



DEFINIÇÃO DE PARÂMETROS PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Cercopora aff. canescens* EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

Gabriela Maria de Lima **Dias**¹; Aline Vitoria Corim **Marim**²; Bernardo de Almeida **Halfeld-Vieira**³; Kátia de Lima **Nechet**⁴

Nº 21406

RESUMO- O objetivo desse trabalho foi identificar parâmetros na composição de meios de cultura que influenciam na produção de biomassa em fermentação líquida de *Cercospora aff. canescens* (CMAA 1444), isolado selecionado como candidato a mico-herbicida no controle biológico de *Ipomoea spp.* (cordas-de-viola). Onze ensaios foram realizados e, em cada ensaio foi utilizado meio de cultura Czapek-Dox modificado com diferentes combinações de três níveis dos parâmetros: relação C/N, relação N/C, pH, sulfato de magnésio, e sulfato de potássio. Erlenmeyers contendo cinco discos de micélio do isolado fúngico foram mantidos em agitador orbital (150 rpm) a 25 °C em luz contínua. Após 7, 14 e 21 dias de crescimento, a biomassa fúngica de cinco repetições foi filtrada e seca a 70 °C até a obtenção de peso constante. A taxa de acúmulo de biomassa seca (g/50mL de meio) por dia foi calculada por regressão linear e as biomassas comparadas por intervalo de confiança. As maiores taxas de biomassa seca por dia foram de 0,85 g a 1,09 g/50mL. As maiores biomassas foram observadas aos 21 dias variando de 3,56 a 4,08 g/50mL. Os fatores de crescimento identificados nos meios de cultura com maiores taxa de crescimento foram relação C/N 10:1 e 50:1; relação N/C 50:1 e 100:1, pH 4 e 7; sulfato de magnésio 0,25 g e 1 g; sulfato de potássio 0,25 g e 1 g. Esses fatores poderão subsidiar ensaios de otimização de produção de inóculo de *Cercospora aff. canescens*, fundamentais para o desenvolvimento de um mico-herbicida no controle das cordas-de-viola.

Palavras-chaves: *Ipomoea spp.*, corda-de-viola, controle biológico, mico-herbicida, mancha-de-cercopora.

¹ Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Química, ESAMC, Campinas-SP; lima.gabi360@gmail.com

²Bolsista Embrapa: Graduação em Biotecnologia, UFSCAR, Araras-SP; alinecmarim@gmail.com

³ Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; bernardo.halfeld@embrapa.br.

⁴ Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; katia.nechet@embrapa.br



ABSTRACT – *The aim of this work was to identify parameters in culture media content which influence the biomass production under liquid fermentation of Cercospora aff. canescens (CMAA 1444), an isolate selected as potential mycoherbicide to control Ipomoea spp. (morning glories). Each of the eleven assays were carried out using Czapek-Doz media modified with different compositions considering three levels of the following parameters: C/N ratio, N/C ratio, pH, magnesium sulphate, and potassium sulphate. Erlenmeyers containing five mycelia disks from the isolate were maintained in an orbital shaker (150 rpm), at 25 °C under continuous light. After 7, 14 and 21 days of incubation, the biomass from five repetitions was filtered and dried at 70 °C until constant weight. The dry biomass accumulation rate (g/50mL of culture media) per day was calculated using linear regression, and the biomass compared by using confident interval. The highest dry biomass accumulation rates per day ranged from 0.85 g to 1.09 g/50mL. The highest biomass was observed 21 days after incubation ranging from 3.56 to 4.08 g/50mL. The growth parameters identified in the culture media that provide the highest dry biomass accumulation rate were C/N ratio 10:1 and 50:1; N/C ratio 50:1 and 100:1, pH 4 and 7; magnesium sulphate 0.25g and 1 g; potassium sulphate 0.25g and 1 g. These parameters can be used to optimize further investigations for inoculum production of Cercospora aff. canescens, essential for the development a mycoherbicide to control morning glories.*

Keywords: *Ipomoea* spp., morning glories, biological control, mycoherbicide, *Cercospora* leaf spot.

1. INTRODUÇÃO

As espécies *Ipomoea nil*, *I. hederifolia*, *I. quamoclit* e *I. grandifolia*, popularmente conhecidas como cordas-de-viola, são importantes invasoras em áreas de cana crua, uma vez que apresentam capacidade de germinar sob a camada de palha que se forma em áreas de cana-de-açúcar manejadas sem queima (MONQUERO et al., 2011). Essas plantas são trepadeiras agressivas que interferem, não apenas na capacidade produtiva da cultura, mas dificultam o corte mecanizado, comprometendo o rendimento das máquinas e qualidade do produto colhido (BHULLAR et al., 2012). Além disso, a presença da palha diminui a eficácia tanto de herbicidas pré-emergentes quanto pós-emergentes (SILVA; MONQUERO, 2013; PIZZO et al., 2010).



Nesse contexto, as cordas-de-viola foram selecionadas como alvo potencial para estudos de controle biológico pelo método mico-herbicida, com o uso de fungos fitopatogênicos. A partir de levantamento da micobiota de *Ipomoea* spp. e de estudos de epidemiologia de doenças associadas às cordas-de-viola, um isolado de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 (GenBank MG652650) foi selecionado como candidato a mico-herbicida por ser capaz de causar mancha foliar seguida de desfolha nas plantas-alvo (SANTOS et al., 2016; NECHET et al., 2019).

Entretanto, os principais obstáculos são o uso de alta concentração de inóculo da suspensão (2×10^7 conídios/mL) para causar desfolha nas plantas e a dificuldade de produção de inóculo desse isolado, uma vez que o gênero *Cercospora* é de difícil esporulação *in vitro*, o que constitui um entrave para o desenvolvimento de um produto biológico (NECHET; HALFELD-VIERA, 2019).

Atualmente, o uso da técnica difásica é necessário para a produção de inóculo de *Cercospora* aff. *canescens*, e essa estratégia envolve duas técnicas de fermentação (líquida e sólida). Na fase de fermentação líquida produz-se a biomassa do fungo que após dias de crescimento é triturada e disposta em meio de cultura sólido, em incubadora por mais 5 dias, para a produção de inóculo. A otimização da fermentação líquida pode reduzir o tempo de produção de biomassa fúngica aumentando a eficiência da técnica difásica para a produção de propágulos de *Cercospora* aff. *canescens*.

O objetivo deste trabalho foi identificar parâmetros na composição de meio de cultura Czapek-Dox que influenciam na produção de biomassa de *Cercospora* aff. *canescens* em fermentação líquida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente utilizando o isolado *Cercospora* aff. *canescens* (CMAA 1444). O isolado foi repicado para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), mantidos por sete dias em incubadora a 25°C em fotoperíodo de 12 h sob lâmpadas de luz negra (Modelo F15T8-BL/GE/15 watts). Após este período, cinco discos de BDA contendo crescimento fúngico foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido sintético Czapek-Dox modificado (DHINGRA; SINCLAIR, 1995).



Cada ensaio foi constituído de uma combinação diferenciada dos seguintes componentes do meio de cultura Czapek-Dox: dextrose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ -40% C), nitrato de cálcio ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ -17% N), sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), fosfato de potássio (K_2HPO_4), cloreto de potássio (KCl), e sulfato de ferro ($FeSO_4 \cdot H_2O$). A quantidade utilizada em cada combinação variou de acordo com o nível do componente em cada ensaio (Tabela 1). Para os componentes KCl e $FeSO_4 \cdot H_2O$ utilizou-se 0,5 g e 0,364 g, respectivamente, em todos os ensaios.

Tabela 1. Parâmetros e níveis (baixo, central e alto) utilizados nos ensaios para a otimização da produção de biomassa de *Cercospora aff. canescens* CMAA 1440

| Parâmetros | Código | Níveis | | |
|-------------------------|----------------|-----------|-------------|----------|
| | | -1(baixo) | 0 (central) | 1 (alto) |
| C:N | X ₁ | 10:1 | 50:1 | 100:1 |
| N:C | X ₂ | 10:1 | 50:1 | 100:1 |
| pH | X ₃ | 4 | 7 | 8,5 |
| Sulfato de Magnésio (g) | X ₄ | 0,25 | 1 | 2,5 |
| Sulfato de potássio(g) | X ₅ | 0,25 | 1 | 2,5 |

Cada ensaio foi constituído de um meio Czapek-Dox modificado conforme a combinação dos níveis dos fatores investigados (Tabela 2). Os Erlenmeyers, contendo cinco discos de micélio do isolado CMAA 1440, foram mantidos em incubadora orbital a 150 rpm, submetidos à luz contínua a 25 °C. Após 7, 14 e 21 dias de crescimento, a biomassa fúngica foi filtrada em papel de filtro Whatman N° 1 e seca em estufa a 70 °C até a obtenção de peso constante (Figura 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições e 3 períodos de coleta (7, 14 e 21 dias), sendo cada repetição um Erlenmeyer.

A análise de regressão linear foi calculada a partir dos dados de biomassa obtidos nos três períodos de coleta. A partir das equações das retas obtidas, obteve-se a taxa de acúmulo de biomassa seca (g/50mL de meio) por dia (inclinação da reta). As biomassas secas obtidas aos 21 dias de crescimento foram comparadas estatisticamente por meio do intervalo de confiança a 95%. Tratamentos que apresentaram valores coincidentes dentro do intervalo de confiança foram considerados estatisticamente iguais. Os cálculos foram realizados no programa Excel®.

Tabela 2. Combinações dos parâmetros: C:N (X_1), N:C (X_2), pH (X_3), sulfato de magnésio (X_4) e sulfato de potássio (X_5) para a composição do meio de cultura líquido Czapek-Dox modificado.

| Ensaio | Meio | X_1 | X_2 | X_3 | X_4 | X_5 |
|--------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | A | -1 | - | -1 | -1 | -1 |
| 2 | B | - | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 3 | C | 0 | - | -1 | 1 | -1 |
| 4 | D | - | 0 | -1 | 1 | -1 |
| 5 | E | 0 | - | 0 | 0 | 0 |
| 6 | F | - | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | G | 1 | - | 0 | 1 | 1 |
| 8 | H | - | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 9 | I | -1 | - | 1 | 1 | 0 |
| 10 | J | - | -1 | 1 | 1 | 0 |
| 11 | L | 1 | - | 1 | 1 | 1 |

- fator não utilizado no ensaio

-1 nível baixo; 0 nível central; 1 nível alto



Figura 1. Esquema dos ensaios da produção de biomassa de *Cercospora aff. canescens* CMAA 1440

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biomassa seca de *Cercospora aff. canescens* obtida com cada meio de cultura aos 7, 14 e 21 dias de crescimento é apresentada na Figura 2. Aos 7 dias de crescimento, as biomassas obtidas variaram de 1,2 g a 2,0 g/50mL. Aos 14 dias de crescimento, essa variação foi de 1,20 g a 3,65 g/50mL enquanto que aos 21 dias de crescimento a produção de biomassa seca variou de 1,20 g a 4,08 g/50mL. Aos 21 dias de crescimento observou-se diferença entre as produções de

biomassa para os meios de cultura. Os meios E, F, G, I e J apresentaram produção de biomassas em torno de 1,20 g/50mL, independente do tempo de crescimento (Figura 2).

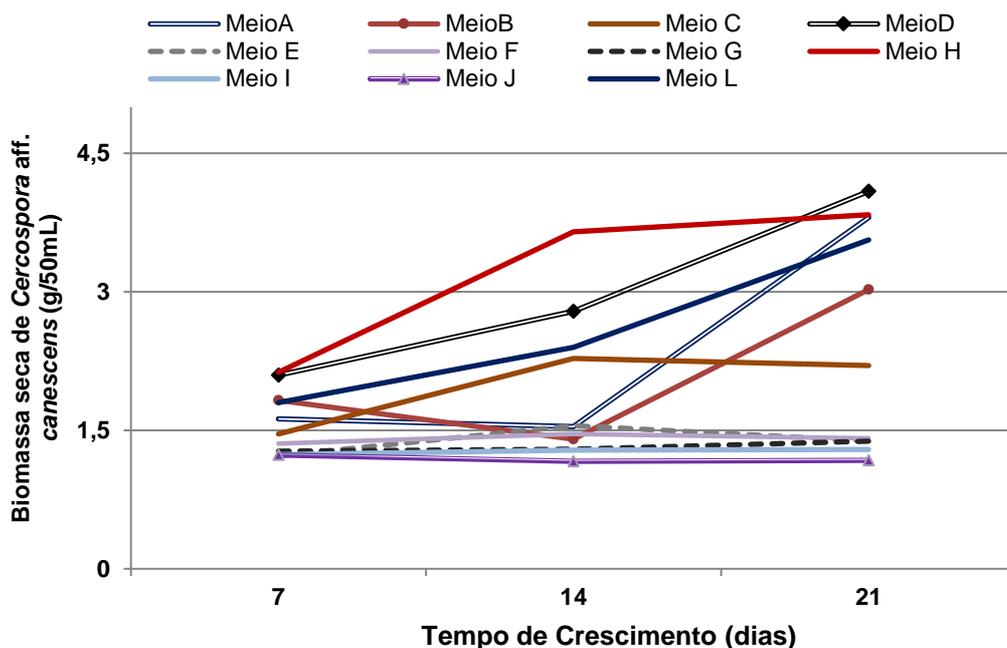


Figura 2. Biomassa seca (g/50mL) de *Cercospora aff. canescens* CMAA 1440 após 7, 14 e 21 dias de crescimento em incubadora tipo Shaker a 25° C sob luz contínua em diferentes composições de meio sintético Czapek-Dox. Valores representam a média de 5 repetições.

A taxa de acúmulo de biomassa seca (g/50mL de meio) por dia calculada para os meios de cultura é apresentada na Tabela 3. As taxas observadas variaram de zero (meio J) a 1,09 g/50mL (meio A) com maiores taxas de crescimento por dia observadas para os meios de cultura A-1,09 g/50mL (C/N 10:1; pH 4; 0,25 g Sulfato de magnésio; 0,25g Sulfato de pótássio), D-0,99 g/50mL (N/C 50:1; pH 4; 1 g Sulfato de magnésio; 0,25 g Sulfato de pótássio), L-0,88 g/50mL (C/N 50:1; pH 7; 1 g Sulfato de magnésio; 1 g Sulfato de pótássio) e H- 0,85 g/50mL (N/C 100:1; pH 7; 1 g Sulfato de magnésio; 2,5 g Sulfato de pótássio) (Tabela 3). Os meios de cultura B e C apresentaram taxa de acúmulo de biomassa seca de 0,66 e 0,37 g/50mL, respectivamente. Para os demais meios de cultura, E, F, G, I, e J, a taxa de acúmulo de biomassa seca variou de 0 a 0,08 g/50mL (Tabela 3).



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021
01 a 02 de setembro de 2021
ISBN 978-65-994972-0-9

As biomassas secas obtidas com os meios de culturas A, D, L e H, aos 21 dias de crescimento, variaram de 3,56 a 4,08 g/50mL, não diferiram entre si e foram maiores que a biomassa seca obtidas nos demais meios de cultura (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de acúmulo de biomassa seca por dia (g/50mL) e intervalo de confiança da biomassa seca de *Cercospora aff. canescens* CMAA 1440 aos 21 dias de crescimento em incubadora tipo Shaker a 25° C sob luz contínua em diferentes composições de meio sintético Czapek-Dox.

| Meios | Taxa de acúmulo de biomassa seca/dia (g/50mL) | Intervalo de Confiança (95%) (21 dias) |
|-------|--|---|
| A | 1,09 | 3,80±0,82* |
| D | 0,99 | 4,08±0,68* |
| L | 0,88 | 3,56±1,45* |
| H | 0,85 | 3,83±0,70* |
| B | 0,60 | 3,02±0,23 |
| C | 0,37 | 2,20±0,39 |
| E | 0,08 | 1,38±0,10 |
| G | 0,05 | 1,38±0,09 |
| F | 0,02 | 1,41±0,19 |
| I | 0,02 | 1,17±0,02 |
| J | 0 | 1,29±0,09 |

* Meios de cultura que apresentam biomassa seca com diferença estatística das demais biomassas secas. Valores representam a média de 5 repetições.

Nesse trabalho demonstramos que a combinação de diferentes fatores de crescimento influenciaram na produção de biomassa de *Cercospora aff. canescens* e as maiores biomassas foram obtidas aos 21 dias. Os componentes identificados nos meios de cultura com maiores taxa de crescimento foram relação C/N 10:1 e 50:1; relação N/C 50:1 e 100:1, pH 4 e 7; sulfato de magnésio 0,25 g e 1 g; sulfato de potássio 0,25 g e 1 g. O meio de cultura H apresentou aos 14 dias uma biomassa (de 3,65±1,06 g/50 mL) estatisticamente igual à produzida aos 21 dias de (intervalo de confiança 95%). Portanto, este meio proporcionou a obtenção da mesma biomassa em menor tempo de fermentação.

Fungos do gênero *Cercospora* apresentam crescimento lento e raramente esporulam em meio de cultura (GROENEWALD et al., 2013). Em função disso, muitos isolados de *Cercospora* são eliminados como candidatos a mico-herbicidas baseados apenas na sua baixa capacidade de



produção de inóculo. O processo atual de produção de inóculo de *Cercospora aff. canescens* é conhecido por técnica difásica e envolve duas etapas de fermentação: fermentação líquida e fermentação sólida (WALKER, 1980).

Na etapa de fermentação líquida se produz a biomassa do fungo, influenciada pela combinação de diferentes fatores na composição do meio de cultura. O efeito de diferentes meios de cultura tem sido relatado na produção de biomassa para outras espécies de *Cercospora* (GÓMEZ; REIS, 2013; ÁVILA; PITELLI, 2004). Entretanto, muitos trabalhos são delineados utilizando meios de cultura padronizados que limitam as combinações de fatores. Nesse trabalho, o meio sintético Czapek-Dox foi selecionado e permitiu o uso de diferentes níveis dos fatores relação C/N, N/C, pH e sulfato de magnésio e sulfato de potássio.

Considerando que não houve diferença entre os meios A, D, H e L, os fatores utilizados nesses meios podem ser utilizados como base para futuros delineamentos de ensaios de otimização. Outras combinações entre esses fatores podem levar a composição de um meio líquido em que se use quantidades menores de reagentes e que possam viabilizar uma produção maior de biomassa e até reduzir o tempo de fermentação líquida necessários para essa produção. Nesse estudo, maior biomassa foi obtida aos 21 dias de crescimento, tempo considerado longo para uma fermentação líquida. Entretanto, o meio H foi capaz de promover a redução desse período para 14 dias mantendo a mesma estimativa de produção de biomassa.

A biomassa produzida nessa fase será utilizada na segunda etapa da técnica difásica (fermentação sólida) e sua otimização pode influenciar na produção de conídios aumentando a eficiência do uso dessa técnica para a produção de propágulos de *Cercospora aff. canescens*. Essa otimização é fundamental para o avanço nas etapas de estudo que visa o desenvolvimento de um produto biológico para o controle de *Ipomoea* spp.

Não há produto biológico comercial de larga escala para o controle de plantas daninhas (BO BO et al., 2020). O desenvolvimento de um mico-herbicida para o controle de cordas-de-viola é uma proposta inovadora e atende ao objetivo estratégico da Embrapa de desenvolver tecnologias de base biológica para a geração de bioprodutos. Além de contribuir com o desafio de inovação de substituir insumos sintéticos por ativos biológicos para contornar limitações produtivas das principais commodities agropecuárias.



4. CONCLUSÃO

Os fatores de crescimento C/N 10:1 e 50:1; relação N/C 50:1 e 100:1, pH 4 e 7; sulfato de magnésio 0,25 g e 1 g; e sulfato de potássio 0,25 g e 1 g promoveram maiores produção de biomassa de *Cercospora* aff. *canescens* em fermentação líquida e subsidiarão ensaios de otimização de produção de inóculo de *Cercospora* aff. *canescens*.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica, à Embrapa pelo apoio financeiro (10.19.02.002.00.00) e à Embrapa Meio Ambiente pela infraestrutura e apoio logístico. Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (Proc. 303396/2018-0).

6. REFERÊNCIAS

ÁVILA, Z.R.; PITELLI, R.A. Crescimento, esporulação e virulência do inóculo de *Cercospora piaropi*, agente de biocontrole do aguapé. **Fitopatologia Brasileira** 29:189-192. 2004.

BHULLAR, M. S.; WALIA, U.S.; SINGH, S.; SINGH, M.; JHALA, A.J. Control of morning glories (*Ipomoea* spp.) in sugarcane (*Saccharum* spp.) **Weed Technology**, v. 26, p. 77-82, 2012.

BO BO, A.; KHAITOV, B.; UMURZOKOV, M.; MIN CHO, K.; PARK, K.W.; SUP CHO, J. Biological Control Using Plant Pathogens in Weed Management. **Weed & Turfgrass Science**, v. 9, p.11-19, 2020.f

DHINGRA, O.B.; SINCLAIR, J.B.(1995) **Basic Plant Pathology Methods**. 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton. 434p.

GÓMEZ, D.E.; REIS, E.M. Influence of substrates, light, filter paper and pH on the sporulation of *Cercospora sojina*. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.2, p.126-129, 2013.

GROENEWALD, J.Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J. ; SHIN, H.-D.; PARK, J.-H.; JAMA, A.N.; GROENEWALD, M.; BRAUN, U.; CROUS, P.W. **Species concepts in Cercospora**: spotting the weeds among the roses, *Studies in Micology*, v.75, p. 115-170, 2013.

MONQUERO, P. A.; SILVA, P. V.; HIRATA, A. C. S.; MARTINS, F.R.A. Monitoramento do banco de sementes de plantas daninhas em áreas com cana-de-açúcar colhida mecanicamente. **Planta Daninha**, v. 29, n.1, p. 107-119, 2011.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Development of *Cercospora* leaf spot on *Ipomoea* weed species for biological control. **Biocontrol**, v. 64, n. 2, p. 185-195, 2019.



NECHET, K. L.; VITORINO, M. D.; VIEIRA, B. S.; HALFELD-VIEIRA, B. A. **Weeds**. In: SOUZA, B.; VÁZQUEZ, L.; MARUCCI, R. (ed). Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems: biological control and functional biodiversity. Cham: Springer, 2019. cap. 35. p. 437-449.

PIZZO, I.V.; AZANIA, C.A.M.; AZANIA, A.A.P.M.; SCHIAVETTO, A.R. Seletividade e eficácia de controle de plantas daninhas pela associação entre óleo fúsel e herbicidas em cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 347-357, 2010.

SANTOS, T.H.F.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; ASSIS, M.C.; NECHET, K.L. Patogenicidade da micobiota de *Ipomoea spp.* para prospecção de mico-herbicida. In: Anais do Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 2016, Campinas. **Anais...**Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2016.p.16411.

SILVA, P.V.; MONQUERO, P.A. Influência da palha no controle químico de plantas daninhas no sistema de cana crua. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.12, n.1, p.94-103, 2013.

WALKER, L. Production of spores for field studies. **Advances in Agricultural Technology**, v. 12, p. 1-15, 1980.