

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCINE BONTORIN SILVA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Armillaria* sp DA
REGIÃO SUL DO BRASIL

CURITIBA
2009

FRANCINE BONTORIN SILVA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Armillaria* DA REGIÃO
SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre, área de Concentração: Microbiologia.

Orientadora:
Prof^a Dr^a Vania Aparecida Vicente

Co-orientador:
Prof. Dr Celso Garcia Auer

Co-orientadora:
Prof^a Dr^a Ida Chapaval Pimentel

CURITIBA
2009

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Silva, Francine Bontorin

Caracterização molecular de isolados de *Armillaria* da região sul do Brasil. / Francine Bontorin Silva. – Curitiba, 2010.

75 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vânia Aparecida Vicente

Co-orientador: Celso Garcia Auer

Co-orientadora: Ida Chapaval Pimentel

Dissertação (mestre) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Armillaria* 2. *Pinus* 3. Fungos fitopatogenicos I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida III. Auer, Celso Garcia IV. Pimentel, Ida Chapaval V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 632.4

***“sim,
sei que a terra gira em um único sentido
mas sei também,
que é possível mudar o sentido da vida
sem andar na contra-mão do mundo!!”***

Vinicius Marçal

*Aos meus pais, Angelo e
Rosangela, e ao meu querido
Vinicius, dedico...*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e especiais agradecimentos a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho:

À Prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente, cuja orientação, esforço, confiança e amizade foram fundamentais para realização deste sonho, e que mesmo a distância, esteve sempre presente;

Ao Prof. Dr. Celso Garcia Auer, que foi muito além do que um co-orientador, me auxiliando em todas as circunstâncias e tornando muito mais fácil esta jornada. Todo agradecimento não será suficiente para expressar minha gratidão;

À Prof^a Dr^a Ida Chapaval Pimentel, pela co-orientação, amizade, grande contribuição com conhecimentos e conselhos valiosos;

À Prof^a Dr^a Débora do Rocio Klisiowicz, que se tornou uma amiga e um exemplo, meus agradecimentos vão muito além da sua contribuição e seria impossível expressá-los apenas com palavras em uma folha de papel;

Às Prof^{as} Dr^{as} Andréa Emilia Marques Stinghen, Ilma Hiroko Higuti e Patrícia do Rocio Dalzoto pelos conselhos e agradável convivência;

Ao querido colega e amigo Diogo Robl que, com muita paciência, disposição e bom humor me auxiliou na metodologia do seqüenciamento de região ITS;

À Monica Moreira, pela ajuda nas análises de RAPD;

Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (LabMicro): Paulo, Raphael, Isadora, Ângela, Gabriela, Patrícia, Fabiana, Juliana, Guilherme, André e Carlos, pela disposição e ajuda sempre que possível;

Um agradecimento muito especial para Fernanda, Raquel, Eduardo e Samarina, por toda ajuda, e principalmente pela amizade e momentos de descontração. Sem vocês nada disso seria possível;

Ao Departamento de Patologia Básica e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, por todo apoio, incentivo e paciência;

À equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos e Dr. Albino Grigoletti Jr, pela disposição e inúmeros conselhos. E aos meus colegas e amigos que fiz durante minha estadia neste agradável laboratório: Suelen, Herlon, Márcia, Thiago, Sandro, Sílvia, Johann, Karen, Paula, Rafaela, Davi e Keila. Vocês são parte disso;

À todos os meus queridos amigos, por serem pessoas maravilhosas, com as quais eu tenho o privilégio de conviver;

Aos meus pais, pela minha formação, amor, carinho e incentivo em todos os momentos;

Ao meu irmão Franco, minha cunhada Aline, minha mais do que tia Rosana, meu compadre Marco, meu amado afilhado Felipe e toda minha família, por tornarem minha vida mais feliz;

Ao meu querido Vinicius, pela confiança, companheirismo, imenso incentivo, paciência constante, amor e toda contribuição na redação deste trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A armilariose, doença causada por fungos do gênero *Armillaria*, é conhecida em várias partes do mundo, provocando a mortalidade de culturas agrícolas e florestais. Na região Sul do Brasil, essa doença tem causado a morte de árvores, principalmente em plantios de pinus, e a espécie associada à doença ainda não foi identificada. Sendo assim, o presente trabalho visou caracterizar isolados de *Armillaria* coletados na região Sul do Brasil, por meio de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD e sequenciamento de região ITS). Vinte e dois isolados de *Armillaria* sp. foram coletados de árvores doentes de pinus, pessegueiro e vassourinha-do-campo, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os isolados foram cultivados em meio sólido BDA (batata, dextrose e ágar), a 22°C, no escuro. As observações de micromorfologia do micélio foram feitas através de microscopia de luz e eletrônica de varredura e demonstraram a presença de estruturas típicas do gênero. Os resultados do RAPD demonstraram haver variabilidade entre os isolados. Os resultados das análises das sequências ITS demonstraram que os isolados procedentes da região Sul do Brasil formaram um único grupo filogenético, sugerindo se tratar de uma única espécie, a qual parece ser muito próxima das linhagens referências procedentes da Patagônia, as quais parecem se tratar da espécie *A. montagnei*, intimamente relacionada com a espécie *A. luteobubalina*.

Palavras-chave: armilariose, pinus, RAPD, seqüências ITS

ABSTRACT

Armillaria species cause *root disease* in various parts of the world, causing the death of agricultural crops and forest. In the South of Brazil, this disease has caused the death of trees, mainly in the pine plantations, and the species associated with the disease has not yet been identified yet. Thus, the present study has the objective to characterize isolates of *Armillaria* collected in South of Brazil, through morphological and molecular markers (RAPD and sequencing of ITS region). Twenty-two isolates of *Armillaria* sp. were collected from pine trees, peach and broomfields, in the states of Parana, Santa Catarina and Rio Grande do Sul. The isolates were grown on solid medium PDA (potato, dextrose and agar) at 22 °C in the dark. The observations of micromorphology of mycelium were made through light microscopy and scanning electron microscopy and demonstrated the presence of structures typical of the genre. The results of RAPD demonstrated a variability among the isolates. The results of the analysis of ITS sequence showed that the isolates from the region south of Brazil formed a one group, suggesting that they are belong to the same species, which seems to be very close to the reference strains of *Armillaria* coming from Patagonia, which seem to treat the species *A. montagnei*, closely related species with *A. luteobubalina*.

Key words: *Armillaria* rot root, pine, RAPD, ITS sequence

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: (A) Rizomorfias de <i>Armillaria</i> sp. internas, sob a casca de árvore jovem de <i>Pinus elliottii</i> . var. <i>elliottii</i> . e (B) rizomorfias externas, a partir da casca em direção ao solo.....	17
FIGURA 2: Placa micelial de <i>Armillaria</i> no interior do tronco atacado.....	31
FIGURA 3: Aspecto da cultura de <i>Armillaria</i> em meio BDA, com extensão das rizomorfias a partir do micélio.....	45
FIGURA 4: Microscopia eletrônica de varredura (esquerda) e de luz (direita), em <i>Armillaria</i> sp. A e B– Início da formação de grampos de conexão, normalmente encontrados em espécies de basidiomicetos; C e D - Projeções diminutas, similares a pêlos sobre a superfície de algumas hifas; E e F Massas resinosas sobre a parede de algumas hifas.....	46
FIGURA 5: Perfil de RAPD obtido a partir do oligonucleotídeo iniciador OPX 17. Marcador de peso molecular: <i>Ladder</i> 100pb. As letras representam o <i>Ladder</i> (L), a amostra sem DNA (branco – B) e os números representam os diferentes isolados de <i>Armillaria</i>	47
FIGURA 6: Dendrograma obtido com os dados de similaridade genética entre os 22 isolados de <i>Armillaria</i> utilizados.....	48
FIGURA 7: Árvore filogenética gerada pelo método de Neighbor-Joining (Kimura 2-parametros) a partir das seqüências ITS dos isolados de <i>Armillaria</i> do Sul do Brasil.....	51
FIGURA 8: Diversidade nucleotídica entre isolados de <i>Armillaria</i> da região Sul do Brasil.....	52
FIGURA 9: Árvore filogenética pelo método “Neighbor-Joining” Kimura 2-parametros construída a partir do seqüenciamento das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 dos isolados de <i>Armillaria</i> do Sul do Brasil e linhagens referências utilizadas.....	55

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1:Relação dos isolados de <i>Armillaria</i> utilizados no presente estudo.....	30
QUADRO 2:Relação das diferentes linhagens de <i>Armillaria</i> utilizadas como referencia.....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Diferenças nucleotídicas de <i>Armillaria</i> sp da região Sul do Brasil para os fragmentos ITS1 e ITS2.....	49
TABELA 2: Diferenças nucleotídicas (par a par) entre os isolados de <i>Armillaria</i> estudados (parte inferior). Na parte superior são representadas em vermelho o número de transições e em azul as transversões.	50
TABELA 3: Quadro comparativo entre as seqüências ITS dos isolados de <i>Armillaria</i> sp procedentes do Sul do Brasil e linhagens referências utilizadas.....	53
TABELA 4: Distâncias nucleotídicas para a região intergenica do DNAr nuclear entre os isolados de <i>Armillaria</i> estudada e as linhagens referências utilizadas.....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>Armillaria</i>	16
3.2 SINTOMAS DA ARMILARIOSE E FAIXA DE HOSPEDEIROS.....	17
3.3 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Armillaria</i>	20
3.4 O USO DE MARCADORES MOLECULARES.....	21
3.4.1. Marcadores moleculares do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	21
3.4.2 PCR (Polimerase Chain Reaction) e seqüenciamento de região ITS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
4.2 ISOLAMENTO.....	31
4.3 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	32
4.3.1 Meio Batata – Dextrose – Ágar (BDA).....	32
4.3.2 Meio seletivo para <i>Armillaria</i>	33
4.3.3 Meio com extrato de malte e ácido tânico.....	33
4.3.4 Tampão CTAB.....	33
4.3.5 Tampão de extração (TE).....	34
4.3.6 Solução EDTA 0,5M pH 8,0 + N–Laurilsarcosinato de Sódio (NaEDTA).....	34
4.3.7 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0.....	34
4.3.8 Solução estoque de Tris-HCl 1M pH 9,5.....	34
4.3.9 Tampão de corrida para gel de agarose (TBE 10x).....	34
4.3.10 Tampão de amostra para gel de agarose.....	35
4.3.11 Gel de agarose 0,6 %.....	35
4.3.12 Gel de agarose 1,5 %.....	35
4.3.13 Brometo de Etídio.....	35
4.3.14 Oligonucleotídeos iniciadores.....	36
4.3.15 Taq polimerase.....	36
4.3.16 dNTPs.....	36
4.3.17 Marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com <i>Hind III</i> Gibco).....	36
4.3.18 Marcador de peso molecular (DNA <i>Ladder</i> 100pb Ludwing Biotec).....	37
4.4 PREPARO DE MATERIAL.....	37
4.4.1 Esterilização.....	37
4.4.2 Incubação.....	37
4.4.3 Identificação dos isolados.....	37
4.4.4 Linhagens utilizadas.....	38
4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E MICROSCOPIA DE LUZ.....	38
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA.....	39

4.7 RAPD – AMPLIFICAÇÃO.....	39
4.7.1 Eletroforese dos produtos de RAPD.....	40
4.7.2 Análise do polimorfismo obtido por RAPD.....	40
4.8 PCR – AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO.....	41
4.8.1 PCR – Ribotipagem.....	41
4.8.2 Reação de sequenciamento.....	42
4.8.3 Precipitação do DNA para ser seqüenciado.....	42
4.8.4 Sequenciamento.....	42
4.8.5 Alinhamento das sequências e construção da árvore filogenética...	43
4.8.6 Análise comparativa entre os isolados de <i>Armillaria</i> da região Sul do Brasil e isolados de diferentes publicações.....	43
5. RESULTADOS.....	45
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	45
5.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	46
5.2.1 RAPD.....	47
5.2.2 PCR – Gene específica e sequenciamento de região ITS.....	49
5.2.3 Análise comparativa entre os isolados de <i>Armillaria</i> da região Sul do Brasil e isolados de diferentes publicações.....	53
6. DISCUSSÃO.....	56
6.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	56
6.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR MEIO DE MARCADORES RAPD.....	58
6.3 ANÁLISE NUCLEOTIDICA DA REGIÃO INTERGÊNICA ITS-1, 5.8S E ITS-2 DO DNA RIBOSSOMAL NUCLEAR DE <i>Armillaria</i> DO SUL DO BRASIL.....	60
7. CONCLUSÕES.....	64
8. REFERÊNCIAS	65
ANEXO.....	75

1. INTRODUÇÃO

A armilariose causada pelo fungo *Armillaria* sp., é a principal doença em pínus no Brasil provocando o apodrecimento da casca, do lenho, das raízes e do colo da planta, resultando na morte do hospedeiro. Este patógeno ataca diferentes espécies vegetais, frutíferas, florestais, ornamentais, arbustivas e gramíneas, em todos os continentes. O ataque ocorre em plantas estabelecidas em áreas anteriormente ocupadas por florestas nativas, plantadas ou em pomares infestados e, quando os hospedeiros são plantados entre plantas infectadas. A infecção inicia-se em plantas ainda jovens, quando as raízes encontram as rizomorfias que se desenvolvem a partir dos tocos e de restos vegetais presentes no solo contendo inóculo do patógeno (HOOD *et al*, 1991).

As medidas de controle recomendadas são de difícil aplicação e de eficiência duvidosa, por se tratar de um patógeno de solo. Na diagnose da doença, tem-se apenas identificado o gênero, sem a devida caracterização micológica da espécie de *Armillaria* associada (KRUGNER; AUER, 2005).

O gênero *Pinus* apresenta-se importante fonte de matéria-prima para o setor florestal brasileiro, com cerca de 1,9 milhões de hectares em plantações e cerca de 35 % do volume de madeira serrada produzida tem por base o pínus (MARTO *et al*, 2006). Notadamente, na região Sul do Brasil, são predominantes os plantios de *P. taeda* (a espécie mais plantada) seguida pela espécie *P. elliottii* var. *elliottii* (SHIMIZU, 2006). Esta participação na produção florestal é, por conseguinte uma fonte de riquezas para o setor industrial gerando um grande número de empregos e tributos, indispensáveis para o desenvolvimento de toda a região.

Considerando-se todos esses fatores expostos, há também ainda uma falta de conhecimento mais detalhado sobre o patógeno e seu controle, assim como uma real avaliação dos prejuízos causados por esta doença no mundo, o que exigem um estudo mais aprofundado sobre a armilariose do pínus.

A identificação de espécies de *Armillaria* tem como base dois tipos de metodologias: o teste de pareamento de culturas *in vitro* e o uso de métodos moleculares. (CROP, 2005). Os marcadores moleculares têm sido ferramentas muito úteis nos estudos de filogenia de fungos e na diferenciação de espécies, raças e isolados (KURAMAE; SOUZA, 2002). Nesse contexto, a análise molecular baseada

nos ácidos nucléicos tem sido usada para diferenciar variedades e identificar espécies de *Armillaria*, podendo demonstrar a diversidade genética de isolados individuais. (HARRINGTON; WINGFIELD, 1995; CHILLALI *et al.*, 1998; PÉREZ-SIERRA *et al.*, 1999).

Sendo assim, conhecimento sobre o agente causal, sua variabilidade e virulência, pode auxiliar no desenvolvimento de medidas de controle adequadas, e conseqüentemente minimizar os danos e as perdas provocadas pela armilariose na região Sul do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar isolados de *Armillaria* sp obtidos de árvores de pínus, pessegueiro e vassourinha-do-campo com sintomas de armilariose, na região Sul do Brasil, por meio de marcadores morfológicos e moleculares.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente os isolados de *Armillaria* sp.
- Estudar a variabilidade dos isolados por meio de marcadores RAPD.
- Identificar taxonomicamente e caracterizar os isolados de *Armillaria* sp por meio de sequenciamento das regiões ITS do DNA ribossomal.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características do gênero *Armillaria*

O gênero *Armillaria*, pertence à ordem Agaricales, classe Basidiomycetes e família Tricholomataceae (LUZ, 2008). Várias características morfológicas, culturais, entre outros fatores, auxiliam a distinguir *Armillaria* dos outros gêneros pertencentes a esta ordem. Coletivamente, estas características definem o gênero, e variações entre elas podem definir a espécie (WATLING *et al.*, 1991).

Assim como em outros macromicetos, as espécies de *Armillaria* são delimitadas primariamente pela morfologia dos basidiocarpos (cogumelos). Enquanto os isolados vegetativos podem ser identificados ou agrupados por vários métodos, os basidiocarpos são essenciais para a descrição completa e nomenclatura das espécies (WATLING *et al.*, 1991).

Algumas características do basidiocarpo de *Armillaria* são: píleo carnoso, mais ou menos orbicular; estipe carnoso, central ou excêntrico; anel presente, persistente, membranoso ou subaracnóide; volva ausente; lamelas adnexas, adnatas ou decurrentes; basidiósporos lisos, hialinos, brancos em massa (LUZ, 2008).

A macromorfologia do basidiocarpo, como a estrutura e ornamentação do pileipelis, características do anel, ornamentação da estipe, presença ou ausência de grampos submeniais ou basidiósporos, localização de pigmentos na parede celular ou em vacúolos, e tamanho e ornamentação dos esporos estão entre as características mais importantes para a diferenciação das espécies (WATLING *et al.*, 1991).

Pegler (2000) comenta que, 42 espécies são aceitas em todos os continentes, sendo encontradas na América Central e América do Sul, cerca de dez espécies. Watling *et al.* (1991), mencionam oito espécies encontradas na América do Sul: *A. griseomellea*, *A. montagnei*, *A. olivacea*, *A. procera*, *A. puiggari*, *A. sparrei*, *A. tigrensis* e *A. yungensis*. Ivory (1987) menciona uma nona espécie, *A. novaezelandiae*, que além da América do Sul, ocorre também na Austrália e na Nova Zelândia, atacando *Pinus*, *Eucalyptus* e outras espécies. Em concordância, Coetzee

et al. (2001), que registrou *Armillaria* sp em *P. oocarpa* e outras espécies na Austrália e Nova Zelândia.

3.2 Sintomas da armilariose e faixa de hospedeiros

Segundo Fox (2000), muitas espécies de *Armillaria* são parasitas facultativos, mas outras são saprófitas obrigatórios ou simbiontes. A principal forma de expansão pode ser a produção de rizomorfos, estruturas emitidas a partir das placas miceliais (FIGURA 1) que 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 rizomorfos permitam a infecção planta-planta por meio mecânico-enzimático, também as raízes saudias podem ser infectadas quando entram em contato com o micélio presente em raízes doentes. O autor relata que o processo de infecção depende de enzimas e toxinas produzidas pelo micélio e também, ressalta que as raízes injuriadas podem tornar-se bioquimicamente predispostas a ficarem doentes.



FIGURA 1 – (A) Rizomorfos de *Armillaria* sp. internas, sob a casca de árvore jovem de *Pinus elliottii*. var. *elliottii*. (B) Rizomorfos externas, a partir da casca em direção ao solo. FONTE: GOMES (2005).

Pearce e Malaczuk (1990) citam *Armillaria* spp. como causador de doença radicular e também de podridão de colo em florestas, pomares, árvores ornamentais e arbustos por todo o mundo e, também relatam que as rizomorfos são sua principal forma de expansão, particularmente em climas temperados.

Os sintomas que permitem a diagnose da doença são detectados nas raízes mais grossas e na base do tronco. Nestes locais, ocorre intensa exsudação de resina que se acumula no solo, ao redor das raízes ou do tronco, formando uma crosta constituída de solo e resina solidificada. As placas miceliais de coloração esbranquiçada que são formadas na região da entrecasca podem se estender no tronco a mais de 1 m de altura. Este crescimento micelial é a característica mais importante para a diagnose da doença. O fungo pode também formar rizomorfias na região da entrecasca, no lugar de placas miceliais, quando a árvore está morta (KRUGNER; AUER, 2005).

O gênero *Armillaria* tem como corpo de frutificação os basidiocarpos ou basidiomas, que geralmente se formam ao redor e sobre os tocos podres ou de árvores já mortas por seu ataque, mas de difícil observação. Na continuidade do processo de infecção, os basidiocarpos produzem basidiósporos que, disseminados pelo vento, podem dar origem a infecções primárias. Segundo Ferreira (1989), na ausência dos basidiocarpos é o micélio ou as rizomorfias, presentes em restos vegetais lenhosos como tocos, galhos ou raízes, que iniciam as infecções (FIGURA 2).

Para sua sobrevivência o fungo requer quantidades significativas de substrato energético, onde cresce saprofiticamente e pode infectar as raízes das árvores suscetíveis (FERREIRA, 1989).

Segundo a literatura, o patógeno pode ser isolado em meio BDA ou extrato de malte-ágar, descascando-se um ponto da raiz ou caule com lesão aparentemente nova, em franco progresso, da parte interna da casca ou superfície do lenho, no limite da lesão com o restante do tecido sadio. Então, os fragmentos de tecido doente podem ser removidos com um bisturi flambado e transferidos para meio de cultura ao qual pode ser adicionado alguns antibióticos (FERREIRA, 1989).

A predisposição à armilariose pode ocorrer tanto por fatores bióticos quanto abióticos, podendo haver uma interação complexa entre as mudanças químicas induzidas pela desfolha causada por insetos e déficit hídrico, facilitando a colonização por fungos do gênero *Armillaria* e resultando na mortalidade das árvores (WARGO, 1996).

Em relação à faixa de hospedeiros, somente em coníferas, Raabe (1962) relacionou 27 espécies de *Pinus* hospedeiras de *A. mellea*. Os hospedeiros mais

comuns, segundo Ivory (1987), são espécies de *Pinus*, especialmente *P. elliottii*, *P. caribaea*, *P. kesiya*, *P. merkusii*, *P. patula*, *P. radiata* e *P. taeda*.

Os primeiros registros de *Armillaria* em coníferas no Brasil ocorreram em árvores de *P. elliottii* com um ano e meio de idade, em Castro, PR, e em Joaçaba, SC, em 1961 (MAY, 1962). A ocorrência da doença foi constatada também em *P. elliottii* e *P. taeda*, por meio de amostras procedentes dos municípios de Guarapuava/PR, e Campos Novos/SC, analisadas pela seção de Fitopatologia do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná (TECPAR) por Czaja Neto e Fontoura (1970).

Spegazzini (1889) citou *A. mellea* como agente causal da armilariose no Brasil e descreveu duas novas espécies no Estado de São Paulo: *A. puiggarii* e *A. procera*. Inicialmente, Singer (1950,1956) considerou *A. procera* como um sinônimo de *Armillariella puiggarii*. No entanto, estes estudos não mencionam se o autor estudou as espécies descritas por Spegazzini, e as descrições que ele apresentou foram baseadas em suas próprias coleções, feitas principalmente na Argentina.

Posteriormente, Singer (1970), estudando novas coleções da Argentina, concluiu que *Armillaria procera* possivelmente era uma nova espécie, fazendo comparações com *Armillariella*.

Rick (1906, 1937) cita *Armillaria mellea*, *A. mellea* var. *chlorina* e *A. mellea* var. *olivacea*, como os dois primeiros considerados por Singer (1953) como *Armillariella puiggarii*, e a última, uma nova combinação como *A. puiggarii* f. *olivacea*. Posteriormente, Singer (1956) eleva *A. puiggarii* f. *olivacea* a nível de espécie, como *A. olivacea*. As variedades de Rick (1906) e a combinação de Singer (1956) não são válidas e consideradas *nomem nudum* de acordo com a Código.

Armillaria procera sensu Rick e *A. bresadolae* (RICK, 1907), citadas no Rio Grande do Sul são, respectivamente, *Pleurotus rickii* (BRESADOLA, 1920) e *Lepiota crassior* (SINGER, 1953). Rick (1920) também mencionou, para o mesmo estado, *A. carneo-gelatinosa* e *A. rhagadiosa*, hoje consideradas *Cyptotrampa asprata* (SINGER, 1953 como *Xerula chrysopepla*) e *Ripartitella brasiliensis* (SINGER, 1953), respectivamente.

Além das espécies acima mencionadas, Rick (1937) cita *A. mucida* e *A. mucida* var. *favacea*, esta última, atualmente *Oudemansiella canarii*, é amplamente distribuída no Brasil. Rick (1961) também descreveu duas novas espécies adicionais

de *Armillaria*, *A. virginea* do Rio de Janeiro e *A. subcinerescens* do Rio Grande do Sul, cujos tipos não foram revisados.

Para a América do Sul, o número de espécies citadas na literatura tem crescido consideravelmente com a descrição de várias espécies provenientes do Chile e da Argentina, incluindo a menção de espécies descritas na Austrália, como *A. limonea* e *A. novazelandiae* (SINGER, 1969). No que diz respeito à presença de *A. mellea* na Argentina e no Brasil, Singer e Digilio (1952) e Singer (1970) consideram a ocorrência desta espécie possível, e que o material coletado na Argentina (SINGER; DIGILIO 1952) poderia ser *A. puiggarii* e não *A. mellea* ou até mesmo outra espécie. Singer (1956) descreveu *Armillariella montagnei* como intimamente relacionada a *A. mellea*, e sugeriu, posteriormente, que *A. montagnei* poderia ser considerada um sinônimo de *A. mellea* (SINGER 1970; TERMORSHUIZEN; ARNOLDS 1987). Singer (1969) relatou que *A. montagnei* também ocorre na Europa, onde poderia ser confundida com *A. mellea*. Butin e Peredo (1986), relataram a presença de *A. mellea* (Vahl.: Fr.) Kumm em *P. radiata* e, também foi registrado o fungo *A. sparrei* Singer (Henrik) por Wright e Deschamps (1972) na Argentina.

No Brasil, a armilariose foi constatada em espécies florestais como *Pinus*, *Araucaria* e *Eucalyptus*, nos estados da região Sul e Sudeste, não tendo sido constatada em plantios de espécies tropicais de pinus (KRUGNER e AUER, 2005). *Armillaria* sp. também é o agente causal da podridão radicular, em plantações de chá de camélia (*Camellia sinensis*) (FURTADO, 1997), da podridão radicular de óleo de palma (*Elaeis guineensis*) (TRINDADE, 1997), e também é citada como agente causal da podridão branca em árvores pêsego (BLEICHER, 1997).

3.3 Identificação de espécies de *Armillaria*

A identificação de espécies de *Armillaria* tem como base dois tipos de metodologias (CROP, 2005). A primeira é o teste de pareamento de culturas *in vitro* utilizando diferentes meios de cultura visando a formação de basidiocarpos e produção de basidiósporos, que originam o isolado haplóide. O teste consiste no pareamento entre o isolado haplóide a ser identificado, com isolados haplóides

representantes de espécies às quais há possibilidade deste pertencer. Quando as culturas pertencem à mesma espécie, há o cruzamento entre elas e, quando não pertencem, aparece a formação de linha pigmentada no meio de cultura, na região de contato entre as culturas. Neste caso, torna-se imprescindível a existência de uma coleção de haplóides para se fazer os pareamentos de cultura, que ainda não é encontrada no Brasil em função da dificuldade em produzir basidiocarpos *in vitro*, conseqüentemente não sendo possível produzir culturas haplóides para este tipo de estudo.

A outra metodologia possível de ser utilizada é baseada no uso de métodos moleculares.

3.4 O uso de marcadores moleculares

Desde 1980, métodos de diagnoses bioquímicos e moleculares têm sido desenvolvidos. O método bioquímico inclui eletroforese (SDS PAGE) e análises de isoenzimas (CROP, 2005). Embora estes métodos sejam muitas vezes satisfatórios, as análises isoenzimáticas não se tornaram um método de rotina para a identificação de espécies de *Armillaria*.

Marcadores moleculares estão sendo cada vez mais utilizados para caracterizar populações de fungos fitopatogênicos, avaliar níveis de diversidade genética, relações filogenéticas intra e inter específicas e identificar raças e patótipos (LEAL-BERTIOLI,1998).

3.4.1. Marcadores moleculares do tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Em 1990, Williams *et al.* descreveram a técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), sigla para DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso, que permite, de maneira rápida, avaliar o grau de similaridade entre genótipos, em níveis inter e intraespecífico. Simultânea e independentemente, outros dois pesquisadores, Welsh e McClelland (1990), publicaram a metodologia com o nome de AP-PCR (Arbitrarily

Primed – Polymerase Chain Reaction), considerado como mais adequado, uma vez que os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) são arbitrários e, portanto suas sequências-alvo são desconhecidas, porém a amplificação ocorre em lugares específicos do genoma e não ao acaso (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O princípio da técnica assemelha-se àquele de duplicação do DNA, para a qual são necessários: uma fita de DNA a ser amplificada na forma desnaturada ou de fita simples; a presença de oligonucleotídeos iniciadores de 10 a 15 bases como iniciadores da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (Polymerase Chain Reaction), e uma enzima DNA polimerase que catalisa a reação (Taq DNA polimerase).

Os RAPDs constituem uma classe de marcadores moleculares extremamente úteis em estudos de tipagem molecular, taxonomia, genética de populações, mapeamento genético (AUFVRE-BROWN, COHEN e HOLDEN, 1992; GLIENKE, 1995), identificação de variedades patogênicas, obtenção de marcadores para diagnóstico via PCR (BLANCO, 1999; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002) e análise de recombinação via parameiose em fungos mitospóricos (DALZOTO *et al.*, 2003).

Um grupo de isolados de *Armillaria* do Japão e da África tiveram sua variabilidade genética estudada por Ota *et al.*, (2000). Previamente, os isolados estudados foram separados em quatro grupos distintos, através de estudos de compatibilidade somática. O dendrograma formado a partir das análises dos resultados do RAPD demonstrou a formação de três grupos distintos, sendo que dois dos grupos coincidiram com os grupos formados a partir dos estudos de compatibilidade somática.

Gatto, Sicoli e Luisi em 2009 estudaram, uma população de isolados de *Armillaria gallica* coletados no Sul da Itália que foram analisados por RAPD. Os diferentes oligonucleotídeos iniciadores utilizados agruparam os isolados em subgrupos, demonstrando baixa variabilidade genética intra-específica.

Dezessete isolados chineses de *Armillaria mellea*, foram submetidos à técnica de RAPD por Zheng *et al.*, 2009, onde dez oligonucleotídeos iniciadores produziram 106 bandas, das quais 96 demonstraram um padrão polimórfico. No dendrograma formado, foi observada a formação de quatro grupos distintos, demonstrando a presença de quatro perfis genéticos entre os 17 isolados, que foram correlacionados positivamente com quatro quimiotipos presentes entre os isolados.

3.4.2 PCR (Polimerase Chain Reaction) e sequenciamento de região ITS

No início da década de 90, Bruns *et al.* aplicaram as diversas técnicas de biologia molecular já descritas, para espécies de fungos. Entre estas técnicas, hibridização DNA-DNA, RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) e PCR. Em um estudo realizado em 1990, estes pesquisadores utilizaram a técnica de PCR para amplificar o DNA de 35 espécimes de fungos herborizados. Dezesesseis destas amostras foram seqüenciadas. Os resultados demonstraram a eficácia da utilização da técnica de PCR para a amplificação de DNA e sua importância na sistemática molecular e em estudos genéticos de populações de fungos (BRUNS *et al.*, 1990).

A PCR pode ser definida como um método *in vitro* para produzir grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e sequência definidos, a partir de uma pequena quantidade de um molde complexo de ácido nucléico (MULLIS; FALOONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988). A reação de amplificação é catalisada pela DNA polimerase, que alonga um pequeno fragmento de DNA de fita simples, o oligonucleotídeo iniciador, quando este está ligado a uma fita molde de DNA. O alongamento é feito pela adição, na extremidade 3'OH do iniciador, do nucleotídeo complementar ao nucleotídeo correspondente na fita molde. Os oligonucleotídeos iniciadores são sintetizados artificialmente, tendo como base uma sequência de nucleotídeos complementares às sequências que delimitam o fragmento de ácido nucléico a ser amplificado.

É uma técnica sensível, onde o DNA isolado de uma única célula, é suficiente para detecção de sequências específicas de genes. Além da detecção de genes em um DNA genômico, a PCR pode ser aplicada para clonagem de DNA; sequenciamento; quantificação de sequências específicas; análise de expressão gênica pela amplificação a partir de RNAm ; mutagênese direta e indireta; análise da estrutura de genomas; análise de interações DNA-proteína; evolução molecular; identificação de mutações, novos membros de famílias multigênicas e de polimorfismo; diagnóstico de patógenos e de doenças hereditárias; identificação de anormalidades cromossomais; mutações somáticas específicas e terapia gênica (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

Os ácidos ribonucléicos ribossomais (RNAr) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudo da diversidade. Seus genes são universalmente distribuídos e apresentam elevado grau de conservação. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão, em diferentes regiões da molécula (LANE *et al.*, 1985). A codificação do RNAr é feita em regiões específicas do genoma pelo chamado DNA ribossômico (DNAr).

O genoma nuclear possui vasta complexidade e muitos genes têm se mostrado úteis para inferir relações filogenéticas (FRIEDLANDER; REGIER; MITTER, 1992). O melhor exemplo da ampla utilização de genes nucleares em estudos filogenéticos é então a unidade de repetição do DNA ribossômico (DNAr), a qual tem sequências intercalares que variam dentro e entre populações e sequências codificadoras que são altamente conservadas e que servem como marcadores para comparação entre táxons divergentes (MINDELL; HONEYCUTT, 1990; HILLIS; DIXON, 1991), até mesmo entre reinos diferentes (PACE *et al.*, 1986).

Em fungos, o DNAr é uma molécula multigênica organizada em unidades repetidas dentro da região organizadora nucleolar. Cada unidade repetida consiste de regiões altamente conservadas que codificam os genes para os RNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas por regiões mais variáveis de espaçadores não-codificantes. Cada unidade de transcrição é composta de uma região promotora líder (ETS – *External Transcribed Spacer*), uma região codificadora do RNAr 18S, um espaçador não-codificante interno (ITS-1), uma região codificadora de RNAr 5,8S, um outro espaçador não-codificante interno (ITS-2), uma região codificadora de RNAr 28S e, finalmente, um segmento intergênico espaçador não-transcrito, IGS (HILLIS e DIXON, 1991; POLANCO *et al.*, 1998).

Estes marcadores moleculares têm sido ferramentas muito úteis nos estudos de filogenia de fungos e na diferenciação de espécies, raças e isolados (KURAMAE; SOUZA, 2002). Nesse contexto, a análise molecular baseada nos ácidos nucléicos tem sido usada para diferenciar variedades e identificar espécies de *Armillaria*, podendo demonstrar a diversidade genética de isolados individuais. (HARRINGTON; WINGFIELD, 1995; CHILLALI *et al.*, 1998; PÉREZ-SIERRA *et al.*, 1999).

Problemas em torno da identificação de *Armillaria* levaram a importantes avanços no desenvolvimento de técnicas de DNA. Tais técnicas têm incluído a análise da composição do DNA (JAHNKE *et al.*, 1987), hibridização DNA - DNA (MILLER *et al.*, 1994), análise da região IGS (ANDERSON; STASOVSKI, 1992) e

ITS (COETZEE *et al.*, 2001) e Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLPs) (SMITH; ANDERSON, 1989). Embora algumas dessas técnicas possam apresentar alguns problemas, em virtude da sua relativa simplicidade, estão gradualmente substituindo os métodos tradicionais (PÉREZ – SIERRA, 2000).

As espécies de *Armillaria* foram quase desconhecidas por muito tempo, pensando-se que todos os exemplares se restringiam a uma única espécie, *Armillaria mellea*. Os métodos moleculares demonstraram que *Armillaria mellea* trata-se na verdade de um complexo de espécies, muito semelhantes nas suas características morfológicas, mas com distintos padrões moleculares. Dados moleculares para várias espécies de *Armillaria* têm aumentado substancialmente desde a primeira publicação sobre a filogenia de *Armillaria* no hemisfério norte, (ANDERSON; STASOVSKI, 1992). Inicialmente, estes estudos se concentravam em espécies na Europa e na América do Norte (CHILLALI *et al.*, 1998; COETZEE *et al.*, 2000). Mais recentemente, no entanto, substanciais conjuntos de dados de espécies na África, Sudeste Asiático, Australásia e na América do Sul tornaram-se disponíveis (TERASHIMA *et al.*, 1998; COETZEE *et al.*, 2000, 2001, 2003; LIMA *et al.*, 2008; PILDAIN *et al.*, 2009).

Harrington e Wingfield (1995) amplificaram a região IGS de 74 isolados de 11 espécies definidas de *Armillaria*, coletados na Europa e na América do Norte utilizando técnica de PCR-RFLP, para confirmar suas espécies. Todas as amostras tiveram suas identidades confirmadas em apenas um dia. Este trabalho foi o primeiro a demonstrar a eficácia e a rapidez da técnica de amplificação por PCR, para a caracterização de espécies de *Armillaria*.

Utilizando a PCR e RFLP para amplificação e análise de região IGS, Volk, Burdsall e Banik, em 1996, identificaram uma nova espécie de *Armillaria*, na América do Norte, denominada *A. nabsona*, espécie restrita a alguns estados do Canadá e dos Estados Unidos.

Em 1997, Chillali *et al.* analisaram 13 isolados de *Armillaria*, coletados em diferentes locais da África tropical, utilizando PCR-RFLP. As regiões ITS e IGS foram amplificadas e analisadas através de digestão enzimática. No sequenciamento da região ITS, dois comprimentos diferentes foram observados nas sequências, sugerindo a presença de pelos menos dois grupos no estudo. O primeiro grupo incluiu isolados que aparentemente pertenciam à espécie *A. mellea*, além de dois isolados quenianos não identificados. O segundo grupo incluiu isolados

identificados como *A. heimii* e um isolado da Tanzânia. Cada variação do comprimento das sequências das regiões ITS1 e ITS2, demonstrou padrões de bandas distintas na análise de RFLP, com a utilização das enzimas *EcoRI*, *AluI*, *NdeI* e *HinfI*. Os resultados indicaram que o isolado não identificado da Tanzânia, era possivelmente *A. heimii*. Os dados também revelaram a presença de pelo menos três espécies distintas de *Armillaria* na África tropical, sendo a *A. heimii* a mais variável geneticamente.

Em 2001, vários isolados de *Armillaria* da Austrália e da Nova Zelândia, sendo *A. hinnulea*, *A. fumosa*, *A. pallidula*, *A. novae-zelandiae* e *A. luteobubalina* da Austrália; *A. limonea*, *A. novae-zelandiae*, *A. hinnulea*, e um isolado morfológicamente distinto e não identificado, provenientes da Nova Zelândia, tiveram suas relações filogenéticas estudadas através do sequenciamento de região ITS. O isolado não identificado se mostrou mais próximo da espécie *A. hinnulea*. As árvores filogenéticas geradas demonstraram a formação de um clado monofilético entre todas as espécies isoladas da Austrália e da Nova Zelândia (COETZEE *et al.*, 2001).

Baseando-se em sequências nucleotídicas das regiões ITS1 e ITS2, Coetzee *et al.*, em 2003, analisaram rizomorfos coletados de árvores doentes no Chile, Indonésia e Malásia. Além das rizomorfos, foram incluídos no estudo basidiocarpos com identidade morfológica incerta, mas similares a *A. novae-zelandiae* e *A. limonea*, originários do Chile e Argentina, respectivamente. Todos os isolados estudados foram comparados com várias sequências de *Armillaria* previamente publicadas no *genbank* bem como, suas relações filogenéticas com diversas espécies do Hemisfério Sul. Os resultados demonstraram, que as regiões ITS obtidas dos basidiocarpos similares à *A. novae-zelandiae* se mostraram muito semelhantes às sequências disponíveis para esta espécie, no *genbank*. As sequências obtidas dos isolados provenientes da Indonésia e da Malásia também demonstraram alta similaridade com *A. novae-zelandiae*, mas foram separados filogeneticamente desta espécie. Para os isolados obtidos no Chile, não foram encontrados basidiocarpos, e suas sequências ITS demonstraram ser muito semelhantes às de um isolado coletado na Argentina, similar à *A. limonea*, no entanto, suas sequências demonstraram alta similaridade e íntima relação filogenética com *A. luteobubalina*.

Em 2003, Sicoli *et al.*, desenvolveram na Europa, oligonucleotídeos iniciadores específicos para identificação de espécies de *Armillaria*, com base em variações na

sequência nucleotídica das regiões ITS e IGS do DNA ribossomal. Os oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados com sucesso, e as espécies *A. tabescens*, *A. mellea* e *A. ostoyae*, foram identificadas entre os isolados utilizados no estudo.

Em 2004, Lochman *et al* utilizaram oligonucleotídeos iniciadores específicos para a amplificação de uma parte específica da região ITS de isolados *Armillaria* coletados no solo. O método permitiu a identificação de espécies de *Armillaria* no prazo de um dia, diretamente das amostras do solo, sem a necessidade de isolamento e cultivo do micélio.

Em 2004, Bragança *et al* analisaram 20 isolados de uma coleção portuguesa de *Armillaria*, por meio de confrontações haplonte-diplonte ("mating-tests"-pareamento de culturas) e análise de restrição de região ITS. Foi possível identificar 80% dos isolados diplóides através das confrontações haplonte-diplonte, mas o método se mostrou trabalhoso e demorado (2 meses ou mais), além de apresentar uma alta taxa de resultados inconclusivos. A análise de restrição da região ITS1 com a enzima *HinfI*, permitiu discriminar claramente a espécie *A. mellea* (245 bp e 125 bp), uma das mais patogênicas, das espécies europeias deste gênero (290 bp e 70 bp). Este estudo também demonstrou que a utilização de métodos moleculares confere à identificação de espécies de *Armillaria* maior rapidez, simplicidade e confiabilidade nos resultados.

Em 2007, Guglielmo *et al.*, desenvolveram e otimizaram reações de PCR Multiplex (reação de amplificação desenhada para detectar múltiplas sequências-alvo em uma mesma amostra), para identificar fungos causadores de podridão em madeiras, em regiões temperadas do hemisfério norte. Os resultados demonstraram que o desenvolvimento e otimização de PCRs multiplex permite a identificação confiável de fungos diretamente de árvores doentes, tornando possível a detecção precoce, visando reduzir a severidade da doença e a evolução da deterioração das árvores.

Em 2008, Lima *et al* descreveram no Brasil uma nova espécie de *Armillaria*, morfológicamente distinta das outras espécies conhecidas, denominada *Armillaria paulensis*. O estudo foi baseado na morfologia e sequenciamento de região ITS de um único basidiocarpo encontrado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, localizado no sul da cidade de São Paulo. O espécime foi comparado

morfologicamente com outros basidiocarpos, e sua morfologia distinta sugeriu uma nova espécie. A sequência da região ITS foi comparada com sequências da África, Austrália e América do Sul, e demonstrou uma relação aproximada com *A. luteobubalina*.

Algumas espécies de *Armillaria* são muito semelhantes em sua morfologia e até mesmo em sua genética, de modo que outros métodos são necessários para facilitar a identificação. Este é o caso das espécies *A. cepistipes* e *A. gallica*, comuns na Europa. Em 2009, Antonín *et al* estudaram a ecologia das espécies, demonstrando que estas espécies tinham predileções por ambientes distintos, principalmente em altitude. Porém, neste mesmo trabalho, o estudo do fator de alongação alfa-1 (cofator da síntese protéica em células eucarióticas, responsável pela ligação do RNAt aos ribossomos durante a alongação de peptídeos), demonstrou alta variabilidade entre as duas espécies, sugerindo que o estudo deste gene específico pode ser uma ferramenta promissora na distinção de espécies de fungo intimamente relacionadas e o melhor método de identificação para *A. cepistipes* e *A. gallica*.

Em 2009, Pildain *et al.*, determinaram a identidade de uma coleção de 32 de isolados de *Armillaria* da Patagônia, baseada em suas sequências de DNA ribossômico e avaliaram suas relações filogenéticas com outras espécies utilizando as regiões ITS1 e ITS2. As árvores filogenéticas geradas a partir das sequências obtidas separaram os isolados de *Armillaria* em quatro linhagens. A linhagem I incluiu isolados da Patagônia e representantes de *A. novae-zelandiae* da Austrália e da Nova Zelândia. A linhagem II incluiu isolados da Patagônia, juntamente com isolados provenientes do Chile e da Argentina, que foram identificados como *A. luteobubalina*. Isolados de *A. novae-zelandiae* da Malásia, Nova Zelândia, Austrália e América do Sul formaram um grupo com considerável intra-subestrutura. As linhagens III e IV foram formadas por espécies provavelmente diferentes e estão mais estreitamente relacionados com *A. hinnulea* e com espécies não identificadas isoladas da Nova Zelândia e do Quênia. A sequência da nova espécie recentemente descrita em São Paulo por Lima *et al* em 2008, que possivelmente é uma espécie irmã de *A. luteobubalina* foi usada no estudo de Pildain *et al.*, (2009) como comparativo e ficou separada por um longo grupo das linhagens de *A. luteobubalina* utilizadas.

Utilizando a técnica de PCR Multiplex e sequenciamento de DNA ribossômico, Prodorutti *et al*, em 2009, avaliaram a diversidade genética de vários isolados de *Armillaria* coletados em 13 campos de mirtilo que apresentavam focos da doença, na região de Trentino, no norte da Itália. Os resultados revelaram que a maioria dos isolados se tratava das espécies *A. mellea* e *A. gallica*, demonstrando também, que em cada um dos 13 campos de coleta, foram encontrados de três a oito genótipos diferentes, além de que, o mesmo genótipo foi encontrado em mais de um campo diferente.

Atualmente, sequências de regiões ITS e IGS - 1 estão disponíveis no *genbank* para as mais conhecidas espécies de *Armillaria* (HARRINGTON; WINGFIELD , 1995; VOLK *et al.*, 1996; CHILALLI *et al.*, 1997; TERASHIMA *et al.*, 1998; COETZEE *et al.*, 2001, 2003; SICOLI, *et al.*, 2003; BRAGANÇA *et al.*, 2004; LOCHMANN *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2008, PILDAIN *et al.*, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de material biológico

Os estudos de campo (coleta de material doente e informações geográficas) foram desenvolvidos em áreas de mata nativa e de plantios comerciais de *Pinus taeda* e *P. elliottii* var. *elliottii* de empresas florestais, localizadas no estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul durante o período entre 2001 e 2008. Um isolado de pessegueiro, e um de vassourinha-do-campo, foram incluídos no estudo. Todos os isolados utilizados no estudo são parte da coleção da Embrapa Florestas (QUADRO 1).

QUADRO 1: Relação dos isolados de *Armillaria* utilizados no presente estudo.

CODIGO DO ISOLADO	MUNICIPIO/ESTADO	HOSPEDEIRO	NOME POPULAR
A1	Pirai do Sul – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A2	Pirai do Sul – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A3	Rio Negrinho – SC	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A4	General Carneiro – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A6	Calmon – SC	<i>Pinus taeda</i>	Pínus
A7	Campo Alegre – SC	<i>Pinus taeda</i>	Pínus
A8	Castro – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A11	Rio Negrinho – SC	<i>Pinus taeda</i>	Pínus
A12	São Mateus do Sul – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A13	Cambará do Sul – RS	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A14	Dona Emma – SC	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A15	Castro – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A16	Guarapuava – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A17	Rio Negro – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A18	Lapa – PR	<i>Prunus persica</i>	Pessegueiro
A19	Tijucas do Sul – PR	<i>Sida rhombifolia</i>	Vassourinha-do-campo
A20	Mangueirinha – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A22	Tunas do Paraná – PR	<i>Pinus elliottii</i>	Pínus
A23	Araucária – PR	<i>Pinus taeda</i>	Pínus
A24	Coronel Vivida – PR	<i>Pinus taeda</i>	Pínus
A25	Guairacá - PR	<i>Pinus taeda</i>	Pínus
A26	Guarapuava – PR	<i>Pinus taeda</i>	Pínus

FONTE: O autor (2009)

Os estudos laboratoriais foram desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas e no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

(LabMicro), do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

As atividades desenvolvidas referiram-se às coletas de material doente para a obtenção de isolados (FERNANDEZ, 1993) e de dados georreferenciados. As expedições de coleta foram concentradas em locais já com registro da doença ou por outras informações de literatura que relacionaram a coleta de isolados de *Armillaria* no Brasil (MAY, 1962; PEGLER, 1997; SINGER, 1953; SPEGAZZINI, 1889; GOMES, 2005).

Como sintomas típicos da armilariose foram considerados o amarelecimento geral da copa, bronzeamento e seca das acículas, expressando a morte da árvore, presença de exsudação de resina na base da árvore e a formação de placa micelial esbranquiçada na entrecasca do tronco e em raízes.

4.2 Isolamento

Amostras de troncos de plantas doentes coletadas foram transferidas para o laboratório e utilizadas para o isolamento em meio de cultura, inicialmente realizado em meio seletivo para *Armillaria* (GOMES; AUER, 2004) depois em meio BDA (batata, dextrose e ágar) (Merk). Para o isolamento o tecido infectado (placa micelial) (FIGURA 2) era coletado preferencialmente do segmento inferior do tronco da planta atacada (colo), logo após a limpeza do tronco para retirada de solo e outros resíduos com papel toalha.



FIGURA 2. Placa micelial de *Armillaria* no interior do tronco atacado. FONTE: GOMES (2005),

A separação da casca do lenho era realizada com uma faca ou lâmina previamente flambada retirando os fragmentos da madeira doente, placas miceliais ou rizomorfas, os quais eram inoculados em placas de Petri contendo meio seletivo para *Armillaria*. A incubação foi realizada em câmara de germinação tipo BOD à temperatura de 22 °C, de acordo com as condições previamente estabelecidas por GOMES *et al.*, (2002) para o gênero *Armillaria*.

Após a purificação das colônias do patógeno em meio seletivo, estas foram repicadas para placas de *Petri* contendo meio BDA, para a produção e conservação do inóculo.

A partir destes trabalhos de coleta e obtenção de isolados, montou-se uma coleção, composta por 27 isolados, coletados por Celso Garcia Auer, entre 2001 e 2008.

Os 22 isolados de *Armillaria* utilizados neste estudo estão armazenados em geladeira (4 °C), na forma de duplicata, parte em frascos de penicilina pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1963; SILVA *et al.*, 2005) e parte em tubos de ensaio com óleo mineral e meio de cultura BDA (FERNANDEZ, 1993), no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas..

4.3 Meios de cultura e soluções utilizadas

4.3.1. Meio Batata, Dextrose e Ágar (BDA) (Merck)

Infusão de batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	18 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

4.3.2 Meio seletivo para *Armillaria* (GOMES; AUER, 2004)

Meio BDA	1000 mL
Solução Rosa Bengala	100 mL
Benomyl	10 mL
Etanol Absoluto	10 mL
Clorafenicol	250 mg
Solução de ácido láctico 25%	1 mL

O clorafenicol e a solução de ácido láctico foram adicionados após a autoclavagem.

4.3.3 Meio com extrato de malte e ácido tânico

Água destilada	1000 mL
Extrato de malte	5 g
Ácido tânico	15 g
Ágar	20 g

4.3.4 Tampão CTAB

Tris-base	2,42 g
Cloreto de sódio	8,2 g
NaEDTA	2,0 g
Água destilada	8,0 mL

O pH final foi ajustado para 7,5 com HCL 1N.

4.3.5 Tampão de extração (TE)

Tris – HCl pH 8,0	20 mM
EDTA pH 8,0	20 mM

4.3.6 Solução EDTA 0,5M pH 8,0 + N–Laurilsarcosinato de Sódio (NaEDTA)

EDTA pH8,0	50 mM
N–Laurilsarcosinato de Sódio	1% (p/v)

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.3.7 Solução EDTA 0,5 M pH 8,0

O Ph desta solução foi ajustado pára 8,0 com NaOH 10N. Para obtenção de EDTA 50mM, diluiu-se esta solução 10 vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.3.8 Solução estoque de Tris-HCl 1M pH 9,5

Tris-base	1M
-----------	----

O Ph foi ajustado para 9,5 com HCl p.a.

4.3.9 Tampão de corrida para gel de agarose (TBE 10x)

Trizma base	0,89M
-------------	-------

Ácido bórico	0,89M
EDTA	0,02M
pH 8,0	

4.3.10 Tampão de amostra para gel de agarose

Glicerol (v/v)	50,0 %
Azul de bromofenol (p/v)	0,1 %
Xileno cianol (p/v)	0,1 %

4.3.11 Gel de agarose 0,6 %

Agarose	0,6g
Tampão TBE	100 mL

4.3.12 Gel de agarose 1,5 %

Agarose	1,5 g
Tampão	100 mL

4.3.13 Brometo de Etídio (Sambrook)

Brometo de etídio	1g
Água destilada	100 mL

A solução foi agitada durante 1 hora em agitador magnético e armazenada em frasco âmbar sob refrigeração.

4.3.14 Oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen)

Os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos em água ultra pura, usando o peso molecular do oligonucleotídeo iniciador individual dado pelo fornecedor. Os oligonucleotídeos iniciadores diluídos foram mantidos a -20°C.

4.3.15 Taq polimerase (Invitrogen)

A polimerase foi mantida em tampão apropriado com 50 % de glicerol.

4.3.16 dNTPs (Invitrogen)

ATP, CTP, GTP, TTP foram armazenados em quatro soluções mantidas a -20°C.

4.3.17 Marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com *Hind III* Gibco Invitrogen)

O marcador de peso molecular do DNA foi fornecido concentrado e no momento do uso, diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 1 µL do tampão da amostra: 4 µL de água ultra pura esterilizada. Na corrida eletroforética foi utilizado 5 µL do marcador.

4.3.18 Marcador de peso molecular (DNA *Ladder* 100pb Ludwing Biotec)

O marcador de peso molecular foi fornecido concentrado e no momento do uso diluiu-se na proporção de 1 µL do marcador: 2 µL do tampão da amostra: 7 µL de água ultra pura esterilizada. Na corrida eletroforética foram utilizados 3 µL do marcador.

4.4 Preparo de material

4.4.1 Esterilização

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, à pressão de 1 atmosfera por 20 minutos. Vidrarias em estufa à 250 °C por 3 horas.

4.4.2 Incubação

A incubação foi realizada à 22 °C, em incubadora tipo BOD, no escuro por aproximadamente 20 dias.

4.4.3 Identificação dos isolados

Os fungos isolados foram identificados morfológicamente, principalmente pela presença de rizomorfas, estruturas típicas do gênero (WATLING *et al.*, 1991).

4.4.4 Linhagens utilizadas

Neste estudo foram utilizadas 22 isolados de *Armillaria* da coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas, obtidos de árvores doentes de *Pinus elliotti*, *Pinus taeda*, *Sida rhombifolia* e *Prunus persica*, de diferentes regiões dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, apresentados no quadro 1.

4.5 Caracterização morfológica por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz

Três isolados de *Armillaria* sp. previamente selecionados de acordo com a procedência (cidade de Rio Negrinho, Santa Catarina; Cambará do Sul, Rio Grande do Sul e São Mateus do Sul, Paraná), foram cultivados em meio BDA (batata, dextrose e ágar) utilizando a técnica de retirada de micélio do meio. Parte do material foi examinada sob microscopia de luz (450x e 1000x) e a outra sob microscopia eletrônica de varredura, visando identificar as estruturas presentes durante o desenvolvimento filamentosos.

Para a análise em microscopia eletrônica, o micélio retirado do meio BDA foi fixado (glutaraldeído 2,5%, em 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 observadas no Microscópio Eletrônico de Varredura, da marca Jeol (Centro de Microscopia Eletrônica - UFPR).

4.6 Extração de DNA

A metodologia foi a utilizada por Vicente (2000). As amostras foram cultivadas em meio sólido BDA, na temperatura de 22°C, no escuro, conforme recomendação

de Gomes *et. al* (2002). Em seguida, aproximadamente 1 cm² de micélio de cada isolado foi coletado e transferido para tubos do tipo “ependorf”, contendo uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck/celite 2:1). Trezentos mL de tampão CTAB foram adicionados e o material foi triturado com auxílio do equipamento “Eppendorfpestle” (Mörser) durante 1 a 2 minutos. Após a trituração, foram acrescentados mais 200 µL de tampão CTAB. Os tubos foram agitados e incubados por 10 minutos a 65°C. Em seguida foram adicionados 500 µL de clorofórmio obtendo-se fases, as quais foram misturadas cuidadosamente. Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 14000 rpm (22000 g) durante 5 minutos. A fase aquosa foi coletada e 2 volumes de etanol 96% gelado foram acrescentados, e a precipitação do DNA realizada a -20 °C por 30 minutos ou tempo necessário. Após a precipitação do DNA, foi procedida novamente a centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool gelado a 70%, submetido à centrifugação por 1 minuto e os tubos vertidos até a secagem completa do precipitado à temperatura ambiente. Posteriormente, o DNA foi ressuscitado em 97,5 µL de água ultra pura esterilizada, e incubado em banho-maria a 37 °C durante 1 hora. A integridade do DNA obtido foi verificada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio.

4.7 RAPD – Amplificação

Para a amplificação do DNA (RAPD) foi empregada a condição experimental previamente testada por Vicente (2000). Para cada amostra utilizou-se uma mistura contendo além da amostra de DNA os seguintes elementos: 1,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase; 5 µL para cada dNTP; 3,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,4µM de oligonucleotídeos iniciadores; 20 mM de Tris-HCl pH 8,4; 5mM KCl e 10 ng de DNA por 25 µL de reação Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados, da Operon Technologies foram: OPX 14 (ACAGGTGCTG), OPX 17 (GACACGGACC) e OPX 19 (TGGCAAGGCA).

As condições da reação foram 40 ciclos com as seguintes condições: 1 minuto a 92°C; 1,5 minutos a 37°C e 2 minutos a 72°C. Foram utilizados 4 minutos a 92°C para desnaturação inicial e 2 minutos a 72°C de extensão final.

4.7.1 Eletroforese dos produtos de RAPD

Separadamente a mistura contendo 22 μ L de cada amostra e 3 μ L de corante foi aplicada no gel, além do marcador de peso molecular “Ladder” 100pb (MPM). A corrida do DNA no gel foi realizada sob voltagem constante de 3 v por cm. O gel foi corado com brometo de etídio e exposto à luz ultravioleta para a visualização das bandas de DNA e registro fotográfico.

4.7.2 Análise do polimorfismo obtido por RAPD

A análise de variabilidade genética foi realizada pelo agrupamento das linhagens segundo os princípios adotados em taxonomia numérica. Utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard e coeficiente simples (simple matching). Os quais permitem calcular similaridades com base em variáveis binárias (0 para ausência e 1 para presença de banda). As bandas foram consideradas variáveis enquanto as linhagens como unidades. O coeficiente Jaccard foi calculado segundo a fórmula $J = M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos concordâncias negativas, enquanto que o coeficiente simples foi calculado segundo a fórmula $SM = M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, mais concordâncias negativas e P o número total de variáveis (SNEATH; SOKAL, 1973). As unidades foram agrupadas através do método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average”), que é um modelo de agrupamento hierárquico que permite a construção de dendrogramas (SNEATH; SOKAL, 1973). Matrizes e dendrogramas foram elaborados com auxílio do programa NTSYS (“numerical taxonomy system of multivariate programs”) (ROHLF, 1988).

A consistência dos agrupamentos foi verificada pela análise *bootstrap*, segundo descrito por Felsenstein (1993) utilizando o “software Winboot” (YAP; NELSON, 1996). Foram utilizadas 10000 amostragens com reposição dos dados dos marcadores. Foram considerados consistentes os agrupamentos que

apresentaram P maior ou igual a 70%, sendo P a freqüência de determinado agrupamento no conjunto dos dendrogramas resultantes das repetições *bootstrap*.

4.8 PCR – Amplificação e sequenciamento

4.8.1 PCR – Ribotipagem

Fragmentos de DNA foram amplificados com os pares de oligonucleotídeos iniciadores V9G (5'TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-3') e LS266 (5' – gCATTCCCAAACAACACTCgACTC – 3'), segundo Gerrits van den Ende e de Hoog (1999), no termociclador “Eppendorf” (modelo). Para a reação de PCR foram utilizados um volume de 50 µL, contendo 10mM tris-HCL, pH 8,3; 50mM KCl; 1,5 mM MgCl₂ 6H₂O; 200mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 50 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 10-100ng de DNA total e 0,50 U de taq DNA polimerase (Invitrogen). O programa apresentava 30 ciclos (30 s de desnaturação a 94°C; 60 s de anelamento a 56°C; 60 s de alongamento a 72°C), utilizando 2 minutos para a desnaturação inicial e 3 minutos de extensão final.

Os produtos foram aplicados em gel de agarose 1,5% (utilizando 7 µL da amostra e 3 µL de tampão de corrida). Os fragmentos de amplificação obtidos foram visualizados no Analisador de Imagem “Master Vídeo System” com o software da “Pharmacia”. O marcador de peso molecular “Ladder” de 1Kp (Invitrogen) foi o utilizado. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit de purificação de bandas e DNA (GTX PCR DNA, “Pharmacia”).

4.8.2 Reação de sequenciamento

Na PCR realizada para o sequenciamento, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS4 (5'TCCTCCgCTTATTgATATgC-3'); e ITS5 (5'-ggAAgTAAAgTCgTAACAagg-3'), segundo White *et al.* (1990). Para cada reação foi

utilizado 4 μL do “mix” *big dye terminator* (“Terminator Ready Reaction Mix” da Perkin-Elmer Applied Biosystem”), 30 ng de produto de PCR purificado, 12 μL do oligonucleotídeo iniciador (25ng/ μL), 0,5 μL de tampão e água ultra pura a completar 10 μL . O programa de amplificação constituiu de 35 ciclos de 10 segundos à 96°C, 5 segundos à 50°C e 4 minutos à 60°C, com rampa de 1°C para os dois primeiros comandos e de 3°C para o terceiro. Após 35 ciclos foi utilizada a refrigeração à 4°C.

4.8.3 Precipitação do DNA para ser seqüenciado

O volume total (10 μL) dos produtos de amplificação foi transferido para tubos tipo “eppendorf” de volume 1,5 mL e 40 μL de isopropanol 75% foram adicionados. Após a homogeneização, as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado durante 25 minutos à 14000rpm. O sobrenadante obtido foi cuidadosamente removido visando a preservação do “pellet”. Posteriormente foi adicionado 200 μL de etanol à 70% e o material foi centrifugado por 5 minutos à 14000rpm (22000g) O sobrenadante retirado e o material precipitado foi secado em evaporador centrífugo (*speed vac*) por 45 minutos à 60°C.

4.8.4 Sequenciamento

Após a secagem completa do DNA precipitado, foi acrescentado 12 μL da solução TSR (“Template Suppression Reagent” da “Perkin-Elmer Applied Biosystem”) indicada para o seqüenciador utilizado. Depois da dissolução completa, a solução de DNA foi transferida para tubos recomendados pelo fabricante e mantidos em banho à 90 °C durante dois minutos e rapidamente transferidos para o banho de gelo até o momento da reação de sequenciamento realizada no seqüenciador “Prism ABI” (3130) automático da “Perkin-Elmer”(Applied Biosystem).

4.8.5 Alinhamento das sequências e construção da árvore filogenética

As sequências foram analisadas com o programa STADEN Package (THOMPSON *et al.*, 1994). Para o alinhamento, análises nucleotídicas e filogenia foi utilizado o programa MEGA 3 (KUMAR *et al.*, 2004).

4.8.6 Análise comparativa entre os isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil e isolados de diferentes publicações

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos, foram adicionadas sequências de região ITS provenientes no *genbank* de diferentes trabalhos publicados, como referência (QUADRO 2).

QUADRO 2: Relação das diferentes linhagens de *Armillaria* utilizadas como referência.

Linhagens	Espécie	País de origem	genbank - número de acesso
CMW 5844	<i>Armillaria fuscipes</i>	Etiópia	AY882969
CMW 7184	<i>Armillaria fuscipes</i>	Quênia	AY882973
CMW 7187	<i>Armillaria fuscipes</i>	Quênia	AY882972
CMW 4871	<i>Armillaria fuscipes</i>	Malawi	AY882976
CMW 4950	<i>Armillaria fuscipes</i>	Tanzânia	AY882979
CMW 2740	<i>Armillaria fuscipes</i>	África do Sul	AY882970
CMW 3164	<i>Armillaria fuscipes</i>	Quênia	AY882975
CMW 4873	<i>Armillaria fuscipes</i>	Malawi	AY882977
CMW 4949	<i>Armillaria fuscipes</i>	Tanzânia	AY882978
CMW 2717	<i>Armillaria fuscipes</i>	África do Sul	AY882971
CMW 4874	<i>Armillaria fuscipes</i>	Zimbábue	AY882967
CMW 10165	<i>Armillaria fuscipes</i>	Zimbábue	AY882966
CMW4977	<i>Armillaria luteobubalina</i>	Austrália	AF329912
CMW5704	<i>Armillaria luteobubalina</i>	Austrália	AF329913
DA275	<i>Armillaria luteobubalina</i>	Austrália	AF454741
DA184	<i>Armillaria luteobubalina</i>	Austrália	AF454742
ATCC38574	<i>Armillaria luteobubalina</i>	Austrália	AF454743
CMW4978	<i>Armillaria luteobubalina</i>	Austrália	AF329909
CMW4979	<i>Armillaria luteobubalina</i>	Austrália	AF329910
B608	<i>Armillaria mellea</i>	Coréia do Sul	AF163591
B917	<i>Armillaria mellea</i>	Coréia do Sul	AF163593
B916	<i>Armillaria mellea</i>	Coréia do Sul	AF163592

B731	<i>Armillaria mellea</i>	Japão	AF163594
B1212	<i>Armillaria mellea</i>	Hungria	AF163581
B525	<i>Armillaria mellea</i>	França	AF163585
B176	<i>Armillaria mellea</i>	Reino Unido	AF163578
B1217	<i>Armillaria mellea</i>	Estados Unidos	AF163597
B931	<i>Armillaria mellea</i>	Estados Unidos	AF163596
B927	<i>Armillaria mellea</i>	Estados Unidos	AF163595
B282	<i>Armillaria mellea</i>	Estados Unidos	AF163587
B496	<i>Armillaria mellea</i>	Estados Unidos	AF163589
B623	<i>Armillaria mellea</i>	Estados Unidos	AF163588
B497	<i>Armillaria mellea</i>	Estados Unidos	AF163590
CMW4986	<i>Armillaria nova-zelandiae</i>	Nova Zelândia	AF329925
CMW4722	<i>Armillaria nova-zelandiae</i>	Nova Zelândia	AF329926
CMW4963	<i>Armillaria nova-zelandiae</i>	Austrália	AF454739
CMW4966	<i>Armillaria nova-zelandiae</i>	Austrália	AF329923
CMW5448	<i>Armillaria nova-zelandiae</i>	Chile	AF448417
CMW5450	<i>Armillaria nova-zelandiae</i>	Chile	AF448418
Arg 272	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ711610
Arg 143	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ711611
Arg 281	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ711608
Arg 53	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ660936
Arg 56	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ711615
Arg 26	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ711605
Arg 17	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ711598
Arg 30	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ711601
Arg 45	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ660949
Arg 48	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ660950
Arg 21	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ711597
Arg 269	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ660945
Arg 29	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ660947
Arg 271	<i>Armillaria</i> sp.	Patagônia	FJ711596
CMW 3173	<i>Armillaria</i> sp.	Zambia	AY882981
CMW 10115	<i>Armillaria</i> sp.	Zimbabwe	AY882983
CMW 4455	<i>Armillaria</i> sp.	Zimbabwe	AY882985
CMW 3152	<i>Armillaria</i> sp.	Camarões	AY882980

FONTE: HARRINGTON; WINGFIELD, 1995; COETZEE, 2001, 2003; SICOLI, 2003; LIMA, 2008, PILDAIN, 2009

5.1 Caracterização morfológica

Três isolados foram selecionados de acordo com o estado de procedência (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), e submetidos à análise morfológica do micélio (FIGURA 3), através de microscopia eletrônica e microscopia de luz.

Nas micrografias obtidas tanto em microscópio eletrônico como em microscópio de luz, foram evidenciadas as seguintes estruturas: Grampos de conexão normalmente encontrados em espécies de basidiomicetos; projeções diminutas, similares a pêlos sobre a superfície de hifas características do gênero; massas resinosas sobre a parede de algumas hifas (FIGURA 4). Estas estruturas já haviam sido descritas e discutidas por Nobles, (1964) para várias espécies de basidiomicetos, entre elas *Armillaria*.



FIGURA 3: Aspecto da cultura de *Armillaria* em meio BDA, com extensão das rizomorfias a partir do micélio. FONTE: SILVA (2005)

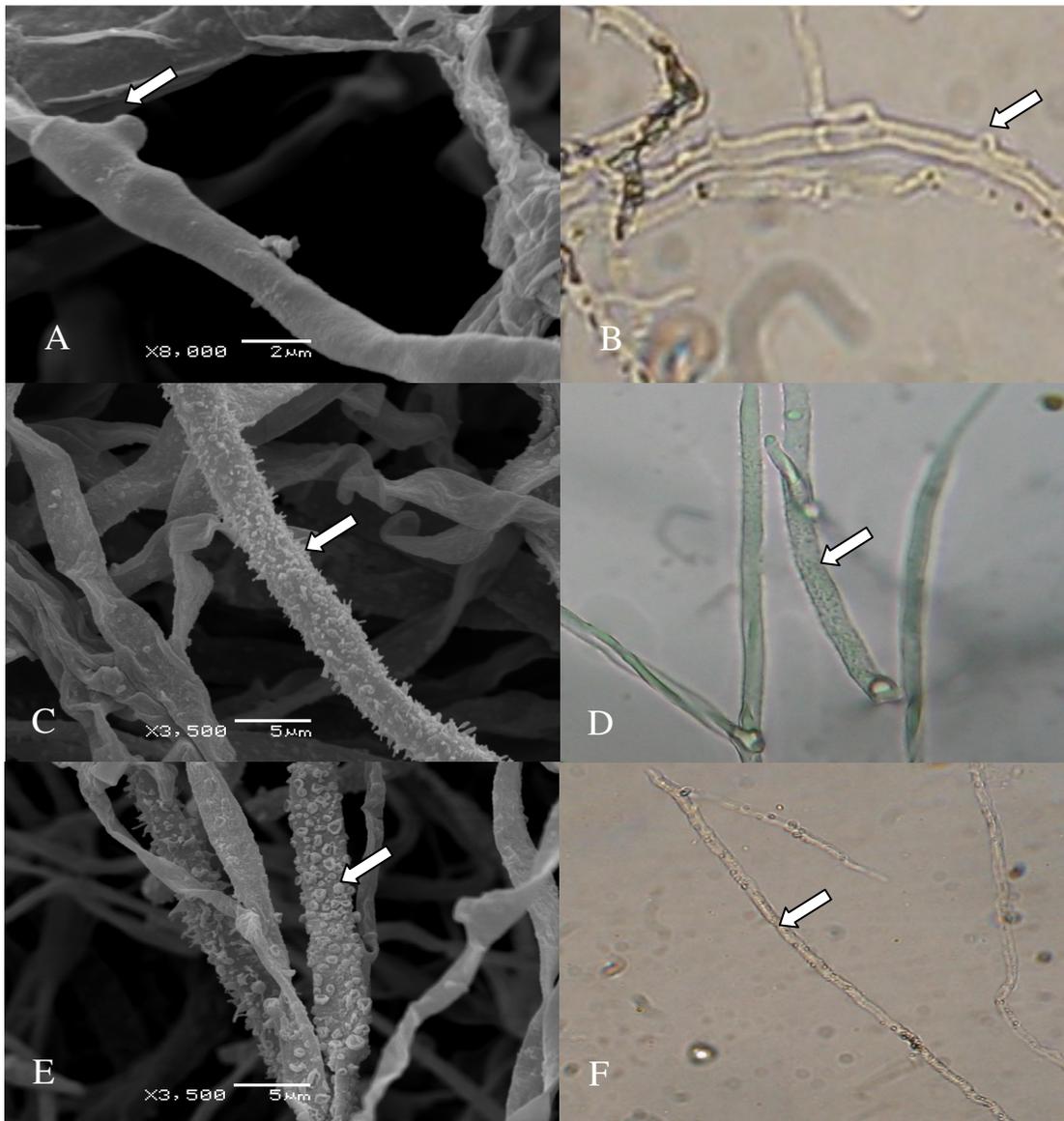


FIGURA 4: Microscopia eletrônica de varredura (esquerda) e de luz (direita), em *Armillaria sp.* A e B - Início da formação de grampões de conexão, normalmente encontrados em espécies de basidiomicetos; C e D - Projeções diminutas, similares a pêlos sobre a superfície de algumas hifas; E e F - Massas resinosas sobre a parede de algumas hifas. FONTE: O autor (2007).

5.2 Caracterização Molecular

Visando a identificação e o entendimento da posição taxonômica dos isolados, foi realizado um estudo molecular baseado em marcadores RAPD e em sequências das regiões ITS1, ITS2 e 5.8S.

5.2.1 RAPD

Os 22 isolados de *Armillaria* foram caracterizados por meio de marcadores RAPD utilizando três oligonucleotídeos iniciadores (OPX 14, OPX 17 e OPX 19), os quais geraram 51 bandas e o perfil de amplificação pode ser visualizado na figura 5.

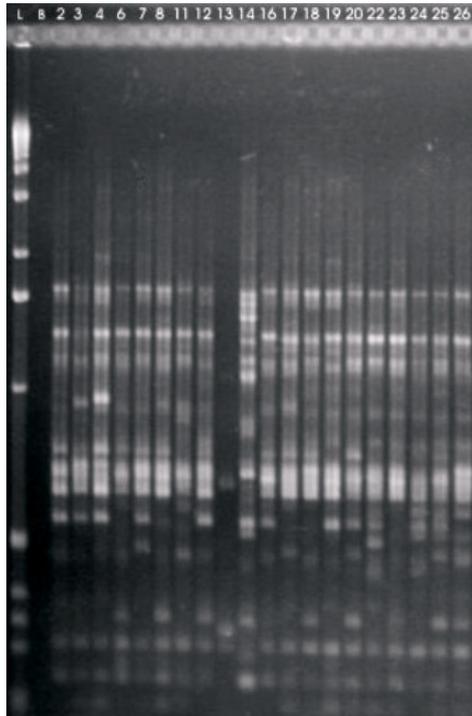


FIGURA 5: Perfil de RAPD obtido a partir do oligonucleotídeo iniciador OPX 17. Marcador de peso molecular: *Ladder* 100pb. As letras representam o *Ladder* (L), a amostra sem DNA (branco – B) e os números representam os diferentes isolados de *Armillaria*. FONTE: O autor (2008).

De acordo com o perfil de RAPD obtido, foi observada pequena variabilidade entre os isolados, em que a maioria apresenta um padrão de bandas monomórficas. Porém, de acordo com a análise de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard, verificou-se a formação de pelo menos três grupos, suportados com valores de *bootstrap* (*bootstrap*=100).

De acordo com o dendrograma gerado (FIGURA 6), o primeiro grupo foi formado por apenas um isolado (A1), proveniente da cidade de Piraí do Sul – PR, comportando-se como um grupo externo com alto suporte, considerando o valor de *bootstrap* encontrado.

O segundo grupo, sustentado por um valor de *bootstrap*=77, foi formado por 19 isolados, que parecem estar divididos em três subgrupos. O primeiro subgrupo foi formado por isolados provenientes de quatro regiões do estado do Paraná (A2, A4, A8 e A12) e três procedentes do estado de Santa Catarina (A3, A6 e A7), sendo que, de acordo com este agrupamento os isolados A2 e A7, procedentes de diferentes estados, parecem geneticamente próximos entre si. No segundo subgrupo, quatro isolados de diferentes cidades do estado do Paraná se agruparam (A16, A17, A18 e A23). No terceiro subgrupo, o agrupamento foi formado por seis isolados, cinco do estado do Paraná (A19, A20, A22, A24 e A25), e um do estado de Santa Catarina (A11). Enquanto que o isolado A26, procedente do estado do Paraná se encontra dentro do subgrupo II, porém agrupado de forma separada e o isolado A13 proveniente do estado do Rio Grande do Sul (único isolado deste estado utilizado no estudo) encontra-se separadamente relacionado a este agrupamento.

O terceiro agrupamento foi formado pelos isolados A14 e A15, sendo o primeiro proveniente da cidade de Dona Emma, no estado de Santa Catarina, e o segundo da cidade de Castro, no estado do Paraná, porém com baixos valores de similaridade entre si.

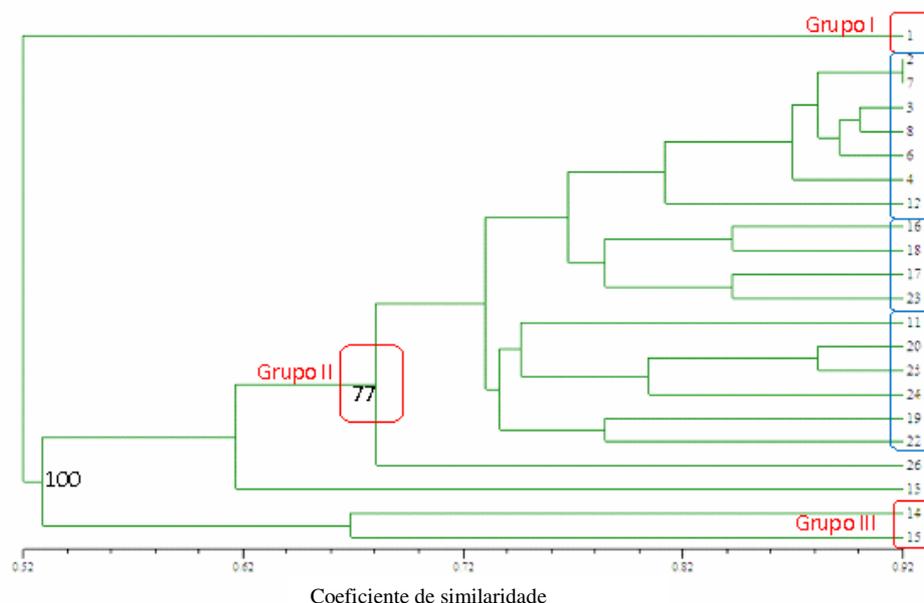


FIGURA 6: Dendrograma obtido com os dados de similaridade genética entre os 22 isolados de *Armillaria* utilizados no estudo, a partir dos oligonucleotídeos iniciadores OPX14, OPX17 e OPX19, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os quadrados em vermelho representam os grupos, e em azul os subgrupos. FONTE: O autor (2008).

5.2.2 PCR – Gene específica e sequenciamento de região ITS

A partir da amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores específicos, V9D e LS266, da região dos domínios variáveis do DNAr, foram obtidos “amplicons” de aproximadamente 1500 pares de base (pb).

Dos 22 isolados de *Armillaria* sp que foram submetidos ao sequenciamento da região intergênica do DNAr nuclear (ITS1, 5.8S e ITS2), 17 resultaram em sequências passíveis de serem analisadas. Um fragmento apresentando em torno de 776 pares de bases (pb) foi obtido para todos os isolados, onde a região ITS1 apresentou um comprimento de 360 pb, o 5.8S de 155 pb e o ITS2 de 260 pb.

Um total de 28 mutações foram descritas para os três fragmentos, em que 20 posições continham informações de parcimônia. Das 28 mutações, 15 foram descritas para o ITS1 e 13 para o ITS2. Dentre as amostras analisadas não houve diferenças nucleotídicas no fragmento 5.8S (TABELAS 1 e 2). A variabilidade nucleotídica para as amostras de *Armillaria* sp, analisadas no presente estudo é de 0,0360824.

TABELA 1: Diferenças nucleotídicas de *Armillaria* sp da região Sul do Brasil para os fragmentos ITS1 e ITS2.

	11111111	1122355566	66777777
	6692255556	7818448858	89111455
	2382612577	3841322876	94236534
	*****	*** ** ** *	***** *
A1	CAGATGAAGT	GAGCGGCATG	GACAAGTG
A2
A3	GGCG....C.	.G.....CC	A.TG...C
A4TCC	AG..A..G.C	ACTG...C
A6	GG.GC..TC.	.G.G....CC	AC.G....
A7	..C.....	.G.G....C.
A8G.G....CC
A11	GGCG....C.	.G.....CC	A.TG...C
A13	GG.G....C.	.G.GA...CC	A.TG...C
A15C.	...G....CCC
A16	..C.....	.G...C..CC	...GTA.C
A17	..c.....	.G.G....CC	.C.....
A18	GG.GC..TC.	.G....T.CC	ACTG...C
A20G.G....C.GA
A23	GG.GCTCTC.	.GA...T.CC	ACTG...C
A24	GG.G....C.	.G.G....CC	A.TG...T
A26	..C....TCC	AG..A.T.CC	...G...C

.Posição nucleotídica semelhante a amostra A1

*Posição nucleotídica com informação de parcimônia

FONTE: O autor (2009).

TABELA 2: Diferenças nucleotídicas (par a par) entre os isolados de *Armillaria* estudados (parte inferior). Na parte superior são representadas em vermelho o número de transições e em azul as transversões.

	A1	A2	A3	A4	A6	A7	A8	A11	A13	A15	A16	A17	A18	A20	A23	A24	A26
A1		0	7	9	7	2	2	7	8	1	4	2	9	3	10	7	7
A2	0		7	9	7	2	2	7	8	1	4	2	9	3	10	7	7
A3	12	12		8	2	5	5	0	1	2	3	5	2	3	5	1	2
A4	14	14	12		10	9	9	8	7	4	6	9	8	9	9	9	4
A6	13	13	7	13		5	5	2	3	3	5	5	2	6	3	2	3
A7	4	4	10	16	11		0	5	6	1	2	0	7	1	8	5	5
A8	4	4	10	14	9	2		5	6	1	2	0	7	1	8	5	5
A11	12	12	0	12	7	10	10		1	2	3	5	2	3	3	1	2
A13	13	13	3	11	6	11	9	3		7	6	6	3	6	4	2	0
A15	5	5	9	13	10	5	3	9	8		3	1	8	1	6	7	1
A16	9	9	9	15	14	7	7	9	12	8		2	7	7	9	6	4
A17	5	5	11	13	8	3	1	11	10	4	8		7	1	8	5	6
A18	15	15	5	9	4	15	13	5	6	12	14	12		7	1	3	8
A20	5	5	12	16	12	13	3	12	11	5	9	4	15		8	5	7
A23	18	18	8	12	7	18	16	8	9	15	17	15	3	18		4	5
A24	12	12	3	13	5	10	8	3	2	8	12	9	6	10	9		4
A26	12	12	10	6	13	10	10	10	11	9	9	11	11	12	14	13	

FONTE: O autor (2009).

A partir da análise filogenética (FIGURA 7) realizadas utilizando as sequências ITS dos isolados, foi observada uma árvore com dois grupos distintos. No grupo I estão os isolados A1 e A2 de Piraí do Sul (PR), A7 (Campo Alegre – SC), A20 (Mangueirinha - PR), A8 (Castro – PR), A17 (Rio Negro – PR), A15 (Castro – PR), A16 (Guarapuava – PR), A4 (General Carneiro – PR), e A26 (Guarapuava (PR). No grupo II foram reunidos os isolados A18 (Lapa – PR), A23 (Araucária – PR), A6 (Calmon – SC), A13 (Dona Emma – SC), A11 (Rio Negrinho – SC), A13 (Cambará do Sul –RS) e A24 (Coronel Vivida – PR).

De acordo com a árvore gerada (FIGURA 7), a maioria dos subgrupos obtidos não apresentou um alto valor de *bootstrap* e, não sendo possível traçar uma relação específica a partir deste resultado, como por exemplo, em relação à procedência ou hospedeiro. As localizações individuais estão ilustradas no anexo.

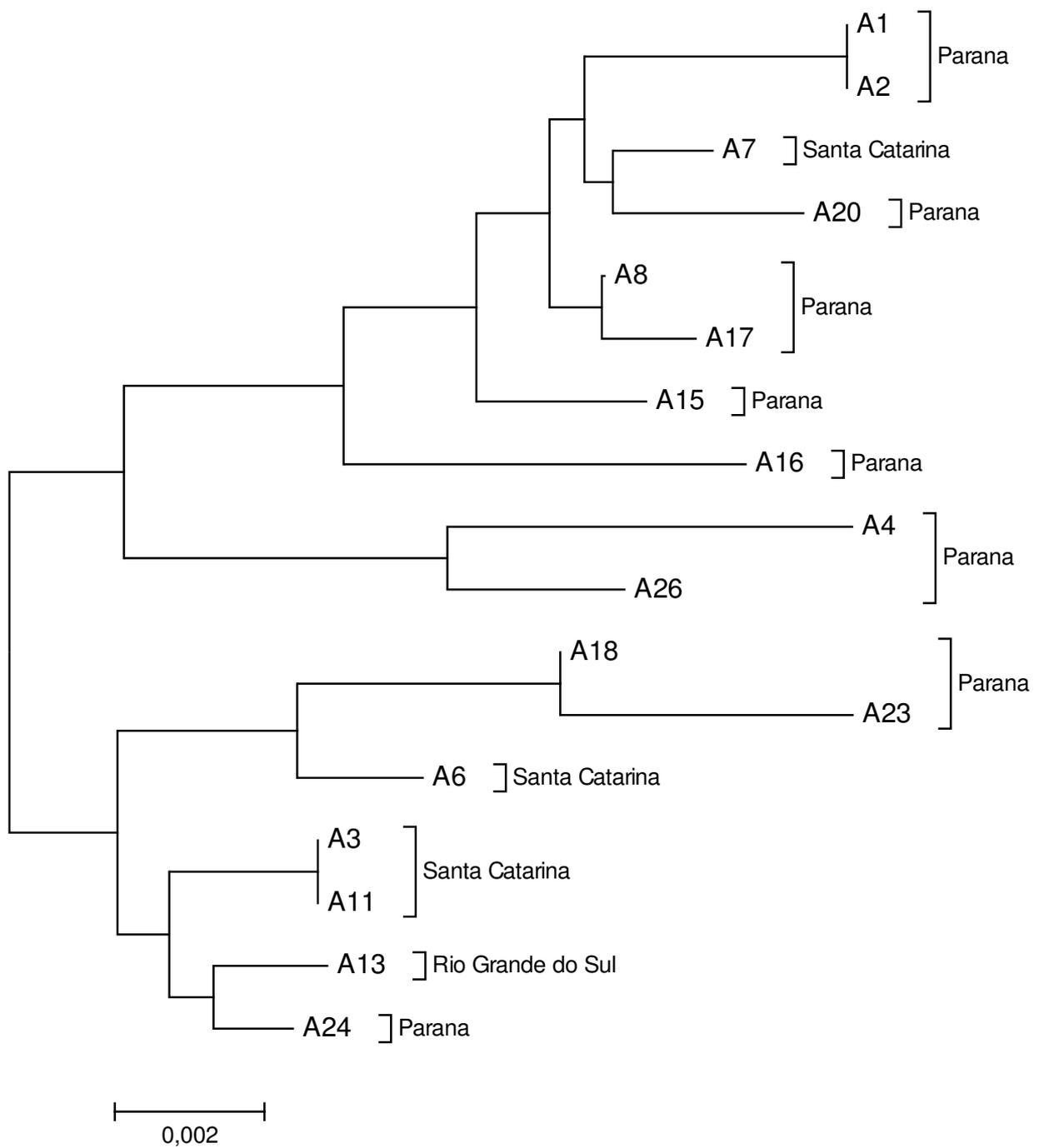


FIGURA 7: Árvore filogenética gerada pelo método de Neighbor-Joining (Kimura 2-parametros) a partir das sequências ITS dos isolados de *Armillaria* procedentes da Sul do Brasil. FONTE: O autor (2009).

Porém, de acordo com a figura 7 foi possível observar existência de diversidade genética entre os isolados, os quais formaram diferentes agrupamentos.

A diversidade entre os isolados pode ser visualizada na figura 8. Os valores dentro dos círculos demonstram que a variabilidade entre os isolados do Paraná é maior do que a obtida entre os isolados de Santa Catarina. Os números também demonstraram que a variabilidade entre os isolados (valor abaixo das linhas) do Paraná e o isolado do Rio Grande do Sul é maior do que a variabilidade entre o isolado do Rio Grande do Sul e os isolados de Santa Catarina. A variabilidade entre os isolados do Paraná e os isolados de Santa Catarina é ligeiramente menor do que a variabilidade apresentada entre os isolados do Paraná e o isolado do Rio Grande do Sul. Entre os isolados de Santa Catarina e o isolado do Rio Grande do Sul, a variabilidade foi a menor encontrada.

O fato de o número de isolados do Paraná ser maior que o número de isolados de Santa Catarina (oito e três, respectivamente) e de que apenas um espécime representa o Rio Grande do Sul, pode ter influenciado este resultado.

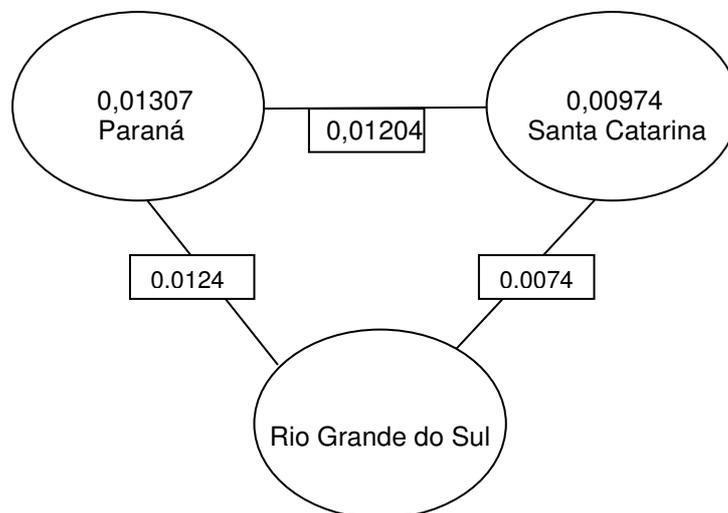


FIGURA 8: Diversidade nucleotídica entre isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil. Dentro dos círculos a distância nucleotídica intra-específica e dentro dos retângulos a distância nucleotídica entre as amostras dos estados estudados. FONTE: O autor (2009).

5.2.3 Análise comparativa entre os isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil e isolados de diferentes publicações

Com o objetivo de definir a posição taxonômica dos isolados de *Armillaria*, foi realizada uma análise, adicionando como referência, sequências de região ITS provenientes do *genbank* de diferentes espécies de *Armillaria* anteriormente publicadas. Estas linhagens estão listadas no quadro 2. Os resultados obtidos foram apresentados na tabela 3.

TABELA 3: Quadro comparativo entre as sequências ITS dos isolados de *Armillaria* sp procedentes do Sul do Brasil e linhagens referências utilizadas.

	Sul do Brasil	Patagonia	<i>A. mellea</i>	<i>A. luteobubalina</i>	<i>A. novae-zelandiae</i>	<i>A. fuscipes</i>	<i>Armillaria</i> sp
Comprimento do alinhamento*	776	1001	885	730	770	621	618
Comprimento médio	776	876,1	802,6	706,4	724,8	616,3	618
Número de posições nucleotídicas variáveis	28	168	113	24	33	6	6
Variabilidade	0,0360	0,2019	0,1407	0,0329	0,0429	0,0096	0,0097
Maior número de mutações**	18	64	37	11	20	6	6
Média das distâncias dentro do grupo***	0,0078	0,0556	0,0219	0,0035	0,0144	0,0020	0,0036

* Comprimento compreendendo as inserções/deleções

** Comparações par a par entre os isolados

*** Distancia calculada pelo método Kimura 2-parametros

FONTE: O autor (2009)

Quando alinhadas as sequências nucleotídicas das regiões intergênicas dos diferentes isolados de *Armillaria* com as das linhagens referências utilizadas, observou-se que o alinhamento das sequências, dentro de cada grupo analisado variou entre 618 a 1001 pares de bases. Somente as sequências ITS dos isolados deste estudo e as linhagens referências descritas como *Armillaria* sp não apresentaram, inserção/deleção (in/del), sendo que as sequências das linhagens referências procedentes da patagônia, apresentaram o maior número de in/del. Este

grupo foi também o que apresentou a maior variabilidade nucleotídica e a maior distância nucleotídica dentre os grupos de comparação (TABELA 4).

TABELA 4: Distâncias nucleotídicas para a região intergenica do DNAr nuclear entre os isolados de *Armillaria* estudada e as linhagens referências utilizadas.

	<i>A._luteobubalina</i>	<i>A._mellea</i>	<i>A._novae-zelandiae</i>	<i>A._fuscipes</i>	<i>Armillaria_sp</i>	Patagonia	Sul do Brasil
<i>A.luteobubalina</i>							
<i>A.mellea</i>	0,076458						
<i>A.novae-zelandiae</i>	0,099848	0,105852					
<i>A.fuscipes</i>	0,162131	0,168773	0,210941				
<i>A.sp</i>	0,164901	0,169439	0,199766	0,068423			
Patagonia	0,060223	0,077265	0,103149	0,172151	0,164296		
Sul do Brasil	0,030327	0,084260	0,097576	0,171612	0,161977	0,071988	

FONTE: O autor (2009)

Quando comparadas as distâncias nucleotídicas entre os diferentes grupos estudados observou-se que os isolados em estudo estão mais próximos da espécie *A. luteobubalina* e das linhagens referências provenientes da Patagônia, porém observou-se que os exemplares da Patagônia foram subdivididos em três grupos, sendo que as linhagens arg 143 (FJ711611 - província de Chubut), arg 272 e arg 281 (FJ711610 e FJ711608 respectivamente, ambas da província de Neuquen) eram as mais próximas dos isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil. As duas províncias, localizadas na Argentina são separadas pela grande província de Rio Negro, estando Chubut localizada ao Sul da Argentina, acima da província de Santa Cruz e Neuquen localiza-se na região central da Argentina, fazendo divisa com o Chile. As linhagens arg 53 (FJ660936) e arg 56 (FJ711615) foram observadas em um grupo com linhagens de *A. novae-zelandiae*, procedentes da Austrália e do Chile. As demais linhagens da Patagônia ficaram agrupadas com linhagens de *A. mellea* de diversas procedências.

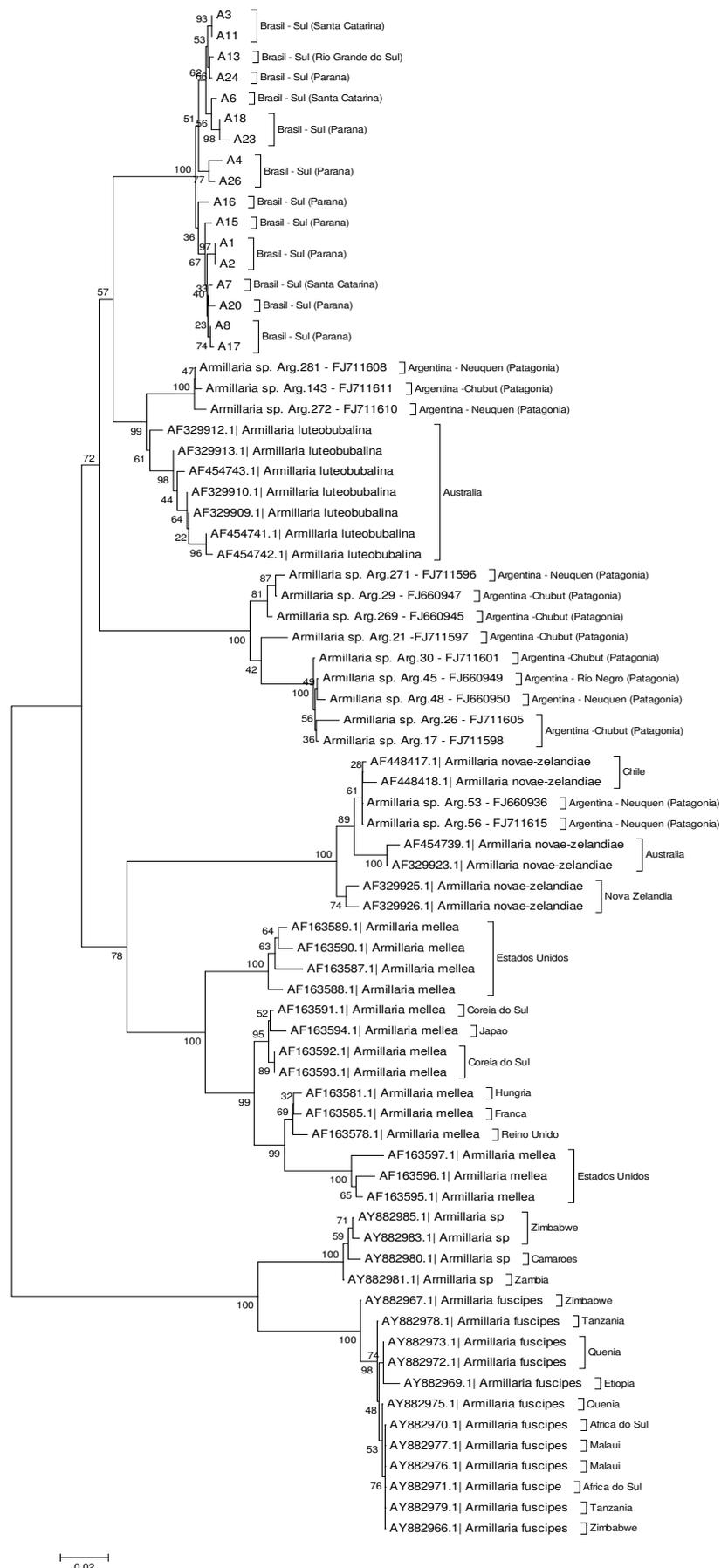


FIGURA 9: Árvore filogenética pelo método “Neighbor-Joining” Kimura 2-parâmetros, construída a partir do sequenciamento das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do DNA ribossomal dos isolados de *Armillaria* do Sul do Brasil e linhagens referências utilizadas. *Bootstrap* de 1000 replicações.

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização morfológica

Os isolados de *Armillaria* foram analisados morfológicamente pelo aspecto do micélio e por meio de microscopia de luz. As observações macromorfológicas do micélio, não revelaram nenhuma característica diferenciada entre os isolados, sendo a coloração e o aspecto dos micélios similar para todos os isolados, demonstrando um desenvolvimento micelial bastante irregular.

A presença e o aspecto das rizomorfias, formadas a partir do micélio, demonstrou uma leve variação em relação ao tipo de meio de cultura (BDA, meio seletivo para *Armillaria* e meio com ácido tânico e extrato de malte), não sendo formadas em poucas ocasiões, e em outras formadas com aspecto levemente mais grosseiro. Porém, quando repicadas novamente para o meio BDA, retornaram ao aspecto normal. Nenhum padrão foi observado em relação às rizomorfias dos diferentes isolados, não sendo possível detectar a causa desta variação.

Também foi observada alguma variação na coloração e no aspecto dos micélios, se apresentando mais ou menos volumosos, conforme repicados em meios de cultura diferentes, mas nenhum padrão foi detectado, não sendo possível diferenciar os isolados pela morfologia do micélio.

O meio de cultura contendo ácido tânico e extrato de malte foi utilizado para observar o crescimento micelial, e demonstrou acelerar a extensão das rizomorfias, conforme indicado por Nobles (1964).

Bruhn *et al*, em 1998, avaliaram as características do crescimento micelial de algumas espécies de *Armillaria*, e demonstraram que diferentes espécies apresentaram um padrão de crescimento diferente, variando em relação a formação de hifas aéreas, a densidade do micélio e à pigmentação escura observada no meio de cultura, porém, dentro da mesma espécie as variações eram mínimas ou indistinguíveis.

Mihail e Bruhn em 2005 estudaram o desenvolvimento de rizomorfias de várias espécies de *Armillaria in vitro* e sugeriram que algumas características destas estruturas são inatas de cada espécie, como a presença ou a ausência de melanina

e o mecanismo de invasão, aparentemente mais brando nas espécies menos agressivas. Contudo, foi observada uma grande variabilidade no diâmetro, no comprimento, na quantidade de estruturas formadas e na intensidade da coloração, variando conforme alterações na temperatura ou modificações na constituição do meio de cultura.

Em 2006 Cheng *et al* estudaram diferentes composições nutricionais para o crescimento de isolados de *Armillaria mellea* chinesas, e observaram grandes alterações na biomassa e na morfologia das culturas frente à diferentes nutrientes.

Em 2009, Yafetto *et al*, estudaram os mecanismos do crescimento das rizomorfias e concluíram que os padrões de crescimento eram alterados conforme alterações na densidade do meio de cultura, e ainda, que os padrões de extensão das rizomorfias são comparáveis aos padrões de extensão das hifas vegetativas isoladas, sugerindo que o comportamento mecânico das hifas é semelhante se crescerem isoladas ou agregadas ou para formar as rizomorfias macroscópicas.

Em todas as análises utilizando microscopia de luz, as estruturas observadas nos isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil, como grampos de conexão, projeções diminutas, similares a pêlos sobre a superfície de hifas e massas resinosas sobre a parede de algumas hifas (FIGURA 5), também não demonstraram um padrão entre os diferentes isolados, aparecendo aleatoriamente sobre algumas hifas, porém todos os isolados analisados demonstraram a presença dessas estruturas, em maior ou menor quantidade.

Três isolados selecionados de acordo com a procedência (um de cada estado da região Sul do Brasil), foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura. As estruturas observadas foram as mesmas, também não apresentando um padrão em relação à presença destas estruturas. Em 1964, Nobles descreveu e discutiu a presença destas estruturas para várias espécies de basidiomicetos, inclusive para espécies do gênero *Armillaria*. As espécies de *Armillaria*, não apresentam estruturas de reprodução no micélio, sendo sua dispersão realizada principalmente por meio da extensão das rizomorfias pelo solo. Os esporos são formados na base dos efêmeros basidiocarpos (WATLING,1991).

A morfologia dos basidiocarpos é a base da caracterização morfológica de isolados de *Armillaria*, mas estes corpos de frutificação nem sempre se desenvolvem no campo, também sendo de difícil produção *in vitro* (WATLING,1991).

Em 2008, Lima *et al* descreveram no Brasil uma nova espécie de *Armillaria*, morfológicamente distinta das outras espécies descritas, denominada *Armillaria paulensis*. O estudo foi baseado na morfologia e sequenciamento de região ITS utilizando como amostra de estudo um único basidiocarpo, encontrado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, localizado no sul da cidade de São Paulo. No estudo morfológico, o basidiocarpo foi comparado com vários basidiocarpos de espécies distintas de *Armillaria*, cujas diferenças sugeriram se tratar de uma nova espécie.

A análise morfológica dos isolados de *Armillaria* do Sul do Brasil, portanto, não revelou diferenças em relação à presença destas estruturas, o que auxiliaria na separação em diferentes grupos utilizando como critério a morfologia das hifas. Deste modo não foi possível separar os isolados em morfotipos. Confirmando esta similaridade na morfologia dos isolados, vários autores comentaram a dificuldade em se distinguir morfológicamente as culturas de espécies de *Armillaria* e ressaltaram importância da utilização de métodos moleculares como uma ferramenta adicional, visando uma identificação mais refinada e precisa destas espécies. (CHILALI *et al.*, 1998; VOLK *et al.*, 1996; COETZEE *et al.*, 2001, 2003; BRAGANÇA *et al.*, 2004; ANTONIN *et al.*, 2009; PILDAIN *et al.*, 2009).

6.2 Caracterização molecular por meio de marcadores RAPD

A partir do dendrograma gerado utilizando marcadores RAPD (FIGURA 6), foi possível visualizar a formação de três grupos, com valores de *bootstrap* consistentes, contendo pelo menos quatro subgrupos entre os 22 isolados de *Armillaria* analisados.

A partir da distribuição dos isolados provenientes de diferentes locais da região Sul do Brasil nos três grupos formados, não foi possível estabelecer relação com o local de coleta e nem com o hospedeiro. De acordo com os resultados da análise realizada, os isolados procedentes do mesmo local de coleta, pareciam estar em agrupamentos diferentes, como é o caso dos isolados A1 e A2, provenientes da cidade de Piraí do Sul - PR e dos isolados A3 e A11, ambos provenientes da cidade de Rio Negrinho – SC (FIGURA 6).

Pildain (2009) discute a não interação de isolados de *Armillaria* frente a hospedeiros específicos, ou seja, ainda não foi observada a predileção de alguma espécie ou raça por alguma espécie de hospedeiro.

O isolado A1, proveniente da cidade de Piraí do Sul – PR pareceu estar separado dos demais, comportando-se como um grupo externo e com suporte, considerando o valor de *bootstrap* encontrado. Porém, de acordo com o sequenciamento da região ITS, este isolado demonstrou ser geneticamente idêntico ao isolado A2, também proveniente da cidade de Piraí do Sul.

Os demais isolados foram arranjados em dois grupos, sendo o primeiro deles subdividido em quatro subgrupos, indicando assim, a existência de polimorfismo entre os isolados. No entanto, como os subgrupos apresentaram baixos valores de *bootstrap*, o sequenciamento das regiões ITS foi realizado para o entendimento da variabilidade sugerida pelos marcadores RAPD.

Os resultados gerados a partir das análises moleculares com base em marcadores RAPD demonstraram para alguns grupos coerência com os resultados obtidos a partir do sequenciamento de região ITS. No entanto, mais marcadores RAPD seriam necessários para realizar maiores inferências a respeito do polimorfismo indicado por estes marcadores.

De acordo com a literatura, existem resultados consistentes obtidos a partir de marcadores RAPD em diferentes grupos de isolados de *Armillaria*. Ota *et al.*, em 2000, caracterizaram isolados de *Armillaria* procedentes do Japão e da África. Inicialmente, os isolados estudados foram separados em quatro grupos distintos, através de estudos de compatibilidade somática. Os resultados das análises obtidas a partir dos marcadores RAPD demonstraram a formação de três grupos distintos, sendo que dois dos grupos coincidiram com os formados a partir dos estudos de compatibilidade somática.

Gatto *et al.*, em 2009 estudaram uma população de isolados de *Armillaria gallica* coletados no Sul da Itália, onde foram analisados por RAPD. Os diferentes oligonucleotídeos iniciadores utilizados agruparam os isolados em subgrupos, demonstrando baixa variabilidade genética intra-específica. Além disso, as análises obtidas a partir dos grupos formados, não corresponderam aos grupos formados por testes de compatibilidade somática, realizados anteriormente dentro da mesma população. Os resultados obtidos levantaram várias questões sobre a confiabilidade

da utilização de marcadores do tipo RAPD para caracterização molecular de isolados de *Armillaria*.

No entanto, Zheng *et al*, em 2009, submeteram 17 isolados chineses de *Armillaria mellea*, à técnica de RAPD, onde dez oligonucleotídeos iniciadores produziram 106 bandas, das quais 96 demonstraram um padrão polimórfico. No dendrograma formado, foi observada a formação de quatro grupos distintos, demonstrando a presença de quatro perfis genéticos entre os 17 isolados, que foram correlacionados positivamente com quatro quimiotipos presentes entre os isolados. Os autores sugerem que dez oligonucleotídeos iniciadores, é a quantidade mínima necessária para a obtenção de resultados mais consistentes para a caracterização molecular de isolados de *Armillaria* por meio de marcadores RAPD.

Sendo assim, os dados obtidos a partir das análises utilizando marcadores RAPD, demonstraram haver variabilidade genética entre os isolados de *Armillaria* do Sul do Brasil, embora uma grande similaridade entre eles tenha sido observada. Devido ao baixo número de marcadores utilizados para esta análise, e conseqüentemente a obtenção de grupos com baixos valores de *bootstrap*, um segundo marcador foi necessário para a caracterização dos diferentes isolados. Portanto, os 22 isolados em estudo foram caracterizados por meio do sequenciamento das regiões interespaçadoras (ITS1 e ITS2), e região 5.8S do DNA ribossomal.

6.3 Análise nucleotídica da região intergênica ITS1, 5.8S e ITS2 do DNA ribossomal nuclear de *Armillaria* do Sul do Brasil

Dos 22 isolados de *Armillaria* submetidos ao processo de sequenciamento nucleotídico, 17 resultaram em sequências passíveis de serem analisadas. Para os 17 isolados foram obtidas sequências de 776 pares de bases, considerando as regiões ITS1, 5.8S e ITS2. Quando comparadas com outras sequências publicadas para este fragmento, observou-se que as sequências nucleotídicas de *Armillaria* apresentaram um tamanho aproximado. As sequências nucleotídicas de isolados de *Armillaria* da África, obtidas por Coetzee *et al* (2003), apresentam 630 pb. Enquanto que as sequências nucleotídicas das linhagens referências procedentes da

Patagônia, estudadas por Pildain *et al* (2009), apresentaram tamanhos variando entre 768 e 852 pb.

A árvore filogenética apresentada na figura 9, formada a partir das análises das sequências ITS dos 17 isolados demonstrou a formação de dois grupos definidos. Assim como nos resultados obtidos a partir das análises através dos marcadores RAPD, o sequenciamento das regiões ITS demonstrou haver variabilidade entre os isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil, porém com grande similaridade entre eles.

De acordo com os diferentes grupos observados (FIGURA 7), pode se verificar que, com exceção dos isolados A1 e A2 e dos isolados A3 e A11, que eram idênticos e procedentes do mesmo local de coleta, os demais isolados foram distribuídos em diferentes grupos, independente do local de coleta e do seu hospedeiro. A falta de relação entre o local de coleta e hospedeiros foi detectada por Pildain *et al* (2009). No trabalho, foram utilizados 32 isolados de *Armillaria*, coletados de três diferentes Províncias, na Argentina: Neuquen, localizada mais ao norte, Chubut, localizada mais ao Sul e Rio Negro, posicionada entre as Províncias de Neuquen e Chubut, sendo a coleta realizada em diferentes pontos das três Províncias.

De acordo com Pildain *et al.*(2009) alguns isolados provenientes do mesmo ponto, se mostraram idênticos, ou próximos entre si. Enquanto que, outros isolados coletados no mesmo local, se agruparam em grupos bem distantes. Ainda neste estudo, os autores relataram que os isolados arg 142 e arg 281, ambos coletados no Lago Lácar, na província de Neuquen, pareciam ser de espécies diferentes, pois se arranjaram em grupos muito distantes, separados por pelo menos cinco espécies com origens bem distintas entre si (*A. luteobulalina*, *A. montagnei*, *A. limonea*, *A. hinnulea* e uma espécie não identificada). Os resultados de Pildain *et al.* (2009), demonstraram então que, os 32 isolados utilizados no estudo, possivelmente pertencem a pelo menos três espécies diferentes.

Os dados do trabalho de Pildain *et al*, (2009) não indicaram qualquer interação específica entre os diferentes isolados de *Armillaria*, com nenhuma espécie de hospedeiro. Isto não é surpreendente, pois é sabido que espécies de *Armillaria* não têm hospedeiros específicos, e a transferência de hospedeiros, por exemplo, entre Pinaceae e Fagaceae, ocorre com frequência (KILE *et al*, 1991).

Sendo assim, com o objetivo de comparar os isolados de *Armillaria* do Sul do Brasil com outras linhagens de diferentes partes do mundo, foram adicionadas 57 linhagens como referências, procedentes de diferentes trabalhos publicados abrangendo o estudo da região ITS e uma árvore filogenética foi gerada (FIGURA 9).

De acordo com as análises das sequências ITS dos isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil, e das linhagens utilizadas como referência, foi observado que os isolados do Sul do Brasil estão reunidos em um único subgrupo com valor de *bootstrap* fortemente sustentado, sugerindo assim se tratar de uma única espécie, porém outros genes deveriam ser seqüenciados para sustentar tal proposição.

Quando comparadas as distâncias nucleotídicas entre os diferentes grupos estudados foi observado que os isolados do presente estudo estão mais próximos da espécie *A. luteobubalina* e das linhagens provenientes da Patagônia.

Na análise filogenética das linhagens de *Armillaria* da Patagônia (PILDAIN *et al* 2009), as linhagens arg143, arg272 e arg281, as mais próximas dos isolados deste estudo, formaram um subgrupo com três linhagens de *Armillaria luteobubalina* e uma linhagem de *Armillaria montagnei*. Singer (1956) relatou a presença de *Armillaria montagnei* na Patagônia, na Província de Neuquen. Os resultados do trabalho de Pildain *et al.* (2009) sugerem que estas três linhagens, pertencem à espécie *A. montagnei*. Contudo, os autores relatam que, somente com estudo da morfologia do basidiocarpo, será possível confirmar esta hipótese.

Recentemente, Lima *et al.*, (2008) propuseram uma nova espécie, *A. paulensis*, coletada no Estado de São Paulo. No entanto, este estudo foi baseado em um único basidiocarpo. Com base em análises de sequenciamento de região ITS1 e ITS2, este isolado demonstrou alta proximidade com linhagens identificadas como *A. luteobubalina*, provenientes da América do Sul e da Austrália. E, de acordo com a árvore filogenética gerada, *A. paulensis* seria uma nova espécie, relacionada, ou seja, próxima da espécie *A. luteobubalina*. No entanto, o fator determinante para a caracterização desta nova espécie, foi a morfologia do basidiocarpo, não sendo possível relacionar a sequência nucleotídica da região ITS publicada no *genbank* (EF639348.1) (LIMA *et al*, 2008), com nenhuma das sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo, em função da grande incompatibilidade, não tornando viável o alinhamento. Este fato também foi relatado por Pildain *et al.*, (2009).

A obtenção de uma nova sequência a partir deste isolado descrito como *A. paulensis*, poderia possibilitar uma comparação com as sequências de *Armillaria* do Sul do Brasil, e as relações taxonômicas entre elas poderiam ser elucidadas. A análise filogenética demonstrou que os isolados de *Armillaria* coletados de diferentes locais da região Sul do Brasil apresentam grande similaridade entre si, apesar da variabilidade genética observada. E ainda pode ser possível que esta similaridade também venha a ser observada em uma futura análise, incluindo um novo sequenciamento do isolado procedente do estado de São Paulo com os isolados da região Sul do Brasil.

Como já discutido, todos isolados de *Armillaria* do presente estudo formaram um único grupo fortemente sustentado por valores de *bootstrap*, demonstrando alta similaridade entre si, sugerindo a presença de uma única espécie, ou espécies relacionadas. Contudo, é importante correlacionar os dados obtidos através das análises filogenéticas, com as características morfológicas dos basidiocarpos, que ainda não foram produzidos com sucesso *in vitro*.

Embora espécies de *Armillaria* da América do Sul têm sido relativamente bem estudadas, as origens e as relações evolutivas ainda devem ser discutidas dentro de um abrangente contexto filogenético molecular (PILDAIN *et al.*, 2009).

No entanto, considerando os resultados obtidos a partir deste estudo, onde os isolados procedentes da região sul do Brasil foram submetidos a uma análise mais abrangente, utilizando linhagens de referência de diversas procedências, observou-se que estes isolados formaram um grupo a parte, sugerindo assim, uma possível especiação, formando um único grupo filogenético. Porém faz se necessário ressaltar a existência de variabilidade entre eles.

Futuramente, outros genes deverão ser seqüenciados, visando uma análise multilocus, envolvendo genes de fator de alongamento de proteínas, para confirmar os resultados obtidos. Um número maior de isolados, aliados à tentativa de obtenção de basidiocarpos *in vitro*, poderão melhor caracterizar os espécimes de *Armillaria* da região Sul do Brasil e entender seus processos de disseminação, no intuito de esclarecer melhor as características ecoepidemiológicas da armilariose, e assim poder estabelecer meios eficazes de controle, reduzindo os prejuízos causados pela doença.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que:

- Os resultados obtidos por meio dos marcadores RAPD, demonstraram que, apesar da similaridade observada entre os isolados, pareceu haver variabilidade entre eles. Este dado foi comprovado através do sequenciamento das regiões ITS.
- As análises filogenéticas sugeriram que os 17 isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil submetidos ao sequenciamento, pertencem a uma única espécie, a qual parece ser muito próxima da espécie *A. luteobubalina* e das linhagens referências de *Armillaria* procedentes da Patagônia, as quais parecem se tratar da espécie *A. montagnei*.
- Os estudos envolvendo dados moleculares deverão ser ampliados e aliados a características morfológicas dos basidiocarpos para o desenvolvimento de conceitos taxonômicos mais sólidos, para este grupo em estudo, dando suporte para a proposição de uma nova espécie de *Armillaria*, procedente do Brasil.

8. REFERÊNCIAS

ANDERSON, J.B., STASOVSKI, E. **Molecular Phylogeny of Northern Hemisphere species of *Armillaria***. *Mycologia* 84:505–516, 1992.

ANTONÍN, V.; TOMSOVSKY, M.; SEDLAK, P. **Morphological and molecular characterization of the *Armillaria cepistipes* – *A. gallica* complex in the Czech Republic and Slovakia**. *Mycol Progress*. German Mycological Society and Springer, 2009.

AUFAUVRE-BROWN, A.; COHEN, J.; HOLDEN, D. W. Use randomly amplified Polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2991-2993, 1992.

BLANCO, C. G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo. 200 p. Piracicaba, 1999.

BLEICHER, J. **Doenças de rosáceas de caroço (pessegueiro, ameixeira, nespereira, etc)**. In: Manual de Fitopatologia. KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M.. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, cap. 56, p.621-627, 1997.

BRAGANÇA, H., TENREIRO, R. e SANTOS, N.. **Identificação de Isolados Portugueses de *Armillaria* por Testes Clássicos de Confrontação e Análise de RFLP-PCR da Região ITS1 do DNA Ribossomal**. *Silva Lus*, vol.12, no.1, p.67-75, 2004.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA-Cenargen, Brasília, 309p, 1998.

BRESADOLA, G. **Selecta mycologica**. *Annales Mycologici* 18: 26–70, 1920.

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*. 142(2):89-96, 1998.

BRUNS, T.D; FOGEL, R; TAYLOR, J.W. **Amplification and Sequencing of DNA from Fungal Herbarium Specimens**. *Mycologia*, Vol. 82, No. 2, pp. 175-184, 1990.

BUTIN, H.; PEREDO, H. L. **Hongos parásitos en coníferas de América del Sur.** Bibliotheca Mycológica, Band 101, Cramer, Berlin Stuttgart, 100 p, 1986.

CASTELLANI, A. **The "water cultivation" of pathogenic fungi.** J. trop. Med. Hyg., 66: 283-284, 1963.

CHENG, X.H.; GU, S.X. **Cultural characteristics of *Armillaria mellea* on solid media.** Zhongguo Yi Xue Ke. 28(4):553-7, 2006.

CHILLALI, M.; WIPF, D.; IDDER-IGHILI, H.; GUILLAUMIN, J.J.; MOHAMMED, C.; BOTTON, B. **Species delimitation in the African analysis of the ribosomal *Armillaria* complex by DNA spacers.** Journal of General and Applied Microbiology. pp. 23-29, 1997.

CHILLALI, M.; WIPF, D.; GUILLAUMIN, J.J.; MOHAMMED, C.; BOTTON, B. **Delineation of the European *Armillaria* species based on the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA.** New. Phytol. 138 (3). p 553-561, 1998.

COETZEE, M. P. A.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J. **Identification of the causal agent of *Armillaria* root rot of *Pinus* species in South Africa.** Mycologia. The Mycological Society of America, Lawrence, p. 777-785, 2000.

COETZEE, M. P. A.; WINGFIELD, B. D.; BLOOMER, P.; RIDLEY, G. S.; KILA, G. A.; WINGFIELD, M. J. **Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand *Armillaria* species.** Mycologia. The Mycological Society of America, Lawrence, p. 887-896, 2001.

COETZEE, M. P. A.; WINGFIELD, B. D.; BLOOMER, P.; RIDLEY, G. S.; WINGFIELD, M. J. **Molecular identification and phylogeny of *Armillaria* isolates from South America and Indo-Malaysia.** Mycologia. The Mycological Society of America, Lawrence, p. p. 285-293, 2003.

CROP Protection compedium. **datasheet: *Armillaria luteobubalina*.** (armillaria root rot). CAB International, Wallingford, UK, 2005.

CZAJA NETO, F.; FONTOURA, O. S. **Nova constatação de armilarirose em *Pinus taeda* e *P. elliottii*.** Revista do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas. Curitiba, n.15, p.8, 1970.

DALZOTO, P. R.; GLIENKE-BLANCO, C.; KAVA-CORDEIRO, V.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. **RAPD analyses of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana***. *Mycological Research*, v. 107, p.1069-1074, 2003.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c**. Seattle Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, 1993.

FERNANDEZ, M.R. **Manual para Laboratório de Fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPQ, 128p, 1993.

FERREIRA, F.A. **Patologia Florestal; principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: SIF, 570p, 1989.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

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, p. 151-171, 2000.

FRIEDLANDER, T. P., REGIER, J. C., MITTER, C. **Nuclear gene sequences for higher level phylogenetic analysis: 14 promising candidates**. *Syst. Biol.*, v.41, p.483-490, 1992.

FURTADO, E.L. **Doenças do chá (*Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze)**. In: Manual de Fitopatologia. KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M.. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 257–260, 1997.

GATTO, A; SICOLI, G; LUISI, N. **Genetic Diversity within an Italian Population of Forest *Armillaria gallica* Isolates as Assessed by RAPD-PCR Analysis**. Correspondence to Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università degli Studi di Bari, Vol.157, Italy, 2009.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) – Universidade Federal do Paraná. 115 p., Curitiba, 1995.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. de **Genetic variability in the endophytic fungus**

Guignardia citricarpa isolated from citrus plants. Genetics and Molecular Biology, v. 25, n. 2, p. 251-255, 2002.

GOMES, N.S.B.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Temperaturas para desenvolvimento de *Armillaria* sp.** Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo, v. 69, p. 278-279, 2002.

GOMES, N.S.B.; AUER, C.G. **Meio seletivo para *Armillaria* sp.** In: III Evento de Iniciação Científica da Embrapa Florestas, Colombo, 102p, 2004.

GOMES, N.S.B. **Armilariose em *Pinus elliottii*: etiologia, determinação de danos e medidas de controle, nos estados do Paraná e de Santa Catarina.** (Tese de Doutorado em Engenharia Florestal - Universidade Federal do Paraná) 96 p, 2005.

GUGLIELMO, F.; BERGEMANN, S.E.; GONTHIER, P.; NICOLOTTI, G.; GARBELOTTO, M. **A multiplex PCR-based method for the detection and early identification of wood rotting fungi in standing trees.** Journal of Applied Microbiology, vol 103, n 5. Pp.1490-1507, 2007.

HARRINGTON, T.C; WINGFIELD, B.D. **A PCR-Based Identification Method for Species of *Armillaria*.** Mycologia, 87(2).p 280-288, 1995.

HILLIS, D. M., DIXON, M. T. **Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference.** *Quart. Rev. Biol.*, v.66, p.411-453, 1991.

HOOD, I. A.; REDFERN, D. B.; KILE, G. A. ***Armillaria* in Planted Hosts.** In: SHAW, C. G., III; KILE, G. A. (Ed.) *Armillaria* Root Disease, Agriculture Handbook n.691, Forest Service-USDA, Washington, D.C, p. 122-149, 1991.

IVORY, M.H. **Diseases and disorders of pines in the tropics; a field and laboratory manual.** Oxford, Oxford Forest Institute, 92p, 1987.

JAHNKE K. D., BAHNWEIG G., WORRAL J. J. **Species delimitation in the *Armillaria mellea* complex by analysis of nuclear and mitochondrial DNAs.** Trans Br Mycol Soc 88: 572–575, 1987.

KILE, G.A.; McDONALD, G.I.; BYLER, J.W. **Ecology and disease in natural forests.** In: Shaw CG, Kile GA (eds) *Armillaria* root disease. Agricultural Handbook no. 691, USDA Forest Service, Washington DC, p 102–121, 1991.

KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. **Doenças dos pinheiros**. In: Manual de Fitopatologia. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M ; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.;. 4.ed. v. 2 São Paulo: Agronômica Ceres, cap. 59, p.517-522, 2005.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. **MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment**. Briefings in Bioinformatics, Oxford, v. 5, p. 150163, 2004.

KURAMAE, E. E; SOUZA, N. L. **Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA**. Acta Scientiarum, v. 24, n. 5, p. 1481- 1485. 2002.

LANE, D.L.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L.; PACE, N.R. **Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses**. Proceedings of National Academy of Science, v.82, p.6955-6959, 1985.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M. **O Enfoque molecular na sistemática de fungos**. Revisão anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 06, p. 197-201, 1998.

LIMA, M.L.A.; ASAI, T; CAPELARI, M. ***Armillaria paulensis*: a new South American species**. Mycological research 112(Pt 9):1122-8, 2008.

LOCHMAN, J.; SERV, O.; MIKES, V. **The rapid identification of european *Armillaria* species from soil samples by nested PCR**. Microbiol Lett. 1;237, p.105-10, 2004.

LUZ, W.C. **Micologia avançada: taxonomia de basidiomicetos**. Passo Fundo: Editora Revisão Anual de Patologia de Plantas. v.1, 400p. 2008.

MARTO, G.B.T.; BARRICHELO, L.E.G.; MULLER, P.H. **Indicações para escolha de espécies de *Pinus***. Revista da Madeira, Curitiba, edição especial, p.16-17, 2006.

MAY, L.C. **Uma armilarirose em *Pinus elliottii* Engel**. Silvicultura em São Paulo, v.1, n.1, p.71-84, 1962.

MIHAIL, J.D.; BRUHN, J.N. **Foraging behaviour of *Armillaria* rhizomorph systems**. Mycol Res. 109(Pt 11):1195-207, 2005.

MILLER, O. K., JOHNSON, J. L., BURDSAL L. H. H, FLYNN, T. **Species delimitation in North American species of *Armillaria* as measured by DNA reassociation.** *Mycol Res* 98:1005– 1011, 1994.

MINDELL, D. P., HONEYCUTT, R. L. **Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic implications.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v.21, p.541-566, 1990.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. **A polymerase catalyzed chain reaction.** In: WU, R(Eds). *Recombinant DNA – Part F.* San Diego: Academic Press, p. 335-350, 1987.

NOBLES, M.K. **Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes.** *Canadian Journal of Botany*, 43, 1097–113, 1964.

OTA ,Y; INTINI, M.; HATTORI, T. **Genetic characterization of heterothallic and non-heterothallic *Armillaria mellea sensu strict*.** *Mycological Research: Cambridge University.* p 1046-1054, 2000.

PACE, N. R., OLSEN, G. J., WOESE, C. R. **Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent.** *Cell*, v.45, p.325-326, 1986.

PEARCE, M. H.; MALAJCZUK, N. **Factors affecting growth of *Armillaria luteobubalina* rhizomorphs in soil.** *Mycological Research, Cambridge*, n. 94 (1) p. 38-48, 1990.

PEGLER, D. N. **The agarics of São Paulo.** Kew: Royal Botanical Gardens, 68p, 1997.

PEGLER, D. N. **Taxonomy, nomenclature and description of *Armillaria*.** In: FOX,R. T. V, (Ed.) *Armillaria Root Rot: Biology and Control of Honey Fungus*, p. 81-93, Andover, 2000.

PÉREZ-SIERRA, A., WHITEHEAD, D.S., WHITEHEAD, M.P. **Investigation of a PCR-based method for the routine identification of British *Armillaria* species.** *Mycol. Res.* 103(12) :1631-1636, 1999.

PÉREZ-SIERRA, A.; WHITEHEAD, D.; WHITEHEAD, M. **Molecular methods used for the detection and identification of *Armillaria*.** In: Fox RTV, ed. *Armillaria root rot: biology and control of honey fungus.* Andover, England: Intercept Limited. p 95–110, 2000.

PILDAIN, M.B.; COETZEE, M.P.A.; RAJCHENBERG, M.; PETERSEN, R.H.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. **Molecular phylogeny of *Armillaria* from the Patagonian Andes**. Mycol Progress. German Mycological Society and Springer-Verlag, 2009.

POLANCO C., GONZALEZ, A. I., DE LA FUENTE, A., Dover, G. A. **Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions. A possible mechanism to resolve this paradox**. Genetics, v.149, p.243-256, 1998.

PRODORUTTI, D.; VANBLAERE, T.; GOBBIN, D.; PELLEGRINI, C.; GESSLER, C.; PERTOT, I. **Genetic Diversity of *Armillaria* spp. Infecting Highbush Blueberry in Northern Italy (Trentino Region)**. Phytopathology, vol 99, n 6. pp.651-658, 2009.

RAABE, R. D. **Host list of the root rot fungus, *Armillaria mellea***. Hilgardia, Berkeley, v. 33, n. 2, p.25-88, 1962.

RICK, J. **Pilze aus Rio Grande do Sul (Brasilien)**. Broteria 5: 5–53, 1906.

RICK, J. **Contributio ad monographiam Agaricearum et *Polyporacearum brasiliensium***. Broteria 6: 65–92, 1907.

Rick, J. **Contributio ad monographiam Agaricearum brasiliensium**. Broteria 18: 47–63, 1920

RICK, J. **Agarici riograndensis**. Lilloa 1: 307–346, 1937.

RICK, J. **Basidiomycetes eubasidii in Rio Grande do Sul – Brasilia**. 5 agaricaceae. Iheringia série Botânica 8: 296–450, 1961.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York, Exeter Publishing, 1988.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. Sci., Washigton, v.239, p.487-491, 1988.

SICOLI, G.; FATEHI, J.; STENLID, J. **Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of European *Armillaria* species.**

Correspondence to Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università degli Studi di Bari, Vol.150, Italy, 2003.

SILVA, F. B.; FERREIRA, M. M.; AUER, C. G. **Preservação de Isolados de *Armillaria* sp. pelo método de Castellani.** In: IV EVINCI da Embrapa Florestas, 2005.

SINGER, R. **Type studies on basidiomycetes.** IV. Lilloa 23: 147–246, 1950.

SINGER, R. **Type studies on Basidiomycetes.** VI. Lilloa, v. 26, p.65-67, 1953.

SINGER, R. **The *Armillariella mellea* group.** Lloydia 19: 176–187, 1956.

SINGER, R. **Mycoflora australis.** Beihefte zur Nova Hedwigia 29: 1–405, 1969.

SINGER, R. **Omphalinae (Clitocybeae–Tricholomataceae basidiomycetes).** Flora Neotropica 3: 1–84, 1970.

SINGER, R; DIGILO, A.P.L. **Pródromo de la Flora Agaricina Argentina.** Lilloa 25: 5–461, 1952.

SHIMIZU, J.Y. ***Pinus* na silvicultura brasileira.** Revista da Madeira, Curitiba, edição especial, p.4-14, 2006.

SMITH, M.L.; ANDERSON, J.B. **Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNAs of *Armillaria*: identification of North American biological species.** Mycol Res 93:247–256, 1989.

SNEATH, P H.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy.** W.H. Freeman and Company, San Francisco, 573p, 1973.

SPEGAZZINI, C. **Fungi puiggariani. Pugillus I.** Boletim da Academia Nacional de Ciencias. Cordoba, n.11, p.381-622, 1889.

TERASHIMA, K.; CHA, J.Y.; YAJIMA, T.; IGARASHI, T.; MIURA, K. **Phylogenetic analysis of Japanese *Armillaria* based on the intergenic spacer (IGS) sequences of their ribosomal DNA.** Eur J For Pathol 28:11–19, 1998.

TERMORSHUIZEN, A.; ARNOLDS, E. **On the nomenclature of the European species of the *Armillaria mellea* group.** Mycotaxon 30: 101–116, 1987.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nuc. Ac. Res.* 22, 4673-4680, 1994.

TRINDADE, D.R. 1997. **Doenças do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.).** In: Manual de Fitopatologia. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M ; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.;. 4.ed. v. 2 São Paulo: Agronômica Ceres, p. 338–344, 1997.

VAN DE ENDE, A.H.G; HOOG, G.S. **Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*.** Studies in Mycology 43:151–162, 1999.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose.** Piracicaba, ESALQ –USP. (Tese de Doutorado) 181p, 2000.

VOLK, T.J.; BURDSALL, H.H.; BANIK, M.T. ***Armillaria nabsnona*, a new species from western North America.** Mycologia. 88(3), pp. 484-491, 1996.

WARGO, P. M. **Consequences of enviromental stress on oak: predisposition to pathogens.** Annual Science Forestry, n. 53, p. 359-368, 1996.

WATLING, R.; KILE, G. A.; BURDSALL JR, H. H. **Nomenclature , Taxonomy, and identification.** In: SHAW, C. G.; III; KILE, G. A. (Ed.). *Armillaria* Root Disease. Agriculture Handbook, n. 691, Forest Service-USDA, Washington, D. C., p. 1-9, 1991.

WELSH; J.; McCLELLAND, M. **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.** Nucleic Acids Research, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In: *PCR*

Protocols: A guide to methods and applications. (MA Innis, DA Gelfand JJ, Sninsky. TJ White eds) Academic Press, San Diego, U.S.A, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. **DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Research, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

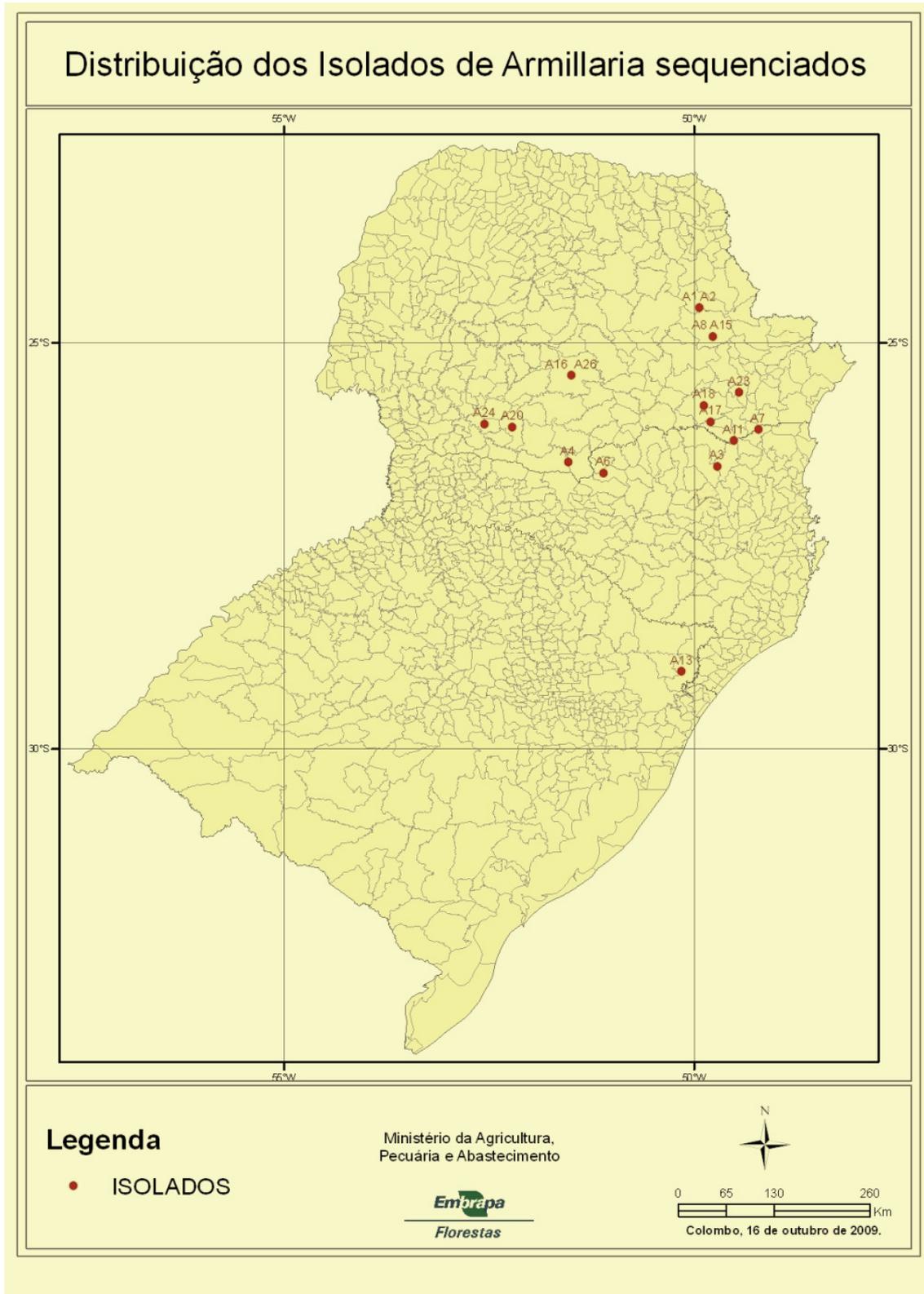
WRIGHT, J. E; DESCHAMPS, J. R. **Basidiomicetos xilófilos de los Bosques andinopatagónicos** Rev. Inv. Agrop. INTA, Serie 5, Pat. Veg. 9 (3): 111-196, 1972.

YAFETTO, L.; DAVIS, D.J.; MONEY, N.P. **Biomechanics of invasive growth by *Armillaria* rhizomorphs.** Fungal Genet Biol, 46(9):688-94, 2009.

YAP, I.V., ; NELSON, R.J. **Winboot: A program for performing bootstrap analysis os binary data to determine the confidense limits of UPGMA- based dendograms.** IRRRI discussion paper n. 14, 22p.1996.

ZHENG, P; MENG, X; YU, Z; WU, Y; BAO, Y; YU, C; LI, Y. **Genetic and Phytochemical Analysis of *Armillaria mellea* by RAPD, ISSR, and HPLC.** Analytical Letters, Volume 42, Number 10, pp. 1479-1494, 2009.

ANEXO



Distribuição dos 17 isolados de *Armillaria* cujas seqüências nucleotídicas foram analisadas. FONTE: Laboratório de Monitoramento Ambiental da Embrapa Florestas (2009).