

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCINE BONTORIN SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE
ISOLADOS DE *Armillaria* sp. DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

CURITIBA
2014

FRANCINE BONTORIN SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE
ISOLADOS DE *Armillaria* sp. DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor no programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal no Setor de Ciências Agrárias, do Centro de Ciências Florestais e da Madeira, Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Co-orientador:

Prof. Dr. Alvaro Figueredo dos Santos

CURITIBA
2014

Ficha catalográfica elaborada por Denis Uezu – CRB 1720/PR
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Silva, Francine Bontorin

Caracterização morfológica, fisiológica e patogênica de isolados de *Armillaria* sp. da região sul do Brasil/ Francine Bontorin Silva. – 2014
66 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientador: Prof. Dr. Alvaro Figueredo dos Santos

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 29/08/2014.

Área de concentração: Silvicultura

1. Fungos fitopatogênicos. 2. Fitopatologia – Brasil, Sul. 3. Pinheiro – Doenças e pragas. 4. Teses. I. Auer, Celso Garcia. II. Santos, Alvaro Figueredo dos. III. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.44



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias - Centro de Ciências Florestais e da Madeira
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

PARECER

Defesa nº. 1058

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, após arguir o(a) doutorando(a) *Francine Bontorin Silva* em relação ao seu trabalho de tese intitulado "**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E PATOGÊNICA DE ISOLADOS DE *Armillaria sp.* DA REGIÃO SUL DO BRASIL**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de *Doutor* em Engenharia Florestal, área de concentração em SILVICULTURA.

Dr. Ida Chapaval Pimentel
Universidade Federal do Paraná
Primeiro examinador

Dr. Lucimeris Ruaro
Universidade Federal do Paraná
Segundo examinador

Dr. Luciene Martins Moreira
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Terceiro examinador

Dr. Alessandro Camargo Angelo
Universidade Federal do Paraná
Quarto examinador

Dr. Celso Garcia Auer
Universidade Federal do Paraná
Orientador e presidente da banca examinadora



Curitiba, 29 de agosto de 2014.

Antonio Carlos Batista
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

Aos meus queridos pais
Angelo e Rosangela,

OFEREÇO

Ao meu amado Vinicius,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr., Celso Garcia Auer, pela orientação, confiança, apoio, paciência, amizade e agradável convivência. Não tenho palavras para expressar meu profundo respeito e gratidão. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Alvaro Figueredo dos Santos, pela co-orientação, disposição, apoio e conselhos valiosos;

Ao Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte, pela grande contribuição.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas: Caroline, Davi, Pedro, José "Peco", Paula, Karen, Flavia, Heloisa, Etienne, Hágata, Ana Lídia, Edson, Cristiane, Lucas, Bruno, Isabelle, Lunara, por toda ajuda e momentos de descontração.

Aos meus pais, Angelo e Rosangela, pela minha formação, apoio, paciência, amor e confiança.

Ao meu irmão Franco, pela disposição e toda ajuda na redação deste trabalho.

Ao meu marido Vinicius, por todo amor, confiança, companheirismo, imenso incentivo, paciência constante e toda contribuição. Obrigada, meu amor! Sem você nada disso seria possível!

A todos os meus amigos e familiares, que tornam minha vida mais feliz.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal, que contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários Reinaldo e David, da Secretaria do Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal pelas orientações e auxílios prestados sempre que necessário.

À Embrapa Florestas pelo apoio neste trabalho.

RESUMO

Espécies do gênero *Armillaria* causam doenças em raízes, em várias partes do mundo, promovendo a mortalidade de plantas em culturas agrícolas e florestais. Na região Sul do Brasil, essa doença tem causado a morte de árvores, especialmente em plantações de pinus. Assim, o presente trabalho visou caracterizar isolados de *Armillaria* sp. da região Sul do Brasil, por meio de características morfológicas, fisiológicas e patogênicas, e induzir a produção de basidiomas a fim de auxiliar a identificação da espécie. Trinta isolados de *Armillaria* sp. provenientes dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul foram utilizados neste estudo. As observações da morfologia do micélio, rizomorfas e placa micelial foram feitas através de microscopias de luz e estereoscópica, em estruturas fúngicas produzidas em meio sólido BDA (extrato de batata-dextrose-ágar), a 20 °C, no escuro, por 30 dias. Para analisar o crescimento *in vitro* e determinar a temperatura ótima de crescimento, seis temperaturas (4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 °C) foram testadas em meio líquido BD (extrato de batata-dextrose). Com o propósito de determinar a patogenicidade dos isolados, oitenta plantas envasadas de *Pinus taeda* foram inoculadas. A produção de basidiomas também foi testada *in vitro*. As análises morfológicas revelaram a presença de estruturas típicas do gênero *Armillaria*, como grampos de conexão, septos e massas resinosa sobre a superfície de hifas. As análises também mostraram grande variação na morfologia do micélio, mesmo dentro de um único isolado. A morfologia das rizomorfas mostrou-se variável de acordo com o ambiente. A temperatura média ótima para o crescimento dos isolados de *Armillaria* foi de 17 °C. No teste de patogenicidade, somente uma planta de pinus foi morta (inoculada com o isolado A2) indicando a dificuldade em se induzir a doença *in vivo*. Um basidioma foi produzido, demonstrando a possibilidade de frutificação *in vitro* de isolados brasileiros de *Armillaria*, tratando-se do primeiro relato no Brasil.

Palavras-chave: armilarirose, basidioma, etiologia, fungo, patógeno, *Pinus*.

ABSTRACT

Armillaria species cause root disease in various parts of the world, promoting the death of plants in agricultural and forest crops. In Southern Region of Brazil, this disease has caused the death of trees, mainly in the pine plantations. Thus, the present study has the objective to characterize isolates of *Armillaria* collected in Southern Brazil, through morphological, physiological and pathogenic aspects, and inducing basidiomes production aiming to identify the species. Thirty isolates of *Armillaria* sp. from the states of Parana, Santa Catarina and Rio Grande do Sul were used in this study. The observations of the morphology of the mycelium, rhizomorphs and mycelium fans were made through light microscopy and stereoscopic microscopy, in fungal structures produced on solid medium PDA (potato extract-dextrose-agar) at 20 °C in the dark, for 30 days. In order to analyze *in vitro* growth and to determine the optimal growth temperature, six different temperatures (4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28 °C) were tested in liquid medium PD (potato extract-dextrose). Concerning to determine the pathogenicity of isolates, eighty potted plants of *Pinus taeda* were inoculated. The production of basidiomes was also tested *in vitro* conditions. Morphological analysis revealed the presence of typical structures of the *Armillaria* genus, as clamp connection, septa and resinous masses on the surface of hyphae. The analysis also showed wide variation in hyphal morphology, even within a single isolate. Rhizomorphs morphology appeared variable depending on the environment. The optimum temperature for *Armillaria* isolates growth was 17 °C. In pathogenicity test, only a pine plant was killed (inoculated with isolate A2) indicating the difficulty to reproduce the disease *in vivo*. One basidiome was produced, demonstrating the possibility of *in vitro* fruiting of Brazilian *Armillaria* isolates, being the first report in Brazil.

Keywords: *Armillaria* root rot, basidiome, etiology, fungus, pathogen, pine

Title: Morphological, Physiological and Pathogenic Characterization of *Armillaria* isolates from the Southern Region of Brazil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ASPECTO DO ISOLADO A-1 DE <i>Armillaria</i> sp. EM MEIO BDA (VERSO E REVERSO), DEMONSTRANDO A APARÊNCIA DO MICÉLIO DAS RIZOMORFAS APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO BDA, A 20 °C.....	31
FIGURA 2	ASPECTO GERAL DOS 30 ISOLADOS DE <i>Armillaria</i> sp. UTILIZADOS NESTE ESTUDO.....	32
FIGURA 3	EXEMPLO DE ISOLADOS QUE APRESENTARAM COLORAÇÃO CINZA E BRANCA, COM MICÉLIO AÉREO ABUNDANTE, EM PARTES RUGOSO E SEMPRE COM PRESENÇA DE RIZOMORFAS.....	35
FIGURA 4	EXEMPLO DE ISOLADOS QUE APRESENTARAM MICÉLIO E RIZOMORFAS MENOS ABUNDANTES, COM A PRESENÇA DE MICÉLIO AÉREO DE COLORAÇÃO CLARA, VARIANDO ENTRE BRANCO, MARROM E CINZA.....	36
FIGURA 5	EXEMPLO DE ISOLADOS QUE APRESENTARAM UM PREDOMÍNIO DE RIZOMORFAS.....	36
FIGURA 6	EXEMPLO DE ISOLADOS QUE APRESENTAM FORMAÇÕES CROSTOSAS NO MICÉLIO.....	37
FIGURA 7	CULTURAS DO ISOLADO A-2, REPICADOS NO MESMO DIA, PROVENIENTES DA MESMA CULTURA, DEMONSTRANDO VARIAÇÕES NO MICÉLIO.....	38
FIGURA 8	DESENVOLVIMENTO DE ISOLADO DE <i>Armillaria</i> EM MEIO DE CULTURA COM EXTRATO DE MALTE E ÁCIDO TÂNICO.....	40
FIGURA 9	A: PRESENÇA DE UM MICÉLIO COMPACTADO, COM COLORAÇÃO AMARELADA; B: MICÉLIO DIFERENCIADO, FORMANDO ÁREA RUGOSA AO REDOR DO MICÉLIO AÉREO; C: FORMAÇÕES CROSTOSAS NO MICÉLIO, COM EXSUDATOS. D: EXSUDATO FORMADO EM MICÉLIO DE <i>Armillaria</i> sp.....	41
FIGURA 10	A: MASSAS RESINOSAS SOBRE A PAREDE DE ALGUMAS HIFAS. B: PRESENÇA DE SEPTOS EM MICÉLIO DE <i>Armillaria</i> sp. (SETAS PRETAS); INÍCIO DA FORMAÇÃO DE GRAMPO DE CONEXÃO (SETA BRANCA).....	43
FIGURA 11	A,B,C, D: PRESENÇA DE CELULAS CUTICULARES EM ÁREAS PSEUDOPARENQUIMATOSAS. E , F: PRESENÇA DE ESTRUTURAS SIMILARES A CLAMIDÓSPOROS EM HIFAS DE <i>Armillaria</i> sp. (SETAS).	44
FIGURA 12	ASPECTO DE RIZOMORFAS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO (BDA), SOB MICROSCÓPIO ESTEREOSCÓPIO, DEMONSTRANDO PILOSIDADES FORMADAS EM RIZOMORFAS AÉREAS (SETA PRETA) E PIGMENTAÇÃO DIFERENCIADA ENTRE RIZOMORFAS AÉREAS E SUBTERRÂNEAS (SETA BRANCA).....	45

FIGURA 13	A: HIFAS INFLADAS EM RIZOMORFA SUBTERRÂNEA; B HIFAS INFLADAS EM RIZOMORFA AÉREA (SETAS)....	47
FIGURA 14	FORMAÇÃO DE PLACA MICELIAL EM TRONCO DE PINUS COLONIZADO POR <i>Armillaria</i>	48
FIGURA 15	ASPECTO GERAL DE UM FRAGMENTO DE PLACA MICELIAL OBSERVADO EM MICROSCÓPIO DE LUZ (100X).....	49
FIGURA 16	HIFAS VERRUGOSAS PRESENTES NA SUPERFÍCIE DA PLACA MICELIAL.....	49
FIGURA 17	A: PLANTA DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADA E MORTA PELA ARMILARIOSE. B: RAIZ DE PLANTA INOCULADA E MORTA COM SINTOMAS DA PODRIDÃO POR ARMILARIOSE. C: PRESENÇA DE RIZOMORFA E PLACA MICELIAL NA BASE DA PLANTA MORTA POR <i>Armillaria sp.</i>	53
FIGURA 18	FORMAÇÃO DE BASIDIOMA DE <i>Armillaria</i> EM FRASCO COM MEIO BDA E TRONCO DE PÍNUS.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ORIGEM E TIPO DE HOSPEDEIRO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE <i>Armillaria</i> sp. DA COLEÇÃO DA EMBRAPA FLORESTAS, UTILIZADOS NESTE ESTUDO.....	26
TABELA 2	CARACTERÍSTICAS DA CULTURA DOS ISOLADOS EM MEIO BDA.....	33

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	CURVAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA MÉDIA (g) EM MEIO LÍQUIDO EXTRATO DE BATATA- DEXTROSE, SOB VÁRIAS TEMPERATURAS, COM SEIS ISOLADOS DE <i>Armillaria</i> sp.....	51
-----------	--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 O GÊNERO <i>Armillaria</i>	16
3.1.1 Ciclo de vida.....	16
3.1.2 Identificação.....	17
3.1.3. Características da cultura.....	19
3.1.3.1 Características do micélio.....	20
3.1.4 Rizomorfos.....	21
3.2 HOSPEDEIROS E SINTOMAS DA ARMILARIOSE.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 ISOLADOS UTILIZADOS.....	25
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	27
4.2.1 Caracterização do micélio de <i>Armillaria</i> sp.....	27
4.2.2 Caracterização das rizomorfos <i>in vitro</i>	27
4.2.3 Caracterização da placa micelial.....	27
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE CRESCIMENTO..	28
4.4 DETERMINAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Armillaria</i> sp.....	29
4.5 PRODUÇÃO DE BASIDIOMAS <i>in vitro</i>	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	31
5.1.1 Caracterização do micélio de <i>Armillaria</i> sp.	31
5.1.2 Análise da hifa de <i>Armillaria</i> sp. sob microscopia de luz.....	42
5.1.3 Caracterização das rizomorfos.....	45
5.1.4 Caracterização da placa micelial.....	48
5.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA	50
5.2.1 Determinação da temperatura ótima de crescimento.....	50
5.3 DETERMINAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Armillaria</i> sp.....	52
5.4 PRODUÇÃO DE BASIDIOMAS <i>in vitro</i>	54
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

As atividades de reflorestamento com espécies do gênero *Pinus* foram intensificadas a partir da segunda metade da década de 1960, após a promulgação da lei dos incentivos fiscais. Extensas áreas foram ocupadas, predominantemente, com *Pinus taeda* Linnaeus e *Pinus elliottii* Engelm var. *elliottii*, constituindo, hoje, base de importantes atividades industriais, como a produção de celulose e papel, embalagens, aglomerados, mobiliário, compensados, chapas, dentre outras. Estima-se em aproximadamente 1,8 milhões de hectares, a área ocupada por espécies de *Pinus* no Brasil (ABRAF, 2013).

A representatividade da madeira de pínus no mercado nacional e internacional pode ser notada em vários segmentos florestais. Em 2007, o comércio mundial de produtos de origem florestal movimentou aproximadamente US\$ 300 bilhões em exportações e cerca de 40 % foram de produtos feitos de pínus (RECH, 2004; SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2008). Segundo Rech (2004), os estados do Paraná e Santa Catarina apresentam os maiores maciços florestais de *Pinus* e também são os maiores consumidores, utilizando 80 % do total produzido.

No Brasil, a armilariose é a principal doença em plantios de pínus e foi primeiramente constatada na década de 1960 em *P. elliottii* var. *elliottii*, *P. taeda* e *Pinus patula* (MAY, 1962) e nas décadas posteriores, em *P. elliottii* e *P. taeda* (CZAJA NETO e FONTOURA, 1970; STAMMER e TOMAZ, 1991).

A podridão de raízes por *Armillaria* sp. ou armilariose é conhecida em várias partes do mundo, afetando um grande número de plantas lenhosas (SHAW e KILE, 1991). No Brasil, pode ser constatada em culturas agrícolas como fruteiras de clima temperado e coníferas dos gêneros *Pinus* e *Araucaria*, nos estados da região Sul e Sudeste (KRUGNER e AUER, 2005; SILVA et al., 2007). É doença importante especialmente para plantios de *Pinus* localizados em áreas onde havia mata natural ou reflorestamentos com espécies florestais hospedeiras do patógeno, em regiões temperadas úmidas (FERREIRA, 1989).

A doença inicia-se aos seis meses de idade e manifesta-se mais frequentemente em plantações com idade entre um a cinco anos de idade (AUER et

al., 2003). Começa com o amarelecimento geral da copa seguido pelo seu bronzeamento, seca e morte da parte aérea. Nas raízes e na região do colo da árvore, observa-se a podridão de raízes e a presença de placas miceliais na entrecasca (KRUGNER e AUER, 2005). No Brasil, Auer et al. (2004) discutindo sobre a incidência da doença em áreas florestais dentro da região Sul e comentaram que o número total de árvores mortas em plantios jovens (entre 1 e 7 anos de idade) pode chegar a 8,5 %. Alguns plantios com mais de 20 anos, apresentaram uma média de 20 % de árvores doentes.

Considerando-se a importância econômica que o *Pinus* tem para a produção florestal madeireira da região Sul do Brasil, os estudos básicos da biologia do fungo *Armillaria* sp. podem auxiliar na identificação da espécie presente no Brasil. O presente estudo foi desenvolvido para complementar informações acerca de características básicas, envolvendo a morfologia, fisiologia e patologia de isolados de *Armillaria* sp., com o propósito de subsidiar estudos sobre a epidemiologia e controle da armilariose no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar os isolados de *Armillaria* sp. obtidos na região Sul do Brasil com base em aspectos morfológicos, fisiológicos e patogênicos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a morfologia de hifas, rizomorfos e placa micelial de isolados de *Armillaria* sp.;
- b) Determinar a temperatura ótima de crescimento de isolados *Armillaria* sp., *in vitro*;
- c) Determinar a patogenicidade de isolados frente à mudas de *Pinus*;
- d) Produzir basidiomas *in vitro* para a identificação da espécie de *Armillaria*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O gênero *Armillaria*

O gênero *Armillaria* (Fr.) Staude, pertencente à ordem Agaricales, classe Basidiomycetes e família Tricholomataceae (LUZ, 2008), foi descrito pela primeira vez pelo micologista dinamarquês Martin Vahl em 1787 e caracterizado por Fredrich Staude em 1857. *A. mellea* (Vahl.: Fr.) Kummer, foi a primeira espécie caracterizada, em 1871 por Paul Kummer (Watling et al., 1982). Atualmente, o gênero *Armillaria* conta com mais de 50 espécies identificadas (COETZEE et al., 2012), em todos os continentes.

3.1.1 Ciclo de vida

O estagio vegetativo do fungo *Armillaria* é diplóide, não dicariótico, o que é incomum entre os basidiomicetos (KORHONEN e HINTIKKA, 1974). O basidioma dá origem aos basidiósporos, que por sua vez germinam e dão origem a um micélio primário haplóide. Quando duas hifas haplóides se combinam, dão origem a um micélio dicariótico, que se torna diplóide (ANDERSON e ULLRICH, 1982). Segundo Lamoure (1985), as células dicarióticas são instáveis, e morrem em poucos dias se não se tornarem diplóides. Os micélios haplóides e diplóides podem ser diferenciados por características morfológicas (HINTIKKA, 1973).

O micélio diplóide se desenvolve e origina rizomorfos. As rizomorfos são compostas por milhares de hifas coordenadas, cercadas por uma bainha protetora contendo melanina, com aparência semelhante à das raízes das plantas (SCHWEIGER et al., 2002;. MIHAIL e BRUHN, 2005; MOTTA, 1969;. YAFETTO et al., 2009). As rizomorfos se expandem pelo solo em busca de nutrientes e, quando em contato com raízes suscetíveis, penetram e colonizam, causando a podridão da raiz da planta hospedeira (FOX, 2000).

Uma vez colonizada a planta, um micélio diferenciado é formado: a placa micelial. A placa micelial é uma estrutura esbranquiçada, formada por um emaranhado de hifas, que se desenvolve ao longo da entrecasca do tronco e em raízes doentes, infectando o floema e câmbio, separando o lenho da casca e matando o hospedeiro (FOX, 2000). Novas rizomorfias podem ser produzidas a partir da placa micelial e infectar novos hospedeiros.

Depois da colonização do hospedeiro, o fungo pode produzir os basidiomas geralmente ao redor e sobre os tocos podres ou de árvores já mortas, e são de difícil visualização (FERREIRA, 1989).

3.1.2 Identificação

Algumas características morfológicas, culturais e fisiológicas 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, 1991).

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

Algumas características salientes do basidioma 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 basidioma, como a estrutura e ornamentação do píleo, características do anel, ornamentação do estipe, presença ou ausência de grampos subhimeniais ou os basidiósporos, localização de pigmentos na parede celular ou em vacúolos, e tamanho e ornamentação dos esporos estão entre as características importantes para a diferenciação das espécies (WATLING, 1991).

Pesquisas sobre a armilariose em plantios de pinus revelam que as frutificações do patógeno são efêmeras e, quando encontradas não estão em condições ideais para a sua identificação. A falta de basidiomas para a clássica identificação com base na morfologia dificulta a taxonomia das espécies de *Armillaria* pelo mundo (GOMES et al., 2004).

Além do modo clássico para a identificação de espécies de *Armillaria*, com base na morfologia dos basidiomas, outras possibilidades podem ser baseadas em 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 basidiomas 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. Esta coleção ainda não existe no Brasil, em função da dificuldade em produzir basidiomas *in vitro* e, desse modo, este tipo de estudo não tem sido feito.

A outra metodologia possível de ser utilizada na identificação de *Armillaria* é baseada no uso de métodos moleculares. No Brasil, Silva (2009) analisou por meio de sequenciamento de região ITS, 17 isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil. Os isolados demonstraram variabilidade genética entre si, porém formaram um único grupo filogenético, sugerindo que se trata de uma única espécie. Esse autor sugeriu que os isolados de *Armillaria* do Sul do Brasil, parecem pertencer a uma nova espécie ainda não descrita. Contudo, os isolados demonstraram-se similares a um isolado encontrado na Patagônia, Argentina, identificado como *Armillaria montagnei* (PILDAIN et al., 2009).

Lima et al. (2008) descreveram no Brasil uma nova espécie de *Armillaria*, morfologicamente distinta das outras espécies conhecidas, denominada *Armillaria paulensis*. O estudo foi baseado na morfologia e sequenciamento de região ITS de um único basidioma encontrado no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, localizado no sul da cidade de São Paulo, SP. O espécime foi comparado morfologicamente com outros basidiomas, e sua morfologia distinta sugeriu uma nova espécie. A sequência ITS publicada no estudo de Lima et al. (2008), não demonstrou similaridade com as sequências adquiridas para o estudo de Silva (2009) e nem com as sequências encontradas por Pildain et al. (2009).

3.1.3. Características da cultura

O fungo *Armillaria* pode ser isolado 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 escalpelo flambado e transferidos para meio de cultura ao qual pode ser adicionado alguns antibióticos (GOMES, 2005).

Em geral, as colônias crescem melhor em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar), e em meios que contenham extrato de malte ou extrato de levedura, e que, a taxa de crescimento e o aspecto das colônias podem variar de acordo com a espécie, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento das rizomorfas (RAABE, 1962; GARRAWAY e WEINHOLD, 1970; SHAW, 1985; CHA et al., 1997).

O gênero *Armillaria* é conhecido por apresentar grande variabilidade em cultura (GIBSON, 1961; RAABE, 1966), embora o aspecto das colônias e a habilidade de frutificação *in vitro*, são característicos para algumas espécies (GUILLAUMIN et al., 1989; MWANGI et al., 1989; SUNG et al., 1990).

Cha et al. (1997), além dos meios de cultura conhecidos, elaboraram outros meios com serragem e extratos de plantas hospedeiras e testaram em diferentes espécies de *Armillaria*. Para *A. mellea* foi observado um melhor crescimento em meio de cultura a base de serragem e extrato de coníferas hospedeiras, enquanto que *A. gallica* cresceu no mesmo meio, porém, somente com a adição de extrato de malte, demonstrando as diferentes necessidades nutricionais entre espécies. O estudo também demonstrou que o aspecto do micélio variou de acordo com o meio de cultura.

Cheng et al. (2006) estudaram diferentes composições nutricionais para o crescimento de isolados chineses de *Armillaria mellea*, e observaram grandes alterações na biomassa e na morfologia das culturas frente aos diferentes nutrientes testados.

3.1.3.1 Características do micélio

Quando se trata das características do micélio, a literatura é sucinta. Watling (1991) descreve o crescimento do micélio de *Armillaria* como irregular, lento, de superfície normalmente crostosa, com coloração variando entre branca, marrom e tons avermelhados, com ou sem presença de rizomorfos.

A irregularidade do crescimento micelial de *Armillaria* foi também relatada por Nobles (1965). A ausência de informações sobre a morfologia do micélio de *Armillaria* na literatura pode estar diretamente relacionada com a dificuldade de isolamento deste fungo para estudos. Trabalhos relacionados com a morfologia e outras características de *Armillaria* trazem informações relacionadas a um número reduzido de isolados ou somente de um isolado (COETZEE et al, 2000).

Bruhn et al. (1998), avaliaram as características do crescimento micelial de algumas espécies de *Armillaria*, e demonstraram que entre espécies, o padrão de crescimento é diferente, variando em relação a formação e aspecto de hifas, a produção de rizomorfos, a coloração e a densidade do micélio e à pigmentação escura observada no meio de cultura. Porém, dentro da mesma espécie as variações foram pequenas.

Em um estudo desenvolvido por Otieno et al. (2003) um grupo de isolados de *Armillaria* provenientes do Kenya foram caracterizados por aspectos morfológicos e moleculares. Primeiramente, de acordo com aspectos morfológicos, como coloração e presença de micélio aéreo, os isolados foram classificados em dois grupos diferentes. As diferenciações morfológicas basearam-se no aspecto dos micélios e nas características das rizomorfos. Posteriormente, os estudos moleculares indicaram que os dois grupos tratavam de duas espécies distintas. Outros estudos também revelaram que isolados classificados como diferentes morfotipos, tratavam-se de espécies diferentes (RISHBETH, 1986; BERUBÉ, 1989; CHA, 1997; BRUHN, 1998)

Os micélios haplóides e diplóides podem ser diferenciados por características morfológicas (HINTIKKA, 1973). Micélios haplóides apresentam aspecto mais cottonoso de pigmentação mais suave, variando entre branca, bege e marrom-clara e sem a presença de rizomorfos. Rizomorfos são formadas a partir de micélio diplóide (HINTIKKA, 1973, BAUMGARTNER et al., 2011).

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a diferenciação em morfotipos de isolados pertencentes à mesma espécie.

3.1.4 Rizomorfas

As rizomorfas são estruturas semelhantes às raízes, produzidas pelo crescimento coordenado de milhares de hifas (YAFETTO, 2009). Estas estruturas são responsáveis pela invasão nas raízes, sua colonização e o desenvolvimento da armilariose.

Diferentes funções já foram propostas para as rizomorfas. A função mais óbvia é o de propagação da infecção ao longo de grandes distâncias, podendo se estender por metros de local do inóculo (GARRETT, 1970). Alguns trabalhos também indicam a importância das rizomorfas na absorção e translocação de água e nutrientes (GRANLUND et al., 1985; EAMUS et al., 1985; CAIRNEY, 1992). Estudos realizados com rizomorfas de *A. mellea* revelaram que as hifas possuem grande diâmetro na região medular e com menor conteúdo citoplasmático, funcionando assim como recipientes para armazenamento de água e nutrientes. (EAMUS et al., 1985; JENNINGS, 1987; CAIRNEY et al., 1988). Outra atribuição da rizomorfa refere-se ao armazenamento e transporte de oxigênio. Isso permite que o fungo penetre e sobreviva em ambientes anóxicos (MONEY, 2004).

Geralmente, *Armillaria* vive como saprófita, colonizando tocos de árvores mortas, mas se torna um patógeno quando as rizomorfas penetram nas raízes de plantas suscetíveis (PATTON e RIKER, 1959; WATLING et al., 1991). As rizomorfas se aderem firmemente às raízes, e através da liberação de enzimas, juntamente com sua ação mecânica, penetram, colonizam e dão origem à placa micelial, que se desenvolve ao longo da entre-casca, atingindo o xilema e interferindo no fluxo da seiva no câmbio (WAHLSTRÖM e JOHANSEN, 1992; WOODWARD, 1992; SCHMIDT, 2006). Pequenos fragmentos (5 cm x 1,2 a 1,5 cm de diâmetro) de material infectado por *Armillaria mellea* podem sobreviver enterrados no solo, por pelo menos três anos (PEREZ-SIERRA e GORTON, 2005).

A morfologia da rizomorfa pode variar de acordo com o ambiente. A morfologia e a fisiologia das rizomorfas, bem como seu comportamento de dispersão e invasão, podem auxiliar na diferenciação de espécies (MORRISON, 1982; STANOSZ, 1987; MALLETT 1989; MIHAIL e BRUHN, 2005; YAFETTO, 2009).

Rizomorfas subterrâneas são de pigmentação mais escura, apresentando maior quantidade de melanina do que as rizomorfas aéreas. Essa deposição de melanina na superfície na rizomorfa funciona como uma bainha protetora, e confere ao fungo maior resistência contra dessecação, contra micro-organismos

antagonistas e contra diversos estresses ambientais. Esta deposição de melanina também torna as rizomorfias subterrâneas mais espessas do que as aéreas (TOWNSEND, 1954; BLOOMFIELD e ALEXANDER, 1967; KUO e ALEXANDER, 1967; BUTLER et al., 2001). Por outro lado, rizomorfias aéreas tendem a desenvolver pilosidades sobre a superfície. Parrek (2006) relaciona estas estruturas com a presença e concentração de oxigênio no meio, visto que estas pilosidades não são observadas em rizomorfias subterrâneas.

Rizomorfias podem apresentar ramificações dicotômicas ou monopodiais. Estudos sugerem que rizomorfias que apresentam ramificações dicotômicas são geralmente mais agressivas (MORRISON, 2004).

3.2 Hospedeiros e sintomas da armilariose

Segundo Fox (2000), muitas espécies de *Armillaria* são parasitas facultativos, mas outras são saprófitas obrigatórios ou simbiontes. Embora as rizomorfias permitam a infecção planta-planta por meio mecânico-enzimático, também as raízes saudáveis 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 machucadas podem tornar-se bioquimicamente predispostas a ficarem doentes.

Pearce e Malaczuk (1990) citam *Armillaria* spp. como causadora 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 rizomorfias 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 são formadas na região da entrecasca e 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 rizomorfos na região da entrecasca, no lugar de placas miceliais, quando a árvore está morta (KRUGNER e AUER, 2005).

Coetzee et al. (2000) relataram que a podridão de raízes causada por *Armillaria* foi considerada economicamente importante em espécies de *Pinus* e *Eucalyptus* nos povoamentos da África do Sul desde o início do século XX. Espécies de *Armillaria* têm sido bem estudadas na América do Norte e Europa, mas têm recebido pouca atenção na África do Sul. A maioria dos registros de armilariose na África do Sul sugere que *Armillaria mellea* é o principal agente causal.

Segundo Ferreira (1989), há um consenso entre vários pesquisadores em considerá-la como doença importante, na primeira rotação da cultura, especialmente para plantações de pinus estabelecidas em áreas onde havia mata natural ou reflorestamento com espécie florestal suscetível de reconhecida capacidade multiplicadora de inóculo do patógeno, principalmente em regiões úmidas, com temperatura moderada.

Além disto, um fator determinante que contribui para a infecção e severidade do ataque pode ser a predisposição das árvores, pois árvores debilitadas por fatores ambientais, como seca, mau desenvolvimento do sistema radicular condicionado pelo recipiente da muda, ataque de insetos como a vespa da madeira, entre outros, podem torná-las mais suscetíveis ao fungo (KRUGNER e AUER, 2005). Os autores ressaltam que a mortalidade tende a diminuir à medida que as plantas envelhecem, quando a fonte original do inóculo é exaurida e as árvores tornam-se mais resistentes.

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 gama 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. elliotii*, *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. elliotii* 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. elliotii* 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).

No Brasil, a armilariose também foi constatada em *Araucaria* e *Eucalyptus*, nos estados da região Sul e Sudeste (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 de pêssigo (BLEICHER, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados utilizados

Para este estudo foram utilizados 30 isolados de *Armillaria* sp. (TABELA 1), componentes da coleção da Embrapa Florestas, sendo que dos 30, 8 (A23 ao A30) foram coletados e isolados durante este trabalho.

Os estudos laboratoriais foram desenvolvidos no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo-PR. Amostras de troncos de plantas doentes coletadas foram transferidas para o laboratório. A separação da casca do lenho foi realizada com uma faca ou lâmina previamente flambada retirando os fragmentos da madeira doente, placas miceliais ou rizomorfas, os quais eram transferidos para placas de *Petri* contendo meio seletivo para *Armillaria* (extrato comercial de ágar-batata-dextrose, 39 g, solução rosa bengala, 100 mL, benomyl, 10 mL, etanol absoluto, 10 mL, clorafenicol, 250 mg, solução de ácido láctico 25 %, 1 mL, água ultrapurificada 1000 mL; sendo o clorafenicol e o ácido láctico adicionados após a autoclavagem) segundo Gomes e Auer (2004). A incubação foi realizada em câmara de germinação tipo BOD à temperatura de 20 °C, no escuro.

Após a purificação das colônias do patógeno em meio seletivo, estas foram repicadas para placas de *Petri* contendo meio BDA (extrato comercial de ágar-batata-dextrose, 39 g, água ultrapurificada 1000 mL), para a produção e conservação do inóculo. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave, à 120 °C por 20 minutos, e as vidrarias em estufa à 250 °C por 3 horas.

Os fungos isolados foram identificados morfológicamente, principalmente pela presença de rizomorfas, estruturas típicas do gênero (WATLING et al., 1991). Os isolados de *Armillaria* foram armazenados em geladeira a 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 (FIGUEIREDO e PIMENTEL, 1975) e meio de cultura BDA (FERNANDEZ, 1993).

TABELA 1: ORIGEM E TIPO DE HOSPEDEIRO DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *Armillaria* sp. DA COLEÇÃO DA EMBRAPA FLORESTAS, UTILIZADOS NESTE ESTUDO.

ISOLADO	MUNICÍPIO/ESTADO	HOSPEDEIRO - NOME POPULAR
A1	Piraí do Sul – PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A2	Piraí do Sul – PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A3	Rio Negrinho – SC	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A4	General Carneiro – PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A5	Santa Maria do Oeste - PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>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> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A9	Tijucas do Sul - PR	<i>Pinus taeda</i> - Pínus
A10	Castro - PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A11	Rio Negrinho – SC	<i>Pinus taeda</i> - Pínus
A12	São Mateus do Sul – PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A13	Cambará do Sul – RS	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A14	Dona Emma – SC	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A15	Castro – PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A16	Guarapuava – PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A17	Rio Negro – PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>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> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A21	Caxias do Sul - RS	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> - Pínus
A22	Tunas do Paraná – PR	<i>Pinus elliottii</i> var. <i>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
*A27	Almirante Tamandaré - PR	<i>Pinus taeda</i> - Pínus
*A28	São Cristovão - PR	<i>Pinus taeda</i> - Pínus
*A29	Caseiros - RS	<i>Pinus taeda</i> - Pínus
*A30	Ibaiti - PR	<i>Pinus taeda</i> - Pínus

*Isolados coletados e isolados durante este estudo.

FONTE: O autor (2014)

4.2 Caracterização morfológica

4.2.1 Caracterização do micélio de *Armillaria* sp.

Os trinta isolados de *Armillaria* foram cultivados em meio BDA, em temperatura de 20 °C, no escuro, por 30 dias. Posteriormente, foram submetidos às análises morfológicas através de observação direta do micélio, de microscopia estereoscópica e microscopia de luz (400 X). O preparo das lâminas foi realizado através coleta de fragmentos de micélio e para melhor visualização, as lâminas foram coradas com lactofenol ou lactoglicerol com azul-algodão. Características como coloração, superfície do micélio e estruturas presentes nas hifas foram analisadas.

4.2.2 Caracterização das rizomorfos *in vitro*

Rizomorfos foram removidas de culturas previamente cultivadas conforme descrito no item 4.2.1. A morfologia das rizomorfos foi analisada com o auxílio de microscopia de luz (100X e 400X), onde as estruturas foram retiradas do micélio e fragmentadas em partes de aproximadamente 5 mm, não necessitando de nenhuma coloração sobre o material. Para o estudo da morfologia interna das rizomorfos, foram efetuados cortes longitudinais de quatro isolados (A2, A7, A13 e A23), selecionados de acordo com a variabilidade genética demonstrada no sequenciamento dos genes ITS e fator de alongação - EF-1 alpha (SILVA, 2009), que foram submetidos à análise de microscopia ótica e estereoscópica.

4.2.3 Caracterização da placa micelial

Pedaços de tronco de *Pinus taeda* de aproximadamente 10 cm, com casca e autoclavados foram inseridos em frascos de vidro contendo 100 mL de meio BDA e

inoculados com três discos de micélio-ágar de cinco mm do isolado A1, escolhido aleatoriamente. Os frascos foram incubados em câmara BOD à temperatura de 20 °C, no escuro, por 120 dias, para a colonização dos troncos pelos isolados. Após a colonização, a separação da casca do lenho foi realizada com uma lâmina previamente flambada, e fragmentos de placa micelial foram removidos. Os fragmentos foram analisados sob microscopia estereoscópica e microscopia ótica (100X e 400 X), não necessitando de nenhuma coloração sobre o material.

4.3 Caracterização da temperatura ótima de crescimento

Uma alíquota de 50 mL de meio de cultura BD (extrato comercial de batata e dextrose, 39 g, água ultrapurificada 1000 mL) foi colocada em frascos de vidro com tampa plástica com capacidade de 500 mL, os quais foram esterilizados em autoclave por 1 h, a 120 °C e 1 atm. A inserção dos isolados nos frascos foi realizada transferindo-se três discos de micélio-ágar, de cinco mm de diâmetro, previamente cultivados em meio BDA, por 30 dias, em temperatura de 20 °C no escuro. Seis isolados foram utilizados para este estudo (A1, A2, A3, A4, A6 e A13), os quais foram selecionados aleatoriamente. Foram utilizadas cinco repetições para cada isolado e cada temperatura, totalizando 70 frascos para cada isolado. Os frascos foram incubados em estufas BOD, no escuro, às temperaturas de 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 °C, sem agitação. Após 35 dias de incubação, a produção de biomassa foi avaliada filtrando-se o caldo contendo rizomorfos e micélio em papel filtro Whatman n.1, secando-se o filtrado em estufa à temperatura de 40 °C, por 72 horas. Os isolados foram pesados e o peso do papel filtro foi descontado, estimando-se assim a biomassa produzida em cada temperatura. A média (cinco repetições para cada isolado) de matéria seca produzida para cada isolado em cada temperatura foi estimada, e a análise estatística foi realizada empregando-se regressão polinomial com ajuste da curva de tendência.

4.4 Determinação da patogenicidade de isolados de *Armillaria* sp.

Para o teste de patogenicidade, quatro isolados de *Armillaria* sp. (A2, A7, A13 e A23), foram selecionados de acordo com a variabilidade genética demonstrada no sequenciamento dos genes ITS e fator de alongação - EF-1 alpha (SILVA, 2009) e cultivados em placa de *Petri* (90 mm), contendo meio BDA em temperatura de 20 °C, por 35 dias no escuro. Frascos de vidro com capacidade de 500 mL foram preparados com 100 mL de meio de cultura líquido (infuso comercial de batata dextrose) e um fragmento de tronco de pínus com casca (torete) de aproximadamente 10 cm. Os frascos foram autoclavados duas vezes, por 1 hora. Em seguida, três discos de micélio-ágar de 5 mm foram retirados dos isolados previamente cultivados e inseridos nos frascos. Os frascos foram incubados a temperatura de 20 °C por 120 dias, para permitir a colonização dos toretes pelos isolados e se constituir no inoculo. Foram realizadas 20 repetições para cada isolado, totalizando oitenta frascos.

Os toretes colonizados foram então retirados dos frascos e inoculados verticalmente, a 5 cm de profundidade, encostados nas plantas, em vasos de 10 litros contendo plantas de *Pinus taeda* de 6 meses de idade, plantadas em substrato a base de turfa, esterilizado e sem adubação. Foi utilizado um torete por planta. Antes da inoculação, as raízes de quarenta mudas foram feridas com o auxílio de um bisturi. Os vasos ficaram ao ar livre, com irrigação eventual, quando necessária. Cem plantas de *Pinus taeda* foram utilizadas para este ensaio (20 para cada isolado e 20 para controle – sem ferimento). Nos 20 vasos utilizados para controle, foram inseridos toretes sem inoculo, autoclavados.

Foi avaliada a incidência de plantas com sintomas típicos da armilariose e/ou mortas aos 6, 12, 18 e 24 meses, após a inoculação.

4.5 Produção de basidiomas *in vitro*

Para este estudo, um isolado de *Armillaria* sp. (A1) foi cultivado em meio BDA por 35 dias, em temperatura de 20 °C no escuro. Segmentos de tronco de *Pinus*

taeda com casca, de aproximadamente 15 cm de comprimento e 8 cm de espessura foram inseridos em frascos de vidro com dimensões de 21 cm x 11 cm, que continham 500 mL de meio BDA. Todo este conjunto foi esterilizado por duas vezes, em autoclave a 120 °C, durante 1 hora. Cinco discos de micélio-ágar de 5 mm de diâmetro, do isolado foram inseridos nos frascos. Foram realizadas seis repetições. Os frascos foram incubados a 20 °C no escuro, por seis meses para a colonização do tronco, e posteriormente transferidos para prateleiras, em temperatura e luminosidade ambiente, a partir do mês de março de 2011. Os frascos foram avaliados uma vez por mês, observando-se a evolução do fungo no frasco e a formação do basidioma.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização morfológica

5.1.1 Caracterização do micélio de *Armillaria* sp.

As culturas dos isolados de *Armillaria* apresentam crescimento irregular, não apresentando simetria radial, com coloração variando entre branco, tons de cinza e marrom, e na maioria das vezes com a presença de rizomorfos (FIGURA 1).



FIGURA 1: ASPECTO DO ISOLADO A-1 DE *Armillaria* sp. (VERSO E REVERSO DA PLACA), MOSTRANDO A APARÊNCIA DO MICÉLIO E DAS RIZOMORFAS, APÓS 60 DIAS DE CULTIVO EM MEIO BDA, A 20 °C.
FONTE: O AUTOR (2014)

Os 30 isolados de *Armillaria* analisados demonstraram um crescimento micelial bastante diferenciado, não apresentando um padrão de geral de desenvolvimento (FIGURA 2, TABELA 2).

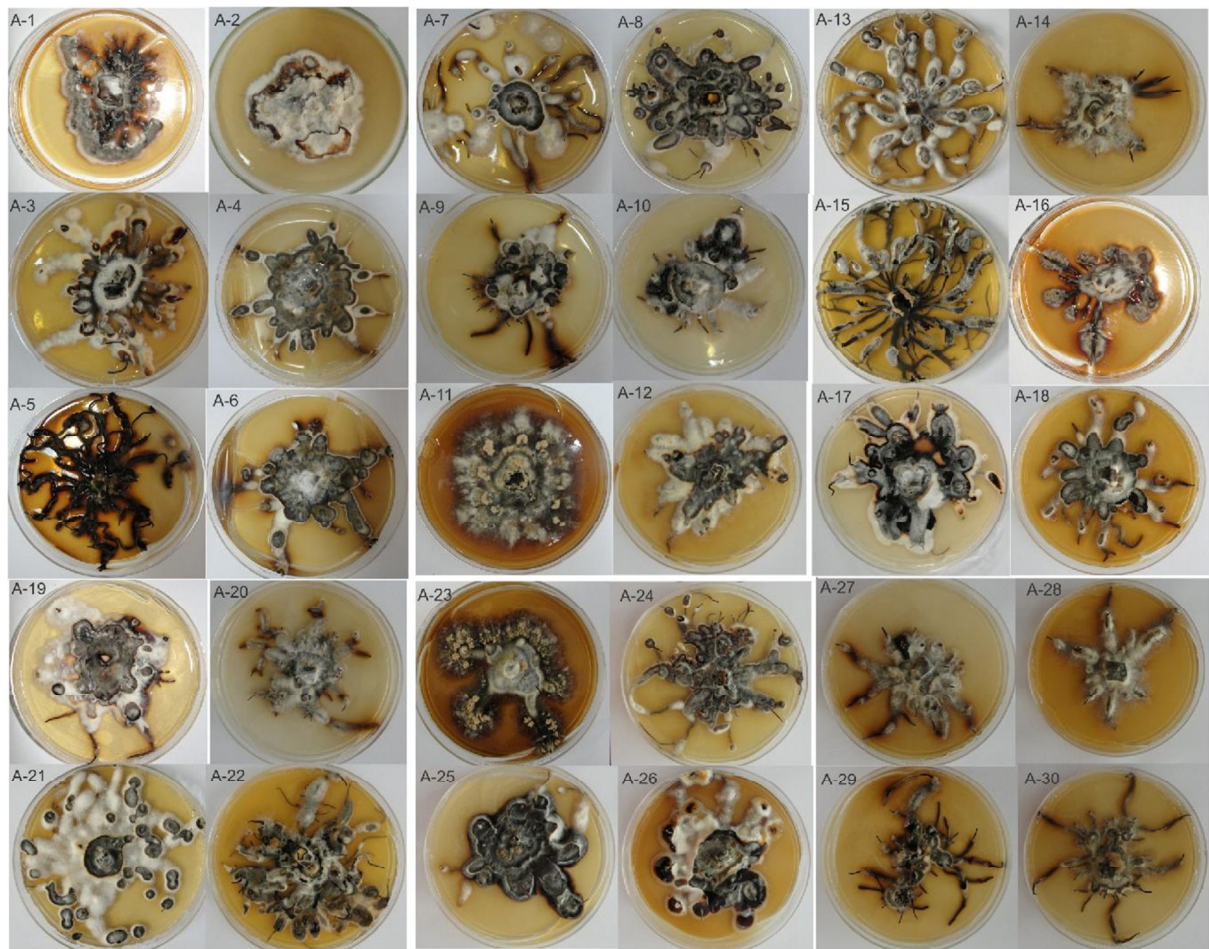


FIGURA 2: ASPECTO GERAL DOS 30 ISOLADOS DE *Armillaria* sp. CULTIVADOS EM MEIO BDA, A 20 °C, POR 30 DIAS.
FONTE: O AUTOR (2014)

TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DA CULTURA DOS ISOLADOS DE *Armillaria* sp. EM MEIO BDA.

ISOLADO	COR	ASPECTO MICELIAL	BORDA	RIZOMORFAS
A1	Cinza	Micélio aéreo presente, em partes rugoso.	Irregular	Poucas e/ou abundantes
A2	Branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Poucas ou ausentes
A3	Branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes
A4	Cinza/branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Poucas e/ou abundantes
A5	Marrom-escuro/ cinza	Micélio aéreo ausente ou mínimo, predominantemente rugoso.	Irregular	Abundantes
A6	Cinza/branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Poucas e/ou abundantes
A7	Branco	Micélio aéreo presente, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes
A8	Cinza	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes
A9	Cinza/branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Poucas ou abundantes
A10	Cinza/branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Poucas e/ou abundantes
A11	Marrom-claro/ branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso, com formações crostosas.	Irregular	Poucas
A12	Cinza/branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Poucas
A13	Branco	Micélio aéreo presente, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes

A14	Branco	Micélio aéreo presente, em partes rugoso.	Irregular	Poucas
A15	Cinza/branco	Micélio aéreo presente, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes
A16	Marrom-claro/ branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso, com formações crostosas.	Irregular	Poucas
A17	Cinza	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes
A18	Cinza	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes
A19	Cinza/branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Poucas ou ausentes
A20	Cinza/branco	Micélio aéreo presente, em partes rugoso.	Irregular	Poucas e/ou abundantes
A21	Branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes
A22	Cinza	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes
A23	Cinza/marrom-claro	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso, com formações crostosas.	Irregular	Poucas e/ou abundantes
A24	Cinza	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Abundantes
A25	Cinza	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Poucas e/ou ausentes
A26	Cinza/branco	Micélio aéreo abundante, em partes rugoso.	Irregular	Poucas ou ausentes
A27	Branco	Micélio aéreo presente, em partes rugoso.	Irregular	Poucas

A28	Branco	Micélio aéreo presente, em partes rugoso	Irregular	Poucas
A29	Cinza	Micélio aéreo presente, em partes rugoso	Irregular	Poucas e/ou abundantes
A30	Marrom-claro/cinza	Micélio aéreo presente, em partes rugoso	Irregular	Poucas e/ou abundantes

FONTE: O AUTOR (2014)

Algumas características predominantes da cultura dos isolados são comentadas a seguir. Alguns isolados apresentaram coloração cinza e branca, com micélio aéreo abundante, em partes rugoso e frequentemente com presença de rizomorfos (FIGURA 3).

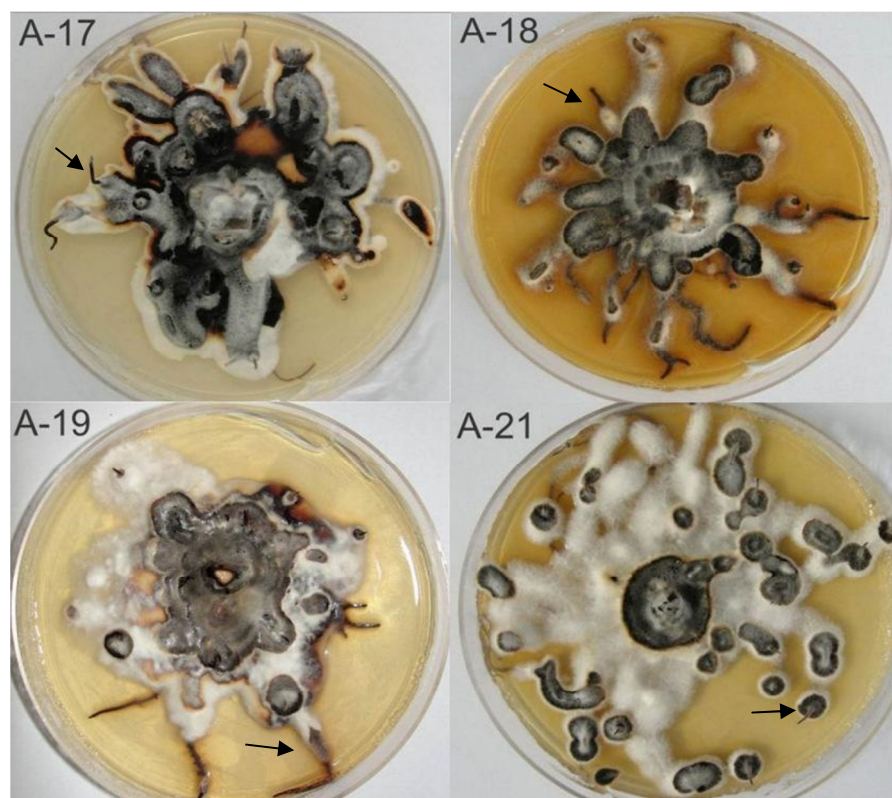


FIGURA 3: EXEMPLO DE ISOLADOS QUE APRESENTARAM COLORAÇÃO CINZA E BRANCA, COM MICÉLIO AÉREO ABUNDANTE, EM PARTES RUGOSO E SEMPRE COM PRESENÇA DE RIZOMORFAS (SETAS).
FONTE: O AUTOR (2014).

Alguns isolados apresentaram micélio e rizomorfos menos abundantes, com a presença de micélio aéreo de coloração clara, variando entre branco, marrom e cinza (FIGURA 4).

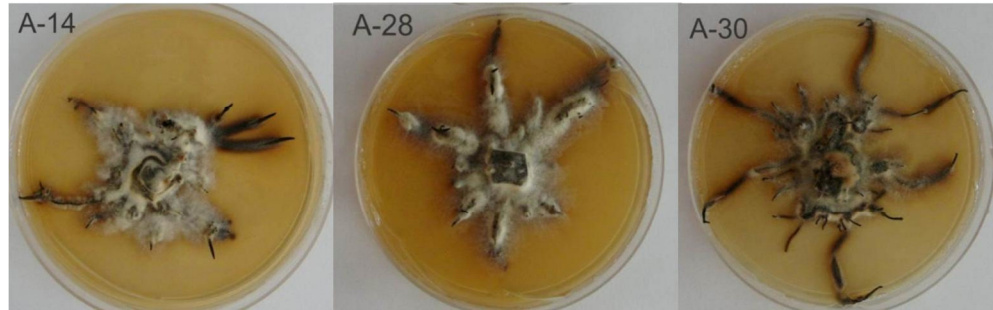


FIGURA 4: EXEMPLO DE ISOLADOS QUE APRESENTARAM MICÉLIO E RIZOMORFAS MENOS ABUNDANTES, COM A PRESENÇA DE MICÉLIO AÉREO DE COLORAÇÃO CLARA, VARIANDO ENTRE BRANCO, MARROM E CINZA.
FONTE: O AUTOR (2014)

Ao contrário do grande desenvolvimento micelial observado na maioria das placas, algumas culturas demonstraram menor desenvolvimento micelial, sendo as placas dominadas por rizomorfos, na maioria das vezes com a presença de micélio aéreo sobre as rizomorfos. (FIGURA 5). Formações crostosas foram observadas em algumas culturas. (FIGURA 6).



FIGURA 5: EXEMPLOS DE ISOLADOS QUE APRESENTARAM PREDOMÍNIO DE RIZOMORFAS.
FONTE: O AUTOR (2014)

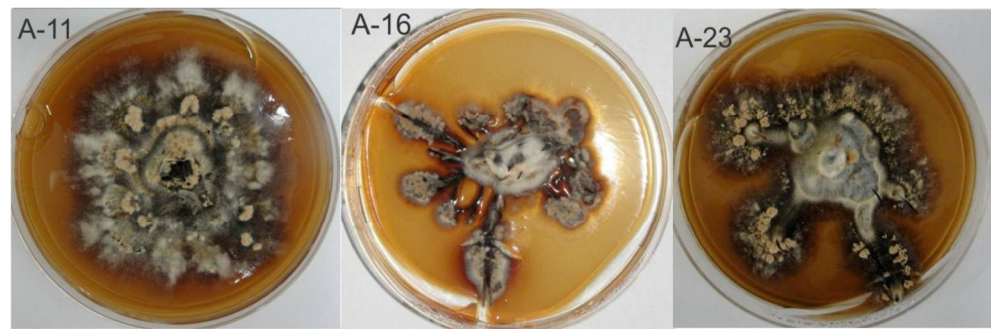


FIGURA 6: EXEMPLO DE ISOLADOS QUE APRESENTAM FORMAÇÕES CROSTOSAS NO MICÉLIO.
FONTE: O AUTOR (2014).

Variações do micélio foram detectadas em um mesmo isolado, repicado em placas diferentes. A Figura 7 demonstra variações no micélio do isolado A-2. Ambas as placas foram inoculadas no mesmo dia e foram provenientes de uma mesma cultura. Além da variação de cor e aspecto, pode-se observar que uma das culturas não desenvolveu rizomorfias.

A respeito destas variações em basidiomicetos como *Armillaria*, Nobles (1965) comentou que podem ser devidas às condições de cultivo como meio e temperatura. Contudo, foi observado neste estudo, que o aspecto da cultura pode ser fortemente influenciado pelo ponto selecionado para o repique, sugerindo grande variabilidade fenotípica dentro de um mesmo isolado.

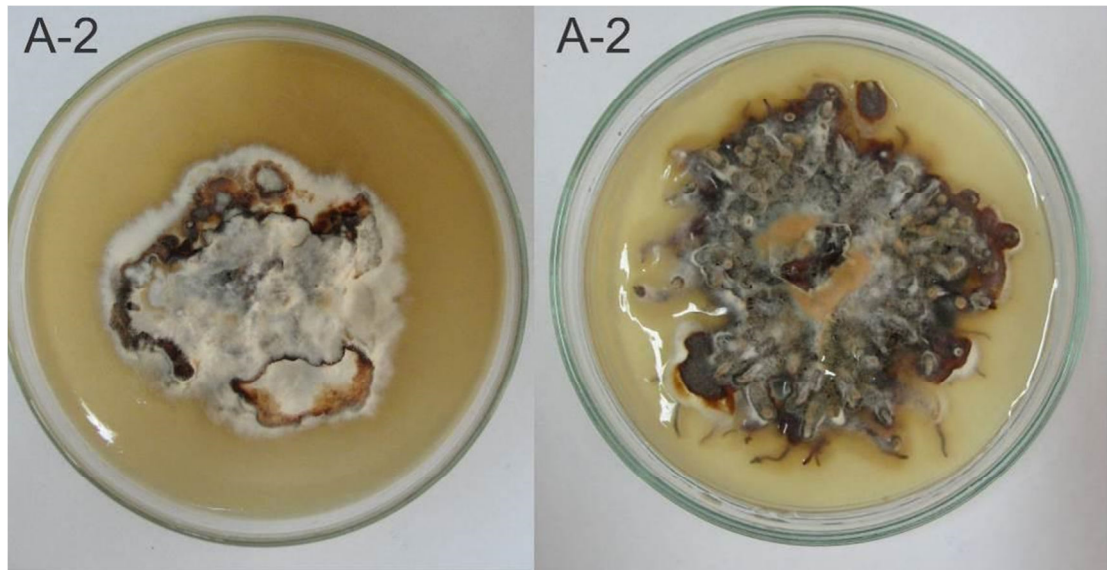


FIGURA 7: CULTURAS DO ISOLADO A-2, REPICADAS NO MESMO DIA, PROVENIENTES DA MESMA CULTURA, DEMONSTRANDO VARIAÇÕES NO ASPECTO DO MICÉLIO.
 FONTE: O AUTOR (2014).

Os micélios utilizados nesse estudo são diplóides. Contudo, mesmo quando crescimento vegetativo é produzido a partir de basidiósporos, originando uma cultura haplóide, a variabilidade é observada. A partir de um único basidioma de *Armillaria gallica*, Peabody et al. (2005), produziram culturas haplóides e com base na grande variabilidade observada nos micélios, esses autores concluíram haver grande plasticidade fenotípica nas hifas, especialmente quando cultivadas em diferentes potenciais hídricos. Os resultados obtidos por Peabody et al. (2005), sugerem que esta variabilidade fenotípica está diretamente relacionada com a capacidade de adaptação do fungo *Armillaria* em condições ecológicas distintas. Assim, um espécime de *Armillaria ostoyae*, que cresce sob o solo da Floresta Nacional de Malheur, no estado do Oregon nos Estados Unidos, é considerado o maior ser vivo do mundo, se distribuindo por quase 10 Km² (FERGUSON et al., 2003).

Wang et al. (1985), relataram a dificuldade em identificar morfotipos em fungos que apresentam grande variação morfológica de crescimento, como é o caso de *Armillaria* sp.

Bruhn et al. (1998) avaliaram as características do crescimento micelial de algumas espécies de *Armillaria*, e demonstraram que entre espécies, o padrão de crescimento é diferente, variando em relação a formação e aspecto de hifas, a coloração e a densidade do micélio e à pigmentação escura observada no meio de

cultura, porém, dentro da mesma espécie as variações eram mínimas ou indistinguíveis. O presente estudo sugere resultados diferentes, indicando grande variação dentro da mesma espécie.

Silva (2009) analisou por meio de sequenciamento de região ITS, isolados de *Armillaria* presentes neste estudo. Os isolados demonstraram variabilidade genética entre si, porém formaram um único grupo filogenético, sugerindo que os isolados tratam-se de uma única espécie.

Durante a realização deste trabalho, as culturas cresceram mais rapidamente e com aspecto mais vigoroso quando o ponto da cultura selecionado para repique contém fragmentos de micélio e rizomorfos. Quando somente fragmentos de rizomorfa foram selecionados, o aspecto da cultura demonstrou-se mais rugoso e com menor crescimento micelial. Contudo, algumas culturas repicadas somente com fragmentos de micélio, desenvolveram rizomorfos. Este dado sugere que as propriedades do micélio sustentam o crescimento das rizomorfos. Na natureza, as rizomorfos desenvolvem-se a partir da placa micelial (FOX, 2000).

Vários estudos demonstram a possibilidade de diferenciação de culturas em morfotipos, quando estas pertencem a espécies diferentes (RISHBETH, 1986; BERUBÉ, 1989; CHA, 1997; BRUHN, 1998, OTIENO et al., 2003). Não foram encontrados relatos na literatura sobre a diferenciação entre culturas da mesma espécie.

A coloração observada dentre os 30 isolados, variou entre branca, cinza e, marrom, sendo que na maioria das vezes, diferentes tonalidades foram observadas no mesmo micélio. Quanto à superfície, os micélios apresentaram-se por vezes volumosos, com um aspecto cotonoso ou rugoso. Estas variações, apesar de serem observadas em um mesmo isolado, em culturas diferentes, apresentou uma leve diferenciação quando repicado em meio BDA contendo ácido tânico e extrato de malte (FIGURA 8) o que pareceu favorecer o desenvolvimento das rizomorfos, conforme indicado por Nobles (1965), Shaw (1985), Cha (1997) e Cheng (2006).

Shaw (1985) relata que diferentes espécies de *Armillaria* respondem diferentemente frente a variados componentes, especialmente compostos fenólicos. Contudo, a maioria das espécies responde de maneira similar ao ácido tânico não sendo, portanto, uma alternativa para a identificação morfológica de espécies.



FIGURA 8: DESENVOLVIMENTO DE ISOLADO DE *Armillaria* EM MEIO DE CULTURA COM EXTRATO DE MALTE E ÁCIDO TÂNICO.
FONTE: O AUTOR (2014)

Algumas estruturas vistas frequentemente nos micélios durante este estudo foram visualizadas em microscópio estereoscópico. A estrutura observada na Figura 9A foi visualizada com frequência. Trata-se de um micélio compacto, de superfície lisa e coloração diferenciada. Quando perfurada, a estrutura demonstrou-se carnosa, liberando uma substância líquida. Trata-se possivelmente de uma estrutura de reserva de água e nutrientes formada *in vitro*.

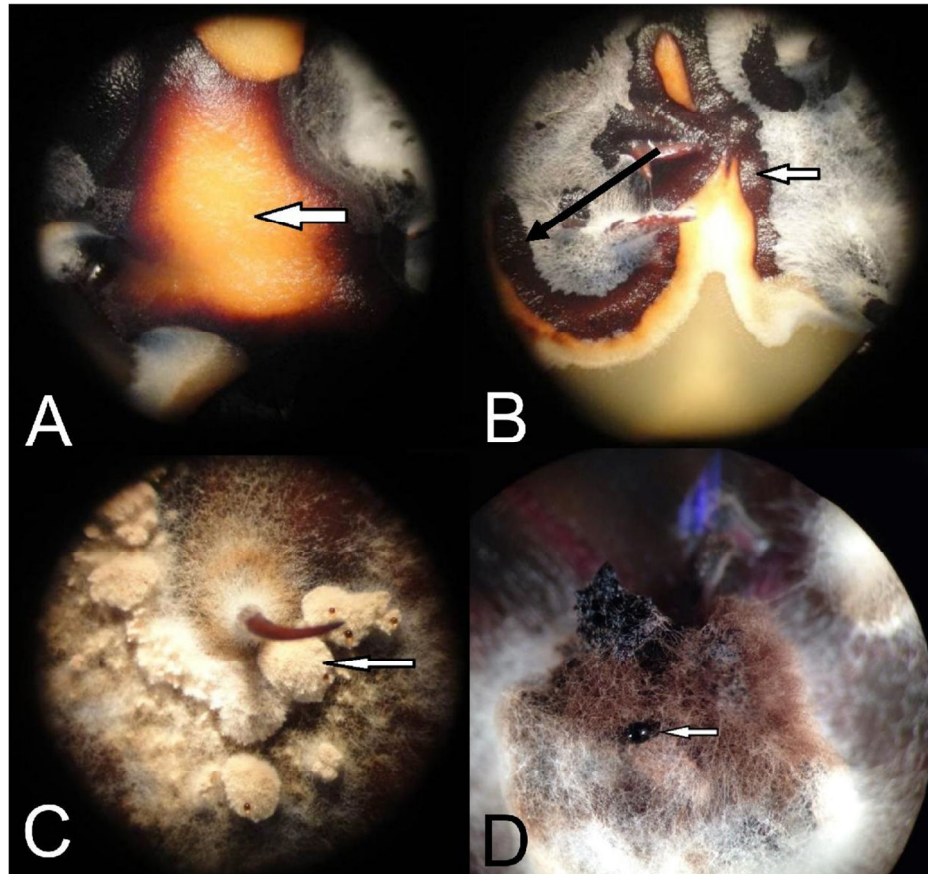


FIGURA 9: A: PRESENÇA DE UM MICÉLIO COMPACTADO, COM COLORAÇÃO AMARELADA; B: MICÉLIO DIFERENCIADO, FORMANDO ÁREA RUGOSA AO REDOR DO MICÉLIO AÉREO; C: FORMAÇÕES CROSTOSAS NO MICÉLIO, COM EXSUDATOS. D: EXSUDATO FORMADO EM MICÉLIO DE *Armillaria* sp.
 FONTE: O AUTOR (2014).

Alguns isolados apresentaram partes do micélio diferenciadas, formando uma área rugosa, ao redor do micélio aéreo. (FIGURA 9B). As formações crostosas observadas nos isolados A11, A16 e A 23 podem ser observadas na Figura 9C. Segundo Morrison (1982), estas formações crostosas são típicas em isolados diploides, não sendo formadas em culturas haploides. Não foi possível traçar a frequência da formação destas estruturas entre os isolados, e o desenvolvimento foi observado tanto em culturas jovens, quanto velhas.

Um exsudato de coloração marrom escura foi observado sobre a superfície do micélio de alguns isolados (FIGURA 9D). Segundo estudo realizado por Mallett e Colotelo (1984), estes exsudatos podem ser observados também na superfície de rizomorfas, além do micélio. Segundo o estudo, trata-se de um composto de aminoácidos livres, proteínas, β -glicosidase, peroxidase, polifenol, ácidos e elementos inorgânicos, que podem estar diretamente relacionados com o processo de invasão na planta e desenvolvimento da armilarirose.

Uma pigmentação escura foi observada no meio de cultura, até mesmo antes

do início do desenvolvimento de todos os isolados. Para Nobles (1965), a pigmentação escura observada em crescimento em meio de cultura contendo ácido tânico, pode indicar a produção de oxidase extracelular. Bastos (2005) estudou o perfil de produção de enzimas extracelulares em fungos fitopatogênicos e sugeriu que a produção de certas enzimas extracelulares, entre elas a oxidase, está diretamente relacionada com a capacidade do fungo em produzir doença, visto que, estas enzimas ativamente degradam os componentes presentes no tecido infectado do hospedeiro.

Os isolados mencionados anteriormente, que demonstraram um padrão similar no crescimento das culturas, são provenientes de localidades e de hospedeiros diferentes, não sendo possível, dessa forma, traçar alguma relação entre a morfologia, origem e hospedeiro.

5.1.2 Análise da hifa de *Armillaria* sp. sob microscopia de luz

Na análise de todos isolados à microscopia de luz, grampos de conexão, projeções diminutas similares a pelos sobre a superfície de hifas, septação e massas resinosas sobre a parede de algumas hifas (FIGURA 10A e 10B), foram observados. Da mesma forma, não demonstraram um padrão entre os diferentes isolados, aparecendo aleatoriamente sobre algumas hifas. Algumas placas mantidas em geladeira por até um ano, também foram avaliadas, no intuito de descartar a possibilidade da presença e frequência destas estruturas estarem relacionadas com um possível envelhecimento dos isolados. Vale aqui mencionar, que culturas de isolados de *Armillaria* sp. em meio BDA, sob refrigeração (4 °C), demonstraram-se viáveis por pelo menos 1 ano e meio de armazenamento. Estas estruturas poderiam estar relacionadas com algum mecanismo de resistência, no entanto, demonstraram-se presentes tanto em culturas novas, como nas armazenadas.

Estas estruturas já haviam sido descritas e discutidas por Nobles, (1965) para várias espécies de basidiomicetos, entre elas *Armillaria*. Silva (2009) estudando três isolados de *Armillaria* sp. sob microscopias de luz e eletrônica de varredura pode verificar estruturas típicas de basidiomicetos, porém não sendo possível traçar um padrão em relação à presença destas estruturas, nem tão pouco diferenciar os

isolados ou identificar estruturas específicas de *Armillaria* sp. Nas micrografias obtidas por Silva (2009) tanto em microscópio eletrônico como em microscópio de luz, já haviam sido evidenciadas as mesmas estruturas descritas neste estudo.

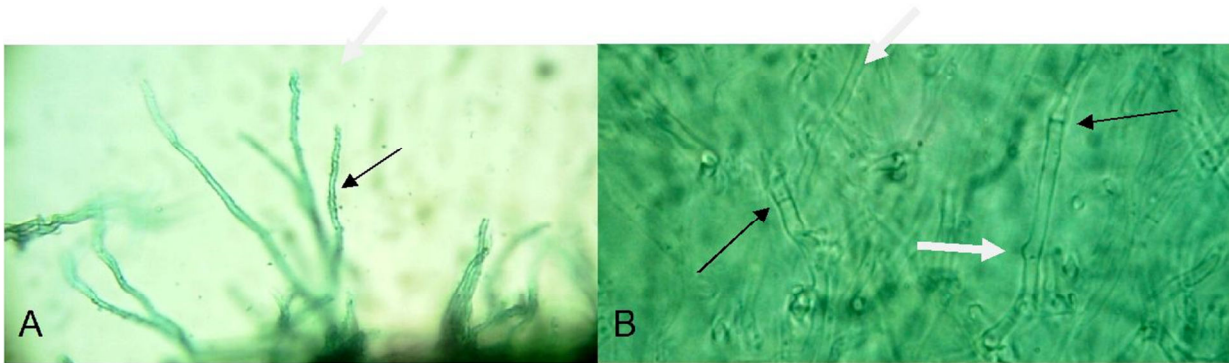


FIGURA 10: A: MASSAS RESINOSAS SOBRE A PAREDE DE ALGUMAS HIFAS. B: PRESENÇA DE SEPTOS EM MICÉLIO DE *Armillaria* sp. (SETAS PRETAS); INÍCIO DA FORMAÇÃO DE GRAMPO DE CONEXÃO (SETA BRANCA) (400X).
 FONTE: O AUTOR (2014)

Nobles (1965) descreveu que o gênero *Armillaria* assim como outros basidiomicetos apresenta células cuticulares em áreas pseudoparenquimatosas. Estas estruturas foram claramente evidenciadas nas análises (FIGURA 11). Leite (1985), ao estudar a morfologia de um basidiomiceto (*Panus* sp.) também visualizou estas estruturas e descreveu-as similarmente às estruturas encontradas no presente trabalho e as referiu como vesículas. Porém algumas destas estruturas poderiam indicar a presença de clamidósporos, estruturas de resistência, que atuam como conídios (esporos assexuados), comuns em alguns basidiomicetos (FIGURA 11). Leite (1985), também relatou a presença de clamidósporos no gênero *Panus*.

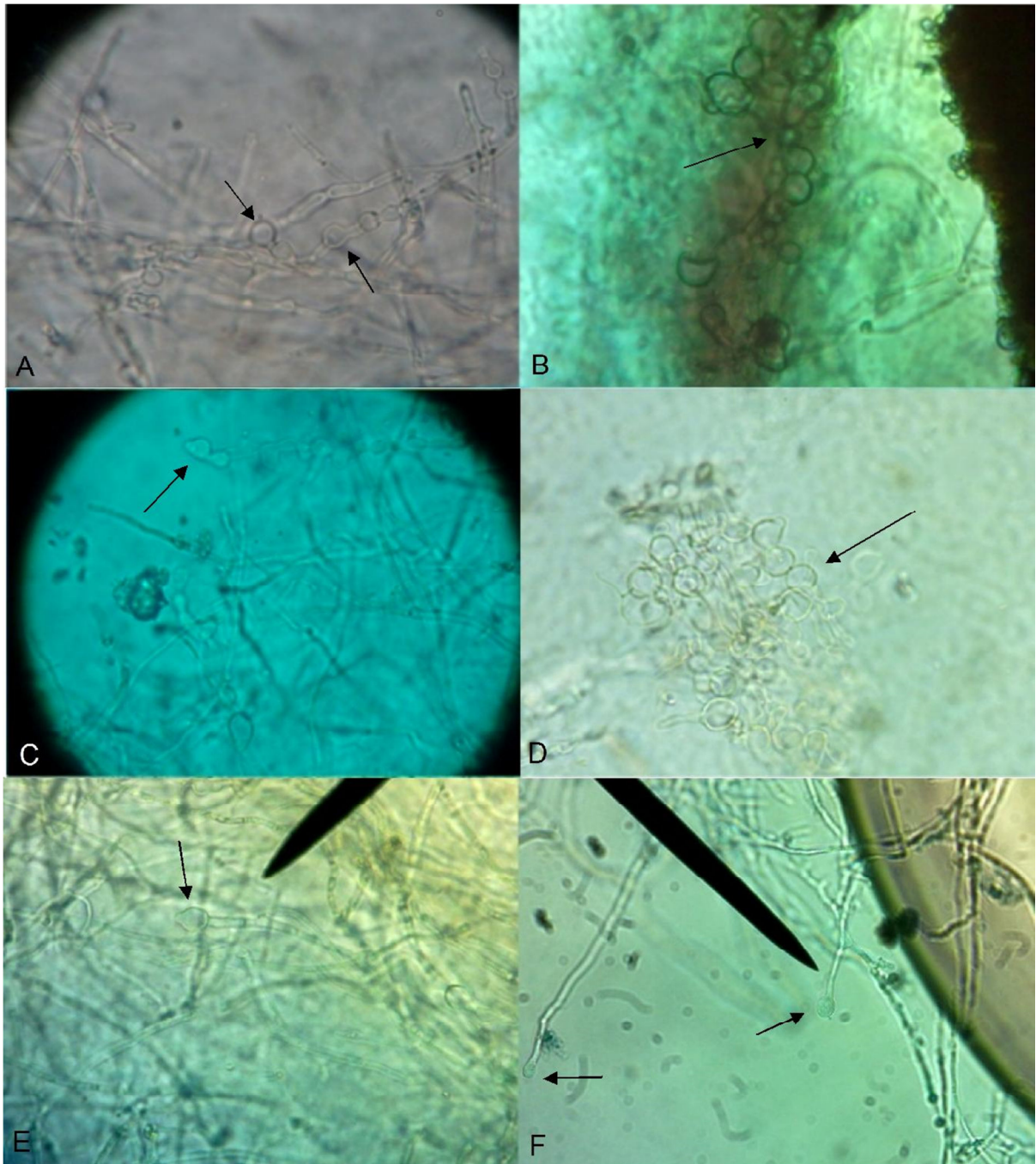


FIGURA 11: A, B, C, D: PRESENÇA DE CÉLULAS CUTICULARES EM ÁREAS PSEUDOPARENQUIMATOSAS. E, F: PRESENÇA DE ESTRUTURAS SIMILARES A CLAMIDÓSPOROS EM HIFAS DE *Armillaria* sp. (SETAS).
 FONTE: O AUTOR (2014)

A presença de clamidósporos poderia significar uma adaptação do gênero, em termos de dispersão e sobrevivência, visto que somente produz esporos a partir dos basidiomas, que são produzidos eventualmente.

Muitos fungos habitantes do solo possuem elevada capacidade de competição saprofítica e podem sobreviver em resíduos de plantas introduzidos no solo, mantendo-se em elevadas densidades populacionais mesmo durante longos

períodos de rotação de culturas, como é o caso de *Armillaria*. Alguns fungos que vivem nesse ambiente produzem estruturas como agregados miceliais, esclerócios, oósporos, clamidósporos ou outros tipos de esporos, que resistem às condições ambientais adversas e permanecem viáveis quando as plantas hospedeiras não estão presentes. Essas estruturas podem estar associadas com resíduos de plantas, mas frequentemente encontram-se livres no solo. Esse conjunto de características é uma das razões pela qual fungos fitopatogênicos habitantes do solo, uma vez introduzidos em área de plantio, dificilmente são eliminados (WHEELER e RUSH, 2001). A alta capacidade de competição saprofítica, aliada à produção de estruturas de resistência, como clamidósporos, pode esclarecer o grande poder adaptativo de *Armillaria* em condições ambientais variadas.

5.1.3 Caracterização das rizomorfias

As rizomorfias são estruturas alongadas, de coloração marrom, por vezes avermelhada, com a superfície de aparência lisa ou pilosa. A presença destas estruturas pilosas foi relacionada com rizomorfias “aéreas”, não sendo encontradas nas que se desenvolvem no interior do meio de cultura, inclusive no crescimento em meio líquido (FIGURA 12).

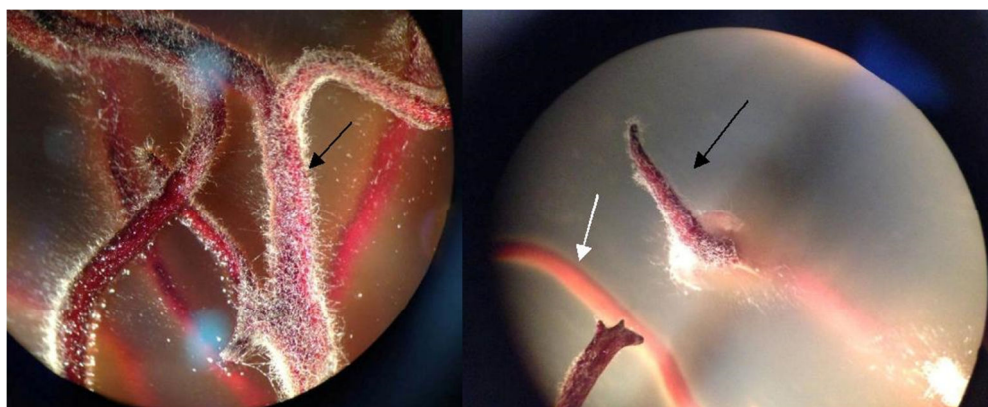


FIGURA 12: ASPECTO DE RIZOMORFAS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO (BDA), SOB MICROSCÓPIO ESTEREOSCÓPIO, DEMONSTRANDO PILOSIDADES FORMADAS EM RIZOMORFAS AÉREAS (SETA PRETA) E PIGMENTAÇÃO DIFERENCIADA ENTRE RIZOMORFAS AÉREAS E SUBMERSAS (SETA BRANCA).
 FONTE: O AUTOR (2014)

Parrek (2006) analisou a estrutura de rizomorfos de *Armillaria luteobubalina* e comentou que a estrutura da rizomorfa varia de acordo com as condições de crescimento. Na natureza, podem ser observadas rizomorfos subterrâneas (no solo) e as que crescem na superfície, sobre a casca de plantas doentes. A diferenciação destas estruturas na natureza foi relatada por Hartig (1974). Parrek (2006) sugeriu que a diferenciação se deve a inúmeros fatores, incluindo a presença e concentração de oxigênio no meio circundante e que, essas pilosidades tratam-se de prolongamento de hifas, cujo papel é aumentar a área de captação de água e especialmente, oxigênio.

Alguns trabalhos indicam que as rizomorfos subterrâneas têm um papel fundamental na absorção e translocação de água e nutrientes (GRANLUND et al., 1985; EAMUS et al., 1985; CAIRNEY, 1992).

Em relação à pigmentação, a literatura relata que na natureza, rizomorfos subterrâneas são de pigmentação mais escura, apresentando maior quantidade de melanina do que as rizomorfos aéreas. (TOWNSEND, 1954; BLOOMFIELD e ALEXANDER, 1967; KUO e ALEXANDER, 1967; BUTLER et al., 2001). Contudo, neste trabalho foi observado que as hifas aéreas mostraram-se mais pigmentadas do que as hifas subterrâneas (FIGURA 12). Por essa deposição de melanina na superfície na rizomorfa estar relacionada com resistência e proteção frente à condições ambientais adversas, as condições cultivo *in vitro*, mais instáveis na superfície do meio, explicam a diferenciação das rizomorfos aéreas, sendo outra demonstração do poder adaptativo das hifas de *Armillaria* frente à condições ambientais

Ao microscópio de luz, as rizomorfos se mostraram um emaranhado de hifas, formando um pseudoparênquima. As hifas que formam as rizomorfos mostraram-se similares às hifas que formam o micélio, com a presença de septos, e células infladas, lembrando as células cuticulares encontradas no micélio. Essas estruturas foram observadas tanto em hifas aéreas quanto em hifas subterrâneas (FIGURA 13).

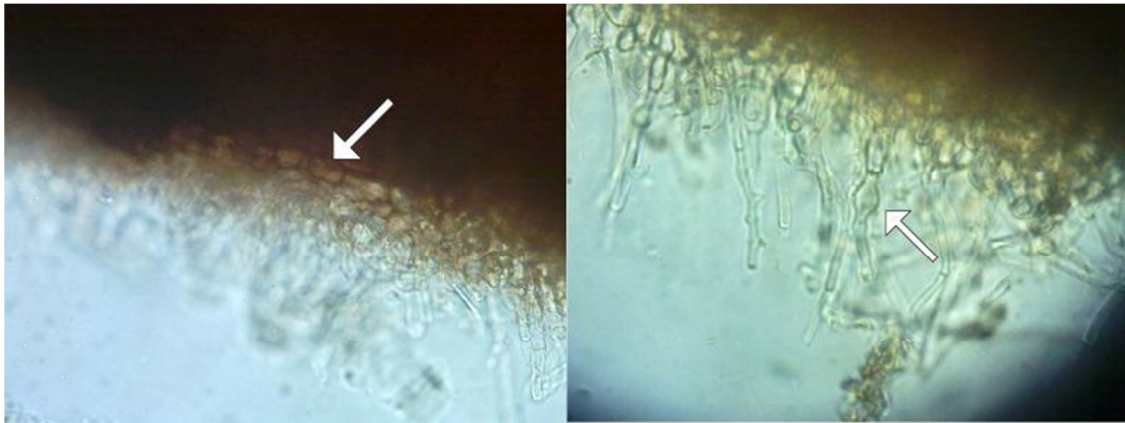


FIGURA 13: A: HIFAS INFLADAS EM RIZOMORFA SUBMERSA; B HIFAS INFLADAS EM RIZOMORFA AÉREA (SETAS).
 FONTE: O AUTOR (2014).

Money (2004) e Parrek (2006) sugerem que a presença de hifas infladas nas rizomorfias aéreas, esta diretamente relacionada com a presença e concentração de oxigênio no meio, sendo mais presentes e mais volumosas em rizomorfias aéreas, podendo tratar-se de um reservatório de oxigênio.

Esta propriedade de armazenamento das rizomorfias aéreas e subterrâneas explica a presença de células infladas nos dois casos. Mihail e Bruhn (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 quantidade 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.

A presença e o aspecto das rizomorfias, formadas a partir do micélio, também apresentaram variações entre os isolados, dentro de um mesmo isolado e em relação ao tipo de meio de cultura (BDA, meio com ácido tânico e extrato de malte e meio BD), não sendo formadas em poucas ocasiões, e em outras formadas com aspecto levemente mais grosseiro. O aspecto das rizomorfias formadas em meio líquido (BD), mostrou-se muito similar ao crescimento quando no interior do meio sólido (BDA). Este fato sugere que o aspecto liso da superfície da rizomorfa está diretamente relacionado com a privação de oxigênio no ambiente.

Yafetto et al. (2009) estudando os mecanismos do crescimento das rizomorfas, concluíram que os padrões de crescimento eram modificados conforme alterações na densidade do meio de cultura, e ainda, que os padrões de extensão das rizomorfas 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 rizomorfas macroscópicas.

5.1.4 Caracterização da placa micelial

A placa micelial é uma estrutura esbranquiçada produzida por *Armillaria* sp na entrecasca do tronco e em raízes doentes. A fim de se estudar melhor esta estrutura, toretes de pinus foram inoculados com *Armillaria* e cultivados por 90 dias. Os isolados A2, A7, A13 e A 23 foram utilizados neste ensaio. Todos os isolados colonizaram os toretes. Após a colonização, a casca foi removida para a observação da placa micelial (FIGURA 14).



FIGURA 14: FORMAÇÃO DE PLACA MICELIAL EM TRONCO DE PINUS COLONIZADO POR *Armillaria*.
FONTE: O AUTOR (2014).

Um fragmento de placa micelial foi removido diretamente de um tronco colonizado e analisado microscopicamente. Ao microscópio de luz, a placa micelial se mostrou um emaranhado de hifas, aparentemente formando um pseudoparênquima. Todos os isolados apresentaram a mesma estrutura (FIGURA 15).

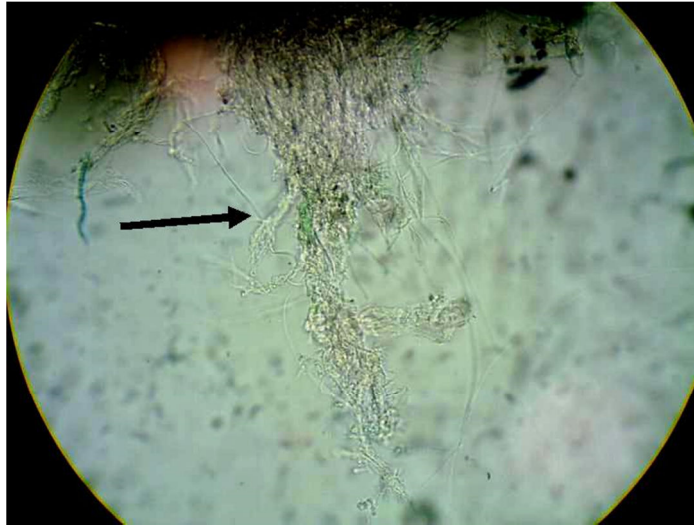


FIGURA 15: ASPECTO GERAL DE UM FRAGMENTO DE PLACA MICELIAL OBSERVADO EM MICROSCÓPIO DE LUZ (100X).
FONTE: O AUTOR (2014)

As hifas que formam a placa micelial apresentaram um aspecto grosseiro, com estruturas verrucosas sobre a superfície (FIGURA 16). Estas estruturas foram observadas em um estudo realizado por Silva (2007), na superfície de hifas removidas do micélio, bem como relatadas por Nobles (1965).

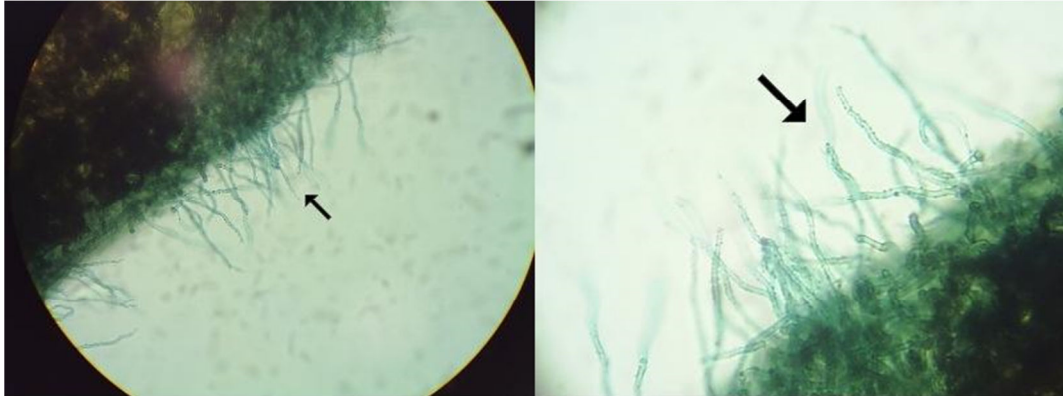


FIGURA 16: HIFAS VERRUGOSAS PRESENTES NA SUPERFÍCIE DA PLACA MICELIAL (400 X).
FONTE: O AUTOR (2014)

Por se tratar de uma estrutura que se desenvolve na entrecasca de plantas doentes, a presença destas estruturas verrucosas pode estar relacionada com algum mecanismo de resistência ou invasão. Estas estruturas também foram observadas nos micélios.

5.2 Caracterização fisiológica dos isolados

5.2.1 Determinação da temperatura ótima de crescimento

Os resultados da temperatura ótima de crescimento de isolados de *Armillaria* sp. mostraram que o isolado A1 (Pirai do Sul) teve a maior produção de biomassa, comparado com os demais isolados estudados. A faixa de temperatura em que foi observada a maior produção de biomassa entre os isolados foi entre 16 °C e 24 °C. (GRAFICO 1) confirmando os resultados apresentados por Gomes et al. (2007). No referido estudo, três isolados foram estudados, e a temperatura sugerida pelo autor como ótima de crescimento foi de 22 °C.

Analisando os resultados obtidos para os seis isolados estudados neste trabalho, a temperatura média ótima de crescimento ficou entre 16 °C e 20 °C, estando o ponto máximo médio em aproximadamente 17° C, abaixo do resultado demonstrado por Gomes et al. (2007). Contudo, o isolado A4 demonstrou melhor crescimento entre 20 °C e 24 °C.

A literatura relata diferentes temperaturas para o crescimento do gênero *Armillaria*. Rishbeth (1978) estudou os efeitos da temperatura do solo no crescimento de *Armillaria* sp. e concluiu que a temperatura ótima para o crescimento está em torno de 20 °C, sendo a mínima 10 °C e a máxima 26 °C. Cheng et al. (2006) sugeriram que a faixa de temperatura ótima para crescimento de *A. mellea* está entre 20 e 30 °C.

Keča et al. (2005), testaram cinco espécies de *Armillaria* (*A. cepitipes*, *A. gallica*, *A. mellea*, *A. ostoyae* e *A. tabescens*) frente à quatro temperaturas (13, 22, 27 e 32 °C). Os resultados sugeriram que a temperatura ótima para o crescimento do gênero esta entre 22 e 27 °C. Contudo, os resultados obtidos pela equipe demonstraram grande variação de temperatura para o crescimento entre as diferentes espécies. *A. gallica* e *A. tabescens* cresceram melhor em temperatura de 32 °C do que em 13 °C, enquanto que *A. cepitipes* cresceu melhor em temperatura de 13 °C do que em 27 e 32 °C.

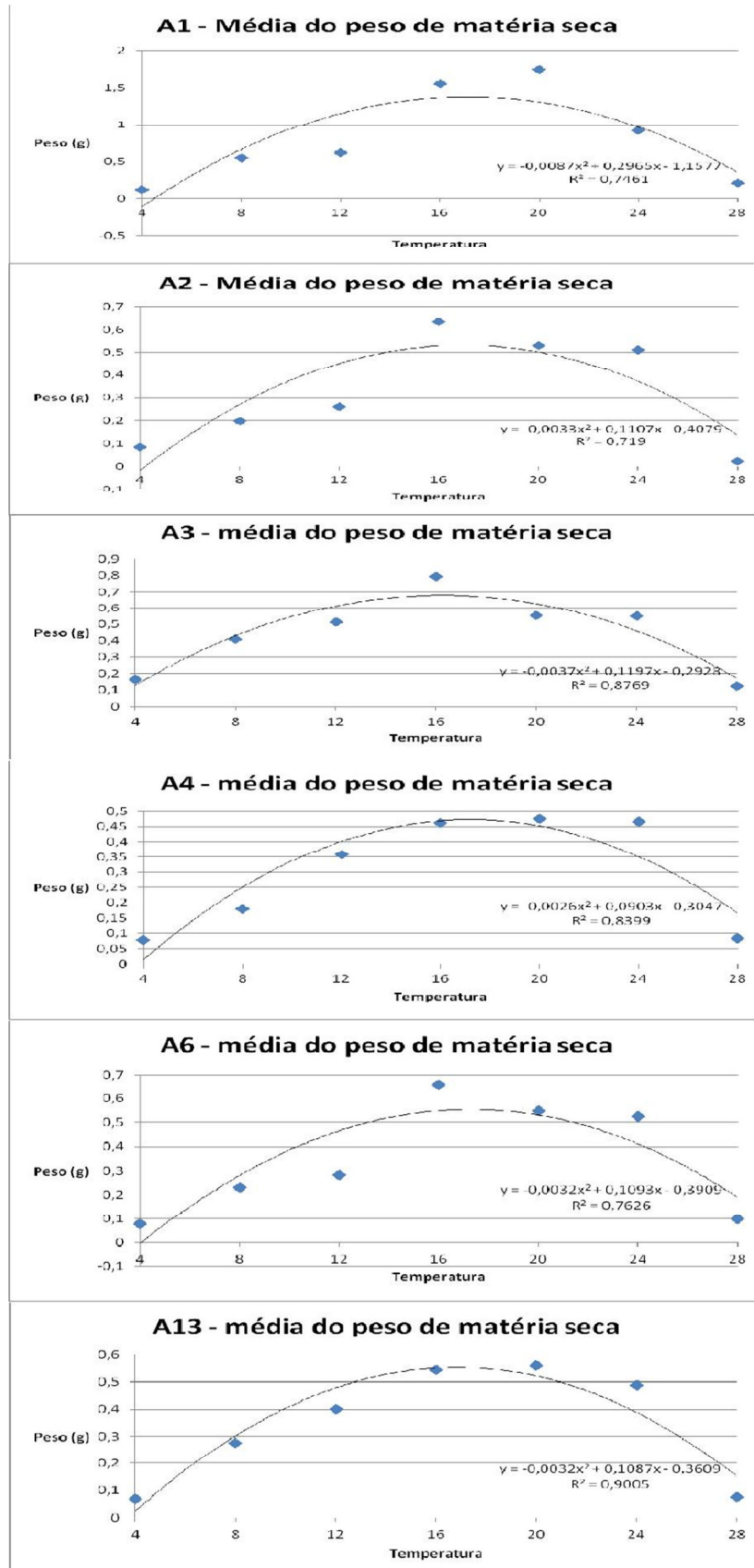


GRAFICO 1: CURVAS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA MÉDIA (g) EM MEIO LÍQUIDO EXTRATO DE BATATA-DEXTROSE, SOB VÁRIAS TEMPERATURAS, COM SEIS ISOLADOS DE *Armillaria sp.*
 FONTE: O AUTOR (2014)

Além da temperatura ótima de 17 °C para crescimento dos isolados de *Armillaria* sp. estar abaixo da faixa relatada na literatura para outras espécies, este estudo registrou crescimento em temperaturas de 4 e 8 ° C, indicando que os isolados de *Armillaria* sp. da região Sul do Brasil crescem em temperaturas mais baixas. Outro fato é o crescimento dos isolados em todas as sete temperaturas testadas, sendo mais um indício do poder de adaptação dos isolados de *Armillaria* sp. em diferentes condições ambientais.

5.3 Determinação da patogenicidade de isolados de *Armillaria* sp.

Durante as primeiras avaliações (seis e 12 meses após a inoculação) não foram detectadas plantas com sintomas. Na avaliação realizada com 18 meses após a inoculação, uma planta, inoculada com o isolado A2 e com ferimento na raiz, apresentou amarelecimento da copa, sintoma inicial típico da doença. Antes da realização da quarta e última avaliação (24 meses após a inoculação), a planta estava morta (FIGURA 17A). Esta baixa incidência de plantas doentes em ensaios pode estar relacionada com as condições ambientais propiciadas pelo plantio em vasos.

Rishbeth (1978) relatou que o fungo *Armillaria* é sensível às alterações do solo, como umidade, pH, temperatura e concentração de oxigênio e dióxido de carbono. As rizomorfas normalmente se desenvolvem nas camadas mais superficiais do solo, dependentes de concentração adequada de oxigênio. Contudo, o presente estudo indicou a importância das propriedades do micélio (ou da placa micelial) em sustentar o desenvolvimento das rizomorfas. Como o micélio e a placa micelial necessitam de temperaturas mais amenas para o seu desenvolvimento, a temperatura mais elevada do solo em vasos pode ter dificultado o desenvolvimento do fungo.

Outro fator pode estar relacionado com a duração do experimento. Sicoli et al. (2002), estudaram a patogenicidade de quatro espécies de *Armillaria* (*A. ostoyae*, *A. mellea*, *A. gallica* e *A. tabescens*) em plantas de carvalho na Itália, sendo que a maioria das plantas que adoeceram demonstraram sintomas após quatro anos desde a inoculação. O referido trabalho também relata a dificuldade em se induzir a doença *in vitro*, sugerindo que as plantas utilizadas no estudo provavelmente

apresentavam ou desenvolveram alguma resistência contra o fungo. Guillaumin e Pierson (1977) sugeriram que a inoculação *in vitro*, especialmente quando a raiz é ferida, estimula os mecanismos de defesa e resistência das plantas e, *Armillaria*, sendo um fungo de desenvolvimento lento, as condições proporcionadas pelo ambiente restrito de vasos, dificulta o desenvolvimento e permanência do fungo no solo, possibilitando assim, a defesa e recuperação das plantas.

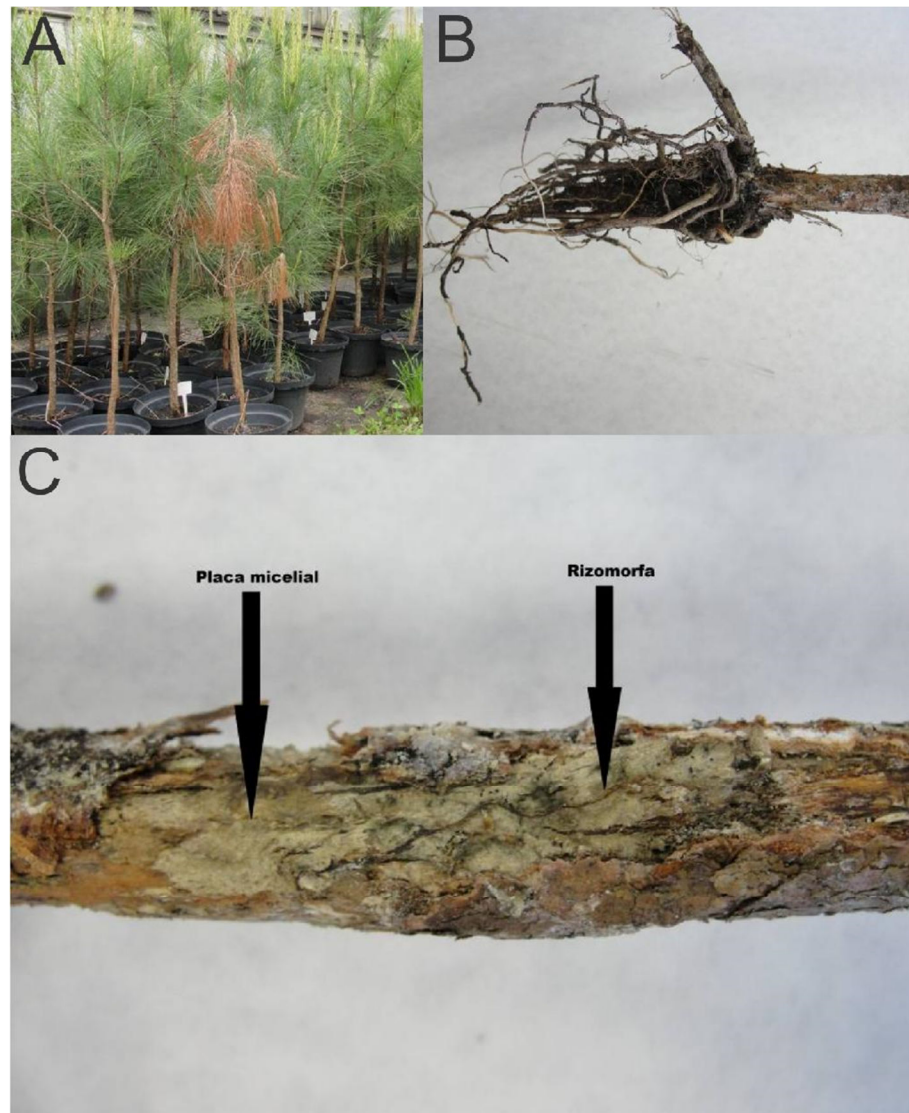


FIGURA 17: A: PLANTA DE *Pinus taeda* INOCULADA E MORTA PELA ARMILARIOSE. B: RAIZ DE PLANTA INOCULADA E MORTA COM SINTOMAS DA PODRIDÃO POR ARMILARIOSE. C: PRESENÇA DE RIZOMORFA E PLACA MICELIAL NA BASE DA PLANTA MORTA POR *Armillaria* sp.

FONTE: O AUTOR (2014)

Sobre a patogenicidade de *Armillaria* em carvalho, Luisi et al. (1993), sugere

que, para a indução da doença *in vitro*, condições de estresse, como falta de água e nutrientes devem ser testadas, a fim de se esclarecer os fatores relacionados à suscetibilidade das plantas à doença.

A raiz da planta doente obtida neste estudo foi analisada e demonstrou deformidades, com aparente podridão típica provocada pela armilariose (FIGURA 17B).

Para confirmação de que a morte da planta foi provocada pelo fungo, a casca foi removida e a presença de placa micelial e rizomorfas foi observada (FIGURA 17C). A presença destas estruturas confirmou a infecção por *Armillaria*. Um fragmento da placa micelial foi transferido para o meio de cultura seletivo para *Armillaria*, e o desenvolvimento da colônia comprovou que a doença foi provocada pelo isolado inoculado previamente, como previsto nos postulados propostos por Koch.

5.4 Produção de basidiomas *in vitro*

Durante o ensaio com um segmento de tronco de *Pinus taeda* e meio BDA em um frasco de vidro um basidioma foi obtido com o isolado A-1. O basidioma se desenvolveu um ano e meio após a inoculação, mas apresentando-se com dimensões maiores do que as normalmente mencionadas na literatura (FIGURA 18).

Sobre a produção de basidiomas *de Armillaria in vitro*, vários autores relatam que as técnicas usualmente utilizadas para a produção de basidiomas podem não ser satisfatórias para *Armillaria*, envolvendo muitos fatores e limitações, sendo o desenvolvimento dos basidiomas bastante variável, dependendo da espécie. (ANDERSON e ULLRICH, 1979; GARRAWAY et al., 1991). Alguns experimentos mostraram-se bem sucedidos na produção de basidiomas de *Armillaria in vitro* pelo mundo, contudo os autores relataram dificuldades e baixo número de frutificações obtidas dentre inúmeros ensaios.

Reaves e McWilliams (1991) obtiveram basidiomas de *A. ostoyae*, a partir de fatias de laranja inoculadas. Dentre 33 experimentos instalados, em 16 os basidiomas frutificaram. Porém, a maioria apresentou irregularidades, especialmente no tamanho. Somente três basidiomas se mostraram regulares e com esporos

viáveis. Os autores atribuíram o baixo índice de frutificação ao excesso de umidade do substrato.



FIGURA 18: FORMAÇÃO DE BASIDIOMA DE *Armillaria* EM FRASCO COM MEIO BDA E TRONCO DE PÍNUS.
FONTE: O AUTOR (2014).

Raabe (1972) obteve um basidioma de *A. mellea* a partir de experimentos com galhos de figueira. Shaw et al. (1991), obtiveram um basidioma de *A. novae-zelandiae* em meio de cultura.

Grillo, 2000, que obteve inúmeras frutificações de *A. tabescens* em substrato a base de farelo de arroz, relatou que a frutificação *in vitro* de *Armillaria* é específica para cada espécie, e não sendo possível para algumas espécies.

O presente trabalho demonstrou que é possível a frutificação *in vitro* de isolados brasileiros de *Armillaria*, tratando-se do primeiro relato no Brasil.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- a) As hifas de *Armillaria* sp. são caracterizadas pela presença de grampos de conexão, septos, pilosidades e massas resinosas sobre a superfície de hifas.
- b) Áreas com células cuticulares em áreas pseudoparenquimatosas e estruturas similares a clamidósporos podem ser observadas no micélio.
- c) O aspecto das rizomorfias e das hifas que as formam, varia de acordo com o ambiente de crescimento (aéreo ou submerso).
- d) A placa micelial é formada por um agrupamento de hifas verrucosas, de aspecto crostoso.
- e) A temperatura média ótima para o crescimento dos isolados de *Armillaria* sp. é de 17 °C.
- f) O ensaio de patogenicidade mostrou a dificuldade de se reproduzir a doença *in vivo*.
- g) Um basidioma foi produzido, demonstrando a possibilidade de frutificação *in vitro* de isolados de *Armillaria*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas)**: ano base 2012. Brasília: 120p, 2013

ANDERSON, J.B; ULLRICH, R.C. Biological species of *Armillaria* in North America. **Mycologia**, v. 81, p. 401– 414, 1979.

ANDERSON, J.B; ULLRICH, R.C. Diploids of *Armillaria mellea*: synthesis, stability, and mating behavior. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 432-439, 1982.

AUER, C.G.; GOMES, N.S.B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Novas ocorrências da armilariose em *Pinus* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 2, p. 205-207, 2003.

AUER, C.G.; GOMES, N.S.B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **A armilariose em Pinus no Brasil**. Comunicado Técnico. Embrapa Florestas, Colombo, n. 117, 5p, 2004.

AUER, C.G.; SANTOS, A.F. ***Armillaria luteobubalina*: Praga Florestal Exótica**. Comunicado Técnico. Embrapa Florestas, Colombo, n. 195. 8p, 2007.

BASTOS, C.N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 286-288, 2005.

BAUMGARTNER, K.; COETZEE, M.P.A.; HOFFMEISTER, D. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 515-534, 2011.

BERUBE, J. A.; DESSUREAULT, M. Morphological studies of the *Armillaria mellea* complex: two new species, *A. gemina* and *A. calvescens*. **Mycologia**, v. 81, p. 216-225, 1989.

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.

BLOOMFIELD, B.J.; ALEXANDER, M. Melanins and resistance of fungi to lysis. **Journal of Bacteriology**, v. 93, n. 4, p. 1276-1280, 1967.

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**, v. 142, n 2, p. 89-96, 1998.

BUTLER, M.J.; DAY, A.W.; HENSON, J.W.; MONEY, N.P. Pathogenic properties of fungal melanins. **Mycologia**, v. 93, n. 1, p. 1-8, 2001.

CAIRNEY, J.W.G., JENNINGS, D.H.; VELTKAMP, C.J. Structural differentiation in maturing rhizomorphs of *Armillaria mellea* (Tricholomatales). **Nova Hedwigia** , v. 46, p. 1-25, 1988.

CAIRNEY, J.W.G. Translocation of solutes in ectomycorrhizal and saprotrophic rhizomorphs. **Mycological Research** , v. 96, n. 2, p. 135-141, 1992.

CASTELLANI, A. The "water cultivation" of pathogenic fungi. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 283-284, 1963.

CHA, J. Y. ; SHIBUY, A. M.; AJIMA, T.Y.; AKAHASHI, K.T.; IGARASHI, T. **Cultural Characteristics of Biological Species of *Armillaria* from Hokkaido, Japan.** Research Bulletin of the Hokkaido University Forests, v. 54, n. 2, p. 212-222,1997.

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

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., BLOOMER, P., WINGFIELD, M.J., AND WINGFIELD, B.D. Paleogene Radiation of a Plant Pathogenic Mushroom. **Plos One** , v. 6, p.25-35, 2012.

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.

DAY, W.R. The parasitism of *Armillaria mellea* in relation to conifers. **Quarterly Journal of Forestry**, v. 21, p. 9-21, 1927.

EAMUS, D., THOMPSON, W., CAIRNEY, J.W.G.; JENNINGS, D.H. Internal structure and hydraulic conductivity of basidiomycete translocating organs. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, n.168, p. 1110-1116, 1985.

EDGINGTON, L. V., KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42-44, 1971.

FERGUSON, B.A; DREISBACH, T.T.; PARKS, C.G.; FILIP, G.M.; SCHMITT, C.L. Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 33 -4, p. 612-623, 2003.

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

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

FIGUEIREDO, M.B.; PIMENTEL, C.P.V. Métodos utilizados para conservação e fungos na micoteca da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, n. 4, p. 299-302, 1975.

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.

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.

GARRAWAY, M.O. WEINHOLD, A. R. ***Armillaria mellea* infection structures: rhizomorphs**. Berkeley University of California Press. p.122-124, 1970.

GARRAWAY, M.O.; HÜTTERMANN, A.; WARGO, P.M.; **Ontology and Physiology**. In: ***Armillaria* Root Disease**. Agricultural Handbook No. 691.Washington DC: USDA Forest Service, p. 21–47, 1991.

GARRETT, S.D. **Specialized parasites: ectotrophic root-infecting fungi**. In Pathogenic root infecting fungi, Cambridge University Press, p. 80-142, 197

GIBSON, I. A. S. A note on variation between isolates of *Armillaria mellea* (Vahl ex Fr.) Kummer. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 44, p. 123-128, 1961.

GOMES, N.S.B. **Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum*, agente causal da pinta-preta em erva -mate**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Dissertação Mestrado, 42p, 2000.

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.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Considerações sobre as espécies de *Armillaria* associadas à podridão de raízes de *Pinus elliottii* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.29, p. 167. 2004.

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) 96p, 2005.

GOMES, N.S.B.; AUER, C. G; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Crescimento *in vitro* de isolados de *Armillaria* sp. obtidos de *Pinus elliottii* var. *elliottii* sob várias temperaturas. **Summa phytopathologyca**, Botucatu, v.33 n.2, p. 135, 2007.

GRANLUND, H.I., JENNINGS, D.H; THOMPSON, W. Translocation of solutes along rhizomorphs of *Armillaria mellea*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 84, n.1, p. 111-119, 1985.

GRILLO, R., KORHONEN, K., HANTULA, J.; HIETALA, A.M. Genetic evidence for somatic haploidization in developing fruit bodies of *Armillaria tabescens*. **Fungal Genetic Biology**, v. 30, p. 135–145, 2000.

GUILLAUMIN, J.J., MOHAMMED, C.; BERTHELAY, S. ***Armillaria* species in the northern temperate hemisphere**. In: Proc. 7th Int. Con. Root and Butt rots, August

9-16, 1988, Vernon and Victoria, BC, Canada. Ed. by Morrison D. J. Victoria: IUFRO. p.27-43, 1989.

GUILLAUMIN, J.J.; PIERSON, J., GRASSELY, C. The susceptibility to *Armillaria mellea* of different *Prunus* species used as stone fruit rootstocks. **Scientia Horticulturae**, v. 46, n. 1-2, p. 43-54, 1991.

GUILLAUMIN J.J., PIERSON J. **Inoculation of two stocks of *Prunus mahaleb* by *Armillariella mellea*** . Incidence of grafting and wounds. *Annales de Phytopathologie*, v. 9, p.533, 1977.

HARTIG, R. **Agaricus (*Armillaria*) melleus L. In Wichtige krankheiten der waldbäume**. Beiträge zur mycologie und phytopathologie für botaniker und forstmänner. Verlag von Julius Springer, Monbijouplatz 3, Berlin. [In German] English translation by M. William, D.H. Lambert and W. Liese, 1974.

HINTIKKA, V. A note on the polarity of *Armillariella mellea*. **Karstenia**, v.13, p. 32–39, 1973.

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

JENNINGS, D.H.; Translocation of solutes in fungi. **Biological Review**, v. 62, p. 215-243, 1987

KEČA, N. Characteristics of *Armillaria* species development and their growth at different temperatures. **Bulletin of the Faculty of Forestry**, v. 91, p. 149-162, 2005.

KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. **Doenças dos pinheiros** . In: Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. ed. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, c. 56, p.517-522, 2005.

KORHONEN, K. AND HINTIKKA, V. Cytological evidence for somatic diploidization in dikaryotic cells of *Armillariella mellea*. **Archives of Microbiology**, v. 95, p. 187–192, 1974.

KORHONEN, K Infertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. **Karstenia**, v.18, n. 2, p.31-42, 1978.

KUO, M.J.; ALEXANDER, M. Inhibition of the lysis of fungi by melanins. **Journal of Bacteriology** , v. 94, n. 3, p. 624-629, 1967.

LAMOURE, D. Le cycle caryologique des *Armillaires* du groupe *mellea*. **European Journal of Forest Pathology** , v. 15, p. 288–293, 1985.

LEITE, C.. Estudos biológicos em culturas de *Panus* Fr. (Basidiomycetes) no Rio Grande do Sul, Brasil. **INSULA Revista de Botânica**, 20p, 1985.

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

LUISI, N., LERARIO, P., VANNINI, A., **Recent advances in studies in oak decline**. Dipartimento di Patologia Vegetale, Università, Bari, Italy, 221p,1993.

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

MALLETT, K.I. Morphology and cultural characteristics of *Armillaria* root rot pathogens in the Prairie Provinces of Canada. **Canadian Journal of Microbiology** v.30, p. 1247-1252, 1989.

MALLETT, K.I.; COLOTELO, N. Rhizomorph exudate of *Armillaria mellea*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, p.1247-1252, 1984.

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. **Mycological research**, v. 109, p.1195-207, 2005

MONEY, N.P. **Carpet Monsters and Killer Spores: A Natural History of Toxic Mold**. Oxford University Press, New York. p. 127-142, 2004.

MORRISON, D.J. Variation among British isolates of *Armillaria mellea*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 78, n. 3, p.459-464, 1982

MORRISON, D.J. Rhizomorph growth habit, saprophytic ability and virulence of 15 *Armillaria* species. **Forest Pathology** , v.34, p. 15–26, 2004.

MOTTA, J. Cytology and morphogenesis in the rhizomorph of *Armillaria mellea*. **American Journal of Botany**, v. 56, p. 610–619, 1969.

MWANGI, L. M., LIN, D. AND HUBBES, M. Identification of Kenyan *Armillaria* isolates by cultural morphology, intersterility tests and analysis of isozyme profiles. **European Journal of Plant Pathology**, v.19, p. 399- 406, 1989

NOBLES, M.K. Identification of cultures of wood-inhabiting hymenomycetes. **Canadian Journal of Botany**, v. 43, p. 1097–1113, 1965.

OTIENO W, PÉREZ-SIERRA AP, TERMORSHUIZEN A,. Characterisation of *Armillaria* isolates from tea (*Camellia sinensis*) in Kenya. **Mycologia**, v. 95, p. 160–175 ,2003.

PAREEK, M. **Structure and role of rhizomorphs of *Armillaria luteobubalina*** Thesis. University of New South Wales, Australia. 139p, 2006.

PATTON, R.F.; RIKER, A.J. Artificial inoculations of pine and spruce trees with *Armillaria mellea*. **Phytopathology**, v. 49, p. 615-622, 1959.

PEABODY, R.B., PEABODY, D.C., TYRRELL, M.G., EDENBURN-MCQUEEN, E., HOWDY, R.P., SEMELRATH, K.M.. Haploid vegetative mycelia of *Armillaria gallica* show among-cell-line variation for growth and phenotypic plasticity". **Mycologia**, v. 97, n.4, p. 777–87, 2005.

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

PEREZ-SIERRA, A.; GORTON, C. Survival of honey fungus in wood and bark chip mulches. **The Plantsman**, v. 4., p. 204-207, dec. 2005. Disponível em: <<https://www.rhs.org.uk/science/pdf/plant-health/survival-of-honey-fungus-in-wood-and-bark-chip-mul>>. Acessado em: 05 novembro 2014.

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, 21p. 2009.

RAABE, R. D. Host list of the root rot fungus, *Armillaria mellea*. **Hilgardia**, Berkeley,

v. 33, n. 2, p.25-88, 1962.

RAABE, R. D. Variation of *Armillaria mellea* in culture. **Phytopathology**, v. 56, p. 1241-1244, 1966.

RAABE, R.D. Variation in pathogenicity and virulence in single spore isolates of *Armillaria mellea*. **Mycologia**. 64:1154-1159, 1972.

REAVES, J.L.; McWILLIAMS, M. **In vitro Fruiting of Armillaria Species**. The Forest Service of the U.S. Department of Agriculture. 8p, 1991.

RECH, C. Silvicultura; silvicultura apresenta evolução. **Revista da Madeira**. n.80, 2004.

RISHBETH, J. Effects of soil temperature and atmosphere on growth of *Armillaria* rhizomorphs. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.70, n.2, p. 213-220, 1978.

RISHBETH, J. Some characteristics of English *Armillaria* species in culture. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 86, n. 2, p. 213–218, 1986

ROSOT, M.A.D.; OLIVEIRA, Y.M.M. de; AUER, C.G. **Mapeamento de focos de armilarirose em plantações florestais na região sul do Brasil**. In: SEMINÁRIO SOBRE a ARMILARIOSE EM PINUS spp., 2003, Curitiba. Anais. Colombo: Embrapa Florestas, v. 1, 11p. (CD-ROM), 2003

SCHMIDT, O. **Wood and Tree Fungi: Biology, Damage, Protection, and Use**. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, p. 189, 2006.

SCHWEIGER, P., ROUHIER, H., AND SÖDERSTRÖM, B. Visualisation of ectomycorrhizal rhizomorph structure using laser scanning confocal microscopy. **Mycological Research** , v. 106, p. 349–354, 2002.

SICOLI, G., ANNESE, V., DE GIOIA, T., AND LUISI, N *Armillaria* pathogenicity tests on oaks in southern Italy. **Journal of Plant Pathology**, v. 84, p. 107-111, 2002.

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.

SILVA, F.B.; GOMES, N.S.B.; AUER, C.G. Ocorrência de armilariose em pínus tropicais na região Sul do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. Lavras, v. 32, suplemento, p.138, 2007.

SILVA, F.B. **Caracterização molecular de isolados de *Armillaria* da região Sul do Brasil**. (Dissertação de mestrado em Microbiologia – Universidade Federal do Paraná), 75p, 2009

SHAW, C. G., III; MACKENZIE, M.; TOES, E. A.H.; HOOD, L. Cultural characteristics and pathogenicity to *Pinus radiata* of *Armillaria novae-zelandiae* and *A. limonea*. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v.11, p. 6-70, 1981.

SHAW, C. G. In vitro responses of different *Armillaria* taxa to gallic acid, tannic acid, and ethanol. **Plant Pathology**, v.34, p. 594-602, 1985.

SHAW, C.G; KILE, G.A. **Armillaria root disease**. Washington: USDA Forest Service, 233p. (Agriculture Handbook n. 691), 1991

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, **Fatos e Números do Brasil Florestal**, [S.l.], [s.n.], dezembro de 2008.

STAMMER, E.E.; TOMAZ, R. **Ocorrência de fungos e bactérias fitopatogênicas no Estado do Paraná**. Curitiba: Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento/DEFIS/Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti. 91p., 1991.

STANOSZ, G.R.; PATTON, R.F.; SPEAR, R.N. Structure of rhizomorphs from Wisconsin aspen stands. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, p. 2124-2127, 1987.

STAUDE F. **Die schamme Mitteldeutshchlands inbesonderes de Hertzogthums**. Coburg, Germany: Dietz'shen Hofbuchdruckerei, 1957.

SUNG, J. M., CHA, J. Y., YI, C. G. ; HARRINGTON, T. C. Studies on strain characteristics and identification of species using mating of *Armillaria* spp. **Plant Pathology**, v. 6, p. 175-185, 1990.

THOMAS, H.E., 1934. Studies on *Armillaria mellea* (Vahl) Quel., infection, parasitism, and host resistance. **Journal of Agricultural Research**, v. 48, p. 187-218, 1934.

TOWNSEND, B.B. Morphology and development of fungal rhizomorphs. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 37, p. 222-233, 1954.

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.

VAHL. M. **Flora Danica**, v. 6, p. 109,1787.

WAHLSTRÖM, K.T., JOHANSEN, M. Structural responses in bark to mechanical wounding and *Armillaria ostoyae* infection in seedlings of *Pinus sylvestris*. **Forest Pathology**, v. 22, p. 65-76, 1992.

WANG, C.G.; BLANCHETTE, R.A.; JACKSON, W. A.; PALMER, M.A. Differences in conidial morphology among isolates of *Sphaeropsis sapinea*. **Plant Disease**, Saint Paul v. 69, n.10, p. 838-841, 1985.

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. Nomenclature, typification, the identity of *Armillaria mellea* and species differentiation. **Transactions of the British Mycological Society** , v. 78, p. 271–285, 1982.

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.

WHEELER, T.; RUSH, C.M. **Soilborne diseases**. In: Maloy, O.C. & Murray, T.D. (Eds.) Encyclopedia of Plant Pathology. New York. JohnWiley & Sons. p.935-947, 2001.

WOODWARD, S. **Responses of gymnosperm bark tissues to fungal infections**. In: Blanchette RS, Biggs AR (eds), Defense Mechanisms of Woody Plants against Fungi. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 62-75, 1992.

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