

**Comportamento de *Ceratocystis* sp. “in vitro” sob diferentes temperaturas,  
meios de cultura e pH.**

***“In vitro” Ceratocystis sp. behavior under different temperatures, culture  
medium and pH.***

Paula Leite Santos <sup>1</sup>, Ana Carolina Firmino <sup>2</sup>, Hugo José Tozze Junior <sup>3</sup>, Susette Aparecida de  
Barros <sup>4</sup>, Edson Luiz Furtado <sup>5</sup>.

<sup>1, 2, 5</sup> Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP/Botucatu/Departamento de Proteção de Plantas-Defesa Fitossanitária.

<sup>3</sup> Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP/Piracicaba/Departamento de Fitopatologia e Nematologia.

<sup>4</sup> FREA- Fundação Regional Educacional de Avaré.

**Resumo**

O gênero *Ceratocystis* é um fungo cosmopolita sendo que no Brasil a principal espécie é *C. fimbriata*, causadora de doenças em muitas plantas de grande importância econômica. O trabalho objetivou avaliar o crescimento micelial nos meios: Aveia, BDA, MEA, AA, CE, CEA e V8-A. Para isso foram utilizados 14 isolados de *Ceratocystis* de diferentes hospedeiros. As colônias foram incubadas sob fotoperíodo alternado a 30°C, 25°C, 20°C e 15°C. Já para o estudo referente ao efeito do pH sobre o crescimento micelial de *Ceratocystis* foram usados 6 isolados. As colônias foram incubadas em fotoperíodo alternado (12h) a 25°C±2. Os testes foram realizados em meio MEA

(Malte, extrato de levedura e Agar) com diferentes faixas de pH: 5, 7 e 9. Em todos os experimentos cada tratamento foi constituído de quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Realizaram-se avaliações diárias até o primeiro contato de uma das colônias com a borda da placa, através de mensurações de diâmetros de cada colônia. Os meios CE e CEA foram os que propiciaram melhor crescimento ao fungo em todas as temperaturas, já meio de aveia e AA foram os que o fungo teve menor crescimento. A maior velocidade de crescimento foi observada na temperatura de 25°C. A maioria dos isolados não produziu estruturas sexuais em meio AA. O melhor crescimento para isolados de eucalipto e teca foi observado em meio com pH 7, já para o isolado de cacau não apresentou diferença significativa entre as diferentes faixas de pH trabalhadas

*Palavra chave:* Crescimento, Micélio, Caracterização.

### **Abstract**

The genus *Ceratocystis* fungus is a cosmopolitan and in Brazil the main species is *C. fimbriata*, which causes disease in many plants of great economic importance. The study aimed to evaluate the mycelial growth in the media: Oats, BDA, MEA, AA, CE, CEA, and V8-A. For this we used 14 isolates of *Ceratocystis* from different hosts. The colonies were incubated at 30 ° C under a photoperiod alternating, 25oC, 20oC and 15oC. As for the study on the effect of pH on the mycelial growth of *Ceratocystis* isolates were used 6. The colonies were incubated in alternating photoperiod (12h) at 25 ° C ± 2. The tests were performed on MEA medium (malt, yeast extract and agar) with different pH ranges: 5, 7 and 9. In all experiments each treatment consisted of four replicates in a randomized design. Evaluations were performed daily until the first contact one of the colonies with the edge of the board, through measurements of diameters of each colony. The means were the CE and CEA that provided better growth to the fungus at all temperatures, since the middle of oats and

AA were the fungus had lower growth. The fastest growth was observed in the temperature of 25oC. Most of the isolates did not produce sexual structures through AA. The best growth for isolated eucalyptus and teak was observed in medium with pH 7, while for the isolated cocoa showed no significant difference between the different pH ranges worked.

Keyword: growth, mycelium, characterization.

## 1. Introdução

O gênero *Ceratocystis* contempla diversas espécies 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* Ellis & Halsted é causador de doenças em muitas plantas lenhosas e em algumas herbáceas de importância econômica como, por exemplo, acácia negra (*Acácia mearnsii* De Wild), batata doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam], cacau (*Theobroma cacao* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), citrus (*Citrus* spp.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), figo (*Ficus carica* L.), gmelina (*Gmelina arborea* Roxb), mangueira (*Mangifera indica* L.) e seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell & Arg]. Em planta lenhosa, *C. fimbriata* é um típico patógeno de xilema (BAKER & HARRINGTON, 2004) cujo sintoma marcador é constatável nas secções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras (FERREIRA & MILANI, 2002), da medula para o exterior do lenho, ou da periferia do lenho para a medula, ou descoloração (mancha escura), 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)

*Xyleborus ferugineus* e *Hypocryphalus mangiferae* são considerados como os principais vetores da seca-do-cacaueiro (*Theobroma cacao*) e da seca-da-mangueira (*Mangifera indica*), respectivamente, causadas por *C. cacaofunesta* e *C. fimbriata* respectivamente, e provavelmente são beneficiados pela introdução do fungo no hospedeiro. Os fungos associados aos escolitídeos podem ser disseminados por micângia, por esporos aderentes ao corpo destes ou através de ácaros (FLECHTMANN et al., 1995).

Devido a relevância que este patógeno vem tomando, estudos sobre seu comportamento “in vitro” vem se tornando cada vez mais importantes para seu melhor conhecimento e também para otimizar alguns procedimentos no manuseio deste fungo em laboratório. Deste modo o objetivo do presente trabalho é verificar o comportamento de isolados de *Ceratocystis* sob diferentes temperaturas, meios de cultura e pH.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Crescimento micelial de *Ceratocystis* sp. em sete meios de cultura em diferentes temperaturas.**

Foram usados 14 isolados: 1 de manga (*Mangifera indica*), 10 de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), 1 de cacau (*Theobroma cacao*), 1 de Teca (*Tectona grandis*) e 1 de atemóia (*Annona* sp).

Os meios usados foram: : Aveia (2% de aveia, 1% de Ágar), BDA (Batata, Dextrose e Ágar-sintético), MEA (2% Malte; 0,2% Extrato de levedura, 1% de Ágar), AA (2% Amido, 1% Ágar), CE (100g Cenoura para 1L de água, batida no liquidificador, 1% Ágar), CEA (100g Cenoura para 1L de água batido no liquidificador, acrescida de 2% de amido e 1% Ágar) e V8-A (200 ml de sulco de tomate, 0,2% de CaCO<sub>3</sub>, 0,8g de oxgal para 1L de água, 1% Ágar).

Após autoclavados os meios foram vertidos (cerca de 25ml/placa) em placas de plasticos de 90mmx15mm. Decorrido a solidificação destes procedeu-se a transferência dos discos de micélio (6mm) dos isolados trabalhados para o centro das placas contendo o meio de interesse.

As colônias foram incubadas sob fotoperíodo (12/12h) alternado. E todos os meios foram submetidos as seguintes temperaturas: 30°C, 25°C, 20°C e 15°C.

Realizaram-se avaliações diárias até o primeiro contato de uma das colônias com a borda da placa. A avaliação do crescimento micelial foi realizada a partir da medição diária do diâmetro micelial da colônia em dois sentidos, perpendiculares.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta por uma placa de Petri. A velocidade média de crescimento micelial, expressa em mm/dia, foi utilizada para as análises estatísticas. Foi aplicado teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## **2.2. Efeito do pH sobre o crescimento micelial de *Ceratocystis* sp. *in vitro*.**

Foram usados 6 isolados: 4 de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), 1 de cacau (*Theobroma cacao*) e 1 de Teca (*Tectona grandis*).

Os testes foram realizados em meio MEA (2% Malte; 0,2% Extrato de levedura, 1% de Ágar) com diferentes faixas de pH: 5, 7 e 9. Após autoclavados os meios foram vertidos (cerca de

25ml/placa) em placas de plasticos de 90mmx15mm. Decorrido a solidificação destes procedeu-se a transferência dos discos de micélio (6mm) dos isolados trabalhados para o centro das placas contendo o meio de interesse.

As colônias foram incubadas sob fotoperíodo (12/12h) alternado sob temperatura de 25°C. Realizaram-se avaliações diárias até o primeiro contato de uma das colônias com a borda da placa. A avaliação do crescimento micelial foi realizada a partir da medição diária do diâmetro micelial da colônia em dois sentidos, perpendiculares.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, onde cada parcela experimental foi composta por uma placa de Petri. A velocidade média de crescimento micelial, expressa em mm/dia, foi utilizada para as análises estatísticas. Foi aplicado teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3. Resultados e Discussão**

Os meios CE e CEA foram os que propiciaram melhor crescimento do fungo em todas as temperaturas. Podendo estes serem usados para isolamento deste fungo com maior eficiência, visto que cenoura é usada como “isca” de isolamento para *Ceratocystis*. Os meios BDA e MEA propiciaram um crescimento mais homogêneo entre os isolados, sendo o meio MEA o indicado para caracterização cultural de *Ceratocystis*. O meio de aveia e AA foram os que o fungo tiveram menor crescimento.

A maior velocidade de crescimento foi observada na temperatura de 25°C. Nas temperaturas de 15 e 30°C foi observado um decréscimo da velocidade do fungo (Tabela 1, 2, 3 e 4) . A maioria dos isolados não produziu estruturas sexuais em meio AA.

Em relação ao pH . O melhor crescimento para isolados de eucalipto e teca foi observado em meio com pH 7, já para o isolado de cacau não apresentou diferença significativa entre as diferentes faixas de pH trabalhadas (Figura 1 e Tabela 5).

**Tabela 1:** Crescimento micelial (mm/dia) de isolados de *Ceratocytis* em diferentes meios a temperatura de 15°C.

isolado	15°C						
	AA	CEA	V8-A	AVEIA	MEA	BDA	CE
<b>13750</b>	3,13Fb	4,38Bd	3,13Db	2,54Ha	4,25Hc	4,25Fc	6,88Ke
<b>17</b>	3,13Fd	4,38Be	2,88Bc	2,50Ha	2,75Ab	2,75Bb	5,00Ef
<b>ate1</b>	2,88Dc	5,38Hf	2,75Ab	1,63Ca	3,38Cd	4,38Ge	6,5Jg
<b>Brot.</b>	1,88Ba	4,38Be	3,27Ed	1,87Ea	3,15Bc	2,78Bb	5,64Hf
<b>cepa</b>	3,13Fc	4,38Bf	3,02Cb	2,38Ga	4,03Fe	3,75Dd	6,25Ig
<b>comp d</b>	2,88Db	4,63Cf	4,38Je	1,56Ba	3,75Ed	3,63Cc	5,09Eg
<b>comp 3</b>	3,06Eb	5,31Gf	4,38Jd	1,25Aa	4,13Gc	5,25Je	5,63Hg
<b>JP1</b>	3,13Fb	4,75De	3,50Fc	1,56Ba	4,38Id	4,37Gd	6,50Jf
<b>Manduri</b>	2,50Cb	5,63Ig	2,88Bc	1,63Ca	4,38Id	4,50He	5,25Ff
<b>olhos</b>	4,38Ge	4,38Be	3,52Fc	1,75Da	3,38Cb	3,75Dd	5,38Gf
<b>Paraup.</b>	1,27Aa	4,87Ee	3,76Hc	1,56Bb	4,75Jd	3,75Dc	4,89De
<b>suz 08</b>	2,50Cb	4,25Ae	3,63Gc	1,63Ca	3,63Dc	4,00Ed	4,75Cf
<b>teca 09</b>	2,53Cb	5,06Ff	3,13Dc	1,88Ea	5,02Kf	4,65Ie	3,75Ad
<b>vcp 01</b>	3,14Fc	5,04Fg	4,08Id	2,08Fa	4,75Jf	2,56Ab	4,63Be
Média	2,82	4,77	3,45	1,84	3,98	3,88	5,43

\*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na diferem entre si na coluna  
 Médias seguidas de letras minúsculas distintas na diferem entre si na linha

isolado	20°C						
	AA	CEA	V8-A	AVEIA	MEA	BDA	CE
<b>13750</b>	2,55Ea	7,50Af	4,38Cc	3,13Hb	6,06Ce	5,81Cd	7,88Bg
<b>17</b>	1,88Cb	7,88Bg	3,13Ac	1,63Aa	5,00Ae	4,63Ad	7,50Af
<b>ate1</b>	3,75Gb	8,50Ef	5,63Ec	2,25Da	7,13Ge	6,94Hd	8,75Eg
<b>Brot.</b>	1,38Ba	7,88Bf	4,13Bc	2,5Eb	5,50Bd	6,38Fe	8,50Dg
<b>cepa</b>	2,25Da	7,50Af	5,63Ec	2,5Eb	7,00Fe	6,38Fd	8,13Cg
<b>comp d</b>	1,25Aa	8,04Cf	6,63Gd	2,50Eb	7,50Je	5,94Dc	8,88Fg
<b>comp 3</b>	1,25Aa	8,75Fg	5,63Ec	2,75Fb	7,94Ke	7,88Kd	8,50Df
<b>JP1</b>	1,88Ca	8,13Df	5,63Ec	2,13Cb	6,50De	6,13Ed	8,75Eg
<b>Manduri</b>	1,88Ca	8,13De	5,38Db	1,88Ba	7,31Id	6,50Gc	9,8Hf
<b>olhos</b>	1,25Aa	8,13Df	5,63Ec	3,00Gb	6,63Ee	6,38Fd	8,50Dg
<b>Paraup.</b>	1,25Aa	8,0Cf	5,38Dc	1,88Bb	7,19Hd	7,50Je	9,13Gg
<b>suz 08</b>	2,25Da	7,50Af	6,00Fc	3,13Hb	7,19He	6,38Fd	8,13Cg
<b>teca 09</b>	1,88Ca	8,5Ef	5,63Ec	2,5Eb	8,631Le	7,38Id	9,96Ig
<b>vcp 01</b>	2,88Fb	8,50Ef	5,38Dd	2,25Da	5,0Ac	5,63Be	9,98Ig
Média	1,97	8,06	5,09	2,35	6,54	6,44	8,74

\*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na diferem entre si na coluna  
 Médias seguidas de letras minúsculas distintas na diferem entre si na linha

**Tabela 3:** Crescimento micelial (mm/dia) de isolados de *Ceratocytis* em diferentes meios a temperatura de 25°C.

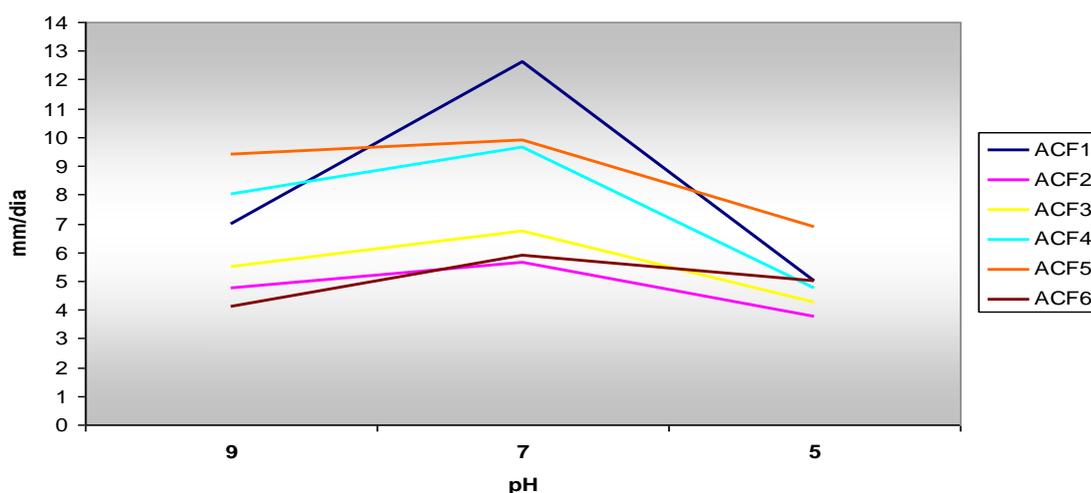
isolado	25°C						
	AA	CEA	V8-A	AVEIA	MEA	BDA	CE
<b>13750</b>	2,38Da	10,0Bf	5,25Fc	3,38Gb	8,13De	8,0Ed	10,0Cf
<b>17</b>	2,5Eb	5,75Af	3,63Ac	1,25Ba	5,31Ae	5,0Ad	8,13Bg
<b>ate1</b>	3,44Hb	9,98Bf	5,00Dc	3,38Ga	8,38Ee	7,75Cd	10,0Cf
<b>Brot.</b>	2,69Fb	10,0Bf	4,13Bc	1,88Ca	9,38Fe	8,13Fd	10,0Cf
<b>cepa</b>	1,88Ca	10,0Be	6,25Ic	3,69Hb	9,98He	9,13Id	10,0Ce
<b>comp d</b>	1,25Aa	9,96Be	6,44Kc	2,03Db	9,95He	9,38Jd	9,95Ce
<b>comp 3</b>	5,00Ib	10,00Be	6,00Hc	4,38Ja	9,38Fd	9,38Jd	10,0Ce
<b>JP1</b>	1,88Ca	10,0Bf	5,13Ec	2,00Db	7,00Cd	8,75He	10,0Cf
<b>Manduri</b>	1,38Ba	9,82Bf	4,44Cb	4,69Kc	9,80Hf	8,38Ge	7,50Ad
<b>olhos</b>	2,81Ga	9,98Bf	6,38Jd	3,38Gb	6,98Ce	6,13Bc	10,0Cf
<b>Paraup.</b>	1,25Aa	10,0Be	6,38Jc	4,01Ib	10,00He	8,75Hd	10,0Ce
<b>suz 08</b>	1,25Aa	9,90Be	6,38Jc	2,5Eb	6,38Bc	8,13Fd	9,91Ce
<b>teca 09</b>	3,44Hb	10,00Be	5,94Gc	1,07Aa	10,00He	7,81Dd	10,0Ce
<b>vcp 01</b>	1,25Aa	10,0Be	6,00Hc	3,13Fb	9,69Gd	10,00Ke	10,00Ce
Média	3,02	9,65	5,25	2,91	8,6	8,2	9,67

\*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na diferem entre si na coluna  
 Médias seguidas de letras minúsculas distintas na diferem entre si na linha

**Tabela 4:** Crescimento micelial (mm/dia) de isolados de *Ceratocytis* em diferentes meios a temperatura de 30°C.

isolado	30°C						
	AA	CEA	V8-A	AVEIA	MEA	BDA	CE
<b>13750</b>	1,25Aa	5,13Ce	3,06Bc	1,81Gb	5,19Ee	4,25Dd	5,50Dg
<b>17</b>	1,25Aa	5,25Dg	3,13Cc	1,5Cb	4,25Be	3,38Ad	4,38Af
<b>ate1</b>	2,81Ga	7,69Gf	3,94D4c	1,81Gb	5,25Fd	5,31He	7,69Jf
<b>Brot.</b>	1,69Db	4,06Ad	4,75Ge	1,56Da	6,25If	3,88Bc	7,0Fg
<b>cepa</b>	2,56Fa	8,63Ie	6,13Ic	5,19Kb	6,13Hc	7,50Jd	8,81Lf
<b>comp d</b>	2,38Eb	8,63If	4,69Fd	1,44Ba	6,63Je	3,94Bc	8,75Kg
<b>comp 3</b>	3,79Hb	8,94Kg	4,06Dc	2,69Ja	7,38Le	6,69Id	7,69Jf
<b>JP1</b>	3,81Hc	6,25Ee	3,06Bb	1,69Ea	4,94Cc	5,13Fd	7,06Gf
<b>Manduri</b>	1,25Aa	8,44Hg	4,5Ed	2,06Hb	6,69Jf	3,38Ac	6,56Ee
<b>olhos</b>	1,25Aa	4,50Bf	2,06Ac	1,75Fb	4,25Be	4,06Cd	4,69Bg
<b>Paraup.</b>	1,31Bb	8,88Jg	4,94Hd	1,25Aa	5,50Ge	3,88Ac	7,19Hf
<b>suz 08</b>	1,31Ba	8,6Ig	4,69Fc	1,56Db	6,75Ke	4,63Ec	6,56Ed
<b>teca 09</b>	1,63Ca	8,98K3g	4,01Dd	2,44Ib	3,25Ac	4,63Ee	5,19Cf
<b>vcp 01</b>	1,25Aa	7,56Fg	4,69Fc	1,56Db	5,06Dd	5,19Ge	7,31If
Média	1,96	7,25	4,12	2,02	5,53	4,48	6,74

\*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na diferem entre si na coluna  
 Médias seguidas de letras minúsculas distintas na diferem entre si na linha



**Figura 1:** Crescimento micelial (mm/dia) de isolados de *Ceratocytis* em meios com diferentes pHs.

**Tabela 5:** Crescimento micelial (mm/dia) de isolados de *Ceratocystis* meios com diferentes pHs.

Isolados	Hospedeiro	Faixa de pH (mm/dia)		
		9	7	5
ACF1	Eucalipto	7,00 Bb	12,63 Aa	5,00 Bc
ACF2	Eucalipto	4,75 Cda	5,63 Da	3,75 Cb
ACF3	Eucalipto	5,50 Ca	6,75 Ca	4,25 BCB
ACF4	Eucalipto	8,00 Abb	9,63 Ba	4,75 Bc
ACF5	Teca	9,38 Aa	9,88 Ba	6,88 Ab
ACF6	Cacau	4,13 Db	5,88 Cda	5,00 Ba

\*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si.  
Médias seguidas de letras minúsculas distintas na linha diferem entre si.

#### 4. Conclusão

Estes tipos de características obtidas da população de *Ceratocystis* sp. testada pode auxiliar em futuros estudos relacionados com a caracterização deste fungo. Além disso os resultados obtidos podem colaborar no entendimento da fisiologia do fungo *Ceratocystis* "in vitro" colaborando para um melhor cultivo deste em laboratório.

#### 5. Agradecimentos

Agradecemos a pesquisadora da Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura cacauera, 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.

#### 6. Referências

- BAKER, C.J.; HARRINGTON, T.C. *Ceratocystis fimbriata*. Surrey, England, CABI Publishing, 2004.
- FERREIRA, F.A.; MILANE, D. Diagnóstico visual e controle de doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. International Paper, Mogi-Guaçu, 2002.

FLECHTMANN, C.A.H.; COUTO, H.T.Z.; GASPARETO, C.L.; BERTI FILHO, E. *Scolytidae* em reflorestamento com pinheiros tropicais. Piracicaba, IPEF, 201p, 1995.

RIBEIRO, I.J.A. Doenças da mangueira. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Fº., A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Editores). **Manual de Fitopatologia**. (3ª Edição). Volume 2. Doenças das plantas cultivadas. Editora Agronômica Ceres Ltda, São Paulo; p.511 –524, 1997.

ROSSETTO, C.J.; RIBEIRO, I.J.A.; IGUE, T. III – Comportamento de variedades de mangueira, espécies de coleobrocas e comportamento de *Hypocryphalus mangiferae*. **Circular do Instituto Agrônomo**, 106, 44p, 1980.