

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ANNA LUIZA BOCALOM DA SILVA

OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO MASSAL DE *Didymella*
sp., POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE DO CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria*
insularis)

MONTE CARMELO
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ANNA LUIZA BOCALOM DA SILVA

OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO MASSAL DE *Didymella*
sp., POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE DO CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria*
insularis)

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de
Agronomia da Universidade Federal de
Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como
requisito necessário para a obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Orientador (a): Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira

MONTE CARMELO
2025

ANNA LUIZA BOCALOM DA SILVA

OTIMIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO MASSAL DE *Didymella*
sp., POTENCIAL AGENTE DE BIOCONTROLE DO CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria*
insularis)

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de
Agronomia da Universidade Federal de
Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como
requisito necessário para a obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Monte Carmelo, 29 de agosto de 2025

Banca Examinadora

Bruno Sérgio Vieira
Orientador (a)

Daniele Ruela Mendes
Membro da Banca

Jairla Gomes Rodrigues
Membro da Banca

Monte Carmelo

2025

RESUMO

O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) é uma das principais plantas daninhas da agricultura brasileira, causando prejuízos significativos devido à sua rápida disseminação, elevada competitividade e resistência a herbicidas como o glifosato e os inibidores de ACCase. Essa resistência dificulta seu controle e torna urgente o desenvolvimento de estratégias alternativas de manejo, como o controle biológico com fungos fitopatogênicos. Neste contexto, um isolado do fungo *Didymella* sp. (KDI036) foi obtido a partir de plantas doentes de capim-amargoso. Aplicações de suspensões contendo seus esporos resultaram em alta mortalidade das plantas, evidenciando seu potencial como agente de biocontrole. Com base nisso, conduziram-se experimentos para avaliar diferentes combinações de meio de cultura visando otimizar a produção de conídios e clamidósporos do fungo. O estudo foi conduzido em três etapas: teste preliminar com os meios BD 10%, BD 50% e Caldo de vegetais, teste com diferentes concentrações de BD e glicerol e com diferentes tempos de incubação, e por último o teste com variação de sacarose, extrato de levedura, sais, glicerol e tempo. Foi possível observar no teste preliminar que a maior produção de conídios ocorreu no meio BD 10% aos 3 e 7 dias, e a partir desse resultado, realizou-se os outros experimentos. No segundo teste, o meio BD 10% associado a glicerol 10% favoreceu a produção de conídios, enquanto BD 50%, glicerol 15% e 7 dias de incubação favoreceram a formação de clamidósporos. No último teste, a produção de conídios foi insignificante, porém para clamidósporos houve uma tendência nos meios que apresentaram maiores concentrações de sacarose, menores concentrações de glicerol e maior tempo de incubação. Com base nesses resultados, foi possível concluir que o meio de cultura tem grande influência na produção dos inóculos desse isolado e os próximos experimentos devem levar em consideração os ajustes nos componentes do meio para maximizar a produção em larga escala visando o seu uso para o controle biológico do capim-amargoso.

Palavras-chave: planta daninha, clamidósporos, conídios.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	OBJETIVO	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	10
	3.1. Origem e seleção do isolado KDI036	10
	3.2. Recuperação do isolado KDI036	10
	3.3 Obtenção da suspensão de conídios e clamidósporos	10
	3.4. Teste preliminar em meio líquido	11
	3.5. Teste de produção em BD 10% e 50% com diferentes concentrações de glicerol	11
	3.6. Teste de produção em diferentes concentrações dos componentes do meio BD 10% ...	12
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
	4.1. Teste preliminar em meio líquido	14
	4.2. Teste de produção em BD 10% e 50% com diferentes concentrações de glicerol	15
	4.3. Teste de produção em diferentes concentrações dos componentes do meio BD 10% ...	17
5	CONCLUSÃO.....	19
	REFERÊNCIAS	20

1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas são naturalmente adaptadas ao ambiente em que estão inseridas e apresentam a capacidade de crescer rapidamente, quando comparadas às plantas cultivadas. Apresentam tanto importância econômica quanto social, pois afetam atividades de produção de culturas importantes, causando perdas econômicas com reflexos sociais (Carvalho, 2013).

Os prejuízos causados pelas plantas daninhas na agricultura podem ser diretos ou indiretos, sendo os diretos: a competição por recursos como água, luz, espaço e nutrientes, o que causa uma grande redução na produtividade de cultivos comerciais. Os prejuízos indiretos são por serem hospedeiras de pragas e patógenos e por dificultarem o manejo ou a colheita, causando uma desvalorização do produto comercial (Barroso e Murata, 2021).

O capim-amargoso (*Digitaria insularis*) é uma espécie de planta daninha que é nativa de regiões tropicais e subtropicais da América, e é comumente encontrado em pastagens, cultivos agrícolas, pomares, bem como em áreas ruderais, como margens de estradas e terrenos baldios (Machado et al., 2008). É uma gramínea, perene e pode atingir até 150 cm de altura que apresenta grande potencial como invasora (Adegas e Gazziero, 2024).

Esta espécie nas últimas décadas vem apresentando grande relevância dentro da agricultura brasileira e isso tem acontecido devido a algumas peculiaridades da espécie, como seu padrão de crescimento, características de reprodução e dispersão, e sua capacidade de adaptação. Isso inclui a capacidade de se adaptar a diversas condições do solo e do clima, bem como aos diferentes sistemas de produção adotados no país (Adega e Gazziero, 2024).

Digitaria insularis é uma espécie que apresenta características de agressividade, como a capacidade de formação de rizomas que formam touceiras notáveis, e a capacidade de disseminação de sementes durante praticamente todo o verão (Gemelli et al., 2012). As sementes são abundantes e apresentam pelos que auxiliam na sua dispersão a longas distâncias, o que junto com o alto percentual germinativo, permite que essa planta se dissemine com grande facilidade (Kissmann e Groth, 1997). Estudos de Gazziero et al. (2012), indicaram que a convivência de 4 a 6 plantas m² de *D. insularis* com a cultura da soja já é suficiente para reduzir a produtividade em 44%.

Atualmente, grande parte das plantas de capim-amargoso apresentam biótipos resistentes à herbicidas químicos, isso devido à intensas aplicações realizadas para controlar essa planta. Em 2005, o Paraguai registrou o primeiro caso de resistência de *D. insularis*. Essa

resistência foi identificada em culturas como milho, algodão, soja e girassol ao glifosato, um ingrediente ativo que funciona por meio do mecanismo de ação conhecido como inibidores da Enolpiruvil Shiquimato Fosfato Sintase (EPSP's). No Brasil, o primeiro caso de resistência ocorreu em 2008, nas culturas de soja e milho aos inibidores da EPSP's. Em 2016, surgiu a confirmação da resistência aos inibidores da Acetil CoA Carboxilase (ACCase), na cultura da soja, resistentes aos ingredientes ativos fenoxaprop-etila e haloxifop-metil. Em 2020, ocorreu o primeiro caso de resistência múltipla a dois mecanismos de ação, com resistência aos inibidores da EPSP'S e inibidores da ACCase na cultura da soja (Heap, 2024).

Com isso, necessita-se de métodos de controle para essa espécie que apresenta resistência significativa aos atuais herbicidas químicos utilizados para seu controle. Uma das alternativas ao uso de herbicidas é o controle biológico de plantas daninhas com o uso de fitopatógenos.

O controle biológico de plantas daninhas consiste na diminuição de populações de espécies de plantas daninhas, utilizando inimigos naturais, nesse caso, fungos fitopatogênicos ao capim-amargoso. Ele é dividido em duas abordagens, sendo o método clássico (inoculativo) e o método de bioherbicida (inundativo). O primeiro consiste em introduzir o patógeno a partir do centro de origem da planta-alvo e transferi-lo para a nova região onde a espécie se encontrará. A segunda envolve o uso de patógenos já associados à planta-alvo, depois de ter seu inóculo produzido em massa, formulado e aplicado (Vieira e Barreto, 2018).

A produção de um produto biológico para o controle de plantas daninhas, pelo método inundativo apresenta várias etapas, sendo elas: a escolha da planta-alvo, coleta de plantas que apresentam sintomas/lesões, testes de patogenecidades após a obtenção dos fungos a partir das coletas, testes de agressividade a fim de selecionar os fungos mais agressivos à planta-alvo, teste de especificidade para selecionar os fungos específicos à planta-alvo, produção massal e registro do produto. A etapa de produção massal, tem como finalidade escolher metodologias que influenciam positivamente na esporulação e no crescimento do fungo a fim de realizar o registro do futuro produto biológico a base de fungos fitopatogênicos (Barreto, 2018).

Os clamidósporos são um tipo de esporo grande, esférico e de parede espessa, derivado das hifas fúngicas, que permite ao fungo sobreviver em condições adversas (como extremo de temperatura, escassez de nutrientes, pH desfavorável). Conídios são esporos assexuados, com a principal função de dispersão e reprodução dessas espécies. Eles são gerados a partir de hifas especializadas chamadas conidióforos (Jiang et al., 2018).

A produção massal é uma das etapas mais importantes quando o foco é a produção de um bioherbicida, pois é necessário que o fungo esteja disponível em grandes quantidades. Um

meio de cultura deve apresentar fontes de carbono, nitrogênio, sais minerais e outros fatores que favoreçam o crescimento do fungo (Soper e Ward, 1981; Alves, 1998).

As fontes de carbono normalmente utilizadas são amido, sacarose, dextrose entre outros açúcares. Já as fontes de nitrogênio são derivadas de compostos ricos em proteínas ou aminoácidos, como extrato de levedura, entre outros. Alguns produtos ricos em amido também são usados como meio de cultura, podendo citar: arroz, batata, aveia entre outros (Carvalho, 2014).

A produção *in vitro* pode ser realizada pela fermentação sólida, difásica ou líquida. A fermentação sólida, os conídios são colhidos direto da placa com o crescimento e em seguida inoculados em substratos sólidos (Alves e Pereira, 1998). O arroz cozido é um dos substratos mais utilizados na fermentação sólida de fungos, entretanto, essa é uma opção considerada cara pelo preço de mercado do arroz, o que torna a busca por substratos alternativos a fim de substituir esse (Moraes, 2009).

A técnica difásica se baseia no processo em que o fungo é produzido inicialmente em meio líquido, e em seguida em meio sólido, ocorrendo à alta formação de biomassa quando em meio líquido e a alta formação de conídios quando em meio sólido (Mascarin et al., 2019).

A fermentação líquida apresenta como vantagem a obtenção de elevadas quantidades de biomassa em um pequeno espaço físico e em pouco tempo. Essa técnica visa manipular as condições nutricionais e ambientais durante o crescimento do fungo no meio líquido, para induzir um crescimento desejado ou avaliar o potencial de produção de propágulos (Alves e Pereira, 1998).

Diante da problemática com a produção de fungos, a busca por outras metodologias que visem otimizar a produção de conídios e clamidósporos do fungo *Didymella* sp., o qual é patogênico ao capim-amargoso, é uma necessidade para obter uma produção em larga escala. A escolha por essas estruturas fúngicas se deve ao fato de que, em testes anteriores, ambos demonstraram capacidade de causar doença nas plantas de capim-amargoso, sendo então, usados nesse trabalho.

Da mesma forma, a fermentação líquida foi escolhida a partir de trabalhos anteriores em que essa metodologia proporcionou os melhores resultados para produção desse fungo, principalmente por ele apresentar picnídios, uma estrutura reprodutiva responsável pela formação dos conídios do fungo.

2 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes combinações de meios de cultura para otimizar a produção de esporos e clamidósporos do fungo *Didymella digitalium*, criando um meio nutricionalmente completo e economicamente viável para produção em larga escala, visando seu uso potencial para o controle biológico do capim-amargoso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF) na Universidade Federal de Uberlândia, *campus* Monte Carmelo.

3.1. Origem e seleção do isolado KDI036

O isolado de *Didymella digitalium* (KDI036), foi obtido a partir de plantas de capim-amargoso e sua patogenicidade foi testada em trabalhos anteriores (Garcia, 2024; Estevam, 2024), no qual foi possível selecioná-lo como o mais específico e mais agressivo dentre outros isolados testados, apresentando grande potencial como um agente de biocontrole para esse alvo.

3.2. Recuperação do isolado KDI036

Para a obtenção de material fúngico ativo, o isolado foi previamente cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA 10% (Batata-Dextrose-Ágar), e incubado em BOD durante sete dias à 25°C com fotoperíodo.

3.3 Obtenção da suspensão de conídios e clamidósporos

Com a definição dos esporos (conídios) e clamidósporos como infectivos, realizou-se a produção da suspensão desses propágulos. Inicialmente, o isolado foi cultivado em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA onde após 7 dias ocorreu a formação de picnídios contendo conídios. Em seguida, foram adicionados 8 mL de água destilada esterilizada (ADE) nessas placas e com a ajuda de uma alça de Drigalski os picnídios foram rompidos, liberando os conídios e formando assim, a suspensão. A concentração foi aferida em câmara de Neubauer, e padronizada em 1×10^6 conídios/mL.

3.4. Teste preliminar de cultivo em meio líquido

Após a obtenção da suspensão, foi realizado o teste preliminar com diferentes meios e concentrações, a fim de otimizar a produção. Os meios e concentrações avaliados foram: BD (Batata-Dextrose) a 50% e 10%; e CV (Caldo de Vegetais). Foram adicionados 5 mL da suspensão em cada Erlenmeyer (frasco) contendo 95 mL do meio de cultura, e em seguida, foram incubados em agitador orbital a 130 rpm. As avaliações foram realizadas aos 3, 5 e 7 dias de cultivo, e as concentrações foram aferidas em câmara de Neubauer.

3.5. Teste de cultivo em BD 10% e 50% com diferentes concentrações de glicerol

Com o intuito de confirmar os resultados do teste preliminar, foi conduzido um experimento com o objetivo de avaliar em quais condições de cultivo ocorre a maior produção de estruturas fúngicas infectivas, como conídios e clamidósporos. Com isso, foram testadas diferentes concentrações de BD, e a adição de glicerol como um fator adicional.

O experimento foi delineado em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado), com arranjo fatorial $2 \times 3 \times 2$, totalizando 12 tratamentos com 3 repetições cada. Os fatores avaliados foram: concentração de BD (10% e 50%), concentração de glicerol (0%, 10% e 15%) e tempo de incubação (3 e 7 dias). A significância foi verificada pelo teste F e as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5%.

Os frascos contendo as combinações de meios e glicerol foram inoculados com uma suspensão que foi obtida a partir da raspagem de placas de BDA contendo o crescimento do fungo, como citado no item 3.3. Foram incubados em agitador orbital a 150 rpm e 25°C, e para as avaliações, os frascos foram retirados do shaker, e processados em liquidificador para homogeneizar e promover a trituração dos picnídios, liberando os conídios neles contidos, o que possibilitou uma contagem facilitada. As concentrações de conídios e clamidósporos foram aferidas em câmara de Neubauer.

3.6. Teste de cultivo em diferentes formulações

Com base na composição do meio BD 10%, foram criadas diferentes formulações, com o intuito de desenvolver combinações que favorecessem a produção de conídios e clamidósporos do KDI036. A formulação original apresenta glicose como fonte de carbono, porém, neste trabalho, a glicose foi substituída por sacarose devido ao seu menor custo e maior facilidade de aquisição em larga escala. Além disso, foi adicionado glicerol às formulações, atuando como agente osmoprotetor, com o objetivo de reduzir o estresse osmótico e conferir ao fungo maior tolerância a condições desfavoráveis de campo, como baixa disponibilidade de água, temperaturas extremas ou variações de umidade.

O experimento foi conduzido segundo um delineamento fatorial fracionado 2^{5-2} , com cinco fatores avaliados em dois níveis (inferior e superior): sacarose (1 e 5 g/L), extrato de levedura (0,25 e 1,250 g/L), sais minerais (presença e ausência), glicerol (10% e 15%) e tempo de incubação (3 e 7 dias). Foram testadas 8 combinações experimentais, com 3 repetições cada, totalizando 24 unidades experimentais (Tabela 1).

Para facilitar a preparação dos meios, foram feitas soluções estoques de cada fator e os níveis dos componentes foram ajustados em volumes padronizados, sendo: para sacarose e extrato de levedura, o nível inferior e superior correspondentes, respectivamente, a 2 mL e 10 mL, das soluções estoques. Para os sais, o nível inferior correspondeu a 0 e o superior a 10 mL. Cada solução foi adicionada com suas respectivas concentrações nos frascos e o volume final foi ajustado para 100 mL completando com água destilada (Tabela 2).

Os frascos contendo os meios foram autoclavados à 121 °C durante 20 minutos. Para a inoculação, preparou-se a suspensão e inoculou-se 100 µL (microlitros) em cada frasco

contendo os meios de culturas. Esses frascos foram incubados e avaliados da mesma forma como citado no item 3.5.

Tabela 1. Delineamento experimental contendo todas as combinações

Frasco	Sacarose	Extrato	Sais	Glicerol	Tempo
1	1	250	Sem	15	7
2	5	250	Sem	10	3
3	1	1250	Sem	10	7
4	5	1250	Sem	15	3
5	1	250	Com	15	3
7	1	1250	Com	10	3
8	5	1250	Com	15	7
9	1	250	Sem	15	7
10	5	250	Sem	10	3
11	1	1250	Sem	10	7
12	5	1250	Sem	15	3
13	1	250	Com	15	3
15	1	1250	Com	10	3
16	5	1250	Com	15	7
17	1	250	Sem	15	7
18	5	250	Sem	10	3
19	1	1250	Sem	10	7
20	5	1250	Sem	15	3
21	1	250	Com	15	3
23	1	1250	Com	10	3
24	5	1250	Com	15	7

Tabela 2. Ajustes dos níveis para a montagem do experimento

Frasco	Sacarose	Extrato	Sais	Glicerol	Água	Tempo
1	2	2	0	15	81	7
2	10	2	0	10	78	3
3	2	10	0	10	78	7
4	10	10	0	15	65	3
5	2	2	10	15	71	3
6	2	10	10	10	68	7
7	10	10	10	10	60	3
8	2	2	0	15	81	7
9	10	2	0	15	73	7
10	2	10	0	10	78	3
11	10	10	0	10	70	7
12	2	2	10	15	71	3
13	2	10	10	15	63	3
14	10	10	10	10	60	7
15	2	2	0	10	86	3
16	10	2	0	15	73	7
17	2	10	0	15	73	7
18	10	10	0	10	70	3

19	2	2	10	10	76	7
20	2	10	10	15	63	3
21	10	10	10	15	55	3
22	10	2	10	10	68	7
23	10	2	10	10	68	3
24	10	2	10	15	63	7

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste preliminar de cultivo em meio líquido

Nos testes preliminares, foram comparados os meios BD 10%, BD 50% e CV quanto à capacidade de estimular a esporulação do isolado KDI036. Observou-se que o meio BD 10% proporcionou maior produção de conídios em relação aos outros meios testados, nos tempos de 3 e 7 dias de cultivos. Isso pode estar relacionado ao fato de que o BD 10%, por ser menos rico em nutrientes, induz um leve estresse nutricional, favorecendo a esporulação.

Diante disso, o BD 10% e os tempos de cultivo de 3 e 7 dias foram selecionados como base para os experimentos subsequentes de otimização. Estudos de Martins et al. (2007) observaram que o meio de cultura BD foi o que mais promoveu a esporulação de três isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* dentre os quatro isolados que foram testados.

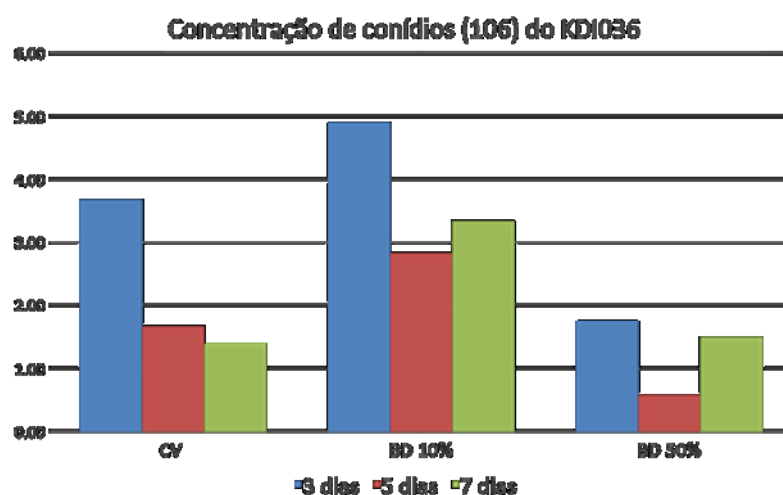


Figura 1. Concentração de conídios do KDI036 em diferentes meios e tempos de cultivo.

4.2. Teste de cultivo em BD 10% e 50% com diferentes concentrações de glicerol

A análise de variância foi realizada em logaritmo do número de conídios (log_conídios) e logaritmo do número de clamidósporos (log_clamidósporos). Para a variável produção de conídios, os fatores BD e glicerol apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). O fator tempo e as interações entre os fatores não apresentaram efeitos significativos (Tabela 3). Observou-se que o meio BD 10% com a média de 4.59, favoreceu a produção de conídios em relação ao BD 50% ($m = 2.25$), e que glicerol 0% e 10% ($m = 4.55$; 3.77) resultaram nas maiores médias de produção de conídios que a concentração de 15% ($m = 1.93$).

Tabela 3. Análise de variância para produção de conídios em função de diferentes tempos de cultivos e diferentes concentrações de BD e glicerol

	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
BD	1	49.46346	49.46346	27.6381	0*
Glicerol	2	43.67642	21.83821	12.2023	2×10^{-4} *
Tempo	1	6.47139	6.47139	3.6159	0.0693 ^{NS}
BD*Glicerol	2	1.35780	0.6789	0.3793	0.6883 ^{NS}
BD*Tempo	1	0.00786	0.00786	0.0044	0.9477 ^{NS}
Glicerol*Tempo	2	2.68312	1.34156	0.7496	0.4833 ^{NS}
BD*Glicerol*Tempo	2	9.21608	4.60804	2.5748	0.097 ^{NS}
Resíduo	24	42.95241	1.78968		
Total	35	155.82855			
CV = 39.13%					

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. NS = Não significativo. C.V= Coeficiente de variação.

Tabela 4. Médias de produção de conídios para o fator BD

BD	Médias
10%	4.59 a
50%	2.25 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Médias de produção de conídios para o fator glicerol

GLICEROL	Médias
0%	4.55 a
10%	3.77 a
15%	1.93 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação a produção de clamidósporos, os três fatores isolados (BD, glicerol e tempo) foram significativos, e as interações não significativas (Tabela 6). Os fatores BD 50% ($m =$

5.62) e glicerol 15% (m = 5.59) foram os que mais produziram clamidósporos em relação ao BD 10% (m = 4.42) e glicerol 10% e 0% (m = 5.22; 4.25) e 7 dias de incubação apresentou a maior média (m = 5.55) que 3 dias (m = 4.49).

Tabela 6. Análise de variância para produção de clamidósporos em função de diferentes tempos de cultivos e diferentes concentrações de BD e glicerol

	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
BD	1	13.00539	13.00539	13.9402	0.001*
Glicerol	2	11.56123	5.78062	6.1961	0.0068*
Tempo	1	10.36485	10.36485	11.1098	0.0028*
BD*Glicerol	2	2.36357	1.18178	1.2667	0.2999 ^{NS}
BD*Tempo	1	3.32292	3.32292	3.5618	0.0713 ^{NS}
Glicerol*Tempo	2	5.89214	2.94607	3.1578	0.0606 ^{NS}
BD*Glicerol*Tempo	2	4.78316	2.39158	2.5635	0.0979 ^{NS}
Resíduo	24	22.39067	0.93294		
Total	35	73.68394			

CV = 19.23%

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. NS = Não significativo. C.V= Coeficiente de variação.

Tabela 7. Médias de produção de clamidósporos para o fator BD

BD	Médias
50%	5.62 a
10%	4.42 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Médias de produção de clamidósporos para o fator glicerol

GLICEROL	Médias
15%	5.59 a
10%	5.22 ab
0%	4.25 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9. Médias de produção de clamidósporos para o fator tempo

TEMPO	Médias
7	5.55 a
3	4.49 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As variáveis analisadas nesse experimento (produção de conídios e de clamidósporos) apresentaram diferenças em relação aos fatores (BD, glicerol e tempo). A produção de conídios foi favorecida nos meios com BD 10% e glicerol 0% ou 10%, enquanto o tempo não influenciou significativamente. Virtuoso et al. (2021) avaliaram as condições ideais para esporulação de *Didymella bryoniae* in vitro, onde o meio de cultura BDAR (batata-dextrose-ágar + ramos de

melão) foi o que mais influenciou na produção de conídios, seguido do meio BDA. Estudos semelhantes apontaram que *Didymella bryoniae* apresentou a maior produção de conídios em meio BDA e ágar de farinha de milho (Bhat et al., 2009).

Em contrapartida, para a produção de clamidósporos os que mais favoreceram foram BD 50%, glicerol 15% e tempo de incubação de 7 dias. Estudos de Li et al. (2015), verificaram que meios de culturas líquidos com glicerol e o tempo de incubação de 6 dias foram satisfatórios para a produção de clamidósporos de *Trichoderma asperellum*.

4.3. Teste de cultivo em diferentes formulações

Nesse experimento não foi possível realizar a análise estatística para a variável produção de conídios, pois apenas na formulação contendo - 5 g/L de sacarose, 0,25 g/L de extrato de levedura, presença de sais, 10% de glicerol e incubação por 7 dias - promoveu a esporulação visível de 1×10^6 conídios/mL e $6,2 \times 10^5$ clamidósporos/mL. Todas as outras formulações favoreceram exclusivamente a produção de clamidósporos.

Em relação a produção de clamidósporos, a análise de variância não indicou efeitos significativos para os fatores testados (Tabela 10). No entanto, o teste de falta de ajuste foi significativo, o que sugere que o modelo usado não explicou completamente os dados.

Tabela 10. Análise de variância para produção de clamidósporos em função das concentrações de sacarose, extrato de levedura, sais e glicerol e do tempo de incubação

	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Sacarose	1	0,15292	0,152921	1,12	0,303 ^{NS}
Extrato	1	0,00544	0,005441	0,04	0,844 ^{NS}
Sais	1	0,00358	0,003585	0,03	0,873 ^{NS}
Glicerol	1	0,24579	0,245791	1,81	0,196 ^{NS}
Tempo	1	0,32086	0,320858	2,36	0,142 ^{NS}
Modelo	5	0,72860	0,145719	1,07	0,409
Linear	5	0,72860	0,145719	1,07	0,409
Erro	18	2,44993	0,136107		
Falta de ajuste	2	0,84513	0,422567	4,21	0,034*
Erro puro	16	1,60480	0,100300		
Total	23	3,17853			

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade; NS = não significativo;

Contudo, observou-se uma maior tendência de produção de clamidósporos nas combinações que apresentaram maiores concentrações de sacarose, menores concentrações de glicerol e maior tempo de incubação, promovendo $9,5 \times 10^5$ clamidósporos/mL. Já os fatores extrato de levedura e sais não influenciaram na produção (Figura 1). De forma semelhante, Vieira e Barreto (2010) verificaram que os meios líquidos JP (Jenkins-Prior), PA (Paris), JA (Jackson) e AD (Adamek) resultaram nas maiores produções de clamidósporos de *Lewia chlamidosporiformans*, não havendo diferença significativa entre eles, o que aponta direções para estudos futuros sobre a produção desse inóculo.

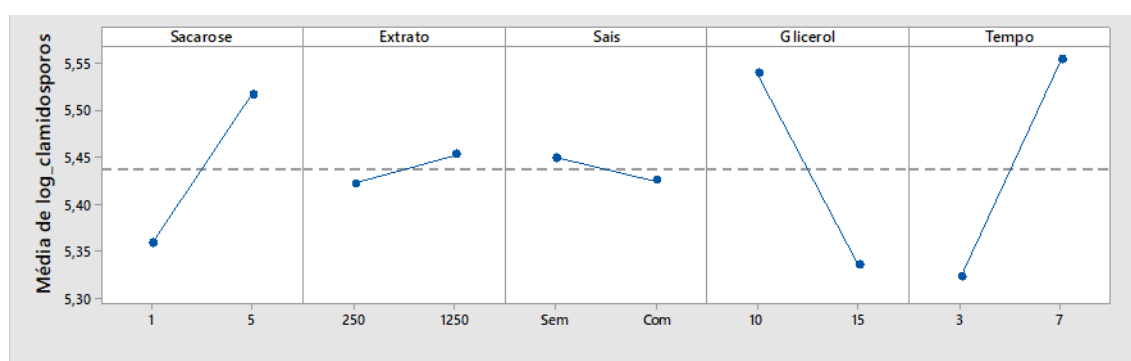
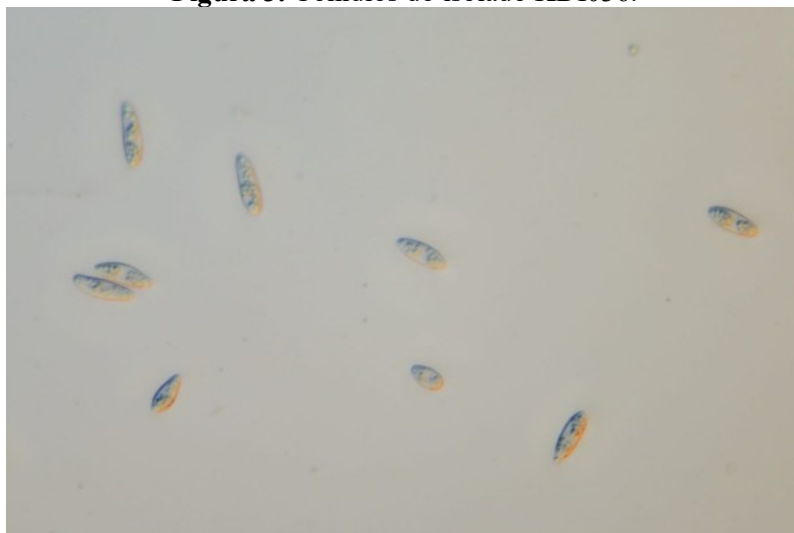


Figura 2. Gráfico de principais efeitos para produção de clamidósporos

Com base nos dados, as combinações não foram positivas para a produção de conídios, tendo apenas uma combinação favorecido essa variável, o que impossibilitou a realização de uma análise estatística. Apesar disso, esse resultado é relevante pois evidencia o potencial dessa formulação específica em induzir a produção de conídios, apontando um caminho promissor para o desenvolvimento de protocolos para a produção desse inóculo. Estudos com *Trichoderma asperellum* demonstraram que entre diferentes fontes de carbono testadas para a produção de conídios, a sacarose foi a que mais influenciou positivamente na esporulação (Li et al., 2015).

Em relação a produção de clamidósporos, a estatística não foi significativa para os fatores testados, porém houve melhores tendência como: mais sacarose e maior tempo de incubação tenderam a favorecer a produção, enquanto mais glicerol tendeu a desfavorecer.

Figura 3. Conídios do isolado KDI036.



Fonte: Mendes, D.R. 2025.

Figura 4. Clamidósforo do isolado KDI036.



Fonte: Mendes, D.R. 2025.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a produção de conídios e clamidósporos do isolado fúngico *Didymella digitarium* (KDI036) é fortemente influenciada pela composição do meio de cultura. O meio BD 10% combinado a glicerol 10% favoreceu a esporulação, enquanto o BD 50%, associado a glicerol 15% e maior tempo de incubação (7 dias), estimulou a produção de clamidósporos.

No último teste (teste de cultivo em diferentes concentrações dos componentes do meio BD 10%) apenas uma combinação permitiu produção tanto de conídios como de clamidósporos,

e os fatores sacarose, tempo e glicerol tiveram influência na produção de clamidósporos, o que sugere uma melhor tendência para os próximos trabalhos de otimização.

Esses resultados reforçam a viabilidade do uso desse isolado como agente de controle biológico do capim-amargoso e indicam a necessidade de ajustes nos componentes dos meios de cultura, a fim de favorecer a produção em larga escala para a produção de um bioherbicida.

REFERÊNCIAS

ADEGAS, F.S.; GAZZIERO, D.L.P. **Monitoramento de *Digitaria insularis* (capim-amargoso) resistente a herbicidas nos estados do Paraná e do Mato Grosso do Sul.** Londrina: Embrapa, 2024. 5 p.

ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M. **Produção de fungos entomopatogênicos.** In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos.** 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 845-869.

BARROSO, A.A.M.; MURATA, T. **Matologia: estudos sobre plantas daninhas.** Jaboticabal: Fábrica da Palavra, 2021. 547 p.

BHAT, Z. A. et al. **Effect of media, temperature and pH on growth and fructification of *Didymella bryoniae* (Auresw.) Rehm. causing blight in ridge gourd.** *Applied Biological Research*, v. 11, n. 2, p. 70-72, 2009.

CARVALHO, L.B. et al. **Deteção de biótipos de capim-amargoso (*Digitaria insularis*) resistentes ao glifosato no Brasil.** *Weed Science*, v.59, n.2, p.171-176, 2011.

CARVALHO, L.B. **Plantas daninhas.** Lages: Editado Pelo Autor, 2013. 82 p.

CARVALHO, A.L.A. **Produção massal do fungo *Clonostachys rosea* em meio líquido.** 2014. 50 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

GEMELLI, A. et. al. **Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle.** *Revista Brasileira de Herbicidas*, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 231, 10 ago. 2012.

GAZZIEIRO, D.L.P. et al. **Efeitos da convivência do capim-amargoso na produtividade da soja.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 2012, Campo Grande. Anais. P. 1-6.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds.** Disponível em: <http://www.weedscience.org>. Acesso em: 29 abril 2024.

JIANG, D. et al. **Identification of genes related to chlamydospore formation in *Clonostachys rosea*.** *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas.** 2.ed. São Paulo: BASF, 1997. Tomo I. 825 p.

LI, Y. et al. **Enhanced conidial production of *Trichoderma asperellum* T-1 by optimizing carbon concentration and C/N ratio, and its biocontrol efficacy against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*.** *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, v. 16, n. 6, p. 465-474, 2015.

MACHADO, A.F.L. et al. **Caracterização anatômica de folha, colmo e rizoma de *Digitaria insularis*.** *Planta Daninha*, v.26, n.1, p.1-8, 2008.

MARTINS, Irene et al. **Esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides* em meios líquidos.** *Summa Phytopathologica, Botucatu*, v. 33, n. 2, p. 203-208, 2007.

MASCARIN, G.M. et al. **Produção industrial de *Trichoderma*.** In: MEYER, M. C. et al (Org.). *Trichoderma: uso na agricultura*. Brasília, DF: Embrapa, 2019. Cap. 8, p. 256-274.

MORAES, C. **Produção massal e influência de fatores físicos no cultivo e viabilidade de *Bipolaris euphorbiae*.** 2009. x, 75 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

SANTOS-SEIXAS, C.D.; PEREIRA, J.M.; BARRETO, R.W. **Caldo de vegetais-ágar: um substituto adequado para o meio V8® - agar.** *Fitopatologia Brasileira*, 25: 419, 2000.

SOPER, R.S.; WARD, M.G. **Produção, formulação e aplicação de fungos para controle de insetos.** In: PAPAIVIZAS, C.G. (Ed.) *Biological Control in Crop Production*. New York: Allanheld & Osmun Publ., p.161-180, 1981.

VIEIRA, B.S.; BARRETO, R.W.; NECHET, K.L. **Controle biológico de plantas daninhas com fungos fitopatogênicos.** 2018.

VIEIRA, B. S.; BARRETO, R. W. **Liquid culture production of chlamydospores of *Lewia chlamidosporiformans* (Ascomycota: Pleosporales), a mycoherbicide candidate for wild poinsettia.** *Australasian Plant Pathology*, v. 39, p. 154-160, 2010.

VIRTUOSO, L. G. et al. **Providing inoculum for *Didymella bryoniae* studies: the effect of light spectrum and storing at low temperature.** *Brazilian Journal of Biology*, [S. l.], v. 81, n. 4, p. 1077–1083, 2021.