



## FERMENTAÇÃO LÍQUIDA DE *Clonostachys rosea* E BIOEFICÁCIA CONTRA *Sclerotinia sclerotiorum*

Ana Vitória Reina da **Silva**<sup>1</sup>; Thiago Pereira da **Silva**<sup>2</sup>; Marcelo Augusto Boechat **Morandi**<sup>3</sup>; Wagner **Bettiol**<sup>4</sup>; Gabriel Moura **Mascarin**<sup>5</sup>

Nº 21403

**RESUMO** – O controle biológico aumentativo em que os antagonistas são aplicados em áreas agrícolas pode substituir os agrotóxicos. Entre os agentes de biocontrole, *Clonostachys rosea* possui capacidade de suprimir a esporulação de fungos fitopatogênicos, além de colonizar tecidos senescentes e mortos. A fermentação líquida submersa promete reduzir o tempo de cultivo e aumentar os ganhos econômicos e de produção. A fermentação sólida em grãos de arroz apresentou uma concentração máxima de  $1,09 \times 10^9$  conídios/g após sete dias de cultivo, enquanto na fermentação líquida chegou a  $2,28 \times 10^9$  conídios/mL após sete dias em C:N = 50:1, além de uma indução na produção de microescleródios de  $1,66 \times 10^4$ /mL após sete dias em meio C:N = 10:1, ambos suplementados com farelo de soja. Em biorreator de bancada, o maior pico de produção ocorreu no 4º dia resultando em  $1,1 \times 10^9$  conídios/mL e  $5,2 \times 10^8$  UFC/mL. No bioensaio de antagonismo, tanto os conídios submersos quanto os microescleródios de *C. rosea* foram capazes de inibir a viabilidade de escleródios do patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Em suma, ambos sistemas de fermentação (líquida e sólida) estudados proporcionam rendimentos promissores que sustentam a produção comercial de *C. rosea*, e a utilização de biorreatores promove uma melhor produção em menor tempo em comparação à fermentação sólida-estática.

**Palavras-chaves:** Controle biológico, Fermentação líquida submersa, Fermentação em estado sólido, *Clonostachys rosea*, *Sclerotinia sclerotiorum*.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduando em Ciências Biológicas, PUCC, Campinas-SP; anareina89@gmail.com.

2 Bolsista Embrapa: Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologia, UNESP, Araraquara-SP.

3 PhD, Pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

4 PhD, Pesquisador Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

5 Orientador: PhD, Analista de pesquisa da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; gabriel.mascarin@embrapa.br.



**ABSTRACT** – *Augmentative biological control in which antagonists are applied to agricultural crops can replace chemical pesticides. Among the biocontrol agents, Clonostachys rosea has the ability to suppress the sporulation of plant pathogenic fungi, in addition to rapidly colonizing senescent and dead plant tissues. Submerged liquid fermentation enables to reduce the cultivation time while economically increasing the yields. In this study, solid fermentation in rice grains showed a maximum concentration of  $1.09 \times 10^9$  conidia/g after 7 days of cultivation, while in liquid fermentation it reached  $2.28 \times 10^9$  conidia/mL after 7 days at C:N = 50:1, but also induced the production of microsclerotia up to  $1.66 \times 10^4$ /mL after 7 days in medium C:N = 10:1, both supplemented with soyflour. In order to improve production, fermentation batches carried out in a benchtop bioreactor promoted the production peak on the 4<sup>th</sup> day, corresponding to  $1.1 \times 10^9$  conidia/mL and  $5.2 \times 10^8$  CFU/mL. For the bioassay, both submerged conidia and microsclerotia of C. rosea were able to inhibit 100% viability of sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum. Therefore, both fermentation systems (liquid and solid) tested here provide high yields that support the commercial production of C. rosea and the use of bioreactors improves spore yields in shorter time than the solid-state fermentation.*

**Keywords:** Biological control, Submerged liquid fermentation, Solid state fermentation, *Clonostachys rosea*, *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 1. INTRODUÇÃO

Controle biológico pode ser conceituado como o uso de um organismo para reduzir a densidade populacional de outro organismo que causa perdas na produção agrícola, como as pragas, doenças e plantas invasoras. Um dos tipos de controle biológico é o aumentativo em que os antagonistas, os entomopatógenos, os parasitoides e os predadores são aplicados de forma massal em uma cultura vegetal. Esse tipo de controle é o mais conhecido entre os agricultores, pois tem como base a aplicação de um agente de biocontrole disponível no mercado. Assim, é fundamental para o desenvolvimento desta técnica realizar a multiplicação em larga escala dos microrganismos, que é a fase que representa um grande limitador para o crescimento do controle biológico. Dentre os antagonistas utilizados no controle biológico de doenças de plantas se destacam os fungos, sendo as hifas, blastosporos ou conídios aéreos ou submersos utilizados nas aplicações inoculativas e inundativas (FARIA; WRAIGHT, 2001; LEITE *et al.*, 2003; WRAIGHT *et al.*, 2001).

Os fungos filamentosos do gênero *Clonostachys*, pertencentes à família Bionectriaceae, ordem Hypocreales e filo Ascomycota, são encontrados em solos e restos vegetais. Em virtude da



sua capacidade de suprimir a esporulação de fungos fitopatogênicos, colonizar tecidos senescentes e mortos, promover crescimento de plantas e induzir resistência nas plantas, *Clonostachys rosea* é um importante antagonista (MORANDI *et al.*, 2000, 2001; MOUEKOUBA *et al.*, 2014; NOBRE *et al.*, 2005; SUTTON *et al.*, 1997). *Clonostachys rosea* se destaca como um potencial fungo para o desenvolvimento de bioprotetores devido a sua ação contra fungos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* e também contra nematoides e insetos parasitas de plantas, como a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) (BYRNE; BELLOWS, 1991; CARVALHO *et al.*, 2018).

A produção em massa de agentes fúngicos de controle biológico depende dos processos de fermentação sólida, líquida ou bifásica. Sendo o método em estado sólido, que utiliza grãos de cereais como principal substrato de crescimento, e a fermentação bifásica que propõe a cultura de propágulos por fermentação líquida que serão usados como inóculo para a produção de conídios aéreos em meios sólidos, os processos mais empregados pelas indústrias (MASCARIN *et al.*, 2010). Porém, a fermentação sólida-estática apresenta gargalos, tais como altos custos dos substratos à base de cereais, intensa demanda por mão de obra, maior chance de contaminação, deficiências de automação, longos períodos de fermentação e falta de controle das condições nutricionais e ambientais (SANTOS *et al.*, 2021).

A fermentação líquida submersa é a alternativa promissora, pois promete reduzir o tempo de cultivo e aumentar os ganhos econômicos e de produção. Além da possibilidade de controlar os nutrientes do meio, como vitaminas, sais, fontes de carbono e nitrogênio, também apresenta facilidade e flexibilidade em manipular o ambiente físico durante o processo fermentativo. Associado a essas facilidades, o cultivo submerso permite a obtenção de propágulos de interesse, tais como conídios submersos, blastosporos, micélios, clamidósporos e microescleródios (JACKSON *et al.*, 2010; MASCARIN *et al.*, 2015; ORTIZ-URQUIZA *et al.*, 2010).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos: i) verificar o impacto da origem do inóculo sobre a produção de conídios por *C. rosea* em arroz, ii) otimizar os parâmetros nutricionais para fermentação submersa de *Clonostachys rosea* e iii) testar a eficácia dos propágulos produzidos contra *S. sclerotiorum* em condições de laboratório.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1. Isolado e manutenção da cultura

*Clonostachys rosea* (LQC-62 ou CMAA-1284, GenBank MG489966, Sisgen A00AFAP) e *S. sclerotiorum*, provenientes da Coleção da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil, foram os organismos utilizados nos estudos. A preservação dos fungos foi por meio fragmentos, de 5 mm de diâmetro de colônias esporuladas, adicionados em tubos de criopreservação, com 1,5 mL de solução de glicerol a 20% (v/v), e armazenados a -40 °C. A partir dos criotubos, os microrganismos foram transferidos para placas de Petri (90 x 15 mm, Pleion®) contendo 20 mL de meio de Batata-Dextrose-Agar (BDA, Difco®) e incubados em câmara por 14 dias a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12:12h.

### 2.2 Fermentação sólida-estática em grãos de arroz

Para a fermentação de *C.rosea* em meio sólido, foram utilizados 300 g de arroz parboilizado (Raroz), umedecido com 600 mL de água destilada durante 1h. Em seguida, o excesso de água foi removido e 15 g de arroz úmido (umidade inicial igual a 39%) foram distribuídos em 12 frascos de Erlenmeyers (125 mL, tipo baffled, Exom®), vedados com tampões de algodão hidrófobo e papel alumínio para autoclavagem por 20 minutos a 121 °C. Após a autoclavagem, o papel alumínio foi removido para permitir troca gasosa durante o processo fermentativo. Esse ensaio contemplou dois tratamentos, cujo objetivo foi investigar a influência de dois tipos de inóculos sobre a produção de conídios em arroz. O tratamento 1 consistiu na suspensão de conídios submersos produzidos pela fermentação líquida (aqui denominado de pré-cultura líquida), e o tratamento 2 foi atribuído à suspensão de conídios aéreos provenientes de culturas com 14 dias de crescimento em meio BDA e preparada por meio da adição de 10 mL de uma solução de polissorbato a 0,04% (Tween 80) para coleta dos esporos. Os frascos contendo a massa de arroz úmido foram inoculados com 1,5 mL de cada suspensão de *C. rosea* ajustada para  $5 \times 10^6$  conídios/mL e, em seguida, agitados para homogeneizar o inóculo na massa de arroz. Os tratamentos foram mantidos em BOD a  $25 \pm 2$  °C com 12h de fotofase por sete dias. Transcorrido esse período, foram adicionados 50 mL de solução surfactante (0,05% de Break Thru (MSO), Evonik®) em cada frasco, levados a uma incubadora shaker (280 rpm e 28 °C) por 30 minutos e ao banho de ultrassom por cinco minutos, de forma a promover um desprendimento dos conídios do arroz. Após essas etapas, foi realizado uma diluição seriada e com auxílio de câmara de Neubauer realizada a contagem de conídios sob microscópio de luz (Leica MD250) com aumento de 400X. Os resultados foram expressos em conídios/g de arroz seco, após correção feita pela umidade inicial do arroz (média de 39% peso/peso). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) envolvendo dois tratamentos com seis

repetições cada, obtendo-se um  $n = 12$  para cada tratamento. O mesmo experimento foi repetido no tempo por duas vezes usando inóculos fúngicos novos.

### 2.3 Fermentação líquida submersa com seleção de fontes de nitrogênio

A composição nutricional do meio de cultura teve como fontes de proteína, o extrato de levedura (Acumedia, NEOGEN), o farelo de algodão (Pharmamedia®, AMD), o farelo de milho (Protenose®, Ingredion) e o farelo de soja (Baker's soyflour®, ADM) todos contendo inicialmente 36 g carbono/L, pH inicial 6.0 e relação C:N de 10:1 para formação de microescleródios e relação C:N de 50:1 para maior formação de conídios. Com densidade inicial de inóculo  $1 \times 10^7$  conídios/mL na cultura líquida (proveniente da pré-cultura) e 12h de fotofase. A dextrose mono-hidratada (Ingredion®) a 25% (p/v) foi usada em todos os ensaios como principal fonte de carbono (Tabela 1). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) incluindo 8 tratamentos com 6 repetições cada.

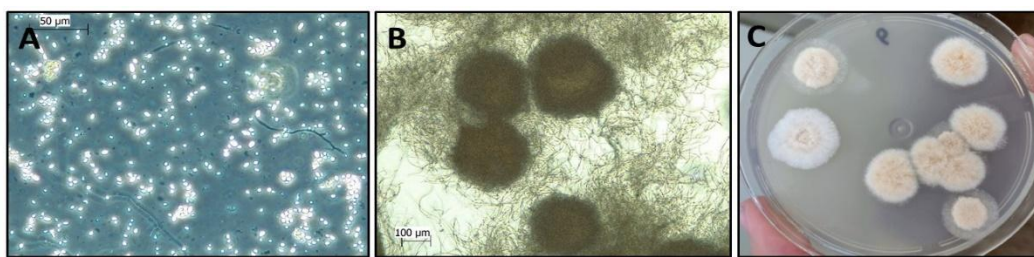
**Tabela 1.** Composição dos meios de cultura líquidos utilizados na fermentação submersa de *Clonostachys rosea*.

| Ingredientes                    | Pré-cultura | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |
|---------------------------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Relação C:N                     | 50:1        | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 50:1 | 10:1 | 10:1 | 10:1 | 10:1 |
| pH inicial                      | 6           | 6    | 6    | 6    | 6    | 6    | 6    | 6    | 6    |
| Inóculo $1 \times 10^7$ (mL)    | 10          | 10   | 10   | 10   | 10   | 10   | 10   | 10   | 10   |
| Meio Basal (mL)                 | 50          | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   |
| Dextrose 25% (mL)               | 37,2        | 37,2 | 36,4 | 36   | 36,4 | 21,2 | 18   | 15,4 | 17,7 |
| H <sub>2</sub> O Destilada (mL) | 2,1         | 2,1  | 3,6  | 4    | 3,6  | 15,5 | 22   | 24,6 | 22,4 |
| Extrato de Levedura (g)         | 0,7         | 0,7  |      |      |      | 3,30 |      |      |      |
| Pharmamedia (g)                 |             |      | 0,76 |      |      |      | 3,83 |      |      |
| Baker's soyflour (g)            |             |      |      | 0,84 |      |      |      | 4,25 |      |
| Protenose (g)                   |             |      |      |      | 0,77 |      |      |      | 3,90 |
| Volume total (mL)               | 100         | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  |

A inoculação dos meios líquidos em frascos foi feita com a pré-cultura líquida, conforme descrito no item 2.2. O material da raspagem foi transferido para um tubo Falcon® com 10 mL de Tween 80 0,04%. Posteriormente foi realizada a diluição seriada para contagem de esporos na câmara de Neubauer. Assim, foi inoculado 10 mL dessa suspensão conidial com concentração de inóculo de  $1 \times 10^7$  conídios/mL nos frascos de Erlenmeyer tipo *baffled* com 3 defletores basais (250 mL) com tampa de aço inox (que permite trocas gasosas) contendo 90 mL de meio líquido. A pré-cultura ficou quatro dias na incubadora shaker com agitação orbital (248 rpm, diâmetro orbital de 28 mm, Solab®), a 28°C com pH inicial de 6. A inoculação dos tratamentos foi feita adicionando-se 10



mL da suspensão (pré-cultura) contendo  $1 \times 10^7$  conídios/mL nos frascos de Erlenmeyer (250 mL) com 90 mL de meio. Esses frascos foram incubados em shaker orbital (248 rpm) a 28 °C e fotoperíodo de 12:12h por sete dias. As contagens de esporos e microescleródios foram realizadas do 2º ao 7º dia de fermentação. Para determinar a concentração de conídios submersos, uma alíquota de 1 mL de cultura líquida foi retirada dos frascos e diluída sucessivamente para contagem em câmara de Neubauer (Figura 1A). A quantificação de microescleródios foi realizada utilizando o método de contagem em lâmina de vidro coberta com lamínula (24 x 50 mm) (Figura 1B). O caldo fermentado passou por uma diluição de  $10^{-1}$  e foi adicionado 100 µL diretamente na lâmina, e somente microescleródios com tamanho de 50 a 500 µm foram computados. Os resultados foram expressos em conídios submersos/mL e microescleródios/mL.



**Figura 1.** Propágulos submersos de *Clonostachys rosea* produzidos em frascos agitados. **A)** Conídios submersos observados na microscopia de luz no aumento de 400X. **B)** Microescleródios observados no aumento de 200X. **C)** Colônias após 4 dias de crescimento em meio BDA+0,1% Triton X-100.

A determinação dos propágulos viáveis foi realizada determinando as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 20 mL de BDA com Triton X-100® (Synth®) e cloranfenicol. Após a diluição seriada das amostras obtidas na fermentação líquida, transferiu-se para o meio uma alíquota de 50 µL da suspensão de *C. rosea* da diluição de  $10^{-7}$ . As placas foram incubadas em BOD a  $25 \pm 2$  °C com fotoperíodo de 12:12h e a contagem do número de UFC foi feita após quatro dias (Figura 1C). Para a realização da secagem da biomassa produzida, no sétimo dia de fermentação, todo o volume da cultura líquida foi misturado com 5% de diatomita M2D (Diatom®) e transferido para um filtro de papel com gramatura de 80 g/m² para filtração a vácuo em funil de Büchner acoplado a um Kitassato. A secagem foi conduzida em câmara de leito horizontal com aeração forçada (UR ar = 18-50%) por 15 h a  $22 \pm 2$  °C até atingir umidade final < 5% (p/p). Após secagem, os materiais foram triturados até se obter grânulos finos (< 2 mm).

#### 2.4 Bioensaio de *Clonostachys rosea* vs. *Sclerotinia sclerotiorum*

O estudo de parasitismo de *C. rosea* sobre escleródios de *S. sclerotiorum* foi realizado com 24 placas de Petri (90 x 15mm) contendo 30 g de solo seco autoclavado cada, e umidade do solo ajustada para 100% da capacidade de campo, usando água destilada esterilizada. Os escleródios



foram produzidos em meio BDA após 25 dias de incubação do fungo em BOD. Após a distribuição de 12 escleródios por placa, foram aplicados 10,5 mL da suspensão de *C. rosea* e 10,5 mL de água destilada no tratamento controle, também foi necessária a adição de 16 µL de solução surfactante (0,02% de Break Thru (MSO), Evonik®), para que a suspensão se espalhasse mais facilmente no solo. As placas foram incubadas por 14 dias em BOD a 25 °C e 12h de fotofase, quando os escleródios foram removidos do solo e desinfestados superficialmente com etanol 70% (1 min), hipoclorito de sódio 2% (1 min) e lavados em água destilada esterilizada três vezes. Para verificar a viabilidade dos escleródios, os mesmos foram colocados em meio Neon-S (1 L de água; 40 g de BDA Difco®, 50 mg de azul de bromofenol, 50 mg de cloranfenicol, 50 mg de ácido livre 2,4-D), adicionando-se 12 escleródios por placa (90 x 15 mm), e incubados por sete dias. A avaliação foi realizada observando a mudança de cor induzida bioquimicamente pela germinação do patógeno (escleródios viáveis e germinados mudaram a cor do meio de roxa para amarelo).

Os tratamentos avaliados, em seis repetições, foram: T1 = controle com água destilada, T2 = suspensão de conídios da fermentação sólida em arroz, T3 = suspensão de conídios da fermentação líquida (meio T3, Tabela 1) e T4 = suspensão de microescleródios da fermentação líquida (meio T7, Tabela 1). Nos tratamentos 2 e 3 a densidade de inóculo foi  $1 \times 10^6$  UFC/g de solo seco e no tratamento T4 foi de  $2,5 \times 10^5$  microescleródios/g de solo.

## 2.5 Validação da fermentação líquida em biorreator de bancada

O ensaio com biorreator de bancada de 3 L (Eppendorf®, BioFlo/CelliGen® 115) foi conduzido com o meio T3 da Tabela 1 para validar a produção de conídios submersos. A pré-cultura foi a mesma da Tabela 1 e foi utilizada após cinco dias de fermentação em frascos agitados. O meio foi inoculado com uma pré-cultura líquida na concentração de  $1 \times 10^7$  ou  $5 \times 10^7$  conídios/mL utilizando 180 mL de inóculo (10% v/v), considerando um volume útil final de 1,7 L. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 e não teve controle ao longo do processo fermentativo. Os parâmetros iniciais após inoculação foram: agitação de 400 rpm, aeração de 1,0 L/min e 28 °C. Os parâmetros foram monitorados e foram retiradas amostras a cada 24h até o 4º dia de fermentação visando à contagem de conídios, UFC e medição do pH. Foram testadas duas densidades iniciais de inóculo:  $1 \times 10^7$  conídios/mL no ensaio BR 1 e  $5 \times 10^7$  conídios/mL no ensaio BR 2.

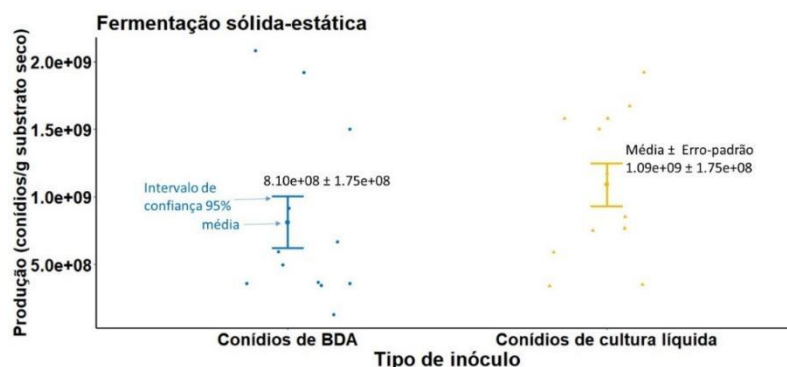
## 2.6 Análise dos dados

Os dados de produção de conídios aéreos, conídios submersos e microescleródios foram ajustados com modelos generalizados lineares com distribuição negativa binomial com ou sem interação dos efeitos fixos no preditor linear. Quando houve efeito significativo, as médias foram comparadas pelo método de Tukey HSD a  $P < 0,05$ . As análises foram realizadas no ambiente estatístico R (<https://cran.r-project.org/>).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Fermentação sólida em farinha de arroz

A fermentação de *C. rosea* em grãos úmidos de arroz apresentou uma concentração máxima de  $2,08 \times 10^9$  conídios/g após sete dias de cultivo em frascos Erlenmeyer, utilizando como fonte de inóculo inicial a suspensão de conídios feita a partir de culturas crescidas em BDA. Esse rendimento supera o resultado obtido por Maganhoto (2020) que conseguiu no máximo  $1,87 \times 10^9$  conídios/g de arroz após 30 dias de incubação em embalagens plásticas, o que demonstra a marcante diferença no tempo de produção. A hipótese deste estudo foi verificar se a forma de inóculo teria influência na produção de conídios em arroz por *C. rosea*; logo, o inóculo derivado das culturas crescidas em BDA apresentou uma média de  $8,10 \times 10^8$  conídios/g, enquanto o inóculo da suspensão feito com pré-cultura líquida conferiu uma média de  $1,09 \times 10^9$  conídios/g, concluindo que não há diferença estatística na produção de conídios entre as duas formas de inóculo testadas ( $\chi^2 = 1,26$ ,  $P = 0,26$ , Figura 2).



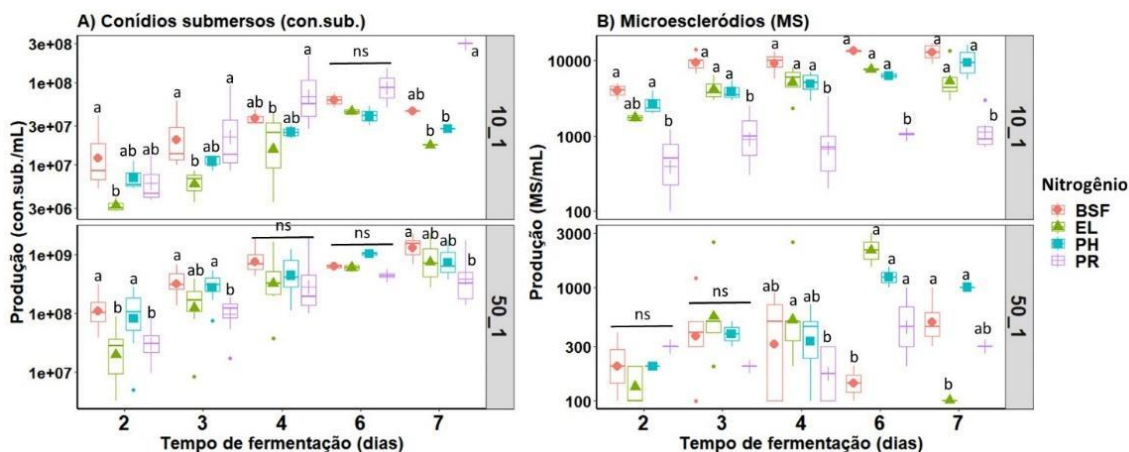
**Figura 2.** Impacto do tipo de inóculo (conídios de BDA e conídios de pré-cultura líquida) sobre o rendimento de conídios aéreos de *Clonostachys rosea* produzidos em arroz úmido após sete dias de incubação.

#### 3.2 Fermentação líquida de *C. rosea* em diferentes fontes de N e relações C:N

A relação C:N, fonte de nitrogênio e tempo de cultivo influenciaram significativamente a produção tanto de conídios submersos quanto de microescleródios nas culturas líquidas de *C. rosea* (Figura 3). Essas culturas líquidas começaram com uma densidade inicial de  $1 \times 10^6$  conídios/mL e cresceram significativamente ao longo do tempo, chegando a  $2,28 \times 10^9$  conídios/mL após sete dias de fermentação em meio com C:N = 50:1 e farelos de soja ( $\chi^2 = 41,6$ ,  $P < 0,01$ ). Esse resultado é superior ao obtido por Carvalho *et al* (2018), cujo rendimento máximo atingiu apenas  $1,52 \times 10^7$  conídios/mL em sete dias de cultivo. A maior concentração de microescleródios foi de  $1,66 \times 10^4$ /mL após sete dias com o meio contendo farelo de soja e C:N = 10:1 ( $\chi^2 = 27,4$ ,  $P = 0,006$ ). Em



contrapartida, Maganhoto (2020) reportou um rendimento máximo de  $5,33 \times 10^3$  microescleródios/mL após seis dias de cultivo. Os resultados deste ensaio evidenciam a importância da fonte de nitrogênio e da relação C:N para formação e produção de conídios submersos e microescleródios de *C. rosea*, corroborando com estudos anteriores feitos com outras espécies fúngicas (JACKSON; JARONSKI, 2009; KOBORI *et al.*, 2015).



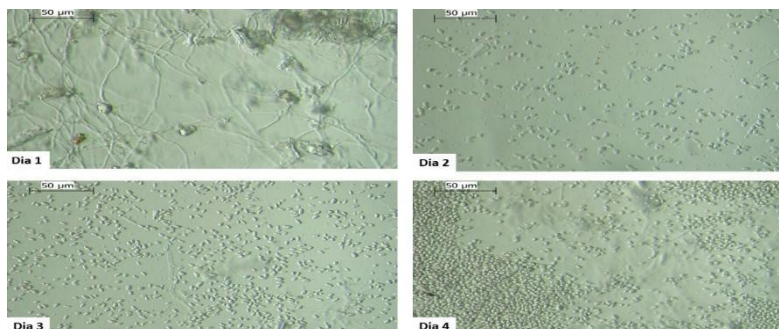
**Figura 3.** Efeito da interação de nitrogênio e relação C:N sobre a cinética de produção de conídios submersos e microescleródios de *Clonostachys rosea* sob cultivo líquido submersos em frascos agitados. Legenda: BSF = farelo de soja, EL = extrato de levedura, PH = farelo de algodão, PR = protenose. Médias seguidas pela mesma letra dentro de cada intervalo de tempo e relação C:N (10:1 ou 50:1) indicam que as fontes de nitrogênio não diferem entre si (Tukey HSD,  $P < 0,05$ ).

### 3.3 Validação da fermentação em biorreator de bancada

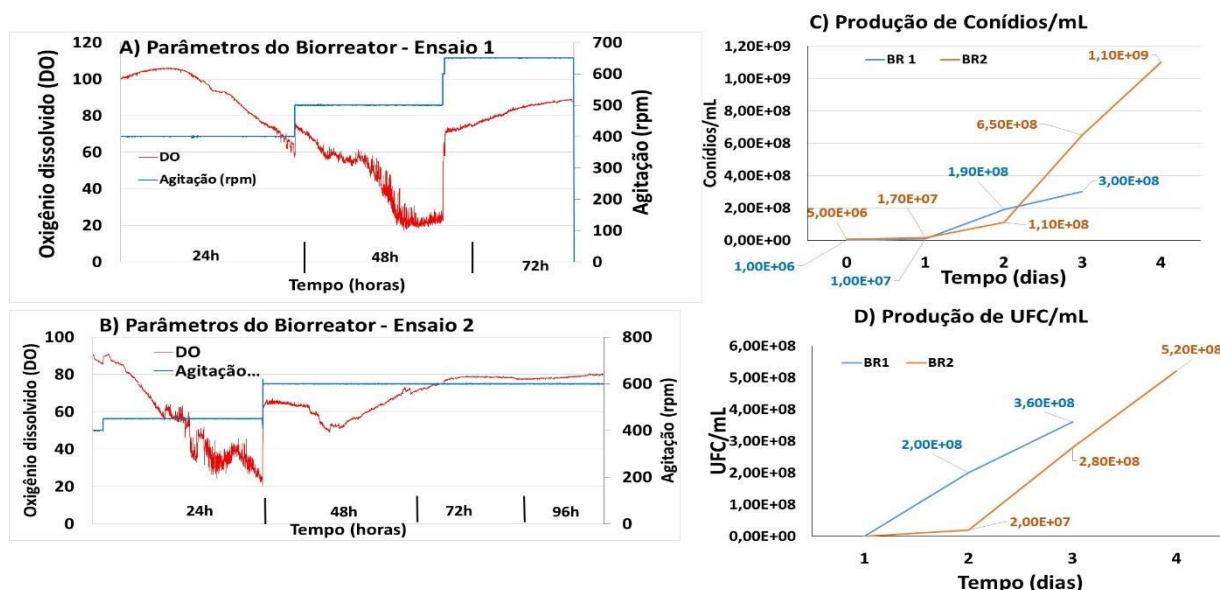
Com o intuito de ampliar a escala de produção de *C. rosea*, foi realizada a fermentação em biorreator automatizado de bancada, utilizando o meio contendo farelo de soja, relação C:N de 50:1 e pH inicial 6,0, pois proporcionou maior rendimento de conídios submersos e microescleródios sob cultivo líquido em frasco agitado. O pH variou pouco durante a fermentação e estacionou entre 5,4 e 5,9. Foram testadas duas densidades iniciais de inóculo:  $1 \times 10^7$  conídios/mL no ensaio BR 1 e  $5 \times 10^7$  conídios/mL no ensaio BR 2, sendo que o segundo ensaio apresentou o pico de produção no 4º dia, correspondendo a  $1,1 \times 10^9$  conídios/mL (Figura 4) e  $5,2 \times 10^8$  UFC/mL. Esse resultado é mais promissor em relação ao trabalho de Maganhoto (2020), que obteve uma concentração de conídios e propágulos viáveis de  $1,49 \times 10^7$  e  $1,12 \times 10^7$  UFC/mL após cinco dias de cultivo, respectivamente. Também é mais promissor se comparado com o estudo de Carvalho *et al.* (2018), que teve uma concentração máxima de  $1,01 \times 10^8$  conídios/mL após sete dias de fermentação.

Quanto aos parâmetros fermentativos controlados (Figura 5), nota-se um decréscimo no consumo de oxigênio (DO) no ensaio BR 2 mais acentuado do que no ensaio BR 1 nas primeiras 24 h de cultivo, o que pode estar relacionado à maior carga inicial de inóculo. Esse rápido consumo de

oxigênio no ensaio BR 2 nas primeiras 24 h de cultivo acelerou a cinética de produção de conídios submersos em relação ao ensaio BR 1 (Figura 5). No ensaio BR 1, o decréscimo de DO foi mais lento ao longo dos dias, o que pode ter refletido numa menor produção de esporos submersos. Em ambos os casos, o valor de DO foi ajustado para se manter acima de 40% com a agitação e fluxo de ar (aeração).



**Figura 4.** Evolução na produção de conídios submersos de *Clonostachys rosea* durante 1º, 2º, 3º e 4º dia de fermentação no ensaio BR 2 em biorreator de bancada, observados em microscopia de luz com aumento de 400x.

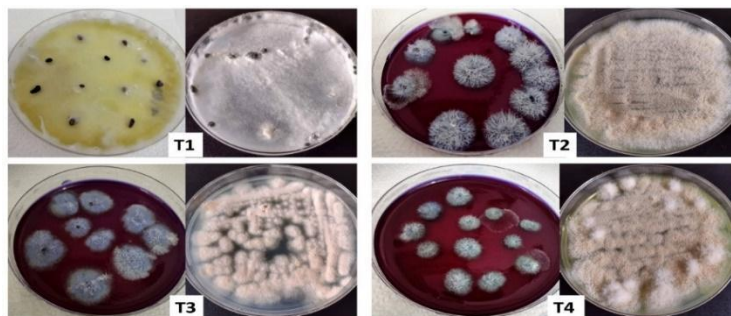


**Figura 5.** Monitoramento dos parâmetros fermentativos (DO e Agitação) dos ensaios BR 1 (A) e BR 2 (B) de *Clonostachys rosea* em biorreator de bancada em sistema de batelada. Rendimento de conídios submersos (C) e propágulos totais viáveis em UFC/mL (D).

### 3.4 Eficácia de propágulos submersos de *C. rosea* sobre *S. sclerotiorum*

Conídios submersos e aéreos e microescleródios de *C. rosea* inibiram 100% a germinação miceliogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*, os propágulos submersos (Figura 6). No controle, todos os escleródios estavam viáveis. Esses resultados indicam que os propágulos de *C. rosea*, provenientes de fermentação líquida ou sólida, foram eficazes na inibição de germinação dos

escleródios de *Sclerotinia*. Esses resultados estão de acordo com os de Maganhoto (2020), em que os propágulos obtidos nos diversos tipos de fermentação inibiram a germinação dos escleródios.



**Figura 6.** Culturas fúngicas obtidas a partir do reisolamento dos tratamentos T1, T2, T3 e T4 após sete dias de crescimento, com mudança de coloração do meio Neon-S para amarelo apenas no T1 (controle), enquanto todos os tratamentos que receberam aplicação no solo com *Clonostachys rosea* resultaram em 100% de inibição da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (note colonização dos escleródios por *C. rosea*).

#### 4. CONCLUSÃO

Os sistemas de fermentação líquida e sólida proporcionam rendimentos economicamente viáveis e promissores que sustentam a produção comercial de *C. rosea* LQC-62. Conídios submersos e microescleródios foram capazes de inibir 100% a viabilidade de escleródios do de *S. sclerotiorum*. Portanto, esses resultados geram subsídios que fomentam o desenvolvimento de um bioproduto inédito à base de conídios submersos e/ou microescleródios de *C. rosea* para uso no manejo integrado de mofo-branco e outros potenciais alvos.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ana da Silva agradece ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq - 136336/2020-5) e à Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade de desenvolvimento da Iniciação Científica. Wagner Bettiol agradece ao CNPq, pela bolsa de produtividade em pesquisa (CNPq 307855/2019-8). Os estudos foram desenvolvidos com recursos do projeto 20.19.02.003.00 da Embrapa.

#### 6. REFERÊNCIAS

- BYRNE, F. J.; BELLOWS, T. S. Whitefly biology. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 431–457, 1991.
- CARVALHO, A. L. A. et al. Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation. **Biololy Control**, v. 118, p. 16-25, 2018.



FARIA, M. R. de; WRIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biololy Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.

JACKSON, M. A., JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycology Research*, v. 113, p. 842–850, 2009.

JACKSON, M. A. et al. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. In: Roy, H. E. et al. (Eds.). **The ecology of fungal entomopathogens**. Dordrecht: Springer, 2010. p. 129-146.

KOBORI, N. N. et al. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 119, p. 179–190, 2015.

LEITE, L.G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S. Pinto, 2003. 92p.

MAGANHOTO, N. H. Otimização dos parâmetros para fermentação líquida submersa de *Clonostachys rosea*. 2020. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MASCARIN, G. M. et al. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 753-761, 2010.

MASCARIN, G. M. et al. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 99, n. 16, p. 6653–6665, 2015.

MORANDI, M. A. B. et al. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. *European Journal of Plant Pathology*, v. 106, p. 439–448, 2000.

MORANDI, M. A. B., et al. Development of *Clonostachys rosea* and interactions with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. **Phytoparasitica**, v. 29, p. 103–113, 2001.

MOUEKOUBA, L. D. O., et al. Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to tomato gray mold disease in tomato leaves. *PLoS One*, v. 9, n. 7, e102690, 2014.

NOBRE, S. A. M., et al. Selection of *Clonostachys rosea* isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling *Botrytis cinerea*. **Biology Control**, v. 34, p. 132–143, 2005.

ORTIZ-URQUIZA, A. et al. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). *Pest Management Science*, v. 66, p. 725–735, 2010.

SANTOS, P.S. et al. Nutritional impact of low-cost substrates on biphasic fermentation for conidia production of the fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae*. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, 100619, 2021.

SUTTON, J. C. et al. *Gliocladium roseum*, a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease**, v. 81, p. 316–328, 1997.

WRIGHT, S. P. et al. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungi as biocontrol agents**: progress, problems and potential. Wallingford: CAB International, 2001. p. 253-287.