

## Notas Científicas

# Metodologia para esporulação e produção de culturas monospóricas de *Sphaeropsis sapinea*

Paula Rachel Rabelo Corrêa Basílio<sup>(1)</sup>, Celso Garcia Auer<sup>(2)</sup>, Álvaro Figueredo dos Santos<sup>(2)</sup>, Antonio Rioyei Higa<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal do Paraná, Engenharia Florestal, Av. Lothario Meissner nº. 632, Campus III, CEP 80210-170, Curitiba-PR. E-mail: pbasilio@ufpr.br, higa@ufpr.br <sup>(2)</sup>Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, Km 111, Caixa Postal 319, Colombo- PR. E-mail: auer@cnpf.embrapa.br, alvaro@cnpf.embrapa.br

**Resumo** - *Sphaeropsis sapinea* é um dos principais patógenos causadores de perdas em plantios comerciais de *Pinus spp.* Estudos de controle por resistência genética podem ser feitos pela inoculação de vários isolados monospóricos em populações de pinus e selecionando-se os indivíduos resistentes. Este trabalho descreve uma metodologia de produção de picnídios *in vitro* e culturas monospóricas de *S. sapinea*, usando um meio ágar-água (AA) com fragmentos de acículas de *Pinus taeda* esterilizadas. Quatro isolados de *S. sapinea* foram testados e os picnídios e conídios maduros foram observados após 14 dias de incubação, sob luz fria em BOD, a 25 °C. Os picnídios foram triturados em água e os conídios germinaram após duas horas de incubação em meio AA, em BOD, a 25 °C. Os conídios germinados formaram colônias que foram purificadas em meio extrato de malte-ágar e mantidas em tubos de ensaio com o mesmo meio e imersas em óleo mineral estéril para preservação. A metodologia revelou ser adequada para a produção de colônias monospóricas do fungo *S. sapinea*.

**Termos para indexação:** Inóculo, patógeno, pinus.

## Methodology for sporulation and production of monoconidial isolates of *Sphaeropsis sapinea*

**Abstract** - *Sphaeropsis sapinea* is one of main pathogens that causes losses in commercial plantations of *Pinus spp.* Studies for control based on genetic resistance can be done by inoculating different monosporic isolates on pine populations and selectioning the resistant individuals. This work describes a methodology for pycnidia production *in vitro* and *S. sapinea* monoconidial cultures, using an agar-water medium with sterile pine needles. Four *S. sapinea* isolates were tested e pycnidia and mature conidia were observed after 14 days of incubation, under continuous fluorescent light, in BOD, at 25 °C. Pycnidia were triturated in sterile water and conidia germinated after two hours of incubation in water-agar, in BOD, at 25 °C. Germinated conidia formed colonies which were purified in malt extract-agar and maintained in test tubes with the same medium, covered with sterile mineral oil for preservation. This methodology revealed to be adequated for production of monoconidial colonies of *S. sapinea*

**Index terms:** Inoculum, pathogen, pine.

### Introdução

*Sphaeropsis sapinea* (Fr.:Fr.) Dyko e Sutton (= *Diplodia pinea* (Desmaz.) J. Kickx fil.) é um importante patógeno de vários gêneros de coníferas em todo o mundo (ELDRIDGE, 1961; SWART; WINGFIELD, 1991), conhecido pelas extensas perdas que causa, principalmente em plantações comerciais de *Pinus spp.* (ZWOLINSKI et al., 1990). No Brasil, o primeiro relato da ação desse fungo ocorreu na década de 1940, durante a introdução do *Pinus radiata* no Estado de São Paulo,

juntamente com o *P. taeda* e o *P. elliottii* var. *elliottii*, porém os plantios de *P. radiata* foram totalmente dizimados pelo fungo. A partir da década de 90, novos registros têm sido feitos no Brasil, principalmente na Região Sul do Brasil (AUER; GRIGOLETTI JUNIOR, 1997).

A infecção provocada por *S. sapinea* apresenta alguns sintomas bem característicos e a doença é mais comumente chamada de “dieback” (WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1980). Pode, também, produzir cancos (KRUGNER; AUER, 1997), a morte de raízes

(WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1980) e ainda a murcha da copa (CHOU, 1987). Esse fungo pode ser encontrado como endofítico, comportando-se, na árvore, como patógeno oportunista (SWART; WINGFIELD, 1991) na condição de saprófita (LAUGHTON, 1937), podendo resultar em azulamento da madeira. A doença pode estar associada ao estresse da planta, como seca, temperaturas adversas, ou ainda, pela redução de sua resistência, quando esta sofre algum tipo de injúria como chuva de granizo ou podas (WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1980).

Dois morfotipos (A e B) foram descritos para o *S. sapinea*, baseados nas diferentes dimensões dos conídios, diferentes dimensões e morfologia das paredes conidiais (SUTTON, 1980), na aparência e taxa de crescimento das colônias, na agressividade e padrões enzimáticos (PALMER et al., 1987). O morfotipo A é caracterizado por apresentar um micélio branco a cinza-esverdeado, macio e paredes de conídios lisas, enquanto que o tipo B tem um micélio branco a escuro, prensado sobre superfície do meio e com paredes conidiais marcadas por depressões (WANG et al. 1985, 1986; PALMER et al., 1987). Um terceiro morfotipo (C) foi descrito por De Wet et al. (2003), baseado na morfologia dos esporos, RAPD e seqüências de DNA e usando técnicas de seqüenciamento de rDNA operon. Este morfotipo apresenta micélio macio e paredes lisas como o tipo A, mas com os conídios significativamente mais longos. De Wet et al. (2003) descreveu este morfotipo de isolados obtidos do Norte da Indonésia, e foi selecionado como o mais agressivo entre os três morfotipos, seguido pelo tipo "A" e depois pelo tipo "B".

Este fungo possui apenas reprodução assexuada (SUTTON, 1980), resultando em linhagens clonais dentro das populações e grande diversidade intra-específica. Assim, qualquer estudo de caracterização deste fungo e de resistência genética de hospedeiros necessita de culturas monoconidiais.

A produção de picnídios por *S. sapinea* em meios de cultura agarizados é muito demorada (acima de três meses) e irregular. Inclusive, testes com madeira de pínus autoclavada mostraram que esse tempo pode ser diminuído para dois meses (AUER, 1997), porém ainda pode ser melhorado. Por esse motivo, o presente trabalho objetivou montar um protocolo para o isolamento e produção de culturas monoconidiais de *S. sapinea* similar aos encontrados na literatura, para estudos de controle por meio da resistência genética.

Os isolados do patógeno empregados nesse estudo foram obtidos de árvores com sintomas de ataque do patógeno, coletados de *P. taeda* (São José do Ouro, RS e Rancho Queimado, SC) e *P. maximinoi* (Santa Maria do Oeste/PR) e *Pinus* sp. (Curitiba, PR). Os isolados originais foram obtidos por isolamento direto em meio de cultura ou por meio da esporulação em material mantido em câmara úmida e mantidos em placas com meio de batata-agar-dextrose-BDA (extrato de batata e ágar, 39 g; água destilada, 1.000 mL). Todos os isolados originais são mantidos na coleção do Laboratório de Fitopatologia, *Embrapa Florestas*, Colombo, PR.

Para induzir a produção de picnídios e de conídios, os isolados foram transferidos para placas contendo meio agar-água-AA (agar comercial, 20 g; água destilada 1.000 mL) suplementado com fragmentos de acículas de pínus estéreis e incubados a 25 °C, sob luz constante, conforme mencionado por De Wet et al. (2000). As acículas utilizadas foram removidas de árvores sadias de *P. taeda*, cortadas em pequenos segmentos de 1 cm de comprimento, colocadas em placas de Petri, autoclavadas, e depois recobertas com meio AA, antes da solidificação. Os picnídios formados no meio de acículas-ágar começaram a produzir conídios maduros a partir de 14 dias de incubação.

Picnídios individualizados (contendo conídios) foram colocados em tubos de ensaio com água esterilizada, triturados com estilete e misturados com ajuda de um agitador ou de forma manual. Alíquotas de 100 a 300 µl da suspensão de conídios foram tomadas com uma micropipeta, plaqueados em meio AA, e incubados por duas horas, a 25 °C. Neste período de tempo, os conídios iniciaram a germinação e a formação de hifas. Sob microscópio estereoscópio, os conídios germinados foram coletados com um estilete, transferidos para placas com meio extrato de malte-ágar-EMA (extrato de malte, 20 g; ágar comercial, 20 g; água destilada 1.000 mL), obtendo-se placas com apenas um conídio germinado. Posteriormente, as placas foram repicadas e mantidas em câmara BOD, a 25 °C, para o desenvolvimento das colônias monoconidiais.

Após a confirmação da identificação baseada na morfologia dos conídios e picnídios, de acordo com descrição de Sutton, (1980, p. 120-121), os isolados monoconidiais foram purificados em meio EMA ou meio BDA a 25 °C, no escuro.

Os isolados originais e as culturas monoconidiais de *S. sapinea* foram transferidos para tubos contendo os

meios EMA e BDA, cultivados e recobertos com óleo mineral esterilizado. No caso das culturas monoconidiais, são mantidos três repetições correspondendo a três conídios diferentes do mesmo isolado original, para fins de análise da variação intra-específica e clonal. Todas as culturas estão armazenadas em geladeira a 4 °C, para fins de preservação e formação de um banco de germoplasma que servirá para os estudos de seleção de pinus resistente a *S. sapinea*, no Brasil.

Esta metodologia mostrou-se prática e adequada para o isolamento e esporulação de culturas puras de *S. sapinea*. É um método rápido e de baixo custo para a produção de esporos do patógeno, em comparação aos comumente utilizados e que facilitará os estudos de resistência genética contra a seca de ponteiros em espécies de *Pinus*.

## REFERÊNCIAS

- AUER, C. G. Método para esporulação de *Sphaeropsis sapinea* *in vitro*. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1997, Rio de Janeiro. **Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. v. 1, p. 152.
- AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Ocorrência de *Sphaeropsis sapinea* em *Pinus* nos Estados do Paraná e de Santa Catarina. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 34, p. 99-101, 1997.
- CHOU, C. K. S. Crown wilt of *Pinus radiata* associated with *Diplodia pinea* infection on woody stems. **European Journal of Forest Pathology**, Berlin, v. 17, p. 37-39, 1987.
- DE WET, J.; BURGESS, T.; SLIPPERS, B.; PREISIG, O. D.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 557-566, 2003.
- DE WET, J.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa, Mexico and Indonesia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 2, p. 151-156, 2000.
- ELDRIDGE, K. G. Significance of *Diplodia pinea* in plantations. **Review of Applied Mycology**, Surrey, v. 41, p. 339, 1961.
- KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos pinheiros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 584-593. v. 2 - Doenças das plantas cultivadas.
- LAUGHTON, E. M. The incidence of fungal disease on timber trees in South Africa. **South African Journal of Science**, Cape Town, v. 33, p. 377-382, 1937.
- PALMER, M. A.; STEWART, E. L.; WINGFIELD, M. J. Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the North Central United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 6, p. 944-948, 1987.
- SUTTON, B. C. **Coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
- SWART, W. J.; WINGFIELD, M. J. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 8, p. 761-766, 1991.
- 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, p. 838-841, 1985.
- WANG, C. G.; BLANCHETTE, R. A.; PALMER, M. A. Ultrastructural aspects of the conidium cell wall of *Sphaeropsis sapinea*. **Mycologia**, New York, v. 78, n. 6, p. 960-963, 1986.
- WINGFIELD, M. J.; KNOX-DAVIES, P. S. Association of *Diplodia pinea* with a root disease of pines in South Africa. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 221-223, 1980.
- ZWOLINSKI, J. B.; SWART, W. J.; WINGFIELD, M. J. Intensity of dieback induced by *Sphaeropsis sapinea* in relation to site conditions. **European Journal of Forest Pathology**, Berlin, v. 20, p. 167-174, 1990.