

NOTAS CIENTÍFICAS

Crescimento *in vitro* de isolados de *Armillaria* sp. obtidos de *Pinus elliottii* var. *elliottii* sob várias temperaturas

Nei Sebastião Braga Gomes¹, Celso Garcia Auer², Albino Grigoletti Júnior²

¹ Professor Adjunto, Depto. de Ciências Agrárias, UFAC, Rua Coronel João Cândio, 409, Bairro Estação Experimental, CEP 69.912-440, Rio Branco, AC, Brasil. Parte da tese de Doutorado, Bolsista do CNPq. Projeto CNPq 478133/01-4.

² Pesquisadores da Embrapa Florestas, C. P. 319, CEP 83411-000, Colombo, PR, Brasil, e-mail: auer@cnpf.embrapa.br. Data de chegada: Autor para correspondência: Celso Garcia Auer

Data de chegada: 20/04/2005. Aceito para publicação em: 23/08/2006.

1195

RESUMO

Gomes, N.S.B.; Auer, C.G.; Grigoletti Júnior, A. Crescimento *in vitro* de isolados de *Armillaria* sp. obtidos de *Pinus elliottii* var. *elliottii* sob várias temperaturas. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.2, p.187-189, 2007.

A armilariose tem sido considerada a principal doença em *Pinus* no Brasil. Os sintomas e danos consistem no amarelecimento de acículas, declínio, podridão de raízes, exsudação de resina e morte. A temperatura é um dos fatores ambientais que influencia patógenos, doença de plantas ou ambos. Este trabalho avaliou o comportamento de três isolados de *Armillaria* sp. obtidos de *P. elliottii* var. *elliottii*, submetidos a uma faixa

de temperatura de 16 a 26 °C, utilizando a biomassa seca produzida em meio líquido como parâmetro de análise. Verificou-se que todos os isolados apresentaram máxima produção de biomassa a 22 °C. Utilizando-se de regressão cúbica encontrou-se temperaturas de máximo crescimento entre 21,79 e 23,19 °C. De acordo com os resultados, a melhor temperatura para crescimento dos isolados testados situou-se em 22 °C.

Palavras-chave adicionais: fisiologia de fungo, patógeno, podridão de raízes.

ABSTRACT

Gomes, N.S.B.; Auer, C.G.; Grigoletti Júnior, A. *In vitro* growth of *Armillaria* sp. isolates obtained from *Pinus elliottii* var. *elliottii* under several temperatures. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.2, p.187-189, 2007.

Armillaria root rot is the major pine disease in Brazil. Symptoms of this disease are yellowing of the needles, decline, root rot, resin exudation and plant death. Temperature is an environmental factor that affects pathogens, the disease or both. This work evaluated the behaviour of three isolates of *Armillaria* sp. obtained from *P. elliottii* var. *elliottii*.

The fungus isolates were submitted to temperature ranging from 16 to 26 °C, by using dry biomass production in liquid medium as a measureable variable. All isolates produced higher amount of biomass at 22 °C. A cubic regression showed a maximum point of temperatures between 21,8 and 23,2 °C. The best temperature for fungus isolates growth was around 22 °C.

Additional keywords: fungal physiology, pathogen, root rot.

A armilariose causada pelo fungo *Armillaria* sp. é a principal doença em *Pinus* (6, 7, 12). O patógeno ataca muitas espécies frutíferas, florestais, ornamentais, arbustivas e outras em todos os continentes e, ocorre tipicamente em plantas estabelecidas em áreas anteriormente ocupadas por florestas nativas ou pomares e, quando os hospedeiros foram plantados entre plantas infectadas (10).

Os principais sintomas são detectados nas raízes mais grossas e na base do tronco. Nestes locais, ocorre intensa exsudação de resina que acumula-se no solo, ao redor das raízes ou do tronco, formando uma crosta constituída de solo e resina solidificada. A presença de placas miceliais de coloração esbranquiçada que são formadas na região da entrecasca e, podem se estender no tronco a mais de 1 m de altura, é a característica mais importante para a diagnose da doença (12).

As rizomorfias emitidas a partir das placas miceliais entram em contato e colonizam as raízes da planta hospedeira, infectando o floema e câmbio, separando o lenho da casca, matando o hospedeiro. Embora as rizomorfias permitam a infecção planta a planta por meio mecânico, raízes sadias podem ser infectadas quando entram em contato com o micélio presente em raízes doentes (8).

Os primeiros registros de ocorrência do patógeno em pínus no Brasil, foram atribuídos como sendo causados por *A. mellea* (13), entretanto, estudos taxonômicos conduzidos na década de 90, ampliaram consideravelmente o número de espécies de *Armillaria*. Estudos morfológicos feitos por Volk & Burdsall (1995), citados por Coetzee *et al* (6), incluem pelo menos 36 espécies diferentes. Infecção, colonização, produção de inóculo, dispersão e sobrevivência constituem

os elementos necessários para o desenvolvimento de epidemias em plantas. Todos esses processos são afetados pelos fatores ambientais, principalmente temperatura e umidade (4).

Porém, o efeito da temperatura sobre as atividades do patógeno é menos marcante que aquele exercido pela umidade. A maioria dos patógenos, particularmente aqueles presentes em regiões tropicais e subtropicais, é capaz de crescer numa ampla faixa de temperaturas. Nestas regiões, a temperatura não chega a atuar como fator limitante mas, temperaturas muito altas podem provocar dessecação de estruturas do patógeno presentes na fonte do inóculo. Em áreas de clima temperado, as temperaturas baixas do período de inverno levam à paralisação das atividades do patógeno ou mesmo causam sua morte (3).

Neste sentido, trabalhos realizados em ambiente controlado fornecem uma base sólida para o melhor entendimento dos fatores ambientais no desenvolvimento de epidemias (11). Ensaio realizado com *Armillaria in vitro* também podem fornecer subsídios importantes para prever o comportamento do patógeno *in vivo*. Rishbeth (14) avaliou o crescimento das rizomorfas em vasos, utilizando solo proveniente de plantio de *P. sylvestris*, inoculado artificialmente com um isolado de *Armillaria mellea*. O patógeno desenvolveu-se bem numa faixa de temperatura entre 10 e 26 °C e as rizomorfas atingiram o maior crescimento diário foi em torno de 20 °C, reduzindo-se drasticamente à temperatura de 28 °C.

Como o desenvolvimento micelial de *Armillaria* é totalmente irregular em meio agarizado, constituindo-se de micélio crustoso e longas rizomorfas, torna-se necessário o uso da biomassa seca ao invés do crescimento radial da colônia. Para se determinar preliminarmente a temperatura ótima de um isolado de *Armillaria* sp. obtido de árvores doentes de pinus, os autores determinaram a produção de biomassa seca (micélio mais rizomorfas) sob temperaturas que variaram entre 5 e 35 °C, em intervalos de 5 °C (9). Como resultado principal, verificou-se que a faixa entre 15 e 25 °C proporcionou maior produção de biomassa seca.

Devido ao grande número de registros da armilariose em pinus na região Sul do Brasil e sua importância para o setor florestal (2), essa doença precisa ser estudada quanto aos aspectos epidemiológicos e de controle. Um parâmetro bem estudado na epidemiologia é a temperatura ótima de desenvolvimento do patógeno.

Os resultados preliminares da temperatura ótima de *Armillaria* sp. (9) haviam sido feitos com apenas um isolado, sendo considerado mais adequado aumentar-se o número de isolados para cobrir uma possível variação genética do fungo. Assim, o presente trabalho teve por objetivo o refinamento da informação sobre a temperatura ótima para este patógeno, utilizando de três isolados de *Armillaria* sp., em intervalos mais estreitos de temperatura (2 °C).

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados três isolados obtidos de árvores doentes de *P. elliotii* var. *elliotii*, denominados A-1, A-2 (originários de Pirai do Sul/PR) e A-3 (originário de Rio Negrinho/SC), pertencentes a uma coleção de culturas de *Armillaria* obtidos de diferentes plantas hospedeiras da região Sul do Brasil. Essa coleção é mantida pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas. O isolado A-1 foi o mesmo utilizado em estudo preliminar (9). De acordo com estudos moleculares desenvolvidos no Canadá, os isolados pertencem a uma mesma espécie entre *A. sparrei* e *A. luteobubalina* (5).

O ensaio de temperaturas e o desenvolvimento de *Armillaria* sp. foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas,

Colombo/PR. O patógeno foi isolado a partir de tecidos lesionados de raízes e colo do tronco na região entre a casca e o lenho das árvores. Para o preparo do meio líquido BD (batata-dextrose) e inoculação, usou-se a metodologia preconizada por Gomes *et al.* (9). Os frascos foram incubados em estufas BOD, no escuro, às temperaturas de 16, 18, 20, 22, 24 e 26 °C. Após 30 dias de incubação, a produção de biomassa foi avaliada, filtrando-se o caldo contendo rizomorfas e micélio em papel filtro Whatman n.1, secando-se o filtrado em estufa à temperatura de 80 °C por 16 horas e pesando-se a biomassa seca.

As coordenadas geográficas e altitude local de origem foram coletadas com um aparelho portátil com o sistema NAVSTAR – GPS (Navigation System with Time and Ranging-Global Positioning System). As coordenadas UTM (Projeção Universal Transversal de Mercator) registradas foram transformadas em coordenadas de latitude e longitude para Pirai do Sul/PR (altitude 992 m, 24,58 S 49,94 W) e Rio Negrinho/SC (altitude 797 m, 26,36 S 49,73 W).

Os dados climáticos, temperaturas máxima (média), temperatura mínima (média) e precipitação média mensal, foram obtidos da estação meteorológica mais próxima, em torno de 25 km, do local de origem do isolado (1). Para a origem dos isolados A-1 e A-2 foram utilizados os dados da estação meteorológica de Castro do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) e para A-3, da estação meteorológica de Rio Negrinho da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.). Na região de Pirai do Sul, as temperaturas médias variaram entre 4,0 (mínima) e 29,5 °C (máxima) e a precipitação média mensal foi de 135,5 mm. Na região de Rio Negrinho, as temperaturas variaram entre 7,0 (mínima) e 29,2 °C (máxima) e a precipitação média mensal foi de 121,2 mm.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições (frascos). O peso de matéria seca (mg) foi transformado em crescimento diário (mg/dia) de biomassa. Os valores foram submetidos à análise de variância e de regressão por meio de polinômios ortogonais, utilizando-se o aplicativo SAS – *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do crescimento mostraram que todos os isolados apresentaram a maior produção de biomassa seca a 22 °C (Tabela 1). Verificou-se, também, que os isolados A-1 e A-2 tiveram a maior produção de biomassa e o maior temperatura de máxima produção de biomassa (Tabela 1). Estes isolados apresentaram produção de biomassa similar entre si dentro do intervalo de confiança, nas faixas de temperatura entre 16 e 24 °C. Por outro lado, a temperatura de máximo crescimento não foi a mesma para todos os isolados (Tabela 1).

A temperatura de maior crescimento dos isolados brasileiros de *Armillaria* sp. esteve abaixo do que foi encontrado por Rishbeth (15) para *A. mellea*, quando o fungo foi cultivado em meio Malte-ágar 3%, testado em um intervalo de temperatura entre 5 e 32 °C, avaliando o crescimento de rizomorfas. A taxa de crescimento linear das rizomorfas verificada por este autor esteve em 0,11 mm/dia nas temperaturas extremas (5 e 32 °C), com máximo crescimento observado a 25 °C (9,8 mm/dia), decrescendo para 6,8 mm/dia a 30 °C. Não se encontrou na literatura algum estudo de desenvolvimento de *Armillaria* em meio líquido, avaliando a biomassa produzida. Um outro estudo de Rishbeth (14) demonstrou que a melhor temperatura para o crescimento de rizomorfas foi próxima de 22 °C, quando a inoculação foi feita por meio de cavacos de madeira colonizados pelo patógeno em tubos com solo.

Tabela 1. Biomassa seca diária (mg/dia) produzida por isolados de *Armillaria* sp. sob diferentes temperaturas.

| Temperatura (°C) | Crescimento micelial (mg/dia) | | |
|----------------------|-------------------------------|--------------|--------------|
| | A-1 | A-2 | A-3 |
| 16 | 13,66 ± 0,74 ¹ | 12,73 ± 0,72 | 8,35 ± 0,40 |
| 18 | 13,95 ± 0,55 | 13,01 ± 0,81 | 8,52 ± 0,50 |
| 20 | 14,86 ± 1,33 | 13,37 ± 0,87 | 10,53 ± 0,64 |
| 22 | 22,59 ± 0,59 | 18,10 ± 1,44 | 11,78 ± 0,48 |
| 24 | 18,61 ± 1,07 | 16,90 ± 1,34 | 8,34 ± 0,22 |
| 26 | 9,61 ± 0,50 | 12,88 ± 0,72 | 6,17 ± 0,10 |
| Média | 15,72 ± 0,39 | 14,28 ± 0,40 | 9,42 ± 0,23 |
| Ponto de Máximo (°C) | 22,77 | 23,19 | 21,79 |

Cada valor é média mais desvio padrão, de um número de repetições que variou de 7 a 12 frascos, devido ao descarte dos contaminados.

A regressão cúbica foi o modelo matemático que melhor ajustou o crescimento dos isolados às diferentes temperaturas (Figura 1), pela qual foi possível determinar a temperatura de máximo crescimento para cada isolado. Os resultados encontrados neste estudo mostraram que as temperaturas de máximo crescimento variaram entre 21,79 e 23,19, as quais estão dentro da faixa de crescimento (15 a 25 °C) considerada como adequada para *Armillaria* sp. em estudo anterior (9) no qual testou-se apenas o isolado A-1.

O isolado A-3 apresentou a menor produção de biomassa e a menor temperatura de máximo crescimento, fato que pode ser explicado pela variação fisiológica normalmente encontrada entre isolados, decorrente das adaptações ecotípicas. A diferença observada não foi muito pronunciada e pode ser ampliada se forem analisados outros isolados provenientes de regiões mais distantes, como por exemplo do estado do Rio Grande do Sul. A exemplo dos estudos feito por Rishbeth (14, 15) este tipo de pesquisa implicaria em um grande número de isolados para cobrirem-se as diferenças entre ecótipos.

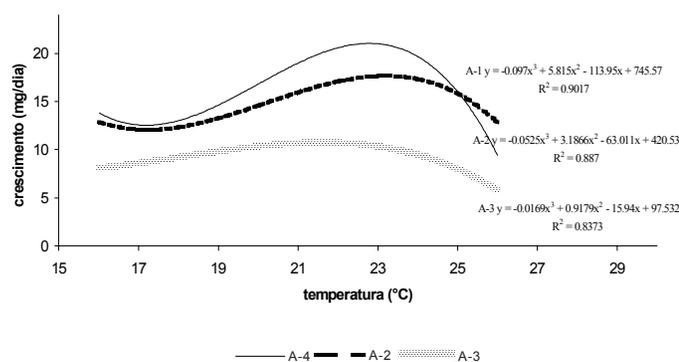


Figura 1. Curvas de crescimento da biomassa seca (mg/dia) de três isolados de *Armillaria*, sob várias temperaturas, em meio líquido.

Analisando-se os pontos de máximo crescimento (Tabela 1), sugere-se que a temperatura para produção de inóculo e estudos fisiológicos com os isolados brasileiros de *Armillaria* sejam feitos a 22 °C. Nesta temperatura, todos os isolados se desenvolveram muito bem, embora tenha sido acima do que foi encontrado por Rishbeth (14), no estudo do efeito da temperatura sobre a produção de rizomorfos de *A. mellea* em solo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de recursos financeiros para suporte ao projeto n° 478133/01-4 e pela bolsa de

doutorado do primeiro autor, imprescindíveis à realização das pesquisas. Agradecemos ao Dr. Osmir Lavoranti pelo auxílio na análise estatística dos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agritempo. Disponível em: <http://www.agritempo.gov.br/agro-clima/sumario> Acesso em 02 mar. 2005.
2. Auer, C.G.; Gomes, N.S.B.; Grigoletti Júnior, A. Novas ocorrências da armilariose em *Pinus* no Sul do Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.2, p.205-207, 2003.
3. Bergamin Filho, A.; Amorim, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 289 p.
4. Bedendo, I.P. Ambiente e doença. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia**: 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 18, p.331-341.
5. Bérube, J. *Armillaria* [mensagem de trabalho]. Mensagem recebida por: <JBerube@exchange.cfl.forestry.ca>, em 30 set. 2004.
6. Coetzee, M.P.A.; Wingfield, B.D.; Coutinho, T.A.; Wingfield, M.J. Identification of the casual agent of *Armillaria* root rot of *Pinus* species in South Africa. **Mycologia**, Lancaster, v.92, n.4, p.777-785, 2000.
7. Ferreira, F.A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. p.263-267.
8. Fox, R.T.V. Biology and life cycle. In: Fox, R.T.V. (Ed.) **Armillaria root rot: biology and control of honey fungus**, Andover: Intercept Limited, 2000. cap. 1, p.1-42.
9. Gomes, N.S.B.; Auer, C.G.; G.; Grigoletti Júnior, A. Temperaturas para desenvolvimento de *Armillaria* sp. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, p.278-279, 2002. (Resumo expandido).
10. Hood, I.A.; Redfern, D.B.; Kile, G.A. *Armillaria* in planted hosts. In Shaw, C.G.; Kile, G.A. (Ed.) **Armillaria root disease**, Washington: USDA-Forest Service. p.122-149, 1991. Agriculture Handbook n.691.
11. Kranz, J.; Hau, B. Systems analysis in epidemiology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.67-83, 1980.
12. Krugner, T.L.; Auer, C.G. Doenças dos pinheiros. In: Kimati, H.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. cap.56, p.584-593.
13. May, L.C. Uma armilariose em *Pinus elliotii* Engel. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v.1, n.1, p.71-84, 1962.
14. Rishbeth, J. The growth rate of *Armillaria mellea*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.51, n.3/4, p.575-586, 1968.
15. Rishbeth, J. Effects of soil temperature and atmosphere on growth of *Armillaria* rhizomorphs. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.70, n.2, p. 213-220, 1978.