

Caracterização morfofisiológica e patogênica de isolados de *Armillaria* na região Sul do Brasil

Francine Bontorin Silva¹; Edson José Mazarotto², Álvaro Figueredo dos Santos³, Celso Garcia Auer³

¹Faculdades “Integradas” Espírita, Curitiba, PR; ²Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; ³Embrapa Florestas, Colombo, PR.

Autor para correspondência: Francine Bontorin Silva (franbontorin@yahoo.com.br)

Data de chegada: 19/02/2016. Aceito para publicação em: 20/06/2017.

10.1590/0100-5405/175653

RESUMO

Silva, F.B.; Mazarotto, E.J.; Santos, A.F.; Auer, C.G. Caracterização morfofisiológica e patogênica de isolados de *Armillaria* na região Sul do Brasil. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.1, p.23-31, 2018.

Armillaria sp. é patógeno causador de podridão de raízes e a morte de árvores de *Pinus* na região Sul do Brasil. Pouco se conhece sobre aspectos morfofisiológicos e patogênicos dessa espécie. Este trabalho objetivou caracterizar a morfologia, fisiologia, patogenicidade e produção de basidiomas *in vitro* de isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil. A análise da morfologia do micélio e rizomorfa foi feita em colônias cultivadas em meio BDA (batata-dextrose-ágar) a 20 °C, no escuro, por 30 dias e em fragmentos de placas miceliais produzidas em seções de tronco inoculadas com o fungo, com microscopia de luz e de varredura. A fisiologia abordou a análise da biomassa produzida em caldo BD (batata-dextrose) em seis temperaturas. O teste de patogenicidade foi realizado em mudas de *Pinus taeda*. A indução de basidiomas foi feita em seções de tronco de *P. taeda* inoculados em frascos com meio BDA. As colônias

apresentaram variação na morfologia do micélio, crescimento irregular sem simetria radial, coloração variando do branco, cinza ao marrom, e na maioria das vezes com rizomorfias. A análise da hifa revelou estruturas típicas do gênero *Armillaria*, como grampos de conexão, septos, pilosidades e massas resinosa sobre a superfície de hifas. A morfologia das rizomorfias mostrou-se variável de acordo com o ambiente, apresentando pilosidades quando em crescimento aéreo e superfície lisa quando desenvolvidas no interior do meio de cultura. A placa micelial mostrou-se crostosa com hifas verrucosas. A temperatura ótima para os isolados de *Armillaria* variou de 16 a 24 °C. Somente uma planta inoculada morreu demonstrando a dificuldade de se reproduzir a doença *in vivo*. Um basidioma foi produzido demonstrando a possibilidade de frutificação *in vitro* de *Armillaria* sp.

Palavras-chave: basidiomiceto, fungo patogênico, *Pinus*.

ABSTRACT

Silva, F.B.; Mazarotto, E.J.; Santos, A.F.; Auer, C.G. Morphophysiological and pathogenic characterization of *Armillaria* isolates from the south region of Brazil. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.1, p.23-31, 2018.

Armillaria sp. is the pathogen causing root rot and death to *Pinus* trees in the south region of Brazil. Little is known about the morphophysiological and pathogenic aspects of this species. This study aimed to characterize the morphology, physiology, pathogenicity and *in vitro* basidiome production of *Armillaria* isolates from the south region of Brazil. Analysis of the mycelium and rhizomorph morphology was done with colonies grown on PDA medium (potato-dextrose-agar) at 20 °C, in the dark, for 30 days, and mycelial fan fragments produced in trunk sections inoculated with the fungus, using light and scanning microscopy. Physiology was based on the analysis of biomass produced in PD broth (potato-dextrose) at six temperatures. Pathogenicity test was done with *Pinus taeda* seedlings. Basidiome induction was done with *P. taeda* trunk sections inoculated in flasks containing PDA medium.

Colonies presented variation in mycelial morphology, irregular growth without radial symmetry, coloration varying from white, to gray and to brown, and most often with rhizomorphs. Analysis of hyphae revealed typical structures of the *Armillaria* genus, such as clamp connections, septa, pilosities and resinous masses on the hyphal surface. Rhizomorph morphology appeared variable depending on the environment, presenting pilosities when developed in aerial growth and smooth surface when developed in the culture medium. The mycelial fan was crusted and had verrucous hyphae. Optimum temperatures for *Armillaria* isolates varied from 16 to 24 °C. Only one inoculated plant died, indicating difficulty in reproducing the disease *in vivo*. One basidiome was produced, demonstrating the possibility of *in vitro* fruiting of *Armillaria* sp.

Keywords: basidiomycete, pathogenic fungus, *Pinus*

Armillaria é um fungo saprófita em tocos de árvores mortas, mas se torna um patógeno quando as rizomorfias penetram nas raízes de plantas suscetíveis (3), desenvolvendo a doença conhecida como armilarirose. Produz rizomorfias, estruturas semelhantes a raízes, resultado do crescimento coordenado de milhares de hifas (35), as quais são responsáveis pela disseminação no solo, invasão e colonização nas raízes. Tais estruturas aderem às raízes e, por meio de enzimas e ação mecânica, penetram, colonizam e dão origem à placa micelial, que se desenvolve ao longo da entre-casca, atingindo o xilema e interferindo no fluxo da seiva no câmbio (3, 35).

A armilarirose por afetar grande número de plantas lenhosas,

sendo constatada em fruteiras de clima temperado e coníferas dos gêneros *Pinus* e *Araucaria*, nos estados da região Sul e Sudeste (1). Impacta plantios de *Pinus* localizados em áreas de mata natural ou reflorestamentos com espécies florestais hospedeiras do patógeno, cujos solos estavam infestados com o patógeno (1).

No Brasil, a identidade da espécie de *Armillaria*, associada à armilarirose em *Pinus*, ainda não foi elucidada. Por enquanto, essa espécie tem sido relatada como *Armillaria* sp., pois um estudo de caracterização molecular de isolados da região Sul (31) demonstrou tratar-se de uma única espécie, nova ou ainda não publicada no GenBank. Os trabalhos de identificação desse gênero se concentram

em taxonomia clássica baseada na morfologia de basidiomas (3) ou sequenciamento de DNA e comparação com sequências depositadas no GenBank (8). Poucos estudos abordaram a caracterização morfológica do micélio, rizomorfias e hifas de espécies de *Armillaria* (7, 23). Desse modo, este estudo foi desenvolvido para caracterizar a morfologia das colônias, micélio, hifas, rizomorfias e placa micelial de isolados de *Armillaria* sp., além de aspectos da fisiologia, patogenicidade e produção de basidiomas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos de caracterização foram conduzidos nos laboratórios de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo, PR e do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. Culturas puras de isolados de *Armillaria* sp. utilizados neste trabalho foram obtidos da Coleção de Fungos Florestais da Embrapa Florestas (Tabela 1). Os fungos isolados foram inicialmente identificados pela presença de rizomorfias, estruturas típicas do gênero. Os isolados encontram-se armazenados em geladeira (4 °C), pelos métodos de Castellani, óleo mineral e repicagem periódica.

Tabela 1. Relação de isolados de *Armillaria* sp. coletados na região Sul do Brasil e hospedeiros

Isolados	Local	Hospedeiro
A1	Pirai do Sul, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A2	Pirai do Sul, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A3	Rio Negrinho, SC	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A4	General Carneiro, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A5	Santa Maria do Oeste, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A6	Calmon, SC	<i>Pinus taeda</i> L.
A7	Campo Alegre, SC	<i>Pinus taeda</i> L.
A8	Castro, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A9	Tijucas do Sul, PR	<i>Pinus taeda</i> L.
A10	Castro, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A11	Rio Negrinho, SC	<i>Pinus taeda</i> L.
A12	São Mateus do Sul, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A13	Cambará do Sul, RS	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A14	Dona Emma, SC	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A15	Castro, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A16	Guarapuava, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A17	Rio Negro, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A18	Lapa, PR	<i>Prunus persica</i> L.
A19	Tijucas do Sul, PR	<i>Sida rhombifolia</i> L.
A20	Mangueirinha, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A21	Caxias do Sul, RS	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A22	Tunas do Paraná, PR	<i>Pinus elliottii</i> Engelm. var. <i>elliottii</i>
A23	Araucária, PR	<i>Pinus taeda</i> L.
A24	Coronel Vivida, PR	<i>Pinus taeda</i> L.
A25	Guairacá, PR	<i>Pinus taeda</i> L.
A26	Guarapuava, PR	<i>Pinus taeda</i> L.
A27	Almirante Tamandaré, PR	<i>Pinus taeda</i> L.
A28	São Cristóvão, PR	<i>Pinus taeda</i> L.
A29	Caseiros, RS	<i>Pinus taeda</i> L.
A30	Ibaiti, PR	<i>Pinus taeda</i> L.

O estudo foi feito em colônias produzidas em meio BDA (batata-dextrose-ágar, 20 °C, 30 dias no escuro), avaliando a forma, coloração e presença de hifas e rizomorfias. A morfologia da hifa foi analisada por meio de microscopia estereoscópica, microscopia de luz (100X e 400 X) e microscopia eletrônica de varredura. Na microscopia de luz, fragmentos de micélio foram retirados de colônias e colocados em lâminas de vidro coradas com líquido de Amann (lactoglicerol-azul de metileno). Na microscopia eletrônica de varredura, utilizou-se três isolados de *Armillaria* sp. da região Sul (Rio Negrinho, SC; Cambará do Sul, RS e São Mateus do Sul, PR). O micélio retirado do meio BDA foi fixado (glutaraldeído 2,5%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2), pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% e desidratado em etanol. Posteriormente, fez-se a secagem ao ponto crítico com CO₂ líquido e levado ao metalizador para a cobertura com uma fina camada de ouro. As amostras foram analisadas no microscópio e as estruturas presentes nas hifas foram fotografadas.

As rizomorfias foram removidas de colônias e sua morfologia analisada em microscopia de luz, fragmentando-se em segmentos de 5 mm, sem aplicação de corante para não alterar sua visualização.

Seções de tronco de *Pinus taeda* L. com casca, com dez cm de comprimento e cinco cm de diâmetro, foram inseridas em frascos de vidro de 500 mL, contendo 100 mL de meio BDA, esterilizados por duas vezes sucessivas em autoclave (120 °C, 1 h). Depois, os frascos foram inoculados com três discos de micélio-ágar de cinco mm de diâmetro de culturas dos isolados A2, A7, A13 e A23 previamente cultivados em meio BDA, por 30 dias, a 20 °C, no escuro. Os frascos foram incubados em câmara BOD à temperatura de 20 °C, no escuro, por 120 dias, para a colonização do fungo nas seções do tronco. Após a colonização, a separação da casca do lenho foi realizada com uma lâmina de aço e fragmentos de placa micelial foram removidos e analisados sob microscopia estereoscópica e microscopia de luz (100X e 400X), sem aplicação de corante.

O estudo do efeito da temperatura no crescimento micelial dos isolados foi feito em frascos de vidro de 500 mL, com tampa plástica, perfurada e tamponada com algodão, contendo 50 mL de caldo BD (extrato comercial de batata e dextrose, 1000 mL de água ultrapurificada) segundo Gomes et al. (12), esterilizados em autoclave (120 °C, 1 h). A inoculação dos frascos foi realizada com três discos de micélio-ágar, com cinco mm de diâmetro, de culturas cultivadas em meio BDA, por 30 dias, a 20 °C, no escuro, dos isolados A1, A2, A3, A4, A6 e A13. Cinco frascos foram utilizados para cada isolado e cada temperatura. Os frascos foram incubados em câmaras BOD a 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 °C no escuro, sem agitação. Após 35 dias, a biomassa fúngica foi avaliada filtrando-se o caldo contendo micélio e rizomorfias em papel filtro Whatman n. 1, secando-se a biomassa em estufa a 40 °C, por 72 h. A partir da biomassa seca estabeleceu-se uma regressão polinomial para cada isolado e a determinação da temperatura de máximo crescimento.

Para o teste de patogenicidade, empregou-se a mesma metodologia para produção de placa micelial em seções de tronco de *P. taeda* em frascos de vidro de 500 mL com 100 mL de meio BD. Foram utilizados os isolados A2, A7, A13 e A23, cultivados por 35 dias em meio BDA, em câmara BOD, a 20 °C, no escuro. Foram preparados 20 frascos para cada isolado. O teste foi feito em plantas de *P. taeda* de seis meses de idade, cultivadas em vasos de 10 L com substrato comercial de mudas à base de turfa, esterilizado e sem adubação. As seções colonizadas pelo fungo foram retiradas dos frascos e inseridas verticalmente, a cinco cm de profundidade, em um orifício no solo, próximo da planta, com

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do micélio de *Armillaria* sp.

As colônias apresentaram crescimento irregular, ausência de simetria radial, coloração variando de branco, tons de cinza a marrom, e na maioria das vezes com a presença de rizomorfos em meio BDA (Figura 1, Tabela 2). Alguns isolados apresentaram colônias de coloração cinza e branca, com micélio aéreo abundante, de aspecto rugoso em certas partes e rizomorfos presentes (isolados A17, A18, A19 e A21). Outros isolados produziram colônias de micélio e rizomorfos menos abundantes, com micélio aéreo variando entre branco, marrom e cinza (isolados A14, A28 e A30).

A comparação da morfologia das colônias de *Armillaria* sp. com outras espécies necessita de algum ajuste, pois a maioria dos trabalhos utilizou meio malte-água com ou sem adição de fontes de N ou sais minerais. *Armillaria* sp. se desenvolve muito bem em meio BDA, comumente utilizado em estudos com fungos fitopatogênicos. Após quatro semanas em meio malte-água, *Armillaria mellea* (Vahl ex Fries) Kummer formou colônias cotonosas de coloração branca que gradualmente passaram para marrom e finalmente marrom crostoso, com gotas de coloração marrom (15). Tais variações da colônia podem ser função do meio empregado, em dado período de cultivo.

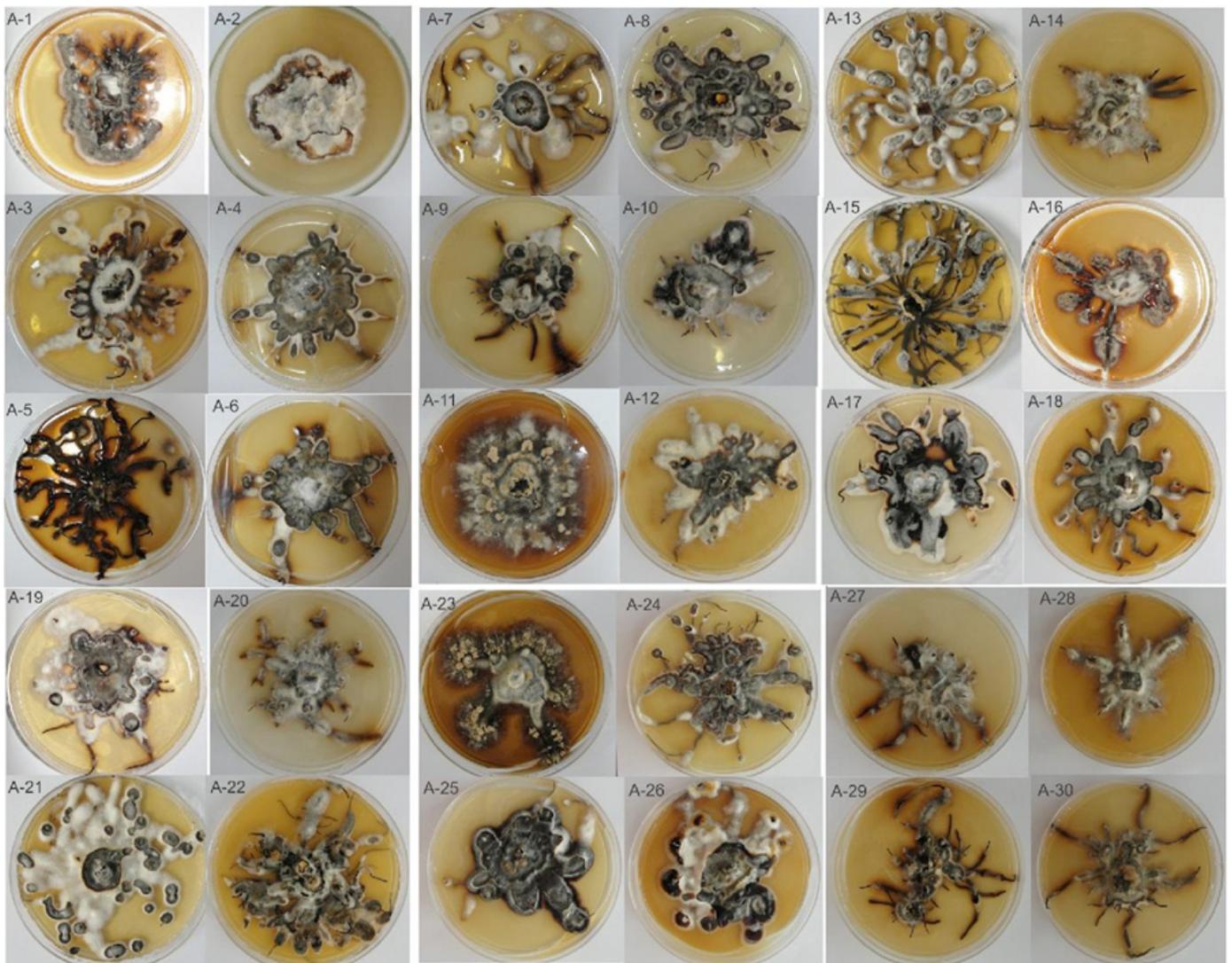


Figura 1. Variação micelial de isolados de *Armillaria* sp. (meio BDA, 20 °C, 30 dias).

Tabela 2. Características culturais dos isolados de *Armillaria* sp., após cultivo por 30 dias, em meio BDA, a 20 °C.

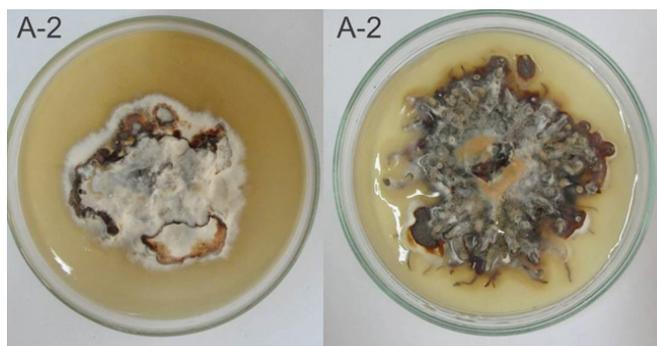
Isolados	Cor do micélio	Tipo de micélio	Rizomorfas
A1, A29	Cinza	Micélio aéreo presente, parcialmente rugoso	Poucas ou abundantes
A2	Branco	Micélio aéreo abundante, parcialmente rugoso	Poucas ou ausentes
A3, A21	Branco	Micélio aéreo abundante, parcialmente rugoso	Abundantes
A4, A6, A9, A10	Cinza/Branco	Micélio aéreo abundante, parcialmente rugoso	Poucas ou abundantes
A5	Cinza/Marrom escuro	Micélio aéreo ausente ou mínimo, predominantemente rugoso	Abundantes
A7, A13	Branco	Micélio aéreo presente, parcialmente rugoso.	Abundantes
A8, A17, A18, A22, A24	Cinza	Micélio aéreo abundante, parcialmente rugoso	Abundantes
A11, A16	Branco/Marrom claro	Micélio aéreo abundante, parcialmente rugoso, com formações crostosas	Poucas
A12	Cinza/branco	Micélio aéreo abundante, parcialmente rugoso	Poucas
A14, A27, A28	Branco	Micélio aéreo presente, parcialmente rugoso	Poucas
A15	Cinza/branco	Micélio aéreo presente, parcialmente rugoso	Abundantes
A19, A26	Cinza/branco	Micélio aéreo abundante, parcialmente rugoso	Poucas ou ausentes
A20	Cinza/branco	Micélio aéreo presente, parcialmente rugoso	Poucas ou abundantes
A23	Cinza/Marrom claro	Micélio aéreo abundante, parcialmente rugoso, com formações crostosas	Poucas ou abundantes
A25	Cinza	Micélio aéreo abundante, parcialmente rugoso	Poucas ou ausentes
A30	Cinza/Marrom claro	Micélio aéreo presente, parcialmente rugoso	Poucas ou Abundantes

A maioria das colônias apresentou bom desenvolvimento micelial, a exceção de A7, A13 e A15 com menor crescimento, predomínio de rizomorfas e micélio aéreo. No caso de A11, 16 e A23, as colônias apresentaram formações crostosas. Espécies do Zimbábue cultivadas em meio malte-peptona-ágar a 25 °C por 30 dias (19) e do Quênia em malte-ágar a 22 °C, por 15 dias (18) foram separadas em três grupos considerando as características da colônia (coloração e tipo) e rizomorfas (produção e tipo). No presente estudo, usando de condições de cultivo diferentes (meio BDA, a 20 °C, 30 dias) e considerando características da colônia e rizomorfas, esse número chegou a 15 grupos distintos, indicando a necessidade de padronizar meio de cultivo e temperatura ótima para estudos com *Armillaria*.

Bruhn et al. (4) avaliaram as características do crescimento micelial de algumas espécies de *Armillaria* e relataram que, entre espécies, o padrão de crescimento é diferente, variando em relação à formação e aspecto de hifas, a coloração e a densidade do micélio e a pigmentação escura observada no meio de cultura. Porém, dentro da mesma espécie, as variações foram mínimas ou indistinguíveis. Por outro lado, grande variação fenotípica foi encontrada em isolados de *A. mellea* (15). Também foi observada grande variação na morfologia dos isolados de *Armillaria* sp. desse estudo, o que não significa que são de espécies diferentes, pois o sequenciamento da região ITS com os mesmos isolados sugeriu serem pertencentes a uma mesma espécie (33).

Um dado isolado repicado para meio BDA, sob as mesmas condições de tempo e cultivo pode produzir colônias de aspecto bem diferentes, inclusive sem formar rizomorfas, como observado no isolado A2 (Figura 2). Nobles (24) comentou sobre tais variações que podem ser devidas às condições de cultivo, como meio e temperatura. Outra possibilidade seria que diferentes pontos de coleta de inóculo na mesma colônia representariam diferentes estádios de crescimento ou variabilidade fenotípica, influenciando o desenvolvimento da nova colônia.

O ponto da colônia selecionado para repicagem é importante para a produção de novas colônias. Quando a repicagem é feita com fragmentos de micélio e rizomorfas, as colônias cresceram mais rapidamente e com aspecto mais vigoroso. Quando somente fragmentos

**Figura 2.** Variação micelial de duas colônias (isolado A-2), originárias de mesma cultura e repicadas no mesmo dia.

de rizomorfa foram selecionados, o aspecto da cultura demonstrou-se mais rugoso e com menor crescimento micelial e alguns isolados repicados somente com fragmentos de micélio, desenvolveram rizomorfas. Isto sugere que as propriedades do micélio sustentam o crescimento das rizomorfas, pois em condições naturais as rizomorfas são formadas a partir da placa micelial (10).

Estudos demonstram a possibilidade de diferenciação de culturas em morfotipos, quando estas pertencem a espécies diferentes (4, 23, 28). Não foram encontrados relatos na literatura sobre a diferenciação entre culturas da mesma espécie.

Durante o exame das colônias ao microscópio estereoscópico, micélio compacto, de superfície lisa e coloração diferenciada foi visualizado com frequência, e quando perfurado revelou-se consistência carnosa com líquido em seu interior (Figura 7A). Possivelmente, seria uma estrutura de reserva de água e nutrientes. Outras colônias apresentaram partes do micélio formando uma região rugosa, ao redor do micélio aéreo (Figura 7B) e, também, formações crostosas (Figura 7C). Segundo Morrison (23), estas formações crostosas são típicas em isolados diplóides, e ausentes em haplóides. Não foi possível traçar a frequência da formação destas estruturas entre os isolados, que aparentemente independem da idade da colônia.

Exsudatos de coloração marrom escura podem ser observados sobre a superfície do micélio de alguns isolados (Figura 7D). Tais exsudatos, também observados sobre rizomorfas, seriam compostos por aminoácidos livres, proteínas, enzimas β -glicosidase e peroxidase, polifenol, ácidos e elementos inorgânicos, relacionados com o processo de patogênese em plantas (18).

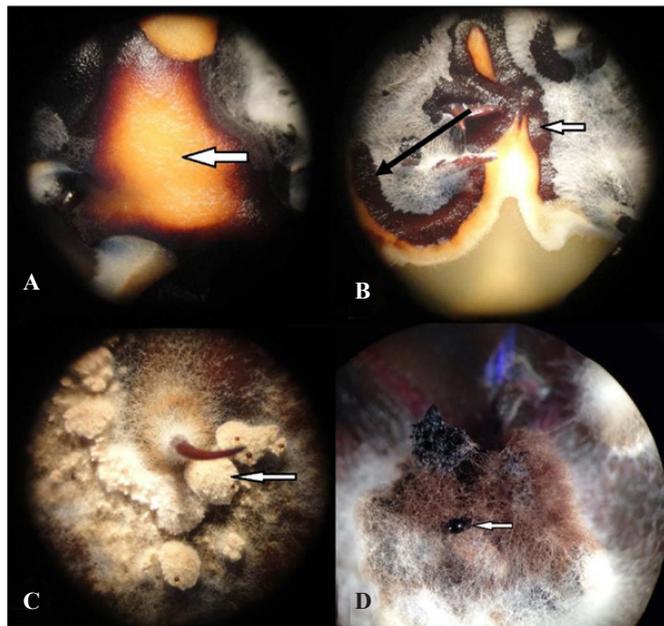


Figura 3. Colônia de *Armillaria* sp. ao microscópio estereoscópico (400X). A: Micélio compacto, com coloração amarelada (seta branca); B: Micélio diferenciado, formando área rugosa ao redor do micélio aéreo (setas branca e escura); C: Micélio com formações crostosas (seta branca); D: Presença de exsudato sobre a colônia (seta branca).

Pigmentação escura foi observada no meio de cultura, até mesmo antes do início do desenvolvimento das colônias. Segundo Nobles (24), essa pigmentação seria resultado da produção de oxidase extracelular, comum em alguns basidiomicetos. Tais oxidases foram relacionadas com a patogênese de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora durante a degradação do tecido do hospedeiro (2).

Os isolados que demonstraram um padrão similar no crescimento das colônias foram provenientes de localidades e de hospedeiros diferentes. Assim, não foi possível traçar alguma relação entre a morfologia, origem e hospedeiro.

Caracterização da hifa de *Armillaria* sp.

Várias estruturas foram evidenciadas nas hifas: grampos de conexão e septos (Figuras 4A e 4B), projeções diminutas, similares a pelos sobre a superfície (Figuras 4C e 4D) e massas resinosa (Figuras 4E e 4F). Tais estruturas foram verificadas em vários gêneros de basidiomicetos, inclusive *Armillaria* (24).

Armillaria e outros basidiomicetos apresentam células cuticulares em áreas pseudoparenquimatosas (24), evidenciadas na análise de hifas (Figura 5). Leite (17) estudando a morfologia de *Panus* sp. visualizou tais estruturas e descreveu-as como vesículas ou clamidósporos, presentes em espécies desse gênero. A presença dessas estruturas em *Armillaria* sp. poderia significar uma importante adaptação ecológica, em termos de dispersão e sobrevivência, além das rizomorfas.

Muitos fungos habitantes do solo possuem elevada capacidade de competição saprofítica e podem sobreviver em resíduos de

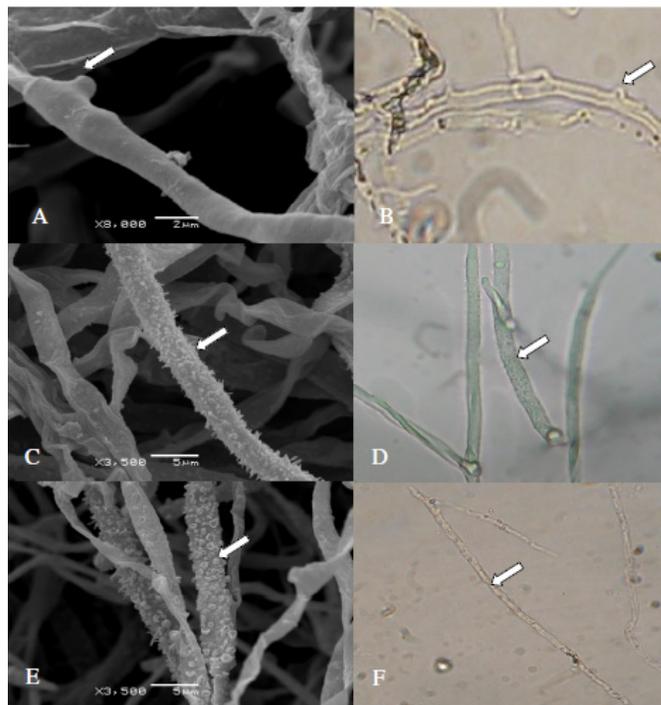


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura (esquerda) e de luz (direita, 400X) de hifas de *Armillaria* sp. A e B: Formação de grampos de conexão (setas); C e D: Projeções diminutas, similares a pelos sobre a superfície (setas); E, F: Massas resinosa sobre a parede (setas).

plantas introduzidos no solo, mantendo-se em elevadas densidades populacionais mesmo durante longos períodos de rotação de culturas, como *Armillaria* (3). Alguns fungos que vivem nesse ambiente produzem estruturas como agregados miceliais, escleródios, oósporos, clamidósporos ou outros tipos de esporos, que resistem às condições ambientais adversas e permanecem viáveis quando as plantas hospedeiras não estão presentes. Essas estruturas podem estar associadas com resíduos de plantas, mas frequentemente encontram-se livres no solo. A alta capacidade de competição saprofítica, aliada à produção de estruturas de resistência, como clamidósporos, pode esclarecer o grande poder adaptativo de *Armillaria* em condições ambientais variadas.

Caracterização das rizomorfas

As rizomorfas são estruturas alongadas, de coloração marrom, por vezes de coloração avermelhada, com a superfície de aparência lisa ou pilosa. A pilosidade foi encontrada em rizomorfas formadas sobre ou fora do meio de cultura, não sendo encontrada nas rizomorfas formadas no interior do meio de cultura sólido (Figura 6A). Pareek et al. (26) analisando a estrutura de rizomorfas de *Armillaria luteobubalina* Watling & Kile demonstrou que a estrutura da rizomorfa varia de acordo com as condições de crescimento, sugerindo que a diferenciação é devida à presença e concentração de oxigênio no meio circundante e que, essas pilosidades seriam prolongamentos de hifas, cujo papel é aumentar a área de captação de água e, especialmente, de oxigênio. Outros estudos demonstraram o papel das rizomorfas na absorção e translocação de água, nutrientes e oxigênio para a colônia (6, 9).

Em relação à pigmentação, as rizomorfas “aéreas” de *Armillaria* sp. mostraram-se mais pigmentadas do que as hifas imersas (Figura 6B). Essa diferença poderia ser explicada pela maior quantidade de melanina na rizomorfas aéreas (5). Como a deposição de melanina na superfície

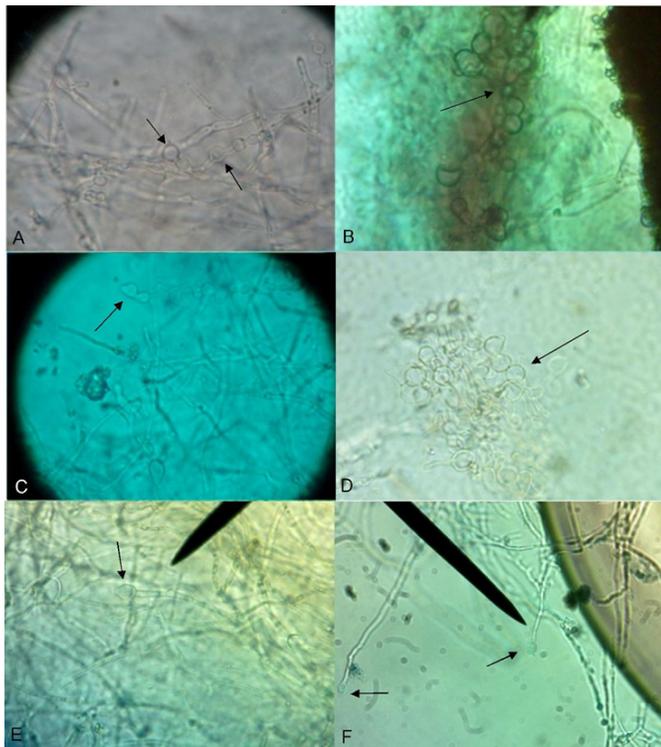


Figura 5. Áreas pseudoparenquimatosas em micélio de *Armillaria* sp. (400X). A, B, C, D: presença de células cuticulares (setas); E, F: presença de estruturas similares a clamidósporos em hifas (setas).

na rizomorfa parece estar relacionada com resistência e proteção frente às condições ambientais adversas, a exposição ao ar e luz pode estar induzindo a formação da melanina na superfície das rizomorfas aéreas.

A rizomorfa é um pseudoparênquima formado por emaranhado de

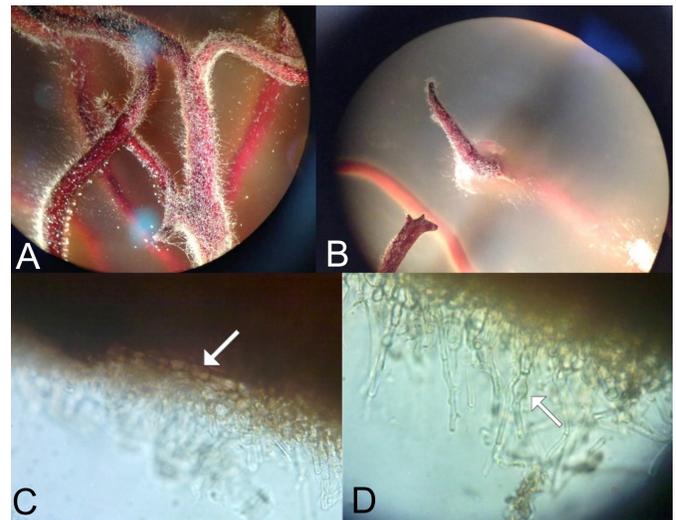


Figura 6. Rizomorfas de *Armillaria* sp. em meio BDA. A: Pilosidade sobre rizomorfas aéreas (50X). B: Pilosidade e pigmentação diferenciada entre rizomorfas aéreas e imersa (50X). C: Hifa inflada em rizomorfa imersa (seta, 400X). D: Hifa inflada em rizomorfa aérea (seta, 400X).

hifas. As hifas das rizomorfas são similares às hifas do micélio, com a presença de septos, e células infladas, lembrando as células cuticulares encontradas no micélio. Essas estruturas foram observadas em hifas imersas (Figura 6C) e aéreas (Figura 6D). Para Money (22) e Pareek et al. (26) a presença de hifas infladas nas rizomorfas aéreas estaria diretamente relacionada com a presença e concentração de oxigênio no meio, sendo mais presentes e mais volumosas em rizomorfas aéreas, podendo tratar-se de um reservatório de oxigênio. Mihail & Bruhn (21) estudaram o desenvolvimento *in vitro* de rizomorfas de espécies de *Armillaria* e sugeriram que algumas características destas estruturas são

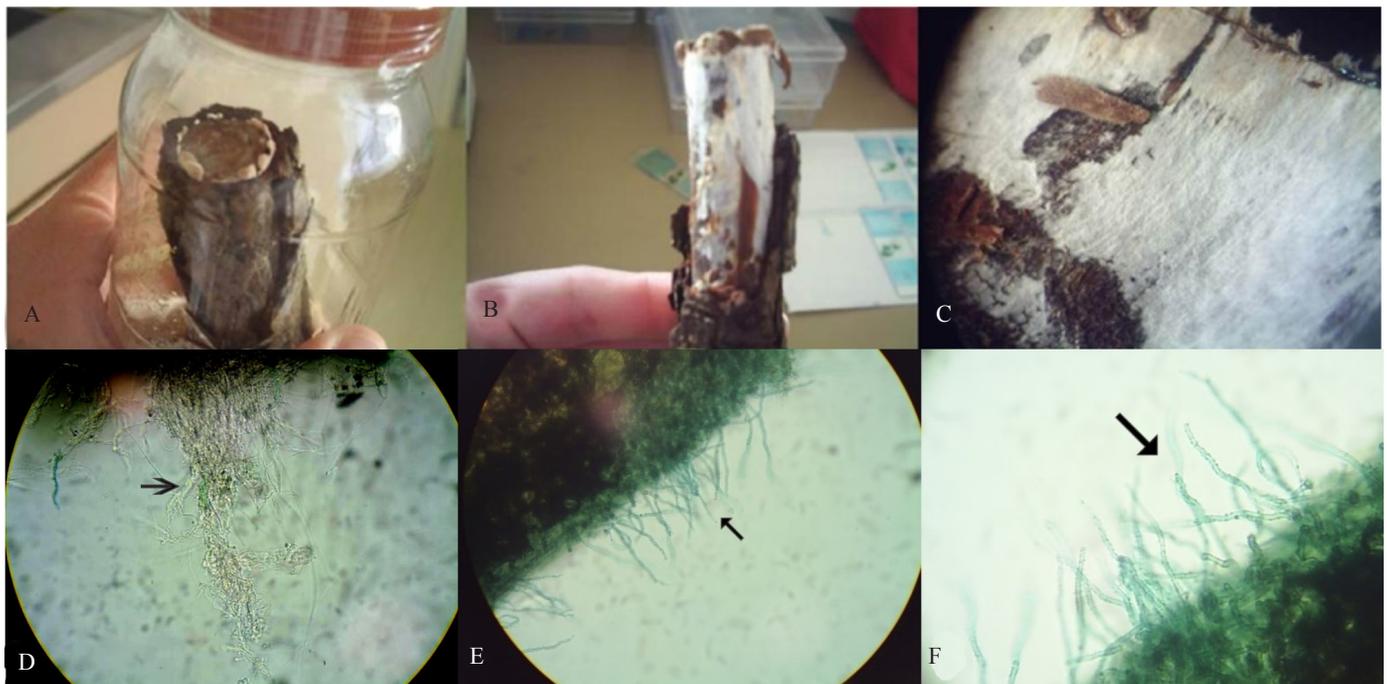


Figura 7. Placa micelial de *Armillaria* sp. A: Produção *in vitro* em tronco de pinus colonizado. B, C: Placa micelial formada na entre-casca. D: Fragmento de placa micelial observado em microscópio de luz (100 X). E, F: Hifas verrucosas presentes na superfície da placa micelial (E, 100X; F 400X).

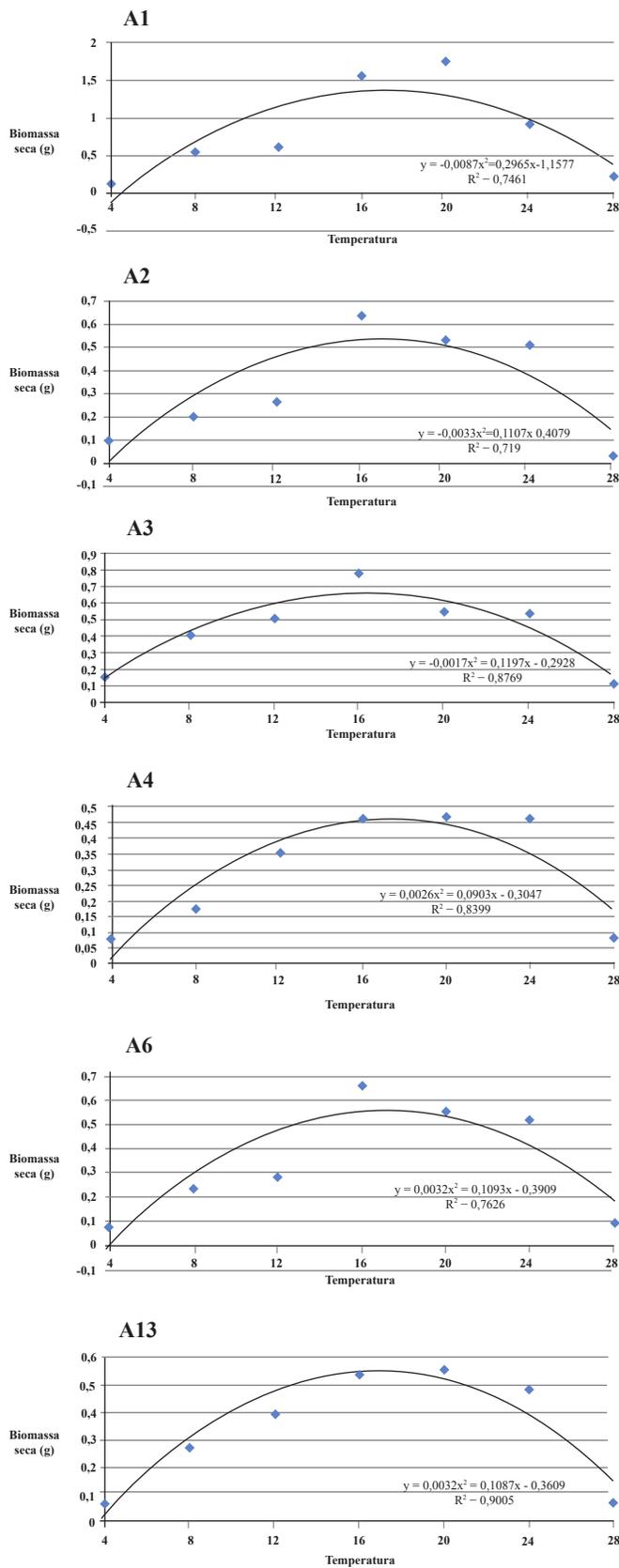


Figura 8. Biomassa seca média (g) de seis isolados de *Armillaria* sp. produzidos em caldo BD, sob várias temperaturas (°C).

inatas de cada espécie, como a quantidade de melanina e o mecanismo de invasão. Contudo, os autores observaram uma grande variabilidade no diâmetro, no comprimento, na quantidade de estruturas formadas e na intensidade da coloração, de acordo com a temperatura ou constituição do meio de cultura.

Caracterização da placa micelial

As seções de tronco inoculadas foram colonizadas pelos isolados testados (Figuras 7A e 7B) e com a remoção da casca pode-se observar a placa micelial formada *in vitro* (Figura 7C), constituída por pseudoparênquima (Figura 7D). As hifas que formam a placa micelial apresentaram um aspecto grosseiro, crostoso, com estruturas verrucosas sobre a superfície (Figura 7D e 7E), as quais também foram observadas por Nobles (24).

Determinação da temperatura ótima de crescimento

Em caldo BD, o fungo *Armillaria* sp. ficou parcialmente submerso formando uma massa constituída de micélio e rizomorfas, similar ao descrito por Hansson e Reifert (15) em caldo extrato de malte. A faixa de temperatura de maior produção de biomassa seca variou entre 16 e 24 °C (Figura 8), próximo dos resultados de Gomes et al. (12) com três isolados de *Armillaria* sp., sugerindo 22 °C como temperatura ótima de crescimento. Rishbeth (29) estudando os efeitos da temperatura no crescimento de rizomorfas de *A. mellea* em meio malte-ágar e verificou que a temperatura ótima para o crescimento foi 25 °C, crescendo entre 5 e 32 °C. De acordo com classificação de Pérez-Sierra et al. (27), os isolados de *Armillaria* sp. têm caráter mesofílico de crescimento, pois nenhum mostrou temperatura ótima de 30 °C.

Outros estudos mostram faixa de temperatura próxima da verificada para *Armillaria* sp. Cheng e Gu (7) sugerem que a faixa de temperatura ótima para crescimento de *A. mellea* está entre 20 e 30 °C. Keča et al. (16) testaram cinco espécies de *Armillaria*: *A. cepistipes* Velen., *A. gallica* Marx. & Rom., *A. mellea*, *A. ostoyae* (Rom.) Herink e *A. tabescens* (Scop.) Emel. a 13, 22, 27 e 32 °C, sugerindo que a temperatura ótima para o crescimento do gênero estaria entre 22 e 27 °C.

Utilizando a regressão polinomial, a temperatura de maior produção biomassa dos isolados testados ficou próxima de 17 °C. Além da temperatura ótima para crescimento (17 °C) estar abaixo da faixa relatada na literatura para outras espécies, houve crescimento a 4 e 8 °C, demonstrando que os isolados brasileiros de *Armillaria* sp. desenvolvem-se em temperaturas mais baixas.

Patogenicidade de *Armillaria* sp.

As avaliações aos seis e 12 meses após a inoculação não detectaram plantas com sintomas de armilarirose. Somente aos 18 meses, uma planta inoculada com o isolado A2 apresentou amarelecimento da copa, sintoma inicial típico da doença, e aos 24 meses a planta estava morta (Figura 9A). A raiz apresentou sintoma típico de podridão da raiz (Figura 9B) e a remoção da casca confirmou a presença de placa micelial e rizomorfas (Figura 9C). Apesar da baixa incidência da armilarirose, o reisolamento do isolado A2 comprovou a patogenicidade de *Armillaria* sp.

A baixa incidência de plantas doentes em ensaios com *Armillaria* pode ser explicada pelas condições ambientais durante a condução do ensaio em vasos. A esse respeito, Rishbeth (29) relatou que *Armillaria* é sensível às alterações do solo, como umidade, pH, temperatura, concentração de oxigênio e dióxido de carbono. As rizomorfas normalmente se desenvolvem nas camadas mais superficiais do solo, dependentes de concentração adequada de oxigênio. Como o micélio e a placa micelial necessitam de temperaturas mais amenas para o seu

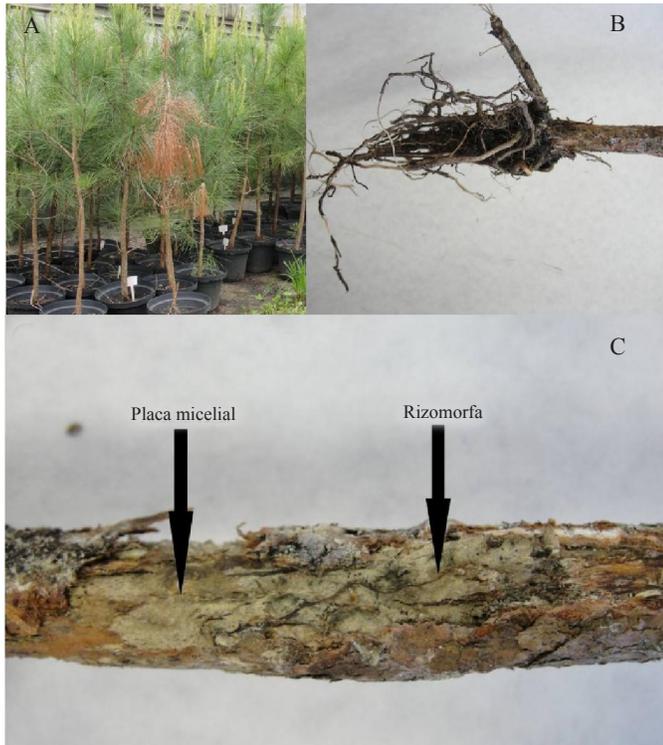


Figura 9. Plantas de *Pinus taeda* inoculadas com isolado A-2 de *Armillaria* sp. A: Planta morta. B: Raiz com sintomas da podridão. C: Rizomorfa e placa micelial na casca da planta morta (setas).



Figura 10. Basidioma formado em frasco com meio BDA e tronco de pínus inoculado com isolado A-1 de *Armillaria* sp.

desenvolvimento, a temperatura mais elevada do solo em vasos pode ter dificultado o desenvolvimento do fungo.

Outra explicação seria o tempo de desenvolvimento da doença em condições experimentais. Sicoli et al. (32) estudando a patogenicidade de *A. ostoyae*, *A. mellea*, *A. gallica* e *A. tabescens* em plantas de carvalho, verificaram sintomas somente após quatro anos da inoculação. Esses autores comentaram a possibilidade de que as plantas utilizadas provavelmente apresentavam ou desenvolveram alguma resistência contra o patógeno. Guillaumin & Pierson (14) sugeriram que a inoculação por ferimentos pode estimular os mecanismos de defesa e resistência da planta. Como *Armillaria* sp. apresenta um lento

crescimento em temperaturas mais elevadas, condição existente em vaso, seu desenvolvimento estaria sendo dificultado no solo, o que possibilitaria a cicatrização e recuperação das plantas inoculadas.

Produção de basidiomas *in vitro*

Somente um basidioma foi produzido após 18 meses de cultivo em seção de tronco de *P. taeda* e meio BDA (Figura 10). Raabe (28) também obteve um basidioma de *A. mellea* inoculando galhos de figueira, enquanto Shaw et al. (31) obtiveram um basidioma de *Armillaria novae-zelandiae* (Stev.) Boesewinkel em meio de cultura. Entretanto, dependendo do isolado, substrato e espécie de *Armillaria* pode haver formação de número considerável ou não de basidiomas (21, 27, 34). Nestes estudos, os substratos utilizados foram laranja, madeira picada, ou serragem adicionados de fonte de açúcares e proteínas.

Outro aspecto sobre a produção de basidiomas *in vitro*, seria que as técnicas utilizadas podem não ser adequadas para *Armillaria*, envolvendo muitas limitações, e seu desenvolvimento é variável, dependendo da espécie (11). Grillo et al. (13) obteve sucesso com *A. tabescens*, em substrato a base de farelo de arroz, e comentou da possibilidade de frutificação *in vitro* para algumas espécies.

A caracterização dos isolados de *Armillaria* sp. mostrou similaridade em vários aspectos com outras espécies de *Armillaria* e outros basidiomicetos. Possivelmente, algumas das estruturas anatômicas sejam únicas de *Armillaria* sp. justificando o aprofundamento dos estudos sobre tais estruturas quanto à participação na patogênese, bem como na identificação da espécie em questão.

REFERÊNCIAS

- Auer, C.G.; Santos, A.F. Doenças dos pinheiros In: Amorim, L.; Rezende J.A.M.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 5.ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres, 2016. v.2, p.595-602.
- Bastos, C.N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.286-288, 2005.
- Baumgartner, B.; Coetzee, M.P.A.; Hoffmeister, D. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. **Molecular Plant Pathology**, London, v.12, n.6, p.515-534. 2011.
- Bruhn, J.N.; Johnson, T.E.; Karr, A.L.; Wetteroff, J.J.; Leininger, T.D. Identification of *Armillaria* field isolates using isozymes and mycelial growth characteristics. **Mycopathologia**, The Hague, v.142, n.2, p.89-96, 1998.
- Butler, M.J.; Day, A.W.; Henson, J.W.; Money, N.P. Pathogenic properties of fungal melanins. **Mycologia**, New York, v.93, n.1, p.1-8, 2001.
- Cairney, J.W.G. Translocation of solutes in ectomycorrhizal and saprotrophic rhizomorphs. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n.2, p.135-141, 1992.
- Cheng, X.H.; GU, S.X. Cultural characteristics of *Armillaria mellea* on solid media. **Acta Academiae Medicinæ Sinicae**, Beijing, v.28, n.4, p.553-557, 2006.
- Coetzee, M.P.A.; Bloomer, P.; Wingfield, M.J.; Wingfield, B.D. Paleogene radiation of a plant pathogenic mushroom. **Plos One**, v.6, p.25-35, 2012.
- Eamus, D.; Thompson, W.; Cairney, J.W.G.; Jennings, D.H. Internal structure and hydraulic conductivity of basidiomycete translocating organs. **Journal of Experimental Botany**, London, v.36, n.168, p.1110-1116, 1985.
- Fox, R.T.V. Cultural methods to manage *Armillaria*. In: Fox, R.T.V. (Ed.). **Armillaria root rot: biology and control of honey fungus**. Andover: Intercept, 2000. p.151-171.
- Garraway, M.O.; Hüttermann, A.; Wargo, P.M. Ontology and physiology. In: Shaw, C.G. III; Kile, G.A. **Armillaria Root Disease**. Agricultural Handbook, 691, Washington DC: USDA Forest Service, 1991, p.21-47.
- Gomes, N.S.B.; Auer, C.G.; Grigoletti Junior, A. Crescimento *in vitro* de isolados de *Armillaria* sp. obtidos de *Pinus elliottii* var: *elliottii* sob várias temperaturas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p.184-189, 2007.
- Grillo, R.; Korhonen, K.; Hantula, J.; Hietala, A.M. Genetic evidence for somatic haploidization in developing fruit bodies of *Armillaria tabescens*.

- Fungal Genetics and Biology**, New York, v.30, p.135-145, 2000.
14. Guillaumin J.J.; Pierson J. Inoculation of two stocks of *Prunus mahaleb* by *Armillariella mellea*. Incidence of grafting and wounds. **Annales de Phytopathologie**, Paris, v.9, p.533, 1977.
 15. Hansson, G.; Reifert, G. Effects of cultivation techniques and media on yields and morphology of the basidiomycete *Armillaria mellea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.26, n.5, p.468-473, 1987.
 16. Keča, N. Characteristics of *Armillaria* species development and their growth at different temperatures. **Bulletin of the Faculty of Forestry**, Belgrado, v.91, p.149-162, 2005.
 17. Leite, C. Estudos biológicos em culturas de *Panus* Fr. (Basidiomycetes) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Insula Revista de Botânica**, Florianópolis, v. 15, p. 117-140, 1985.
 18. Mallett, K.I.; Colotelo, N. Rhizomorph exudate of *Armillaria mellea*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.30, p.1247-1252, 1984.
 19. Mwangi, L.M.; Lin, D.; Hubbes, M. Identification of Kenyan *Armillaria* isolates by cultural morphology, intersterility tests and analysis of isozyme profiles. **European Journal of Forest Pathology**, Berlin, v.19, p.399-406, 1989.
 20. Mwenje, E.; Ride, J.P. Morphological and biochemical characterization of *Armillaria* isolates from Zimbabwe. **Plant Pathology**, London, v.45, p.1036-1051, 1996.
 21. Mihail, J.D.; Bruhn, J.N. Foraging behaviour of *Armillaria* rhizomorph systems. **Mycological Research**, Cambridge, v.109, p.1195-207, 2005.
 22. Money, N.P. **Carpet monsters and killer spores: a natural history of toxic Mold**. Oxford University Press: New York, 2004. p. 127-142.
 23. Morrison, D.J. Variation among British isolates of *Armillaria mellea*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.78, n.3, p.459-464, 1982.
 24. Nobles, M.K. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.43, p.1097-1113, 1965.
 25. Otieno W.; Pérez-Sierra, A.P.; Termorshuizen, A. Characterisation of *Armillaria* isolates from tea (*Camellia sinensis*) in Kenya. **Mycologia**, New York, v.95, p.160-175, 2003.
 26. Pareek, M.; Cole, L.; Ashford, A.E. Variations in structure of aerial and submerged rhizomorphs of *Armillaria luteobubalina* indicate that they may be organs of absorption. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, n.11, p.1377-1387, 2006.
 27. Pérez-Sierra, A.; Guillaumin, J.J.; Spooner, B.M.; Bridge, P.D. Characterization of *Armillaria heimii* from Africa. **Plant Pathology**, London, v.53, p.220-230, 2004.
 28. Raabe, R.D. Variation of *Armillaria mellea* in culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v.56, p.1241-1244, 1966.
 29. 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.
 30. Rishbeth, J. Some characteristics of English *Armillaria* species in culture. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.86, n.2, p.213-218, 1986.
 31. Shaw, C.G.; Kile, G.A. **Armillaria root disease**. Washington, DC: USDA Forest Service, 1991. 233p. (Agriculture Handbook, 691).
 32. Sicoli, G.; Annese, V.; De Gioia, T.; Luisi, N. *Armillaria* pathogenicity tests on oaks in southern Italy. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v.84, p.107-111, 2002.
 33. Silva, F.B. **Caracterização molecular de isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil**. 2009. 75p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
 34. Tsopelas, P. Distribution and ecology of *Armillaria* in Greece. **European Journal of Forest Pathology**, Berlin, v.29, p.103-116, 1999.
 35. Wahlström, K.T.; Johansen, M. Structural responses in bark to mechanical wounding and *Armillaria ostoyae* infection in seedlings of *Pinus sylvestris*. **Forest Pathology**, Oxford, v.22, p.65-76, 1992.