogenados e vitaminas (Sun & Liu, 2006; Liu & Chen, 2003), assim como variações na razão C:N e no pH inicial do meio de cultura (Mo et al, 2005) e em nenhum dos estudos foi conseguida a produção de clamidósporos em meio líquido. Contudo, estudos preliminares realizados no Laboratório de Micologia Aplicada (LabMic) indicam que essa produção é possível. Assim, o objectivo principal deste trabalho prende-se com o estudo dos nutrientes essenciais à produção de clamidósporos pelo fungo *P. chlamydosporia*, tal como a compreensão dos principais factores que afectam o seu desenvolvimento no meio de cultura.

1.5 Referências bibliográficas

Agrios, N. G. (2005) Plant Pathology 5th Ed. Academic Press, pp. 635.

Barron, G.L. & Onions, H.S. (1966). *Verticillium chlamydosporium* and its relationships to *Diheterospora*, *Stemphyliopsis*, and *Paecilomyces*. Canadian Journal of Botany. 44: 861-869.

Berto, P., Jijakli, H. and Lepoivre, P. (2001) Possible Role of Colonization and Wall-Degrading Enzymes in the Differential Ability of Three *Ulocladium atrum* Strains to Control *Botrytis cinerea* on Necrotic Strawberry Leaves. The American Phytopathological Society, 91:1030-1036

Bourne J. M., Kerry, B. R., and Leij, F. A. A. M. de (1996) The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C. E Goodway, G. W. (2001) The Fungi, 2nd ed. Academic Press, London, pp. 149-155

Carneiro, R. M. & Almeida, M. R. (2000) Enzyme phenotips of *Meloidogyne* spp. populations. Nematology. 2: 645-654 *in* Root-knot nematodes (*Meloidogyne*, Goeldi, 1887) – speacies composition, pathogenecity, some problems for investigation. Experimental Pathology And Parasitology. 5: 21-24

Eilenberg, J. & Hokkanem, H. M. (ed) (2006) An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Springer, pp. 2

Eisenback, D. (1998) Morphology and Sistematics, pp.37-60, *in* Plant Nematode Interactions, (Eds. Barkers, K. R.; Pederson, G. A.; Windham, G. F.; Agronomy monograph, N°36, Soil science society of America, USA

Eisenback, J D. Interactions among populations of nematodes In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. (Eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne: biology and control*. Raleigh: North Carolina State University, 1985.pp 155-141

EPA (2005) Methyl Bromide Phaseout. Web site: (<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-AIR/2004/December/Day-23/a27905.htm>)

Evans, H.C., *Nova Hedwigia* 73(1-2): 59 (2001)

Eyal J, Baker, CP, Reeder, JD, Devane, WE and Lumsden, RD. (1997) Large-scale production of chlamydospores of *Gliocladium virens* strain GL-21 in submerged culture *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19, 163–168

Gams, W. (1988) A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 94: 123-148.

Goddard, H.N. (1913). Can Fungi living in agricultural soil assimilate free nitrogen? *Botanical Gazette*. 56: Crawfordsville, IN, 249-304

Hussey, R.S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: SASSER, J.N.; CARTER, C.C. (Eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne: biology and control*. Raleigh: North Carolina State University, 1985. pp.143-153.

Jatala, P. (1986) Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Revue of Phytopathology*, 24vue of *Phytopathology*, 24:453-489.

Karssen, G. (2002) The Plant-Parasitic Nematode genus *Meloidogyne* Goldi, 1982 (Tylenchida) *in* Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*, 56: 190-197

Kerry, B. R. & Bourne, L.M. (ed) (2002) A Manual for Research on *Verticillium chlamyosporium*, a Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes. Germany:; Druckform GmbH, Merckstr 22-23

Kerry, B. R. & Evans, K. (1987) Principles and practice of nematode control in crops. Cap. 7, pp. 233-262

Kerry, B. R. (1995) Ecological considerations for use of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium*, to control plant parasitic nematodes. Canadian Journal of Botany 73 (suppl. 1): S65-S70.

Kerry, B. R. (2001) Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamyosporium* Goddard for the biological control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.), volume 5, in Fungi as biocontrol agents, Progress, Problems and potential, (eds Butt, T., Jackson, C., Magan, N.). Cab International, UK.

Kerry, B.R. (2000) Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of nematodes. Phytopathology 38, 423-441

Kerry, B. R. and Bourne, J. M. (1996) The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes-a case study using *Verticillium chlamyosporium*. Pesticide Science 47:69-75.

Kerry, B. R. and Jaffee, B. A. (1997) Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. The Mycota IV- Environmental and Microbial Relationships. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 204-218.

Kerry, B. R., Kirkwood I.A., de Leij, B. J. Leijdens, M. B. and Brookes, P. A. (1993) Growth and survival of *Verticillium chlamyosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. Biocontrol Sci Technol 3, 355-365

Kim, D.G. & Riggs, R.D. (1991) Characteristics and efficacy of a sterile hyphomycete (ARF18), a new biocontrol agent for *Heterodera glycines* and other nematodes, *J. Nematol.* 23, 275-282

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A. (2001) *Dictionary of the Fungi*. 9th Ed., Wallingford, CAB International, UK.

Lewis, J. A. & Papavizas, G. C. (1983) Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp in liquid and solid growth media, *Soil Biology and Biochemistry* 15, Pages 351-357

Liu, X.Z. & Chen, S.Y. (2003) Nutritional requirements of *P. chlamydosporia* and ARF18, fungal parasites of nematode eggs. *J. Invertebr Pathol* 83:10-15

Lopez-Llorca, L.V. & Olivares-Bernabeu, C. (1998). Metabolites influencing Pathogenicity of Nematophagous Fungi. In: *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. (Bridge, P.D; Cousteaudier, Y. and Clarkson Eds.): 171-186. CABI International, Wallingford

Mckee, T. & Mckee, J. R. (1999) *Biochemistry - An Introduction*, 2nd ed. Mc GrawHill, London, pp. 182-212

Mo, M., Xu, C and Zhang, K. (2005) Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *P. chlamydosporia* in liquid culture, *Mycopathologia* 159: 381-387

Morgan-Jones & Rodriguez-Kabana, R. (1987) Fungal biocontrol for the management of nematodes. *Vistas on Nematology*, cap. 14, pp. 95-99

Nahar, P., Ghormade, V. and Deshpande, M. V. (2004) The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85: 80-88

Powell, K.A. (1993) The commercial exploitation of microorganisms in agriculture. In: Gareth Jones D (ed) Exploitation of microorganisms. Chapman and Hall. London, pp 441-459

Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A. (1996) Microbiology 3rd ed., Wm. C. Brown Publishers

Pyrowolakis, A., Westphal, A., Sikora, R.A., Becker, J.O. 2002: Identification of root-knot nematode suppressive soils. Applied soil Ecology. 19: 51-56.

Rao MS, Kerry BR, Gowen SR, Bourne JM, Reddy PP. (1997) Management of *Meloidogyne incognita* in tomato nurseries by integration of *Glomus deserticola* with *Verticillium chlamyosporium*. Zeitschrift fur pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz-journal of plant diseases and protection 104(4): 419-422.

Sayre, R.M. & Walter, D.E. (1991). Factors affecting the efficacy of natural enemies of nematodes. Annu. Reviev of Phytopathol., 29: 149-166.

Segers, R., Butt, T. Q., Kerry, B. R., and Peberdy, J. F. (1994) The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. Microbiology, 140: 2715-2723.

Siddiqui, Z. A., & Mahmood, I. (1996) Biological control of plant-parasitic nematodes by fungi: A review. Bioresource Technology 58: 229-239

Stehr, F., Kretschmar, M., Kroger, C., Hube, B. and Schafer, W. (2003) Microbial lipases as virulence factors. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 22, 347-255

Sun, M. & Liu, X. (2006) Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. Mycopathologia. 161: 295-305

Tikhonov, V.E., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J. and Jansson, H. (2002) Purification and Characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology*, 35, 67-78

Tsao, P. H. (1970) Selective media for isolation of pathogenic fungi, *Annual Review of Phytopatology*, Vol. 8, 157-222

Vidotto, V., Caramello, S. & Gallo, M. G. (1986) A new medium for the production of chlamydoconidia by *Candida albicans*, *Mycopathologia* 95:73-75

Whitehead, A. G. (1997) *Plant Nematode Control*. CAB International, London, UK, 384 pp.

Whitehead, A. G. (1998) *Plant Nematode Control*. CAB International, London, UK, pp. 1-12

Wraight, S. P., Jackson, M. A. and Kock, S. L. (2001) Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents, volume 10, *in* *Fungi as biocontrol agents*, Progress, Problems and potential, (eds Butt, T., Jackson, C., Magan, N.). Cab International, UK.

Zare R. & W. Gams (2001) A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia*, 73: 1-50.

Zare, R., Gams, W., Evans, H. (2001) A revision of *Verticillium chlamydosporium* section *prostata*, V., The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophora*, *Nova Hedwigia*, vol 73, pp. 51-86

II- Artigo Científico

Main nutrition requirements for liquid media chlamydospore production of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*

Susana Magriço, Nuno Alegria, Celeste Santos e Silva* and Carlos Franco

Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Núcleo da Mitra, Universidade de Évora, Ap. 94, 7002-554 Évora, Portugal

* *Corresponding author, email adress: css@uevora.pt*

ABSTRACT:

Previous sporulation studies with *Pochonia chlamydosporia* (*P.c.*), strain PcMR, a nematophagous fungus, showed that high amounts of chlamydospores can be produced in liquid media. Mixture A was established as a suitable salt mixture to achieve the maximum chlamydospore production combined with the amounts of organic nutrients used in basal medium. A_w increment didn't induce chlamydospore production, otherwise, some of the modifiers tested, appear to be toxic to the fungus and all the substances tested above individual a_w limits are deleterious to *P.c.* The effect on chlamydospore production of several carbohydrate, proteins and lipids were tested. Carbohydrates assayed have no negative or positive effect. Proteins such as bsa, gliadin, casein, and its enzymatic hydrolysate, tryptone proved to be good protein sources with similar chlamydospore yields on positive control (ovalbumin). Triglycerides show no influence on chlamydospore production. The phospholipid phosphatidylcholine show an effect similar to that of lecithin on chlamydospore yields. The unsaturated fatty acids, oleic acid and linoleic acid, seem to be the lipids involved in chlamydospore production. It was shown that variation on ovalbumin:lecithin ratio makes no improvement on chlamydospore yield compared to basal medium.

INTRODUCTION:

The deuteromycete *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Zare and Gams (= *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) Goddard) is a facultative endoparasite of the sedentary stages of plant parasitic nematodes (14, 29). It has been recorded from the eggs of cyst and root-knot nematodes throughout the world (14). The fungus has been extensively studied on its potential as biocontrol agent. Various formulations have been studied (14) since chlamydospores (12; Franco, unpublished data) to hyphae and conidia (24). Chlamydospores of *P. chlamydosporia* are nutrient rich and have been used as an inoculum that gives effective and persistent colonization of soil and rhizosphere without additional nutrients on the formulation (15). The field assays with hyphae and conidia showed effect on nematode population only when applied with a nutrient source (13). However, the nutrient source will increase the inoculum size and the probability of competitive microorganism's development. Usually, the successful development of microbial nematocides depends on the availability of a low cost production process that yields high concentration of viable propagules. Chlamydospores are easily produced in solid medium but their extraction has been a difficult and time expensive process (16). Spore production in liquid culture, often used for industrial purposes, could be a good alternative. However, because a suitable method for *P. chlamydosporia* chlamydospore production in liquid media was not available, the inoculum production for biocontrol experimental assays, utilised by several authors, has been solid culture processes (5, 7, 9, 11, 15, 26, 27). Nevertheless, several studies on liquid media components and liquid culture conditions for *P. chlamydosporia* have been performed, but only related with the mycelial growth and conidia (phialospores) sporulation (29, 20). Recently, a previous work (Franco, unpublished data) reported the development of several liquid media for submerged chlamydospore production with yields above 10^5 /mL. This work, performed with the strain PcMR of *P. chlamydosporia* and using a liquid synthetic medium, composed by a combination of ovalbumin, lecithin and a mixture of salts, aims to study the main nutritive elements and its proportion required for chlamydospore production in liquid culture by the fungus.



MATERIAL AND METHODS

Fungal isolate and inoculum

Pochonia chlamydosporia, strain PcMR (isolated and selected from *Meloidogyne* spp. eggs collected in Portugal) was used in all experiments. Stock cultures were grown on corn meal agar (CMA) (Oxoid Lab) at 25°C. This strain has high biological control potential (11; Franco, unpublished results).

Preliminary tests were made to evaluate the best inoculum for this study. These tests (data not shown) establish that it's possible to use liquid cultures of PcMR with different ages as inoculum, because this factor cause no difference on chlamydospore production at the end of a 30 day stationary culture. Nevertheless, to diminish contamination risk, the inoculum used in all experiments was 1 mL of a 10 day old PcMR Czapek culture. For inoculum preparation, PcMR were grown on CMA plates and incubated at 25°C for 2 weeks. Four plugs (0.5 cm Ø) from a selected colonized CMA plate were transferred into a 250 mL Erlenmeyer containing 100 mL of autoclaved Czapek solution, and incubated at 25°C during 10 days.

Basal medium

Basal medium contain per litre (total volume of distilled water with organic components and salts): organics: 3.25 g of ovalbumin (Sigma) and 1g of lecithin (cooking grade); salts: mixture A: 1.15 g NaNO₃, 0.7 g of KNO₃, 0.4 g of Mg(NO₃)₂.6H₂O, 0.1 g of NaOH, 0.5 g of MgSO₄.7H₂O, 0.02 g of FeSO₄.7H₂O, 0.4 g of K₂SO₄, 0.3 g of KH₂PO₄, 0.2 g of KCl, 0.3 g of NaCl, 0.6 g of Ca(OH)₂ and 0.76 g of H₃PO₄ (85% w/w) all from Sigma. Media preparation: The organics were mixed with distilled water at appropriate concentration in glass containers and sealed with a cotton stopper. Mixture A is previously prepared 20x concentrated in a sealed container. Both mixtures are autoclaved at 121°C for 40 min and mixture A is added in sterile conditions to the glass containers, making up a final volume of 100 mL. This procedure avoids protein coagulation during the sterilization process.

Stationary/Aerated cultures

Stationary: Stationary culture was performed in 250 mL Erlenmeyer flasks sealed with a cotton stopper. The final volume was 100 mL in all experiments.

The stationary cultures were grown at 25°C during 30 days for all types of media.

Aerated: On the aerated assay, a 500 mL round flask, stopped with a silicone stopper, was set in a metal stand. The stopper has two openings with aluminium tubes (0.6 cm Ø), 10 cm length in it, the entrance tube and the exit tube. The outer side of the entrance tube was connected to an air pump through a 0.2 µm Ø Nalgene filter (IN). The inner side of the entrance tube was connected to a ceramic air diffuser with 4 cm length and Ø 1.3 cm. The inner side of exit tube is left open close to the base of silicone stopper. The outer side of exit tube is closed with a silicone tube (30 cm length, Ø 6 cm) stopped with cotton. Flask filling with media is achieved using a sterile syringe with a 10 cm needle. All the connecting tubes were of silicone with Ø 6 cm. The fungus was grown during 5 days at 25°C with an air flux of 0.03 to 0.1 VVM.

Salt mixtures assay

Four salt mixtures were tested: mixture A, B, C and D. Mixture A (per litre): 1.15 g of NaNO₃, 0.7 g of KNO₃, 0.4 g of Mg(NO₃)₂·6H₂O, 0.1 g of NaOH, 0.5 g of MgSO₄·7H₂O, 0.02 g of FeSO₄·7H₂O, 0.4 g of K₂SO₄, 0.3 g of KH₂PO₄, 0.2 g of KCl, 0.3 g of NaCl, 0.6 g of Ca(OH)₂ and 0.76 g of H₃PO₄ (85% w/w). Mixture B (per litre): 0.4 g of NaCl, 0.5 g of MgSO₄·7H₂O, 1 g of KH₂PO₄, 0.2 g of NaOH, 0.6 g of K₂SO₄ and 0.02 g of FeSO₄·7H₂O. Mixture C (per litre): 0.7 g of NaCl, 0.5 g of MgSO₄·7H₂O, 1 g of KH₂PO₄, 0.2 g of NaOH, 0.6 g of K₂SO₄, 0.02 g of FeSO₄·7H₂O and 0.3 g of Ca(OH)₂. Mixture D is similar to mixture C, but uses 0.6 g/L of Ca(OH)₂ instead of 0.3 g/L of Ca(OH)₂. All media was based on the basal medium substituting de mixture A by the other salt mixtures. The media preparation was performed as described for basal medium. The mixture A and B were also tested using basal media + 1 g/L of triglycerides (100% sunflower oil, cooking grade). Controls: Basal medium was used as positive control (+), Czapek medium (Czapek Yeast Autolysate) (22) was used as negative control (-), sucrose (30 g/L) + mixture A as negative control (AS⁺) for mixture A and sucrose (30 g/L) + mixture B as negative control (BS⁺) for mixture B. All media were tested in stationary culture. The basal medium with mixture A and the basal medium with mixture B were also tested in aerated culture.

Water activity (a_w) assay

The adjustment of a_w values was achieved by adding several amounts of glycerol, propylene glycol (PPG), collagen, sucrose, peptone and NaCl to basal media. Glycerol and PPG were studied at the concentrations of 200 and 70 g/L. Peptone was assayed at 200, 150, 100 and 65 g/L. Two mixtures were also used, peptone 26 g/L + sucrose 30 g/L and peptone 26 g/L + NaCl 30 g/L. Collagen was used at the concentration of 30 g/L. Preparation: To avoid protein coagulation, besides de salt mixture, modifiers were also prepared and autoclaved separately from organic compounds and added as described for mixture A in basal medium. Basal medium was prepared as described. Controls: Basal medium was used as positive control (+) and Czapek medium as negative control (-).

Organic nutrients assays

Carbohydrate tests: 4 carbohydrates and 3 controls were tested. The following carbohydrates were added to basal media: 10 g/L of sucrose (100% cooking grade), 10 g/L of starch (100% cooking grade), 1g/L of β -1,3-glucane (Sigma) and 1g/L of hyaluronic acid (Sigma). Controls: basal medium was used as positive control, Czapek medium was used as negative control (-) and sucrose (30g/L) + mixture A was used as negative control (S^+) for sucrose.

Protein tests: 7 proteins, 1 protein hydrolysate and 2 controls were tested. Proteins and hydrolysate: in each medium ovalbumin of the basal medium was substituted with 1 g/L by one of the following: bsa, gliadine, haemoglobin, lactalbumin, collagen, casein, trypsin and tryptone all from Sigma with exception of collagen (100% cooking grade). In the case of gliadine, due to its low water solubility was necessary to mix it with lecithin before addition of the distilled water. Controls: Basal medium was used as positive control (+) and Czapek as negative control (-).

Lipid tests: 7 lipids, 3 lipid mixtures and 4 controls were tested. Lipids: in each medium, lecithin of the basal medium was substituted with 1 g/L by one of the following: cholesterol (Sigma), triglycerides (100% sunflower oil, cooking grade), phosphatidylcholine (Sigma) and 4 fatty acids (1 g/L, one per medium) (all from Sigma): 2 saturated fatty acids (stearic and behenic acid) and 2 unsaturated fatty acids (oleic and linoleic acid); Lipids mixtures: in each medium, lecithin of

the basal medium was substituted with (0.5g/L+0.5 g/L) one of the following mixtures (1:1, w:w): lecithin:sunflower oil, oleic:stearic acids and oleic:linoleic acids. Because the lipids are water immiscible, they have to be mixed with the protein prior to their addition to water. Controls: basal medium was used as positive control (+), Czapek was used as negative control (-), lecithin + mixture A was used as negative control (O⁻) for lecithin and ovalbumin + mixture A was used as negative control (L⁻) for all lipids.

Ovalbumin and lecithin variation assay

The basal medium had a specific proportion of 3.25 g/L of ovalbumin to 1 g/L of lecithin. In order to evaluate the effect of the protein and lecithin concentration variation, two different assays were carried out, using basal medium as positive control (+), Czapek medium as negative control (-) and setting a different medium for each different concentration. In the first assay, the lecithin concentration was set at 1 g/L and ovalbumin concentration varied as follows: 0.0, 0.81, 1.63, 2.44, 3.25, 6.5 and 13 g/L. In the second assay, the ovalbumin concentration was set at 3.25 g/L and lecithin concentration varied as follows: 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 1, 3 and 6 g/L. The media was prepared as described for basal media and the fungus was grown in stationary culture.

Chlamyospore evaluation

After the growing period, the cultures were extracted from flasks to a bench blender (700 w, 125 rpm), and homogenised for 2-3 min. After a 5 min rest, they were gently stirred to avoid foam formation and chlamyospores counted in a Fuchs-Rosenthal counting chamber.

Dry weight, ovalbumin and lecithin determination

For each experiment, the dry weight was measured for biomass determination using the homogenised residue after the chlamyospore counting. The cultures were precipitated by centrifugation at 8000 rpm for 10 min. The pellet was dried at 80°C for 24h and the dry biomass was weighted in aluminium paper.

The ovalbumin and lecithin, which remained in the medium at the end of the experiment, were measured by spectrophotometry. Ovalbumin residue was measured by the spectrophotometric method of Bromocresol Green (6) against

ovalbumin standard protein. Medium samples or standard (0.5 mL) were added to 1 mL of working solution (1 volume of Bromocresol green 0.58 mmol/L to 3 volumes of succinate buffer 0.1 mol/L pH 4.0). Succinate buffer was prepared with Brij35 to improve specificity. The absorbance was recorded at 620 nm using a BECKMAN DU[®]530 Life Science UV/Vis spectrophotometer. Distilled water + working solution were used as blank. Lecithin was measured by a modified method of Stewart (23). In brief, 0.1 mL aliquots of medium samples or standard were added to glass tubes containing 1 ml each of 0.1 N ammonium ferrithiocyanate and chloroform. After a vigorous mixing for 1 min and a brief centrifugation, the chloroform layers were removed and their absorbance's recorded at 488 nm using a BECKMAN DU[®]530 Life Science UV/Vis spectrophotometer. It was used chloroform as blank. Aqueous 0.1 N ammonium ferrithiocyanate was prepared by dissolving anhydrous ferric chloride (16.2 g) and ammonium thiocyanate (30.4 g) in water and its final volume was adjusted to 1 litre.

Data analysis

All the tests were made using five replicates (individual Flasks with the same medium) and all experiments were repeated three times. The chlamyospore counting were made six times in each flask, by taking three samples from each flask and count twice per sample in the Fuchs-Rosenthal counting chamber, one in each counting grid. The dry weight determination was made once in each flask. For spectrophotometric determinations, lecithin and ovalbumin were estimated in duplicate in each one of the five replicates. Data were statistically analysed with the SPSS software package (SPSS Inc. Chicago, USA). Chlamyospore counts were used directly to variance analysis (ANOVA) and averages were separated using Tamhane's *T2* test ($P < 0.05$). The SE (standard error) and SED (Standard Error of the Difference) were calculated according to Webster (28).

RESULTS

Salt mixtures assay

The tests performed with mixture A and B in the presence and absence of triglycerides, showed no significant differences in stationary culture (Table 1). In

aerated culture, significant differences were found between mixture A and B, although neither of them show significant differences to negative control. After 5 days visible differences on biomass production between both mixtures were also evident (data not shown).

The media with mixtures C and D are not different ($P < 0.05$), but are different from negative and positive control (Table 1).

Table 1. Effect of salt mixture on *Pochonia chlamydosporia* chlamydospore production.

Salt mixture	Chlamydospores ¹	Initial pH
A	1.09 ^{a,b}	6.92
B	1.02 ^a	6.91
A, triglycerides	1.13 ^{a,b}	7.37
B, triglycerides	1.61 ^b	6.86
A, aerated	0.15 ^c	6.92
B, aerated	0.00 ^d	6.91
C ²	0.64 ^e	6.94
D ²	0.55 ^e	7.09
Control (AS ⁺)	0.02 ^{c,d}	6.30
Control (BS ⁺)	0.02 ^{c,d}	6.22
Control (-)	0.05 ^{c,d}	6.51

SE=0.059, SED=0.083, all with 54 degrees of freedom.

¹Values in chlamydospores/mL x 10⁵. Values with no common letter are significantly different ($P < 0.05$).

²Mixture B with Ca(OH)₂. See material and methods

Water activity (a_w) assay

The use of glycerol, PPG or NaCl to decrease a_w in the culture medium leads to a significant decrease ($P < 0.05$) in chlamydospore production to positive control. Glycerol, PPG and NaCl appear to be toxic to *Pochonia chlamydosporia* at the concentrations studied. At these concentrations it was not observed chlamydospore production neither mycelial growth. The use of peptone, collagen and sucrose allow chlamydospore production, but the lower values of a_w lead to significant ($P < 0.05$) decreases in chlamydospore production relative to positive control. The only media with no significant differences to control were those with peptone/sucrose and collagen with the lower substance concentration in the medium (lower a_w).

Table 2. Effect of a_w and modifier substance on *Pochonia chlamydosporia* chlamydo-spores production.

a_w modifier	Quantity ¹	Chlamydo-spores ²
Glycerol	200	0.00 ^a
Glycerol	70	0.00 ^a
Propylene glycol	200	0.00 ^a
Propylene glycol	70	0.00 ^a
Peptone/NaCl	26/30	0.00 ^a
Peptone/Sucrose	26/30	1.48 ^c
Peptone	200	0.08 ^a
Peptone	150	0.17 ^a
Peptone	100	0.04 ^a
Peptone	65	0.19 ^a
Collagen	30	0.77 ^b
Control (+)	-	1.09 ^{c,b}
Control (-)	-	0.05 ^a

SE=0.048, SED=0.067, all with 64 degrees of freedom.

¹Measured in g/L

²Measured in chlamydo-spores/mL x 10⁵. Values with no common letter are significantly different (P<0.05).

Organic nutrients assay

The results presented here show a marked difference between the importance of the three main groups of organic nutrients involved in *P. chlamydosporia* nutrition: carbohydrates, proteins and lipids (Table 3).

The addition of sucrose or starch had no effect on chlamydo-spore production (P<0.05) compared to positive control. The addition of β -1,3 glucane or hyaluronic acid still allow a chlamydo-spore production significantly higher than negative control, but significantly smaller (P<0,05) than positive control. As expected (Franco, unpublished results) the sucrose control (S⁻) is not significantly different from negative control.

The substitution of ovalbumin from basal medium showed that media with bsa, gliadin, casein and its enzymatic hydrolisate, tryptone, had no significant difference (P<0.05) relative to positive control for chlamydo-spore production (Table 3). On the other hand media with lactalbumin, haemoglobin, trypsin and collagen are significantly different (P<0.05) than positive control production. Even so, on all media the fungus produce significantly more (P<0.05) chlamydo-spores than negative control. This increment is at least a 10 fold increase in chlamydo-spore production to Czapek medium.

Table 3. Effect of different carbohydrate, protein and lipid sources on production of *Pochonia chlamydosporia* chlamydospores.

Carbohydrate	Class¹	Chlamydospores²
Sucrose	C	1.10 ^a
Starch	C	1.38 ^a
β-1,3 glucane	C	0.58 ^b
Hyaluronic acid	C	0.65 ^b
Control (+)	-	1.25 ^a
Control (-)	-	0.05 ^c
Control (S)	-	0.02 ^c
<hr/>		
Bsa	P	2.17 ^a
Gliadine	P	2.43 ^a
Heamoglobin	P	0.92 ^b
Lactalbumin	P	1.30 ^{b,c}
Casein	P	2.14 ^a
Tryptone	P	2.60 ^a
Trypsine	P	1.18 ^{b,c}
Collagen	P	1.38 ^c
Control (+)	-	2.55 ^a
Control (-)	-	0.07 ^d
<hr/>		
Oleic acid	L	0.85 ^{a,b}
Stearic acid	L	0.15 ^g
Linoleic acid	L	0.61 ^{bc}
Behenic acid	L	0.17 ^g
Oleic/Stearic acid	L	0.40 ^c
Oleic/linoleic acid	L	0.61 ^b
Lecithin/triglycerides	L	1.21 ^a
Triglycerides	L	0.18 ^g
Phosphatydilcholine	L	0.80 ^{a,b}
Cholesterol	L	0.13 ^g
Control (+)	-	1.09 ^a
Control (-)	-	0.07 ^g
Control (L)	-	0.10 ^g
Control (O)	-	0.13 ^g

Classe C: SE= 0.051, SED= 0.072; classe P: SE= 0.137, SED= 0.194; classe L: SE= 0.048; SED=, 0.067

¹ Class: Carbohydrates (C); Protein (P) ; Lipid (L)

² Measured as chlamydospores/mL x10⁵. Values with no common letter, for the same class, are significantly different (P<0.05).

The modification of the lipid present in basal medium on chlamydospore production was studied replacing the lecithin by other lipids. Media with oleic acid, phosphatydilcholine and lecithin/triglycerides shows no significant differences (P<0.05) compared to positive control. Media with linoleic, oleic/linoleic acid combination and oleic/stearic acid combination achieved productions significantly greater (P<0.05) than negative control, but significantly lower (P<0.05) than positive control (P<0.05). Saturated fatty acids (stearic and

behenic acids), triglycerides and cholesterol show no significant differences relatively to negative control, with low chlamyospore yields ($P < 0.05$). As expected, negative controls including those only with lecithin (O⁻) or only with ovalbumin (L⁻) had no significant ($P < 0.05$) difference, and induce no increase in chlamyospore production relatively to negative control (Czapek medium).

Ovalbumin and lecithin variation assay

With the increment of ovalbumin concentration on the basal medium, occurs an increase ($P < 0.05$) in chlamyospore production. The maximum production of chlamyospores/mL occurs at 3.25 g/L of ovalbumin (Fig. 1). Ovalbumin concentrations above 3.25 g/L cause a significant ($P < 0.05$) chlamyospore production decrease. The dry weight increases along with the ovalbumin concentration, from the lowest (0.0 g/L) to the highest (13.0 g/L) concentration (Fig.1) ($R = 0.90$).

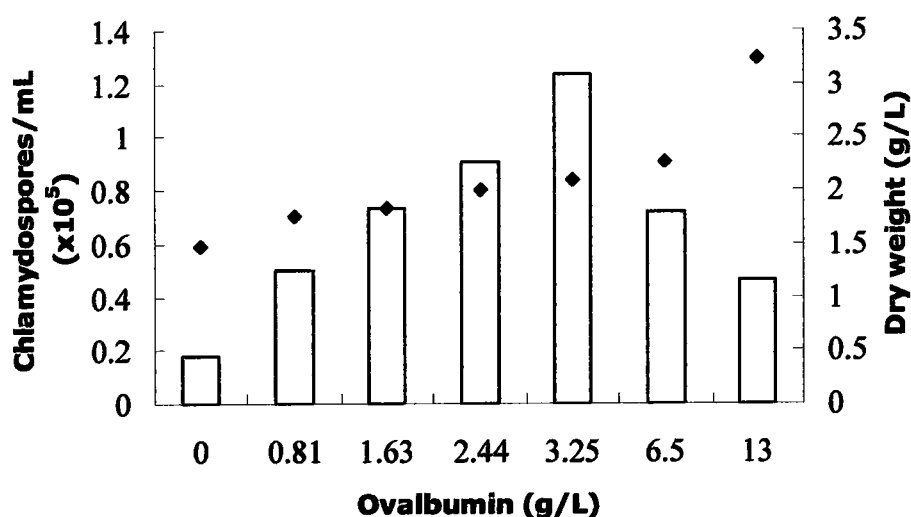


Figure 1: Effect of ovalbumin concentration on chlamyospore production and dry weight. Bars represent chlamyospore production and points represent dry weight. Bars with no common letter are significantly different ($P < 0.05$). Chlamyospore production: SE=0.048, SED=0.068; dry weight: SE= 0.105; SED= 0.149.

Lecithin consumption by PcMR is higher at ovalbumin concentrations from 0.0 to 3.25 g/L. Above 3.25 g/L of ovalbumin, the lecithin residue in the medium increases ($P < 0.05$), leaving near 50% of the lecithin in the medium (Fig. 2) to ovalbumin concentrations of 6g/L and 13 g/L. The increment of albumin

concentration leads to an increase ($P<0.05$) in ovalbumine residue that is particularly evident over 6.5 g/L of ovalbumin (Fig. 2).

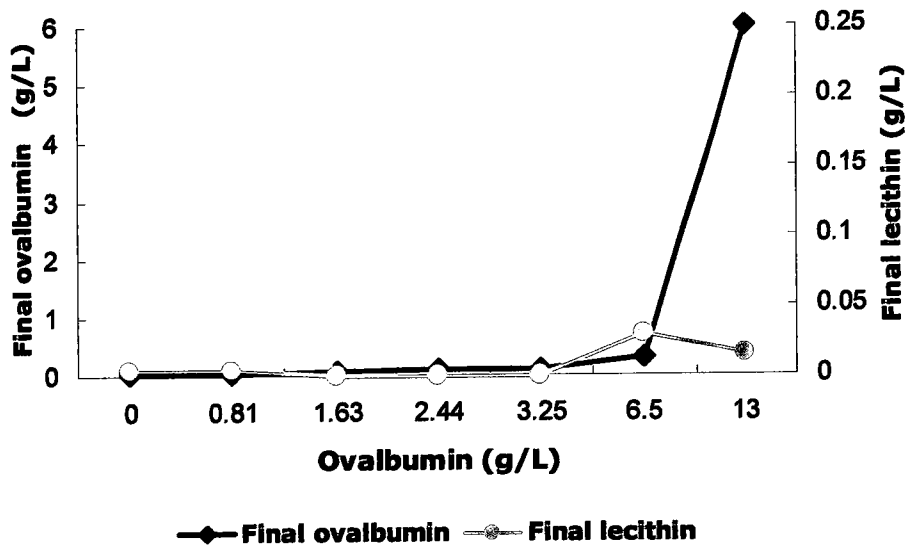


Figure 2: Effect of ovalbumin concentration variation on ovalbumin and lecithin consumption.

The effect of increasing lecithin concentration causes an increase on chlamydospore production to a maximum level of 3×10^5 chlamydospores/mL that remains constant ($P<0.05$) from 1 to 6 g/L of lecithin (Fig. 3).

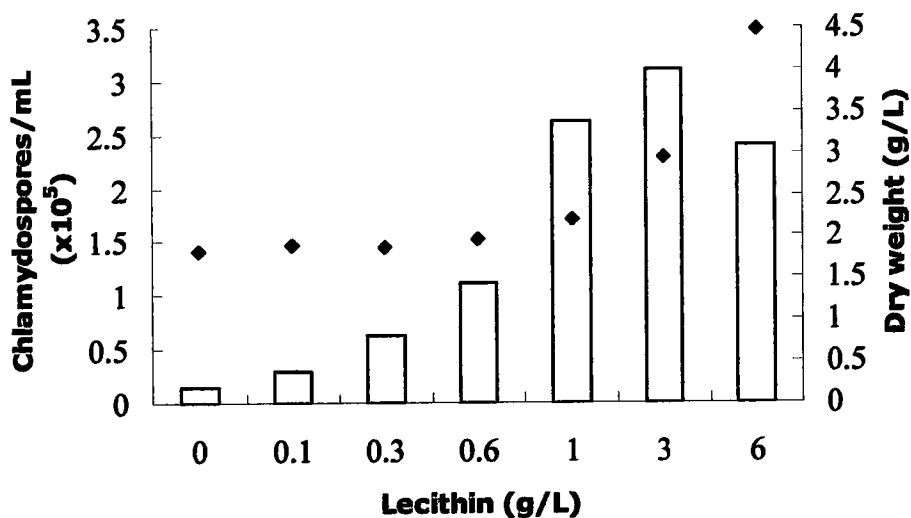


Figure 3: Effect of lecithin concentration on chlamydospore production and dry weight. Bars represent chlamydospore production and line represents biomass production. Values with no common letter are significantly different ($P<0.05$). SE=0.106, 0.067; SED=0.150, 0.094, to chlamydospore production and dry weight, respectively.

The dry weight increases with lecithin concentrations from the lowest (0.0 g/L) to the highest (6 g/L) lecithin concentration, in a similar way to that observed

with ovalbumin concentration ($R=0.83$). The ovalbumin consumption by PcMR increases from the lowest (0.0 g/L) to the highest (6 g/L) lecithin concentration, leaving low ovalbumin residues in the media (Fig. 4).

The increment of lecithin concentration leads to a slight increase ($P<0.05$) of lecithin residue in the media, especially above 1 g/L of lecithin, although even with 6 g/L of lecithin the residual concentration is relatively low (0.25 g/L).

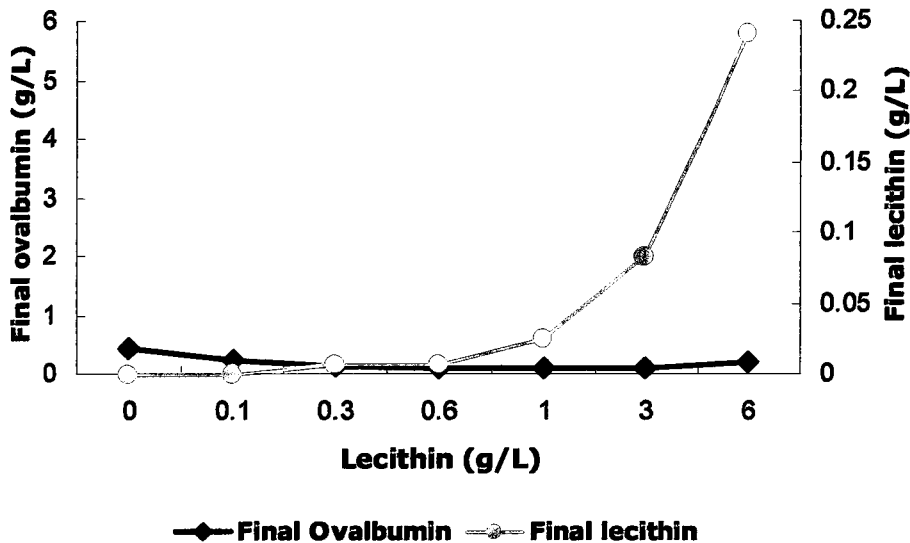


Fig. 4: Effect of lecithin concentration variation on ovalbumin and lecithin consumption.

DISCUSSION

The effect of different salt mixtures shows that salt composition is important in chlamyospore production in liquid media, according to the importance of the different ions already stated as necessary for the growth of most saprophytic fungus (8, 4). The results for chlamyospore production in aerated media show that the additional ions Ca^{2+} and NO_3^- play an important role in the beginning of fungal development. The importance of these ions in fungal growth is well established (21), although it's unclear the role of each of them in chlamyospore production. Once NO_3^- is present in Czapek medium, with low chlamyospores yields, and there are other sources of N (ovalbumin) in basal media, Ca^{2+} is likely to be the most important ion for *P. chlamyosporia* chlamyospore production. It is possible that, at least partially, the role of Ca^{2+} might be replaced by other positive cations like K^+ or Mg^{2+} , once there is no difference in chlamyospore production from media with mixture A and B in

stationary culture. The differences encountered in chlamyospore production using media with mixture C or mixture D, both with Ca^{2+} , might be due to changes on pH caused by the different amount of Ca^{2+} added to the media. These results establish mixture A as a suitable salt mixture to achieve the maximum chlamyospore production with the quantities of organic nutrients used in basal medium.

The solid culture provided, during many years, reliable results (5, 9, 11, 26, 27) in production of chlamyospores for experiment inoculation. Because the moisture of solid media is expected to be relatively low, it was possible that a_w may play an important role on chlamyospore production, as it has in the production of other types of spores (17), especially in liquid media. The results show that the substances used to decrease a_w are either toxic, as glycerol, PPG and NaCl, or lead to lower chlamyospore productions as sucrose, peptone and collagen. Less toxic substances tend to affect fungal growth (not quantified) which was evident during the culture period in the flasks. The properties of media like a_w seem to have an indirect role on chlamyospore production, mainly related with the growth and survival of the fungus. These results reinforce that the main role on the generation and production of chlamyospores seem to be played by the nutrients in the medium and not by other additional factors.

The results show a marked difference between the importance of the three main groups of organic nutrients involved in *P. chlamyosporia* nutrition (carbohydrates, proteins and lipids). Starch and β -1,3 glucane are major components of seeds, such as wheat, corn, barley, oat and rice, main components of solid media currently used for chlamyospore production (1, 11). The gelatinous matrix of egg masses of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) has mucopolysaccharides in its composition (2) and hyaluronic acid is a common component of animal mucopolysaccharides. So, hyaluronic acid is likely to be present in the gelatinous matrix. However, none the carbohydrates tested appeared to increase the production of chlamyospores in liquid media. This is clearly demonstrated by the effect of sucrose. Sucrose is the single organic nutrient in Czapek medium (negative control) and even after its addition to basal medium makes no effect on the chlamyospore production. Although the added carbohydrates make no contribution to chlamyospore production,

they are a good carbon source to growth and sporulation for *P. chlamydosporia* (19, 20, 25). In all the carbohydrate supplemented media, either in solid or liquid culture, the fungus *P. chlamydosporia* produced great amounts of fungal hyphae and phialoconidia.

The proteins play an important role on the chlamyospore production in liquid media, but only in the presence of lecithin, confirming previous findings (Franco, unpublished results). There is a tenfold increase in chlamyospore production in basal media compared to control without lecithin (L⁻) or control without ovalbumin (O⁻). The substitution of ovalbumin by other soluble proteins (the exception is gliadine that has a low water solubility) show that most proteins are able to produce chlamyospores in liquid media (10 to more than 20 fold increase to negative control).

Although there are differences between proteins, all tested proteins could be used for chlamyospore production in liquid media. The lowest productions were achieved with haemoglobin, the intermediate with lactalbumin, trypsin and collagen, and the highest with bsa, gliadine, casein and tryptone. The result analysis shows that, neither the origin, the function, the class of proteins, nor molecular weight influence chlamyospore production.

Several authors have demonstrated aminoacid importance in both, solid and liquid media (19, 20) and on sporulation (10). The aminoacid composition could also be an important factor, although no correlation was obtained between the production ability and the aminoacid composition. It is possible that a minimum composition of aminoacids is necessary for chlamyospore production, composition which is probably met by all the tested protein sources.

The lipids play also, as the proteins, a fundamental role in chlamyospore production (Franco, unpublished results). But, unlike proteins, lipid class has a marked influence on the chlamyospore production. It was shown that the triglycerides used had no influence in chlamyospore production, because when they replace lecithin in basal media no difference to negative control was found. The statement of no effect of triglycerides on chlamyospore production is reinforced by the result obtained with the triglycerides added to basal medium, which has no influence on chlamyospore production compared to positive control. The use of cholesterol gave similar results to triglycerides. When phosphatidylcholine was tested alone with ovalbumin gave

chlamydospore yields similar to positive control. This result along with those for basal media (lecithin) suggests that phospholipids may be used to the production of chlamydospores in liquid media. When the fatty acids oleic, linoleic, stearic and behenic acid were tested, they produced different results. The unsaturated fatty gave productions similar (oleic acid) or close (linoleic acid) to positive control and the saturated fatty acids (stearic acid and behenic acid) produced no difference to negative control.

When considered together, the effect of triglycerides (sunflower oil), lecithin, phosphatidylcholine and fatty acids, suggest that the nutrients involved in chlamydospore production along with proteins, are the fatty acids, namely oleic and linoleic acid. The differential chlamydospore productions achieved by fungus on the presence of saturated and unsaturated acids point to importance of insaturated acids. The fatty acid composition of phosphatidylcholine can vary with its source, but usually the main fatty acids in its composition are oleic and linoleic acid (1) although other fatty acids might be present in variable proportions. Chlamydospore yields obtained on the media with phosphatidylcholine and lecithin show that it easily digests phospholipids, releasing the fatty acids. On the other and, the results also intend that the fungus *P. chlamydosporia* may have difficulties to digest sunflower oil. Sunflower oil is rich in oleic and linoleic acids (1), and if it was easily digested, it would release those fatty acids and the fungus should have produced chlamydospores. The above assumptions are reinforced by the use of the mixture linoleic/oleic acids which gave similar results to each acid alone, and by the fact that when oleic acid is mixed with stearic acid, a reduction relatively to positive control is achieved. This is probably due to the reduction of oleic acid concentration in the medium. The importance of unsaturated fatty acids in fungi nutrition was already stated, especially in what concerns normal growth maintenance, survival and cell membrane fluidity and cell viability, at low temperatures (3). In the genus *Aspergillus*, biochemical data suggests an additional requirement of unsaturated acids and their derivatives for the production of multicellular structures such as conidiophores, cleistothecia and sclerotia (3).

Chlamydospore production in liquid media depends of two classes of organic nutrients, the proteins and the phospholipids, particularly, an adequate

aminoacid and unsaturated fatty acid composition. Because of this dual nature an optimal ratio or a range should be encountered. The results suggest that, if enough quantities of these components are present, *P. chlamydosporia* can grow and produce chlamydospores without additional carbon sources.

The basal media has a ratio of ovalbumin/lecithin of 3.25:1 (w/w). This ratio is based on previous work (Franco, unpublished results) and the results presented show the effect of ovalbumin:lecithin proportion, when one of them is maintained constant and the other is altered. The increase in protein concentration with lecithin concentration constant, leads to an increase in chlamydospore production to the maximum concentration of 3.25 g/L (the concentration of basal medium), and to a reduced chlamydospore yield at higher ovalbumin concentrations. This effect happens along with continuous growth of fungal biomass and might be due to low aeration in the medium caused by higher protein concentrations. Considering the consumption of lecithin and ovalbumin by the fungus, when ovalbumin concentration is increased in the medium, all lecithin is consumed at ovalbumin concentrations above 6.5 g/L, although, most of the additional ovalbumin remains in the medium as residue. These results show that for 1g/L of lecithin in the medium the optimum level of ovalbumin lays between 3.25 and 6.5 g/L, probably closer to 3.25 g/L.

When lecithin concentration is increased in the media, it is observed an increase in chlamydospore production, achieving the maximum yield at 1 g/L and maintaining that production on the following lecithin concentrations. This effect happens along with continuous biomass increase till the highest lecithin concentration. Looking into the consumption of ovalbumin and lecithin when lecithin concentration is increased in the medium, the ovalbumin is almost completely consumed at all concentrations tested. On the other hand, for the same concentrations, most of the added lecithin is also consumed, although the lecithin residue for concentrations above 1 g/L increase slightly. These results show that the optimum lecithin concentration lay between 1 and 3 g/L, probably closer to 1 g/L.

When considered together the results presented show that the basal medium proportion of ovalbumin:lecithin (3.25:1, w/w) are within the optimum range found. The existence of a specific proportion between two classes of nutrients,

involved in the chlamyospore formation by *P. chlamyosporia*, may suggest specific requirements on this spore's constitution, namely specific proteins and lipids. Inside chlamyospore cells, lipid droplets accumulate (18) and because lipids are not easily and quickly synthesised its requirement is understandable. On the other hand, the requirement for protein is not so obvious and further work is needed to clear this issue. Thus, the specific nutrient proportion needed to optimize chlamyospore production is probably related with the nature of chlamyospores, and once achieved the proportion that maximises chlamyospore production it should be simpler to attain higher chlamyospore yields. Nevertheless further work is necessary to understand the relation between this specific nutrient requirements and the ecological role of chlamyospores in the life cycle of *Pochonia chlamyosporia*.

REFERENCES

1. **Belitz, H.D. and Grosch, W.** 1999. Food Chemistry. 1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
2. **Bird, A.F., and G.E. Rogers.** 1965. Ultrastructure of the cuticle and its formation in *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 11:224–230.
3. **Calvo, A., Hinze, L., Gardner, W. and Keller, N.** 1999. Sporogenic Effect of Polyunsaturated Fatty Acids on Development of *Aspergillus* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 3668-3673.
4. **Carlile, M. J., Watkinson, S. C. E Goodway, G. W.** 2001. The Fungi, 2nd ed. Academic Press, London, pp. 149-155.
5. **de Leij, F. A. A. M., Kerry, B. R. & Dennehy, J. A.** 1993. *Verticillium chlamyosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests. *Nematologica.* 39:115-126.
6. **Doumas, B.T. and Peters T. Jr.** 1997. Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. *Clinica Chimica Acta.* 258:3-20.

7. **Franco, C., Esteves, I., Cravo, J., Clara, I. & Mota, M.** 2001. The use of *Verticillium chlamyosporium* isolates, as a biological control agents against *Meloidogyne incognita*, in a green pepper pot test evaluation. Proc. Of 11th Congress of Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of Sociedade Portuguesa de fitopatologia, Andaluz Academic publishing, Redondo, 154-156.
8. **Goddard, H.N.** 1913. Can Fungi living in agricultural soil assimilate free nitrogen? *Botanical Gazette.* **56:** Crawfordsville, IN, 249-304.
9. **Hidalgo-Diaz, L., Bourne, J. M., Kerry, B. R. & Rodriguez, M. G.** 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management.* **46:**277-284.
10. **Jackson, M. A. and Slininger, P. J.** 1993. Submerged culture conidial germination and conidiation of the bioherbicide *Colletotrichum truncatum* are influenced by the amino acid composition of the medium. *J. Ind. Microbiol.* **12:**417±422.
11. **Kerry, B. R. and Bourne, L.M. (ed)** 2002. A Manual for Reasearch on *Verticillium chlamyosporium*, a Potencial Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes. Germany:; Druckform GmbH, Merckstr 22-23.
12. **Kerry, B. R. and Crump, D. H.** 1998. The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* in four soils under intensive cereal production. *Fundamental Applied Nematology.* **21:** 617-625.
13. **Kerry, B. R.** 1995. Ecological considerations for use of the nematophagous fungos, *Verticillium chlamyosporium*, to control plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Botany.* **73:** S65-S70.

14. **Kerry, B. R.** 2001. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control Rooth-Knoth Nematodes (Meloidogyne spp.), volume 5, in Fungi as biocontrol agents, Progress, Problems and potencial, (eds Butt, T., Jackson, C., Magan, N.). Cab International, UK.
15. **Kerry, B. R., Kirkwood I.A., de Leij, B. J. Leidjens, M. B. and Brookes, P. A.** 1993. Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Gooddard, a parasite of nematodes in soil. *Biocontrol Sci. Technol.* **3**: 355-365.
16. **Kerry, B.R.** 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of nematodes. *Phytopathology.* **38**: 423-441.
17. **Kleespies, R. G., and Zimmermann, G.** 1998. Effect of Additives on the Production, Viability and Virulence of Blastospores of *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci. and Techn.* **8**:207-214.
18. **Lin, X. and Heitman, J.** 2005. Chlamyospore Formation during Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukariotic Cell.* **4**: 1746–1754.
19. **Liu, X. Z. and Chen, S. Y.** 2003. Nutritional requirements of *P. chlamydosporia* and ARF18, fungal parasites of nematode eggs. *J. Invertebr. Pathol.* **83**:10-15.
20. **Mo, M., Xu, C and Zhang, K.** 2005. Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *P. chlamydosporia* in liquid culture, *Mycopathologia.* **159**: 381-387.
21. **Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A.** 1996. *Microbiology* 3rd ed., Wm. C. Brown Publishers.

22. **Smith, D. and Onions, A. H. S.** 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. Second edition, CAB International, Wallingford, UK. ISBN 085198-902-0.
23. **Stewart, J. C.** 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **104**:10-14.
24. **Stirling, G. R., Licastro, K. A., West, L.M. & Smith, L. J.** 1998. Development of commercially acceptable formulations of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Biological Control.* **11**:217–223.
25. **Sun, M. and Liu, X.** 2006. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia.* **161**: 295-305.
26. **Van Damme, V., Dekie, A. and Viaene, N.** 2005. Long-term efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for management of *Meloidogyne javanica* in glasshouse crops. *Nematology.* **7**: 727-736.
27. **Verdejo-Lucas, S., Ornat, C., Sorribas, F. J. & Stchiegel, A.** 2002. Species of Root-knot Nematodes and Fungal Egg Parasites Recovered from Vegetables in Almería and Barcelona, Spain. *Journal of Nematology.* **34**:405–408.
28. **Webster, R.** 2007. Analysis of variance, inference, multiple comparisons and sampling effects in soil research. *European Journal of Soil Science.* **58**: 74-82.
29. **Zare, R., Gams, W., Evans, H.** 2001. A revision of *Verticillium chlamydosporium* section *prostata*, V., The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*, *Nova Hedwigia.* **73**: 51-86.

III- Considerações

Finais

Com este trabalho experimental, demonstrou-se que a composição da mistura de sais, em particular os íons Ca^{2+} e NO_3^- , é fundamental para a produção de clamidósporos pelo fungo *P. chlamydosporia* em meio líquido. Para além disso, constatou-se que a mistura A contém a combinação de sais mais adequada para a maximização da produção de clamidósporos, na presença dos nutrientes orgânicos do meio basal.

Nenhum dos carboidratos testados aumentou significativamente a produção de clamidósporos em meio líquido, contudo esses nutrientes são uma importante fonte de carbono para a manutenção, crescimento e esporulação de *P. chlamydosporia*, tendo-se verificado a produção de elevadas quantidades de hifas e fialoconídios.

As proteínas desempenham um papel fundamental na produção de clamidósporos em meio líquido, embora se tenham obtido resultados diferentes para os vários ensaios. Apesar disso, verificou-se que, nem a origem, nem a função, nem a classe, nem o peso molecular ou a composição em aminoácidos das proteínas testadas, influenciam a produção de clamidósporos.

Os lípidos têm também um papel relevante na produção de clamidósporos, mas contrariamente às proteínas, a sua categoria é relevante. Os resultados sugerem que a produção de clamidósporos está dependente de duas classes de nutrientes, proteínas e fosfolípidos, em particular, de uma adequada composição em aminoácidos e ácidos gordos insaturados. Devido a esta dualidade, dever-se-á encontrar a proporção óptima entre estes dois nutrientes de forma a maximizar a produção de clamidósporos, sem necessidade de recorrer a outras fontes adicionais de carbono.

Resumindo, a proporção de ovalbumina/lecitina do meio basal (3,25/1; p/p) encontra-se dentro dos limites óptimos para essa produção. Assim, uma determinada proporção de nutrientes específicos, proteínas e lípidos, deverá ser necessária para otimizar a produção de clamidósporos, e após conseguida essa relação, deverá ser mais fácil a produção em massa deste tipo de esporos. No entanto, será necessário realizar mais estudos para compreender a relação entre a necessidade específica de nutrientes e o papel ecológico dos clamidósporos no ciclo de vida de *Pochonia chlamydosporia*.

The present study point to the importance of basal media salt composition, particularly ions Ca^{2+} and NO_3^- , in chlamyospore production in liquid media. These results establish mixture A as a suitable salt mixture to achieve the maximum chlamyospore production with the quantities of organic nutrients used in basal medium.

Carbohydrates added to basal media make no contribution to chlamyospore production, although they are a good carbon source to growth and sporulation for *P. chlamyosporia*. The proteins play an important role on the chlamyospore production in liquid media. Although there are differences between proteins, all tested proteins could be used for chlamyospore production in liquid media. The result analysis shows that, neither the origin, the function, the class of proteins, the molecular weight, nor aminoacid composition influence chlamyospore production. The lipids play also, as the proteins, a fundamental role in chlamyospore production. But, unlike proteins, lipid class has a marked influence on the chlamyospore production. Chlamyospore production in liquid media depends of two classes of organic nutrients, the proteins and the phospholipids, particularly, an adequate aminoacid and unsaturated fatty acid composition. Because of this dual nature an optimal ratio or a range should be encountered. The results suggest that, if enough quantities of these components are present, *P. chlamyosporia* can growth and produce chlamyospores without additional carbon sources. When considered together the results presented show that the basal medium proportion of ovalbumin:lecithin (3.25:1, w/w) are within the optimum range found. The existence of a specific proportion between two classes of nutrients, involved in the chlamyospore formation by *P. chlamyosporia*, may suggest specific requirements on this spore's constitution, namely specific proteins and lipids. Thus, the specific nutrient proportion needed to optimize chlamyospore production is probably related with the nature of chlamyospores, and once achieved the proportion that maximises chlamyospore production it should be simpler to attain higher chlamyospore yields. Nevertheless further work is necessary to understand the relation between this specific nutrient requirements and the ecological role of chlamyospores in the life cycle of *Pochonia chlamyosporia*.