



EFEITO DA RELAÇÃO CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE INÓCULO DE *Cercospora aff. canescens* EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA

Ana Júlia Dias dos Reis **Barbosa**¹; Alfredo José Barreto **Luiz**²; Bernardo de Almeida **Halfeld-Vieira**³; Kátia de Lima **Nechet**⁴

Nº 23402

RESUMO - O trabalho teve como objetivo investigar o efeito da relação carbono e nitrogênio (C:N) na produção de inóculo de *Cercospora aff. canescens* (CMAA 1444) em fermentação líquida. O isolado foi cultivado em meio líquido Czapek-Dox em Erlenmeyer mantido em um agitador orbital do tipo Shaker a 150 rpm, luz contínua e 25°C. Após sete dias, a biomassa foi triturada e 5 mL de suspensão foi transferida para Erlenmeyers contendo 50 mL do meio líquido Czapek-Dox modificado com concentrações diferentes de dextrose. Os Erlenmeyers foram mantidos em um agitador orbital do tipo Shaker a 150 rpm, luz contínua e 25°C em delineamento inteiramente casualizado com 13 tratamentos (C:N variando de 100:1 a 0:1) e quatro repetições. Após sete e 15 dias de fermentação, a biomassa foi filtrada e a fração líquida centrifugada para obtenção de 5 mL de suspensão concentrada. A quantificação da concentração de inóculo (esporos/mL) foi feita em câmara de Neubauer. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, de variância e de médias. Os dados obtidos com sete dias de fermentação não foram considerados normais. Além disso, em função do alto coeficiente de variação e da baixa esporulação observada, estes dados foram excluídos das análises. Após 15 dias de fermentação líquida, houve diferença significativa na produção de esporos/mL entre os tratamentos, variando de $2,5 \times 10^4$ a $1,7 \times 10^5$ esporos/mL. As maiores produções de inóculo foram observadas para as relações de C:N de 95:1 ($1,7 \times 10^5$ esporos/mL) e 90:1 ($1,6 \times 10^5$ esporos/mL).

Palavras-chaves: Fermentação líquida, *Ipomoea* spp., corda-de-violão, mico-herbicida, controle biológico

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

² Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, alfredo.luiz@embrapa.br

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

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



ABSTRACT – *The objective of this study was to investigate the effect of carbon and nitrogen ratio (C:N) on the production of Cercospora aff. canescens (CMAA 1444) inoculum in liquid fermentation. The isolate was grown in Czapek-Dox liquid medium in Erlenmeyer flasks kept in an orbital shaker at 150 rpm, at 25°C in continuous light. After seven days, the biomass was crushed and 5 mL of suspension was transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 mL of modified Czapek-Dox liquid medium with different concentrations of dextrose. Flasks were kept in an orbital shaker at 150 rpm, at 25°C in continuous light. The experiment was conducted in a completely randomized design with 13 treatments (C:N ranging from 100:1 to 0:1) and four replications. After seven and 15 days of fermentation, the biomass was filtered and the liquid fraction centrifuged to obtain 5 mL of concentrated suspension. The inoculum concentration was quantified in a Neubauer chamber (spores/mL). The data was subjected to normality, variance and mean tests. The data obtained from the seven days of fermentation period was not considered normal. Furthermore, due to the high coefficient of variation observed these data were excluded from the analyses. There was a significant difference in inoculum production among treatments after 15 days of liquid fermentation, ranging from 2.5×10^4 to 1.7×10^5 spores/mL. The highest inoculum productions were observed for C:N ratios of 95:1 (1.7×10^5 spores/mL) and 90:1 (1.6×10^5 spores/mL).*

Keywords: Liquid fermentation, *Ipomoea* spp., morning glory, mycoherbicide, biological control.



1. INTRODUÇÃO

As plantas do gênero *Ipomoea*, popularmente conhecidas como corda-de-viola, são plantas trepadeiras, invasoras de cultivos de importância socioeconômica no Brasil, como café (*Coffea arabica* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* L.) (CORREIA, 2016; FARIA et al., 2014; GIANCOTTI et al., 2014; PICCININI et al., 2018). No gênero se destacam as espécies *I. nil*, *I. heredifolia*, *I. grandifolia* e *I. quamoclit* que competem pelos recursos disponíveis, por espaço e luz, diminuindo a qualidade do produto colhido. Os fatores que influenciam essa competição são condições de solo e clima, as características da cultura e da planta invasora, que é mais agressiva nos primeiros estádios de crescimento (AULD, 1997).

Em plantações de cana-de-açúcar crua, sem queima, a palha gerada pode suprimir a ocorrência de algumas plantas daninhas devido às alterações químicas e físicas no solo (GRAVENA et al., 2004). Entretanto, observa-se que, pela menor competição de outras invasoras, a corda-de-viola pode se desenvolver melhor por ser capaz de transpor a camada de palha (GRAVENA et al., 2004). As cordas-de-viola diminuem a produtividade da cultura em 46% e o número de colmos em 34% (SILVA et al., 2009). Além disso, a colheita mecanizada é dificultada devido ao entrelaçamento da corda-de-viola ao colmo da cana-de-açúcar (AZANIA et al., 2002).

O fungo *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 (GenBank MG652650) foi selecionado previamente como candidato a mico-herbicida por ser capaz de causar mancha foliar seguida de desfolha em *Ipomoea* spp. (SANTOS et al., 2016; NECHET et al., 2019). O controle biológico pelo método inundativo ou de mico-herbicida envolve o uso de fungos fitopatogênicos endêmicos que possam ser produzidos em massa, formulados e aplicados de modo semelhante a um herbicida químico onde a população da planta invasora está estabelecida (AULD, 1997). Esta estratégia é baseada na multiplicação massal e aplicações periódicas de propágulos do patógeno (TEBEEST et al., 1992). A otimização da produção de inóculo é essencial para a condução de ensaios experimentais em condições de campo e posterior desenvolvimento de um insumo biológico.

O gênero *Cercospora* é de difícil esporulação *in vitro*, tanto em fermentação sólida como em fermentação líquida. A obtenção de inóculo para ensaios de casa de vegetação é feita utilizando a técnica difásica que envolve as duas técnicas de fermentação (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2019).



Alguns parâmetros na composição de meio de cultura Czapek-Dox, entre eles a relação carbono e nitrogênio (C:N), influenciam a produção de biomassa de *Cercospora* aff. *canescens* em fermentação líquida (DIAS et al., 2021). Entretanto, ainda não há estudos do efeito destes parâmetros na esporulação de *Cercospora* aff. *canescens* em fermentação líquida.

Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da relação carbono e nitrogênio (C:N) na produção de inóculo 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 recuperado de armazenamento em Castellani e repicado para placas de Petri contendo meio de cultura de Batata Dextrose Ágar (BDA), mantidas por sete dias em incubadora a 25°C, em fotoperíodo de 12 h para obtenção da colônia.

Após este período, cinco disquinhos de BDA (5 mm) contendo crescimento fúngico foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de meio líquido sintético Czapek-Dox modificado, pH 4, baseado na melhor produção de biomassa obtida em ensaios anteriores (DIAS et al., 2021) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição do meio de cultura Czapek-Dox modificado utilizado para obtenção de biomassa de *Cercospora* aff. *canescens*

Ingredientes	Quantidade (g/L)
Nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$)	1
Sulfato de magnésio anidro (MgSO_4)	2,5
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	0,25
Cloreto de potássio (KCl)	0,25
Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,0364
Dextrose monohidratada ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$)	4,5



O Erlenmeyer foi mantido em agitação no agitador orbital do tipo Shaker (150 rpm) por sete dias a 25°C sob luz contínua. Após este período, o Erlenmeyer foi transferido para o ultrassom e após cinco minutos, a biomassa foi filtrada utilizando uma peneira de 20 mesh e triturada com auxílio de um homogeneizador de tecido tipo Potter. Cada 5 mL da suspensão obtida foi transferida para Erlenmeyers de 250mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido Czapek-Dox modificado conforme informado anteriormente na Tabela 1, porém com diferentes concentrações de dextrose para obtenção de variações da relação C:N (Tabela 2).

Tabela 2. Variações de dextrose utilizadas na composição do meio de cultura Czapek-Dox modificado utilizado para obtenção de diferentes relações C:N.

Tratamentos	Relação C:N	Quantidade (g/50 mL)	
		Dextrose	Nitrogênio
C1	100:1	2,25	0,05
C2	99:1	2,225	0,05
C3	95:1	2,1375	0,05
C4	90:1	2,025	0,05
C5	80:1	1,8	0,05
C6	65:1	1,4625	0,05
C7	50:1	1,125	0,05
C8	35:1	0,7875	0,05
C9	20:1	0,45	0,05
C10	10:1	0,225	0,05
C11	5:1	0,1125	0,05
C12	1:1	0,0225	0,05
C13	0:1	0	0,05

Os Erlenmeyers foram mantidos em agitação no agitador orbital do tipo Shaker (150 rpm) a 25°C sob luz contínua. A avaliação de produção de inóculo foi feita em duas coletas, após sete e 15 dias de cultivo. Em cada coleta, os frascos passaram por cinco minutos de ultrassom e a biomassa foi separada da fração líquida com uso de uma peneira de 20 mesh e descartada. A fração líquida foi transferida para tubos tipo Falcon de 50 mL e centrifugados a 7000 rpm, a 25 °C, por 15 minutos. Após isso, 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.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 13 tratamentos (variação de C:N) e 4 repetições, sendo cada repetição uma leitura da amostra em câmara de Neubauer.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SAS (SAS, 2013). Os dados coletados foram, antes da ANOVA, submetidos ao teste de normalidade usando o teste estatístico Shapiro-Wilk e, em caso de não normalidade, submetidos à transformação Box-Cox. Os valores de esporos/mL obtidos foram comparados estatisticamente pelo teste Duncan ao nível de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de esporos de *Cercospora aff. canescens* foi observada aos sete e 15 dias de cultivo em fermentação líquida (Figura 1 e 2).

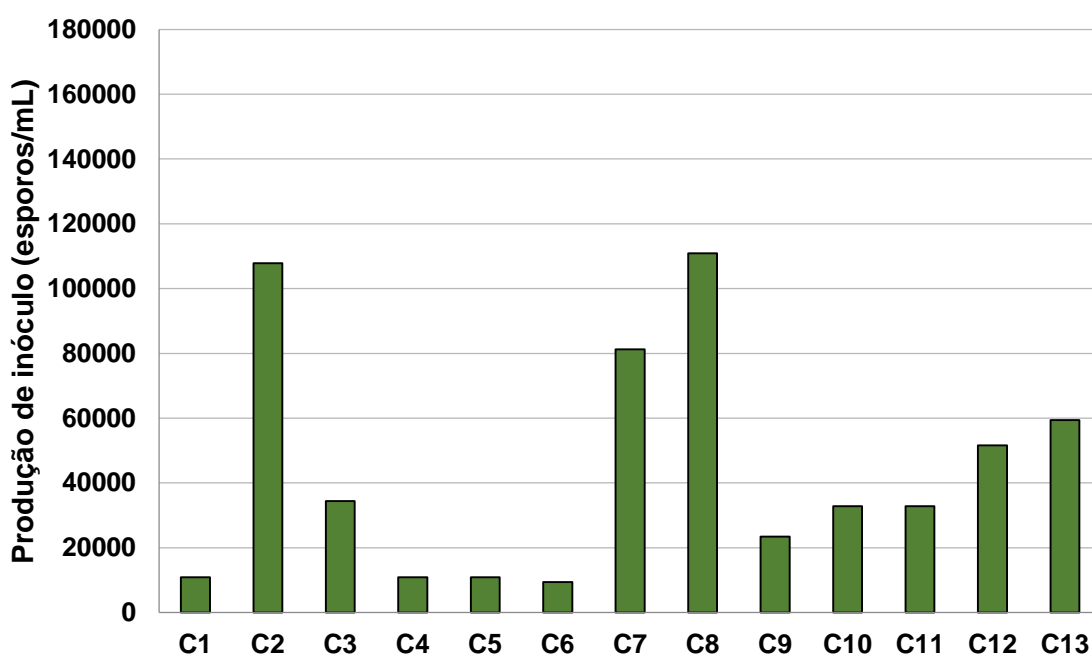


Figura 1. Produção de inóculo de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 (esporos/mL) aos sete dias de cultivo em meio Czapek-Dox modificado com diferentes relações C:N em fermentação líquida.

A produção de inóculo variou de 9×10^3 a 1×10^5 esporos/mL aos sete dias de cultivo (Figura 1). Entretanto, a análise da normalidade indicou dados não normalizados mesmo após a aplicação da transformação Box-Cox dos dados (Prob < W = 0,0080). Portanto, os valores obtidos aos sete dias de cultivo não foram considerados no teste de separação de médias.

Os dados de esporos/mL obtidos aos 15 dias de cultivo em fermentação líquida também não atenderam ao critério de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (Prob < W < 0,0001), sendo o coeficiente de variação de 63,43%. Após a transformação Box-Cox, os dados atenderam aos critérios para uma distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk (Prob < W = 0,1284). Além disso, o coeficiente de variação foi reduzido para 5,55%.

Os testes foram realizados para os valores transformados, entretanto, para facilitar a discussão, as médias são apresentadas nos valores originais. A produção aos 15 dias de cultivo em fermentação líquida variou de $2,5 \times 10^4$ a $1,7 \times 10^5$ esporos/mL (Figura 2).

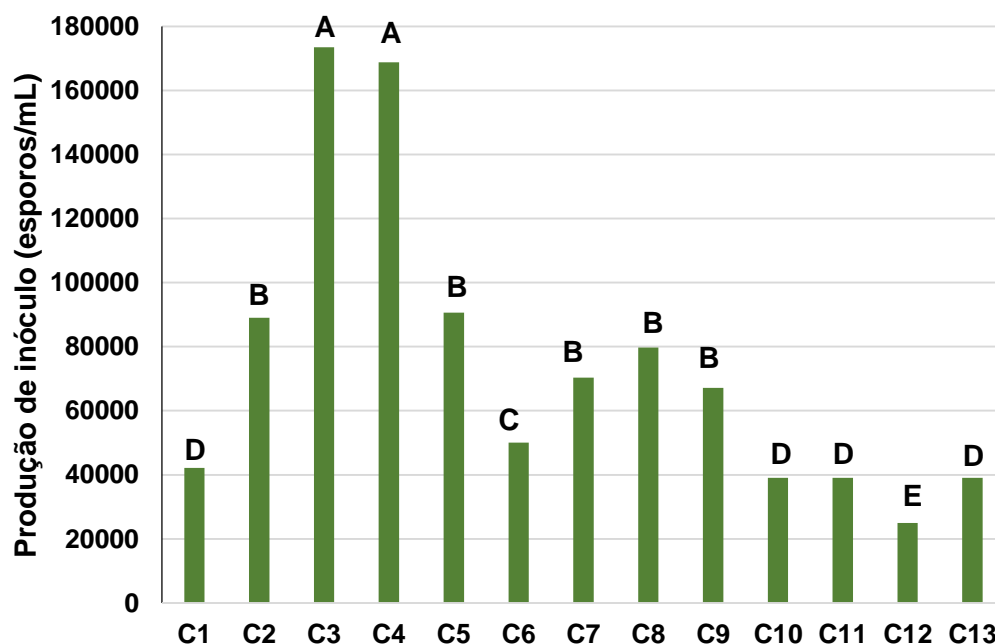


Figura 2. Produção média de esporos/mL de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 em meio Czapek-Dox modificado com diferentes relações C:N após 15 dias em fermentação líquida. Médias seguidas pela mesma letra entre parênteses não diferem pelo teste Duncan ao nível de 5%.

O modelo se mostrou altamente significativo ($F = 25,44$; $\text{Prob} > F < 0,0001$), então, aplicou-se o teste de comparação de médias entre os tratamentos, sendo utilizado o teste indicado para comparações múltiplas de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Observou-se diferença significativa entre os tratamentos, sendo que as maiores produções de inóculo foram observadas para os tratamentos com relação 95:1 (C3) ($1,7 \times 10^5$ esporos/mL) e 90:1 (C4) ($1,6 \times 10^5$ esporos/mL) (Tabela 3).



Tabela 3. Comparação da média de produção de inóculo de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 por tratamento utilizando diferentes relações C:N na composição do meio de cultura Czapek-Dox modificado.

TRATAMENTO	RELAÇÃO C:N	MÉDIA ($\times 10^4$ esporos/mL)*
C3	95:1	17,34 (A)
C4	90:1	16,87 (A)
C5	80:1	9,06 (B)
C2	99:1	8,91 (B)
C8	35:1	7,97 (B)
C7	50:1	7,03 (B) (C)
C9	20:1	6,72 (B) (C)
C6	65:1	5,00 (C) (D)
C1	100:1	4,22 (D)
C10	10:1	3,91 (D)
C13	0:1	3,91 (D)
C11	5:1	3,91 (D)
C12	1:1	2,50 (E)

* Médias seguidas pela mesma letra entre parênteses não diferem pelo teste Duncan ao nível de 5%.



Como os tratamentos contêm diferentes quantidades de carbono, também foi testado o ajuste de um modelo de regressão linear, mas só foi possível aplicar análise aos dados transformados da coleta realizada aos 15 dias. Os dados apresentaram ajuste altamente significativo ($F = 37,37$; $\text{Prob} > F < 0,0001$), com coeficiente de determinação da regressão mediano ($R^2 = 0,4278$).

Analisando os resultados dos testes de médias e do ajuste de regressão, é possível recomendar o uso do tratamento C3 (95:1) ou até C4 (90:1), pois proporcionaram maior número de esporos produzidos e demandam menor adição de fonte de carbono em relação aos tratamentos C1 100:1 e C2 99:1. Esta redução implicaria em menor custo de produção de inóculo em caso de desenvolvimento de um produto comercial.

Neste trabalho verificamos que é possível manipular a nutrição de *Cercospora* aff. *canescens* para otimizar a sua produção de esporos em fermentação líquida. Estudos similares indicam que a relação C:N é um fator nutricional importante na produção de esporos de vários agentes de controle biológico, como *Pochonia chlamydosporia* e *Beauveria bassiana* (GAO; LIU, 2010), e *Trichoderma asperelloides* (REZENDE et al., 2020). A maximização da esporulação aliado a um meio de cultura de baixo custo é um dos objetivos na produção massal de um agente de controle biológico. Entretanto, há necessidade de verificar a qualidade dos esporos produzidos nestas condições, uma vez que estudos demonstram que nem sempre há relação direta de quantidade e qualidade dos esporos produzidos nestas condições (GAO et al., 2007).

Além disso, houve variação alta na produção de esporos considerando que tratamentos com relações C:N similares apresentaram produção de inóculo bem diferentes, como por exemplo C1 (100:1) e C2 (99:1). A variabilidade na produção de biomassa de *Cercospora* aff. *canescens* foi observada em estudos prévios conduzidos por Souza et al. (2022) o que levou a mudanças na metodologia para reduzir esta variabilidade (Dados não publicados). Portanto, estudos futuros serão conduzidos para reduzir a variabilidade dos dados bem como para confirmar os resultados obtidos em relação ao efeito da relação C:N na produção de esporos de *Cercospora* aff. *canescens*.



4. CONCLUSÃO

Há efeito da relação C:N na produção de inóculo de *Cercospora* aff. *canescens*. Com o uso de meio de cultura Czapek-Dox modificado, usando as relações C:N de 95:1 e 90:1, obteve-se maior produção de esporos aos 15 dias de crescimento em fermentação líquida.

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. Kátia de Lima Nechet agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (Proc. 305187/2022-8). Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira agradece ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa (Proc. 309014/2021-2).

6. REFERÊNCIAS

- AULD, B.A. Herbicides. In: JULIEN, M.; WHITE, G. (ed.). **Biological control of weeds: theory and practical application**. Canberra: ACIAR Monograph, n. 49. p.129-134.
- AZANIA, A. A. P. M. et al. A. Interferência da palha de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) na emergência de espécies de plantas daninhas da família convolvulaceae. **Planta Daninha**, v. 20, p. 207-212, 2002.
- CORREIA, N. M. Chemical control of morning glory species in sugarcane harvested in the dry and semi-wet seasons. **Planta Daninha**, v. 34, p. 333-343, 2016.
- DIAS, G. M. de L. et al. Definição de parâmetros para a produção de biomassa de *Cercospora* 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.
- FARIA, R. M.; BARROS, R. E.; TUFFI SANTOS, L. D. Weed interference on growth and yield of transgenic maize. **Planta Daninha**, v. 32, p. 515-520, 2014.
- GAO, L., LIU, X. Sporulation of several biocontrol fungi as affected by carbon and nitrogen sources in a two-stage cultivation system. **Journal of Microbiology**, v. 48, p. 767–770, 2010.
- GAO, L. et al. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biological control fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 87–92, 2007.
- GIANCOTTI P. R. F. et al. Chemical control of morning glory as a function of water restriction levels. **Planta Daninha**, v. 32, p. 345–353, 2014.



GRAVENA, R. et al. Controle de plantas daninhas através da palha de cana-de-açúcar associada à mistura dos herbicidas trifloxysulfuron-sodium + ametrina. **Planta Daninha**, v. 22, p. 419-427, 2004.

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. 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.

SANTOS, T. H. F. dos et al. Patogenicidade da micobiota de *Ipomoea spp.* para prospecção de micoherbicida. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2016, Campinas. **Anais...** Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2016. RE Nº 16411. 9 p., 2016.

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

SILVA, I. A. B. et al. Interferência de uma comunidade de plantas daninhas com predominância de *Ipomoea hederifolia* na cana-soca. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 265-272, 2009.

PICCININI F. et al. Interference of morning glory in soybean yield. **Planta Daninha**, v. 36, e018150988, 2018.

REZENDE, L. C. de et al. Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, article 113, 2020.

SOUZA, D. E. H. de et al. Efeito da posição do frasco de cultivo em relação à fonte luminosa na produção de inóculo de *Cercospora aff. canescens*. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16., 2022, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agronômico, 2022. Evento online. CIIC 2022. Nº 22403. p. 1-11, 2022.

TEBEEST, D. O.; YANG, X. B.; CISAR, C. R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, p. 637-657, 1992.