



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

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

**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.

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

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

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

<sup>4</sup> 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 ( $2 \times 10^7$  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 <sub>1</sub>	10:1	50:1	100:1
N:C	X <sub>2</sub>	10:1	50:1	100:1
pH	X <sub>3</sub>	4	7	8,5
Sulfato de Magnésio (g)	X <sub>4</sub>	0,25	1	2,5
Sulfato de potássio(g)	X <sub>5</sub>	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

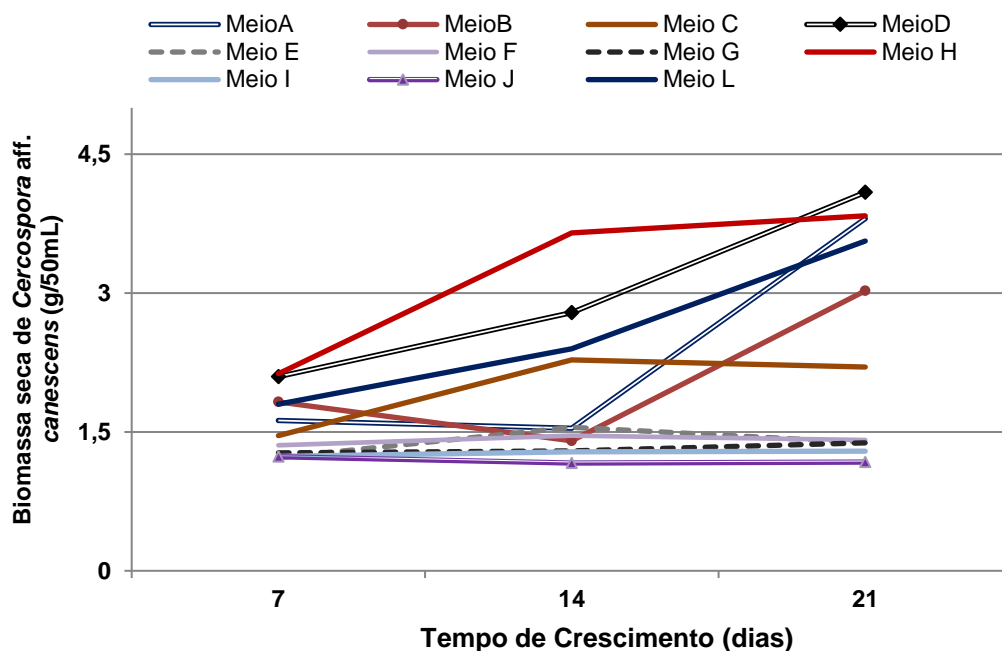


**Figura 1.** Esquema dos ensaios da produção de biomassa de *Cercospora aff. canescens* CMAA 1440

### 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.