



## EFEITO DA POSIÇÃO DO FRASCO DE CULTIVO EM RELAÇÃO À FONTE LUMINOSA NA PRODUÇÃO DE INÓCULO DE *Cercospora aff. canescens*

Daniel Eiji Hinoue de **Souza**<sup>1</sup>; Gabriela Maria de Lima **Dias**<sup>2</sup>; Alfredo José Barreto **Luiz**<sup>3</sup>; Bernardo de Almeida **Halfeld-Vieira**<sup>4</sup>; Kátia de Lima **Nechet**<sup>5</sup>

Nº 22403

**RESUMO** – O presente trabalho teve como objetivos investigar o efeito da posição de frascos de cultivo em relação à fonte luminosa e quantificar a variabilidade natural na produção de biomassa e esporos de *Cercospora aff. canescens* (CMAA 1444) nestas condições. O isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e, após sete dias, cinco discos de micélio foram transferidos para Erlenmeyers contendo 50 mL do meio de cultura líquido Czapek-Dox modificado. Os Erlenmeyers foram numerados e fixados em arranjo 6x6 de um agitador orbital do tipo Shaker, a 140 rpm, luz contínua e 25 °C. O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e cada Erlenmeyer considerado como uma unidade experimental. Após 15 dias, a biomassa foi separada da fração líquida por filtração e seca a 70 °C até a obtenção de peso constante. A fração líquida foi centrifugada para obtenção de 5 mL de suspensão concentrada e quantificação da concentração de inóculo (esporos/mL). Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de normalidade. Cada linha e coluna do equipamento foram consideradas como tratamentos na análise de variância. Não houve efeito significativo da posição do frasco em relação à fonte luminosa para ambos os parâmetros, que apresentaram curtose negativa, porém assimetrias distintas. O coeficiente de variação foi baixo (2,39%) para a massa micelial. Entretanto, o coeficiente de variação da concentração de inóculo foi alto (31,82%), indicando variabilidade natural na produção de esporos de *Cercospora aff. canescens* na condição experimental.

**Palavras-chaves:** *Ipomoea spp.*, corda-de-viola, mico-herbicida, variabilidade natural

<sup>1</sup> Autor, Bolsista Embrapa/CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, IB/ Unicamp, Campinas-SP; eijihinoue18@gmail.com

<sup>2</sup> Colaborador, Bolsista PIBIC: Graduação em Engenharia Química, ESAMC, Campinas-SP; lima.gabi360@gmail.com.

<sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, alfredo.luiz@embrapa.br

<sup>4</sup> Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; bernado-halfeld@embrapa.br

<sup>5</sup> Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; katia.nechet@embrapa.br



**ABSTRACT** – *The present work aims to investigate the effect of the position of culture flasks in relation to the light source and quantify the natural variability on the biomass and spores production of Cercospora aff. canescens (CMAA 1444) under these conditions. The isolate was grown on Petri dishes with potato dextrose agar and, after seven days, five mycelial disks were transferred to Erlenmeyer flasks with 50 mL of liquid media Czapek-Dox modified. The flasks were positioned in an arrangement of 6x6 in an orbital shaker (140 rpm) at 25 °C, under continuous light. The position of each flask was the same throughout the assay. The assay was carried out in a completely randomized design, each flask was considered an experimental unit. After 15 days, the biomass was separated from liquid fraction, filtered, and dried at 70 °C until constant weight. The liquid fraction was centrifuged to obtain 5 mL of concentrated suspension to quantify the inoculum concentration (spores/mL). Data was submitted to analysis of variance and normality test. Each line and column of the shaker were considered as treatments in the analysis of variance. There was no effect of the position of culture flasks in relation to the light source for both parameters, which had negative kurtosis, but different skewness. The biomass had a low coefficient of variation (2,39%). However, the inoculum concentration had a high coefficient of variation (31,82%) which indicates a natural variability in the spores production of Cercospora aff. canescens in the experimental conditions.*

**Keywords:** *Ipomoea* spp., morning glory, mycoherbicide, natural variability.

## 1. INTRODUÇÃO

A corda-de-viola é o nome popular atribuído à *Ipomoea* spp. (Convolvulaceae), com destaque para *I. hederifolia*, *I. grandifolia*, *I. nil* e *I. quamoclit* (LORENZI, 2000). Essas espécies são importantes invasoras em decorrência de seu hábito trepadeiro agressivo, do alto número de sementes dispersas por cada indivíduo (AZANIA *et al.*, 2009) e também pela sua prevalência sob a camada de palha que se forma em áreas de cana-de-açúcar manejadas sem queima (MONQUERO *et al.*, 2011). Além



disso, a presença da palha diminui a eficácia tanto de herbicidas pré-emergentes quanto pós-emergentes (PIZZO *et al.*, 2010; SILVA; MONQUERO, 2013).

Neste contexto, um estudo conduzido na Embrapa Meio Ambiente visa desenvolver um insumo biológico a base do fungo *Cercospora aff. canescens* CMAA 1444 (GenBank MG652650) selecionado previamente 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, um dos principais problemas é a produção de esporos 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, uma vez que os esporos são a fonte de inóculo utilizadas para causar danos em cordas-de-viola (NECHET; HALFELD-VIERA, 2019).

Até o presente momento, a técnica difásica é necessária para a esporulação de *Cercospora aff. canescens*, e essa estratégia envolve duas técnicas de fermentação, a líquida para produção de biomassa seguida da fermentação sólida da biomassa para a obtenção de esporos (DIAS *et al.*, 2021). Entretanto, estudos mais recentes conduzidos pela equipe demonstram que há produção de esporos utilizando apenas fermentação líquida com agitação e, em função da combinação de parâmetros de crescimento e das condições de cultivo, esta produção pode ser otimizada (Dados não publicados).

Dentre as condições de cultivo, a luz é um fator importante na produção de esporos de *Cercospora aff. canescens*. Entretanto, os ensaios de otimização são realizados em incubadoras do tipo shaker com espaço para 36 Erlenmeyers dispostos em arranjo 6X6 (45x45 cm) e com a posição das lâmpadas na porta da incubadora, o que pode levar a questionamentos sobre a uniformidade da luz recebida por cada unidade experimental.

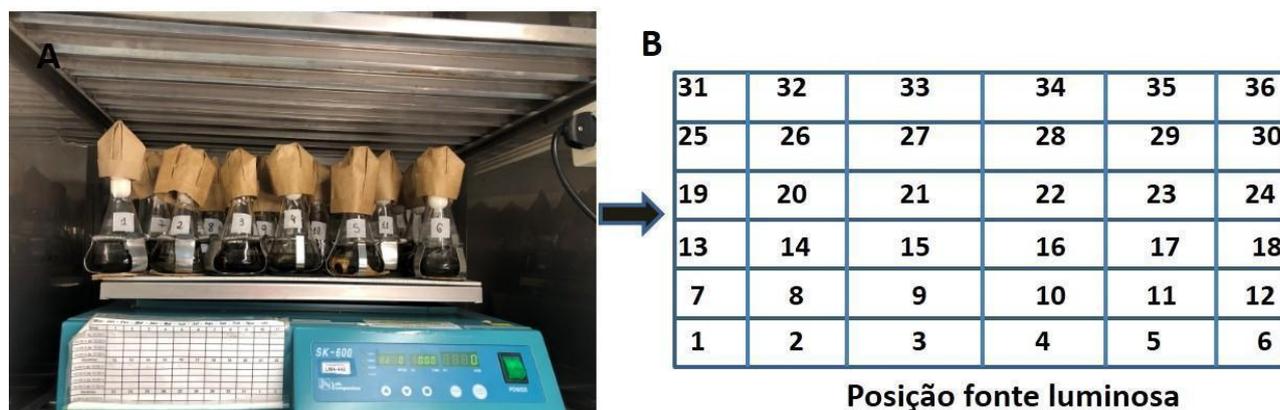
Para que se possa identificar efeitos de tratamentos, como a composição do meio de cultura e o tempo de iluminação, é preciso que a variabilidade natural da produção de inóculo (esporos e biomassa) entre frascos seja mínima, conhecida, e não sofra influências de fatores não controlados (como a posição dentro da incubadora, por exemplo). Assim, os objetivos deste trabalho foram: 1) verificar se há efeito da posição do frasco de cultivo em relação à fonte luminosa na produção de biomassa e de esporos de *Cercospora aff. canescens*; e 2) quantificar a variabilidade natural atual na produção destes parâmetros

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi realizado 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 de Batata Dextrose Ágar, mantidos por sete dias em incubadora a 25°C em fotoperíodo de 12 h. Após este período, cinco discos do meio de cultura contendo crescimento fúngico foram utilizados para inocular os frascos Erlenmeyer de fermentação.

Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido sintético Czapek-Dox modificado (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) tiveram seu pH ajustado, em pHmetro, para 4 com a adição de solução de HCL 1N, sendo esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

Os 36 Erlenmeyers foram então inoculados com os discos previamente preparados, e transferidos para o agitador orbital do tipo Shaker, dispostos em 6 linhas e 6 colunas (Figura 1), a 140 rpm e luz contínua (3 lâmpadas Branco Neutro/ 10 w cada) a 25 °C. Cada Erlenmeyer foi numerado e sua posição fixada no equipamento. O ensaio foi em delineamento inteiramente casualizado, sendo cada Erlenmeyer considerado como uma unidade experimental.



**Figura 1.** Disposição dos frascos de crescimento em relação à fonte luminosa na incubadora do tipo Shaker.

Após 15 dias de crescimento, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos tipo Falcon de 50 mL enumerados, e centrifugados a 3000 rpm a 25 °C por 5 minutos para a separação da biomassa decantada da fração líquida sobrenadante (Figura 2).



**Figura 2.** Separação da biomassa e fração líquida após centrifugação.

A biomassa fúngica foi filtrada utilizando uma peneira de 20 Mesh depositada em papel de filtro Whatman N° 1 e seca em estufa a 70 °C até a obtenção de peso constante. Após a secagem, a massa micelial foi obtida por pesagem em balança analítica.

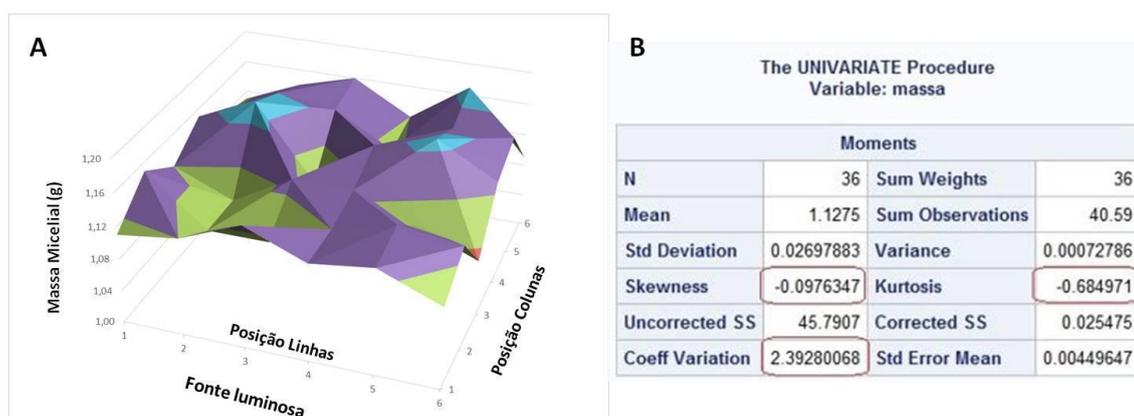
A parte líquida obtida após centrifugação foi transferida para novos tubos do tipo Falcon de 50 mL enumerados que foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos a 25° C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado até a obtenção de uma amostra de 5 mL de suspensão líquida, medida com o auxílio da marcação de volume dos tubos do tipo Falcon. A partir desta amostra, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, retirou-se 1 mL de suspensão que foi depositada na Câmara de Neubauer

e observada em microscópio óptico (objetiva 20x). Os esporos de *Cercospora* aff. *canescens* foram contados nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer e a média obtida multiplicada por  $10^4$  para a obtenção do número de esporos/mL.

Os dados de massa micelial e de esporos/mL foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE INC, 2013). Com o objetivo de verificar o efeito da posição do frasco nos parâmetros avaliados, cada linha e cada coluna foram consideradas como tratamentos na análise de variância. Os dados coletados foram também submetidos ao teste de normalidade usando os testes estatísticos Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises e Anderson-Darling.

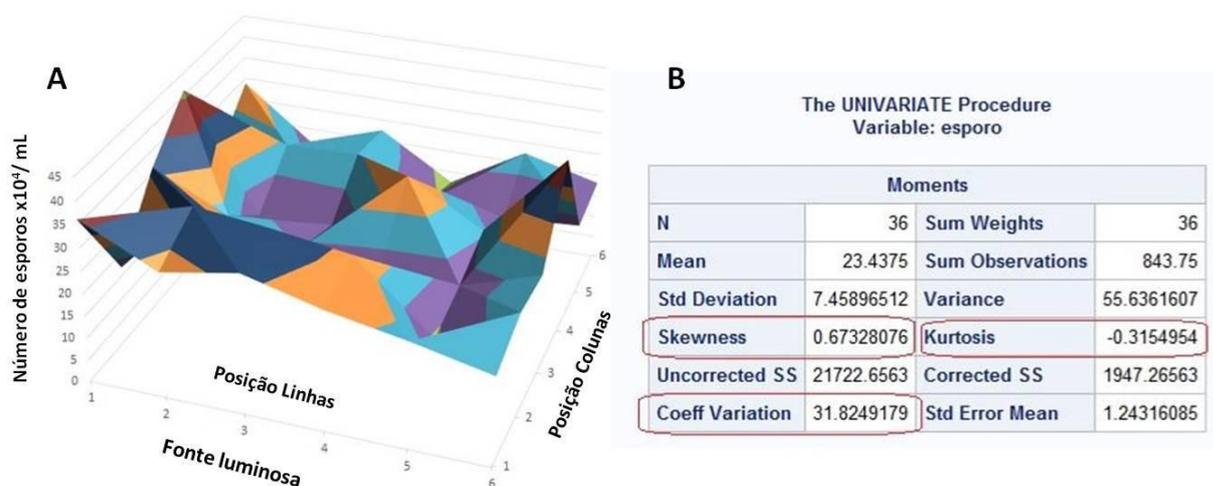
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de massa micelial obtido nos frascos são apresentados na Figura 3A, de forma gráfica. Os valores variaram de 1,07 a 1,17 g e a análise de variância indicou Curtose (Kurtosis) negativa (-0,68), assimetria (Skewness) próxima a zero (-0,09) e um coeficiente de variação (CV=coeff variation) de 2,39% (Figura 3B).



**Figura 3.** Representação gráfica dos valores obtidos de massa micelial(g) em função da posição do frasco (linhas e colunas) em relação à fonte luminosa (A), Análise de variância dos dados (B).

Os valores de esporos/mL obtidos para cada posição de frasco são apresentados na Figura 4A. Os valores variaram de  $12 \times 10^4$  esporos/mL a  $39 \times 10^4$  esporos/mL e a análise de variância indicou Curtose negativa (-0,31), assimetria positiva (0,67) e um coeficiente de variação de 31,82% (Figura 4B).



**Figura 4.** Representação gráfica dos valores obtidos de número de esporos  $\times 10^4$  /mL em função da posição do frasco em relação à fonte luminosa (A), Análise de variância dos dados (B).

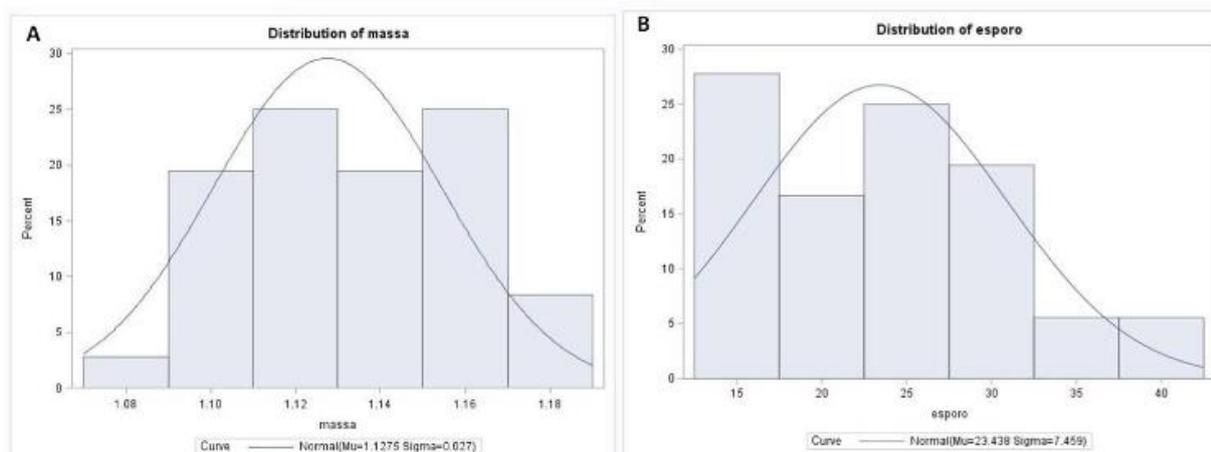
A distribuição da normalidade dos dados analisados é apresentada na Figura 5. Os dados de massa micelial e de número de esporos/mL apresentaram curtose negativa, com valores não muito elevados, mas indicativos de que a maior parte das observações ocorre com valores próximos da média, com baixa probabilidade de ocorrência de valores muito distantes da mesma. No caso da massa micelial, a distribuição foi considerada normal pelos testes realizados, com praticamente nenhuma assimetria e baixa variância, representada pelo baixo valor do CV (Figura 5A). No caso do número de esporos/mL, já não é possível comprovar a normalidade dos dados e o valor mais elevado e positivo do coeficiente de assimetria indica uma maior probabilidade de encontrar valores abaixo

da média, mas que acima da média a probabilidade de encontrar valores muito distantes da mesma é maior que o que aconteceria numa distribuição normal (Figura 5B).

**Figura 5.** Distribuição de normalidade dos dados de massa micelial (A) e de número de esporos/mL de *Cercospora aff. canescens* (B).

O resultado da análise de variância (Tabela 1) em que se adotaram as linhas e colunas, dispostas em função da posição em relação à fonte luminosa, como causas de variação no modelo, mostrou que não houve efeito significativo da posição do frasco em relação à fonte luminosa para ambos os parâmetros: massa micelial e número de esporos/mL.

**Tabela 1.** Análise de variância com soma de quadrados (SQ), quadrado médio (QM), valor do teste (F)



e a probabilidade de valores maiores que F (Prob>F) sob a hipótese nula.

| Causas de variação | N  | Massa Micelial |        |      |          | Número de Esporos |       |      |          |
|--------------------|----|----------------|--------|------|----------|-------------------|-------|------|----------|
|                    |    | SQ             | QM     | F    | Prob>F   | SQ                | QM    | F    | Prob>F   |
| <b>Modelo</b>      | 10 | 0,0091         | 0,0009 | 1,39 | 0,2398ns | 713,9             | 71,39 | 1,45 | 0,2175ns |
| <b>Linha</b>       | 05 | 0,0060         | 0,0012 | 1,84 | 0,1411ns | 397,5             | 79,51 | 1,61 | 0,1936ns |
| <b>Coluna</b>      | 05 | 0,0031         | 0,0006 | 0,94 | 0,4695ns | 316,4             | 63,28 | 1,28 | 0,3026ns |
| <b>Erro</b>        | 25 | 0,0164         | 0,0006 |      |          | 1233,3            | 49,33 |      |          |
| <b>Total</b>       | 35 | 0,0255         |        |      |          | 1947,3            |       |      |          |

Neste trabalho verificamos que a posição do frasco em relação à fonte luminosa, conforme equipamentos e condições utilizadas, não têm efeito na produção de massa micelial e no número de



esporos/mL de *Cercospora aff. canescens*. Isto demonstra que a condição experimental da incubadora é uniforme em relação à intensidade luminosa, permitindo o uso de todas as 36 posições de frascos para a produção de biomassa e esporos de *Cercospora*, e que a variação, quando observada nos ensaios, será em função dos tratamentos delineados.

Importante destacar, entretanto, a ocorrência de coeficiente de variação alto para o parâmetro número de esporos/mL (31,82%) nas condições de experimento de laboratório, em que se espera coeficientes de variação similares aos observados para o parâmetro massa micelial (2,39%). Portanto, observou-se uma variabilidade natural da produção de esporos de *Cercospora aff. canescens*, e a minimização desta variabilidade é essencial para interpretações dos efeitos de 'tratamentos' em ensaios de otimização.

Em função disto, é necessário ajuste na metodologia utilizada para a produção de esporos do isolado em fermentação líquida. No presente ensaio, a fonte de inóculo inicial transferida para os frascos de fermentação foi obtida de cinco colônias cultivadas em placas de Petri diferentes. A variabilidade do crescimento micelial, mesmo em condições similares de cultivo, é amplamente conhecida na literatura para diversos gêneros de fungos (GROENEWALD *et al.*, 2013; DAMM *et al.*, 2019). Portanto, uma das hipóteses é que este pode ter sido um fator que contribuiu para a alta variabilidade observada nos valores do número de esporos/mL..

Etapas posteriores do estudo serão baseadas na hipótese de que há redução da variabilidade natural do fungo quando se utiliza uma única fonte de crescimento fúngico para inoculação dos frascos de fermentação. A partir desta confirmação, será possível padronizar a metodologia e reduzir o efeito “variabilidade natural” de *Cercospora aff. canescens*.

#### 4. CONCLUSÃO

A posição do frasco em relação à fonte luminosa, nas condições deste trabalho, não tem efeito na produção de biomassa e de esporos de *Cercospora aff. canescens* nas condições de fermentação líquida em incubadora do tipo Shaker. A variabilidade natural observada nos resultados da fermentação líquida, nas condições experimentais utilizadas nesse estudo, indica a necessidade de ajustes na metodologia de preparação e padronização do inóculo previamente aos ensaios de produção.



## 5. AGRADECIMENTOS

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

## 6. REFERÊNCIAS

AZANIA, C. A. M. *et al.* Superação da dormência de sementes de corda-de-violão (*Ipomoea quamoclit* e *I. hederifolia*). **Planta daninha**, v. 27, n. 1, p. 23-27, 2009.

DAMM, U. *et al.* The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Micology**, v. 92, p. 1–46, 2019.

DHINGRA, O.B.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2. Ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434p.

DIAS, G. M. de L. *et al.* Definição de parâmetros para a produção de biomassa de *Cercopora aff. canescens* em fermentação líquida. *In*: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2021, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto de Zootecnia, 2021. Evento online. CIIC 2021. RE21406.10 p.

GROENEWALD, J. Z. *et al.* Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, v. 75, n. 1, p. 115-170, 2013.

LORENZI, H. J. Plantas daninhas do Brasil. 3. ed. São Paulo: Inst. Plantarum, 2000. p. 127-137.

MONQUERO, P.A. *et al.* 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, p.185-195, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10526-018-09918-w>.

NECHET, K. L. *et al.* **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.



16° Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2022

30 e 31 de agosto de 2022

ISBN: 978-65-88414-07-1

SANTOS, T.H.F.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; ASSIS, M.C.; NECHET, K.L. Patogenicidade da microbiota de *Ipomoea spp.* para prospecção de mico-herbicida. *In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 2016, Campinas. **Anais...**Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2016.p.16411.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT® 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2013.

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.