

Jaguariúna, SP / Setembro, 2024

OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

Produção de pré-inóculo de *Cercospora* aff. *canescens* para seu cultivo em fermentação líquida

Kátia de Lima Nechet⁽¹⁾, Alfredo José Barreto Luiz⁽¹⁾, Daniel Eiji Hinoue de Souza⁽²⁾ e
Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira⁽¹⁾

⁽¹⁾ Pesquisadores, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. ⁽²⁾ Estudante de mestrado da Escola Superior de
Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (Esalq-USP), Piracicaba, SP.

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP-340, Km 127,5,
Tanquinho Velho
13918-110 Jaguariúna, SP
www.embrapa.br/meio-ambiente
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Janaina Paula Marques Tanure

Secretário-executivo

Anderson Soares Pereira

Membros

Robson Rolland Monticelli Barizon,

Victor Paulo Marques Simão,

Alfredo José Barreto Luiz, Aline

Telles Biasoto Marques, Marcos

Eliseu Losekann, Maria Cristina

Tordin, Maria de Cléofas Faggion

Alencar, Priscila de Oliveira e

Sonia Claudia do Nascimento de

Queiroz

Edição executiva

Anderson Soares Pereira

Revisão de texto

Nilce Chaves Gattaz

Normalização bibliográfica

Maria de Cléofas Faggion Alencar

(CRB-8/1658)

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Silvana Cristina Teixeira

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

Resumo — O trabalho teve como objetivo padronizar uma metodologia de produção de pré-inóculo de *Cercospora* aff. *canescens* (CMAA 1444) capaz de promover regularidade no processo de produção de esporos do fungo em fermentação líquida. O isolado foi cultivado em meio Batata Dextrose Ágar e, após sete dias, dez discos de micélio foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL do meio de cultura líquido Czapek-Dox modificado. O Erlenmeyer foi mantido em agitador orbital a 150 rpm por sete dias a 25 °C sob luz contínua. Após este período, a biomassa foi filtrada e alíquotas de 5 mL da suspensão (pré-inóculo) foram transferidas para 36 Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio Czapek-Dox modificado. Os Erlenmeyers foram numerados e fixados em arranjo 6x6 de um agitador orbital a 150 rpm, luz contínua e 25 °C. O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e cada Erlenmeyer foi considerado como uma unidade experimental. Após 15 dias, a biomassa foi separada da fração líquida por filtragem e seca a 70 °C até a obtenção de massa constante. A quantificação de esporos por mililitro foi feita na fração líquida. Os dados foram submetidos à análise de variância e a testes de normalidade. Cada linha e coluna do equipamento foram consideradas como tratamentos na análise de variância. A posição do frasco em relação à fonte luminosa não teve efeito significativo na biomassa (1,08 a 1,17 g) e na concentração de inóculo (19 a 30 x10⁴ esporos por mililitro). Houve uma redução de 12 % no coeficiente de variação da concentração de inóculo de *C. aff. canescens* usando pré-inóculo obtido de cultivo em fermentação líquida.

Termos para indexação: *Ipomoea* spp., corda-de-viola, mico-herbicida, variabilidade inerente.

Pre-inoculum production of *Cercospora* aff. *canescens* under liquid fermentation

Abstract — The present work aims to standardize a methodology to produce seed culture of *Cercospora* aff. *canescens* (CMAA 1444) to provide a

regular production of spores of the fungus under liquid fermentation. The isolate was grown on Petri dishes with potato dextrose agar and, after seven days, ten mycelial disks were transferred to 500 mL Erlenmeyer flasks containing 300 mL of Czapek-Dox modified liquid media. The flasks were placed in an orbital shaker (150 rpm) at 25 °C, under continuous light for seven days, after that the biomass was separated from the liquid fraction by filtration. Aliquots containing 5 mL of the filtrate were used as pre-inoculum and transferred to 36 Erlenmeyers of 250 mL containing 50 mL of Czapek-Dox modified liquid media. The flasks were positioned in a 6x6 arrangement in an orbital shaker (150 rpm) at 25 °C, under continuous light. The assay was carried out in a completely randomized design and each flask was considered an experimental unit. After 15 days, the biomass was separated from liquid fraction, filtered, and dried at 70 °C until constant weight. The concentration of spores per milliliter was obtained from liquid fraction. Data were submitted to analysis of variance and normality tests. Each line and each column of the shaker were considered as treatments in the analysis of variance. The position of culture flasks in relation to the light source did not significantly affected the biomass (1,08 to 1,17 g) and inoculum concentration (19 to 30 x10⁴ spores per milliliter). There was a reduction of 12 % in the coefficient of variation of inoculum concentration of *C. aff. canescens* by using seed culture obtained from liquid fermentation.

Index terms: *Ipomoea* spp., morning glories, microherbicide, natural variability.

Introdução

O isolado de *Cercospora* aff. *canescens* CMAA 1444 foi selecionado como possível micro-herbicide a partir de levantamento da micobiota de cordas-de-viola (*Ipomoea* spp.) e de estudos de epidemiologia de doenças associadas (Nechet et al., 2019). As cordas-de-viola são 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). Por serem trepadeiras agressivas interferem, não apenas na capacidade produtiva da cultura, mas dificultam o corte mecanizado, e comprometem o rendimento das máquinas e qualidade do produto colhido. Além disso, a presença da palha diminui a eficácia tanto de herbicidas pré-emergentes como dos pós-emergentes (Pizzo et al., 2010; Silva; Monquero, 2013). Atualmente, estudos

vem sendo realizados com relação à otimização da produção de inóculo do isolado CMAA 1444 em fermentação líquida para viabilizar os estudos em casa de vegetação e em condições de campo e, consequentemente, um produto biológico para o controle de corda-de-viola (Barbosa et al., 2023).

Os ensaios de fermentação líquida na Embrapa Meio Ambiente são realizados em incubadoras do tipo *shaker* com espaço para 36 Erlenmeyers dispostos em arranjo 6X6 (45x45 cm) e com a posição das lâmpadas na porta da incubadora. A luz é um fator importante na produção de esporos de *C. aff. canescens*, portanto é essencial a uniformidade deste fator nos ensaios. Porém, um estudo conduzido por Souza et al. (2022) confirmou que, embora haja uniformidade da luz recebida por cada unidade experimental nestas condições de cultivo, obtém-se alto coeficiente de variação para o parâmetro número de esporos por mililitro (31,82%) nestas condições de experimento de laboratório quando comparado com o coeficiente de variação observado para o parâmetro massa micelial (2,39%). Como o esporo é considerado a estrutura infectiva mais importante para causar doença na corda-de-viola é importante reduzir esta variação para que o processo de fermentação tenha maior uniformidade entre as repetições experimentais.

Há uma variabilidade intrínseca na produção de esporos de *C. aff. canescens* e a minimização desta variabilidade é essencial para interpretações dos efeitos de 'tratamentos' em ensaios de otimização. Assim, é necessário estudar um ajuste na metodologia utilizada para a produção do pré-inóculo em fermentação líquida. No ensaio conduzido por Souza et al. (2022), a fonte de inóculo inicial transferida para os frascos de fermentação (pré-inóculo) foi obtida de cinco colônias cultivadas em placas de Petri diferentes. A variabilidade do crescimento micelial, mesmo em condições similares de cultivo, é amplamente conhecida na literatura para diversos gêneros de fungos (Groenewald et al., 2013; Damm et al., 2019). Portanto, uma das hipóteses é que este pode ter sido um fator que contribuiu para a alta variabilidade observada nos valores do número de esporos por mililitro.

Assim, realizou-se um segundo estudo baseado na hipótese de que há redução da variabilidade inerente do fungo quando se utiliza pré-inóculo obtido de cultivo em fermentação líquida com o objetivo de padronizar a metodologia de produção de pré-inóculo de *C. aff. canescens*.

Material e métodos

O isolado de *C. aff. canescens* CMAA 1444 (BRM 042514; GenBank MG652650.1) foi recuperado de armazenamento em Castellani, repicado, e colocado em 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, 10 discos de BDA (5 mm) da periferia da colônia fúngica crescida em uma única placa foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de meio líquido sintético Czapek-Dox modificado, pH 4: dextrose ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$) 4,5 g/L, nitrato de cálcio ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) 1g/L, sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 2,5 g/L, fosfato de potássio (K_2HPO_4) 0,25 g/L, cloreto de potássio (KCl) 0,25 g/L, e sulfato de ferro ($FeSO_4 \cdot H_2O$) 0,0364 g/L.

O Erlenmeyer foi mantido em agitação no agitador orbital do tipo *shaker* (150 rpm) por sete dias a 25 °C sob luz contínua (3 lâmpadas Branco Neutro de 10 w cada uma). Após este período, o Erlenmeyer foi transferido para o ultrassom por cinco minutos. Em seguida, em condições assépticas, a biomassa foi filtrada utilizando uma peneira de 20 mesh para separação da fração líquida. Cada 5 mL da fração líquida (pré-inóculo contendo 12.850 ufc/mL) foi transferida para 36 frascos de 250 mL com defletores contendo 50 mL de meio de cultura líquido Czapek-Dox modificado.

Após a inoculação os 36 frascos foram transferidos para o agitador orbital do tipo shaker, dispostos em 6 linhas e 6 colunas (Figura 1), a 150 rpm e luz contínua (3 lâmpadas Branco Neutro de 10 w cada uma) a 25 °C. Cada Erlenmeyer foi

numerado e sua posição foi fixada no equipamento utilizando o mesmo arranjo experimental do ensaio de Souza et al. (2022). O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, sendo cada Erlenmeyer considerado como uma unidade experimental.

Após 14 dias de crescimento foi feita a avaliação dos parâmetros biomassa e produção de inóculo. Os frascos foram transferidos para um ultrassom por 5 minutos. A biomassa foi separada da fração líquida com uso de uma peneira de 20 mesh, depositada em papel de filtro Whatman N° 1 e seca em estufa a 70 °C até a obtenção de massa constante. Após a secagem a massa micelial foi obtida por pesagem em balança analítica. 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) para contagem do número de esporos. Os esporos foram contados nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer e a média obtida foi multiplicada por 104 para a obtenção do número de esporos por mililitro.

Os dados de massa micelial (mg) e de esporos por mililitro foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa SAS (SAS Institute, 2013). O efeito da posição



31	32	33	34	35	36
25	26	27	28	29	30
19	20	21	22	23	24
13	14	15	16	17	18
7	8	9	10	11	12
1	2	3	4	5	6

Posição fonte luminosa

Foto: Kátia de Lima Nechet

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

Fonte: Souza et al. (2022).

do frasco nos parâmetros avaliados foi verificado considerando cada linha e cada coluna como tratamentos na análise de variância. Os dados coletados foram também submetidos ao teste de normalidade usando os testes estatísticos Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Cramer-von Mises e Anderson-Darling.

Resultados e discussão

Os valores de biomassa seca obtido nos frascos variaram de 1,08 a 1,17 g/50 mL e são apresentados de forma gráfica na Figura 2.

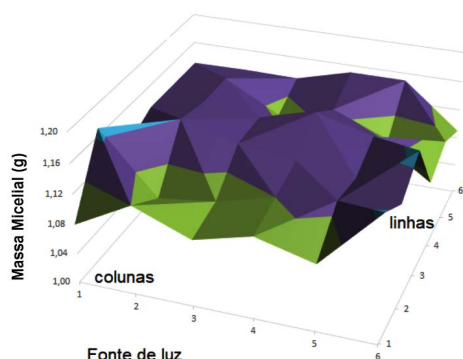


Figura 2. Representação gráfica dos valores obtidos de biomassa seca (g/50 ml) em função da posição do frasco (linhas e colunas) em relação à fonte luminosa.

Os valores de esporos por mililitro obtidos para cada posição de frasco variaram de 19×10^4 esporos por mililitro a 30×10^4 esporos por mililitro e são apresentados de forma gráfica na Figura 3.

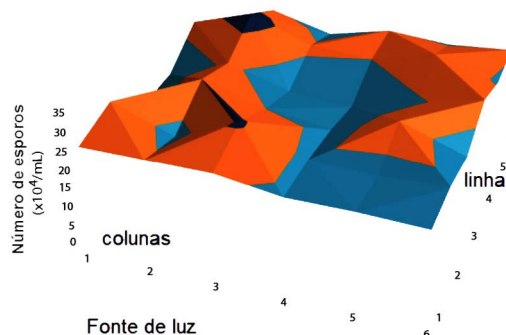
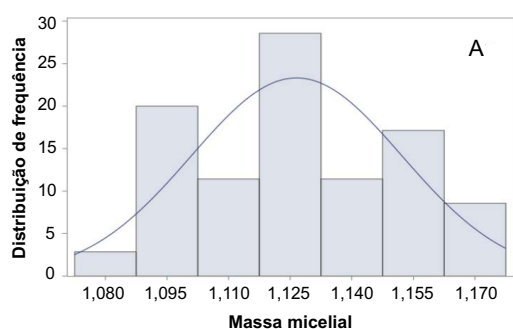


Figura 3. Representação gráfica dos valores obtidos de esporos por mililitro em função da posição do frasco (linhas e colunas) em relação à fonte luminosa.

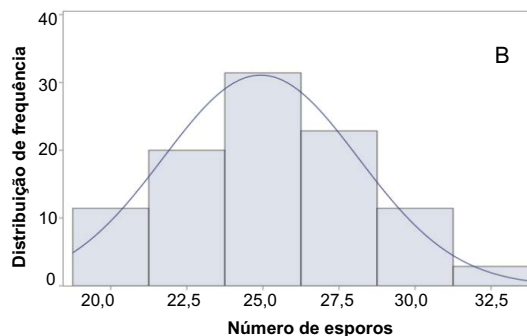
Segundo todos os testes de normalidade aplicados para ambas as variáveis, os valores de p foram maiores que 0,15 e a hipótese de normalidade não pode ser rejeitada (Tabela 1). Portanto, aceita-se que os dados seguem a distribuição normal. A distribuição da normalidade dos dados analisados é apresentada na Figura 4.

Tabela 1. Resultados dos testes de normalidade para as variáveis massa e esporos por mililitro de *Cercospora aff. canescens*.

Testes de normalidade	Massa micelial			Número de esporos		
	Medida	Prob	Valor p	Medida	Prob	Valor p
Shapiro-Wilk (W)	0,95429	<W	0,1534	0,97560	<W	0,6134
Kolmogorov-Smirnov (D)	0,12457	>D	>0,150	0,11161	>D	>0,150
Cramer-von-Mises (W-Sq)	0,06824	>W-Sq	>0,250	0,04238	>W-Sq	>0,250
Anderson-Darling (A-Sq)	0,47688	>A-Sq	>23,03	0,27426	>A-Sq	>0,250



Curva Normal ajustada — (média = 1,1266 desvio padrão = 0,0257)



Curva Normal ajustada — (média = 24,929 desvio padrão = 3,2076)

Figura 4. Distribuição de normalidade dos dados de massa micelial (A) e de número de esporos por mililitro (B) de *Cercospora aff. canescens*.

Segundo a análise de variância, o modelo que assumiu as linhas e colunas (representando a posição de cada frasco) como causas de variação, tanto no valor da massa micelial quanto de esporulação, não foi significativo. Portanto, a variabilidade encontrada não pode ser atribuída à posição ocupada pelo frasco dentro do equipamento, confirmando os resultados obtidos no ensaio anterior conduzido por Souza et al. (2022).

O coeficiente de variação (CV) observado para a variável esporo/mL (12,86%) ainda é bem maior que o da variável massa micelial (2,27%) (Tabela 2), porém, teve seu valor reduzido em relação ao experimento anterior, que foi de 31,82% (Souza et al., 2022), um patamar bem mais aceitável.

Portanto, ainda é importante ressaltar que, se os possíveis efeitos de tratamentos a serem testados não forem muito evidentes e resultarem em valores absolutos de diferença na produção de esporos por mililitro bastante elevados, os efeitos podem não ser considerados significativos. A variabilidade inerente da produção de esporos no experimento está na ordem de 12%, portanto, variações causadas por tratamentos terão de ser superiores a esse patamar para ser diferenciadas da simples variação do acaso.

A mudança de produção de pré-inóculo de *C. aff. canescens* a partir de filtrado de fermentação

líquida, e não diretamente a partir de colônia fúngica obtida de cultivo em meio sólido, como realizado no estudo anterior de Souza et al. (2022), reduziu o coeficiente de variação do parâmetro produção de esporos por mililitro, principal parâmetro de avaliação nos ensaios de otimização de produção de inóculo do fungo.

A partir destes resultados, definiu-se o protocolo de produção de pré-inóculo de *C. aff. canescens* para delineamento dos ensaios de fermentação líquida (Figura 5).

A fermentação líquida tem sido cada vez mais utilizada para a produção massal de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, selecionados como agentes de controle biológico para os mais diversos alvos, como plantas daninhas, insetos-praga e fitopatógenos (Vieira et al., 2018; Rezende et al., 2020; Gotti et al., 2023). O gênero *Cercospora* tem como característica seu crescimento lento e escassez de esporulação em meio artificial (Groenewald et al., 2013) e as mais variadas condições de cultivo são encontradas na literatura visando otimizar a produção de conídios do fungo (Silva et al., 1988; Uppala et al., 2019). Embora a maioria dos trabalhos use o cultivo em meio sólido para a produção de conídios de *Cercospora*, alguns estudos demonstraram a produção de conídios em fermentação líquida utilizando diferentes meios de

Tabela 2. Coeficiente de variação observado para os dados de massa micelial e de número de esporos por mililitro de *Cercospora* aff. *canescens*.

Variável	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Coeficiente de variação
Número de esporos	35	24,929	3,2076	0,5422	12,8673
Massa micelial	35	1,127	0,0256	0,0043	2,2778

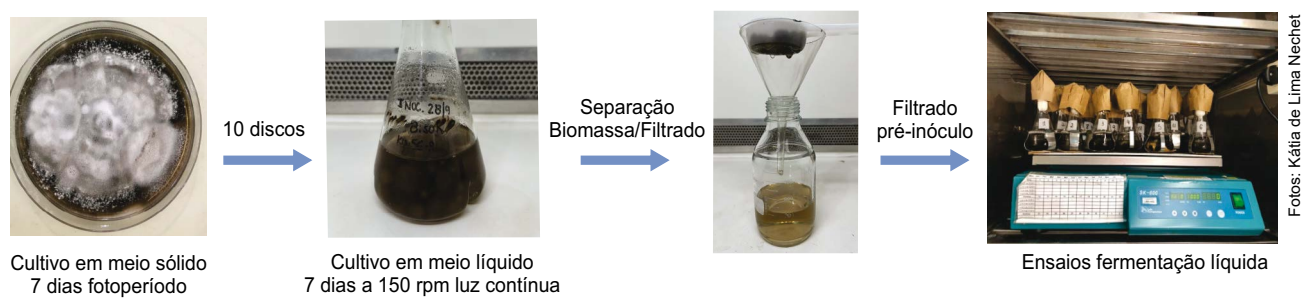


Figura 5. Etapas de produção de pré-inóculo de *Cercospora* aff. *canescens* para cultivo em fermentação líquida.

cultura (Ávila e Pitelli, 2004; Da Costa et al., 2020). Entretanto, os meios de cultura utilizados não são quimicamente definidos, o que dificulta verificar o efeito das variações nos componentes na produção de conídios. No trabalho apresentado utilizou-se um meio quimicamente definido que permitirá selecionar parâmetros quantitativos para obtenção de maior produção de inóculo.

Os fatores de crescimento e condições de cultivo determinados nesta fase de produção em pequena escala em Erlenmeyers serão a base para a realização de ensaios em escalas maiores em biorreatores (Ganeshan et al., 2021). Portanto, a padronização da produção de pré-inóculo estabelecida neste ensaio é importante para reduzir a variabilidade inerente à produção massal de inóculo de *C. aff. canescens* e determinar os parâmetros de otimização de produção de inóculo em fermentação líquida, considerando as condições experimentais dos ensaios em incubadora do tipo shaker com iluminação.

Conclusões

Este estudo demonstrou a redução da variabilidade inerente da produção de esporos por mililitro de *Cercospora aff. canescens* a partir da mudança na produção de pré-inóculo. A metodologia de produção de pré-inóculo envolve a utilização do filtrado obtido do cultivo de *C. aff. canescens* em meio líquido em agitação a 150 rpm e sob luz contínua por 7 dias. Os resultados confirmaram ainda que a condição experimental da incubadora é uniforme em relação à intensidade luminosa, permitindo o uso de todas as 36 posições de frascos nos ensaios de otimização.

Agradecimentos

À Embrapa pelo apoio financeiro (projeto nº 10.19.02.002.00.00). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de produtividade em pesquisa de B. A. Halfeld-Vieira (309014/2021-2) e K. L. Nechet (305187/2022-8).

Referências

ÁVILA, Z. R.; PITELLI, R. A. Crescimento, esporulação e virulência do inóculo de *Cercospora piaropi*, agente de biocontrole do aguapé. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p.189-192, 2004.

BARBOSA, A. J. D. dos R.; LUIZ, A. J. B.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. **Efeito da relação carbono e nitrogênio na produção de inóculo de *Cercospora aff. canescens* em fermentação líquida**. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., 2023, Campinas. Anais [...]. Campinas: Embrapa Territorial, 2023. CIIC 2023. Nº 23402. 12 p.

DA COSTA, G. A.; FREITAS-LOPES, R. L.; LINO, J. B.; JULIÃO, E. C.; MICHEREFF, S. J.; LOPES, U. P. An efficient method for inducing sporulation of cercosporoid fungal species causing leaf spots in cassava. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 201-204, 2020.

DAMM, U.; SATO, T.; ALIZADEH, A.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Mycology**, v. 92, p. 1-46, 2019.

GANESHAN, S.; KIM, S. H.; VUJANOVIC, V. Scaling-up production of plant endophytes in bioreactors: concepts, challenges and perspectives. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, p. 1-16, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00417-y>

GOTTI, I. A.; MOREIRA, C. C.; DELALIBERA Jr., I.; De FINE LICHT, H. H. Blastospores from *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium rileyi* are not Always as virulent as conidia are towards *Spodoptera frugiperda* caterpillars and use different infection mechanisms. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, article 1594, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061594>

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 Mycology**, v. 75, n. 1, 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, p. 185-195, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10526-018-09918-w>

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.

REZENDE, L. C.; CARVALHO, A. L. A.; COSTA, L. B.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; SILVA, L. G.; PINTO, Z. V.; MORANDI, M. A. B.; MEDEIROS, F. H. V. de; MASCARIN, G. M.; BETTIOL, W. Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid

fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 8, article 113, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02882-7>

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

SILVA, M. F.; CAVALCANTI, M. A.; POROCA, D. M.; LIMA, D. M. Cultivo e esporulação de *Cercospora caribaea* e *C. henningsii*, agentes causais de manchas foliares em mandioca. **Fitopatologia Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 54-58, 1988.

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.

SOUZA, D. E. H. de; DIAS, G. M. de L.; LUIZ, A. J. B.; HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. **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.

UPPALA, S. S.; ZHOU, X. G.; LIU, B.; WU, M. Plant-Based Culture Media for Improved Growth and Sporulation of *Cercospora janseana*. **Plant disease**, v. 103, p. 504-508, 2019. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-18-0814-re>

VIEIRA, B. S., DIAS, L.V. S. A., LANGONI, V. D.; LOPES, E. A. Liquid fermentation of *Colletotrichum truncatum* UFU 280, a potential mycoherbicide for beggartick. **Australasian Plant Pathology**, v. 47, p. 277-283, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0555-y>

LUZUE, D. F.; DEGANAE, W. Quisque purus lacus, mattis ac metus sit amet rhoncus porttitor du. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 9, p. 539-552, 2020.

DAGVE, X. V.; SHOBUE, C. B.; KUIRKEIXA, S. R.; POAURBOR, H. Aliquam pulvinar, libero a pulvinar commodo, leo ante sollicitudin turpis, at scelerisque nibh elit efficitur tortor. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 2, p.78-92, 2018.

MUBEIENR, W. N.; LERIN, J. G. K.; GROMN, J. K. Donec porttitor dui sit amet leo consectetur porttitor lectus dignissim. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 7, p. 99-109, 2021.

WABRARAL, N. A.; WEOL, A. N.; URZHOCU, C. A. P. Vestibulum ante ipsum primis in faucibus orci luctus et ultrices posuere cubilia curae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 8, p. 118-128, 2020.

WHURGEARO, K. A.; BUGAMA, D.; ANGEAORIC, E. O. Nunc ultricies enim quis magna ultrices porttitor. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 538-546, 2019.