

# CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Paula Rachel Rabelo Corrêa<sup>1</sup>, Luciano Medina Macedo<sup>2</sup>; Celso Garcia Auer<sup>3</sup>; Álvaro Figueredo dos Santos<sup>4</sup> e Antonio Rioyei Higa<sup>5</sup>

## Resumo

*Sphaeropsis sapinea* é um importante patógeno de várias espécies de *Pinus*, causando muitos prejuízos nos plantios deste gênero em todo mundo ocasionado pela seca de ponteiros. No Brasil, o primeiro relato da ação do *S. sapinea* ocorreu na década de 1940, quando plantios de *Pinus radiata* foram totalmente dizimados por *S. sapinea* no Estado de São Paulo. Considerando a possibilidade de re-introdução de *P. radiata* no Brasil e a ocorrência da seca de ponteiros, este trabalho realizou a caracterização morfológica e molecular de isolados de *S. sapinea* obtidos de cultivos comerciais, com objetivo de determinar os morfotipos isolados de cultivos comerciais, visando à organização de um mapeamento de morfotipos/isolados na região sul do Brasil. As caracterizações morfológicas e análise molecular mostraram uma divergência genética regionalizada entre os isolados, indicando a presença de mais de um morfotipo no Sul do Brasil.

## Introdução

*Sphaeropsis sapinea* (Fr.:Fr.) Dyko & Sutton (=Diplodia pinea (Desmaz.) J. Kickx.) é um importante patógeno de vários gêneros de coníferas, conhecido pelas extensas perdas que causa em plantações comerciais de *Pinus spp* em todo mundo devido à seca de ponteiros (WHITEHILL; LEHMAN.; BONELLO, 2007). Praticamente todas as espécies do gênero *Pinus* sofrem com os ataques do *S. sapinea*, mas existem diferenças entre as espécies com relação ao grau de suscetibilidade a estes ataques (BLODGETT; BONELLO; STANOSZ, 2003). *Pinus radiata* D. (Don) é considerada uma das espécies mais suscetíveis a este patógeno, sendo considerado um fator limitante da expansão dos plantios desta espécie de *Pinus* no Brasil (BASILIO et. al., 2007). Este fungo pode permanecer anos em estado assintomático em plantios de *Pinus*, podendo atacar de forma arrasadora caso estes plantios sofram algum tipo de injúria ocasionada por chuvas de granizo, ataque de insetos ou períodos prolongados de seca (STANOSZ et. al., 2007; MUNCK, et. al., 2009). Este fungo se reproduz apenas assexuadamente, sendo comum a presença de linhagens clonais apresentando diferenças no potencial de agressividade com relação ao hospedeiro (DE WET et. al., 2003; EVIDENTE et. al., 2006). Assim, estratégias de prevenções e controle da doença dependem da identificação através da caracterização morfológica e molecular dos morfotipos presentes nos plantios de *Pinus* (BASILIO et. al., 2007). Considerando a possibilidade de re-introdução de *P. radiata* no Brasil e a ocorrência da seca de ponteiros, este trabalho realizou a caracterização morfológica e molecular de isolados de *S. sapinea* presentes em plantios comerciais de *Pinus* na região Sul do Brasil.

## Material e Métodos

Os isolados do fungo empregados nesse estudo foram obtidos de árvores com sintomas de seca de ponteiros, coletados em *Pinus taeda* L. e *Pinus maximinoi* H.E. Moore no período de 2006 a 2007, nos municípios de São José do Ouro (RS), Rancho Queimado (SC), Santa Maria do Oeste (PR) e Curitiba

<sup>1</sup> Primeiro Autor é Doutoranda em Silvicultura, Universidade Federal do Paraná, sala LAMEF do CIFLOMA, Paraná, PR. CEP: 80.210-170. E-mail: [pbasilio@ufpr.br](mailto:pbasilio@ufpr.br)

<sup>2</sup> Segundo Autor é Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, CEP 91.501-970. E-mail: [medinacwb@pop.com.br](mailto:medinacwb@pop.com.br)

<sup>3,4</sup> Terceiro e quarto Autores são pesquisadores da Embrapa Florestas, laboratório de Fitopatologia Florestal. Colombo, PR. CEP: 83.411-000 E-mails: [auer@cnpf.embrapa.br](mailto:auer@cnpf.embrapa.br) / [alvaro@cnpf.embrapa.br](mailto:alvaro@cnpf.embrapa.br)

<sup>5</sup> Quinto Autor é Pesquisador e Professor Adjunto de Melhoramento Florestal, Universidade Federal do Paraná, sala LAMEF do CIFLOMA, Paraná. CEP: 80.210-170. E-mail: [Higa@ufpr.br](mailto:Higa@ufpr.br).

Apoio financeiro: CAPES e CNPq

(PR), que foram identificados respectivamente como isolados SS1, SS2, SS3 e SS4. A caracterização morfológica dos isolados de *S. sapinea* foi feita em diferentes meios de cultura para observar a influência do meio no tipo de crescimento, na coloração do micélio, na aparência das colônias e na presença de diferenças entre os conídios. Os isolados foram cultivados nos meios batata-ágar-dextrose (BDA), meio extrato de malte Agar (EMA) e meio ácicula de *Pinus*-ágar (APA). Após confirmada a identificação de *S. sapinea*, com base na morfologia dos conídios e picnídios de acordo com descrição de De Wet et. al. (2003), foram cultivados isolados monospóricos seguindo metodologia descrita por Basilio et. al. (2007). A velocidade de crescimento dos isolados foi acompanhada diariamente até que as colônias atingissem os bordos das placas, onde foi avaliado também o aspecto do micélio e sua textura nos diferentes meios de cultura. Os isolados com seus respectivos isolados monospóricos foram colocados em meio APA para formação de picnídios e conídios, que foram avaliados qualitativamente quanto às diferenças de tamanho, a textura da parede e a presença de septos.

A diversidade genotípica dos isolados foi estimada usando teste de compatibilidade vegetativa. Discos com micélio-ágar dos isolados e seus monospóricos com sete a dez dias de crescimento foram transferidos para placas de *Petri* com meio Agar água (AA) a uma distância de 1 cm entre si e incubados por quatro dias em BOD, a 25° C. Estes discos foram distribuídos nas placas de *Petri* confrontando-se todos os isolados de todas as maneiras possíveis. Os isolados monospóricos foram considerados como vegetativamente compatíveis (CV) quando formava-se uma densa linha clara ou cinza com entrelaçamento micelial entre eles, e vegetativamente incompatíveis (ICV) quando se formava uma linha preta bem definida entre os isolados confrontados, com posterior formação de picnídios. A média compatibilidade foi definida quando entre os isolados formava-se uma linha fina escura com algum entrelaçamento micelial entre as amostras (BURGESS et al., 2001).

Para a caracterização molecular dos isolados, a extração de DNA foi realizada em amostras obtidas de micélio cultivado em meio BDA por meio de raspagem direta. A identificação do DNA das amostras foi realizada enumerando as amostras coletadas e isoladas em São José do Ouro (RS) de 1 a 4, as amostras de Rancho Queimado (SC) de 5 a 8, de Santa Maria do Oeste (PR) de 9 a 12 e as amostras originárias de Curitiba de 13 a 15. As culturas primárias foram representadas pelas amostras 4, 8, 12 e 15, enquanto as demais representavam diferentes isolados monospóricos oriundos destas culturas. O DNA das amostras foi avaliado em reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando onze sequências diferentes de *primers* inespecíficos (RAPD): OPA (03, 07, 16, 10); OPX (12, 13, 14, 11, 17, 19) e OPAX 19. O agrupamento dos morfotipos foi realizado pelo método Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average (UPGMA), utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os dendrogramas foram elaborados com auxílio do programa NTSYS-PC.

## Resultados e Discussão

*S. sapinea* desenvolveu-se bem nos meios BDA, EMA, AA e APA a 25 °C. Em meio BDA e EMA os isolados cresceram 9 cm em 5 dias, montante que levou 14 dias para desenvolver nos meios AA e APA. Em meio BDA as colônias apresentaram inicialmente uma coloração branca algodoad, formando aos poucos raios esverdeados, que com o passar do tempo adquiriram um tom verde-musgo a cinza-chumbo. Em meio AA e APA, os micélios apresentaram-se ralos, com coloração cinza chumbo no meio AA, e escura com aspecto gelatinoso no meio APA. A esporulação foi realizada em meio APA (BASILIO, et. al. 2007) sendo possível obter picnídios e conídios em quantidades adequadas para produção de isolados monospóricos. Os picnídios de *S. sapinea* apresentaram-se globosos e imersos, com estruturas separadas ou agregadas, enquanto os conídios permaneceram dentro do picnídio até amadurecerem e tornaram-se escuros, com tonalidade variando de marrom mostarda à marrom escuro. Os conídios jovens raramente se apresentavam septados, aumentando o grau de septação de acordo com o amadurecimento, sendo observados conídios com até dois septos.

Para a obtenção de culturas monospóricas é importante saber o tempo exato em que os conídios começaram a germinar, para que sejam repicados antes que os tubos germinativos se cruzem. Os isolados SS1 incubados por sete dias em meio APA já apresentavam picnídios, e após 14 dias alguns destes picnídios apresentaram conídios maduros. Os isolados SS2 e SS4 começaram a formar picnídios após 10 dias de incubação, apresentando conídios maduros depois de 21 dias. Os isolados SS3 formaram picnídios somente após 21 dias de incubação, apresentando estruturas maduras depois de 30 dias. Os testes realizados nesse trabalho mostraram que os conídios de *S. sapinea* iniciaram sua

germinação após 1 hora e 50 min. de incubação em meio AA. Com duas horas após o início da germinação, mais de 50 % dos conídios já estavam germinando, sendo que relatos anteriores recomendavam incubação over-night (BURGESS et al., 2001). A caracterização morfológica dos isolados indicam que o morfotipo predominante é do tipo "A", não excluindo a possibilidade de existir outros morfotipos em amostras de difícil identificação.

Os resultados do testes de compatibilidade vegetativa identificaram a existência de incompatibilidade vegetativa (ICV) entre alguns isolados, pela formação de uma linha escura indicando a ausência de contato entre as colônias e a formação de picnídios. Porém, nos isolados compatíveis observou-se a formação de um micélio claro-algodoado contínuo entre eles, que ao microscópio revelou ser um entrelaçamento das hifas na região de contato entre as colônias. Os isolados que formaram uma linha escura e rala com formação de poucos picnídios foram considerados como média compatibilidade vegetativa (MCV). Quando as placas de Petri foram mantidas por um período acima de 30 dias houve formação de picnídios entre os isolados. Os isolados SS1, SS2, SS3, SS4 e seus monospóricos comportaram-se de modo a formarem grupos locais: entre os isolados monospóricos geralmente ocorreu CV e entre os isolados originais apareceu uma linha de ICV, resultado similar ao relatado por Burgess et al. (2001).

Dentre as onze sequências RAPD avaliadas, somente uma apresentou polimorfismo para os isolados. Apesar do pequeno número de isolados avaliados, observou-se correlação da distribuição geográfica destes isolados com os grupos formados, concordando com os resultados verificados na caracterização morfológica. O dendrograma mostrou a formação de três agrupamentos com 75% de similaridade. No ramo superior principal foram reunidos os isolados coletados no Estado do Paraná (amostras 9 a 15) juntamente com um dos isolados monospóricos originário do Rio Grande do Sul (amostra 3), enquanto no ramo inferior foram agrupados os isolados originários do Estado de Santa Catarina (amostras 5 a 8), juntamente com o outro isolado oriundo do Rio Grande do Sul (amostra 4). As amostras avaliadas apresentaram uma boa estruturação genética entre seus isolados monospóricos, embora tenham sido verificadas duas situações bem peculiares e no ramo inferior reuniram-se os isolados monospóricos mais agressivos. A primeira delas é de que o isolado SS2 (amostra 8), de onde foram isolados o conjunto gênico dos monospóricos 5, 6, 7, apresentou-se como um subgrupo ligeiramente diferente de seus monospóricos, embora com a mesma similaridade média de 75%. Este comportamento do isolado 8 (SS2) pode indicar que ele possui ainda no seu conjunto original outros isolados monospóricos divergentes podendo, ser um indicativo de variabilidade intra-específica deste isolado. A segunda situação peculiar foi verificada no isolados de São José do Ouro, onde a amostra 4 (SS1) foi agrupada junto com os isolados monospóricos de Rancho Queimado, enquanto o isolado monospórico 3, isolado a partir do 4, foi agrupado junto com as amostras isoladas no Estado do Paraná. O isolado monospórico 3 de São José do Ouro se agrupou com o isolado monospórico 14 originário de Curitiba, indicando a existência de ancestralidade comum entre estas amostras, muito provavelmente de origem de uma mesma procedência exógena. A diversidade nula nas amostras coletadas em Santa Maria do Oeste pode ser considerada como uma evidência da origem clonal deste fungo dentro de povoamentos de *Pinus*, concordando com dados descritos por McDonald (1997). Os isolados monospórico 3 e 14 foram os mais patogênicos e agressivos durante os testes, enquanto que o agrupamento formado pelas amostras de 9 a 13 foi o menos agressivo dentre todos os avaliados, indicando a existência de elevada variabilidade nos isolados oriundos de Curitiba.

## **Conclusão**

Este dendrograma mostrou uma tendência clara de uma melhor estruturação entre os grupos monospóricos de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e entre os grupos monospóricos do Paraná (Santa Maria do Oeste e Curitiba), sendo identificados isolados com alta capacidade de causar lesões nos hospedeiros nos dois grandes grupos formados.

## **Referências**

BASILIO, P.R.C.; AUER, C.G.; SANTOS, A.F.dos; HIGA, A.R. Metodologia para esporulação e produção de culturas monospóricas de *Sphaeropsis sapinea*. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 54, p. 145-147. 2007.

BLODGETT, J.T.; BONELLO, P.; STANOSZ, G.R. An affective medium for isolating *Sphaeropsis sapinea* from asymptomatic pines. *Forest Pathology*, v. 33, p. 395-404, 2003

BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Simple sequence repeat (SSR) markers distinguish between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n.1, p. 354-362. 2001.

DE WET, J.; BURGESS, T. SLIPPERS, B. PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINFIELD, M. 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, n. 5, p. 557-566. 2003.

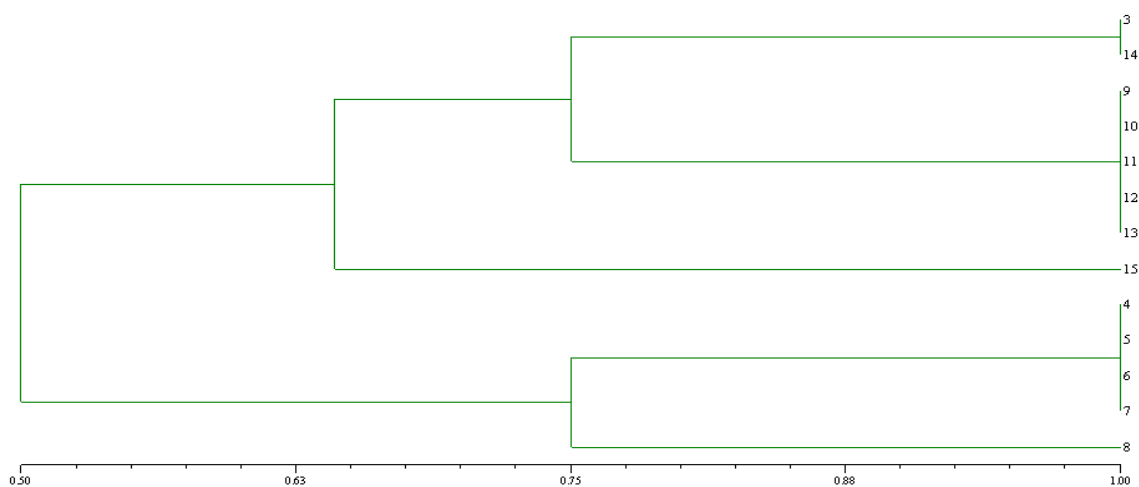
EVIDENTE, A.; FIORE, M.; BRUNO, G.; SPARANO, L.; MOTTA, A. Chemical and biological characterisation of sapinopyridione, a phytotoxic 3, 3, 6-trisubstituted 2, 4-pyridione produced by *Sphaeropsis sapinea*, a toxigenic pathogen of native and exotics conifers, and its derivatives. *Phytochemistry*, v. 67, p. 1019-1028, 2006.

MCDONALD, B.A. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology*, Lancaster, v. 87, n. 4, p. 448-453. 1997.

MUNCK, I.A.; SMITH, D.R.; SICKLEY, T.; STANOSZ, G.R. Site-related influences on cone-borne inoculum and asymptomatic persistence of *Diplodia* shoot blight fungi on or in mature red pines. *Forest Ecology and Management*, v. 257, p. 812-819. 2009.

STANOSZ, G.R.; SMITH, D.R.; LEISSO, R. *Diplodia* shoot blight and asymptomatic persistence of *Diplodia pinea* on or in stem of jack pine nursery seedlings. *Forest Pathology*, v. 37, 145-154. 2007.

WHITEHILL, J.G.A.; LEHMAN, J.S.; BONELLO, P. *Ips pini* (Curculionidae: Scolytinae) is a vector of the fungal pathogen, *Sphaeropsis sapinea* (Coelomycetes), to Austrian pines, *Pinus nigra* (Pinaceae). *Environmental Entomology*, v. 36, n.1, p. 114-120. 2007.



**Figura 1.** Dendrograma da divergência genética a partir do índice de similaridade de Jaccard. Os números correspondem aos isolados monospóricos: SS1 (4) com o isolado monospóricos 3 (isolados 1 e 2 ausentes\*); SS2 (8) com os isolados monospóricos 5, 6 e 7; SS3 (12) com os isolados monospóricos 9, 10 e 11; SS4 (ausente\*) com os isolados monospóricos 13, 14 e 15.

\*: Não foi possível isolar DNA destes isolados.