

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

BRUNA FERREIRA DOS SANTOS

***Chaetomium*-like COMO POTENCIAL AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
*Ceratocystis fimbriata***

**MONTE CARMELO
2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

BRUNA FERREIRA DOS SANTOS

***Chaetomium-like* COMO POTENCIAL AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
*Ceratocystis fimbriata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Florestal, Campus Monte Carmelo, da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Firmino.

**MONTE CARMELO
2023**

BRUNA FERREIRA DOS SANTOS

***Chaetomium-like* COMO POTENCIAL AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
*Ceratocystis fimbriata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Florestal, Campus Monte Carmelo, da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Firmino.

Monte Carmelo, 14 de novembro de 2023.

Banca examinadora:

Prof. Dr. André Luiz Firmino
Orientador

Eliane Mayumi Inokuti
Membro da Banca

Fernando Garcia
Membro da Banca

**MONTE CARMELO
2023**

AGRADECIMENTOS

Aqui escrevo meus mais singelos agradecimentos, isso não é somente um trabalho, é a finalização de muita luta e dedicação a qual escolhi fazer. O marco deste ciclo é um sonho não só meu, mas de quem mais me motivou estar aqui, minha querida mãe Cicera Ferreira da Graça e irmãs, Thais Ferreira da Graça e Nicolly Ferreira dos Santos, vocês são o motivo da minha força, além de serem exemplos de amor, muita fé e perseverança.

Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Uberlândia e ao curso de Engenharia Florestal na qual pude ter a honra de me entregar para aprender com toda base e estrutura proporcionada, sem dúvidas um curso de excelente qualidade e de formidável importância.

Ao meu orientador, André Luiz Firmino que sempre me apoiou e foi essencial para todos os passos deste trabalho, além de toda experiência que me passou até eu chegar aqui para concluir essa etapa, ademais aos membros da banca, Mayumi e Fernando por ter aceitado o convite e por todo apoio, ajuda e trocas de conhecimentos.

Um agradecimento especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) na qual me proporcionou a capacidade e oportunidade da realização deste trabalho.

Ao laboratório de Microbiologia e Fitopatologia (LAMIF), sou imensamente grata pela oportunidade de desenvolver meu trabalho, e a todos que tive a honra de conhecer e aprender a cada troca diária.

Não menos importante, a todos meus colegas e amigos que fiz ao decorrer dessa trajetória, além de minha companheira por todo apoio e amor, vocês foram por muitos ciclos a base e a força para momentos da minha vida, imensa gratidão.

“Eu sempre fui um sonhador, e é isso que me mantém vivo”

(Racionais Mc)

RESUMO

O Brasil possui uma área de 7,53 milhões de hectares de florestas plantadas de *Eucalyptus*. Devido à alta produtividade e extensas áreas de cultivo, têm-se o favorecimento ao aparecimento de doenças, como a murcha-de-*Ceratocystis*. *Ceratocystis fimbriata* é um fungo habitante natural do solo e de grande importância florestal, pois possui difícil controle, prejudicando de forma significativa a produção de madeira e celulose. O gênero *Chaetomium*-like, tem se mostrado eficiente no controle de patógenos de plantas. Diante disso, o trabalho teve como objetivo realizar testes *in vitro* com *Chaetomium*-like, para avaliar seu potencial no controle de *C. fimbriata*. Foi utilizada a técnica do cultivo pareado com três repetições para cada isolado de *Chaetomium*-like frente a *C. fimbriata*. A multiplicação inicial dos isolados de *Chaetomium*-like e do patógeno foi realizada em placas de Petri contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, discos de micélio retirados da borda de culturas puras dos dois fungos foram repicados em lados opostos a um cm de distância da borda de novas placas de Petri contendo o meio BDA, e, como testemunha, o patógeno foi cultivado isoladamente. Após 14 dias, de acordo com a Escala Bell, foram selecionados os isolados mais agressivos: CT05B, CT07B, CT08A, CT13A e CT13B. Foram realizados testes de inibição de germinação dos esporos com os isolados selecionados no teste anterior. Foi preparada uma suspensão de esporos com 10 mL de água destilada esterilizada que foi transferida em placas de Petri, onde o micélio fúngico foi raspado anteriormente com palito de dente. Cada suspensão foi ajustada para a concentração de 10^6 conídios/mL com o auxílio da câmara de Neubauer. Foram depositados 15 μL de cada suspensão de cada isolado que foram homogeneizados com suspensão do isolado de *C. fimbriata* em 5 lâminas de microscopia esterilizadas dentro de placas de Petri com duas camadas de papel germitest umedecidos. Após 72 horas de incubação em B.O.D a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ foi depositada uma gota de lactofucsina para interromper o processo de germinação/crescimento. Foram testados 21 isolados no teste de pareamento, onde cinco isolados foram mais agressivos (CT05B, CT07B, CT08A, CT13A e CT13B). Em microscópio óptico de luz foi possível observar que os cinco isolados selecionados inibiram a germinação dos conídios do patógeno (*C. fimbriata*). Assim, conclui-se que os cinco isolados testados são eficientes em controlar *C. fimbriata in vitro*.

Palavras-chave: Biodiversidade. Bioprospecção. Doença de solo. Fitopatógeno. Murcha do eucalipto.

ABSTRACT

Brazil has an area of 7.53 million hectares of planted Eucalyptus forests. Due to high productivity and extensive cultivation areas, there is a predisposition to the occurrence of diseases such as Ceratocystis wilt. *Ceratocystis fimbriata* is a soil-inhabiting fungus of significant forestry importance, known for its challenging control and substantial negative impact on wood and cellulose production. The Chaetomium-like genus has demonstrated effectiveness in plant pathogen control. Therefore, the objective of this study was to conduct in vitro tests with Chaetomium-like isolates to evaluate their potential in controlling *C. fimbriata*. The paired culture technique with three repetitions for each Chaetomium-like isolate against *C. fimbriata* was employed. Initial multiplication of Chaetomium-like isolates and the pathogen occurred in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) and were maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Subsequently, mycelial discs from the pure cultures of both fungi were transferred to opposite sides, 1 cm apart, from the edge of new Petri dishes containing PDA. The pathogen was also cultured separately as a control. After 14 days, the most aggressive isolates (CT05B, CT07B, CT08A, CT13A, and CT13B) were selected based on the Bell Scale. Inhibition tests of spore germination were then conducted with the selected isolates. A spore suspension was prepared with 10 mL of sterilized distilled water, transferred to Petri dishes where fungal mycelium had been previously scraped with a toothpick. Each suspension was adjusted to a concentration of 10^6 conidia/mL using a Neubauer chamber. Fifteen μL of each isolate suspension were deposited and homogenized with *C. fimbriata* suspension on five sterilized microscope slides within Petri dishes containing two layers of moistened germitest paper. After 72 hours of incubation at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in a B.O.D incubator, a drop of lacto-fuchsin was deposited to halt the germination/growth process. Twenty-one isolates were tested in the pairing test, with five isolates (CT05B, CT07B, CT08A, CT13A, and CT13B) proving to be the most aggressive. Optical microscopy revealed that these five isolates inhibited the germination of *C. fimbriata* conidia. Therefore, it is concluded that the five isolates tested are efficient in controlling *C. fimbriata* in vitro.

Keywords: Biodiversity. Bioprospecting. Soil disease. Phytopathogen. Eucalyptus wilt.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Teste de antagonismo no primeiro dia, <i>Ceratocystis fimbriata</i> à direita sendo repicado antes do isolado de <i>Chaetomium-like</i>	8
FIGURA 2: Produção da suspensão de esporos. A) Técnica de raspagem do micélio para obter a suspensão de esporos. B) Placa de Petri com isolado de <i>Ceratocystis fimbriata</i> raspado para produção de suspensão de esporos; C) Placa de Petri com isolado de <i>Chaetomium-like</i> raspado para produção da suspensão de esporos.....	9
FIGURA 3: Procedimento de homogeneização das gotas com suspensão do antagonista e do patógeno em lâmina de microscopia e (b) contagem dos conídios de <i>C. fimbriata</i>	10
FIGURA 4: Lâminas alocadas dentro de placa de Petri com cinco repetições (cinco gotas com as misturas das suspensões).....	10
FIGURA 5: Lâminas com a gota da suspensão de esporos, o corante lactofucsina e seladas com esmalte incolor para análise microscópica.....	11
FIGURA 6: Isolados do cultivo pareado entre <i>Ceratocystis fimbriata</i> (lado esquerdo) x <i>Chaetomium-like</i> . (lado direito).....	12
FIGURA 7: Isolados mais agressivos: A) CT05B; B) CT07B; C) CT08A; D) CT13A; e E) CT13B.....	14
FIGURA 8: Estruturas de reprodução sob visualização ótica.....	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala de Bell	8
Tabela 2. Isolados e suas notas segundo escala Bell.....	13

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. JUSTIFICATIVA.....	3
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
4.1 Localização da área de estudo e coleção de isolados.....	7
4.2 Teste de pareamento.....	7
4.3 Inibição da germinação de conídios de <i>Ceratocystis fimbriata</i> por <i>Chaetomium-like</i>	9
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
6. CONCLUSÕES.....	17
7. REFERÊNCIAS.....	18

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil possui cerca de 9,93 milhões de hectares de árvores plantadas, sendo que desta área total, 7,53 milhões de hectares são provenientes do plantio de *Eucalyptus* spp. (eucalipto), 1,93 milhões de hectares de *Pinus* spp. (pinus) e 475 mil hectares para as demais culturas florestais (IBÁ, 2022). Em 2021 a produtividade do eucalipto atingiu 38,9 m³/ha/ano, alcançando a maior produtividade desde 2014 (IBÁ, 2022). O setor florestal vem apresentando grande expansão desde a década de 70, e com isso, a ocorrência de pragas e doenças concomitantemente aumentam, na qual, precisam ser controladas para que não haja impactos maiores na sua produtividade e qualidade (FERREIRA, 1989). A transmissão e o ataque de patógenos afetam as mais diversas culturas florestais, gerando impactos em plantios de grande escala desde o viveiro até a fase adulta. De acordo com Mafía *et al.* (2013), *Ceratocystis fimbriata* pode reduzir em até 87% do incremento volumétrico da madeira em plantios de eucalipto.

De acordo com Farr e Rossman (2023), no Brasil, já foram relatados mais de 665 patógenos em diversas espécies de eucalipto. Dentre eles, o fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted possui grande importância para a cultura pois é um habitante natural do solo, sendo, portanto, de difícil controle. O patógeno foi detectado causando doença no eucalipto pela primeira vez no Brasil em 1997 no Sudeste da Bahia, sendo a doença conhecida como murcha do eucalipto (FERREIRA *et al.*, 1999; FERREIRA, 2000). Em 2003 foi constatada a doença nos estados de Minas Gerais e São Paulo. Na última década, *C. fimbriata* passou a ter grande importância em plantios de eucalipto por ocasionar perdas de 14% no rendimento de celulose e de 87% de incremento volumétrico, visto que, (SILVA *et al.*, 2020).

O gênero *Ceratocystis* possui diversas espécies, porém no Brasil, poucas são relatadas. A espécie *C. fimbriata* pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Microascales e família Ceratocystiaceae (MYCOBANK, 2023). Possui peritécio globoso de cor marrom, na sua extremidade possui hifas ostiolares de coloração marrom claro a hialina. Suas estruturas reprodutivas são bem delimitadas para o gênero e marcadas com ascósporos hialinos e em formato de cartola (ENGELBRECHT; HARRINGTON 2005).

O patógeno penetra na planta através de ferimentos nas raízes, e uma vez dentro do hospedeiro, infecta o parênquima, floema e vasos do xilema, o que ocasiona a limitação na

translocação de água e nutrientes, impedindo o fluxo normal na planta, causando obstrução vascular e morte da planta (SILVA *et al.*, 2020). O patógeno permanece no sistema radicular e sobrevive no solo através de estruturas de resistência, chamadas de clamidósporos/aleuroconídios (CORREIA *et al.*, 2018). Estudos relatam a maior incidência de disseminação do patógeno após a rebrota, pois ferramentas utilizadas como, por exemplo, a motosserra, podem transportar o inóculo principal e disseminá-lo por todo o plantio. Por se tratar de um patógeno habitante do solo, o controle químico é inviável e ineficiente, fazendo com que a única alternativa até então, seja através do plantio de clones resistentes (FERREIRA *et al.*, 2013).

O controle biológico vem se tornando uma alternativa muito atrativa e cada dia mais usada nas mais diversas culturas agrícolas. Entretanto, no setor florestal, pesquisas voltadas para o controle biológico de doenças são bastante incipientes e sua utilização é praticamente inexistente. Os estudos existentes, datam de mais de 10 anos e foram restritos à utilização de *Clonostachys* e *Trichoderma* como agentes de controle contra o mofo-cinza (*Botrytis cinerea*) em viveiros (ZALDÚA; SANFUENTES, 2010). Por isso, a busca e o desenvolvimento de novos agentes de biocontrole, para controlar eficazmente doenças florestais em viveiro e campo, se apresenta como uma alternativa de interesse ambiental e comercial, a fim de reduzir a quantidade de inóculo na área e a ocorrência da doença.

O gênero *Chaetomium* tem sido eficiente no controle de patógenos em plantas, apesar de estudos serem escassos (MAGALHÃES, 2013). O gênero *Chaetomium* foi estabelecido em 1817 com a descrição da espécie tipo, *Chaetomium globosum* (AMES, 1961), sendo que atualmente possui 50 gêneros e 275 espécies (CONDÉ *et al.*, 2023), no Brasil ocorrem, atualmente, 19 espécies (COUTINHO *et al.*, 2007, BARBOSA *et al.*, 2012). *Chaetomium* pertence ao Filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Sordariales e família Chaetomiaceae, sendo um fungo habitante de solos, restos vegetais e plantas (PROKHOROV & LINNIK, 2011). O gênero *Chaetomium* possui características reprodutivas únicas como a presença de peritécio estiolados em que são anexados ao substrato por hifas com presença de “pelos” ornamentados com diferentes formas. Suas ascas são evanescentes, com ascósporos castanho escuros, unicelulares e limoniformes (MAGALHÃES, 2013).

3. JUSTIFICATIVA

O Eucalipto (*Eucalyptus* spp.) é um gênero pertencente da família Myrtaceae, originado na Austrália e ilhas da Oceania. Desde 1990, o Brasil se destacou em plantios comerciais de eucalipto, sendo o estado de Minas Gerais a região com a maior área plantada e destinada ao seu comércio (VITAL, 2007; IBÁ, 2022). Segundo a Indústria Brasileira de Árvores – IBÁ (2022), são 7,53 milhões de hectares de florestas plantadas do gênero *Eucalyptus*, além do mais, sua produtividade foi a maior desde 2014 atingindo 38,9 m³/ha/ano em 2021. Dessa forma, o Brasil possui enorme competitividade, sendo líder de produtividade, atingindo 10 vezes mais do que países líderes do mercado mundial (HOEFLICH, 2006), além do mais, o Brasil contribui com o PIB (produto interno bruto brasileiro) e é responsável por US\$11,3 bilhões por ano com as exportações (IBÁ, 2022). Ademais, devido a fatores desejáveis como: clima e solos favoráveis (KARLING, 2004), o crescimento e desenvolvimento do eucalipto se beneficia em um ótimo estabelecimento.

Desde a década de 1970, o desenvolvimento e incentivo às pesquisas relacionado a espécie de *Eucalyptus* vem do afinamento, da necessidade de produção e de tecnologias para suprir as demandas do setor florestal (VALVERDE *et al.*, 2012). Contudo, o eucalipto no Brasil, somado a fatores favoráveis ao uso da matéria prima para suprir as demandas existentes favorece concomitantemente o aumento de pragas e doenças na qual geram grandes perdas de produção ao setor florestal (FERNANDES, 2012).

Dentre tais enfermidades, destaca-se o fungo *Ceratocystis fimbriata*, que possui grande importância econômica causando a murcha-de-*Ceratocystis*, patógeno do xilema (BAKER; HARRINGTON, 2003).

Os primeiros danos da doença em *Eucalyptus* sp. ocorreram em 1999, sendo o primeiro relato no sudeste da Bahia em reflorestamentos de eucalipto (FERREIRA *et al.*, 1999; FERREIRA, 2000), porém, em 1935 sucedeu o primeiro relato em *Crotalaria juncea* L. no estado de São Paulo (COSTA; KRUG, 1935). A murcha-de-*Ceratocystis* é a única constatada nos países da América como o Brasil e Uruguai sendo a doença registrada também na República do Congo, África do Sul e Uganda (ROUX *et al.*, 2000, 2001, 2004). Em Minas Gerais o primeiro relato da doença ocorreu em 2001 em plantios monoclonais de eucalipto (FERREIRA *et al.*, 2006).

Há uma grande diversidade de espécies de *Ceratocystis* em que estão fortemente associadas com insetos como forma de disseminação da doença, no entanto, pouco são os estudos para saber se existe um vetor de *C. fimbriata* em eucalipto, contudo, ferramentas usadas nos tratamentos silviculturais podem transmitir o patógeno (WALTER, 1946; WALTER *et al.*, 1952; TEVIOTDALE; HARPER, 1991). Durante sua colonização no interior dos tecidos, as estruturas de reprodução tem capacidade de germinar em até 6h (FIRMINO *et al.*, 2015) e em plantios monoclonais com 18 meses pode gerar a morte de mais de 40% da população (FERREIRA *et al.*, 2006). Após a infecção, ocorre a murcha da copa podendo se estender para os galhos, consequentemente levando a planta à morte (FERREIRA *et al.*, 2006).

A espécie *C. fimbriata* possui grande importância, causando grande impacto por ser um patógeno habitante do solo, e consequentemente, de difícil controle. Os sintomas da doença podem ser observados após um ano da infecção, caso a infecção ocorra no solo através do sistema radicular. Quando a muda já apresenta o inóculo, os sintomas podem ser observados a partir de seis meses (FERREIRA *et al.*, 2013). O fungo *C. fimbriata* ataca o xilema no sentido radial das células de parênquima, causando a obstrução deste. Com isso, a planta infectada apresenta como sintoma característico estrias radiais escuras nas secções transversais, saindo da medula até o exterior do lenho (FERREIRA; MILANE, 2002; FERREIRA *et al.*, 2006). São escassos os estudos para controle da doença, sendo que o mais recomendado é a queima dos galhos infectados, porém, em eucalipto, não há relatos desse tipo de controle, somente o plantio de genótipos resistentes ao fungo (ZAUZA *et al.*, 2004; ALFENAS *et al.*, 2009; MAFIA *et al.*, 2011).

No Brasil, o controle contra fitopatógenos baseia-se, principalmente, no controle químico, sendo o país responsável por 19% do uso dos agrotóxicos produzidos no mundo, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para a cultura de *Eucalyptus* spp., o método mais eficiente para o controle tem sido a seleção de genótipos resistentes (ZAUZA *et al.*, 2004), contudo, a variabilidade de *Ceratocystis fimbriata* pode ocasionar o insucesso de melhoramentos genéticos em que possuem uma base de poucos genótipos.

Novos estudos têm abordado o controle biológico como alternativa e subsídios do uso de químicos, visto que, nem sempre o uso de agrotóxicos é satisfatório, resultando na busca por biológicos (MORANDI E BETTIOL, 2009). Segundo BAKER e COOK (1974) o controle biológico

se baseia na eliminação ou redução do inóculo e atividades do patógeno por ações de organismos naturais de antagonistas. Além disso, favorece a qualidade do solo e protege o sistema radicular (BERENDSEN *et al.*, 2012; VAN ELSAS *et al.*, 2012).

Diferentes espécies de *Chaetomium*-like apresentam diversas funcionalidades e resultados importantes, como estímulo no crescimento de plantas e produção de ergosterol que estimulam a camada de húmus nos solos (MAGALHÃES, *et al* 2013).

Pouco são os estudos referente ao gênero, porém, espécies do gênero *Chaetomium*-like tem-se mostrado eficiente, como o caso de *Chaetomium globosum* contra *Phytophthora* spp, em que, possui capacidade de secretar as enzimas glucanases e celulasas, se tornando potencial para agente de biocontrole (MADBOULY; ABDEL-WARETH 2020). Algumas espécies são capazes de produzir uma substância chamada “chetomim”, um antibiótico que age sobre bactérias gram-positivas sendo importante no controle biológico. Ademais, *Chaetomium*-like tem a capacidade de induzir resistência nas plantas induzindo uma onda localizada oxidativa subsistêmica (OXB), na qual as plantas geram espécies de oxigênio ativo (AOS) em que induz imunidade às plantas, conseqüentemente resistência em respostas ao ataque de fitopatógenos (MAGALHÃES, 2013).

2. OBJETIVO

Tendo em vista a importância econômica do eucalipto, é vital controlar qualquer fator que venha a interferir em sua produção. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo realizar testes *in vitro* com *Chaetomium*-like, a fim de avaliar o potencial biológico no controle de *Ceratocystis fimbriata*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização da área de estudo e coleção de isolados

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia – LAMIF da Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo. Os isolados utilizados no trabalho estavam na Coleção de culturas do laboratório armazenados em tubo com sílica. Foram recuperados 21 isolados de *Chaetomium*-like.

4.2 Teste de pareamento

Para avaliar o efeito antagônico de *Chaetomium*-like no crescimento micelial e reprodutivo de *Ceratocystis fimbriata*, foi utilizada a técnica do cultivo pareado com três repetições para cada isolado de *Chaetomium*-like. A multiplicação inicial, tanto dos isolados de *Chaetomium*-like quanto do patógeno foi realizada em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e mantidas em B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, discos de micélio retirados da borda de culturas puras dos dois fungos foram colocados em lados opostos a 1 cm de distância da borda de novas placas, sendo *C. fimbriata* colocado nas placas três dias antes do isolado de *Chaetomium* (Figura 1), devido seu crescimento ser mais lento (RODRIGUES *et al.*, 2018). Como testemunha, o patógeno foi cultivado isoladamente em placas de Petri contendo meio BDA, repicando um disco de micélio a um cm da borda das placas.

A avaliação foi realizada após 14 dias da repicagem dos dois isolados. Em seguida foi feita a avaliação dos melhores isolados a partir da escala de Bell *et al.* (1982) (Tabela 1).

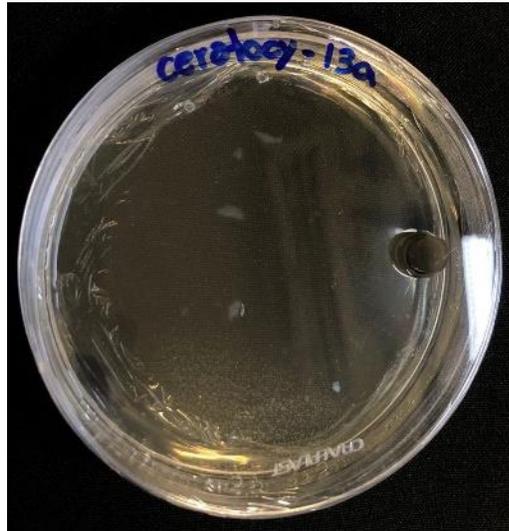


FIGURA 1: Teste de antagonismo no primeiro dia, *Ceratocystis fimbriata* à direita sendo repicado antes do isolado de *Chaetomium*-like.

Tabela 1: Escala de Bell et al. (1982).

NOTAS	ESCALA DE BELL
1	Antagonista cresce em 100% da placa
2	Antagonista cresce em 2/3 da placa
3	Antagonista e patógeno crescem até o meio da placa
4	Patógeno cresce em 2/3 da placa
5	Patógeno crescem 100% da placa

4.3 Inibição da germinação de conídios de *Ceratocystis fimbriata* por *Chaetomium*-like.

Para realizar as suspensões de esporos, os melhores isolados selecionados no teste de antagonismo foram repicados em placa de Petri contendo o meio de cultura BDA a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias. Posteriormente, foi adicionado 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri para produção de suspensão de esporos foi realizada a raspagem do micélio com o auxílio de palito de dente autoclavado (Figura 2).



FIGURA 2: Produção da suspensão de esporos. A) Técnica de raspagem do micélio para obter a suspensão de esporos. B) Placa de Petri com isolado de *Ceratocystis fimbriata* raspado para produção de suspensão de esporos; C) Placa de Petri com isolado de *Chaetomium*-like raspado para produção da suspensão de esporos.

Para cada suspensão, foi realizada a contagem de ascósporos (*C*-like) e conídios (*C.fimbriata*) em câmara de Neubauer e as suspensões foram ajustadas para a concentração de 10^6 ascósporos/mL seguindo a metodologia de SALCEDO *et al.* (2021) (Figura 3).

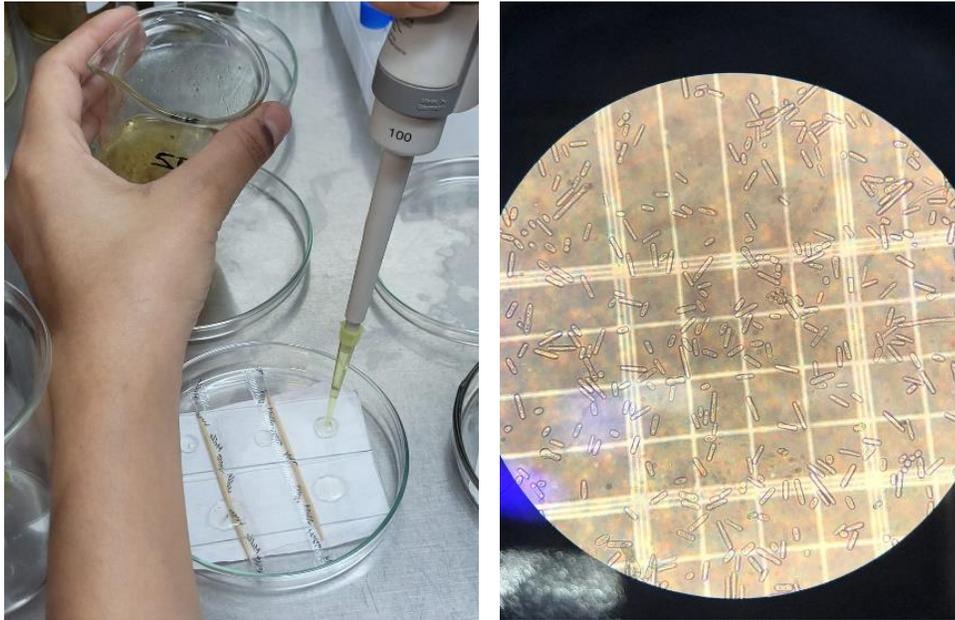


FIGURA 3: Procedimento de homogeneização das gotas com suspensão do antagonista e do patógeno em lâmina de microscopia e (b) contagem dos conídios de *C. fimbriata*.

Duas lâminas de microscopia foram alocadas dentro de placas de Petri sobre palitos de dente, e duas camadas de papel germitest umedecidos com água destilada esterilizada, de modo a manter a umidade e evitar o secamento das gotas (Figura 4). O conjunto foi autoclavado e após o resfriamento, cinco gotas de misturas de suspensões com $15\mu\text{l}$ (*Ceratocystis fimbriata* + cada isolado de *Chaetomium*-like) foram colocadas sobre as lâminas (repetições). Como testemunha foi realizado a suspensão dos ascósporos a 10^6 de *Ceratocystis fimbriata* com 5 repetições (gotas) sobre lâminas.

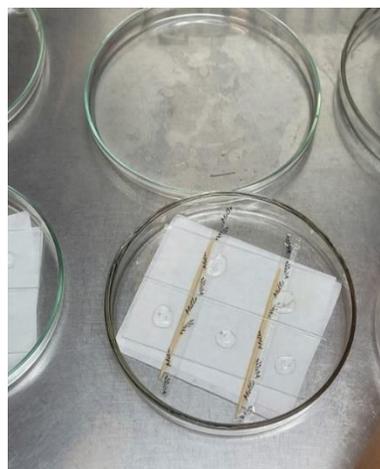


FIGURA 4: Lâminas alocadas dentro de placa de Petri com cinco repetições (cinco gotas com as misturas das suspensões).

Após 72h de incubação em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, foi depositado uma gota de lactofucsina para interromper o processo de germinação/crescimento dos fungos. Uma lamínula foi depositada sobre as gotas e vedadas com esmalte incolor em suas laterais, e, logo, foram examinadas sob microscópio óptico de luz (Figura 5). Os primeiros 100 conídios visualizados foram avaliados com relação à sua germinação e crescimento dos tubos germinativos. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação a lâmina controle contendo apenas *C. fimbriata*. Conídios com comprimento do tubo germinativo maior ou igual ao comprimento do seu diâmetro maior serão considerados como germinados (CAPUCHO, 2009; SALCEDO, 2021).

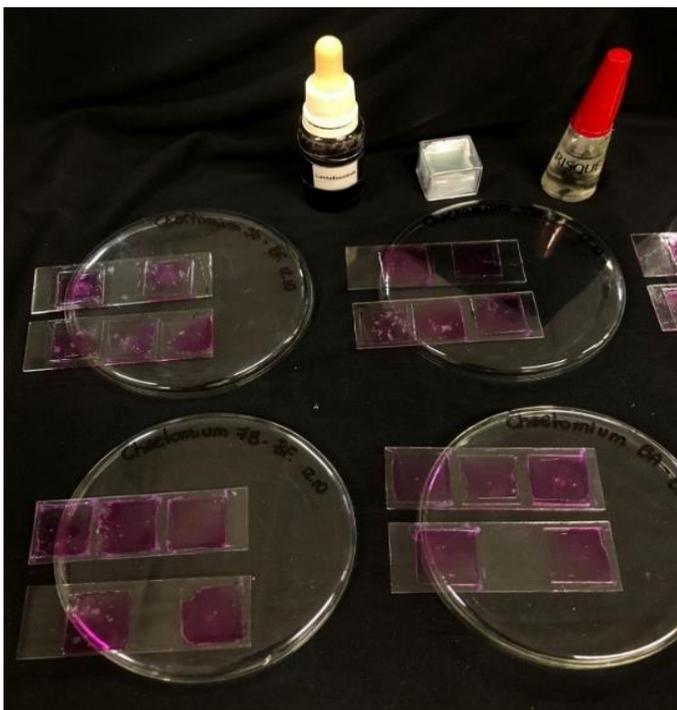


FIGURA 5: Lâminas com a gota da suspensão de esporos, o corante lactofucsina e seladas com esmalte incolor para análise microscópica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DE ANTAGONISMO

Foram recuperados 21 isolados para o teste de antagonismo. Todos os isolados do teste de pareamento foram analisados segundo escala de Bell *et al.* (1982) (Figura 6), e dispostos em tabela com suas notas referentes a proporção em que *Chaetomium*-like se sobrepõe sobre *C. fimbriata* (Tabela 2).

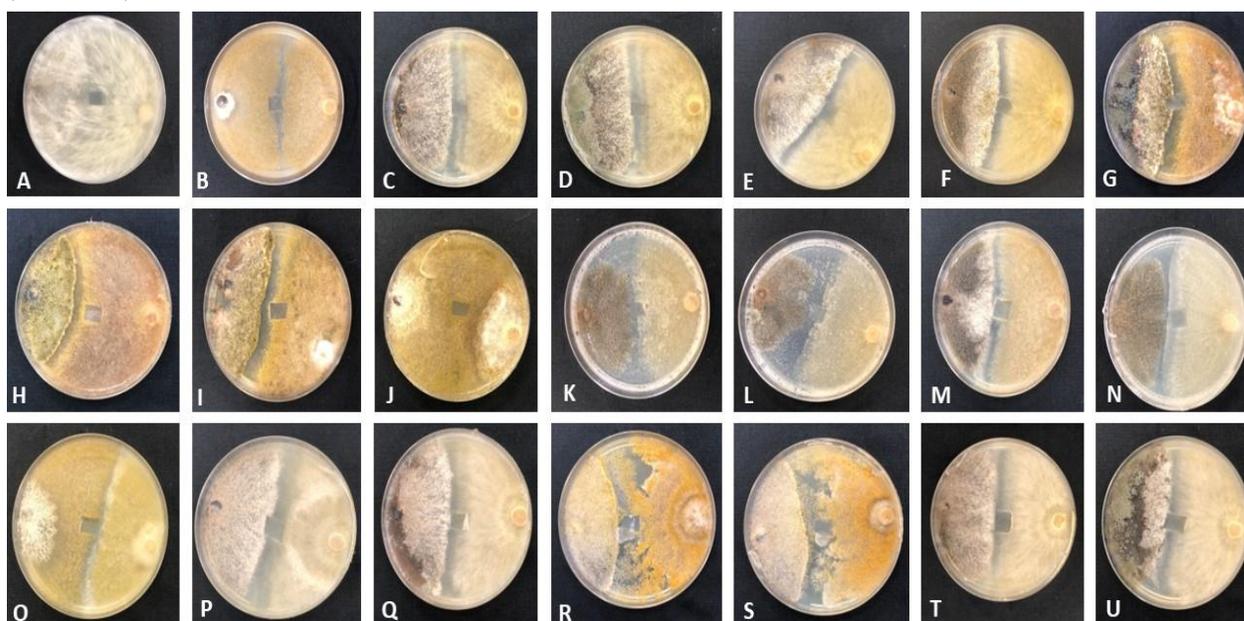


FIGURA 6: Isolados do cultivo pareado entre *Ceratocystis fimbriata* (lado esquerdo) x *Chaetomium*-like. (lado direito); A) CT01-A; B) CT01-B; C) CT-02A; D) CT02-B; E) CT03-A; F) CT03-B; G) CT05-A; H) CT05-B; I) CT07-B; J) CT08-A; K) CT08-B; L) CT09-A; M) CT09-B; N) CT11-A; O) CT11-B; P) CT12-A; Q) CT12-B; R) CT13-A; S) CT13-B; T) CT14-A; U) CT14-B.

Tabela 2: Isolados e suas notas segundo escala de Bell et al. (1982).

ISOLADO	NOTA
CT01-A	3
CT01-B	3
CT02-A	3
CT02-B	3
CT03-A	3
CT03-B	3
CT05-A	3
CT05-B	2
CT07-B	2
CT08-A	1
CT08-B	3
CT09-A	3
CT09-B	3
CT11-A	3
CT11-B	3
CT12-A	3
CT12-B	3
CT13-A	1
CT13-B	2
CT14-A	3
CT14-B	3

Dos isolados testados, foram selecionados os que tiveram nota 1 (antagonista cobrindo toda a placa) e 2 (antagonista cresce em 2/3 da placa). Sendo os melhores isolados: CT05B, CT07B, CT08A, CT13A e CT13B. Ou seja, estes isolados de *Chaetomium*-like cresceram sobre o patógeno e parasitaram as hifas de *C. fimbriata* de forma mais agressiva do que os outros isolados, segundo escala de Bell *et al.*, (1982).

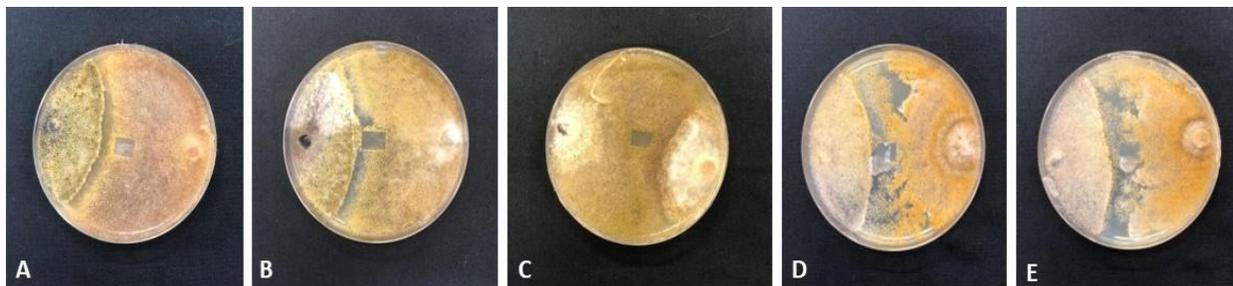


FIGURA 7: Isolados mais agressivos: A) CT05B; B) CT07B; C) CT08A; D) CT13A; e E) CT13B.

5.2 Inibição da germinação de conídios de *Ceratocystis fimbriata* por *Chaetomium*-like.

Em microscópio óptico de luz foi possível observar que os conídios dos isolados: CT05B, CT07B, CT08A, CT13A E CT13B quando inoculados com os conídios de *C. fimbriata* não germinaram quando comparados com a lâmina controle (somente com conídios de *Ceratocystis*), podendo afirmar que, *in vitro*, os isolados de *Chaetomium*-like selecionados no teste de pareamento foram capazes de inibir a germinação de *C. fimbriata*.

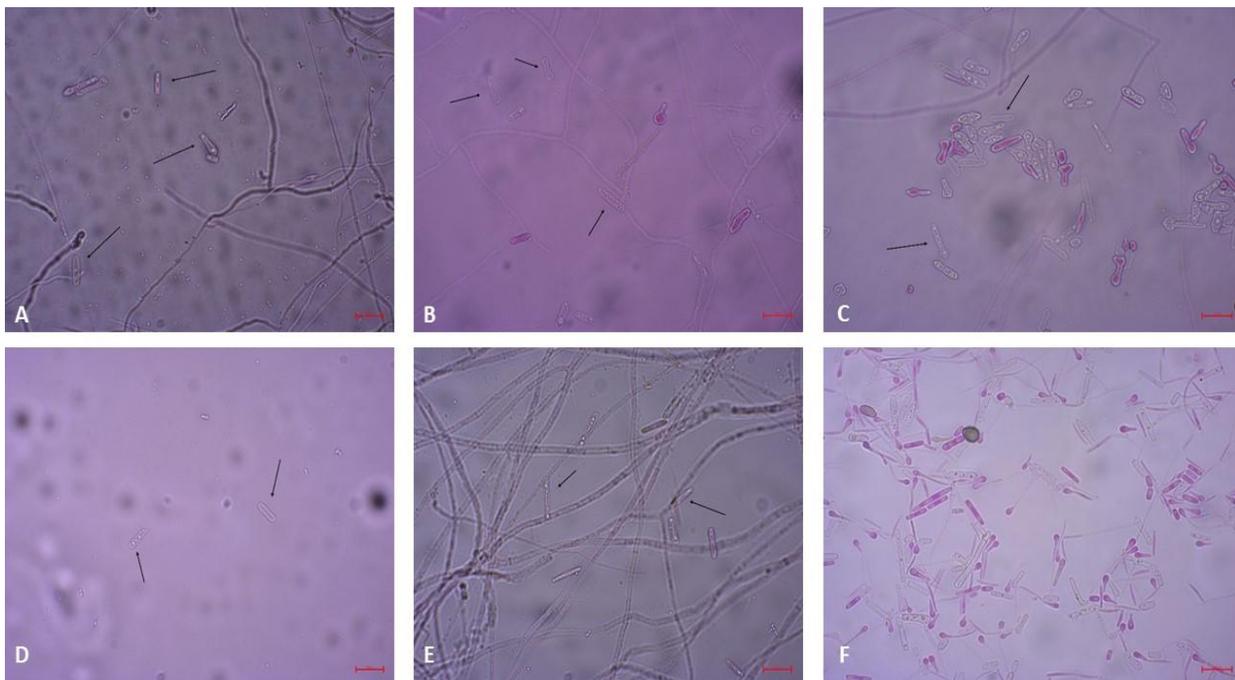


FIGURA 8: Estruturas de reprodução sob visualização ótica. A) Isolado CT05B: Conídios de *C. fimbriata* não germinados; B) Isolado CT07B: Conídios de *C. fimbriata* não germinados; C) CT08A: Conídios de de *C. fimbriata* não germinados; D) Isolado CT13A: Conídios de de *C. fimbriata* não germinados; E) Isolado13B: Conídios de de *C. fimbriata* não germinados; e F) Lâmina controle somente com *Ceratocystis fimbriata*; Barras: 10 μ m.

Chaetomium-like é um fungo que compete no ambiente por nutrientes contra fungos fitopatogênicos, secretando metabólitos e destruindo a parede celular de patógenos (KANOKMEDHAKUL,2006, MAGALHÃES, 2013). É conhecido por ser um fungo endofítico, sendo caracterizado onde pode permanecer por um determinado tempo no órgão interno da planta sem causar doença visível.

Fungos endofíticos como *Chaetomium*-like são fontes de diversos metabólitos secundários caracterizados por atividades biológicas, anticancerígenas e antimicrobianas. Para o gênero *Chaetomium* tem-se mais de 300 metabólitos secundários (ABDEL *et al.*, 2019) dentre eles chaetoglobina (GE *et al.*, 2008), esteróides polihidroxilados (QIN *et al.*, 2009), dentre outros. Possuem potenciais antifúngicos, anti-inflamatórios e podem até mesmo contribuir para o antagonismo contra patógenos (SUN *et al.*, 2006; RAGUCHANDER *et al.*, 2014).

Huang *et al.* (2007) em estudos citando *Chaetomium*-like confirma que o mesmo produz compostos como flavonoides que desempenham papéis importantes na produção de antioxidantes na planta, como no caso de *Nerium oleander* (HUANG *et al.*, 2007). Estudos com a espécie *C. globosum* relataram metabólitos chamados de quetominas que possuem atividades inibitórias sobre fungos patogênicos (TAKAHASHI *et al.*, 1990; QIN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2018). Foram relatados mecanismos de interações antagônicas como parasitismos e antibiose no controle de *Cochliobolus sativum* em cereais por *C. globosum* (AGGARWALL *et al.*, 2004) e inibição do crescimento micelial na requeima da batata causado por *Phytophthora infestans* (SHANTHIYAA *et al.*, 2013). Dentro da premissa florestal, SOYTONG *et al.* (2014) demonstram o eficiente controle da podridão branca das raízes causada por *Rigidoporus microporus* em seringueira, sendo *Chaetomium cupreum* o agente no biocontrole inibindo o crescimento micelial.

Tanto em campo quanto em ambientes controlados, há relatos de *C. cochliodes* controlando a queima de mudas de aveia adicionadas às sementes ou ao solo contra *Fusarium* spp. (TVEIT e WOOD, 1955). Além da ação de metabólitos eficazes para atividades contra fitopatógenos em testes de pareamento, espécies de *Chaetomium* também possuem funções na inibição de germinação de esporos, como mostra estudo de Zhang *et al.* (2016) de *Verticillium dahliae* na cultura do algodão.

Contudo, por meio de literaturas pode-se afirmar que os resultados referentes ao teste de antagonismo e inibição da germinação contra *Ceratocystis fimbriata* foi alcançado, deduzindo que seus diversos metabólitos podem ser a chave para o antagonismo em teste de pareamento e na inibição da germinação de *C. fimbriata*, concluindo que foi possível obter resultados neste estudo que corroboram com o potencial de isolados de *Chaetomium*-like como agentes de controle de fitopatógenos como o *C. fimbriata*.

6. CONCLUSÕES

1. Os isolados mais agressivos, de acordo com o teste de antagonismo, foram CT05B, CT07B, CT08A, CT13A e CT13B;
2. No teste de inibição de germinação em lâminas os isolados CT05B, CT07B, CT08A, CT13A e CT13B foram capazes de inibir o desenvolvimento do *Ceratocystis fimbriata*;
3. Os isolados CT05B, CT07B, CT08A, CT13A e CT13B tem potencial para ser utilizados *in vivo* como biocontrole de *C. fimbriata* em plantios de eucaliptos;
4. Estudos *in vivo* deverão ser conduzidos para sabermos se o resultado é corroborado com o que ocorreu *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZEEM, Ahmed M. (Ed.). **Recent developments on genus Chaetomium**. Springer Nature, 2019.
- AGGARWAL, Rashmi et al. Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. **Mycopathologia**, v. 157, p. 369-377, 2004.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 500p.
- AMES, Lawrence Marion. *A monograph of the Chaetomiaceae*. Army Research Office, 1961.
- BARBOSA, Flavia R., et al. Three *Chaetomium* species (Chaetomiaceae, Ascomycota) from the semi-arid region of Brazil. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, 2012, 12.1: 115-118.
- BAKER, K. F., et al. *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company., 1974.
- BAKER, Christine J., et al. Genetic variability and host specialization in the Latin American clade of *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, 2003, 93.10: 1274-1284.
- BELL, D. K. et al. In vitro antagonismo of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- BERENDSEN, Roeland L.; PIETERSE, Corné MJ; BAKKER, Peter AHM. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 2012, 17.8: 478-486.
- CAPUCHO, Alexandre Sandri, et al. Herança da resistência do Híbrido de Timor UFRV 443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2009, 44: 276-282.
- CONDÉ, Thiago Oliveira, et al. Shedding light on the darkness: a new genus and four new species in the 18ullet Chaetomiaceae from Brazilian neotropical caves revealed by multi-gene phylogenetic analyses. *Mycological Progress*, 2023, 22.7: 49.
- CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Fundamentos e desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. In: LOPES, U. P. MICHEREFF, S. L.(Eds.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife, PE: EDUFRPE, 2018. P. 1-16.
- COSTA, A. S. *Eine durch Ceratostomella hervorgerufene Welkekrankheit der Crotalaria juncea in Brasilien*. 1935. (COSTA; KRUG, 1935)

COUTINHO, Flavia Paiva, et al. New records of Ascomycota from Brazil. *Mycotaxon*, 2007, 101: 239-245.

ENGELBRECHT, Christine J. Baker; HARRINGTON, Thomas C. Intersterility, morphology and taxonomy of *Ceratocystis fimbriata* on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia*, 2005, 97.1: 57-69.

FARR DF, ROSSMAN AY (2023) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. [http:// nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/](http://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/).

FERNANDES, Bianca Vique. **Dinâmica espaço-temporal e quantificação dos danos e perdas da murcha de *Ceratocystis* em eucalipto na produção de carvão vegetal.** 2012.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal-principais doenças florestais no Brasil.** Viçosa, MG: SIF, UFV, 1989. 570 p.

FERREIRA, F. A. et al. **Murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto no Brasil.** Fitopatologia Brasileira, v.24, p.284, 1999. Suplemento

FERREIRA, F. A. Constatação rápida de *Ceratocystis fimbriata* na doença murcha de *Ceratocystis* em eucalipto, por meio de cortes histopatológicos à mão livre. **Fitopatologia Brasileira**, v.25. p. 372, 2000. Suplemento

FERREIRA, F. A.; MILANI, D. **Diagnose visual e controle das doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil.** Mogi-Guaçu: International Paper, 2002. 104 p.

FERREIRA, Francisco Alves, et al. Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. **Revista Árvore**, 2006, 30.2: 155-162.

FERREIRA, M. A.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. *Ceratocystis fimbriata* em espécies florestais e agronômicas no Brasil. In. **Patologia florestal: Desafios e perspectivas.** 1 ed. Lavras, MG: NEFIT, v. 1, p. 75-101, 2013.

FIRMINO, Ana Carolina et al. Colonização do xilema de eucalipto por *Ceratocystis* spp. isolado de diferentes hospedeiros. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 138-143, 2015.

GE, Hui Ming et al. Chaetoglobins A and B, two unusual alkaloids from endophytic *Chaetomium globosum* culture. **Chemical Communications**, n. 45, p. 5978-5980, 2008.

HOEFLICH, Vitor Afonso. Desenvolvimento florestal sustentável: requerimentos de uma sociedade. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2006.

HUANG, Wu-Yang et al. Endophytic fungi from Nerium oleander L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1253-1263, 2007.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES: **Relatório Anual IBÁ**. Brasília, Distrito Federal, 2022. Disponível em:< [relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf](#)>. Acesso em: 25 jul. 2023.

KANOKMEDHAKUL, Somdej, et al. Azafilonas antifúngicas do fungo *Chaetomium cupreum* CC3003. **Revista de Produtos Naturais**, 2006, 69.6: 891-895.

KARLING, Sueli. **Viabilidade de produção de Pinus em áreas ociosas nas propriedades rurais da região centro-sul paranaense**. 2004.

MADBOULY, Adel K.; ABDEL-WARETH, Marwa TA. The use of *Chaetomium* taxa as biocontrol agents. **Recent Developments on Genus Chaetomium**, 2020, 251-266.

MAFIA, Reginaldo Gonçalves, et al. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. **Revista Árvore**, 2011, 35: 817-824.

Mafia RG, Ferreira MA, Zauza EAV, Silva JF, Colodette JL, Alfenas AC (2013) Impact of Ceratocystis wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. **Forest Pathology**. doi: 10.1111/efp.12041.

MAGALHÃES, Stefânia Caixeta. *Chaetomium* spp.: **filogenia e controle biológico de fungos fitopatogênicos transmissíveis por sementes**. 2013.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: **Biocontrole de doenças de plantas: Uso e Perspectivas**. BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (eds.) Embrapa Meio Ambiente – Jaguariuna, 2009.

PROKHOROV, V. P.; LINNIK, M. A. Morphological, cultural, and biodestructive peculiarities of *Chaetomium* species. **Moscow university biological sciences bulletin**, 2011, 66: 95-101.

QIN, Jian-Chun et al. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from Ginkgo biloba. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 6, p. 1572-1574, 2009.

RAGUCHANDER, T. et al. *Chaetomium globosum*: a potential biocontrol agent for the Oomycetes pathogens. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 44, n. 4, p. 393-404, 2014.

RODRIGUES, Giselle de Souza, et al. Antagonismo de *Trichoderma* spp. ao agente etiológico da Murcha de *Ceratocystis* em cacauzeiro. **Summa Phytopathologica**, 2018, 44: 72-78.

ROUX, Jolanda, et al. A serious new wilt disease of Eucalyptus caused by *Ceratocystis fimbriata* in Central Africa. **Forest Pathology**, 2000, 30.3: 175-184.

ROUX, J.; WINGFIELD, M. J.; BYABASHAIJA, D. Mujuni. First report of *Ceratocystis* wilt of *Acacia mearnsii* in Uganda. **Plant Disease**, 2001, 85.9: 1029-1029.

ROUX, J. v, et al. *Ceratocystis* species infecting stem wounds on Eucalyptus grandis in South Africa. **Plant Pathology**, 2004, 53.4: 414-421.

SALCEDO-SARMIENTO, Sara, et al. Elucidating the interactions between the rust *Hemileia vastatrix* and a *Calonectria* mycoparasite and the coffee plant. **Isience**, 2021, 24.4.

SHANTHIYAA, V., et al. Use of *Chaetomium globosum* for biocontrol of potato late blight disease. **Crop Protection**, 2013, 52: 33-38.

SILVA, A. C.; BETANCOURTH, B. M. L.; FERREIRA, D. C.; ELERATI, T. L.; RODRIGUES, F. Á.; ALFENAS, A.C.. Responses of resistant and susceptible hybrid clones of *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* to infection by *Ceratocystis fimbriata*. **Annals Of Forest Science**, v. 77, n. 45, p. 1-19, 21 jan. 2020.

SOYTONG, Kasem, et al. Biological control of white root of rubber trees using *Chaetomium cupreum*. **Journal of Agricultural Technology**, 2014, 10.1: 93-103.

SUN, Hui et al. Purification and properties of a β -1, 3-glucanase from *Chaetomium* sp. that is involved in mycoparasitism. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 131-135, 2006.

TAKAHASHI, Masanao; KOYAMA, Kiyotaka; NATORI, Shinsaku. Four new azaphilones from *Chaetomium globosum* var. *flavo-viridae*. **Chemical and Pharmaceutical bulletin**, v. 38, n. 3, p. 625-628, 1990.

TEVIOTDALE, B. L., et al. Infection of pruning and small bark wounds in almond by *Ceratocystis fimbriata*. **Plant Disease**, 1991, 75.10: 1026-1030.

TVEIT, M.; WOOD, R. K. S. The control of *Fusarium* blight in oat seedlings with antagonistic species of *Chaetomium*. **Annals of Applied Biology**, v. 43, n. 4, p. 538-552, 1955.

VALVERDE, S. R. et al. Silvicultura brasileira – **oportunidades e desafios da economia verde**. Fundação Brasileira para o Desenvolvimento Sustentável – FBDS, 2012. Disponível em: Biblioteca Digital do BNDES: Silvicultura brasileira: oportunidades e desafios da economia verde Acesso em: 07 out. 2023.

VITAL, Marcos Henrique Figueiredo. **Impacto ambiental de florestas de eucalipto**. 2007.

WALTER, J. M., et al. The rate of progress and destructiveness of canker stain of Plane trees. *Phytopathology*, 1952, 42.5.

WALTER, James Munday, et al. Canker stain of Planetrees. *Yearbook of the United States Department of Agriculture*, 1943-47, 1947, 481-4. (no texto WALTER, 1946;

WANG, Zichao et al. Anticancer activity of polysaccharides produced from glycerol and crude glycerol by an endophytic fungus *Chaetomium globosum* CGMCC 6882 on human lung cancer A549 cells. *Biomolecules*, v. 8, n. 4, p. 171, 2018.

ZAUZA, E. A. V., et al. Resistance of Eucalyptus clones to *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Disease*, 2004, 88.7: 758-760.

ZALDÚA, S.; SANFUENTES, E. Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globulus* Mini-Cuttings Using *Clonostachys* and *Trichoderma* Strains. *Chilean Journal Of Agricultural Research*, v. 70, n. 4, p. 576-582, dez. 2010.

ZHANG, Y. et al. Control effect of endophytic fungus *Chaetomium globosum* CEF-082 against Verticillium wilt in *Gossypium hirsutum*. *Acta Phytopathologica Sinica*, v. 46, n. 5, p. 697-706, 2016.