

RESSALVA

Alertamos para ausência do item
“Conclusões” e das “Referências”, não
incluídos pela autora no arquivo original.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Ceratocystis* sp., AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA CLONAL DE EUCALIPTO E SENSIBILIDADE DESTE FUNGO A DIFERENTES FUNGICIDAS.

ANA CAROLINA FIRMINO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU
JUNHO – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Ceratocystis* sp., AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA CLONAL DE EUCALIPTO E SENSIBILIDADE DESTE FUNGO A DIFERENTES FUNGICIDAS.

ANA CAROLINA FIRMINO

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU
JUNHO – 2011

FORMA BIBLIOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CENEP - FEA - LACERDA - BOTUCATU (SP)

Firmão, Ana Carolina, 1982-
TÍTUL: Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp.,
avaliação de resistência clonal de eucalipto e
sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas / Ana
Carolina Firmão. - Botucatu : [s.n.], 2011
v. 102 f. : il. color., gráf., tabs., foto. color.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011
Orientador: Edson Luis Portado
Inclui bibliografia
1. Atenuia. 2. Cacaú. 3. *Ceratocystis*. 4. Eucalipto.
5. Munga (Fruta). 6. Teca (Árvore). I. Portado, Edson
Luis. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de
Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Ceratocystis* sp., AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA CLONAL DE EUCALIPTO E SENSIBILIDADE DESTES FUNGOS A DIFERENTES FUNGICIDAS"

ALUNA: ANA CAROLINA FIRMINO

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado pela Comissão Examinadora



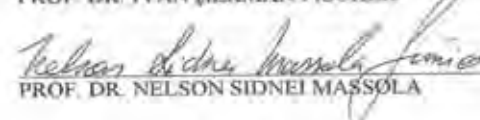
PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



PROFA. DRA. JULIANA CRISTINA SOBRÃO CRUZ



PROF. DR. IVAN HERMAN FISCHER



PROF. DR. NELSON SIDNEI MASSOLA



PROFA. DRA. ADRIANA ZANIN KRONKA

Data da Realização: 18 de julho 2011

Dedico

À Deus e a todos os seres de luz pela ajuda nos momentos mais difíceis e pela companhia no decorrer de cada dia.

A Ana Elizabeth...Minha querida mãe...A mulher mais linda do mundo, em todos os aspectos... mulher forte e fibra, com um coração maravilhoso, que se orgulha de mim pelo o que sou e não pelo que tenho.

A minha Vó Lourdes, minha segunda mãe.....pela dedicação a minha pessoa e ao amor que sempre sentiu por mim.

Ao meu companheiro Hugo, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me ajudando em todos os acontecimentos da minha vida.

“Deus colocou na natureza as quedas d’água, para que o homem pudesse observar quanta energia ele pode tirar de suas próprias quedas”.

Emmanuel

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus avós, Odete e Honório (in memoriam), que em um pequeno gesto realizado a cerca de 10 anos atrás, me ajudaram a estar aqui escrevendo esta tese.

Ao Prof. Dr. Edson L. Furtado, que com calma e paciência me aceitou como orientada, mostrou que acreditava em mim como profissional e como pessoa, em um momento que significava um recomeço de muitas coisas na minha vida.

A todos os professores na FCA/UNESP e da USP/ESALQ pelo conhecimento passado. Principalmente ao Prof. Dr. Jorge A. M. Resende, que como meu orientador no mestrado, me passou conceitos e lições que sempre vou usar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

As empresas Suzano, Compacel, Duratex e V&M por cederem material para desenvolvimento deste trabalho.

A Izabel Christina Gava de Souza e a Bianca Vique pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos técnicos Jansen Barrozo Fernandes da Empresa Compacel, Fernando Marcio da Silva e Edson Diniz da Fonseca da Empresa Suzano, por me acompanharem nas coletas de material realizadas nas áreas destas empresas.

Ao professor Elliot Kitajima e Francisco André Ossamu Tanaka por permitirem que eu utilizasse a estrutura do Centro de Microscopia Eletrônica da ESALQ e ao técnico Renato por me ensinar a utilizar os equipamentos.

A pesquisadora da Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira, Dra. Stela Dalva Vieira M. Silva. E a Dra. Margarida Fumiko Ito, do Instituto Agrônomo de Campinas, por cederem os isolados de *Ceratocystis* de cacau e manga, respectivamente.

A todos os funcionários do Departamento de Produção Vegetal/Defesa Fitossanitária
Aos meus colegas de laboratório.

Aos meus amigos mais próximos, que me reservo no direito de não citar, visto que eles sabem quem são, já que estão sempre ao meu lado.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. OBJETIVOS.....	7
4.1. Gerais.....	7
4. 2. Específicos.....	7
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
5.1. Importância da doença.....	9
5.2. O gênero <i>Ceratocystis</i>	12
5.3. Disseminação e transmissão de <i>Ceratocystis</i>	17
5. 4. Medidas gerais de controle de <i>Ceratocystis</i>	20
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
6. 1. Coleta de material e isolamento de <i>Ceratocystis</i> sp.....	24
6 .2. Caracterização patogênica dos isolados obtidos.....	25
6. 3. Acompanhamento da colonização do xilema de eucalipto por <i>Ceratocystis</i> sp.	27
6. 4. Caracterização cultural dos isolados obtidos.....	29
6. 5. Caracterização morfológica dos isolados obtidos.....	30
6.6. Caracterização enzimática.....	30
6.6.1 Atividade da enzima amilase.....	31
6.6.2 Atividade da enzima celulase.....	31
6.6.3 Atividade da enzima lipase.....	32
6.6.4 Atividade da enzima protease.....	32
6.6.5 Atividade da enzima lacase.....	32
6.6.6 Atividade da enzima pectato-liase.....	33
6.6.7 Atividade da enzima lignina peroxidase.....	33
6. 7. Caracterização molecular dos isolados obtidos.....	34

6.8. Avaliação de resistência de genótipos e clones de eucalipto inoculados com <i>Ceratocystis</i>	35
6. 9. Sensibilidade de isolados de <i>Ceratocystis</i> sp. a diferentes fungicidas.....	36
6.9.1 Sensibilidade “in vitro”.....	36
6.9.2 Sensibilidade “in vivo”.....	37
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
7. 1. Isolados Obtidos.....	38
7. 2. Caracterização patogênica dos isolados obtidos.....	41
7.3 Acompanhamento da colonização do xilema de eucalipto por <i>Ceratocystis</i> sp.....	49
7.4. Caracterização morfológica dos isolados obtidos.....	58
7.5 Caracterização cultural dos isolados obtidos.....	67
7 .6. Caracterização enzimática.....	70
7. 7 Caracterização molecular dos isolados obtidos.....	73
7. 8. Avaliação de resistência de genótipos e clones de eucalipto inoculados com <i>Ceratocystis</i>	80
7. 9. Sensibilidade de isolados de <i>Ceratocystis</i> sp. a diferentes fungicidas.....	84
7.9.1 Sensibilidade “in vitro”.....	84
7.9.2 Sensibilidade “in vivo”.....	87
8. CONCLUSÕES.....	91
9. REFERÊNCIAS.....	93

1. RESUMO

O gênero *Ceratocystis* engloba diversas espécies amplamente distribuídas pelo mundo. No Brasil ocorrem relatos da existência de três espécies: *Ceratocystis cacaofunesta*, *C. paradoxa* e *C. fimbriata*, sendo esta última a de maior relevância e causadora de doenças em muitas plantas lenhosas e em algumas herbáceas de grande importância econômica. Diante desta situação e da alta incidência deste patógeno na cultura do eucalipto, o presente trabalho teve como objetivos: (i) caracterizar aspectos patogênicos, culturais, morfológicos, enzimáticos e genéticos de isolados de *Ceratocystis* sp. coletados de diferentes hospedeiros; (ii) estudar a reação de diferentes genótipos de eucalipto à inoculação de isolados de *Ceratocystis* sp., com objetivo de se encontrar uma fonte de resistência à murcha-de-ceratocistis; (iii) verificar a sensibilidade a diferentes fungicidas “in vitro” e “in vivo” deste fungo. Nos testes de patogenicidade todos os isolados de *Ceratocystis* trabalhados foram patogênicos aos seus hospedeiros originais. Foi observada ainda a ocorrência de patogenicidade cruzada. Esta patogenicidade foi comprovada por meio de análises realizadas em microscópio eletrônico de varredura, onde foi constatado que o isolado de eucalipto, cacau, manga, teca e atemóia foram

capazes de colonizar, se desenvolver e se reproduzir nos vasos de xilema de plantas de eucalipto. Nos experimentos de caracterização morfológica, os isolados foram agrupados segundo comprimento médio do rostro do peritécio, podendo esta característica ser usada como ferramenta para diferenciar isolados de *Ceratocystis* de cacau dos outros isolados de eucalipto, manga, teca e atemóia. Ainda nestes experimentos, foi notada a produção de conídios doliformes em alguns isolados de eucalipto. A diferenciação dos isolados de *Ceratocystis* de cacau dos outros isolados estudados também foi verificada pela velocidade de crescimento. Foram detectadas a produção de amilase, lacase, lignina peroxidase e protease em quase todos os isolados testados. A produção das enzimas protease e lignina peroxidase foram altamente variáveis entre os isolados testados. As amostras de *Ceratocystis* coletadas de cacau mostraram produção intensa da enzima lacase, quando comparadas aos resultados obtidos dos outros isolados testados. Não foram observadas produção de celulase, lipase e pectato-liase dos isolados. Com base nas seqüências de DNA obtidas da região ITS-5.8S rDNA dos isolados de *Ceratocystis* estudados, foi possível concluir que os isolados de eucalipto, atemóia e de teca pertencem a espécie *C. fimbriata*, e que os isolados de cacau foram identificados como *C. cacaofunesta*. Nas análises de filogenia, os isolados foram agrupados segundo a região de coleta e alguns isolados de eucalipto mostraram alta similaridade com isolados de manga. Em relação aos testes de resistência de eucalipto a *Ceratocystis*, dos 20 materiais de eucalipto testados, somente 5 mostraram resistência a todos isolados de *C. fimbriata* testados. Nos testes realizados “in vitro” e “in vivo”, os isolados de *Ceratocystis* mostraram-se mais sensíveis ao fungicida à base de tiofanato-metílico.

Palavras-chave: *Ceratocystis*, eucalipto, cacau, manga, teca, atemóia.

CHARACTERIZATION OF *Ceratocystis* sp ISOLATES, RESISTENCE EVALUATION OF EUCALYPTUS CLONES AND SENSITIVITY OF THIS FUNGUS TO DIFFERENT FUNGICIDES. Botucatu, 2011. 105 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ANA CAROLINA FIRMINO

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

2. SUMMARY

The genus *Ceratocystis* includes several species widely distributed all over the world. In Brazil, there are reports of three species: *Ceratocystis cacaofunesta*, *C. paradoxa* and *C. fimbriata*, the latter being most relevant and causer of diseases in a large number of woody plants and in some herbaceous plants of great economic importance. Based on this situation and on the high incidence of this pathogen in eucalyptus culture, this study aimed to: (i) characterize pathogenic, cultural, morphological, enzymatic and genetic aspects of *Ceratocystis* sp. isolates collected from different hosts; (ii) study the reaction of different eucalyptus genotypes to the inoculation of *Ceratocystis* sp. isolates, in order to find a source of resistance to ceratocystis wilt; (iii) verify the sensitivity of this fungus to different fungicides “in vitro” and “in vivo”. In the pathogenicity tests, all studied *Ceratocystis* isolates were pathogenic to their original hosts. Cross pathogenicity was also observed. This pathogenicity was proved by means of analyses under scanning electron microscope, which indicated that eucalyptus, cacao, mango, teak and atemoya isolates were able to colonize, grow and reproduce in the xylem of eucalyptus plants. In the experiments for morphological characterization, the isolates were grouped according to the mean length of the rostrum of the perithecium, and this trait may be used as a tool to differentiate *Ceratocystis* and cacao isolates from other eucalyptus, mango, teak and atemoya isolates. In these same experiments, the production of doliform conidia was noted in some eucalyptus isolates. The differentiation of *Ceratocystis* and cacao isolates from the other studied isolates was also possible based on the growth rate. Production of amylase, laccase, lignin peroxidase and protease was detected in

almost all tested isolates. The production of the enzymes protease and lignin peroxidase was highly variable among the tested isolates. *Ceratocystis* samples collected from cacao showed intense production of the enzyme laccase, compared to the results obtained for the other tested isolates. Production of cellulase, lipase and pectate-lyase by the isolates was not observed. The DNA sequences obtained from the ITS-5.8S rDNA region of the studied *Ceratocystis* isolates led to the conclusion that the eucalyptus, atemoya and teak isolates belong to the species *C. fimbriata*, while cacao isolates were identified as *C. cacaofunesta*. In the phylogenetic analyses, the isolates were grouped according to the collection site and some eucalyptus isolates showed high similarity to mango isolates. As to the tests of eucalyptus resistance to *Ceratocystis*, of the 20 tested eucalyptus materials, only 5 showed resistance to all tested *C. fimbriata* isolates. In the tests carried out “in vitro” and “in vivo”, *Ceratocystis* isolates were more sensitive to thiophanate-methyl fungicide.

Keywords: *Ceratocystis*, eucalyptus, cacao, mango, teak, atemoya.

3. INTRODUÇÃO

O gênero *Ceratocystis* contempla diversas espécies fungicas distribuídas em vários lugares do mundo. No Brasil há relatos de poucas espécies pertencentes a este gênero de fungo, dentre elas *C. cacaofunesta*, *C. paradoxa* e o mais importante *C. fimbriata*.

Ceratocystis fimbriata é causador de doenças em muitas espécies de plantas lenhosas e em algumas herbáceas de importância econômica como, por exemplo, acácia negra (*Acacia mearnsii*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), cacau (*Theobroma cacao*), café (*Coffea arabica*), citrus (*Citrus* spp.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), figo (*Ficus carica*), gmelina (*Gmelina arborea*), manga (*Mangifera indica*) e seringueira (*Hevea brasiliensis*).

Em plantas lenhosas, *C. fimbriata* é um típico patógeno de xilema (BAKER; HARRINGTON, 2004), cujo sintoma característico é constatável nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras (FERREIRA; MILANI, 2002), do tipo cunha, em geral da periferia para a medula.

Normalmente uma planta infectada com este patógeno tem como

primeiros sintomas a perda de coloração verde-escura da folhagem, seguida de murcha das folhas e conseqüentemente seca da planta. Existem dois tipos de seca no campo: um inicia-se pelos ramos finos da copa e progride em direção ao tronco, matando a árvore lentamente. Outro tipo inicia-se pelas raízes e a planta morre repentinamente, muitas vezes sem mostrar qualquer sintoma. O fungo só penetra na parte aérea da planta através de ferimentos, condição esta não necessária quando a infecção começa pelas raízes (RIBEIRO, 1997).

Culturas de *C. fimbriata* exalam odor de fruta madura. Estas substâncias voláteis têm importante papel na epidemiologia da doença, pois atraem o inseto vetor. O fungo é incapaz de penetrar diretamente através da epiderme do ramo sadio que oferece uma forte barreira mecânica, necessitando de vetor ou ferimentos. Uma vez no interior da planta, seu desenvolvimento inicial dá-se na região do câmbio, entre a casca e o lenho. Com o tempo, avança para o interior do cerne da planta (ROSSETO et al., 1980)

Nas áreas de ocorrência da doença recomenda-se o corte e queima dos galhos das copas infectadas, salientando-se que este controle só terá sucesso quando o sistema radicular da planta estiver sadio. O uso de porta-enxertos resistentes é um método de controle usado em mangueira, porém no caso de eucalipto ainda não há relatos de fontes consistentes de resistência a este fungo. Em plantas de cacau já há indícios de plantas resistentes.

Diante deste problema e da importância que este patógeno vem tomando dentro da cultura do eucalipto, o presente trabalho teve como objetivos: (i) caracterizar aspectos patogênicos, culturais, morfológicos, enzimáticos e genéticos de isolados deste fungo coletados de diferentes hospedeiros; (ii) estudar a reação de diferentes genótipos de eucalipto à inoculação de isolados de *Ceratocystis* sp., com objetivo de se encontrar uma fonte de resistência à murcha-de-ceratocysits; (iii) verificar a sensibilidade a diferentes fungicidas “in vitro” e “in vivo” deste fungo.

4. OBJETIVOS

4.1. Gerais

- a. Identificar e caracterizar os isolados de *Ceratocystis* coletados;
- b. Verificar a reação de diferentes genótipos de eucalipto quando inoculados com *Ceratocystis* sp.;
- c. Verificar a sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas “in vitro” e “in vivo”.

4. 2. Específicos

- a. Realizar estudos de caracterização patogênica, morfológica, cultural, enzimática dos isolados de *Ceratocystis* sp. obtidos de eucalipto, teca, cacau, manga e atemoia.
- b. Acompanhar do crescimento de isolados de a colonização dos vasos de xilema de eucalipto por *Ceratocystis* sp. por meio de técnicas de microscopia eletrônica de varredura.

- c. Estudar a variabilidade genética deste fungo com base no sequenciamento da região ITS-5.8S rDNA.
- d. Com base nas reações dos clones inoculados identificar uma possível fonte de resistência a este patógeno;
- e. Verificar a sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas para uso de uma ferramenta extra na proteção de plantas de eucalipto.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 Importância da doença

O gênero *Ceratocystis* contempla diversas espécies distribuídas em vários lugares do mundo, como *Ceratocystis adiposa*, *C. albifundus*, *C. bhutanensis*, *C. cacaofunesta*, *C. caryae*, *C. coerulescens*, *C. douglasii*, *C. eucalypti*, *C. fagacearum*, *C. fimbriata*, *C. platani*, *C. fimbriatomima*, *C. fujiensis*, *C. laricicola*, *C. major*, *C. moniliformis*, *C. moniliformopsis*, *C. omanensis*, *C. paradoxa*, *C. pinicola*, *C. pirilliformis*, *C. polonica*, *C. polychroma*, *C. populicola*, *C. radicola*, *C. resinifera*, *C. rufipenni*, *C. savannae*, *C. smalleyi*, *C. tribiliformis*, *C. tsitsikammensis*, *C. variospora* e *C. virescens*.

No Brasil, ocorrem relatos da existência de três espécies: *C. paradoxa*, atacando principalmente monocotiledôneas, *C. cacaofunesta* acarretando grandes problemas em plantações de cacau (*Theobroma cacao*) (BEZERRA, 1997), e *C. fimbriata*, causadora de doença em muitas plantas lenhosas e em algumas herbáceas de grande importância econômica como manga (*Mangifera indica*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (FERREIRA et al., 1999).

Ainda pode-se citar a ocorrência deste fungo em acácia negra (*Acacia mearnsii*) (RIBEIRO et al., 1988; SANTOS; FERREIRA, 2003), batata doce (*Ipomoea batatas*) (BARNES et al., 2001), café (*Coffea arabica*) (MARIN et al., 2003), citrus (*Citrus* spp.) (BORJA et al., 1995), figo (*Ficus carica*) (VALARINI; TOKESHI, 1980), gmelina (*Gmelina arborea*) (RIBEIRO, 1982) e seringueira (*Hevea brasiliensis*) (SILVEIRA et al., 1994). Recentemente foram realizados relatos em teca (*Tectona grandis*) (FIRMINO et al., 2010a) e atemóia (híbrido de *Annona cherimola* com *A. squamosa*) (FIRMINO et al., 2010b).

No Brasil até meados de 1990, *C. fimbriata* era considerado problema somente em plantações de manga (*Mangifera indica*). Diversas regiões produtoras sofreram prejuízos vultosos em consequência da morte de milhares de plantas em pomares comerciais. No município de João Pessoa, no Estado da Paraíba, a seca-da-mangueira foi responsável pela morte de mais de 800 plantas entre 2001 e 2005 (BATISTA et al., 2008). Variedades de manga do tipo coquinho, Bourbon e Haden são altamente suscetíveis a este fungo, sendo impraticável seu plantio em áreas de ocorrência desta doença (RIBEIRO et al., 1984; ROSSETO, et al., 1996). Deste modo, o plantio destas variedades foi reduzido e quase não são mais encontradas no mercado.

A murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto, causada por *C. fimbriata*, foi constatada primeiramente no sudeste da Bahia em 1997 (FERREIRA et al., 1999). Atualmente, já foram registradas ocorrências no Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e, recentemente, Maranhão e Pará (ALFENAS et al., 2009; FERREIRA, 2009). Estudos sobre perdas no campo ocasionados pelo fungo *C. fimbriata*, no sul da Bahia, mostraram uma redução de 58% no incremento volumétrico de clones híbridos de eucalipto (*E. grandis* x *E. urophylla*) e de 13,7% no rendimento depurado de celulose (FERREIRA et al., 2007). Essa doença vem causando sérias preocupações, uma vez que nos primeiros meses de observação da doença as perdas não excediam a 20-25% mas que com o passar do tempo alguns talhões monoclonais já apresentavam mortalidade de plantas superior a 40%. Como agravante, a doença começou a ser constatada em hastes de brotações em banco clonal destinadas ao enraizamento de estacas e em mudas já enraizadas na fase de aclimação, no viveiro, a céu aberto. Essas últimas constatações significaram haver considerável risco de se introduzir a doença em áreas ainda sem o patógeno, via mudas propagadas vegetativamente (FERREIRA et al., 2006). Três espécies de *Ceratocystis*, diferentes de *C. fimbriata*, já foram

relatadas em eucalipto: *C. eucalypti* (KILE et al., 1996), *C. moniliformopsis* (YUAN; MOHAMMED, 2002) e *C. pirilliformis* (BARNES et al., 2003), todos ocorrendo na Austrália.

Em cacau, a murcha-de-*Ceratocystis* tem causado danos econômicos na cacauicultura do Brasil desde 1978 (BASTOS; EVANS, 1978; SANCHES, 2006) e em países vizinhos. No Equador, onde foi descrita pela primeira vez em 1918 (ENRIQUEZ; SORIA, 1984; DELGADO; SUÁREZ, 2003; SANCHES, 2006) causou a morte de um grande número de árvores de cacau na década de cinquenta, incluindo genótipos do chamado ‘complexo nacional do Equador’, um cacau fino de alto valor para este país. Na Venezuela, foi identificada pela primeira vez em 1951 ainda registrando-se neste país, a morte de 20 a 50% das árvores de cacau (GOITÍA; ROSALES 2001; SANCHES, 2006). Na Colômbia, causou grandes estragos, atacando 50% das plantações de cacau do município de Sofía e no Valle Del Cauca, não existem plantações sadias (GUERRERO, 1975, SANCHES, 2006). Esta doença também foi registrada causando problemas no México, em Porto Rico, na Guiana, Peru, República Dominicana e Guatemala (BAKER; HARRINGTON, 2004; SANCHES, 2006). Na região cacaueira do Estado da Bahia a enfermidade já se encontra amplamente disseminada e as mortes já somam o equivalente a 24% das plantas, principalmente aquelas derivadas do clone ICS-1, como a variedade Theobahia (SILVA; LUZ, 2000; RAM et al., 2004; SANCHES, 2006), que são utilizadas como fonte de resistência a vassoura-de-bruxa.

Ceratocystis é um típico patógeno de xilema, cujo sintoma mais característico é constatável nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras ou uma descoloração do tipo cunha, que seguem da medula para o exterior do lenho, (FERREIRA; MILANI, 2002; FERREIRA et al., 2006)

Normalmente, uma planta infectada com este fungo, apresenta como primeiros sintomas a perda de coloração verde-escura da folhagem, seguida de murcha das folhas e conseqüente seca e morte da planta. Um estresse hídrico em plantas doentes pode ocorrer como resultado do crescimento de hifas do patógeno e/ou produção de esporo, nestes casos a presença dessas estruturas no interior dos vasos acaba por obstruir as perfurações existentes nos elementos traqueais (PASCHOLATI et al, 2008). Este estresse também pode ser atribuído ao incremento da viscosidade da seiva, decorrente da ação enzimática sobre os componentes dos tecidos do xilema, como exemplo tem-se os glicopeptídeos produzidos por *C. ulmi* (ISAAC, 1992 apud PASCHOLATI et al, 2008).

A reação da planta hospedeira à invasão do fungo também pode gerar sintomas reflexos de murcha e seca. Isso ocorre devido a mecanismos de defesa que bloqueiam segmentos dos próprios vasos do xilema. Um desses mecanismos é formação de tiloses, que são uma extensão do protoplasma das células do parênquima para o interior dos vasos do xilema. Um exemplo disso são as tiloses detectadas nos vasos de *Ulmus* atacados por *C. ulmi* (MACDONALDS; MACNABB, 1974). Tumura (2011), ao realizar cortes semi-finos dos vasos de plantas de eucaliptos sadios e infectados com *Ceratocystis*, notou a presença de tiloses somente nas plantas infectadas.

Culturas de *C. fimbriata* e tecidos atacados por este fungo exalam odor de fruta madura. Estas substâncias voláteis têm importante papel na epidemiologia da doença, pois atraem o inseto vetor. O fungo é incapaz de penetrar diretamente através da epiderme do ramo sadio que oferece uma forte barreira mecânica, necessitando de vetor ou ferimentos. Uma vez no interior da planta, seu desenvolvimento inicial dá-se na região do câmbio. O caráter típico da seca da mangueira vem a ser o colapso dos tecidos parenquimatosos, não sendo, portanto, do tipo vascular. O fungo pode penetrar diretamente pelas raízes, aparentemente sem necessidade de qualquer ferimento ou vetor (ROSSETO et al., 1980).

5.2.O gênero *Ceratocystis*

A distribuição geográfica e diversidade genética de fungos pertencentes ao gênero *Ceratocystis* é muito grande, embora a maioria desta diversidade seja encontrada nas Américas (HARRINGTON, 2000; BARNES, et al., 2001; BAKER et al., 2003; BAKER; HARRINGTON, 2004; STEIMEL, et al., 2004). Segundo Webster e Butler (1967) agrupar as espécies encontradas neste gênero é muito difícil visto que a grande similaridade morfológica e a ocorrência de interfertilidade dificulta a distinção da maioria das espécies. Porém, com base nas seqüências de DNA obtidas da região ITS-5.8S rDNA do DNA ribossômico nuclear e de outras análises genéticas está sendo provado que as espécies deste gênero podem ser agrupadas em vários subgrupos ou clados (HARRINGTON, 2000; BAKER; HARRINGTON, 2004).

Segundo Harrington et al (2011), podem se encontrar quatro clados distintos: o da América Latina, o da América do Norte, o da Ásia e o da África. Dentro do

clado da América Latina, Baker et al (2003) estudaram diferentes isolados de cacau, *Herrania* sp., batata-doce, *Platanus* sp., café, manga, *Annona* sp., eucalipto e *Gmelina* sp. e verificaram, com base nas análises de seqüências da região ITS, que todos os isolados de *Platanus* sp., cacau e batata-doce formaram linhagens fortemente suportadas pela similaridade das seqüências (FERREIRA, 2009). Deste modo foi demonstrada especialização em nível de hospedeiro dentro desse clado, por meio de inoculações cruzadas de isolados de diversos locais. Dessa maneira, Baker et al. (2003) levantaram a hipótese de que populações locais de *C. fimbriata* são hospedeiro-especializados.

Engelbrecht e Harrington (2005), ao realizarem testes de interesterilidade entre isolados de grupos de compatibilidade opostos, constataram que dois grupos interestéreis corresponderam, respectivamente, à linhagens de batata-doce e *Platanus* sp.. A linhagem do patógeno de cacau apresentou dois grupos interestéreis correspondendo à duas sublinhagens genéticas. Além disso, foram estudadas características morfológicas das linhagens hospedeiro-especializadas, e com base nos resultados obtidos por esses autores, os isolados, que antes eram designados *C. fimbriata*, que atacavam cacau e *Platanus* sp, foram renomeados como *C. cacaofunesta* e *C. platani*, respectivamente (FERREIRA, 2009). O patógeno de batata-doce foi mantido como *C. fimbriata*, como foi originalmente descrito.

Com base nesses estudos foi sugerido que a evolução e a divergência das espécies de *Ceratocystis* podem ter sido conduzidas pela especialização por hospedeiro, já que apenas pequenas diferenças morfológicas entre as espécies foram observadas (FERREIRA, 2009). Em contraste, análises filogenéticas da região ITS de isolados brasileiros de *C. fimbriata* de *G. arborea*, manga, eucalipto, figo e inhame mostram-se polifiléticos (BAKER et al, 2003;. THORPE et al, 2005). Isolados brasileiros deste fungo têm mostrado variação na agressividade e baixa especialização no hospedeiro, exceto os isolados de *G. arborea* que são mais agressivos para mudas dessa espécie, e alguns isolados de eucalipto são particularmente mais agressivos aos híbridos de eucalipto (BAKER et al, 2003;. THORPE, 2004; ZAUZA et al, 2004;. THORPE et al, 2005).

A maioria das espécies de *Ceratocystis* são idiomorfos, ou seja, contém dois sistemas mating types (MAT-1 e MAT-2). Assim, é observada a presença de indivíduos auto-estéreis (MAT-1) ou auto-férteis (MAT-2) em um padrão de segregação 1:1. Indivíduos do tipo MAT-1 são sempre auto-estéreis e só podem cruzar com cepas MAT-2, enquanto as

progênies do tipo MAT -2 são geralmente auto-férteis, podendo cruzar com indivíduos tanto MAT-2 como MAT-1. A auto-fecundação em isolados MAT-2 de espécies *Ceratocystis* ocorre através de uma supressão do gene de “acasalamento”, resultando na expressão de cruzamento do tipo MAT-1 (HARRINGTON; McNEW, 1997). Indivíduos MAT-1 de *C. pinicola* têm um crescimento mais lento do que indivíduos MAT-2 deste mesmo fungo. Há hipóteses que sugerem indivíduos MAT-2 no cruzamento com um indivíduo MAT-1 pode ter um gene eliminado ou suprimido durante o acasalamento, e essa alteração pode resultar no crescimento mais lento da auto-estéril (MAT-1) (HARRINGTON; McNEW, 1997). Isolados do tipo MAT-2 são mais difíceis de identificar, embora geralmente sejam apenas capazes de formar peritécios e ascósporos quando combinado com isolados MAT-1 (HARRINGTON et al., 2002).

Engelbrecht e Harrington (2005) estudaram a “interfertilidade” de isolados de cacau, batata-doce e *Platanus* sp.. Os autores constataram que houve cruzamento entre alguns isolados provindos de hospedeiros diferentes. Alguns isolados de batata-doce cruzaram com os de *Platanus* sp.. Em relação aos isolados de cacau, houve interação entre os isolados do Brasil com os do Equador e dos isolados da Colômbia com os da Costa Rica. Alguns isolados de batata-doce e *Platanus* sp. interagiram com os de cacau, gerando algumas vezes indivíduos com esporos inférteis. A capacidade de isolados de três hospedeiros diferentes serem capazes de cruzarem e produzirem híbridos sugere, segundo os autores, que estas espécies estão intimamente relacionadas e provavelmente divergiram recentemente.

A determinação de características reprodutivas entre isolados de *Ceratocystis* apoia a hipótese de que isolados de espécies diferentes, ou coletados em lugares distintos, podem estar estreitamente relacionados. Harrington et al (2002) estudaram a “interfertilidade”, baseados nas características de “mating types”, de diferentes isolados de *C. laricicola* e *C. polonica*, coletados no Japão, Rússia e Europa. Com base nestas características, estes autores sugeriram que as duas espécies de fungos estão intimamente relacionadas e somente se diferenciam pela sua especialização fisiológica pelo hospedeiro e pelos seus vetores.

O fungo *Ceratocystis* pertence à divisão Ascomycota e tem como fase anamórfica o gênero *Chalara* e *Thielaviopsis*. Em meio BDA (batata, dextrose, ágar), o micélio é inicialmente esbranquiçado, passando para acinzentado e negro. Em certas áreas do

micélio, aparecem enovelados escuros, imersos no meio de cultura que são os peritécios. Estes, quando maduros, são globosos, negros, providos de um longo rostro, na extremidade do qual se encontram gotas amareladas de ascósporos. Estas estruturas são visíveis a olho nú. Normalmente, quando há um aumento de temperatura e umidade, essa massa que envolve os ascos absorve umidade e aumenta de tamanho exercendo uma pressão de dentro para fora do peritécio, sendo o rostro o único lugar para o material sair e ser exposto ao ambiente (GUERRERO, 1975; CHONG, 1961). Nas hifas superficiais, formam-se endoconídios, (doliformes e/ou cilíndricos) produzidos nos endoconidióforos. Chong (1961) afirma que os endoconídios em dado momento do seu desenvolvimento, cada segmento limitados por septos, se diferenciam adquirindo parede própria e o crescimento empurra os outros. Os endoconídios então saem em cadeias ou sozinhos quando o conidióforo se rompe. Observam-se também neste fungo, a formação de clamidósporos, também chamado de aleuroconídios, que são estruturas de resistência. Todas estas estruturas citadas podem ser encontradas no campo e em seu hospedeiros (RIBEIRO, 1997). Na figura 1, é possível visualizar as estruturas típicas do gênero *Ceratocystis*.

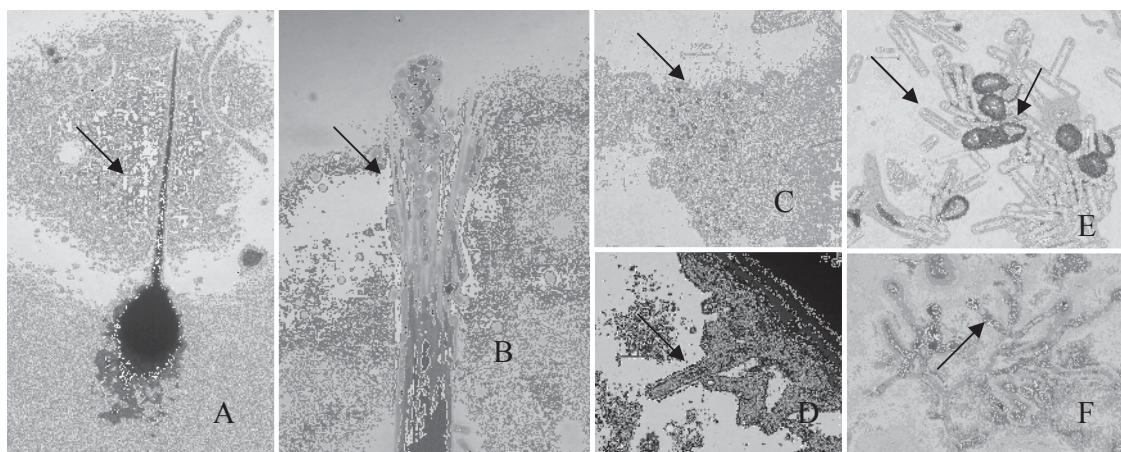


Figura 1: *Ceratocystis* isolado de teca. A. Peritécio; B. Hifas ostiolares com ascósporos; C. ascósporos; D. Endoconidióforo cilíndrico; E. Endocónidio cilíndrico e aleuroconidio; F. Aleuroconidiofóro e aleuroconídio.

Apesar da dificuldade de se distinguir morfologicamente as espécies de *Ceratocystis*, existem algumas pequenas características que podem auxiliar na identificação de

uma espécie. Engelbrecht e Harrington (2005) apontam que isolados de batata-doce, cacau e *Platanus* sp. eram indistinguíveis morfológicamente, exceto pela presença ou ausência de conídio do tipo doliforme e pequenas diferenças no tamanho das bases e pescoço do peritécio.

Segundo Barnes et al. (2003) *C. pirilliforme* pode ser distinguido com facilidade das outras espécies de *Ceratocystis*, pois seu asco tem forma piriforme. No entanto, os tamanhos dos ascos, ascósporos e conídios de *C. pirilliformis*, estão dentro dos intervalos observados para *C. fimbriata* e *C. albofundus* (WINGFIELD et al., 1996). *C. albofundus* tem asco de cor clara, ostíolo divergente e ausência de clamidósporos (WINGFIELD et al., 1996). *C. eucalypti* tem ascósporo alongado com bainha, enquanto *C. pirilliformis* tem ascósporos com bainha em formato de “chapéu”.

Outras espécies de *Ceratocystis* também têm ascósporos em forma de “chapéu”, como *C. moreau*, *C. acericola*, *C. fimbriata*, *C. albofundus*, *C. moniliformis* e *C. moniliformopsis*, sendo que estas duas últimas espécies, no entanto, diferem das outras espécies por possuírem espinhos curtos e cônicos na base do asco (YUAN; MOHAMMED, 2002). *C. cacaofunesta* se distingue de *C. fimbriata* por sua patogenicidade em cacau e rara produção de conídios doliformes (ausente em *C. fimbriata*) e pelo tamanho da abertura das fiálides, que são bem maiores que as observadas em *C. fimbriata*. A espécie *C. cacaofunesta* pode ser distinguida de *C. albofundus* por seu peritécio escuro, já que *C. albofundus* apresenta peritécio amarelado ou castanho (WINGFIELD et al., 1996). *C. platani* pode ser distinguido de *C. fimbriata* e *C. cacaofunesta* por sua patogenicidade em *Platanus* spp. e pela produção freqüente de conídios doliformes, além de apresentar parte da abertura da fiálide mais larga (ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005).

Trabalhos envolvendo o sequenciamento de DNA das regiões espaçadoras ITS e outras análises genéticas vêm auxiliando na determinação de espécies de *Ceratocystis* (HARRINGTON, 2000; BAKER; HARRINGTON, 2004). Análises moleculares da região ITS e estudos com aloenzimas têm apontado uma grande variação entre isolados *C. fimbriata* do clado da América do Norte. Este resultado tem corroborado os de patogenicidade, apontado que existe neste clado a presença de quatro linhagens, sendo que cada linhagem é hospedeiro-específica (JOHNSON et al., 2005). Em estudos realizados com isolados de *Ceratocystis* coletados no Brasil, Harrington et al (2011), concluíram que as seqüências de DNA da região espaçadora ITS variaram muito, não sendo possível a definição de linhagens deste fungo com

base nestas seqüências. Estes resultados, assim como outros (BAKER, et al., 2003; JOHNSON et al., 2005; THORPE et al., 2005), indicam que seqüências de ITS-rDNA têm valor limitado na filogenia de isolados de *C. fimbriata* dentro do clado da América Latina.

Ferreira et al. (2010), ao realizarem estudos de diversidade genética, baseados em marcadores de microsatélites, com isolados de *Ceratocystis* de eucalipto, manga, ficus, Gmelina, batata-doce, cacau e *Platanus* sp., apontam uma baixa diversidade genética entre estes isolados. A dispersão limitada dos ascósporos e aleurioconídios por insetos, juntamente com uma preponderância de autofecundação, são fatores que podem resultar populações de *C. fimbriata* com baixa diversidade genética (ROUX et al, 2001; ENGELBRECHT et al., 2004). Morin et al. (2004), estudaram a variabilidade genética e a estrutura da população de *C. resinifera* no Canadá, constatando baixa diversidade genética dentro de uma determinada área estudada, porém as diferenças genéticas foram especialmente marcantes quando as populações do leste do Canadá foram comparadas com as populações do oeste do Canadá, sugerindo que há uma barreira geográfica. Segundo os autores, esta barreira pode ser a consequência de uma baixa migração de insetos vetores de *C. resinifera* decorrente da presença reduzida de hospedeiras nas grandes planícies canadenses. Atualmente, parte do gene tipo MAT1-2 vem sendo usado para análises filogenéticas por apresentarem menor variação e por agruparem os isolados estudados conforme o hospedeiro de origem (HARRINGTON et al., 2011).

5.3. Disseminação e transmissão de *Ceratocystis*

Espécies de *Ceratocystis* estão fortemente associadas com insetos (HARRINGTON, 2009), apesar de ainda não se conhecer os vetores específicos de *C. fimbriata* na América Latina. Árvores infectadas com o fungo *Ceratocystis* são freqüentemente atacadas por scolytídeos, conhecidos como besouros da ambrósia, (Coleoptera: Curculionidae: *Scolytinae* e *Platypodinae*). Estes besouros, ao perfurarem e adentrarem o tronco da árvore, eliminam, através do orifício aberto, as fezes e restos de madeira com aleurioconídio do fungo que podem ser levados pelo vento ou pela água (BAKER et al, 2003; ENGELBRECHT et al, 2007; OCASIO-MORALES et al, 2007). Além

de dispersão através aleurioconídios, massas pegajosas dos ascósporos podem ser dispersos por insetos, como moscas e besouros (HARRINGTON, 2009)

Os insetos podem carregar estruturas do fungo dentro de estruturas especializadas denominadas micangias cuticulares ou externamente em orifícios simples ou aderidos ao exoesqueleto. Fungos transportados dentro das micangias tendem a ser mutualistas dos besouros, já os carregados no exterior do inseto são mais propensos a ser patógenos de espécies arbóreas (MALLOCH; BLACKWELL, 1993).

Hypocryphalus mangiferae é considerado o inseto vetor primário do agente da seca da mangueira. Pertence à família *Scolytidae*, sendo a única broca entre todas as espécies ocorrentes que é específica da mangueira. Nas árvores saudáveis, é comum observar o inseto ou suas galerias entre a casca e o lenho, em pequenos ramos decadentes. Em plantas doentes, predomina nos galhos finos. Já *Xyleborus ferugineus* é considerado como o principal vetor da seca-do-cacaueiro causado pelo fungo *C. cacaofunesta* (FLECHTMANN et al., 1995).

Os besouros fleófagos, ao colonizarem seus hospedeiros, escavam no floema e inoculam o fungo manchador de azul da madeira (“blue-staining”). Esta combinação já foi relatada para *Dendroctonus frontalis* e o fungo *Ceratocystis minor*, que tem a capacidade de interromper o movimento de água dentro da árvore, o que auxilia o besouro a matar mais rapidamente seu hospedeiro. Para *Scolytus multistriatus*, principal vetor da doença do olmo holandês (“dutch elm disease”), cujo fungo *Ceratocystis ulmi* produz enzimas que rompem as paredes dos vasos do floema do olmo (*Ulmus*), liberando compostos químicos que impedem a translocação de água dentro da árvore. *Ips avulsus* tem seu desenvolvimento favorecido na presença do fungo *Ceratocystis ips* (SILVA, 2006).

Na associação de insetos com *Ceratocystis* podemos também citar: *C. laricicola* com *I. cembrae* e *C. polonica* com *Ips polonica*, que atacam as espécies *Larix* sp. e *Picea* sp., respectivamente, em toda a Europa, Ásia e Japão (HARRINGTON et al., 2002).

Estudos conduzidos em Minnesota para testar a hipótese de que algumas espécies de besouros que ocorriam nesta localidade estavam relacionadas com *C. fagacearum* foram conduzidos por Ambourn et al (2005). Os autores constataram a presença de *C. fagacearum* em *Colopterus truncatus*, sendo que o isolamento do fungo variava conforme o local, o mês e o sexo do inseto. Os meses de maio, junho, agosto e setembro apresentaram

maiores proporções de indivíduos com propágulos *C. fagacearum*. A proporção de indivíduos contaminados com *C. fagacearum* em áreas com plantas de carvalho murchas foi maior do que em áreas com carvalhos sem sintomas. Finalmente, uma maior proporção de insetos machos estavam carregando propágulos *C. fagacearum* que as fêmeas.

Carpophilus sayi também já foi relatado como vetor de *C. fagacearum* nesta mesma área em outros trabalhos. Dos 2.542 besouros coletados, 54% estavam contaminados com o fungo. O isolamento do fungo no inseto revelou que esta espécie e também *Colopterus truncatus* estavam carregando um elevado número de propágulos viáveis (> 3.000 UFC por besouro) (CEASE; JUZWIK, 2001). Assim, essas duas espécies são atualmente consideradas as principais vetoras de *C. fagacearum* no Canadá.

Um paradigma mais abrangente sugere que, embora os mecanismos não sejam totalmente compreendidos, uma planta morta por fungo de xilema é resultado de ações simultâneas e interações de ambos os componentes que podem estar envolvidos, o vetor e patógenos (PAINE et al., 1997). Segundo Hunt e Borden (1990), esta interação entre os besouros de casca, os fungos e seus hospedeiros leva à produção de compostos químicos que são utilizados como feromônios pelos insetos. Podemos citar a associação de *Ips paraconfusus* com o *Bacillus cereus*, que converte α -pineno do hospedeiro no feromônio cis-verbenol (BRAND et al., 1975). Da mesma forma, a associação de *Dendroctonus frontalis* com o fungo presente em sua micângia transforma trans-verbenol no feromônio de antiagregação verbenona (BRAND et al., 1976).

Usando uma técnica que imita a penetração física da casca pelos besouros, Nebeker et al (1965 apud PAINE et al., 1997) mostraram que o fluxo da resina pode ser reduzido rapidamente, mas este fluxo será retomado depois, em alguns dias. Porém, parece que a ação contínua de abrir túneis pelos besouros e invasão local do xilema pelo fungo impede a retomada do fluxo dos vasos pelo hospedeiro. Apesar das espécies de *Ceratocystis* serem patogênicas à planta hospedeira, nem todos os besouros de casca são obrigatoriamente dependentes do fungo. Somente uma pequena porcentagem destes besouros carrega as espécies de *Ceratocystis* (PAINE et al., 1997).

Pelo fato dos fungos pertencentes ao gênero *Ceratocystis* serem disseminados por insetos, as dispersões naturais a longa distâncias da população só fungo, incluindo para novos continentes, são um evento extremamente raro (BAKER et al., 2003).

Assim, a movimentação de propágulos do fungo *Ceratocystis* para novas regiões pode ter ocorrido por material propagativo infectado ou madeira maciça usada para embalagens (BAKER et al., 2003; BAKER; HARRINGTON, 2004; THORPE et al., 2005). Por exemplo, os isolados de *Ceratocystis* de batata-doce da China, Japão, Papua Nova Guiné, Nova Zelândia, e os dos Estados Unidos não mostram variação genética em sua sequência de DNA da região ITS e baixa variação quando se usa marcadores microssatélites, provavelmente porque um único isolado do fungo foi transferido para todo o mundo em raízes utilizado para a propagação (BAKER et al., 2003; STEIMEL, et al., 2004; THORPE et al., 2005; ENGELBRECHT; HARRINGTON, 2005). Ainda há registros sobre a disseminação de *Ceratocystis* sp. pelo contato entre as raízes de batata-doce, mangueira, plátano e eucalipto (BAKER; HARRINGTON, 2004).

5. 4 Medidas gerais de controle de *Ceratocystis*

As medidas gerais de controle são adotadas de acordo com a presença ou ausência do patógeno na área. No primeiro caso, a principal medida é impedir a entrada do fungo, já que o inseto transmissor ocorre endemicamente em todas as regiões onde existem as plantas suscetíveis. No segundo caso, quando o patógeno já está presente na área, recomenda-se o corte e queima dos galhos infectados, entretanto, este controle só terá sucesso quando o sistema radicular da planta estiver sadio (BATISTA et al., 2008). No Texas a prática do corte mecânico das conexões das raízes de carvalho para controle de *C. fagacearum* tem sido recomendada a muitos anos. Neste caso são abertos valas para romper as ligações entre raízes de árvores saudáveis com árvores que estão dentro de uma área denominada centros de infecção (HIMELICK; FOX, 1961 apud WILSON; LESTER, 2002). Wilson e Lester (2002) testaram o uso de trincheiras para o controle *C. fagacearum* em áreas com árvores de carvalho infectadas com este fungo. Os autores testam o uso somente de trincheira e desta combinada com geomenbranas, biobarreiras e fungicidas. Em todos os casos foi constatada o controle do fungo nesta áreas, pois não foi detectada o aumento do número de plantas doentes.

Os métodos de controle químicos e culturais não têm sendo satisfatórias. O uso de fungicidas, por exemplo, é inviável, pois, como a entrada do patógeno se dá por ferimentos na planta, teria-se que se fazer pulverizações regulares, o que é difícil, além de

muito custoso (GUERRERO, 1975).

Entretanto no Canadá o uso de produtos químicos para controle de *Ceratocystis* foi empregado. Neste país, este fungo não afeta as propriedades estruturais da madeira, mas altera sua aparência, reduzindo o seu valor e a liquidez desta no mercado madeireiro. Biocidas químicos como pentaclorofenato de sódio foram usados por décadas, mas a crescente preocupação com a sua toxicidade ambiental levou à exclusão destes produtos do mercado. Além disso, foi constatado que este produto só tinha efeito sobre madeira recém-cortada (BYRNE, 1999 aput MORIN et al., 2006).

A aplicação de isolados menos patogênicos de fungos causadores de mancha em madeira é uma estratégia promissora de controle biológico. Em ensaios em pequena escala de campo, Behrendt et al. (1995) demonstraram que um isolado albino de *Ophiostoma piliferum*, comercialmente disponível sob o nome comercial Cartapip 97, reduziu a colonização de fungos manchadores em *Pinus resinosa*. Um isolado não pigmentado de *C. adiposa* foi usado para proteger discos de pinho amarelo (*Pinus* spp.) contra o desenvolvimento de fungos manchadores, rendendo resultados promissores. No entanto, *C. adiposa* não foi avaliada para proteção de toras (CROAN, 1996 aput MORIN et al., 2006).

O uso de porta-enxerto resistente é um método de controle usado em mangueira. Algumas variedades citadas como resistentes à doença e que podem ser utilizadas como porta-enxerto são: Carabao, Manga d'água, Pico, IAC 101 Coquinho, IAC 102 Touro, IAC 103 Espada Vermelha, IAC 104 Dura, Jasmim, Rosa, Sabina, Oliveira Neto, São Quirino, Van Dyke, Keitt, Espada, Sensation, Kent, Irwin e Tommy Atkins (ROSSETTO et al., 1996; RIBEIRO, 1997; BATISTA et al., 2008).

Apesar de a literatura relacionar uma série de variedades com resistência, um aspecto que não deve ser ignorado é a variabilidade genética do patógeno devido à presença da fase sexual, permitindo a geração de descendentes recombinantes na natureza e, consequentemente, raças fisiológicas do patógeno. Assim, as variedades Kent e Sensation, classificadas como resistentes em Campinas, comportaram-se como suscetíveis em Jaboticabal. No Instituto Agrônomo de Campinas, são conhecidos dois isolados do fungo com virulência distinta: o IAC FITO 334-1, que não infecta as variedades Jasmim e Kent, e o IAC FITO 4905, que infecta ambas as variedades (ROSSETTO et al., 1996, BATISTA et al., 2008). Apesar de as variedades Tommy Atkins e Espada serem citadas como resistentes,

isolados do patógeno obtidos de mangueiras do município de Senhor do Bonfim foram virulentos às mesmas quando inoculadas em condições de casa de vegetação (BATISTA et al., 2008).

Para cacau, já há indícios de plantas resistentes a *C. cacaofunesta*. Silva et al. (2004) avaliaram a resistência de clones de cacau do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Centro de Pesquisas do Cacau, em Ilhéus-BA. Os autores encontraram clones suscetíveis a altamente suscetíveis; os clones SIC-644 e SIC-812 apresentaram-se como moderadamente resistentes e a variedade ‘Jaca’ se comportou com maior resistência, acompanhada pelos clones SIAL-577, CB-205 e CBI-205. Os autores concluíram também que o isolado de *Ceratocystis* da Bahia usado nos estudos é altamente agressivo, pois até o material IMC-67, que na literatura é bem aceito como resistente, foi classificado como suscetível (SILVA et al., 2004).

Silva et al. (2007) avaliaram a reação de 17 genótipos de cacaueiro à murcha-de-*Ceratocystis*, utilizando três isolados virulentos. Dos genótipos analisados, o VB 1159 apresentou alta resistência ao patógeno. Os genótipos MUC 43, FL 78, VB 681, FC 101, VB 184, LP 06, ICS 1, VB 902, FA 13, NO 34, PS 5784 e Theobahia apresentaram resistência intermediária, enquanto que CA 1.4, VB 206, LCT 37 A e SJ 02 foram mais suscetíveis. Os autores indicam que a nova fonte de resistência identificada neste trabalho pode ser utilizada em programa de melhoramento do cacaueiro e como porta-enxerto pelos produtores de cacau.

Para eucalipto, ainda não há relatos de fontes de resistência. Segundo Alfenas et al. (2009) há indícios de que *Eucaliptus grandis* parece ser mais resistente que *E. urophylla*. Zauza et al. (2004) estudaram a reação de 18 clones brasileiros, híbridos *E. grandis* x *E. urophylla*. Seis clones deste cruzamento se comportaram como altamente suscetíveis, quatro clones apresentaram descoloração significativa e outros oito clones apresentaram suscetibilidade intermediária. Os clones que apresentaram alta susceptibilidade têm muitas características superiores em relação aos clones resistentes testados, como a alta produtividade de celulose, rápido crescimento, queda precoce de ramos e resistência ao cancro causado por *Cryphonectria cubensis*. Este fato é preocupante, pois clones de elite como estes são os mais procurados pela indústria madeireira.

Em estudos realizados com o objetivo de encontrar fontes de resistência de eucalipto à *Ceratocystis*, foi observada em plantas inoculadas, ausência de sintomas de murcha

e de mortalidade, porém tinham seus tecidos invadidos pelo fungo (ZAUZA et al., 2004; TUMURA et al., 2010). A evidência de plantas assintomáticas pode estar relacionado com a idade e com as condições de crescimento das plantas, sendo que estes fatores merecem ser mais bem estudado. Independente disso, o fato de algumas plantas se apresentarem assintomáticas deve ser encarado como um problema, visto que elas podem servir de veículo de disseminação do patógeno. Plantas infectadas, sem sintomas, podem ser levadas para o campo ou até serem transportadas entre municípios e estados, servindo assim de fonte de inóculo primário para uma epidemia.

O fato de plantas de eucalipto inoculadas com *Ceratocystis* não apresentarem sintomas de murcha e morte imostrar a necessidade de se encontrar um método ideal para se avaliar a resistência da *C. fimbriata*, em eucalipto. Segundo Baker et al. (2003), a utilização da medida do tamanho da lesão causada por este fungo no xilema da planta, ao invés de porcentagem de mortalidade de plantas inoculadas, pode ser um parâmetro mais aplicável para avaliar susceptibilidade e resistência.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6. 1. Coleta de material e isolamento de *Ceratocystis* sp.

Foram efetuadas coletas em áreas de produção de eucalipto com ocorrência de murcha e seca de plantas, sendo este o sintoma característico da doença ocasionada por *Ceratocystis* sp.. Também foram efetuadas coletas em áreas de espécies arbóreas que demonstravam sintomas de murcha (teca e atemóia). Os isolados de cacau foram cedidos pela pesquisadora da Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira, Dra. Stela Dalva Vieira M. Silva. Os isolados de manga foram cedidos pela pesquisadora Dra. Margarida Fumiko Ito, do Instituto Agronômico de Campinas.

Para isolamento do patógeno, os fragmentos do material coletado foram submetidos a uma desinfestação superficial com álcool 70% durante 1 minuto, seguido de uma submersão em hipoclorito de sódio a 2%, durante 1 minuto finalizando com uma lavagem em água destilada autoclavada por mais 1 minuto. Os fragmentos desinfestados foram depositados sobre discos de cenoura, que são usados como isca, sendo esta técnica considerada seletiva,

por Moller e Vê Vay (1968) (Figura 2). Após formação completa do peritécio, estrutura característica de *Ceratocystis* sp., foi coletada uma pequena porção da mucilagem com esporos contida nesta estrutura. Esta mucilagem foi riscada em uma placa contendo meio MEA (2% de Malte, 0,2% de extrato de levedura e 1% de Agar) e colocada para crescimento das colônias em condições controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$ em fotoperíodo alternado de 12 horas).

Para a obtenção de culturas monospóricas, as colônias obtidas do isolamento foram lavadas com água destilada esterilizada e as concentrações das suspensões de esporos cilíndricos foram padronizadas para aproximadamente 10^2 esporos/mL. Foi depositado 100ul dessa suspensão de esporos em placas contendo meio MEA acrescido de 0,005% de oxitetraciclina. Através de visualização em microscópio ótico, os esporos foram individualizados e transferidos com agulha entomológica para meio MEA para formação das colônias monospóricas.

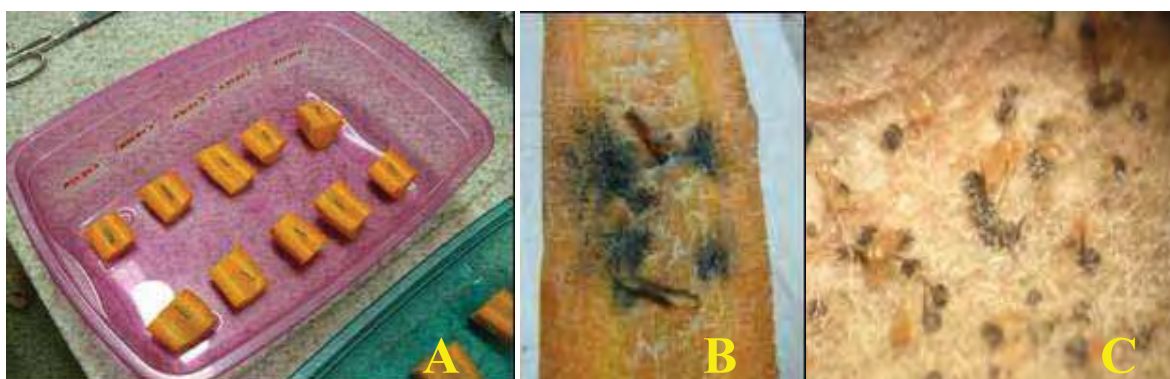


Figura 2: (A) Fragmentos de eucalipto sobre iscas de cenoura; (B) *Ceratocystis* sp. crescendo sobre cenoura; (C) Peritécios de *Ceratocystis* sp. sobre cenoura.

6.2. Caracterização patogênica dos isolados obtidos

Todos os isolados monospóricos obtidos foram submetidos a testes de patogenicidade em seus hospedeiros originais. A metodologia adotada para inoculação foi baseada na utilizada por Silveira et al. (2006) onde a inoculação foi realizada a partir de uma incisão no caule da planta e o inóculo (disco de micélio de 0,5cm) foi depositado entre a casca e o lenho.

Após a inoculação, foi colocado um algodão umedecido com água destilada no local do ferimento, e em seguida, este foi vedado com fita plástica para manter aumidade do ponto de inoculação (Figura 3).

Foram inoculadas seis mudas de eucalipto para cada um dos isolados testados. Os testes com eucalipto foram realizados com o clone 219 (com cerca de 6 meses de idade), o qual já se sabe que é susceptível a *Ceratocystis*. Os testes de patogenicidade em manga foram realizados em plantas do cultivar Bourbon, e foram realizadas três repetições para cada isolado testado. Para os testes de patogenicidade em teca e atemóia, também foram usadas três repetições para cada isolado testado. As plantas de cacau utilizadas para inoculação são do cultivar Theobahia com seis meses de idade, e foram inoculadas 4 mudas destas plantas para cada isolado. Todas as testemunhas foram inoculadas somente com um disco de meio de cultura (MEA) sem o fungo.

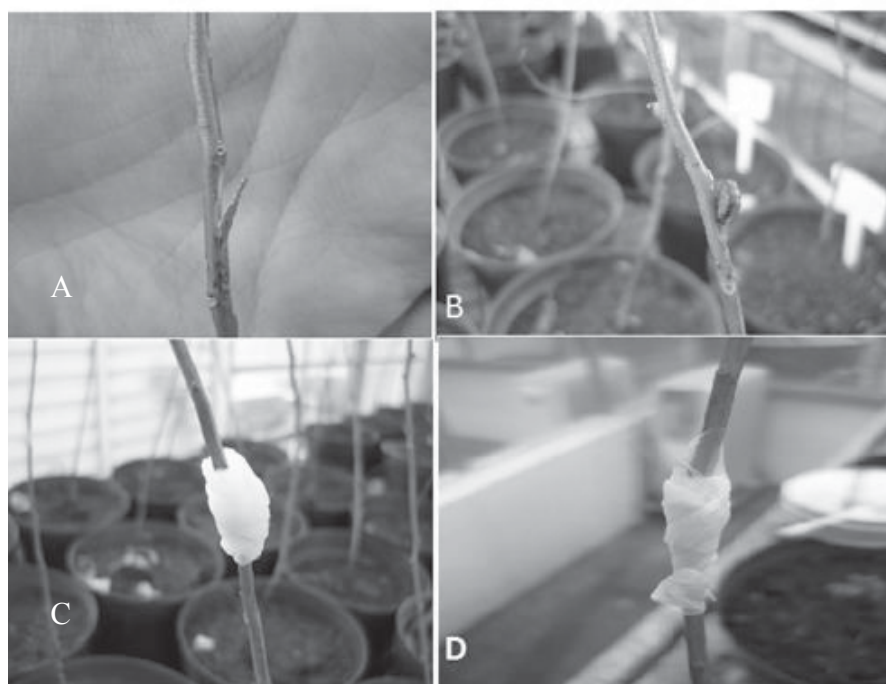


Figura 3: (A) incisão no caule da planta; (B) disco contendo o fungo em contato com o ferimento; (C) algodão embebido com água destilada envolvendo a incisão; (D) fita plástica usada para vedar a incisão.

Foram realizados também testes de patogenicidade cruzada, o qual os isolados de *Ceratocystis* obtidos foram inoculados em outras plantas que não eram suas hospedeiras originais. Em plantas de eucalipto, foi possível realizar a inoculação de todos os isolados obtidos, porém para inoculação de mudas de manga e cacau foram selecionados somente alguns isolados, em função da baixa quantidade destas plantas disponíveis. Para teca e atemóia, não foram realizados testes de patogenicidade cruzada, pois não se obteve número suficiente de mudas.

Todos os testes de patogenicidade foram realizados com plantas em vaso, mantidas em casa de vegetação de vidro com ventilação forçada, localizada na Fazenda Experimental Lageado, no Departamento de Produção Vegetal / Defesa Fitossanitária.

As avaliações foram do tipo destrutiva e foram realizadas 90 dias após inoculação para mudas de eucalipto, teca e atemóia. No caso de mudas de manga e de cacau, as mudas foram avaliadas 30 e 25 dias após a inoculação, respectivamente. As mudas foram cortadas no sentido longitudinal do caule para verificação da invasão do fungo pelo xilema da planta. Esta invasão do fungo no xilema da planta tem como característica a descoloração e escurecimento dos vasos, decorrente do colapso dos tecidos invadidos por este fungo. Assim, a invasão pode ser medida a partir do ponto de inoculação, com o auxílio de uma régua.

Após a avaliação das plantas, fragmentos destas foram usados para reisolamento do fungo, com o propósito de verificar se é o fungo inoculado que está mesmo relacionada com a lesão e morte da planta. Este reisolamento também é necessário para verificar se nos testes de patogenicidade cruzada o fungo inoculado permaneceu ativo, ou se por alguma reação de incompatibilidade com a planta, veio a ser desativado.

6.3. Acompanhamento da colonização do xilema de eucalipto por *Ceratocystis* sp.

Para complementação dos estudos de patogenicidade, foi realizado o acompanhamento da colonização do xilema de eucalipto por alguns isolados de *Ceratocystis* sp., sobre a superfície de plantas de eucalipto. Para isso, plantas do clone 219 tiveram parte do seu sistema vascular exposto com o auxílio de uma lâmina de bisturi (Figura 4). Foram usados 5 isolados de *Ceratocystis*, sendo cada isolado de um hospedeiro diferente (eucalipto, cacau, manga, teca e atemóia). Sobre esta área foi depositada 40ul de uma suspensão contendo 10^6

esporos cilíndricos /ml. Como testemunha uma planta foi inoculada somente com água destilada autoclavada.

Após a inoculação, estas plantas foram mantidas em câmara úmida a 25°C no escuro. Parte da área inoculada (cerca de 5mm de comprimento) foi coletada em intervalos de tempo pré-determinados (6, 12 e 24 horas) e fixadas em solução de “Karnovsky” (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05M, pH 7,2), por um período mínimo de 24 horas, para serem preparadas e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO435-VP. Foram usadas três plantas para cada intervalos de tempo pré-determinados.



Figura 4: Planta de eucalipto com parte de seu sistema vascular exposto para testes de microscopia eletrônica.

As amostras do caule inoculadas foram retiradas do fixador “Karnovsky” e transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo tampão fosfato de sódio 0,05M, onde permaneceram por dez minutos. O tampão foi trocado três vezes. Subseqüentemente as amostras foram desidratadas em série crescente de concentração de acetona (30%, 50%, 70%, 90% – 10 minutos cada e 100% por três vezes de 10 minutos). Após esta etapa, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico (Baltec CPD 030) para completar a secagem. Após completa a desidratação as amostras foram cuidadosamente montadas em “stubs” (Figura 5) com fita de carbono dupla face para aderência das amostras e cobertas com 20nm de ouro em aparelho Baltec SCD 050. A preparação e observação das amostras foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica localizado na ESALQ/USP.



Figura 5: Amostras montadas em “stubs” (a esquerda) e cobertos com ouro (a direita)

6. 4. Caracterização cultural dos isolados obtidos

A caracterização cultural dos isolados de *Ceratocystis* foi baseada na velocidade de crescimento micelial, cor da colônia e estruturas produzidas, quando cultivados em meio de cultura.

Para cada isolado, discos de micélio com 6 mm de diâmetro foram obtidos das bordas de uma colônia cultivada 14 dias em meio de cultura MEA e transferidos para o centro de novas placas de Petri contendo o mesmo meio. Após a repicagem, os isolados foram incubados à temperatura de 25 ± 1 °C, sob fotoperíodo de 12 horas, até que um dos isolados tocassem a borda da placa.

A avaliação do experimento foi realizada a cada três dias, através da mensuração de diâmetros perpendiculares da colônia com auxílio de régua milimetrada. A velocidade média de crescimento micelial foi utilizada para as análises estatísticas.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta por uma placa. Os dados correspondentes à velocidade de crescimento micelial dos isolados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas através do teste estatístico de Scott-Knott a 5% , utilizando o programa Sisvar.

6.5. Caracterização morfológica dos isolados obtidos

Neste experimento foi determinado o tamanho de todos os tipos de esporos (endoconídio cilíndrico, endoconídio doliforme, clamidósporo e ascósporos) produzidos pelo gênero *Ceratocystis*. Também foi realizada a medição dos peritécios. Para isso os esporos e peritécios foram obtidos direto de culturas (14 dias) crescidas em placa de Petri contendo meio MEA.

Para avaliação dos esporos e peritécios, foram preparadas lâminas semi-permanentes. A mensuração dos conídios foi realizada utilizando-se sistema de vídeo-câmara Opton, modelo TA-0124XS, instalada em microscópio óptico. A imagem foi transmitida para computador e analisada por meio do programa EDN-2. Para a calibração do equipamento, utilizou-se uma lâmina micrografada (Carl Zeiss®). Foram medidos 30 esporos e peritécios de cada isolado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por testes estatísticos de Scott-Knott a 5% , realizados no programa Sisvar.

6.6. Caracterização Enzimática

Discos com 5 mm de diâmetro de MEA contendo estruturas do fungo foram retirados do bordo de colônias cultivadas por 14 dias no escuro sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e repicados individualmente para o centro de placas de Petri, contendo cada um dos meios descritos nos itens a seguir. A avaliação das enzimas extracelulares amilase, lipase, celulase, proteases, lignina peroxidase e pectiliase (pectato-liase) foi realizada através da medição de dois diâmetros ortogonais da colônia e dos respectivos halos de degradação formados pela ação enzimática do fungo.

Para a produção da enzima lacase foi realizada uma estimativa subjetiva, mensurada por meio de símbolos baseando-se na intensidade da coloração.

Os dados obtidos foram submetidos à análise variância e as médias das repetições dos isolados foram comparadas entre si para cada enzima por meio da aplicação do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, realizado no programa Sisvar.

6.6.1 Atividade da enzima amilase

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio mínimo, o qual teve a glucose substituída por amido (6 g de NaNO_3 ; 1,5 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de KCl ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de FeSO_4 ; 0,01 g de ZnSO_4 ; 10 g de amido; 15 g de ágar; 1 L de água destilada; pH = 6,8). As colônias foram incubadas a 25° C sob fotoperíodo de 12 horas. Após oito dias de cultivo foram aplicados em cada placa 2 mL de solução lugol (5 g de KI ; 1 g de Iodo; 100 mL de água destilada), sobre a superfície do meio de cultura. Após 5 minutos, a solução lugol foi descartada e avaliou-se o halo de degradação oriundo da atividade amilolítica, caracterizado pela formação de halo amarelo circundado por uma zona azulada (PEREIRA, 2009).

A avaliação foi realizada pela mensuração dos diâmetros perpendiculares da colônia e da colônia mais o halo de degradação do amido com paquímetro. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento.

6.6.2 Atividade da enzima celulase

Os isolados foram cultivados em ágar carboximetilcelulose (1 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g de asparagina; 0,5 g de KCl ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de CaCl_2 ; 0,5 g de extrato de leveduras; 10 g de carboximetilcelulose; 20 g de ágar; 1 L de água destilada). As colônias foram incubadas por oito dias a 25 °C no escuro e em seguida submetidas a choque térmico por 16 horas a 50 °C. Após esse período, foram adicionados 10 mL de solução corante de vermelho congo (2,5 g/L) em tampão Tris HCl 0,1 M, pH 8,0. Após 30 minutos, a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 5 mL de solução de NaCl 0,5 M neste mesmo tampão, visando revelar o halo claro e estreito de degradação da celulose ao redor da colônia (PEREIRA, 2009).

A avaliação da área de degradação da celulose foi realizada como no item 6.6.1. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento.

6.6.3 Atividade da enzima lipase

O protocolo para avaliação da atividade lipolítica utilizado foi adaptado de Hankin e Anagnostakis (1975).

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura específico para detecção da atividade lipolítica (10 g de peptona, 5 g de NaCl, 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 g de ágar, 0,01 g de rodamina, 10 mL de Tween 20 (esterilizado separadamente), 1 L água destilada, pH 6,0).

As colônias foram incubadas por 10 dias a 25 °C no escuro, e em seguida colocadas a 4°C por 48h. Após este período foi avaliado o halo ao redor da colônia, formado por cristais de sais de cálcio decorrentes da liberação da enzima lipolítica. A avaliação da área de degradação da lipase foi realizada como no item 6.6.1

6.6.4 Atividade da enzima protease

O protocolo para avaliação da atividade da protease está de acordo com a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975), adaptada.

Para isso, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio solidificado composto por 5 g de peptona, 3 g de extrato de levedura, 1 g NaCl, 15g de ágar, 0,4 g gelatina e 1 L de água, em pH 6,0. A gelatina foi autoclavada separadamente e misturada ao meio antes de vertê-lo para as placas.

As colônias foram incubadas por cinco dias a 25 °C no escuro. Após este período o halo, caracterizado por uma região amarelada ao redor da colônia contrastante com o vermelho presente na região em que não houve atividade proteolítica, foi revelado por meio da aplicação de 10 mL de vermelho de metila 2% em cada placa, durante 30 minutos. A avaliação da área de degradação da protease foi realizada como no item 6.6.1

6.6.5 Atividade da enzima lacase

O protocolo para atividade da lacase foi realizado conforme Santos (2007). Os isolados foram cultivados em meio contendo 20 g de ágar acrescido de 0,5% (p/v)

de ácido gálico, 15 g extrato de malte e 1 g de peptona em 1 Litro de água destilada (pH 7,0). O ácido gálico foi homogeneizado em 50 mL de água destilada e autoclavado separadamente ao meio de cultura, sendo misturado ao mesmo antes de vertê-lo para as placas. As colônias foram incubadas por 14 dias a 25 °C no escuro.

Para a produção da enzima lacase, foi realizada uma estimativa subjetiva, mensurada por meio de símbolos baseando-se na intensidade da coloração marrom formada em torno da colônia (ausência de alteração de cor no meio de cultura (-); cor fraca (+); cor moderada (++); cor intensa (+++)). Isso foi realizado devido ao fato do fungo não ter se desenvolvido muito bem no meio e seu halo ter coloração muito difusa, dificultando assim sua medição.

6.6.6 Atividade da enzima pectato-liase

O protocolo para atividade desta enzima foi adaptado da metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (1975).

Para isso, os isolados foram cultivados em meio de cultura sólido composto de 500 mL de solução mineral (2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g de KH_2PO_4 , 6 g de NbHPO_4 , 0,2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de CaCl_2 , 10 μg de H_3BO_3 , 10 μg de MnSO_4 , 70 μg de ZnSO_4 , 50 μg de CuSO_4 , 10 μg de MoO_3) + 500 mL de solução de pectina (1g de extrato de levedura, 15 gramas de ágar, 5 gramas de pectina cítrica). O meio foi ajustado para pH 7 para detecção da pectatoliase. As colônias foram incubadas por 14 dias a 25 °C sob fotoperíodo alternado (12h). Decorrido este período, o halo de degradação, formado por uma região translúcida ao redor da colônia, foi revelado com aplicação de vermelho de metila 2%, durante 4 horas. A avaliação da área de degradação foi realizada como no item 6.6.1

6.6.7 Atividade da enzima lignina peroxidase

O protocolo para atividade da lignina peroxidase foi realizado conforme Santos (2007). Preparou-se o meio composto por 2 g de glicose, 2 g de tartarato de amônio; 2 g de extrato de malte; 0,26 g de KH_2PO_4 ; 0,26 g de NbPO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,0066 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,005 g de FeSO_4 ; 0,0005 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02

mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,07 g DE H_3BO_3 , 0,1 g de azul de metileno e 20 g de ágar para 1 litro de água. O pH foi ajustado para 6.5. As colônias foram incubadas por 10 dias a 25 °C no escuro. A detecção da atividade foi verificada pela descoloração do meio de cultivo ao redor da colônia. A avaliação da área de degradação foi realizada como no item 6.6.1

6. 7 Caracterização molecular dos isolados obtidos

A extração de DNA dos isolados coletados foi realizada conforme o método desenvolvido por Murray e Thompson (1980) modificado. Em cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram macerados 3 discos de micélio com 1000 µL de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2 % CTAB; 0,2 % β-mercaptoetanol). Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C, por 30 minutos. Subsequentemente, foram adicionados 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) aos tubos e estes foram misturados manualmente, por agitação, durante 10 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi removida para novos tubos com isopropanol. A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm e o “pellet” obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70% e submetido a uma nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µL de água com DEPC (Diethylpirocarbonato).

A reação de PCR foi feita utilizando os pares de primers ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3), que geram um fragmento de aproximadamente 750 pb. Para a PCR, empregaram-se 3 µl de DNA total extraído (30ng), tampão 1X da enzima *GoTaq* DNA polimerase (Promega®), 2mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada primer na concentração e 1,25 U de *GoTaq* DNA polimerase (Promega®), ajustando o volume da reação para 50 µl com água tratada com DEPC. O regime de programa utilizado no termociclador foi: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 35 segundos, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min, finalizando-se o processo com 72°C por 15 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose corado com Brometo de etídio e observados sob luz UV (Figura 6). Para sequenciamento dos fragmentos amplificados, 100 µl do produto de PCR foi purificado com o Kit SV Gel and PCR Clean UP system (Promega®). O DNA dos isolados obtidos foi seqüenciado no centro de

genoma Humano da USP. As sequências obtidas foram editadas através do software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2005). Após edição, estas sequências foram utilizadas para procurar sequências similares usando o software Blastn do NCBI. As sequências obtidas foram alinhadas e processadas com o programa Mega 5.05 para que fosse construída a árvore filogenética dos isolados de *Ceratocystis*, utilizando o método “Tamura-3-parameter” (TAMURA, 1992) para a construção da matriz de distâncias, pelo método de Neighbor-Joining. Foi realizado um “bootstrap” com 1.000 replicações.

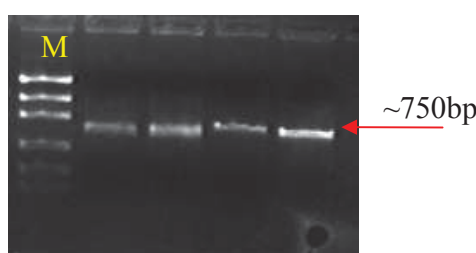


Figura 6: DNA obtido a partir da reação de PCR com os primers ITS1/ITS4 (M= Marcador molecular 1Kb).

6.8. Avaliação de resistência de genótipos e clones de eucalipto inoculados com *Ceratocystis*

Foram testados 20 materiais, entre genótipos e clones de eucalipto, que foram obtidos a partir de sementes do banco de germoplasma e de clones cedidos pela Empresa Susano. Para inoculação, foram escolhidos quatro isolados patogênicos, sendo cada um de uma região diferente. Os testes foram realizados em casa de vegetação com ventilação forçada, localizada na Fazenda Experimental Lageado, no Departamento de Produção Vegetal / Defesa Fitossanitária.

Foram utilizadas mudas com até seis meses de idade originada de diferentes espécies e cruzamentos de eucalipto. A inoculação foi no caule da planta. Para isso, foi realizada uma incisão no local de inoculação e o inóculo foi depositado entre a casca e o lenho na forma de disco de micélio. Após inoculação foi colocado um algodão umedecido com água destilada no local da inoculação e, em seguida, este foi vedado com fita plástica.

Foram inoculadas seis mudas de cada genótipo para cada um dos isolados. A testemunha foi inoculada somente com um disco de meio de cultura (MEA) sem o fungo.

A avaliação foi realizada 90 dias após a inoculação, sendo que esta foi do tipo destrutiva. As mudas foram cortadas no sentido transversal do caule para acompanhamento da invasão do fungo pelo xilema da planta. Esta invasão do fungo no xilema da planta tem como característica uma descoloração e escurecimento do vaso, decorrente do colapso dos tecidos invadidos por este fungo. Assim a invasão pode ser medida a partir do ponto de inoculação, com o auxílio de uma régua. Também foram observados sintomas como período de aparecimento de murcha, seca e morte da planta.

6. 9. Sensibilidade de isolados de *Ceratocystis* sp. a diferentes fungicidas

6.9.1 Sensibilidade “in vitro”

A metodologia utilizada foi a do fungicida incorporado ao meio de cultura adaptada de Caldari Júnior (1998). Para isso, as diferentes concentrações dos fungicidas foram adicionadas a frascos tipo Erlenmeyer, contendo meio de cultura MEA previamente autoclavado e resfriado à temperatura entre 40 e 50°C. Para homogeneização, agitou-se o Erlenmeyer contendo o meio BDA adicionado do fungicida, efetuando-se, posteriormente, a distribuição do mesmo em placas de Petri. As concentrações dos fungicidas testadas foram: 0, 10, 100 e 1000 ppm. Os fungicidas testados foram: azoxystrobina (500g/kg), tiofanato-metílico (500g/kg), clorotalonil + tiofanato-metílico (700g/kg), piraclostrobina + metiran (600g/kg), triadimenol (250g/L), epoxiconazole + piraclostrobina (158g/L), tebuconazole (200g/L) e difenoconazole (250g/L).

Discos de micélio, com 5 mm de diâmetro, foram obtidos das bordas de colônias cultivadas em meio MEA por uma semana e transferidos para o centro das placas contendo meio com os fungicidas. Estas colônias foram então incubadas a 25±1°C sob fotoperíodo alternado. Foram realizadas avaliações diárias até o primeiro contato de uma das colônias com a borda da placa, através da mensuração de diâmetros perpendiculares de cada colônia.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta de uma placa. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi determinada segundo Menten et al. (1976).

6.9.2 Sensibilidade “in vivo”

Clones de eucalipto (clone 301) com cerca de seis meses foram transplantados para vasos, contendo substrato autoclavado e, sete dias após essa operação estas plantas foram irrigadas com 250 ml de uma suspensão dos fungicidas que foram descritas no item 6.9.1. As concentrações dos fungicidas testados foram: 0, 500, 1000 e 2000 ppm.

Aos 7 dias após o tratamento com o fungicida, as plantas foram inoculadas com um isolado de *Ceratocystis* sabidamente patogênico. O procedimento de inoculação foi igual ao descrito no item 6.2. A avaliação foi realizada 90 dias após a inoculação, como descrito no item 6.8.

Após a avaliação do tamanho da lesão causada pelo fungo no vaso do xilema, cada planta testada, foi colocada em sacos de papel e submetidas a secagem em estufa a 37°C, por um período de cinco dias. Passado este período estas foram pesadas para a verificação de seus pesos secos e assim correlacionar estes dados com a ação do fungicida sobre a planta.

Todas as plantas tratadas com os fungicidas e inoculadas com *Ceratocystis* foram submetidas a testes de reisolamento em cenoura para verificar a ação do fungicida, se foi fungistática ou fungitóxica.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas por testes estatísticos de Tukey a 5% , realizados no programa Sisvar.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7. 1. Isolados Obtidos

No total foram obtidos 29 isolados de *Ceratocystis* de eucalipto, 2 de teca e 2 de atemóia. Além desses foram utilizados 4 isolados de manga e 18 isolados de cacau, cedidos por pesquisadores (Tabela 1). Em todas as áreas de eucalipto visitadas em que foi detectada a ocorrência de *Ceratocystis* foi notada a presença de escolitídeos, podendo este estar relacionado com disseminação deste fungo dentro de uma determinada área, visto que foi detectada a presença de *Ceratocystis* na maioria dos túneis escavados por estes insetos (Figura 7).

Tabela 1: Isolados utilizados no para desenvolvimento do trabalho
(Continua)

Isolado	Cidade	Hospedeiro
ACF1	Votuporanga/SP	Manga
ACF2	Votuporanga/SP	Manga
ACF3	Santa Bárbara d'Oeste/SP	Manga
ACF4	Tupi/SP	Manga
ACF5	Camacan/BA	Cacau
ACF6	Canavieiras/BA	Cacau
ACF7	Barra da Rocha/BA	Cacau
ACF8	Camacan/BA	Cacau
ACF9	Ilhéus/BA	Cacau
ACF10	Camacan/BA	Cacau
ACF11	Ilhéus/BA	Cacau
ACF12	Camacan/BA	Cacau
ACF13	Camacan/BA	Cacau
ACF14	Ilhéus/BA	Cacau
ACF15	Itacaré/BA	Cacau
ACF16	Belém/PA	Cacau
ACF17	CEPEC/CEPLAC/BA	Cacau
ACF18	Itamari/BA	Cacau
ACF19	Itajuípe/BA	Cacau
ACF20	Nazaré/BA	Cacau
ACF21	Camacan/BA	Cacau
ACF22	Ferradas/BA	Cacau
ACF23	Botucatu/SP	Atemóia
ACF24	Botucatu/SP	Atemóia
ACF25	Montes Claros/MG	Eucalipto
ACF26	Montes Claros/MG	Eucalipto
ACF27	Araraquara/SP	Eucalipto
ACF28	Itararé/SP	Eucalipto
ACF29	Itararé/SP	Eucalipto
ACF30	Itararé/SP	Eucalipto

Tabela 1: Isolados utilizados no para desenvolvimento do trabalho
(Conclusão)

Isolado	Cidade	hospedeiro
ACF31	Avaré/SP	Eucalipto
ACF32	Avaré/SP	Eucalipto
ACF33	Avaré/SP	Eucalipto
ACF34	Avaré/SP	Eucalipto
ACF35	Avaré/SP	Eucalipto
ACF36	Agudos/SP	Eucalipto
ACF37	João Pinheiro/MG	Eucalipto
ACF38	João Pinheiro/MG	Eucalipto
ACF39	Manduri/SP	Eucalipto
ACF40	Olhos D'agua/MG	Eucalipto
ACF41	Parauapeba/MG	Eucalipto
ACF42	Parauapeba/MG	Eucalipto
ACF43	Parauapeba/MG	Eucalipto
ACF44	Itatinga/SP	Eucalipto
ACF45	Itatinga/SP	Eucalipto
ACF46	Itatinga/SP	Eucalipto
ACF47	Itatinga/SP	Eucalipto
ACF48	Itatinga/SP	Eucalipto
ACF49	Itatinga/SP	Eucalipto
ACF50	Cáceres/MT	Teca
ACF51	Cáceres/MT	Teca
ACF52	Bocaiuva/MG	Eucalipto
AFC53	Bocaiuva/MG	Eucalipto
ACF54	Bocaiuva/MG	Eucalipto
ACF55	Sete Lagoas/MG	Eucalipto

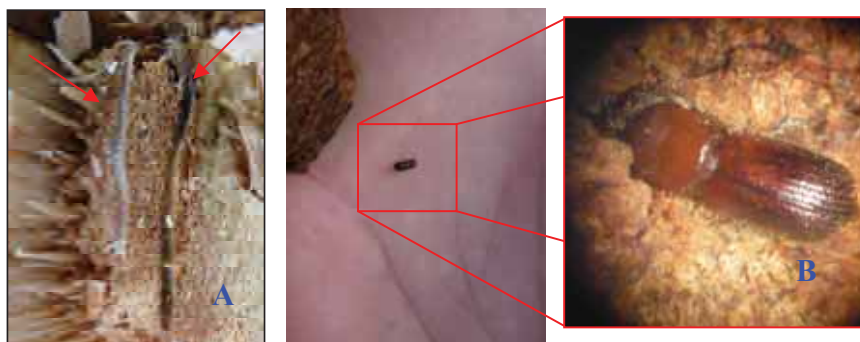


Figura 7: A: Túnel escavado pelo inseto com a presença do fungo *Ceratocytis*. B: Escolitídeo encontrado nas áreas com ocorrência de *Ceratocystis* sp.

7.2. Caracterização patogênica dos isolados obtidos

Todos os isolados foram patogênicos aos seus hospedeiros de origem como pode ser visto na tabela 2.

Nos testes realizados em plantas de eucalipto foi observada uma grande variação do tamanho das lesões (Figura 8). No Estado de São Paulo, os isolados que apresentaram maiores lesões foram coletados na região de Itararé, Avaré e Itatinga, com lesões que variaram de 5,38 a 7,00 cm. Na cidade de Itatinga, foi verificada a presença de uma grande variação de agressividade dentro de uma mesma região, ressaltando assim a importância da reprodução sexuada deste fungo, que pode gerar indivíduos altamente variáveis em um mesmo local, dando a este fungo a oportunidade de adaptação e sobrevivência. Os isolados pertencentes à cidade de Araraquara, Agudos e Manduri apesar de terem lesões medianas, foram capazes de causar murcha na planta.

No Estado de Minas Gerais os isolados que induziram maiores lesões pertencem à região de João Pinheiro, Olhos d'Água, Bocaiúva e Sete Lagoas, apresentando lesões de 5,25 a 6,75 cm. Na região de Bocaiúva, também foram obtidos isolados variáveis em relação a tamanho da lesão como pode ser observado na tabela 2. Os isolados da região de Montes Claros (MG) apresentaram baixa agressividade, não causando murcha aparente na planta inoculada.

Ainda em plantas de eucalipto, foi observado que estas quando inoculadas com isolados procedentes de cacau, manga, atemóia e teca, demonstraram escurecimento de seu xilema, mesmo que pequeno, quando comparados com o tamanho das lesões causadas pelos isolados de eucalipto. Esta informação, juntamente com o fato de que a maioria destes isolados foi capaz de crescer em isca de cenoura quando reisolados (tabela 3) de plantas de eucalipto mostra que este fungo é capaz de se adaptar e invadir os vasos de outros hospedeiros, que não estejam relacionados com seu hospedeiro de origem.

Nos testes de patogenicidade realizados em plantas de cacau todos os isolados de cacau testados foram altamente agressivos, levando as plantas a murcharem 15 dias após a inoculação. Cerca de 25 dias após a inoculação estas plantas estavam mortas (Figura 9).

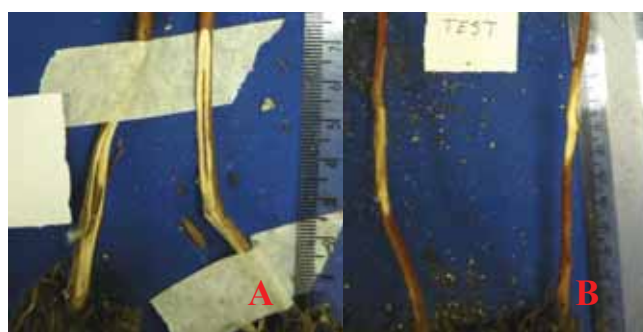


Figura 8: Exemplo do sintoma de escurecimento vascular observado em plantas de eucalipto inoculadas com isolados de *Ceratocystis*. **A.** Isolado ACF44 de eucalipto.; **B.** Testemunha.



Figura 9: Plantas de cacau inoculadas com *Ceratocystis*. **A.** Isolado ACF42 de eucalipto; **B.** Isolado ACF51 de teca; **C.** Isolado ACF2 de manga; **D.** Isolado ACF5 de cacau; **E.** testemunha

Nos testes de patogenicidade cruzada realizada com plantas de cacau, foi observada que somente os isolados provindos de atemóia, manga e um de teca foram capazes de causar escurecimento dos vasos do xilema desta planta e levá-la a morte cerca de 30 dias após sua inoculação (Figura 9). Os isolados de eucalipto não causaram lesões significativas e não induziram murchas da planta no decorrer do experimento, mostrando que estes isolados não são capazes de causar doença em plantas de cacau (Tabela 2). Na etapa de reisolamento, foi possível a recuperação somente dos isolados capazes de causar doença nestas planta (tabela 3). Estes mesmos resultados foram observados por Baker et al. (2003), os quais também observaram que os isolados de eucalipto testados por eles não foram capazes de infectar plantas de cacau. Estes autores observaram que plantas de cacau, batata-doce e *Platanus* sp. são suscetíveis somente a isolados de *Ceratocystis* provindos de seus respectivos hospedeiros.

Vários mecanismos de resistência podem contribuir para a especialização de um fungo a um hospedeiro. Varias fitoalexinas é elicitada em *Platanus* sp. (MODAFAR et al., 1995; ALAMI; MARI; CLERIVET, 1998) e em plantas de batata doce (SHAODONG; HESHENG, 1995; OKUMURA et al., 1999) quando inoculadas com *Ceratocystis fimbriata*. Várias destas fitoalexinas, especialmente fatores de aglutinação e furanoterpenoides, têm sido sugeridas como importantes na determinação da especialização a um hospedeiro por *Ceratocystis* (KAWAKITA; KOJIMA, 1986).

As plantas de manga, 20 dias após a inoculação já apresentavam sintomas de murcha para todos os isolados obtidos de manga (Figura 10). Cerca de 30 dias após a inoculação, todas estas plantas já apresentavam sintomas de seca, mostrando que todos os isolados usados são altamente agressivos. Nos testes de patogenicidade cruzada, um isolado de atemóia (ACF 23), um de cacau (ACF 9), um de teca (ACF 51) e quatro de eucalipto (ACF 27, ACF 37, ACF 54 e ACF 55) foram capazes de invadir os vasos das plantas de manga testadas e gerar lesões significativas, causando sintomas de murcha nas plantas.

Nas plantas de teca inoculadas não foi observada nenhuma variação entre o tamanho das lesões geradas pelos isolados testados, ambos levaram a planta a murchar 40 dias após sua inoculação ocorrendo à morte do ponteiro 90 dias após a inoculação. O mesmo vale para as plantas de atemóia testadas (Tabela 2 e Figura 11).



Figura 10: Planta de manga inoculada com isolado ACF1. À esquerda início do sintoma de murcha e à direita planta com 30 dias após a inoculação.

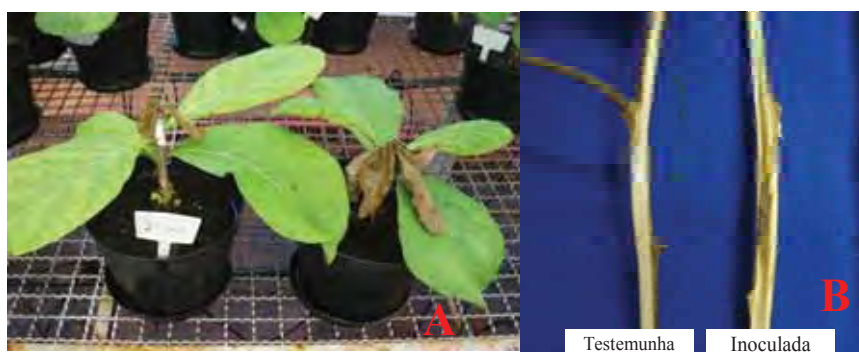


Figura 11: A. Muda de teca com seca de ponteiro 90 dias após a inoculação de *Ceratocystis* sp.; B. Lesão em muda de atemóia inoculada com isolado ACF23.

Barker e colaboradores (2003), realizando estudos de patogenicidade de isolados de *Ceratocystis* coletados de diferentes hospedeiros, também constataram uma variação de agressividade entre isolados de uma mesma espécie. Por exemplo, o isolado C1442 foi o mais agressivo dos três isolados de eucalipto testados pelos autores, enquanto o isolado denominado C1451 deixou de ser usado no decorrer do trabalho por não causar descoloração significativa do xilema. Os isolados de manga e cacau utilizados por estes autores apresentaram estas mesmas características. Neste mesmo trabalho, os autores atestam que os isolados de *Ceratocystis* de cacau, batata doce, *Platanus* sp., café, manga, eucalipto e

Gmelina sp., são mais agressivos em seus hospedeiros de origem, mas da mesma forma que o presente trabalho, estes autores constataram a ocorrência de patogenicidade cruzada. Por exemplo, isolados de cacau foram capazes de causar lesão no xilema de plantas de *Crotalaria* sp., sycarora e café, assim como em plantas de manga e eucalipto. Um isolado de eucalipto foi capaz de causar lesão no xilema de plantas de manga e *Crotalaria* sp. Do mesmo modo, um isolado de manga foi capaz de fazer o mesmo em plantas de eucalipto e de *Crotalaria* sp.

Estudando isolados do clado na América do Norte, Johnson et al (2005) também observaram, em testes de patogenicidade cruzada, que alguns isolados foram capazes de causar doença em plantas que não eram da espécie do seu hospedeiro original. Os autores notaram que mudas de cereja (*Prunus* sp) quando eram inoculadas com isolados de *Ceratocystis* provindos de *Quercus* sp., apresentavam descoloração do xilema similar quando eram inoculadas com isolados de *Ceratocystis* de cereja. O mesmo acontecia com plantas de *Carya* sp. e *Populus* sp. quando inoculadas com isolados de cereja.

Há relatos de isolados de *C. fimbriata* de *Syngonium* da Austrália que não conseguiram infectar *I. batatas*, *Platanus orientalis* ou *Prunus* spp. mas foram patogênicos para várias cultivares de *Syngonium* sp., *Caladium* sp., *Alocasia* sp. e *X. lindenii* (VOGELZANG; SCOTT, 1990), e isolados de *Colocasia* japoneses foram patogênicos a *I. batatas*, e de isolados japoneses de *I. batatas* serem patogênicos a plantas *I. batatas*, mas não para *Colocasia esculenta* (BAKER et al., 2003)

Tabela 2: Tamanho das lesões (cm) em plantas inoculadas com isolados de *Ceratocystis* sp.

(Continua)

Isolado		Plantas inoculadas								
		Eucalipto		Cacau		Manga		Atemoia		Teca
ACF1	Manga	2,75	d	3,00	b	12,37	d	-	-	-
ACF2	Manga	3,50	d	5,00	d	13,00	d	-	-	-
ACF3	Manga	2,13	c	-		11,75	d	-	-	-
ACF4	Manga	2,25	c	-		11,50	d	-	-	-
ACF5	Cacau	1,25	b	9,38	f	0,47	b	-	-	-
ACF6	Cacau	2,50	c	7,50	e	-		-	-	-
ACF7	Cacau	2,20	c	6,25	d	-		-	-	-
ACF8	Cacau	1,25	b	5,25	d	-		-	-	-
ACF9	Cacau	1,25	b	5,50	d	10,25	d	-	-	-
ACF10	Cacau	2,63	c	4,75	c	-		-	-	-
ACF11	Cacau	Cacau	b	6,00	d	-		-	-	-
ACF12	Cacau	2,88	c	6,25	d	-		-	-	-
ACF13	Cacau	3,38	d	6,75	d	-		-	-	-
ACF14	Cacau	1,63	c	6,25	d	-		-	-	-
ACF15	Cacau	2,75	c	6,75	d	0,47	b	-	-	-
ACF16	Cacau	1,95	c	6,25	d	-		-	-	-
ACF17	Cacau	2,25	c	7,00	e	-		-	-	-
ACF18	Cacau	2,25	c	4,93	c	-		-	-	-
ACF19	Cacau	2,50	c	6,25	d	-		-	-	-
ACF20	Cacau	0,75	b	5,50	d	-		-	-	-
ACF21	Cacau	1,25	b	6,00	d	-		-	-	-
ACF22	Cacau	2,25	c	5,50	d	-		-	-	-
ACF23	Atemóia	1,75	c	5,38	d	2,62	c	12,00	b	-
ACF24	Atemóia	1,86	c	5,00	d	-		13,50	b	-
ACF25	Eucalipto	1,88	c	-		-		-	-	-
ACF26	Eucalipto	3,75	d	-		-		-	-	-
ACF27	Eucalipto	2,50	c	0,65	a	4,87	c	-	-	-

Tabela 2: Tamanho das lesões (cm) em plantas inoculadas com isolados de *Ceratocystis* sp.

(Conclusão)

Isolado		Plantas inoculadas									
		Eucalipto		Cacau		Manga		Atemóia		Teca	
ACF28	Eucalipto	5,38	e	-		-		-		-	
ACF29	Eucalipto	5,75	e	-		-		-		-	
ACF30	Eucalipto	6,38	e	0,62	a	0,42	b	-		-	
ACF31	Eucalipto	6,38	e	0,56	a	-		-		-	
ACF32	Eucalipto	5,88	e	-		-		-		-	
ACF33	Eucalipto	4,63	d	-		-		-		-	
ACF34	Eucalipto	5,63	e	-		-		-		-	
ACF35	Eucalipto	6,63	e	-		-		-		-	
ACF36	Eucalipto	2,38	c	-		-		-		-	
ACF37	Eucalipto	5,75	e	0,48	a	3,75	c	-		-	
ACF38	Eucalipto	6,25	e	-		-		-		-	
ACF39	Eucalipto	4,00	d	-		-		-		-	
ACF40	Eucalipto	5,50	e	-		-		-		-	
ACF41	Eucalipto	4,38	d	-		-		-		-	
ACF42	Eucalipto	3,75	d	0,51	a	-		-		-	
ACF43	Eucalipto	4,38	d	-		-		-		-	
ACF44	Eucalipto	7,00	e	-		-		-		-	
ACF45	Eucalipto	6,00	e	0,53	a	0,87	b	-		-	
ACF46	Eucalipto	3,75	d	-		-		-		-	
ACF47	Eucalipto	4,00	d	-		-		-		-	
ACF48	Eucalipto	3,13	c	-		-		-		-	
ACF49	Eucalipto	2,00	c	0,48	a	-		-		-	
ACF50	Teca	5,00	e	0,90	a	-		-		10,25	b
ACF51	Teca	0,75	b	2,63	b	5,62	c	-		12,20	b
ACF52	Eucalipto	3,75	d	-		-		-		-	
ACF53	Eucalipto	6,75	e	-		-		-		-	
ACF54	Eucalipto	3,88	d	0,70	a	6,75	c	-		-	
ACF55	Eucalipto	5,25	e	0,60	a	5,75	c	-		-	
testemunha		0,43*	a	0,51*	a	0,25*	a	0,55*	a	0,56*	a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente, segundo teste de Scott-Knott a 5% (dados transformados em $0,5\sqrt{x}$; Coeficiente de variação de eucalipto (21,45%), cacau (17,55%), manga (34,55%), teca (6,10%) e atemóia (7,22%)). (-) Isolados não testados. *Lesões decorrentes do ferimento no caule.

Tabela 3: Resultados do reisolamento de *Ceratocystis* a partir de plantas inoculadas no teste de patogenicidade.

(Continua)

Isolado	Planta Inoculada				
	Eucalipto	Cacau	Manga	Atemóia	Teca
ACF1	+	+	+	nt	nt
ACF2	-	+	+	nt	nt
ACF3	+	nt	+	nt	nt
ACF4	-	nt	+	nt	nt
ACF5	+	+	-	nt	nt
ACF6	+	+	nt	nt	nt
ACF7	-	+	nt	nt	nt
ACF8	-	+	nt	nt	nt
ACF9	+	+	+	nt	nt
ACF10	-	+	nt	nt	nt
ACF11	-	+	nt	nt	nt
ACF12	-	+	nt	nt	nt
ACF13	+	+	nt	nt	nt
ACF14	-	+	nt	nt	nt
ACF15	+	+	-	nt	nt
ACF16	+	+	nt	nt	nt
ACF17	-	+	nt	nt	nt
ACF18	+	+	nt	nt	nt
ACF19	-	+	nt	nt	nt
ACF20	+	+	nt	nt	nt
ACF21	-	+	nt	nt	nt
ACF22	+	+	nt	nt	nt
ACF23	+	+	+	+	nt
ACF24	+	+	nt	+	nt
ACF25	+	nt	nt	nt	nt
ACF26	+	nt	nt	nt	nt
ACF27	+	nt	+	nt	nt
ACF28	+	nt	nt	nt	nt
ACF29	+	nt	nt	nt	nt
ACF30	+	-	+	nt	nt
ACF31	+	-	nt	nt	nt
ACF32	+	nt	nt	nt	nt

Tabela 3: Resultados do reisolamento de *Ceratocystis* a partir de plantas inoculadas no teste de patogenicidade.

Isolado	(Conclusão)				
	Planta inoculada				
	Eucalipto	Cacau	Manga	Atemóia	Teca
ACF33	+	nt	nt	nt	nt
ACF34	+	nt	nt	nt	nt
ACF35	+	nt	nt	nt	nt
ACF36	+	nt	nt	nt	nt
ACF37	+	-	+	nt	nt
ACF38	+	nt	nt	nt	nt
ACF39	+	nt	nt	nt	nt
ACF40	+	nt	nt	nt	nt
ACF41	+	nt	nt	nt	nt
ACF42	+	-	+	nt	nt
ACF43	+	nt	nt	nt	nt
ACF44	+	nt	nt	nt	nt
ACF45	+	-	nt	nt	nt
ACF46	+	nt	nt	nt	nt
ACF47	+	nt	nt	nt	nt
ACF48	+	nt	nt	nt	nt
ACF49	+	-	nt	nt	nt
ACF50	+	+	+		+
ACF51	-	-	nt	nt	+
ACF52	+	nt	nt	nt	nt
ACF53	+	nt	nt	nt	nt
ACF54	+	-	+	nt	nt
ACF55	+	-	+	nt	nt
testemunh	-	-	-	-	-

(-): Reisolamento negativo; (+) reisolamento positivo; (nt): isolados não testados.

7.3 Acompanhamento da colonização do xilema de eucalipto por *Ceratocystis* sp.

Com base nos dados obtidos nos experimentos de patogenicidade em plantas de eucalipto, foram escolhidos cinco isolados de *Ceratocystis*, sendo um de cada hospedeiro estudados. Foram escolhidos os isolados que foram capazes de causar lesões nos

vasos de xilema de eucalipto e que foram reisolados com sucesso em iscas de cenoura (ACF 1, ACF15, ACF24, ACF38 e ACF50).

Como pode ser observado nas figuras 12 á 16, todo os isolados foram capazes de germinar, penetrar e se desenvolver nos vasos de plantas de eucalipto. Conforme pode ser observado, o isolado de cacau foi o que aparentemente teve o desenvolvimento mais lento dentro do período observado. Isso pode explicar o fato deste ter desenvolvido menores lesões nos teste de patogenicidade em eucalipto.

No período de seis horas após a inoculação, todos os isolados testados já haviam emitido o tubo germinativo e penetrado na planta. Foi observado a germinação de ascósporos, clamidósporos e de conídios do tipo cilíndrico neste periodo. É interessante ressaltar que este fungo parece usar os poros do xilema para invasão das células (Figura 17).

Doze horas após a inoculação, ocorreu um aumento da quantidade de micélio na região do xilema de todos os isolados testados. No caso dos isolados de manga e eucalipto, já é possível observar a formação de novos clamidósporos. Particularmente na superfície inoculada com o isolado de eucalipto, já é possível ver a formação de conidióforos. Além disso neste mesmo caso em particular é possível notar a presença de cristais de oxalato de cálcio, que não foram visualizados no período anterior analisado (Figura 18). Estes cristais este podem estar relacionados com a interação deste fungo com seu hospedeiro específico, assim este fato deve ser melhor estudado.

No período de vinte e quatro horas após a inoculação, com exceção do isolado de cacau, todos os outros isolados testados já apresentaram a formação de conidióforos cilíndricos. Em todos estes conidióforos é possível observar a saída dos esporos, indicando que neste período este fungo já esta apto a produzir conídios do tipo cilíndrico. Nas amostras inoculadas com os isolados de eucalipto, foi possível observar a presença de um segundo tipo de conidióforo, o que produz conídios do tipo doliformes (Figura 19). Estes dados corroboram os dados de caracterização morfológica, que apontam a formação deste tipo de conídio por este isolado estudado. A presença de conídios do tipo doliforme é de suma importância na identificação de espécies de *Ceratocystis*, visto que este tipo de conídio não é produzido por *Ceratocystis fimbriata*, única espécie até o momento relatada infectando eucalipto no Brasil.