

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA RACHEL RABELO CORRÊA BASILIO

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR
DE ISOLADOS DE *Diplodia pinea*

Curitiba
2013

PAULA RACHEL RABELO CORRÊA BASILIO

CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR
DE ISOLADOS DE *Diplodia pinea*

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-orientadores:

Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Profa. Dra Chirley Glienke

Curitiba
2013

Ficha catalográfica elaborada por Denis Uezu – CRB 1720/PR

Basilio, Paula Rachel Rabelo Corrêa

Caracterização morfofisiológica, patogênica e molecular de isolados de *Diplodia pinea*/ Paula Rachel Rabelo Corrêa Basilio. – 2013
86 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientadores: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos
Profa. Dra Chirley Glienke

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 29/08/2013.

Área de concentração: Silvicultura.

1. Pinheiro – Doenças e pragas. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. *Pinus elliottii*. 4. *Pinus taeda*. 5. Teses. I. Auer, Celso Garcia. II. Santos, Álvaro Figueredo dos. III. Glienke, Chirley. IV. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. V. Título.

CDD – 632.4

CDU – 632:582.475.4



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

PARECER
Defesa n.º 988

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) *Paula Rachel Rabelo Corrêa Basilio* em relação ao seu trabalho de tese intitulado "**CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA, PATOGÊNICA E MOLECULAR DE ISOLADOS BRASILEIROS de *Diplodia pinea***", 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. Lucimeris Ruaro
Universidade Federal do Paraná
Primeiro examinador

Dr. Bárbara Eckstein
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Segundo examinador



Dr. Ida Chapaval Pimentel
Universidade Federal do Paraná
Terceiro examinador

Dr. Antonio Rloyei Higa
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 2013.

Antonio Carlos Batista
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Jorge Luis Monteiro de Matos
Vice-coordenador do curso

DEDICATÓRIA

À minha família pelo carinho e confiança,

OFEREÇO

Aos meus queridos filhos
Flávio Augusto,
Ana Carolina e
Ana Paula,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por ter permitido esta graça na minha vida e iluminado meu caminho, não permitindo que eu me desviasse do meu objetivo e providenciado para meu convívio com companheiros e amigos maravilhosos, que tanto me ajudaram na realização deste trabalho, em especial:

Ao professor Dr. Celso Garcia Auer pela orientação, incentivo e amizade.

Ao professor Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, pelas orientações e apoio.

Ao professor Dr. Antonio Rioyey Higa, ao qual tenho um grande respeito e carinho.

À professora Dra. Chirlei Glienke, pelas suas orientações e paciência.

Ao Dr. Edilson Batista de Oliveira pelo seu carinho e amizade.

As companheiras e amigas da BiogenomiKa pelo apoio e carinho: Dra. Juliana Zanetti Ribeiro, Dra. Danielle Stringari, Dra. Milena Lima e Dra. Juliane Mercer.

Aos meus amigos Dra. Juliana Bittencourt e Dr. Luciano Medina pelo apoio e confiança.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas pelo carinho e auxílio nas tarefas diárias, meus sinceros agradecimentos: Caroline, Davi, Ma. Francine Bontorin, Me. Bruno Schultz, Me. Pedro Monteiro, Me. José Sbravatti, Ma. Karen Bora e mestranda Etienne Winagraski

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Genética da UFPR (LABGEN), Lisandra Maba e Ma. Caroline e Ma. Juliana Marta, Dra. Josiane

Figueredo, e especialmente ao Me. Rodrigo Aluizio pelo auxilio e pela paciência comigo.

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

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

À Embrapa Florestas pelo apoio neste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Diplodia pinea é um patógeno que causa doença em vários gêneros de coníferas e perdas em plantações comerciais de *Pinus* devido à seca de ponteiros. *D. pinea* se reproduz apenas assexuadamente, sendo comum a presença de linhagens clonais (morfortipos A e C) apresentando diferenças no potencial de agressividade com relação ao hospedeiro. Diante da importância econômica do gênero *Pinus* para o Brasil e no potencial do *D. pinea* em causar danos nesse gênero, o objetivo deste estudo foi efetuar uma caracterização morfofisiológica, patogênica e molecular de 20 isolados de *D. pinea* obtidos das regiões Sul e Sudeste do Brasil. O aspecto micelial dos isolados foi avaliado em placas com meio BDA e EMA, a temperatura ótima de crescimento dos isolados, em meio BDA e a esporulação em meio APA, nas temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 °C. Foram avaliados 100 conídios por isolado quanto às dimensões, número de septos, espessura e aspecto da parede, sob microscópio ótico e eletrônico de varredura. Avaliou-se, também, a parede dos conídios quanto à presença de perfurações. A agressividade dos isolados foi avaliada em mudas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* var. *elliottii*. A caracterização molecular dos isolados foi realizada através do sequenciamento da região ITS1--5,8S—ITS2 do rDNA. Os isolados apresentaram em meio BDA e EMA micélio algodoado inicialmente branco mudando-se para cinza chumbo. Os conídios avaliados apresentaram dimensões entre 30-39,9 x 12,9-16,5 µm de largura, principalmente sem septos ou uniseptados. A microscopia eletrônica revelou conídios com parede lisa e sem a presença de pontuações, típica para o morfotipo A. O crescimento dos isolados foi verificado de 12 a 36 °C e a formação de picnídios de 12 a 32 °C, mas os conídios maduros foram observados a 20, 24 e 28 °C. O isolado B11 foi o mais agressivo nas duas espécies de *Pinus* testadas e a existência de interação foi verificada entre isolados e espécies de *Pinus*. O sequenciamento formou um clado monofilético agrupando os isolados de *Diplodia pinea*. Os resultados indicam que os isolados pertencem ao morfotipo A de *D. pinea*.

Palavras-chave: agressividade, morfotipo, *Pinus*, seca de ponteiro

ABSTRACT

Diplodia pinea is a known pathogen that causes disease in several genera of conifers and extensive losses in commercial plantations of *Pinus* due to tip blight. *D. pinea* only reproduces asexually, being common the presence of clonal lineages (A and C morphotypes) that differ in potential with respect to the host aggressiveness. Given the economic importance of the genus *Pinus* in Brazil and the ability of the pathogen to cause damage, the aim of this study was to perform detailed morphological, physiological, molecular and pathogenic of twenty *D. pinea* isolates obtained from Southern and Southeast regions of Brazil. Micelial appearance of isolates grown on PDA and EMA media, optimum temperature for growth on PDA medium and sporulation on APA medium, were evaluated at temperatures of 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 °C. Dimensions, number of septa, wall thickness and appearance were evaluated in 100 conidia per isolate under light microscope. It was also evaluated the wall of conidia by the presence of perforations. The aggressiveness of isolates was performed on seedlings of *Pinus taeda* and *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Molecular characterization of the isolates was performed by sequencing the ITS1 - 5, 8S-ITS2 rDNA. Isolates showed cottony mycelium on PDA, initially white changing to dark gray. The conidia showed dimensions of 30–39.9 x 12.9–16.5 µm, especially without septa or with one septa. The electron microscopy revealed conidia with smooth wall without the presence of pitting, typical for morphotype A. Growth of isolates was observed from 12 to 36 °C, and pycnidia were formed from 12 to 32 °C, but only mature conidia were observed in 20, 24 and 28 °C. B11 isolate was the most aggressive and interaction was verified between isolates and *Pinus* species. The sequencing formed a monophyletic clade grouping the *Diplodia pinea* isolates. Results indicate that isolates belong to morphotype A of *D. pinea*.

Keywords: aggressiveness, morphotype, *Pinus*, shootblight.

Title: Morphological, Physiological, Pathogenic and Molecular Characterization of *Diplodia pinea*

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|---|----|
| FIGURA 1 | MAPA DA DISTRIBUIÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA DE MATERIAIS DOENTES COM <i>Diplodia pinea</i> | 39 |
| FIGURA 2 | VARIAÇÃO CULTURAL DOS ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> CULTIVADOS EM MEIO BDA E EMA E INCUBADOS POR 20 DIAS, A 24 °C. A (DP13) B (E11), C (DP10) CULTURAS TÍPICAS EM MEIO BDA E EMA. D- (B11) MICÉLIO CINZA ESVERDEADO EM BDA. E- (G12) MICÉLIO COM BORDAS LOBADAS EM MEIO BDA E EMA. E- (DP8) MICÉLIO PRETO PENSADO EM EMA..... | 52 |
| FIGURA 3 | PICNÍDIOS DE ISOLADOS DE <i>D. pinea</i> . A- PICNÍDIOS EM LENHO DE <i>Pinus</i> AUMENTO DE 20X. B. PICNIDIO COM OSTÍOLO (SETA BRANCA). AUMENTO DE 450X. C- FORMAÇÃO DE PICNIDIOS (SETA BRANCA) SOBRE ACÍCULAS EM MEIO APA (AUMENTO DE 40 X)..... | 53 |
| FIGURA 4 | CONÍDIOS IMATUROS DE <i>Diplodia pinea</i> . A-CONÍDIO HIALINO. B E C- ESPESSURA DAS PAREDES DOS CONÍDIOS (AUMENTO DE 200 X)..... | 54 |
| FIGURA 5 | CONÍDIOS MATUROS DE <i>Diplodia pinea</i> A-CONÍDIOS MARRONS ESCUROS (AUMENTO DE 200 X) B- CONÍDIOS MARRONS ESVERDEADOS (AUMENTO DE 200 X). C-CONÍDIO OBLONGO (AUMENTO DE 200 X). D- CONÍDIO COM BASE TRUNCADA (AUMENTO DE 400 X)..... | 54 |
| FIGURA 6 | CONÍDIOS MATUROS DE <i>Diplodia pinea</i> . A-CONÍDIO SEM SEPTO. B- CONÍDIO COM UM SEPTO. C- CONÍDIO COM DOIS SEPTOS. D- CONÍDIO COM TRÊS SEPTOS. E- CONÍDIO COM VÁRIOS SEPTOS (AUMENTO DO 400X)..... | 55 |
| FIGURA 7 | CONÍDIOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (M.E.V). À ESQUERDA CONÍDIO DO ISOLADO F-12, NO CENTRO CONÍDIOS DO ISOLADO F-11, À DIREITA CONÍDIOS DO ISOLADO DP-8..... | 58 |
| FIGURA 8 | MORTE DE PONTEIRO DE MUDAS DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADAS COM <i>Diplodia pinea</i> | 67 |
| FIGURA 9 | ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> PELA INFERÊNCIA BAYSIANA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS ITS1 -5.8S-ITS2 rDNA. OS VALORES DOS RAMOS REPRESENTAM AS PROBABILIDADES POSTERIORES..... | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| TABELA 1 | DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E HOSPEDEIROS DE <i>Diplodia pinea</i> | 28 |
| TABELA 2 | PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> | 41 |
| TABELA 3 | CÓDIGO DAS SEQUÊNCIAS REFERÊNCIAS UTILIZADAS NO SEQUENCIAMENTO..... | 50 |
| TABELA 4 | DIMENSÕES (VARIAÇÃO E MÉDIA) DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> | 56 |
| TABELA 5 | CRESCIMENTO MICELIAL FINAL (MM) DE 20 ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> SOB DIFERENTES TEMPERATURAS EM MEIO BDA APÓS 3 DIAS..... | 60 |
| TABELA 6 | ANÁLISE DE REGRESSÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL 20 ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> EM MEIO BDA SOB DIFERENTES TEMPERATURAS..... | 61 |
| TABELA 7 | TEMPO DECORRIDO PARA DESENVOLVIMENTO DE PICNÍDIOS NOS 20 ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS EM MEIO APA..... | 63 |
| TABELA 8 | TEMPO DECORRIDO PARA FORMAÇÃO DE CONÍDIOS MATUROS NOS 20 ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> EM DIFERENTES TEMPERATURAS EM MEIO APA..... | 64 |
| TABELA 9 | LESÕES (CM) EM MUDAS DE <i>Pinus taeda</i> E <i>Pinus elliottii</i> var <i>elliottii</i> INOCULADAS COM ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> OBTIDOS DE <i>Pinus</i> | 66 |
| TABELA 10 | REISOLAMENTO DE <i>Diplodia pinea</i> EM MUDAS INOCULADAS DE <i>Pinus taeda</i> E <i>Pinus elliottii</i> var <i>elliottii</i> | 68 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-----------|--|----|
| GRÁFICO 1 | APRESENTAÇÃO DOS TRÊS GRUPOS FORMADOS PELA VARIAÇÃO MÉDIA DOS COMPRIMENTOS DOS ISOLADOS DE <i>D. pinea</i> . INTERVALO DE CONFIANÇA GRUPO1 (0,35%), GRUPO 2 (0,118%) E GRUPO 3 (0,095%)..... | 57 |
|-----------|--|----|

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 16 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 16 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 3.1 | HISTÓRIA DA TAXONOMIA DE <i>Diplodia pinea</i> | 17 |
| 3.2 | TAXONOMIA DOS MORFOTIPOS DE <i>Diplodia pinea</i> | 20 |
| 3.3 | CARACTERIZAÇÃO DE <i>Diplodia pinea</i> | 25 |
| 3.4 | HOSPEDEIROS E DISTRIBUIÇÃO DE <i>Diplodia pinea</i> | 27 |
| 3.5 | SINTOMATOLOGIA DE <i>Diplodia pinea</i> | 29 |
| 3.6 | IMPACTOS ECONÔMICOS DE <i>Diplodia pinea</i> | 32 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 4.1 | OBTENÇÃO DOS ISOLADOS..... | 39 |
| 4.2 | OBTENÇÃO DE CULTURAS MONOSPÓRICAS..... | 41 |
| 4.3 | CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> | 42 |
| 4.3.1 | Avaliação cultural das colônias em diferentes meios de cultura..... | 42 |
| 4.3.2 | Características dos picnídios e conídios em microscópio ótico..... | 42 |
| 4.3.3 | Análise das características conidiais por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura..... | 44 |
| 4.4 | CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> | 44 |
| 4.4.1 | Efeito da temperatura no crescimento micelial..... | 44 |
| 4.4.2 | Efeito da temperatura na esporulação..... | 45 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> EM MUDAS DE <i>Pinus taeda</i> E <i>Pinus elliottii</i> var <i>elliottii</i> | 46 |
| 4.6 | CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR..... | 48 |
| 4.6.1 | Extração de DNA..... | 48 |
| 4.6.2 | Sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS4 do rDNA e purificação..... | 49 |
| 4.6.3 | Edição e análise das sequências..... | 49 |
| 4.6.4 | Análise taxonômica..... | 50 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> | 51 |
| 5.1.1 | Avaliação morfológica das colônias em diferentes meios de cultura.. | 51 |
| 5.1.2 | Características dos picnídios e conídios em microscópio ótico..... | 53 |
| 5.1.3 | Características conidiais por meio de Microscópio Eletrônica de Varredura..... | 58 |
| 5.2 | CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> | 59 |
| 5.2.1 | Efeito da temperatura no crescimento micelial..... | 59 |
| 5.2.2 | Efeito da temperatura na esporulação..... | 62 |
| 5.3 | AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> EM MUDAS DE <i>Pinus taeda</i> E <i>Pinus elliottii</i> var. <i>elliottii</i> | 65 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.4 | CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>Diplodia pinea</i> | 69 |
| 6 | CONCLUSÕES | 73 |
| | REFERÊNCIAS | 74 |

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Pinus* é plantado em escala comercial no Brasil há mais de 50 anos, sendo que os plantios mais extensos foram estabelecidos na região Sul e Sudeste, principalmente com *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Os plantios foram para atender demanda de matéria prima de qualidade nas indústrias de celulose, papel, madeira serrada, resina, indústria de MDF, e até mesmo no aproveitado como biomassa para geração de vapor e energia.

As exportações brasileiras com o gênero alcançaram, em 2013, US\$ 5,5 bilhões ampliando sua participação no superávit da balança comercial nacional de 19,1 % para 28,1 %. Desse valor, 23,4 % são produzidos com matéria prima fornecida pelos plantios comerciais de pinus e corresponde a um plantio de 1,6 milhões de ha de florestas comerciais (ABRAF, 2013).

As principais doenças que atacam os plantios de *Pinus* no Brasil são a armilariose provocada por *Armillaria* sp., e a seca de ponteiro causada por *Diplodia pinea* (FERREIRA, 1989).

A seca de ponteiro é provocada pelo fungo *Diplodia pinea* (Desm.)J. Kickx(ex *Sphaeropsis sapinea* (Fr.)Dyko & B. Sutton). No Brasil, os primeiros relatos dessa doença em *Pinus*, segundo Ferreira (1989) ocorreram na década de 1940, durante a introdução de *Pinus radiata* D. (Don) no estado de São Paulo, e os poucos relatos apontaram que foram totalmente dizimados pelo patógeno *D. pinea*. Contudo, nessa ocasião não foram realizados estudos para caracterizar o patógeno ou trabalhos dirigidos à seleção de materiais resistentes no Brasil. A seca de ponteiro é uma doença que tem pouca expressão no Brasil, e por esse motivo, poucas informações sobre a doença e o patógeno são disponíveis no país.

No entanto, devido à importância econômica desse patógeno e por conta das extensas perdas provocadas em plantios de *Pinus* comerciais no exterior, os principais estudos estão sendo realizados visando o controle ou a prevenção da doença.

Os sintomas típicos da doença são a seca de ponteiro e o declínio além do azulamento da madeira (DICK, 1999). Seca de ponteiro é uma doença que ocorre em árvores adultas em plantios já estabelecidos, sendo favorecida

quando os plantios são realizados em sítios pobres, sujeito à chuva de pedra, secas persistentes ou ataque de insetos (SWART; WINGFIELD, 1991; BLODGETT; KRUGER; STANOSZ, 1997; SMITH; WINGFIELD; COUTINHO, 2002). O patógeno causa também amarelecimento e necroses nas acículas jovens e frequentemente mata os brotos jovens que surgem no início da primavera (FLOWERS *et al.*, 2001).

Quanto à caracterização, as principais características usadas são a dimensão dos conídios, largura das paredes dos conídios, bem como no aspecto e taxa de crescimento dos micélios e sua agressividade. No entanto, as diferenças morfológicas tornaram-se mais importantes ao se evidenciar que elas eram acompanhadas por diferenças na forma de dispersão dos esporos, na agressividade aos hospedeiros e na distribuição geográfica onde os morfotipos do patógeno eram isolados (DE WET *et al.*, 2002). Portanto, ficou evidente a importância em identificar corretamente os morfotipos dos isolados envolvidos nas infecções, antes de recomendar as estratégias de manejo para controle do *D. pinea*, por isso, um grande esforço entre vários pesquisadores está sendo feito nesse sentido, principalmente nos EUA.

No entanto, identificar os morfotipos baseado nas características culturais pode não ser uma tarefa fácil e até mesmo possível, quando se trata deste fungo, pela grande variação que ele pode apresentar quando cresce em diferentes meios de cultura e em diferentes condições ambientais (WANG *et al.*, 1985).

Praticamente todas as espécies do gênero *Pinus* são atacadas por *D. pinea*, mas existem diferenças entre as espécies com relação ao grau de suscetibilidade a estes ataques (BLODGETT; BONELLO, 2003). *P. radiata* é considerada uma das espécies mais suscetíveis ao *D. pinea*. Esse patógeno, segundo Shimizu (2001), dizimou os plantios desta espécie de *Pinus* no Brasil. *P. radiata* foi introduzido com sucesso na Austrália, Nova Zelândia e Espanha, sendo, também, a exótica mais plantada, na Argentina, Chile, Uruguai, Kênia e África do Sul, totalizando seus plantios, ao redor do mundo, em quatro milhões de hectares (ROGERS, 2002).

Em todos os aspectos, técnicos e comerciais, o Brasil apresenta histórico florestal favorável e existe uma boa adaptação do *P. radiata* no

Hemisfério Sul, o que justificou o interesse de empresas florestais brasileiras pelo plantio dessa espécie florestal (BASILIO, 2008)

Considerando a possibilidade de reintrodução de *P. radiata* no Brasil e a ocorrência da seca de ponteiros, foram realizados trabalhos por Corrêa *et al* (2011, 2012) com objetivo de caracterizar quatro isolados de *S. sapinea* da região Sul do Brasil e avaliar a sua agressividade em mudas de *P. radiata*, visando à seleção precoce de material resistente ao fungo *D. pinea*. Diante dos resultados desses trabalhos entendeu-se que havia necessidade de se aprofundar na caracterização do patógeno aumentando o número de isolados, a abrangência da área de coleta e aumentando as variáveis a serem avaliadas.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização morfológica, fisiológica, patogênica e molecular de isolados brasileiros de *Diplodia pinea*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a morfologia de culturas de *Diplodia pinea* em diferentes meios de cultura;
- Caracterizar as estruturas reprodutivas e avaliar a esporulação de *Diplodia pinea* em diferentes temperaturas
- Avaliar a ação patogênica dos isolados de *Diplodia pinea* em mudas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* var. *elliottii*
- Realizar análise taxonômica e variabilidade dos isolados de *Diplodia pinea*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HISTÓRIA DA TAXONOMIA DE *Diplodia pinea*

Desde sua primeira descrição como *Sphaeria pinea* Desm. em 1842 por Desmazières (WATERMAN, 1943) esse fungo foi renomeado pelo menos 10 vezes, sendo que o nome mais comum é *Diplodia pinea* (PUNITHALINGAM; WATERSTON, 1970). Em 1867, Kickx classificou esse fungo como *Diplodia pinea* (Desm) Kickx (WATERMAN, 1943). Petrak e Sydow¹ (citado por DE WET *et al.*, 2003), alguns anos depois, propuseram que o nome fosse trocado para *Macrophoma pinea* (Desm.). No entanto, em 1961, Petrak² (citado por DE WET *et al.*, 2003) achou que o nome *M. pinea* era muito semelhante com *M. pinea* Pass. (= *Dothiorella pinea* (Pass)) e o renomeou para *M. sapinea* (Fr), fatos relatados em (PHILLIPS *et al.*, 2005). Punithalingam e Waterston (1970) consideraram *D. pinea* como sinônimo de *M. pinea* e *M. sapinea*, no CMI descrição de fungos e bactérias patogênicas.

O ponto de discordância decai sobre o gênero em que fungo deve residir: se no gênero *Sphaeropsis* como *Sphaeropsis sapinea* ou no gênero *Diplodia* como *D.pinea*. A separação dos gêneros foi apresentada por Sutton (1980) no livro *The Coelomycetes*, baseando-se principalmente em características morfológicas das células conidiogênicas e dos conidióforos. De acordo com Sutton (1980) ambos *Diplodia* e *Sphaeropsis* pertencem à subordem Blastopycnidinea, mas enquanto *Diplodia* tem conidióforos e células conidiogênicas que forma um conídio simples monoblástico, *Sphaeropsis* não apresenta conidióforos, e as células conidiogênicas proliferam anelicamente. O gênero *Sphaeropsis* foi descrito, também, como tendo conídios que formam septos imediatamente antes da germinação e com parede interior ornamentada. Nesse gênero é comum que células conidiogênicas produzam um único conídio apical, podendo, às vezes, ocorrer proliferação percorrente produzindo um

¹ PETRAK, F ;SYDOW P. Die Gattung der Pyrenomyceten, Sphaeropsiden und Melanconieen. **Repert Spec Nov Regni Veg Beihefte**, v. 42, p. 1-551, 1927.

² PETRAK, F. Die Lecanostica Krankheit der Föhren in Österreich. **Sydowia**, v. 15, p. 252-256, 1961.

segundo conídio. O gênero *Diplodia* foi descrito como tendo conídios lisos, hialinos e asseptados quando jovens e mais tarde tornando-se marrom escuro, com um septo mediano e presença de células conidiogênicas (HILDEBRAND, 2005).

A produção de um único conídio apical foi considerada por Sutton (1980) como a principal característica para separação entre os gêneros *Sphaeropsis* e *Diplodia*. No entanto, Denman *et al.* (2000) questionaram o valor das características morfológicas dos conídios e das células conidiogênicas utilizados por Sutton (1980) para distinguir *Sphaeropsis* de *Diplodia*. Esses autores consideraram que os conceitos de idade e maturidade eram fracos para serem usados como critério de separação de espécies, uma vez que idade e maturidade podem afetar a pigmentação dos conídios. Para completar a fragilidade entre as diferenças que separam os dois gêneros Denman *et al.* (2000) e Philips (2002) relataram terem evidenciado proliferação percorrente em células conidiogênicas em *D. pinea*.

Nenhum estado sexual (forma teleomórfica) de *S. sapinea* ou *D. pinea* é conhecida e, nunca foram relatados a presença de microconídios em culturas (PALMER; NICHOLLS, 1985), mas espermiácias já foram observadas (WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1980b). No entanto, através de evidências moleculares Burgess, Wingfield e Wingfield (2001b) verificaram que *D. scrobiculata* (*Sphaeropsis sapinea*, morfotipo B) representa claramente uma fase anamórfica de *Botryosphaeria*.

Burgess, Wingfield e Wingfield (2001b) mostraram também que o morfotipo A dos isolados de *S. sapinea*, em sentido restrito, são predominantemente clonais. Por outro lado, os isolados de *D. scrobiculata*, produzem ocasionalmente esporos similares às espermiácias (PALMER; STEWART; WINGFIELD, 1987) sugerindo a presença de um estágio sexual para esse fungo. De Wet *et al.* (2003) sugerem que *D. scrobiculata* pode representar uma linhagem de *Botryosphaeria* que perdeu recentemente a capacidade de reproduzir-se sexualmente.

Teleomorfos de espécies de *Botryosphaeria* são incomuns no estado natural e as diferenças morfológicas são pequenas para diferenciar as espécies. Por isso, a diferenciação entre os gêneros é baseada principalmente nos anamorfos, que são muito variáveis.

O gênero *Botryosphaeria*, criado em 1863, sempre foi confuso. Cerca de 200 espécies são descritas para esse gênero, no entanto apenas 20 são reconhecidas. Dos 900 *Diplodia* anamorfos e /ou 160 *Fusicoccum* anamorfos, apenas alguns foram ligados aos teleomorfos (PHILLIPS, 2005; ALVES *et al.*, 2004).

De acordo com Crous *et al.* (2006) existem numerosos fungos anamorfos conidiais cujas características são intermediárias entre *Diplodia* e *Fusicoccum* e, existem diversos relatos de espécies fora do grupo *Botryosphaeriaceae* que possuem anamorfos aparentemente típicos de *Botryosphaeria strictu sensu*. Esta ampla variação é uma característica típica dos anamorfos de *Botryosphaeria* que não é acompanhada por seus teleomorfos, que tendem a serem bem conservados com ascósporos hialinos e sem septos. No entanto, alguns se tornam pigmentados (marrom) e septados com a idade (ALVES; CORREIA; PHILLIPS, 2006; PHILLIPS *et al.*, 2008). Por causa dessas espécies de *Botryosphaeria* que possuem ascósporos, que se tornam septados e marrons com a idade, muitas estão até hoje pipocando entre vários gêneros, mesmo utilizando-se ferramentas moleculares (PHILLIPS, 2002; PHILLIPS *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2008).

Phillips *et al.* (2008) resolveram separar em uma genealogia os membros de *Botryosphaeriaceae* (*Botryosphaeriales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*) utilizando análise de multigenes. Os resultados revelaram que o clado foi separado em seis gêneros incluindo *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neodeightonia*, *Barriopsis*, *Phaeobotryon* e *Phaeobotryosphaeria*. Segundo Phillips *et al.* (2008), as características morfológicas dos estados anamorfos e teleomórficos também suportaram a separação desses gêneros. Até então, *Botryosphaeria* estava restrito apenas as espécies dos anamorfos de *Fusicoccum* (PHILLIPS *et al.* 2008).

Crous *et al.* (2006) utilizando uma ampla base filogenética reconheceram dez gêneros em *Botryosphaeriaceae*. Sendo eles *Diplodia/Lasiodiplodia/Tiarosporella* (não resolvido) *Botryosphaeria* (*Fusicoccum* anamorfo), *Macrophomina*, *Neoscytalidium*, *Dothidotthia* (*Dothiorella* anamorfo), *Neofusicoccum* (teleomorfo similar a *Botryosphaeria*, sinanamorfo *Dichomera*), *Pseudofusicoccum*, *Saccharata* (anamorfo *Diplodia* e

sinanamorfo similar a *Fusicoccum*), "*Botryosphaeria*" *quercuum* (anamorfo similar a *Diplodia*) e *Guignardia* (anamorfo *Phyllosticta*).

Phillips *et al.* (2008) realizaram estudos usando abordagem através de filogenia multigênica (SSU, ITS, LSU, EF1 e β -*tubulina*) buscando obter correta posição para os teleomorfos com esporos escuros de *Botryosphaeriae* e de outras formas assexuais. Os resultados deste estudo revelaram 11 gêneros: *Diplodia*, *Neodeightonia*, *Lasiodiplodia*, *Phaeobotryon*, *Barriopsis*, *Phaeobotryosphaeria*, *Botryosphaeria*, *Dothiorella*, *Spencermartinsia*, *Neofusicoccum* e um grupo *Incertae sedis*.

A maioria das espécies (*Dothiorella*, *Neofusicoccum*, *Botryosphaeria*, *Pseudofusicoccum* e *Neoscytalidium*) tem sido reportada apenas em Angiospermas. Alguns poucos casos, como *Lasiodiplodia* spp., *Diplodia mutila* e *Diplodia seriata* em Angiospermas e Gymnospermas e apenas *D. pinea*, *D. scrobiculata* e *D. cupressi* como exclusivos de Gymnospermas (DE WET *et al.*, 2008).

Acredita-se que infecção em Gymnospermas provavelmente ocorreu recentemente por alguns grupos específicos via mudança de hospedeiro (DE WET *et al.*, 2008).

3.2 TAXONOMIA DOS MORFOTIPOS DE *Diplodia pinea*

D. pinea é um fungo que apresenta apenas reprodução sexual pertencente ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaeriales, família Botryosphaeriaceae, onde seus esporos assexuais ou conídios desenvolvem-se dentro de picnídios (WATERMAN, 1943). Os conídios são de forma oblonga para clavado com extremidades basais contundentes, ápices arredondados e desenvolvimento monoblástico via proliferação percorrente das células conidiogênicas (SUTTON, 1980). Os conídios deste fungo apresentam dimensões (largura e comprimento) que variam entre 30 a 45 μ m e 10 a 16 μ m, respectivamente (PUNITHALINGAM; WATERSTON, 1970; SUTTON, 1980).

Espermácias e espermatóforos, pequenos e hialinos independente da idade, foram relatados em culturas deste fungo por Wingfield e Knox-Davis (1980b). A presença dessas estruturas pode revelar uma redução ou perda recente do estágio sexual desse fungo (DE WET *et al.*, 2003).

Apesar de não ser conhecida a fase sexual de *D. pinea* ele é claramente reconhecido como pertencente à família Botryosphaeriaceae. Junto com outras espécies de *Lasiodiplodia*, este fungo forma uma das dez linhagens de Botryosphaeriaceae descrita por Crous *et al.* (2006). A taxonomia deste fungo tem sido complexa e confusa principalmente pela falta de clareza na distinção da descrição entre *Sphaeropsis* e *Diplodia*.

De Wet *et al* (2002) descreveram três morfotipos para o *S. sapinea*: A, B e C os quais se diferem nas características morfológicas, taxa de crescimento, características dos conídios e virulência. O morfotipo A era capaz de infectar tecidos sem injúria e com injúria e o morfotipo B necessitaria de injúria no tecido para conseguir invadir o tecido com sucesso (WANG *et al.*, 1985; PALMER; STEWART; WINGFIELD, 1987). O morfotipo C foi descrito como uma variante do morfotipo A, só que mais agressivo (DE WET *et al.*, 2002)

A identificação dos morfotipos usando características culturais não é uma atividade fácil, porque os morfotipos podem modificar seu crescimento dependendo do meio ou das diferenças ambientais a que são submetidos (WANG *et al.*, 1985; PALMER, 1991; SWART; WINGFIELD., 1991; SMITH *et al.*, 2000).

O método mais seguro para determinar morfológicamente os morfotipos A e B deve ser examinando a parede dos conídios utilizando microscopia eletrônica de varredura. Por essa metodologia percebe-se que morfotipo A e C apresentam parede lisa e o morfotipo B parede perfurada No entanto, a diferenciação entre o morfotipo A e C é bem mais sutil e difícil de ser evidenciada (DE WET *et al.*, 2002).

Devido à diferença de virulência entre os morfotipos Palmer, Stewart e Wingfield(1987) sugeriram que a identificação do patógeno deveria, sempre que possível, incluir o morfotipo.

Gerhold *et al.* (1994) buscando selecionar mudas de *Pinus resinosa* resistentes ao *S. sapinea*, prepararam suspensão utilizando inóculo provenientes de colônias monospóricas para garantir a identidade dos

morfotipos. No entanto, durante as avaliações, os autores perceberam que algumas colônias monospóricas continham dentro dos picnídios ambas os conídios do tipo A e B. Ou seja, conídios com parede lisa e também conídios com parede perfurada, sendo que os conídios de parede lisa (morfotipo A) eram mais frequentes.

Burgess, Wingfield e Wingfield (2001b) desenvolveram e testaram vários marcadores moleculares capazes de diferenciar os diferentes morfotipos de *D. pinea*. Os alelos polimórficos para todos os loci foram sequenciados para estabelecer mudanças de bases específicas que causavam polimorfismo de comprimento e também para determinar se os alelos eram idênticos por mutação ou por descendência. Esse estudo mostrou que o morfotipo I representava o estado anamorfo do fungo *Botryosphaeria obtusa* e que o morfotipo A e C eram bem mais próximos entre si do que ambos do morfotipo B, que apareceu como geneticamente o mais diverso entre os três morfotipos.

A autenticidade dos morfotipos foi sendo confirmada usando-se técnicas baseadas em DNA, como as amplificações aleatórias de DNA de restrição (RAPDs) (SMITH; STANOSZ, 1995; DE WET *et al.*, 2000), polimorfismo de tamanho de fragmentos (RFLPs) (HAUSNER *et al.*, 1999) e sequências de DNA de rRNA operon (DE WET *et al.*, 2000). Nos últimos anos técnicas como marcadores para pequenas sequências repetidas (ISSR) fingerprint e sequências simples repetidas (SSR) tem sido usadas para prover um aumento da resolução para diferenciação entre os morfotipos (ZHOU; STANOSZ, 2001; BURGESS, WINGFIELD; WINGFIELD, 2001a). Mas, segundo De Wet *et al.* (2003) essas técnicas quando aplicadas separadamente não são suficientes para comparar espécies muito próximas ou elementos da mesma espécie.

Em 2003, De Wet *et al.* utilizando-se de técnicas combinadas de múltiplos genes de codificação de proteína com loci altamente polimórficos de microssatélites (FISHER *et al.*, 2000) compararam os morfotipos de *S. sapinea*. Nesse estudo, De Wet *et al.* (2003) construíram uma genealogia de múltiplos genes a partir de sequências parciais de 6 genes codificadores de proteínas (Bt2 de b-tubulina, quitina sintetase (CHS), fator de alongação 1a (EF-1a), actina (ACT), calmodulina (CAL) e glutaraldeído-6-fosfato (GPD), e 6 loci microssatélites (SS5, SS7, SS8, SS9, SS10 e SS11) com o objetivo de elucidar

as relações filogenéticas entre os isolados dos diferentes do fungo *S. sapinea* representando seus diferentes morfotipos. Os resultados deste estudo mostraram o morfotipo B não se agrupava com o morfotipo A e C e que esses morfotipos (A e C) formavam um grupo geneticamente bem distinto. Os autores sugeriram, então, que o morfotipo B fosse descrito como uma espécie distinta e sugeriram o nome de *D. scrobiculata* (DE WET *et al.*, 2003). Além disso, o grupo concluiu que os três morfotipos A, B e C eram distintos do gênero *Botryosphaeria*, e que se comportavam idênticos ao gênero identificado como *Diplodia*, que produzem conídios elipsóides, parede densa, septados e escuros quando maduros (DE WET *et al.*, 2002).

Baseados nas evidências encontradas no estudo acima relatado, o grupo concordou com os argumentos de Denman *et al* (2000) e Philips (2002) de que proliferação percorrente e tempo de septação do *S. sapinea*, que são as características consideradas por Sutton (1980) para separar as duas espécies, não eram suficientes para separar o gênero *Sphaeropsis* do gênero *Diplodia*. O grupo sugeriu, então, a reversão para o antigo nome *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx para os morfotipos A e C.

O morfotipo tipo A é caracterizado pelo crescimento de um micélio aéreo algodoado, inicialmente branco para a cor cinza esverdeado, conídios de paredes lisas (34µm x 16 µm) em geral asseptado ou com apenas um septo. O morfotipo A esporula com mais facilidade na presença de luz (WANG *et al.*, 1985; PALMER; STEWART; WINGFIELD, 1987; DE WET *et al.*, 2002).

O morfotipo B, descrito como *D. scrobiculata* (DE WET *et al.*, 2003), tem micélio prensado na superfície do ágar, conídios (32 µm x 15 µm) com paredes pontuadas e conídios com até mais de 3 septos (WANG *et al.*, 1985; PALMER; STEWART; WINGFIELD, 1987; de WET *et al.*, 2003). O morfotipo B esporula tanto na presença de luz como no escuro.

O morfotipo C tem micélio algodoado e conídios (37 µm x 15 µm) de paredes lisas similares ao morfotipo A, mas significativamente maiores (DE WET *et al.*, 2002) e asseptados ou com um septo. Isolados do morfotipo C são também considerados mais agressivos que os isolados do morfotipo A (DE WET *et al.*, 2002).

Os morfotipos A e C podem provocar infecção em brotos jovens sem necessidade de injúria, no entanto *D. scrobiculata* necessita de uma injúria

prévia nos brotos para provocar infecção (WANG *et al.*, 1985; DE WET *et al.*, 2000).

D. pinea é bem conhecido como patógeno latente de *Pinus* e foi encontrado em todos os países onde esta espécie florestal é plantada ou é nativa (FLOWERS *et al.*, 2001). *D. scrobiculata*, foi reportado, primeiramente, como endofítico fraco em *Pinus banksiana* Lamb, coexistindo com *D. pinea* em regiões da América do Norte e Europa. Intensas coletas do fungo endofítico em árvores nativas de *P. radiata* na Califórnia (USA) sugeriam apenas a presença do fungo *D. scrobiculata* porque não foi encontrado nenhum isolado de *D. pinea*, sabidamente mais agressivo que o *D. scrobiculata*. Análises com marcadores microssatélites revelaram três populações de *D. scrobiculata* isoladas nos *P. radiata* nativos. Nessas populações foram identificados muitos alelos em comuns e com um fluxo gênico moderado entre elas. Os resultados revelaram também que as três populações californianas são distantes e distintas das populações isoladas de outros lugares.

Os resultados dos trabalhos de De Wet *et al.* (2003) indicaram um forte isolamento geográfico entre as populações de *D. scrobiculata* obtidas de várias regiões da América do Norte, com fixação de alelos únicos nas diferentes populações. Os morfotipos A e C de *S. sapinea* isolados e analisados nos trabalhos De Wet *et al.* (2003) apresentaram altos níveis de similaridade e nenhuma correlação com distribuição geográfica foi observado entre eles.

Os isolados de *D. scrobiculata* englobaram um alto grau de diversidade genética. No entanto, esses dados ainda são incipientes e necessitam de estudos mais aprofundados, incluindo uma ampla distribuição geográfica agrupando os isolados de acordo com sua origem e depois estudar como ocorreu a dispersão desses morfotipos (DE WET *et al.*, 2003).

Em 2006, Smith e Stanosz (2006) introduziram outra ferramenta molecular para o estudo de *Diplodia*. Três primers foram desenvolvidos para flanquear a pequena subunidade do ribossoma (SSU rRNA). O primer DpF/BotR produziam 700 pares de bases na presença de *D. pinea* e nenhuma banda na presença de *D. scrobiculata*. O primer DsF/BotR produziu 700 pares de base na presença de *D. scrobiculata* e nenhuma na presença de *D. pinea*. Os primers foram produzidos também para que não amplificassem DNA de *Botryosphaeria obtusa*, *B. quercum*, *B. rhodina*, *B. ribis*, *B. tsugae*, *B. mutila*, *B.*

dothidea, *Diplodia pinea* f. *sp. cupressi*. Esses primers foram produzidos de forma a não amplificarem também DNA de outros fungos comuns de serem isolados em *Pinus* como *Fusarium tricinctum*, *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Schlerophoma pythiophylla*, *Epicoccum* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotia* sp., *Trichoderma* sp., *Sirococcus conigenus* e *Pseudorobillarda* sp. (HOUSE, 2007).

O Espaço da Região Interna do rDNA nuclear (ITS) também pode ser usado para comparar vários anamorfos de *Botryosphaeria* sp. Jacobs e Rehner (1998) usaram primers ITS-4 e -5 para amplificar regiões ITS 1 e 2 de 22 linhagens de fungos Botryosphaeriaceae. Entre as linhagens comparadas nesse artigo foi *Fusicoccum* spp., *Diplodia quercina*, *Diplodia mutila*, *Sphaeropsis* sp., *Botryosphaeria* sp., *Sphaeropsis sapinea*, e *Lasiodiplodia theobromae*. Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram que as regiões ITS são úteis para distinguir entre os anamorfos. Os resultados apresentados no artigo de Jacobs e Rehner (1998) revelaram também uma tendência de *Sphaeropsis* sp. e *Diplodia* sp. para exibir conídios pleomórficos e plasticidade em cultura. Essa plasticidade já foi relatada em outros trabalhos anteriores.

Morelet e Chandelier (1993) observaram variações entre os conídios de isolados de *D. pinea* e Kay *et al.* (2002) observaram variações na taxa e forma de crescimento e na coloração do micélio. Estas variações também foram observadas por Basilio (2008) na morfologia de conídios em estudo conduzido com isolados obtidos da região Sul do Brasil.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DE *Diplodia pinea*

Diplodia pinea (Desm.) J. Kickx (sinônimo *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton morfotipo A) e *Diplodia scrobiculata* J. De Wet, B. Slippers & M.J. Wingfield (sinônimo *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton morfotipo B) são espécies de fungos que estão intimamente relacionados a um grande número de doenças em várias espécies florestais, causando secamento e morte de mudas e árvores jovens. Condições favoráveis para ocorrer infecções

com *D. pinea* são clima úmido e temperaturas altas (25 °C) coincidindo com o crescimento dos botões (SWART; KNOX-DAVIES; WINGFIELD, 1985). Este fungo pode ocorrer em regiões temperadas, semitropical e tropical, podendo ser transmitido pela semente, resultando na podridão de semente, redução de germinação, deterioração de radículas emergentes e tombamento de plântulas (REES; WEBBER, 1988; STANOSZ *et al.*, 1997).

Os morfotipos diferem entre si na especificidade ao hospedeiro e na distribuição (WANG *et al.*, 1985; SMITH; STANOSZ, 1995; STANOSZ; SMITH; MARK, 1996; BURGESS *et al.*, 2004). *D. scrobiculata* era conhecido como um patógeno de distribuição bem restrita na região central e norte dos EUA, mas nos últimos anos foi notificado também na Europa. *D. scrobiculata* foi reportado pela primeira vez como endofítico e patógeno pouco agressivo em *Pinus banksianae* e *Pinus resinosa* sendo isolado conjuntamente com o *D. pinea* (SMITH; STANOSZ, 1995). *D. pinea* morfotipo A é amplamente distribuído pelo mundo (BLODGETT; STANOSZ, 1999). O morfotipo C de *D. pinea*, foi reportado pela primeira vez em *P. patula*, na Norte da Indonésia (DE WET *et al.*, 2000).

A diversidade genotípica observada no *D. pinea* nos países do Hemisfério Sul é consistente com registros históricos da quantidade e frequência de sementes e germoplasma introduzido dentro e entre esses países. Portanto, a diversidade dentro de uma população introduzida de *D. pinea* fornece uma boa indicação do número de introduções do fungo (BURGESS; WINGFIELD, 2002).

A diversidade do *D. pinea* na África do Sul é alta e moderada na Nova Zelândia e na Austrália é muito baixa (BURGESS; WINGFIELD, 2002). Na África do sul o desmatamento e a introdução de sementes e germoplasma iniciaram-se 100 anos antes do que na Nova Zelândia e na Austrália e muitos dos genótipos foram introduzidos antes de ser obrigatório o procedimento da quarentena. Na Nova Zelândia e na Austrália, no entanto, as sementes e germoplasma foram introduzidas sob rígidas regras quarentenárias (BURGESS; WINGFIELD, 2002).

Como já relatado, os morfotipos de *D. pinea* diferem em relação a sua taxonomia, biologia e agressividade. As populações dos morfotipos também tem diferentes estruturas genéticas (BURGESS *et al.*, 2004; BIHON *et al.*,

2011). O morfotipo A é a principal espécie associada com a maioria dos *Pinus* fora de seus ambientes de origem (BURGESS *et al.*, 2004). *D. scrobiculata* quase que exclusivamente foi associado ao *P. radiata* no seu ambiente de origem (BURGESS; WINGFIELD; WINGFIELD, 2004; BURGESS *et al.* 2004).

As populações do morfotipo A tem baixa diversidade genética, pouca diferença gênica entre as populações e dividem muitos locos genotípicos entre as populações nos diferentes continentes (BURGESS; WINGFIELD; WINGFIELD, 2004; BURGESS *et al.* 2004). Isso sugere que uma longa história de reprodução assexuada e uma constante seleção foi a conexão para o sucesso do *D. pinea* como endofítico. Diante dessa hipótese, é possível que as populações do morfotipo A de *D. pinea* tenham dificuldade em vencer uma resistência do hospedeiro, portanto, seleção para resistência ao hospedeiro para esse morfotipo é considerado uma opção duradoura (BURGESS; WINGFIELD, 2002; BIHON *et al.*, 2011)

Nas populações com *D. scrobiculata*, contudo, foi observada alta diversidade alélica e nenhum loco genotípico é dividido entre as populações. A enorme distância genética observada entre as populações de *D. scrobiculata*, juntamente com uma limitada dispersão gênica, sugere uma recente história de recombinação e /ou mutação, assim como, a presença de um estágio sexual críptico. Essa separação dos morfotipos em espécies crípticas ajusta-se bem dentro do conhecimento da biologia dessas espécies (BURGESS *et al.*, 2004 ALVES, *et al.*, 2008).

3.4 HOSPEDEIROS E DISTRIBUIÇÃO DE *Diplodia pinea*

D. pinea foi reportado em pelo menos 25 países nos dois Hemisférios entre as latitudes de 30° e 50° Norte e Sul (GIBSON, 1979). Existem diferenças quanto à suscetibilidade de pinus ao *D. pinea*. *Pinus nigra* é o considerado o mais suscetível seguido pelo *Pinus sylvestris*, *Pinus mugo*, *Pinus ponderosa* e *Pinus strobus* (PATAKY, 1997). *Pinus resinosa*, *Pinus nigra*, *Pinus banksiana*, *Pinus greggii*, *Pinus sylvestris*, *Pinus halepensis*, *Pinus radiata*, *Pinus patula*

(BLODGETT; KRUGER; STANOSZ, 1997; BLODGETT; BONELLO, 2003; CHOU, 1987; FLOWERS *et al.*, 2001; SMITH; WINGFIELD; COUTINHO, 2002), *Pseudotsuga menziesii*, *Pseudotsuga macrocarpa*, *Picea abies*, *P. pungens*, *P. sitchensis*, *Abies procera*, *A. alba*, *Larix laricina* podem ser infectados (PATAKY, 1997).

Alguns outros gêneros também são suscetíveis como *Cupressus*, *Chamaecyparis*, *Thuja*, *Araucaria*, *Juniperus* e *Cedrus* (DICK, 1999) e *Araucaria angustifolia* (CORRÊA *et al.*, 2012).

Este fungo pode ocorrer em regiões temperadas, semitropical e tropical (TABELA 1), podendo ser transmitido pela semente, resultando na podridão de semente, redução de germinação, deterioração de radículas emergentes e tombamento de plântulas (REES; WEBBER, 1988; STANOSZ *et al.*, 1997).

| TABELA 1 | DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E HOSPEDEIROS DE <i>Diplodia pinea</i> | |
|------------------|--|-------------------------------|
| PAÍSES | HOSPEDEIROS | REFERÊNCIAS |
| América do Norte | <i>Pinus nigra</i> Arnold | Peterson, 1977, 1981 |
| | <i>Pinus sylvestris</i> L. | Brookhouser; Peterson, 1971 |
| | <i>Pinus resinosa</i> Ait | Palmer; Nicholls, 1988 |
| | <i>Pinus ponderosa</i> Laws | Brookhouser; Peterson, 1971 |
| | <i>Pinus banksiana</i> Lamb | Palmer; Nicholls, 1988 |
| Canadá | <i>Pinus sylvestris</i> L. | Haddow; Newman 1942 |
| América do Sul | <i>Pinus radiata</i> D. Don | Gibson, 1979 |
| | <i>Pinus halepensis</i> Mill. | Gibson, 1979 |
| Europe | <i>Pinus sylvestris</i> L. | Gibson, 1979 |
| | <i>Pinus nigra</i> | Gibson, 1979 |
| Ásia | <i>Pinus sylvestris</i> L. | Gibson, 1979 |
| | <i>Pinus nigra</i> | Gibson, 1979 |
| Austrália | <i>Pinus radiata</i> | Gibson, 1979 |
| Nova Zelândia | <i>Pinus radiata</i> | Eldridge, 1957, 1978 |
| África | <i>Pinus radiata</i> | Chou, 1976 |
| África do Sul | <i>Pinus patula</i> Schl. et Cham | Laughton, 1937 |
| | <i>Pinus radiata</i> | Wingfield; Knox-Davies, 1980a |
| | <i>Pinus taeda</i> L. | Wingfield; Knox-Davies, 1980b |
| Outros países | <i>Pinus radiata</i> | Gibson, 1979 |

FONTE: SWART; KNOX-DAVIES; WINGFIELD, 1985. ADAPTADO PELO AUTOR (2013)

3.5 SINTOMATOLOGIA DE *Diplodia pinea*

D. pinea pode sobreviver como endofítico ou saprofítico estando presente em tecido vivo ou morto das acículas, caule e ramos. Como saprófita ele pode permanecer na planta por muitos anos sem desenvolver a doença, mas a árvore ganha um tom azulado na casca que prejudica o preço de venda da madeira (DE WET *et al.*, 2000).

Em plantios de pínus, esse fungo está associado com um grande número de sintomas como necrose, seca e quebra dos ponteiros e o declínio, sendo que este último é considerado o mais comum. *D. pinea* pode ainda induzir, nas plantas atacadas, a formação de cancrios, morte de raízes e murcha da copa (HILDEBRAND, 2005; AUER *et al.*, 2001; PALMER, 1991; GIBSON, 1979; CHOU, 1978; 1987). Entretanto, existem estudos que reportam o fungo *D. pinea* como um patógeno de viveiro, reduzindo à germinação, diminuindo as radículas das mudas e provocando seca e cancro de raiz e tombamento de ponteiros (PALMER; NICHOLLS, 1985; STANOSZ; CUMMINGS CARLSON, 1996; STANOSZ; SMITH; ALBERS, 2005).

A infecção se estabelece, preferencialmente, durante os períodos úmidos com os tubos germinativos dos conídios do fungo entrando através dos estômatos das acículas nos brotos jovens em crescimento e diretamente nas hastes novas não suberificadas (CHOU, 1978; ZHOU; STANOSZ, 2002) no começo da primavera (FLOWERS *et al.*, 2001). A infecção pode se iniciar também em galhos e caules, através de ferimentos causados pela chuva de granizo, ataque de insetos, poda ou outros tipos de danos físicos.

No início, o patógeno causa amarelecimento e necroses nas acículas jovens e frequentemente causa o secamento dos brotos jovens que surgem no início da primavera. Pequenos picnídios negros se desenvolvem próximo da base das acículas, sobre as bainhas ou sobre as escamas dos cones jovens. Estes brotos jovens infectados param de crescer, tornam-se curvos e logo morrem e, após anos de infecção, grandes ramos e até mesmo toda árvore pode ser perdida (FLOWERS *et al.*, 2001). Severas e contínuas infecções retardam e comprometem o crescimento da árvore e podem matar todas as

árvores infectadas (BROOKHOUSER; PETERSON, 1971; FLOWERS *et al.*, 2001).

O patógeno sobrevive dentro de picnídios presentes nos brotos doentes do ano anterior, em cones maduros, ou como endofítico nos tecidos dos brotos de pínus (SMITH *et al.*, 1996; FLOWERS *et al.*, 2001). Os brotos são particularmente suscetíveis para o desenvolvimento da seca de ponteiro no início da primavera durante a quebra de dormência e fase iniciais de crescimento (MUNCK; STANOSZ, 2008; 2009; PETERSON, 1977).

D. pinea esporula sobre tecidos doentes, troncos e galhos. Os conídios são liberados dos picnídios, únicos corpos de frutificação conhecidos deste fungo, durante a primavera. Os picnídios parecem fundidos aos tecidos dos hospedeiros e são formados na subepiderme, posteriormente tornando-se erumpentes (PALMER; NICHOLLS, 1988; PALMER; MCROBERTS; NICHOLLS, 1988).

Quando os picnídios amadurecem, os conídios são disseminados, principalmente, por respingos de chuva (PETERSON, 1981), mas também podem se espalhar através de correntes de ar (BUTIN; PEREDO, 1986; STANOSZ, 2002). Cones não infectados são observados ao lado de cones infectados o que sugere que a doença ocorre primeiramente em cones mais velhos e contaminando depois os cones mais novos. O patógeno pode permanecer vivo durante o inverno dentro de picnídios em brotações enfermas, que são mantidas nas árvores, pelo menos parcialmente, através do fluxo de resina típico durante atividades de infecção (PALMER; MCROBERTS; NICHOLLS, 1988). O fungo pode ainda permanecer em cones maduros (PALMER; STEWART; WINGFIELD, 1987; SMITH *et al.*, 1996) ou como endofítico em tecidos jovens (FLOWERS *et al.*, 2001).

Infecções latentes de *D. pinea* ocorrem em brotações do ano em curso em pinheiros sem sintomas e, em alguns brotos, aparentemente saudáveis, do ano em curso de pinheiros doentes. As infecções latentes também ocorrem em gemas terminais assintomáticas (FLOWERS, HARTMAN. VAILLANCOURT, 2006). Depois de dois ou três anos de infecção sucessivas, os topos das árvores ficam totalmente danificados, resultando nos sintomas típicos da doença (GIESLER, 2003; PETERSON, 1977, 2005).

A gravidade da doença é significativamente maior em mudas e árvores mais velhas submetidos ao estresse, tais como: plantios estabelecidos em sítios inadequados com solos mal drenados e pouco profundos, deficiência de nutrientes ou vegetação concorrente (BLODGETT; KRUGER; STANOSZ, 1997; NICHOLLS; OSTRY, 1990; STANOSZ *et al.*, 1997).

Também são importantes no estabelecimento da doença condições ambientais propícias para a colonização do fungo como, por exemplo, chuvas fortes de verão provocando injúrias (SERNA, 2011). Na África do Sul, *D. pinea* é bem conhecido pela sua capacidade de infectar tecidos injuriados, devido ao crescente número de relatos dos sintomas provocados pelo patógeno após chuvas fortes com granizos (SWART; WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1987). No entanto, Stanosz *et al.* (1997) reportaram que este fungo é capaz de provocar, também, infecção latente em porções do caule de mudas de *Pinus resinosa* em casa de vegetação. Sob condições de viveiro, Corrêa *et al.*, (2012) relataram que mudas de *P. radiata* inoculadas com injúria, desenvolveram lesões mais extensas e severas entre os morfotipos de *D. pinea* testados. Nesse mesmo estudo, os autores constataram que a frequência de reisolamento do patógeno no estudo foi baixa: em alguns ponteiros, com lesões, o fungo não foi reisolado por nenhum dos métodos utilizados, e em outras situações, o fungo foi reisolado de ponteiros que não foram inoculados (testemunha) ou que não apresentaram lesões. Esta característica está ligada, provavelmente a capacidade do *D. pinea* de se manter na forma latente nas cascas e nos brotos, comportando-se como endofítico.

Burgess *et al.* (2004) comentaram que, como endófito, *D. pinea* foi disseminado pelo mundo, juntamente com as introduções de mudas de *Pinus*. Com base nessa hipótese, *D. pinea* pode ter sido introduzido no Brasil a partir de mudas com infecções latentes, durante as primeiras introduções de *Pinus*.

Stanosz *et al.* (1997) mostraram que as infecções latentes são bastante comuns em *Pinus* que mantem suas sementes fechadas dentro dos cones como *P. radiata* e *P. patula* (SMITH *et al.*, 1996). Nesses pinus o fungo foi recuperado, mais frequentemente, no tecido medular dos cones e das sementes, nos quais o fungo colonizava com maior facilidade. Ambos os autores especularam que esse fenômeno pode ser uma explicação para o rápido desenvolvimento da doença sob estresse.

3.6 IMPACTOS ECONÔMICOS DE *Diplodia pinea*

As doenças causadas pelo *D. pinea* correm em todo o mundo e são associadas com significativos danos econômicos em plantações de *Pinus* na Nova Zelândia, Austrália e África do sul. Praticamente todas as espécies do gênero *Pinus* são atacadas pelo fungo, mas existem diferenças entre as espécies na suscetibilidade ao ataque entre coníferas e os sintomas e a severidade da doença dependem de fatores como o morfotipo do patógeno, a espécie do pinus, presença de ferimentos e situações que favorecem os estresses (WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1980b; SWART; WINGFIELD, 1991; CEDEÑO *et al.*, 2001).

A literatura apresenta alguns impactos do ataque de *D. pinea* em florestas. Na região central e norte dos EUA houve na metade da década de 1970 uma epidemia em viveiros com *P. resinosa*, e também com *P. banksiana*. Os danos incluíram além dos sintomas típicos como seca de ponteiros e cancro da haste, grande mortalidade de mudas recém plantadas ou já estabelecidas (acima de 95 %), mas, nesse caso devido à podridão do colo (STANOSZ; CUMMINGS CARLSON, 1996). Esse surto continuou sendo notificado, inclusive em áreas onde nunca havia sido documentada. Alguma ocorrência como às epidemias verificadas nos parques do estado de Wisconsin e Florestas do Norte Highland America Legion (NHAL) que ocupa mais de 232 mil hectares no norte de Wisconsin (STANOSZ, 2002) e porções no centro norte de Michigan (STANOSZ, 2002).

Na África do Sul, *D. pinea* é considerado o principal patógeno de pinus, apesar dos esforços para reduzir o impacto econômico deste fungo neste país (SWART; KNOX-DAVIES; WINGFIELD, 1985; ZWOLINSKI; SWART; WINGFIELD, 1991). Esse patógeno tem sido reportado, também, no norte de Sumatra e Indonésia, onde causa seca de ponteiro em várias espécies de *Pinus*, incluindo desde o exótico *P. patula* até o nativo *Pinus merkusii*. As plantações de *P. patula* são comumente estabelecidas adjacentes aos povoamentos naturais de *P. merkusii* no Norte Sumatra (SMITH *et al.*, 2000; DE WET *et al.*, 2008). Estudos tem mostrado que o patógeno está presente

como infecção latente em cones maduros com três anos de idade de *P. patula* e *P. radiata* (SMITH *et al.*, 2000).

D. pinea foi reportado na Estônia, pela primeira vez, no outono de 2007, após registro de dois períodos de seca prolongada (2002 e 2006) e revelando uma dispersão do patógeno da região Sul para o Norte da Europa, seguindo a tendência geral de mudança climática (STANOSZ *et al.*, 2001). Hanso e Drenkhan (2009) revelaram, também, que durante o período de seca, ocorrida em 2003, na Europa Central, houve condições favoráveis para surto de *D. pinea*.

As doenças causadas por *D. pinea* tornaram-se comuns por causa do plantio de mudas infectadas, incrementada por fatores ambientais favoráveis e escolha inadequada dos locais de plantios. A monocultura de pínus e as áreas de ocorrência natural de *Pinus* com alta densidade de árvores favorecem o surgimento de focos insetos e de doenças. Os insetos são geralmente associados a infecções com *Diplodia* e desempenham papel importante na colonização de câmbio e tecidos saudáveis, aumentam a gravidade e impacto da infecção e acrescentando um papel importante na disseminação do fungo (WINGFIELD; PALMER, 1983; ZWOLINSKI; SWART; WINGFIELD, 1995).

Zwolinski; Swart e Wingfield (1995) fizeram importantes observações sobre a associação de *Pissodes nemorensis* e *Orthomicus erocus* com infecções de *Diplodia* após chuvas de granizo na África do Sul. Fungos oportunistas como *Diplodia* colonizam e infeccionam árvores suscetíveis após ataques de insetos. Quando o pulgão *Cinara cronarti*, ataca e estressa árvores de pinus, ocorre predisposição das árvores para serem infectadas e mortas por *D. pinea* (WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1980b).

Acidentalmente, *Leptoglossus occidentalis*, um inseto nativo da América do Norte, foi introduzido na Itália por volta de 1999 causando danos em cones de várias coníferas, principalmente no *Pinus pinea*, pinheiro nativo italiano. Esta espécie também é infectada pelo *D. pinea* e está se tornando uma ameaça cada vez maior na Itália, porque os pinheiros estão se tornando mais suscetíveis ao patógeno, como consequência, provavelmente do aquecimento global. Como o inseto e o fungo ocupam o mesmo hábitat (pinhas), parece que existe uma interação positiva entre eles, o que está facilitando a dispersão do fungo (LUCHI *et al.*, 2012).

Nos EUA, *D.pinea* é o patógeno que mais provoca danos em plantações de pinus nativos e exóticos, mas, é raramente encontrado em plantações naturais de pínus (PETERSON, 1977). Burgess *et al.* (2004) realizando intensa coleta de fungos endofíticos em árvores nativas de *P. radiata* na Califórnia (USA) constataram somente a presença do fungo *D. scrobiculata*, menos agressivo que o *D. pinea*. Sinclair *et al.* (1987) relataram a presença de *D. pinea* em plantios nativos de *P. radiata* após eventos de estresse, mas os danos foram esparsos e raramente levaram a morte das árvores. Portanto, o impacto ambiental em ambiente nativo, segundo esses autores, é baixo.

Em plantações exóticas no Hemisfério Sul, observa-se uma intensa associação de *D. pinea* com *P. radiata* comportando-se como patógeno endofítico. Essa associação não foi evidenciada em áreas nativas na Califórnia, onde apenas o fungo *D. scrobiculata* havia sido isolado (BURGESS; WINGFIELD; WINGFIELD, 2001b). Essa distorção, (encontrar apenas *D. scrobiculata*) estava sendo evidenciada por conta do baixo número de indivíduos de *P. radiata* encontrado nas populações nativas. Apesar de essa espécie florestal ser o *Pinus* exótico mais plantado no mundo, no seu hábitat de origem ela está em risco de extinção resultado de anos de desmatamento no passado, e com desafios a serem enfrentados nos dias atuais como o isolamento entre as populações, baixa taxa de regeneração devido a supressão pelo fogo, e a mortalidade acelerada das árvores remanescentes devido ao cancro resinoso provocado pelo *Fusarium circinatum* (BURGESS; WINGFIELD; WINGFIELD, 2001b)

Uma alta suscetibilidade entre as árvores remanescentes de *P. radiata* está sendo observada, consequência da limitada diversidade genética apresentada nas populações nativas, e da baixa porcentagem de árvores resistentes sobreviventes. Essa situação é um problema para a sobrevivência das populações das florestas de *P. radiata* no futuro em seu hábitat (BURGESS *et al.*, 2004).

Por conta da natureza endofítica do *D. pinea* fica difícil prever se o fungo é nativo ou se foi introduzido por atividades humanas, nos locais onde o fungo é isolado, mas acredita-se que ele está presente no *P. radiata* desde o início do seu crescimento (STANOSZ *et al.*, 1995). É de conhecimento corrente que sob estresse *P. radiata* é muito suscetível ao *D. pinea*, no Hemisfério Sul e muito

suscetível ao *Fusarium circinatum* nas áreas nativas (BURGESS *et al.*, 2004). Tal estresse proporcionaria as condições ideais para um surto associado de *D. pinea* com *F. circinatum*, por isso é crítico evitar a disseminação de *D. pinea* nos poucos remanescentes de *P. radiata* (BURGESS *et al.*, 2004).

D. pinea tem demonstrado habilidade em desenvolver linhagens mais agressivas. Caso essas linhagens sejam introduzidas nos EUA, existe potencial de danos e grande impacto econômico. Esse fungo esporula rapidamente em tecidos e restos lenhosos (HILDEBRAND, 2005). Os esporos são dispersos por vento, gotas de chuvas, transporte de toras e madeiras infectadas, sementes e mudas. *D. pinea* foi isolado do interior de um tronco de madeira que havia sido processado numa máquina totalmente limpa, borrifada com fungicidas e inseticidas e fumigada com brometo de metila e embarcada para os Estados Unidos (UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1992). Esses fatos fizeram com que o USDA Serviço Florestal, (2008) classificassem esse fungo com um alto potencial de dispersão e alto potencial de risco econômico para os EUA.

Na região leste e central dos Estados Unidos, espécies arbóreas de grande importância econômica e ecológica como *P. resinosa* e *P. banksiana* foram severamente danificadas pelo *D. pinea* (NICHOLLS; OSTRY, 1990; PALMER; NICHOLLS, 1985).

Santamaría; Smith e Stanosz,(2011) conduziram um experimento em Wisconsin para determinar a contribuição de *D. pinea* e *D. scrobiculata* na evolução da doença em *P. resinosa* e *P. banksiana* através de análises moleculares para identificação dos patógenos e para avaliar qual a contribuição de cada patógeno no desenvolvimento da agressividade do outro. O experimento foi conduzido inoculando disco de micélio ágar com as duas espécies de fungo em mudas de *P. resinosa* e *P. banksiana*. *D. pinea* mostrou-se mais agressivo que o *D. scrobiculata* e ambos foram reisolados de brotos assintomáticos, resultado semelhante obtido por Corrêa *et al.* (2011; 2012).

Condição endofítica em tecidos sadios sem causar nenhum dano pode ser associada ao estado latente do patógeno. Sob condição de estresse em diversas áreas, *D. pinea* induziu ou agravou mais rapidamente os danos na planta hospedeira. A seca, segundo Santamaría; Smith e Stanosz, (2006), foi o componente ambiental que mais predispôs para o aparecimento dos sintomas.

Quando os dois patógenos foram inoculados juntos na mesma planta houve diminuição dos sintomas apresentados pelo *D. pinea* quando comparado com a inoculação isolada, revelando um possível antagonismo entre os dois patógenos (SANTAMARÍA; SMITH; STANOSZ, 2011).

Sementes de *Pinus palustris* coletadas no campus da Universidade no estado de Mississippi mostraram que esta espécie também é suscetível ao fungo. *D. pinea* também foi relatado em plantas de *Cedrus* spp. Os primeiros relatos da presença deste fungo foram registrados em árvores nos estados americanos do Alabama, Louisiana e Mississippi (STANOSZ *et al.*, 2009).

P. nigra é nativo da região do Mediterrâneo, onde é a espécie florestal dominante. Desde sua introdução nos EUA, *P. nigra* tornou-se a conífera ornamental mais plantada no país. No entanto, a seca de ponteiro e cancro provocado pelo *D. pinea* regulam o plantio e a expansão desta espécie florestal. Mudanças e árvores adultas são infectadas em vários níveis e mortas em todas as idades em áreas de ocorrência natural nos plantios, em viveiros, áreas de escape e plantios comerciais (BLODGETT; BONELLO, 2003).

O grau de risco apresentado pelo *D. pinea* para o *Pinus taeda* e *P. palustris* e outras espécies nativas do sul dos Estados Unidos quando cultivadas em suas áreas de distribuição natural é desconhecida. No entanto, existem relatórios que mostram a presença de seca de ponteiro provocado pelo *Diplodia* em pinus nativos do sul dos EUA quando plantados como espécie exóticas no Hemisfério sul (BLODGETT; BONELLO, 2003).

A principal forma de prevenir *Diplodia* tem sido o plantio de espécies resistentes combinado com práticas silviculturais (BROOKHOUSER; PETERSON, 1971; PETERSON, 1977; SWART; KNOX-DAVIES; WINGFIELD, 1985; STANOSZ, 2002). No entanto, melhoramento genético visando obtenção de resistência é um processo longo e difícil de ser implantado em plantações florestais comerciais. Na África do Sul os plantios em áreas de risco (com chuvas intensas no verão) de indução de infecção com *Diplodia* é fortemente atado ao replantio de espécies de *Pinus* suscetíveis por espécies mais resistentes (GIBSON, 1979; BURDON; CURRIE; CHOU, 1982). A escolha do local de plantio da espécie é muito importante no manejo da doença.

Na África do Sul, por exemplo, o plantio de *P. radiata*, espécie considerada suscetível ao patógeno, segue as áreas onde ocorrem chuvas de

inverno e onde as chuvas fortes de verão são raras. Espécies suscetíveis como *P. patula* quando plantadas em áreas com maior risco de ocorrer infecção com o patógeno estão sendo trocadas por espécies mais resistentes como *Pinus elliotti* (SWART; WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1987) ou pelo *Pinus gregii* var. *gregii* (SMITH; WINGFIELD; COUTINHO, 2002).

Diversos estudos tem demonstrado que algumas espécie de coníferas possuem resistência natural ao fungo, como por exemplo o *P. pinaster* que, segundo Garcia e Diez (2003) apresenta uma boa resistência a este patógeno, confirmando que existem diferenças de suscetibilidade entre as coníferas.

O uso adequado de práticas silviculturais em conjunto com boas práticas sanitárias é essencial para prevenção e controle das doenças relacionadas com *D. pinea*. A escolha da época correta para se realizar podas nos plantios, agendando essa tarefa para quando o inóculo do fungo está baixo nos talhões e as condições de dispersão e germinação do fungo estão baixas, é uma estratégia importante, além do cuidado em não provocar feridas nas árvores durante essa atividade (SWART; KNOX-DAVIES; WINGFIELD, 1985). Pode-se diminuir o inóculo quando se retira os restos de galhos após podas e desbastes ou realizando um desbaste prematuro, onde se consegue uma diminuição da umidade nos talhões e uma menor competição por água e nutriente (GIBSON, 1979).

O uso de controle químico para controlar o *D. pinea* é mais utilizado em viveiros. Como exemplo, duas aplicações semanais decalda bordalesasão mais eficazesdo que uma única aplicação (PETERSON, 1977, 1981).É importante que o controle seja realizado nas brotações com até dois anos de idade (PALMER, 1983). Os fungicidas da família dos benzimidazóis também são indicados para controlar os surtos *D. pinea* em plantios (STANOSZ *et al.*, 1995). Para proteger madeiras estocadas do azulamento provocado pelo *D. pinea* são aspergidos DDAC (didecyl dimethyl ammonium chloride) que cria uma camada protetora que tem potencial para impedir a germinação dos esporos e sua penetração por até 10 dias (THWAITES *et al*, 2004). Nenhum químico, no entanto, protege a madeira onde o fungo já conseguiu penetrar (DE WET *et al.*, 2008).

A adubação é considerada um importante fator de influência na incidência e severidade de várias doenças. No entanto, em se tratando do *D. pinea*, a adubação não diminui o impacto do patógeno. Parece que acontece o oposto, a incidência do *D. pinea* tende a aumentar em áreas que receberam altas taxas de fertilizantes ou está com a atmosfera saturada com amônio (BLODGETT; HERMS; BONELLO, 2005). Existe uma hipótese de que o excesso de fertilização inibiria a ação do hospedeiro na produção de lignina e depósitos fenólicos, produtos importantes na defesa contra a patógeno (BLODGETT; HERMES; BONELLO, 2005).

Novos surtos da doença estão sendo reportados em espécies antes relatadas como resistentes, e ao mesmo, novas áreas nunca antes acometida pela doença estão sendo notificadas (STANOSZ, 2002; AUER *et al.*, 2011). Hipóteses estão sendo estudadas com objetivo de entender essas mudanças de comportamento patógeno, como mudança climáticas (HANSO; DRENKHAN, 2009), dispersão de linhagens mais agressivas para novas áreas (LUCHI *et al.*, 2012) e aumento de suscetibilidade do hospedeiro para as infecções do patógeno podem ser consequência de uma maior facilidade ambiental que o fungo está encontrando para desenvolver ou pode ser uma escolha do hospedeiro entre crescer ou se defender do patógeno (DE WET *et al.*, 2008).

O uso de híbridos de espécies suscetíveis com espécies resistentes ao *Diplodia* em áreas reconhecidamente favoráveis ao desenvolvimento do patógeno tem sido uma estratégia bastante utilizada em vários países como Chile e África do Sul (DE WET *et al.*, 2008). Os híbridos são selecionados para resistência a doenças e depois são propagados via estaquia em níveis operacionais, como por exemplo: Nova Zelândia (*Pinus radiata*), Austrália (*P. radiata* e *Pinus caribaea* x *Pinus elliotii*), Chile (*Pinus radiata* e *Pinus taeda*) (FURLAN *et al.*, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia Florestal, na casa de vegetação do Laboratório de Propagação Vegetativa de Plantas da Embrapa Florestas, Colombo, PR e, no Laboratório de Genética de Microorganismos, no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados de *D. pinea* utilizados nos diversos experimentos foram obtidos de material doente de *Pinus* coletados em 14 diferentes localidades nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (FIGURA 1).

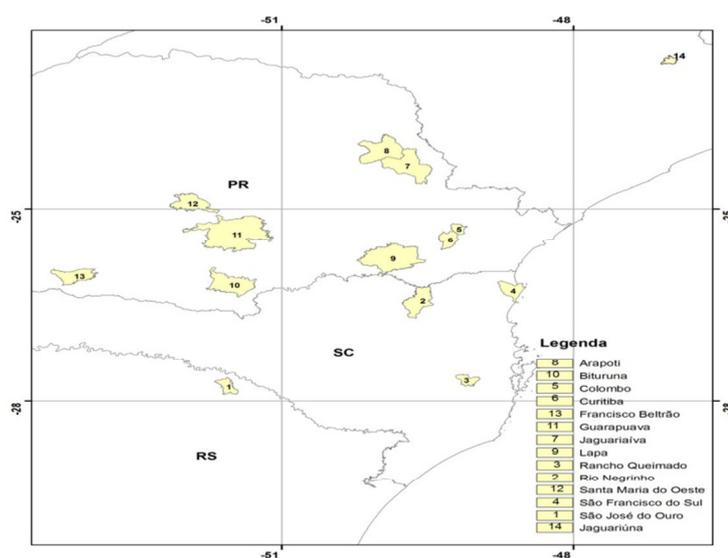


FIGURA 1. MAPA DA DISTRIBUIÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA DE MATERIAIS DOENTES COM *Diplodia pinea*.
 FONTE: LABORATÓRIO DE MONITORAMENTO AMBIENTAL, EMBRAPA FLORESTAS (2013).

Foram realizadas duas etapas de isolamento: culturas originais (isolamento indireto) e culturas monospóricas (isolamento direto)

Para o isolamento indireto em meio de cultivo, utilizaram-se os meios batata-ágar-dextrose-BDA (extrato comercial de batata e ágar, 39 g e água destilada, 1000 mL) e o meio extrato de malte ágar – EMA (15 g de extrato de malte; 20g de ágar e água destilada, 1000 mL). Dos ponteiros e das mudas mortas coletadas foram retirados fragmentos de tecidos doentes e frutificações que foram inseridos em placas de Petri com os meios de cultivo. No caso dos cones foram removidas as brácteas, lavadas as suas superfícies e cortadas em três a quatro segmentos que foram distribuídos nos meios BDA e EMA. Todas as placas foram incubadas em câmara B.O.D a 24 °C, por três ou 4 dias.

No isolamento direto, após confirmação ao microscópio da presença de frutificações de *D. pinea* no material doente, os picnídios formados foram cuidadosamente retirados com auxílio de um estilete esterilizado e colocados em tubos de *Eppendorf* com água destilada estéril. Este material foi centrifugado por alguns segundos para sedimentação dos resíduos e com auxílio de uma micropipeta retirou-se 300 µL do conteúdo dos tubos e colocadas algumas gotas em placas, que foram espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski, em meio ágar-ágar - AA (20 g de ágar e água destilada, 1000 mL). As placas foram examinadas ao microscópio para confirmar a presença dos conídios e depois as placas foram incubadas a 24 °C por 2 horas para germinação dos conídios. Neste tipo de isolamento, os isolados monospóricos foram obtidos diretamente, sem a necessidade dos isolados originais.

Alguns isolados foram procedentes da mesma localidade, mas com coletas realizadas em datas diferentes, onde foi acrescentada uma numeração diferente (TABELA 2).

TABELA 2. PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE *Diplodia pinea*

| CÓDIGOS ISOLADOS | LOCALIDADE DOS ISOLADOS | HOSPEDEIRO | PONTO DE COLETA | DATA DE COLETA |
|------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------|----------------|
| DP-6 | São José do Ouro1/RS | <i>Pinus taeda</i> | Ponteiro | Março 2006 |
| F-11 | Rancho Queimado1/SC | <i>Pinus gregii</i> | Ponteiro | Março 2006 |
| DP-7 | Curitiba1/PR | <i>Pinus sp</i> | Cones | Março 2006 |
| DP-10 | Santa Maria d'Oeste1/PR | <i>Pinus maximinoi</i> | Árvore jovem morta | Janeiro 2006 |
| DP-2 | São José do Ouro2/RS | <i>Pinus taeda</i> | Ponteiro | Março 2007 |
| DP-8 | Santa Maria d'Oeste2/PR | <i>Pinus maximinoi</i> | Muda morta | Janeiro 2007 |
| F-12 | Rancho Queimado2/SC | <i>Pinus taeda</i> | Ponteiro | Março 2007 |
| DP-9 | Curitiba2/PR | <i>Pinus sp.</i> | Cones | Março 2008 |
| G-12 | Rancho Queimado3/SC | <i>Araucariaangustifolia</i> | Ponteiro | Março 2011 |
| C-11 | Guarapuava/PR | <i>Pinus taeda</i> | Ponteiro | Março 2011 |
| B-11 | Arapoti /PR | <i>Pinus taeda</i> | Ponteiro | Março 2011 |
| DP-11 | Colombo/PR | <i>Pinus taeda</i> | Ponteiro | Março 2011 |
| J-11 | Jaguariúna/SP | <i>Araucariaangustifolia</i> | Cone feminino | Março 2011 |
| DP 13 | Jaguariaíva/PR | <i>Pinus patula</i> | Cone feminino | Março 2011 |
| K-11 | Lapa/PR | <i>Pinus taeda</i> | Ponteiro | Março 2011 |
| I-11 | São Francisco do Sul/SC | <i>Pinus caribea</i> | Ponteiro | Março 2011 |
| DP-3 | Francisco Beltrão/PR | <i>Pinus taeda</i> | Ponteiro | Março 2011 |
| H-12 | Bituruna/PR | <i>Pinus patula</i> | Casca de tronco | Março 2011 |
| E-11 | Rio Negrinho 1/SC | <i>Pinus patula</i> | Ponteiro | Março 2012 |
| DP 12 | Rio Negrinho 2/SC | <i>Pinus patula</i> | Ponteiro | Agosto 2012 |

FONTE: O autor (2013)

4.2 OBTENÇÃO DE CULTURAS MONOSPÓRICAS

Para a obtenção das culturas monospóricas um disco de micélio de cinco mm de diâmetro foi retirado da colônia original de cada isolado cultivado por 3 dias em BDA e transferido para placas de Petri com o meio acícula de pínus-ágar - APA (20 g de ágar e água destilada, 1000 mL, suplementado com três ou quatro acículas de pinus estéreis cortadas em fragmentos de 1 cm e colocadas em placas de Petri autoclavadas e depois recobertas com meio AA, antes da solidificação), segundo método de Basilio *et al.*, (2007). As placas foram incubadas sob luz fluorescente, a 24 °C, até os picnídios se desenvolverem, que geralmente iniciam-se após 14 dias de incubação. Os picnídios (contendo conídios) foram colocados com auxílio de um estilete esterilizado em tubo de *Eppendorf* com água destilada esterilizada, macerados com bastão de vidro e misturados em Vortex.

Alíquotas de 100 a 300 µL da suspensão de conídios (sobrenadante) foram tomadas com uma micropipeta, colocadas em placas em meio AA e incubados por duas horas a 24 °C, quando os conídios iniciaram a germinação.

Sob microscópio estereoscópico, os conídios germinados foram coletados com um estilete esterilizado e transferidos para novas placas com meio AA. Cada placa de Petri com apenas um conídio germinando, após 7 dias de crescimento, foram repicadas para meio BDA e mantidas em câmara B.O.D, a 24 °C. Após a confirmação da identificação de *D. pinea*, os isolados monospóricos cultivados em meio BDA foram transferidos para tubos de ensaio com meio BDA, cultivados por 3 dias a 24 °C e depois recobertos com óleo mineral esterilizado, e colocados em geladeira a 4 °C, para fim de preservação. Todos os isolados foram identificados de acordo com as características dos conídios (DE WET *et. al.*, 2002; 2003) e estão mantidos na coleção de fungos florestais da Embrapa Florestas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Diplodia pinea*.

4.3.1 Avaliação cultural das colônias em diferentes meios de cultura

Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em câmaras B.O.D, mantidas a 24 °C. Após três dias de cultivo foram retirados discos de cinco mm de diâmetro contendo micélio dos 20 isolados e transferidos para cinco placas de 90 mm de diâmetro contendo os meios BDA, EMA e AA. As placas foram incubadas por 20 dias a 24 °C, no escuro e as avaliações realizadas foram para identificar as características culturais como tamanho, cor e forma.

4.3.2 Características dos picnídios e conídios ao microscópio ótico

Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em câmaras B.O.D, mantidas a 24 °C. Após um período de três dias de crescimento, os isolados foram repicados para placas de Petri com meio APA

e foram incubados em B.O.D a 24 °C. Após 14 dias de crescimento, as colônias de *D. pinea* iniciaram a formação de picnídios. Nesse período lâminas foram preparadas para verificar a presença de conídios maduros, ou seja, conídios pigmentados e podendo apresentar ou não septos. Para essa verificação foi necessária a retirada, em condições assépticas, dos picnídios formados sobre as acículas e a transferência desses para tubos de *Eppendorf* contendo 300 µL de água destilada estéril. Com o auxílio de um bastão de vidro e um Vortex, os picnídios contendo os conídios maduros foram macerados e agitados dentro de tubos de *Eppendorf* para liberar os conídios. Os conídios liberados ficaram no sobrenadante e foram retirados com auxílio de uma pipeta de Pasteur, cuidadosamente dispersos em lâminas coradas com lactoglicerol recobertas com as lamínulas e levados ao microscópio para avaliar a maturidade.

Após confirmação da maturação dos conídios, as lâminas preparadas foram levadas ao microscópio para avaliação das dimensões dos conídios. Para a avaliação foram retiradas medidas perpendiculares (largura e comprimento) dos conídios e picnídios com a régua micrométrica em aumento de 400 X. Foram avaliados 100 conídios por isolado para determinar as dimensões, número de septos, formato, cor, granulações e espessura da parede dos conídios.

Para determinar o número de septos foram realizadas avaliações da presença e ausência dos septos nos conídios maduros. Quando foram verificados conídios com diferentes números de septos foi realizada contagem de conídios com septos e a contagem de conídios sem septo, para obtenção de uma estimativa da frequência de septos por isolado. Essa metodologia se repetiu para cada isolado.

A espessura da parede dos conídios foi avaliada medindo-se o espaço presente entre a parede externa e interna dos conídios com auxílio da régua micrométrica.

As análises estatísticas foram realizadas sobre o número de conídios avaliados aleatoriamente em três placas de cada isolado e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey pelo programa GENE 5.

4.3.3 Análise das características conidiais por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura

Os isolados foram repicados e colocados para crescer em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em câmaras B.O.D, mantidas a 24°C. Após um período de três dias de cultivo os isolados foram repicados para placas de Petri com meio APA e incubados em B.O.D a 24 °C.

Após confirmação da maturidade dos conídios como descrito no item 4.3.2, os picnídios contendo conídios maduros foram transferidos para tubos de *Eppendorf* estéreis contendo água destilada estéril e macerados com auxílio de um bastão de vidro autoclavado e de um Vortex para liberação dos conídios. Alíquotas de 300 µL do sobrenadante foram tomadas com uma micropipeta e transferidos para outro tubo de *Eppendorf* contendo solução fixadora de Karnovsky (paraformaldeído 2 %, glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2, a 4 °C) (KARNOVSKY, 1965). O material foi desidratado em série de solução alcoólica crescente (50, 60, 70, 80 e 90 %) e solução de acetona (100 %), sendo que o ponto crítico foi obtido em um equipamento Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. Em seguida ocorreu a metalização em ouro obtida em um equipamento Balzers SCD – 030.

As características conidiais pela Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V) foram realizadas para observar a presença de perfurações na parede externados conídios. As análises e documentação fotográfica do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

4.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Diplodia pinea*

4.4.1 Efeito da temperatura no crescimento micelial

Os isolados foram repicados e colocados para crescer em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em câmaras B.O.D, mantidas a 24°C. Após três dias de crescimento foram retirados discos de cinco mm de diâmetro contendo micélio de cada um dos 20 isolados e transferidos para placas de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA. Os discos de cada isolado foram colocados no centro das placas contendo o meio BDA e incubados em B.O.D, no escuro, nas temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 °C e envolvidas individualmente em filme plástico PVC. O crescimento micelial dos isolados foi avaliado diariamente durante três dias. Com auxílio de uma régua foram realizadas medidas perpendiculares (comprimento e largura) das colônias de todas as placas, até que os primeiros isolados atingissem a borda das mesmas.

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado (D.I.C) em arranjo fatorial, num total de 900 placas (5 placas de meio BDA x 20 isolado x 9 temperaturas) e repetido duas vezes. As análises estatísticas foram realizadas sobre o número de placas em cada tratamento pelo teste de Tukey e as médias das temperaturas foram comparadas pelo programa STATISTICA 8.0. As variações de comportamento entre os isolados nas diferentes temperaturas foram avaliadas, também, através de análises de regressão.

4.4.2 Efeito da temperatura na esporulação

Os isolados foram repicados da coleção de *D. pinea* do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas e colocados para crescer em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em câmaras B.O.D, mantidas a 24°C. Após três dias de cultivo, foram retirados discos de cinco mm de diâmetro contendo micélio de cada um dos 20 isolados e transferidos para placas de 90 mm de diâmetro contendo o meio APA. Os discos de cada isolado foram colocados no centro das placas contendo o meio APA e incubados em câmara B.O.D no escuro nas temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 e 40 °C e envolvidas individualmente em filme plástico PVC.

Após 14 dias de cultivo, as colônias de *D. pinea* iniciaram a formação de picnídios. Avaliações ao microscópio foram realizadas a cada dois dias nas placas para verificar se já havia presença de conídios maduros. Após confirmação da maturidade dos conídios como descrito no item 4.3.2 os picnídios contendo conídios maduros foram transferidos para tubos de *Eppendorf* contendo água destilada estéril e macerados com auxílio de um bastão de vidro e Vortex para a liberação dos conídios e avaliação ao microscópio estereoscópico. O ensaio foi avaliado por um período de 54 dias.

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado (D.I.C) num total de 540 placas (3 placas de meio APA x 20 isolados x 9 temperaturas) e repetido duas vezes. As análises estatísticas foram realizadas sobre as médias dos tratamentos e foram comparadas pelo teste de Tukey pelo programa STATISTICA 8.0.

4.5 AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Diplodia pinea* EM MUDAS DE *Pinus taeda* E *Pinus elliottii* var. *elliottii*

Os isolados foram repicados da coleção de *D. pinea* do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas e colocados para crescer em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em câmaras B.O.D, mantidas a 24 °C. Depois de três dias de cultivo os isolados foram transferidos para placas de Petri com meio AA e incubadas a 24 °C

Após 10 dias de incubação, as placas de Petri contendo os isolados foram levadas à câmara de fluxo laminar para produção dos inóculos. Com auxílio de um furador de cortiça, as culturas foram perfuradas para produzir discos de micélio-ágar de cinco mm. Placas de Petri contendo apenas meio com AA também foram furadas para produzir discos de ágar sem micélio.

As mudas de *P. taeda* e *P. elliottii* var. *elliottii* utilizadas nesse ensaio foram produzidas em tubetes de 55 cm³ com substrato comercial à base de vermiculita e casca de pínus, em casa de vegetação e se encontravam com 120 dias de idade. Antes da inoculação, as mudas de *P. taeda* e *P. elliottii* var.

elliottii sofreram injúria (retirada de 3 a 4 acículas do ponteiro) e realizado no local da injúria a desinfecção em álcool 70 %.

Para a inoculação, discos de micélio-ágar dos 20 isolados foram fixados com fita adesiva nas mudas e com a face voltada para injúria, durante quatro dias. Nas plantas testemunhas, foram fixados discos de ágar sem o fungo nas mesmas condições dos discos micélio-ágar.

Os ponteiros inoculados das mudas de *P. taeda* e *P. elliottii* foram envolvidos por sacos plásticos transparentes, umedecidos com água destilada por 48 h. As mudas foram colocadas em casa de vegetação, cuja umidade e temperatura foram monitoradas. A temperatura máxima da estufa ficou entre 28 e 30 °C e foi mantida através de resfriamento automático por aspersão e por ventilação através de dois grandes ventiladores dispostos nas laterais superiores da casa de vegetação. Os ventiladores e a aspersão eram automaticamente ligados quando a temperatura ultrapassava 30 °C.

Para avaliar a doença, mediu-se o comprimento da lesão com o auxílio de uma régua a partir do ponto de inoculação. O experimento foi avaliado semanalmente durante 30 dias na casa de vegetação e consistiu em avaliar os ponteiros das mudas em busca dos sintomas típicos da doença. Dos ponteiros que apresentavam algum sintoma de seca de ponteiro foram retirados pequenos pedaços, com uma tesoura limpa com álcool 70 %, que foram levados ao laboratório para avaliação no microscópio estereoscópico. Quando a presença de picnídios foi constatada nesses ponteiros, foram montadas lâminas coradas com lactoglicerol para verificar a presença de conídios de *D. pinea*.

Após 30 dias em casa de vegetação, iniciaram-se as avaliações dos sintomas em câmara úmida. Para essas avaliações os ponteiros das mudas foram cortados com tesoura limpa com álcool 70 %, e colocados individualmente em sacos plásticos umedecidos com água destilada esterilizada por 30 dias. Os sacos plásticos contendo os ponteiros foram identificados através de etiquetas onde se anotava a espécie da muda inoculada, o número do isolado inoculado e se na muda havia sintomas do patógeno antes do ponteiro ser colocado em câmara úmida.

Os ponteiros, dentro de sacos plásticos, foram colocados com lâmpada fluorescente durante 30 dias para isolamento direto e depois foram analisados

em microscópio estereoscópico. Quando observada a presença de picnídios, foram montadas lâminas coradas com lactoglicerol para verificar a presença de conídios de *D. pinea*.

O ensaio foi montado em delineamento em blocos ao acaso com arranjo fatorial, num total de 420 plantas (duas plantas por parcela, 2 espécies, 20 isolados monospóricos e uma testemunha por tratamento e 5 repetições). As análises estatísticas foram realizadas sobre o total de mudas em cada tratamento e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey pelo programa GENE.5.

4.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

4.6.1 Extração de DNA

Os isolados foram repicados e colocados para crescer em placas de Petri contendo meio BDA e incubados em câmaras B.O.D, mantidas a 24 °C.

As extrações de DNA foram realizadas utilizando-se o kit comercial Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc.™) conforme especificações do fabricante.

Com o objetivo de se obter um DNA de boa qualidade livre de meio de cultura e com menor quantidade de proteínas e outros contaminantes, discos de papel celofane (11 cm de diâmetro), previamente esterilizados em água destilada, foram dispostos sobre a superfície de uma placa de Petri contendo meio BDA.

Discos dos isolados foram transferidos para diversos pontos sobre o papel celofane e incubadas a 24 °C. Após dois dias de crescimento, foram coletados vários micélios dos diversos pontos repicados, cerca de 2 mm no total. A coleta foi realizada cuidadosamente para não romper o papel celofane, com o auxílio de palitos autoclavados por três vezes, e transferidos para tubos de extração. As etapas subsequentes seguiram o protocolo descrito pelo fabricante.

4.6.2 Sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA e purificação.

A identificação molecular dos isolados foram realizadas através do sequenciamento da região ITS1--5,8S—ITS2 do rDNA. As regiões ITS foram amplificadas com o par de primers ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990) que são universais para fungo e permitem amplificar a região ITS1--5,8S—ITS2 do DNA ribossomal. As condições da reação seguiram o protocolo de White *et al.* (1990), modificado por Stringari *et al.* (2009).

A amplificação foi realizada com desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72 °C; seguido de extensão final de 3 minutos a 72 °C. A purificação de produto de PCR foi realizada com acetato de amônio e etanol PA. O pellet resultante foi ressuspenso em 15 µL de água ultra-pura esterilizada. Para reação de seqüenciamento foi utilizado o Kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequency (GE Healthcare®), seguindo as instruções do fabricante.

O produto final da amplificação foi purificado com Sephadex (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) e submetida à eletroforese capilar semiautomática utilizando a plataforma MegaBACE (GE Healthcare®)

4.6.3 Edição e análise das sequências

A edição e o alinhamento das sequências foi realizado com auxílio do programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2006) e posterior inspeção visual através do programa BioEdit 7.0 (HALL, 1997). Após procedimento de alinhamento, as sequências foram comparadas com outras sequências existentes no banco de dados ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) o qual permite detectar similaridade de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes. As sequências obtidas foram comparadas pelo programa Megablast com as sequências de nucleotídeos altamente similares do banco de dados de sequências de nucleotídeos do GeneBank.

4.6.4 Análise Taxonômica

Após a edição, alinhamento e análise prévia das sequências, essas foram submetidas ao programa Mr. Bayes 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) para realização das análises baseadas pelo método Bayesiano onde o modelo mais apropriado de substituição de DNA foi obtido pelo próprio programa. Quatro Cadeias de Markov simultâneas foram realizadas de forma aleatórias a partir de 500.000 gerações sendo realizadas as amostragens a cada 100 gerações. As primeiras 1500 árvores geradas foram descartadas. Os valores de Bootstrap foram determinados depois de 103 replicações e apenas grupos com frequências > 60% foram mantidos

Todas as árvores taxonômicas foram visualizadas no programa FigTree e enraizada utilizando-se *Mycosphaerella konae* como outgroup (DE WET *et al.* 2008).

Na análise da região ITS e 5,8S do rDNA dos isolados de *D. pinea* foram utilizadas linhagens como referência de *D. pinea* morfotipo A depositada no CBS 109727, sequência ITS DQ458897; *D. pinea* morfotipo C depositada no CBS 109725, sequência ITS DQ458896 e *D. scrobiculata* depositada no CBS118110, sequência ITS AY253292.

As linhagens referência Type Strain são reconhecidas como um membro taxonômico do nível de espécie (TABELA 3).

| TABELA 3. | CÓDIGO DAS SEQUÊNCIAS | DAS SEQUENCIAMENTO | REFERÊNCIAS | UTILIZADAS | NO |
|-----------|-----------------------|--|--------------------------------------|------------|----|
| TYPE | MORFOTIPO | | REFERÊNCIAS | | |
| 1 | DQ458897 | <i>Diplodia pinea</i> Type A* | ALVES; CORREIA; PHILLIPS, 2006 | | |
| 2 | AY 253290 | <i>Diplodia pinea</i> A | DE WET <i>et al</i> (2000) | | |
| 3 | DQ458896- | <i>Diplodia pinea</i> Type C | ALVES; CORREIA; PHILLIPS, 2006 | | |
| 4 | AY 253294 | <i>Diplodia pinea</i> C | ALVES; CORREIA; PHILLIPS, 2006 | | |
| 5 | AY253292 | <i>Diplodia Scrobiculata</i> Type | DE WET <i>et al.</i> ,2003 | | |
| 6 | AY623704 | <i>Diplodia Scrobiculata</i> | De WET <i>et al.</i> ,2009 | | |
| 7 | AY623705 | <i>Diplodia Scrobiculata</i> | DE WET <i>et al.</i> ,2009 | | |
| 8 | DQ458899 | <i>Diplodia Scrobiculata</i> | ALVES; CORREIA; PHILLIPS, 2006 | | |
| 9 | AY160196 | <i>Diplodia pinea</i> | FLOWERS; HARTMAN; VAILLANCOURT, 2003 | | |
| 10 | AY260085.1 | <i>Mycosphaerella konae</i> outgroup | DE WET <i>et al</i> , 2003 | | |

*As anotações em negritos são as sequências referências para a espécie *Diplodia pinea*, para o morfotipo A e C e para a espécie *Diplodia scrobiculata*.

FONTE: O autor (2013)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Diplodia pinea*

5.1.1 Avaliação morfológica das colônias em diferentes meios de cultura

Em meio AA, a 24 °C, os isolados de *D. pinea* apresentaram, inicialmente, micélio ralo e de coloração marrom escura. Após 20 dias, as colônias apresentaram ainda micélio ralo e a coloração final foi cinza chumbo.

Em meio BDA e EMA, a 24 °C, os isolados apresentaram, inicialmente, micélio de coloração branca, tornando-se cinza esverdeado e aspecto cotonoso. À medida que as colônias foram envelhecendo os isolados tornaram-se cinza chumbo. Após 20 dias de cultivo, a maioria dos isolados apresentou aspectos culturais semelhantes em meio BDA e EMA: micélio aéreo macio e cotonoso com uma coloração cinza chumbo no reverso da placa, formando pontos brancos macios e cotonoso na parte superior do micélio ou tornando-se com uma coloração cinza clara (FIGURA 2 A, B, C).

Alguns isolados, após 20 dias de incubação, apresentaram variações como micélio aéreo macio cotonoso de coloração cinza esverdeada (FIGURA 2 D). Outras variações foram pontuais como as bordas lobadas apresentadas pelo isolado G12 nos meios BDA e EMA (FIGURA 2E) e o micélio escuro e prensado em meio EMA encontrado no isolado DP8 (FIGURA 2F).

As variações nas características culturais encontradas nesse estudo foram verificadas também em outros trabalhos. Jacobs e Rehner (1998) e Kay *et al.* (2002) trabalhando com *D. pinea* revelaram que existe uma tendência desse fungo em exibir conídios pleomórficos e plasticidade em cultura dependendo das condições de cultivo.

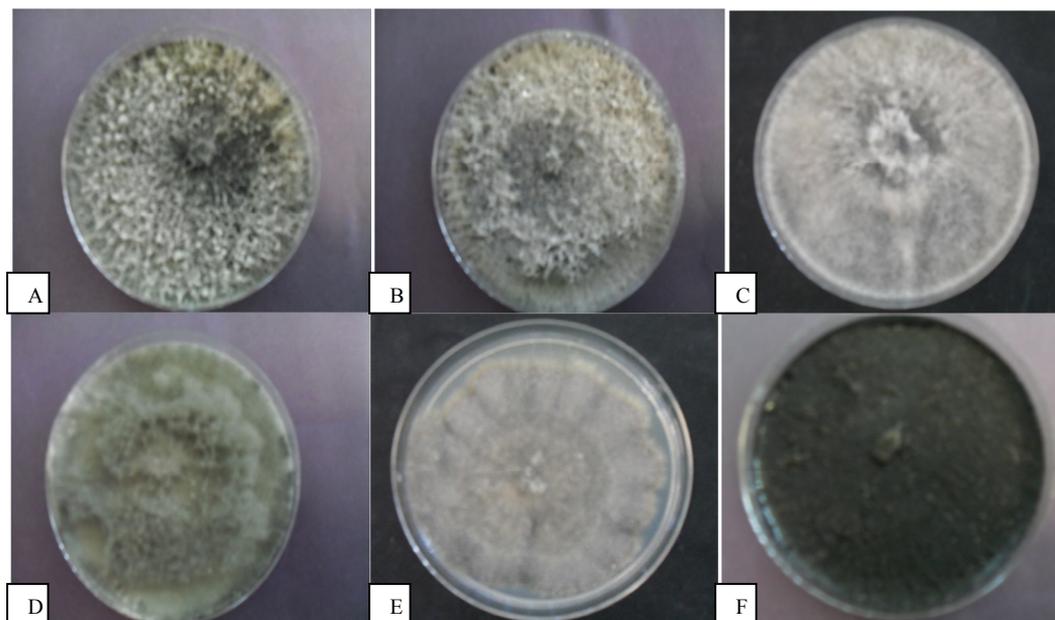


FIGURA 2. VARIAÇÃO CULTURAL DOS ISOLADOS DE *Diplodia pinea* CULTIVADOS EM MEIO BDA E EMA E INCUBADOS POR 20 DIAS, A 24 °C. A (DP13) B (E11), C (DP10) CULTURAS TÍPICAS EM MEIO BDA E EMA. D-(B11) MICÉLIO CINZA ESVERDEADO EM BDA. E- (G12) MICÉLIO COM BORDAS LOBADAS EM MEIO BDA E EMA. E- (DP8) MICÉLIO PRETO PENSADO EM EMA.

FONTE: O autor (2013)

Culturas com bordas lobadas encontradas no isolado G-12, já foi relatada em isolados de *D. pinea* quando cultivados em meio de cultura com deficiência nutricional (RAMIREZ, 2007). Como nesse trabalho o meio de cultura foi o mesmo para todos os isolados e essa variação foi observada apenas no isolado G-12, pode-se suspeitar que a variação fosse intraespecífica, que pode ocorrer dentro de isolados da mesma espécie.

As características culturais atribuídas ao fungo *D. scrobiculata* (ex morfotipo B, segundo DE WET *et al.*, 2003) são micélio com coloração branca ou preta e prensado em BDA. Nenhum isolado, exceto DP8, apresentou essas características culturais e apenas no meio EMA.

As características culturais observadas nos isolados *D. pinea* nos meios BDA e EMA foram compatíveis para o morfotipo A de *D. pinea* nos mesmos meios (PALMER; STEWART; WINGFIELD, 1987; SWART; WINGFIELD, 1991; DE WET *et al.*, 2003).

5.1.2 Características dos picnídios e conídios em microscópio ótico.

As dimensões dos picnídios ficaram entre 350 e 600 μm . Poucos trabalhos apresentam como resultados as medidas dos picnídios de *D. pinea*, provavelmente porque a maioria é macerada para liberar os conídios. Fernandez *et al* (2010) citam medidas de picnídios entre 250 a 300 μm e Luchi, Capretti e Bonello (2007) citam medidas entre 429 a 648 μm para os picnídios de *D. pinea*. Os vinte isolados de *D. pinea* apresentaram picnídios de forma variada em meio APA, normalmente globosa (FIGURAS 3A e 3C), imersa, separada ou agregada, marrom escuro ou preto, parede grossa composta, ostíolo central (FIGURA 3B), circular e papilar.

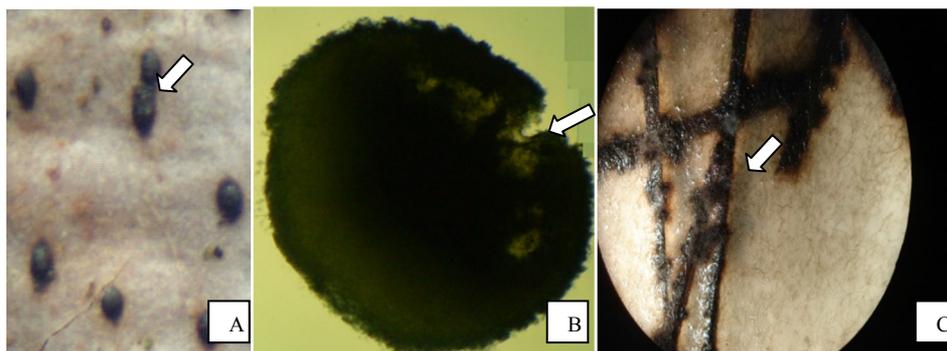


FIGURA 3. PICNÍDIOS DE ISOLADOS DE *D. pinea*. A- PICNÍDIOS EM LENHO DE *Pinus* AUMENTO DE 20X. B- PICNÍDIO COM OSTÍOLO (SETA BRANCA) AUMENTO DE 450X. C- FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS (SETA BRANCA) SOBRE ACÍCULAS EM MEIO APA (AUMENTO DE 40 X).

FONTE: O autor (2013)

Os conídios apresentaram-se hialinos (FIGURA 4A) quando estavam dentro do picnídio e parede com espessura (FIGURAS 4B e 4C) entre 0,1 e 1,0 μm . Foram observadas células conidiogênicas hialinas, ao microscópio ótico, como relatado por Phillips (2005). Os picnídios cresceram sob e sobre a superfície do ágar dependendo da posição das acículas no meio de cultura e essas acículas foram usadas pelo fungo como suporte para formação das estruturas reprodutivas.

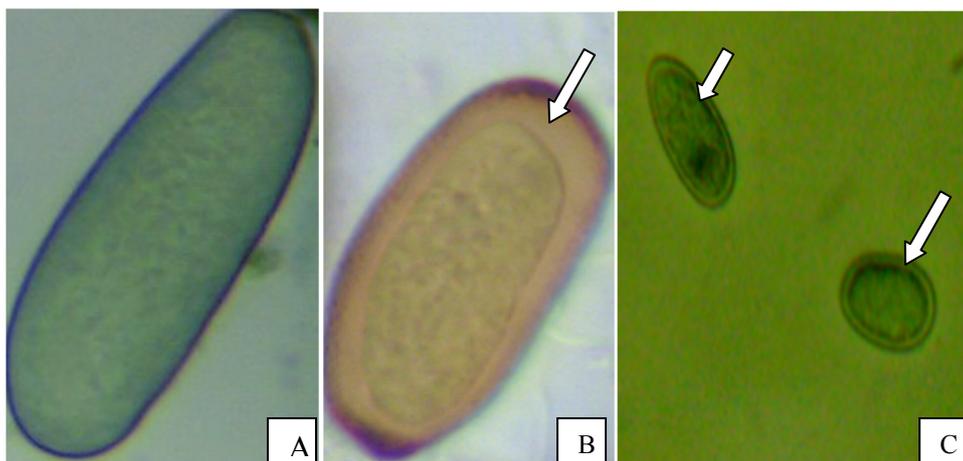


FIGURA 4. CONÍDIOS IMATUROS DE *Diplodia pinea*. A. CONÍDIO HIALINO. B. e C. ESPESSURA DAS PAREDES DOS CONÍDIOS (AUMENTO DE 200 X)
 FONTE: O autor (2013)

Após a liberação dos conídios, esses apresentaram coloração amarelada tornando-se marrom escura (FIGURA 5A) ou marrom esverdeada (FIGURA 5B) com a maturidade. Quanto à forma, os conídios apresentaram-se na maioria oblonga a clavada (FIGURA 5C), alguns elipsóides ou retos, asseptados ou septados, parede ornamentada na superfície interna, ápice obtuso e base truncada (FIGURA 5D).



FIGURA 5. CONÍDIOS MATUROS DE *Diplodia pinea* A- CONÍDIOS MARRONS ESCUROS (AUMENTO DE 200 X). B-CONÍDIOS MARRONS ESVERDEADOS (AUMENTO DE 200 X). C- CONÍDIO OBLONGO (AUMENTO DE 200 X). D- CONÍDIOS COM BASE TRUNCADA (AUMENTO DE 400 X).
 FONTE: O autor (2013)

A maioria dos conídios não apresentou septo. No entanto, os isolados I-11, DP-2, E-11, J-11, DP-11 e DP-9 apresentaram um septo nas proporções

de 12 %, 4 %, 2 %, 70 %, 70 % e 2 %, respectivamente. Os isolados K-11, apresentaram 70 % dos conídios sem septo (FIGURA 6A), 20 % dos conídios com um septo (FIGURA 6B), 7 % dos conídios com 2 septos (FIGURA 6C) e 2 % dos conídios com 3 septos (FIGURA 6D). Com o isolado K-11 houve, também, casos especiais de conídios com vários septos (FIGURA 6E).

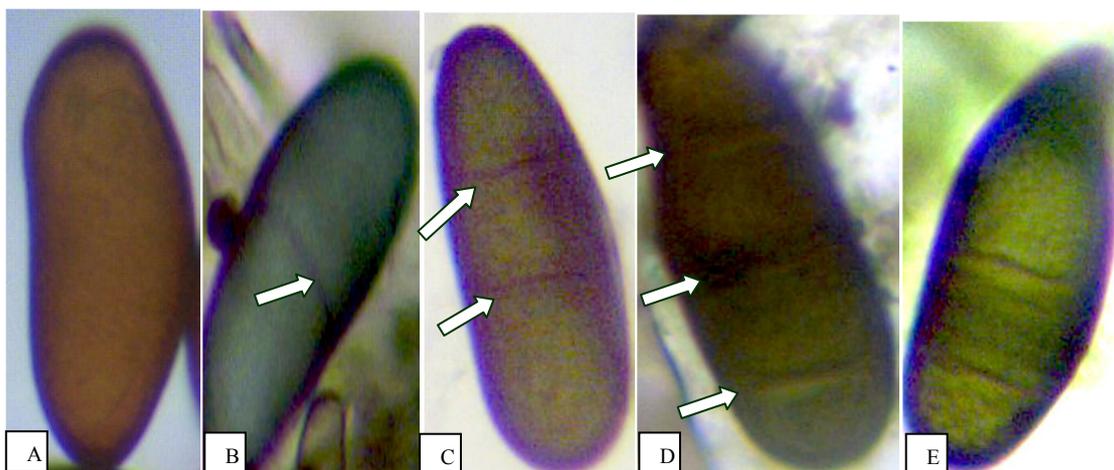


FIGURA 6. CONÍDIOS MATUROS DE *Diplodia pinea*. A-CONÍDIO SEM SEPTO. B- CONÍDIO COM UM SEPTO. C- CONÍDIO COM DOIS SEPTOS. D- CONÍDIO COM 3 SEPTOS. E- CONÍDIO COM VÁRIOS SEPTOS (AUMENTO DO 400X)
 FONTE: O autor (2013).

As dimensões médias dos isolados de *D. pinea* variaram entre 30,1 a 39,9 μm de comprimento e 12,9 a 16 μm de largura (TABELA 4).

As dimensões estão compatíveis com as medidas descritas por Sutton (1980) para *D. pinea*, entre 30 a 45 μm de comprimento e 10 a 16 μm de largura. As dimensões para o morfotipo A variam entre 34,3 a 39,4 μm de comprimento e 12,6 a 12,8 μm de largura, enquanto que as dimensões morfotipo C variam entre 37 a 41,5 μm de comprimento e 13 a 15 μm de largura (DE WET *et al.*, 2002). Mas, de acordo com esses autores a única medida válida para avaliação dos conídios de *D. pinea* é o comprimento.

TABELA 4. DIMENSÕES (VARIACÃO E MÉDIA) DOS CONÍDIOS DOS ISOLADOS DE *Diplodia pinea*

| ISOLADO | COMPRIMENTO(μm) | MÉDIA(μm) | LARGURA(μm) | MÉDIA(μm) | SEPTOS | | Provável morfotipo |
|---------|------------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|----------|------------|--------------------------|
| | | | | | Presença | Frequência | |
| C-11 | 35,90-39,90 | 37,92 a | 14,9-15,9 | 15,38 ab | - | | A/C |
| DP-8 | 36,96-38,50 | 37,73 a | 14,23-15,0 | 14,615abc | - | | A/C |
| DP-10 | 36,00-38,80 | 37,41 a | 14,34-15,0 | 14,78 abc | - | | A/C |
| DP-9 | 33,1-38,4 | 36,20 ab | 12,8-12,2 | 12,21c | + | Raros | A |
| DP-7 | 33,2-38,9 | 36,05 ab | 13,9-14,1 | 14,0cd | - | | A |
| DP-6 | 34,86-36,26 | 35,69ab | 13,84-4,98 | 14,41bc | - | | A |
| DP-2 | 34,30-37,0 | 35,65 ab | 13,8-15,0 | 14,4 bc | + | Raros | A |
| DP-3 | 32,2-36,8 | 34,52 abc | 15,23-15,6 | 15,30ab | - | | A |
| F-12 | 32,1-34,34 | 33,53 bcd | 14,98-15,0 | 15abc | - | | A |
| DP-12 | 30,96-35,98 | 33,46 bcd | 15,23-15,4 | 15,30ab | - | | A |
| E-11 | 33,27-35,0 | 33,45 bcd | 15,0-15,76 | 15,31ab | - | | A |
| G-12 | 32,5-34,0 | 33,43 bcd | 14,97-15,2 | 15abc | - | | A |
| F 11 | 31,5-35,0 | 33,29 bcd | 14,9-15,1 | 15abc | - | | A |
| I-11 | 31,48 31,94 | 31,75 cde | 14,95-16,0 | 15,74 a | + | Raros | <i>Diplodia pinea</i> ** |
| H-12 | 30,44-33,96 | 31,24 cde | 13,38-14,8 | 14,1cd | - | | " |
| K-11 | 31,5-31,96 | 30,44 def | 14-14,42 | 14,41bc | + | Frequente | " |
| B-11 | 30,4-30,98 | 30,27 def | 14,98-14,9 | 14,9abc | - | | " |
| DP-13 | 31,2-30,3 | 30,23 def | 15,1- 14,9 | 15abc | - | | " |
| J-11 | 31,1-30,3 | 30,21 def | 15,2-14,8 | 15 abc | + | Frequente | " |
| DP-11 | 30,1-30,3 | 30,1 def | 12,9-13,1 | 13de | + | Frequente | " |

*Médias seguidas por letras minúsculas (coluna) iguais não apresentam diferença significativa entre si ($P < 0,05$, Tukey). Média de 100 conídios por isolado.

**As medidas são compatíveis para *Diplodia pinea*.

FONTE: O autor (2013).

Os resultados revelaram que existem diferenças estatísticas entre três grupos que se formaram pelos isolados de *D. pinea*. O primeiro grupo foi formado entre os isolados DP10, DP8, C11, cujo comprimento médio dos conídios variou entre 37,92 e 37,41 μm e ficaram entre os maiores conídios encontrados. O segundo grupo foi formado entre os isolados DP2, DP6, DP7, DP9, DP3, F-11, F-12, G-12, E-11, DP-12 cujo comprimento médio dos conídios variou entre 36,20 e 33,29 μm . O terceiro grupo foi formado entre os isolados I-11, H-12, B-11, DP-13, J-11, DP-11, K-11, cujo comprimento médio variou entre 31,75 e 30,1 μm e foram os menores conídios encontrados (GRÁFICO 1).

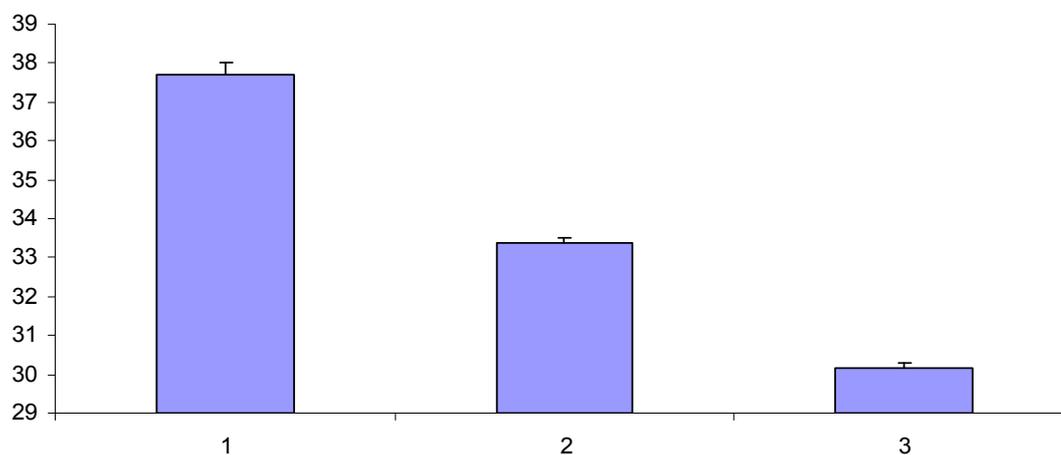


GRÁFICO 1. APRESENTAÇÃO DOS TRÊS GRUPOS FORMADOS PELA VARIAÇÃO MÉDIA DOS COMPRIMENTOS DOS ISOLADOS DE *D. pinea*. INTERVALO DE CONFIANÇA GRUPO1 (0,35 %), GRUPO 2 (0,118 %) E GRUPO 3 (0,095 %)
 FONTE: O autor (2013)

As medidas apresentadas para o primeiro grupo sugerem que os isolados do primeiro grupo representam o morfotipo A/C e que as medidas apresentadas para os isolados do segundo grupo representam o morfotipo A. Os isolados do terceiro grupo apresentaram medidas compatíveis com o *D. pinea*.

Palmer, Stewart e Wingfield (1987) descreveram o morfotipo B de *D. pinea* com medidas conidiais entre 33,5-34,3 μm de comprimento e 11,6-12,1 μm de largura. O morfotipo B de *D. pinea* que atualmente foi reclassificado como *D. scrobiculata* (DE WET *et al.*, 2003) foi descrito por esses autores

como tendo medidas conidiais entre 37,5-41,5 μm de comprimento e 13-15,5 μm de largura. Os resultados das análises desse trabalho mostraram que nenhum dos 20 isolados pertence à espécie *D. scrobiculata*, portanto essas diferenças entre as medidas conidiais foram apenas relatadas, mas não discutidas. No entanto, muitos autores chamam atenção para a interface que ocorre entre as medidas dos conídios e que essa característica deve ser usada com cuidado, quando usada isoladamente como determinante na caracterização dos morfotipos (WANG *et al.*, 1985; WANG; BLANCHETTE; PALMER, 1986, JACOBS; REHNER,1998; SWART *et al.*, 1991, SWART; WINGFIELD, 1991).

5.1.3 Características conidiais por meio de Microscópio Eletrônica de Varredura

Os conídios dos 20 isolados fotografados ao M.E.V (FIGURA 7) apresentaram com parede lisa compatível com os morfotipos A ou C (PALMER, STEWART e WINGFIELD, 1987; DE WET *et al.*, 2003). Nenhum isolado pertence à espécie *D. scrobiculata*.

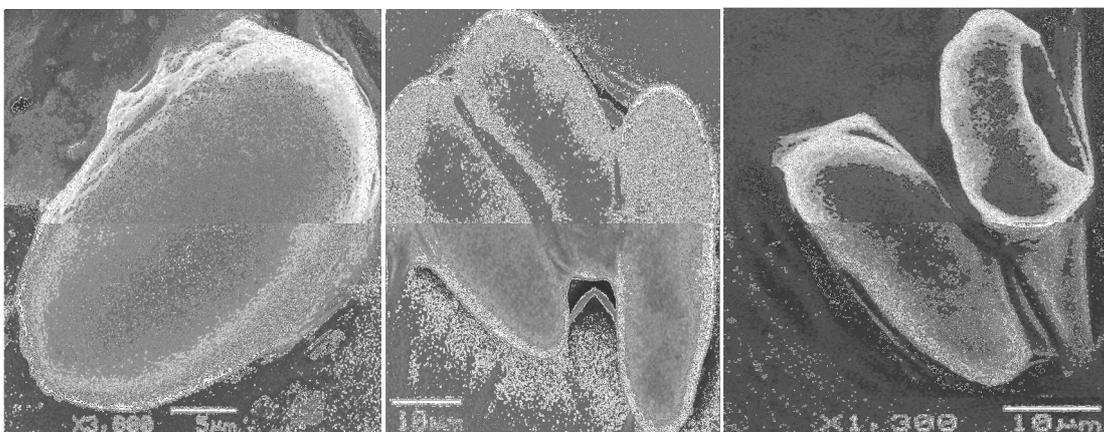


FIGURA 7. CONÍDIOS EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (M.E.V). À ESQUERDA CONÍDIO DO ISOLADO F-12, NO CENTRO CONÍDIOS DO ISOLADO F-11, À DIREITA CONÍDIOS DO ISOLADO DP-8.

FONTE: DONATTI, L. (2013)

O morfotipo C possui conídios com dimensões maiores que o morfotipo A e são mais agressivos (DE WET *et al.*, 2002; 2003). As fotografias em M.E.V confirmaram a tendência observada nas análises das medidas dos conídios, discutidas no item 5.1.2, que indicava a presença de *D. pineado* morfotipo A ou C.

Segundo Wang *et al.* (1985) os conídios com parede lisa são compatíveis com, o morfotipo A e os conídios com parede perfurada são compatíveis com *D. scrobiculata* (DE WET *et al.* 2002, 2003) Esses autores ressaltaram que as diferenças obtidas por fotografia em microscopia eletrônica da parede dos conídios são as únicas evidências morfológicas consideradas consistentes para diferenciar os morfotipos A da espécie *D. scrobiculata* (WANG *et al.*, 1985; WANG, BLANCHETTE, PALMER, 1986; PALMER, STEWART e WINGFIELD, 1987; DE WET *et al.*, 2003.).

WANG *et al.* (1985) ressaltaram também que as perfurações são visíveis apenas em conídios maduros. Pelas características reveladas ao M.E.V nenhum dos 20 isolados pertence à espécie *D. scrobiculata* porque não apresentaram parede com perfurações (FIGURA 7).

5.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Diplodia pinea*

5.2.1 Efeito da temperatura no crescimento micelial

Após três dias de cultivo micelial, os primeiros isolados de *D. pinea* atingiram a borda da placa de Petri (90 mm). Os resultados revelaram que nenhum dos isolados se desenvolveu nas temperaturas 8 e 40 °C.

Os isolados I11, DP11, B11, DP13, DP12 e E11 cresceram a temperatura de 36 °C.

Os resultados para o crescimento dos isolados revelaram que nas temperaturas de 12 e 16 °C o isolado E11 teve um crescimento de 19,75 mm e foi significativamente maior do que os outros isolados.

TABELA 5. CRESCIMENTO MICELIAL FINAL (MM) DE 20 ISOLADOS DE *Diplodia pinea* SOB DIFERENTES TEMPERATURAS EM MEIO BDA APÓS 3 DIAS.

| ISOLADO | Temperaturas (° C) | | | | | | | | |
|----------|--------------------|------------|------------|------------|---------|--------|--------|-------|-----|
| | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 |
| J11 | 0,0 | 10,1cdefg | 15,0cdefg | 33,1gh | 44,75c | 58,4bc | 0,0e | 0,0d | 0,0 |
| DP-7 | 0,0 | 16,1abc | 20bcdef | 37,75gh | 63,1bc | 75,6ab | 30,0b | 0,0d | 0,0 |
| I-11 | 0,0 | 10,1cdefg | 21,5abcde | 35,25gh | 67,1bc | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 0,0 |
| DP-3 | 0,0 | 11,1bcdef | 19,6bcdef | 20,0i | 75,0bc | 85,0a | 30,0b | 0,0d | 0,0 |
| K-11 | 0,0 | 8,4efg | 15,4cdefg | 40,0defg | 75,25bc | 85,0a | 85,0a | 4,0c | 0,0 |
| DP-9 | 0,0 | 5,1g | 9,75g | 37,75defgh | 85,0a | 85,0a | 17,6c | 0,0d | 0,0 |
| DP-10 | 0,0 | 6,7efg | 9,6g | 41,7def | 85,0a | 85,0a | 5,9de | 0,0d | 0,0 |
| H-12 | 0,0 | 7,25fg | 15cdefg | 75,0a | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 0,0d | 0,0 |
| DP-11 | 0,0 | 8efg | 24,4abc | 45,0de | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 0,0 |
| DP-6 | 0,0 | 8,1efg | 22,75defg | 44,6defg | 85,0a | 85,0a | 7,1de | 0,0d | 0,0 |
| DP-2 | 0,0 | 8,4efg | 16,9cdefg | 63,9b | 85,0a | 85,0a | 6,5de | 0,0d | 0,0 |
| B-11 | 0,0 | 8,5defg | 12fg | 33,75 gh | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 0,0 |
| F-11 | 0,0 | 9,75defg | 13,25efg | 45,25d | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 0,0d | 0,0 |
| G-12 | 0,0 | 9,75defg | 15,25cdefg | 38,1fgh | 85,0a | 85,0a | 11,1cd | 0,0d | 0,0 |
| DP-13 | 0,0 | 10,3cdefg | 15,25cdefg | 55,1c | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 0,0 |
| DP-12 | 0,0 | 10,75bcdef | 19,75bcdef | 55,75c | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 0,0 |
| F-12 | 0,0 | 13,6bcd | 26,4abcde | 65,25b | 85,0a | 85,0a | 0,0e | 0,0d | 0,0 |
| DP-8 | 0,0 | 14,1bcde | 26,25ab | 38,1efgh | 85,0a | 85,0a | 5,0de | 0,0d | 0,0 |
| C-11 | 0,0 | 16,5ab | 20bcdef | 40,0defg | 85,0a | 85,0a | 0,0e | 0,0d | 0,0 |
| E-11 | 0,0 | 19,75 a | 32,1 a | 55,5c | 85,0a | 85,0a | 85,0a | 46,8b | 0,0 |
| Média | 0,0 | 5,31 | 9,37875 | 22,32125 | 42,505 | 41,475 | 19,3 | 13,70 | 0,0 |
| CV | 0 | 0,59 | 2,842 | 6,768 | 0,16 | 0,15 | 2,03 | 2,91 | 0 |
| Desvpad. | 0 | 3,15 | 0,68 | 0,68 | 6,7 | 6,23 | 39,2 | 39,94 | 0 |

Ensaio repetido 2 vezes. As temperaturas limitrofes (8 e 40 °C) foram repetidas 5 vezes. Médias seguidas por letras minúsculas (coluna) iguais não apresentam diferença significativa entre si ($P < 0,05$, Tukey).
 FONTE O autor (2013)

Na temperatura de 20 °C, o isolado H12 apresentou crescimento de 75,0 mm e foi significativamente maior do que dos outros isolados nessa temperatura, sendo seguido pelos isolados F12 e DP2 com crescimento acima de 60,0 mm e pelos isolados E11 e DP12 com crescimento acima de 55 mm. O crescimento dos outros isolados não apresentou diferença significativa.

Na temperatura de 24 °C os resultados revelaram que não houve diferenças entre o crescimento dos isolados DP-9, DP-10, H-12 DP-11, DP-6, DP-2, B-11, F-11, G-12, DP-13, DP-12, F-12, DP-8, C-11, E-1, crescendo 85 mm cada, seguido pelos outros isolados que não apresentaram diferenças significativas entre eles.

Na temperatura de 28 °C os resultados revelaram que apenas o isolado J11 teve um crescimento significativamente menor do que os outros isolados que cresceram 85 mm cada.

Na temperatura de 32 °C os resultados revelaram que não houve diferenças significativas no crescimento dos isolados DP12, DP13, B11, DP11,

I 11, K11, H12, F11, crescendo 85 mm cada, sendo seguido pelos isolados D3 e DP7 que cresceram 30 mm cada e pelo isolado DP9, crescendo 17,9 mm. O crescimento dos outros isolados não apresentou diferenças significativas.

Na temperatura de 36 °C, os resultados revelaram que não houve diferenças significativas no crescimento dos isolados DP12, DP13, DP11, I11, B11, crescendo 85 mm cada, sendo seguido pelo isolado E11, com crescimento de 46,8 mm. O crescimento do restante dos isolados não apresentou diferenças significativas.

O teste de média das temperaturas revelou que não houve diferenças estatísticas significativas no crescimento dos isolados entre as temperaturas 12, 32, 36 °C e entre as temperaturas 24 e 28 °C. E que houve diferenças significativas entre o crescimento dos isolados nas temperaturas 12 e 16 °C; 16 e 24°C; 28 e 32 °C.

A temperatura média máxima de crescimento dos isolados e o comportamento temporal foi obtido pela análise de regressão (TABELA 6)

TABELA 6. ANÁLISE DE REGRESSÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL 20 ISOLADOS DE *Diplodia pinea* EM MEIO BDA SOB DIFERENTES TEMPERATURAS

| CÓDIGO ISOLADO | R ² | REGRESSÃO | PONTO MÁXIMO |
|----------------|----------------|-------------------------------------|--------------|
| F-12 | 0,6248 | $y = -0,2956x^2 + 13,88x - 95,755$ | 23,478 |
| J-11 | 0,6435 | $y = -0,1691x^2 + 7,9693x - 52,91$ | 23,564 |
| C-11 | 0,5451 | $y = -0,2619x^2 + 12,387x - 86,161$ | 23,648 |
| DP-8 | 0,5825 | $y = -0,2668x^2 + 12,648x - 88,248$ | 23,703 |
| H-12 | 0,5879 | $y = -0,3037x^2 + 14,402x - 103,65$ | 23,711 |
| DP-2 | 0,6258 | $y = -0,2891x^2 + 13,753x - 98,757$ | 23,786 |
| F-11 | 0,5390 | $y = -0,2673x^2 + 12,765x - 92,388$ | 23,878 |
| DP-6 | 0,6035 | $y = -0,2764x^2 + 13,202x - 95,112$ | 23,882 |
| G-12 | 0,5748 | $y = -0,2667x^2 + 12,853x - 94,38$ | 24,096 |
| DP-10 | 0,5386 | $y = -0,2655x^2 + 12,801x - 95,058$ | 24,107 |
| DP-7 | 0,7096 | $y = -0,2352x^2 + 11,329x - 79,373$ | 24,372 |
| DP-9 | 0,5785 | $y = 0,2685x^2 + 13,088x - 99,096$ | 24,446 |
| DP-3 | 0,5757 | $y = -0,2438x^2 + 11,92x - 87,904$ | 24,446 |
| K-11 | 0,6526 | $y = -0,2949x^2 + 14,869x - 115,98$ | 25,210 |
| E-11 | 0,8408 | $y = -0,3179x^2 + 16,077x - 118,93$ | 25,286 |
| DP-12 | 0,7291 | $y = -0,2882x^2 + 15,427x - 121,14$ | 26,764 |
| DP-13 | 0,7133 | $y = -0,2854x^2 + 15,342x - 121,67$ | 26,878 |
| DP-11 | 0,7139 | $y = -0,2796x^2 + 15,056x - 119,09$ | 26,924 |
| B-11 | 0,5771 | $y = -0,2598x^2 + 14,246x - 115,78$ | 27,417 |
| I-11 | 0,6524 | $y = -0,2417x^2 + 13,273x - 105,34$ | 27,458 |
| MÉDIA GERAL | | | 24,835 |

FONTE: O autor (2013)

Os dados obtidos pela regressão mostraram que o ponto máximo de temperatura dos isolados variou entre 23,47 °C para o isolado F12 e 27,45 °C

para o isolado I-11 e que a temperatura média máxima para os 20 isolados foi de 24,84 °C .

A temperatura para crescimento média máxima é um dado importante em uma caracterização fisiológica, porque mostra qual a temperatura mais adequada para a incubação e cultivo. Essa temperatura variou de 23,47 °C (F-12) a 27,46 °C (I-11). Deve-se ressaltar que quanto às temperaturas testadas a melhor temperatura para crescimento micelial encontrada foi de 28 °C e a média geral foi de 24,8 °C.

A temperatura ótima de crescimento para *D. pinea*, segundo alguns autores, foi relatada de 25 °C (SWART; KNOX–DAVIES; WINGFIELD, 1985; PALMER; STEWART; WINGFIELD, 1987). No entanto, estudos realizados por Vasiljević e Glavonjić (2011) sobre o efeito da temperatura no crescimento micelial de *D. pinea* revelaram que o crescimento ótimo em meio BDA ocorreu entre as temperaturas de 25 °C e 28°C, mas que a temperatura ótima foi de 28°C. Esse mesmo estudo revelou que o fungo cresceu bem nas temperaturas entre 10 °C e 35 °C, mas que um pequeno número de isolados cresceu também entre as temperaturas de 4 °C e 40 °C, em BDA, e que apenas nessas temperaturas não foram verificadas diferenças de crescimento entre os isolados.

Nenhum isolado nesse estudo foi avaliado na temperatura de 4 °C, porque já não houve crescimento na temperatura de 8 °C.

5.2.2 Efeito da temperatura na esporulação

Pode-se observar que não houve formação de picnídios em nenhum isolado nas temperaturas de 8, 36, 40 °C (TABELA 7). Os resultados revelaram que a produção de picnídios e conídios variou de acordo com a temperatura em que os isolados foram colocados para cultivo, em meio APA. Observou-se desenvolvimento preferencial dos picnídios sobre e sob acículas. Esses resultados concordam com os resultados de outros autores (WANG *et al.*, 1985).

Os isolados apresentaram picnídios inicialmente claros e com o passar do tempo foram escurecendo, ficando após 7 dias, com tonalidade marrom escura para preta.

TABELA 7. TEMPO DECORRIDO PARA DESENVOLVIMENTO DE PICNÍDIOS NOS 20 ISOLADOS DE *Diplodia pinea* EM DIFERENTES TEMPERATURAS EM MEIO APA

| ISOLADOS | Temperaturas (° C) | | | | | | | | |
|----------|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 |
| B-11 | - | 12 | 12 | 8 | 8 | 8 | 12 | - | - |
| H-12 | - | - | 06 | 6 | 6 | 6 | 6 | - | - |
| DP 11 | - | 26 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | - | - |
| DP-7 | - | - | 12 | 12 | 6 | 6 | 12 | - | - |
| DP-9 | - | - | 12 | 7 | 6 | 6 | 13 | - | - |
| DP-3 | - | 15 | 8 | 8 | 8 | 8 | 15 | - | - |
| C-11 | - | 27 | 16 | 8 | 8 | 8 | 13 | - | - |
| J-11 | - | 27 | 33 | 15 | 15 | 14 | - | - | - |
| DP-13 | - | 12 | 12 | 8 | 8 | 8 | 12 | - | - |
| K-11 | - | 33 | 08 | 8 | 8 | 8 | 8 | - | - |
| E-11 | - | 27 | 08 | 8 | 8 | 8 | 8 | - | - |
| DP-12 | - | 25 | 08 | 8 | 8 | 8 | 8 | - | - |
| F-11 | - | 13 | 05 | 13 | 5 | 5 | 5 | - | - |
| F-12 | - | 13 | 05 | 5 | 5 | 5 | 5 | - | - |
| G-12 | - | 25 | 10 | 13 | 6 | 7 | - | - | - |
| I-11 | - | 27 | 33 | 27 | 6 | 6 | 25 | - | - |
| DP-6 | - | 25 | 08 | 8 | 5 | 5 | 5 | - | - |
| DP-2 | - | 25 | 10 | 9 | 6 | 6 | 6 | - | - |
| DP-10 | - | 33 | 15 | 8 | 8 | 8 | 8 | - | - |
| DP-8 | - | 33 | 15 | 8 | 8 | 8 | 8 | - | - |

O símbolo (-) significa que não houve formação de picnídios

FONTE: O autor (2013).

O desenvolvimento dos picnídios iniciou-se entre 6 a 15 dias após a incubação, nas temperaturas entre 24 e 28 °C, com exceção do DP-7 e H-12 que formaram picnídios nas temperaturas de 12, 16 e 32 °C, com 33 dias de incubação.

Os resultados revelaram variação na formação de picnídios, evidenciando-se desenvolvimento de picnídios desde a temperatura de 12 até 32 °C. Em 2007, Basilio relatou que os isolados de *D. pinea* avaliados produziram picnídios com 7 a 10 dias de incubação sob luz constante em meio APA, e que em nessas condições também foram observadas variações entre os isolados. Conídios hialinos (imaturos) podiam ser observados dentro dos picnídios com 7 a 14 dias após o surgimento dos picnídios. No entanto, o tempo para a maturação dos conídios apresentou ampla variação.

Os isolados de *D. pinea* apresentaram conídios maduros após 30 dias de incubação a 24 °C (TABELA 8). Nas temperaturas de 12, 16 e 32 °C apenas o isolado DP-6 apresentou conídios maduros após 38, 51 e 51 dias de incubação, nas respectivas temperaturas. Na temperatura de 20 °C apresentaram conídios maduros os isolados de H-12, DP-11, DP-7, E-11, DP-12, F-11, I-11 e DP-6.

TABELA 8. TEMPO DECORRIDO PARA FORMAÇÃO DE CONÍDIOS MADUROS NOS 20 ISOLADOS DE *Diplodia pinea* EM DIFERENTES TEMPERATURAS EM MEIO APA

| ISOLADOS | Temperaturas (° C) | | | | | | | | |
|----------|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 |
| B-11 | - | - | - | - | 54 | - | - | - | - |
| H-12 | - | - | - | 51 | - | - | - | - | - |
| DP-11 | - | - | - | 48 | - | - | - | - | - |
| DP-7 | - | - | - | 48 | - | - | - | - | - |
| DP-9 | - | - | - | - | 48 | - | - | - | - |
| DP-3 | - | - | - | - | 48 | - | - | - | - |
| C-11 | - | - | - | - | 51 | - | - | - | - |
| J-11 | - | - | - | - | 51 | - | - | - | - |
| DP-13 | - | - | - | - | 54 | - | - | - | - |
| K-11 | - | - | - | - | 54 | - | - | - | - |
| E-11 | - | - | - | 31 | 31 | 31 | - | - | - |
| E-11 | - | - | - | 31 | 30 | 31 | - | - | - |
| F-11 | - | - | - | 31 | 30 | 30 | - | - | - |
| F-12 | - | - | - | 31 | 30 | 30 | - | - | - |
| G-12 | - | - | - | - | 35 | - | - | - | - |
| I-11 | - | - | - | - | 35 | - | - | - | - |
| DP10 | - | 51 | 51 | 48 | 48 | 54 | 48 | - | - |
| DP-2 | - | - | - | - | 48 | 54 | - | - | - |
| DP-6 | - | - | - | - | 48 | 54 | - | - | - |
| DP-8 | - | - | - | - | 48 | 54 | - | - | - |

O símbolo (-) significa que não houve formação de conídios.

FONTE: O autor (2013).

Na temperatura de 24 °C apresentaram conídios maduros os isolados B-11, DP-9, DP-3, C-11, DP-13, J-11, K-11, E-11, DP-12, F-11, F-12, G-12, I-11, DP-6, DP-2, DP-10 e DP-8. Não formaram conídios maduros nessa temperatura apenas os isolados H 12, DP-11 e DP-7, que formaram conídios maduros na temperatura de 20 °C.

Na temperatura de 28 °C apresentaram conídios maduros os isolados F-12 e DP-6. Esse resultado chama atenção porque os 20 isolados avaliados cresceram muito bem na temperatura de 28 °C, no entanto nessa mesma temperatura apenas oito isolados conseguiram desenvolver esporos maduros.

Apesar da temperatura ótima para crescimento micelial e desenvolvimento de picnídios encontrada nesse estudo ter variado entre 24 e 28 °C, os isolados apresentaram conídios maduros, principalmente, na temperatura de 24 °C, seguido pela temperatura de 28 e 20 °C.

Basilio *et al.* (2007) evidenciaram que para se obter uma boa quantidade de conídios maduros nos isolados em temperatura de 25 °C sob luz constante foi necessário deixá-los em incubação por pelo menos 30 dias. Os isolados E-11, DP-12, F-11 e F12 desenvolveram conídios maduros nas temperaturas de 24 e 28 °C, com 30 dias de incubação, menor tempo registrado nesse estudo. O isolado DP-10 foi o único que apresentou conídios maduros em quase todas as temperaturas avaliadas (12, 16, 20, 24 e 28 °C). As diferenças apresentadas por esses isolados podem estar revelando uma vantagem fisiológica frente aos outros isolados, pode torná-los mais competitivos que os outros isolados. A capacidade em desenvolver conídios maduros numa velocidade superior pode permitir que esses isolados dispersem seus esporos antes. Além disso, a capacidade em desenvolver conídios maduros em uma ampla faixa de temperatura pode permitir que o isolado sobreviva, reproduza e se disperse para todos os Biomas do Brasil. Os isolados F-11 e F12 e o isolado DP10 já tinham se revelado como bastante agressivos em estudos anteriores, relatado em BASILIO (2008) e CORRÊA *et al.* (2011).

5.3 AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Diplodia pinea* EM MUDAS DE *Pinus taeda* E *Pinus elliottii* var. *elliottii*

Verificaram-se diferenças significativas entre o tamanho das lesões provocadas pelo isolado B11 em relação aos outros isolados de *D. pinea* inoculados nas mudas de *P. taeda*. No caso de *P. elliottii* var. *elliottii*, as diferenças significativas foram verificadas entre os isolados B11, I11, J11 e DP8 e os isolados H12, DP13, DP9, C11, DP11, G12, K11, F11, F12, DP6 (TABELA 9).

Os resultados mostraram também que não houve diferença significativa entre os isolados DP12, DP3, DP2, DP10, DP7, H12, DP13, DP9,

C11, DP11 e os outros isolados quando inoculados em mudas de *P. elliotii* var *elliotii*.

TABELA 9. LESÕES (CM) EM MUDAS DE *Pinus taeda* E *Pinus elliotii* var. *elliotii* INOCULADAS COM ISOLADOS DE *Diplodia pinea* OBTIDOS DE *Pinus*

| ESPÉCIES | | | | | |
|--------------------|-------|---|-----------------------|-------|--------|
| <i>Pinus taeda</i> | | | <i>Pinus elliotii</i> | | |
| ISOLADOS | MÉDIA | | ISOLADOS | MÉDIA | |
| B11 | 7,10 | a | B11 | 4,50 | a |
| I11 | 2,85 | b | DP6 | 4,00 | ab |
| J11 | 2,60 | b | DP2 | 3,85 | abc |
| DP8 | 2,30 | b | DP8 | 3,45 | abc |
| E11 | 2,10 | b | DP3 | 3,30 | abcdef |
| DP12 | 2,10 | b | G12 | 2,90 | abcdef |
| DP3 | 1,90 | b | K11 | 2,50 | abcdef |
| DP2 | 1,90 | b | DP10 | 2,50 | abcdef |
| DP10 | 1,85 | b | DP7 | 2,10 | bcdef |
| DP7 | 1,70 | b | J11 | 1,90 | cdef |
| H12 | 1,40 | b | DP11 | 1,70 | def |
| DP13 | 1,30 | b | F11 | 1,70 | def |
| DP9 | 1,20 | b | E11 | 1,40 | def |
| C11 | 1,10 | b | H12 | 1,35 | def |
| DP11 | 1,10 | b | DP13 | 1,20 | def |
| G12 | 1,10 | b | C11 | 1,20 | def |
| K11 | 1,00 | b | DP9 | 1,15 | f |
| F11 | 1,00 | b | I11 | 1,15 | f |
| F12 | 1,00 | b | F12 | 1,10 | f |
| DP6 | 1,00 | b | DP12 | 1,00 | f |
| TESTEMUNHA | 1,00 | b | TESTEMUNHA | 1,00 | f |

*Médias seguidas por letras minúsculas (coluna) iguais não apresentam diferença significativa entre si ($P < 0,05$, Tukey).

FONTE: O autor (2013)

Alguns isolados, no entanto, apresentaram resultado similar quanto ao tamanho das lesões quando inoculados nas mudas de *P. taeda* ou *P. elliotii* var *elliotii* como, por exemplo, os isolados DP8, DP3, DP2, DP10, DP7, F12. Neste caso, não houve interação.

Houve interação entre os isolados inoculados e as mudas de *P. taeda* e *P. elliotii* var *elliotii*. Essa interação pode ser visualizada no tamanho das lesões provocadas pelos isolados I11, DP12, E11 que foram muito agressivos nas mudas de *P. taeda* e pouco agressivos nas mudas de *P. elliotii* var *elliotii* e tamanho das lesões provocadas pelos isolados G12, K11, DP6 que foram muito agressivos nas mudas de *P. elliotii* var *elliotii* e pouco agressivos nas mudas de *P. taeda*.

De acordo com os resultados, as interações entre os isolados de *D. pinea* e os hospedeiros *P. taeda* e *P. elliotii* var *elliotii* foram evidentes quando se avaliou a maior ou menor severidade produzida pelos isolados.

Os isolados desse estudo foram obtidos principalmente em *P. taeda* (TABELA 2) com sintomas de seca de ponteiro (FIGURA 8) e cancro em *P. patula* provocado pelo *D. pinea*. Na África do sul, *D. pinea* provoca severas doenças de raízes em plantios adultos de *P. elliotii* e *P. taeda*. Os sintomas nessas espécies vão desde o azulamento e lesões radiais em raízes jovens que se estendem em direção as raízes mais velhas e em direção ao fuste até a necrose e das acículas. Também nessas espécies a doença ocorre sob condições de estresse, sendo que seca prolongada foi reportada como o pior fator estressante (WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1980b).



FIGURA 8. MORTE DE PONTEIRO DE MUDAS DE *Pinus taeda* INOCULADAS COM *Diplodia pinea*.

FONTE:O autor (2013)

No Brasil, o fungo *D. pinea* não têm causado impactos importantes nos plantios comerciais de *P. taeda* e *P. elliotii* var *elliotii*, bem como a produção de mudas em viveiro. No entanto, no exterior, *D. pinea* tem demonstrado habilidade em desenvolver linhagens mais agressivas e caso essas linhagens sejam disseminadas existe risco potencial de danos e grande impacto

econômico. Esse risco foi demonstrado pelo USDA (1992), onde esse serviço classificou *D. pinea* com um alto potencial de dispersão e alto potencial de risco econômico para os EUA.

Outra situação que causa preocupação é que em condições de estresse e/ou associado com outros fungos *D. pinea* agrava ou produz maior dano nas plantas hospedeiras (HILDEBRAND, 2005). Essa mesma autora relatou que tal estresse proporcionaria condições ideais para um surto associado de *D. pinea* com *Fusarium circinatum*, nos EUA, colocando em risco os remanescentes nativos de *P. radiata*. Essa condição de associação de *D. pinea* com outros fungos também foi registrada no Havá e Venezuela, com *Lasiodiplodia theobromae* e *Botryosphaeria dothidea*, respectivamente (WINGFIELD; KNOX-DAVIES, 1980b).

O reisolamento de *D. pinea* nas 420 mudas do ensaio mostrou resultados interessantes. Nas mudas de *P. taeda* verificou-se que: *i*) os isolados de *D. pinea* não provocaram lesão em 76,2 % das mudas, *ii*) o fungo foi reisolado em 8,6% das mudas com sintomas do patógeno, *iii*) os isolados foram reisolados em 15,2 % das mudas sem sintoma do patógeno. Nas mudas de *P. elliottii* var *elliottii* verificou-se que: *i*) os isolados de *D. pinea* não provocaram lesão em 86,7 % das mudas, *ii*) os isolados foram reisolados em 10 % das mudas com sintomas do patógeno, *iii*) os isolados foram reisolados em 3,3 % das mudas de *P. elliottii* var *elliottii* sem sintoma.

TABELA 10. REISOLAMENTO DE *Diplodia pinea* EM MUDAS INOCULADAS DE *Pinus taeda* E *Pinus elliottii* var *elliottii*

| ESPÉCIE TESTADA | Muda assintomática a sem patógeno | Incidência (%) | Muda sintomática com patógeno | Incidência (%) | Muda assintomática com patógeno | Incidência (%) |
|---|-----------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|
| <i>Pinus taeda</i> | 32 | 15,2 | 18 | 8,6 | 160 | 76,2 |
| <i>Pinus elliottii</i> var <i>elliottii</i> | 7 | 6,4 | 21 | 10 | 182 | 86,7 |

FONTE: O autor (2013)

D. pinea não provocou lesões mesmo após terem sido proporcionadas todas as condições para o desenvolvimento do patógeno. Os resultados revelaram que a doença pode ficar assintomática nas mudas das espécies

testadas, principalmente nas mudas de *P. taeda*. Basilio (2008) inoculou mudas de *P. taeda* com quatro isolados de *D. pinea* para avaliar sua agressividade e encontrou resultados semelhantes aos relatados nesse estudo.

SMITH *et al.* (1996) sugerem que *D. pinea* seja considerado como um patógeno latente capaz de infecções endofíticas. Nesta condição endofítica Petrini (1991) afirmou que os patógenos encontram-se totalmente dentro dos tecidos sadios do hospedeiro e associam-se com outros patógenos latentes e com fungos micorrízicos. A hipótese de SMITH *et al.* (1996) vai de encontro com a visão primária de que o fungo *D. pinea* é um patógeno principalmente oportunista e que prefere colonizar tecidos injuriados e estressados. A presença de picnídios do patógeno em tecidos anteriormente sadios deve estimular uma reflexão na suscetibilidade das espécies ao *D. pinea* porque o fungo sempre foi encontrado primariamente em árvores de espécies já conhecidas como mais suscetíveis (SMITH *et al.* 1996) como o *P. radiata* e o *Pinus patula*

Outros fitopatógenos foram isolados das mudas de *P. taeda* e *P. elliotti* var *elliottii* inoculadas com *D. pinea*. Foram identificados *Pestalotia* sp. (1,43 %), *Alternaria* sp. (0,43 %) e *Botryodiplodia* sp. (0,43 %). Morfologicamente, o patógeno *Botryodiplodia* sp. é difícil de ser diferenciado do *D. pinea* por que forma picnídios escuros na sua forma anamórfica (assexuada), o que dificulta o diagnóstico. Portanto, para a correta diagnose do patógeno, o material deve ser mantido em câmara úmida e a confirmação através da montagem do exame de lâminas ao microscópio ótico.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *Diplodia pinea*

Com base nas sequências ITS1- 5.8S- ITS4 rDNA e utilizando-se as sequências de linhagens de *D. pinea* (ALVES; CORREIA; PHILLIPS, 2006; DE WET *et al.*, 2003; DE WET *et al.*, 2009; FLOWERS; HARTMAN; VAILLANCOURT, 2003) depositadas no *Genbank* do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) as análises por inferência Bayesiana confirmaram que as sequências obtidas dos 20 isolados pertencem ao fungo *D. pinea* com

similaridade de 100 % (FIGURA 9). Este resultado confirma as características morfológicas e fisiológicas dos isolados serem de *D. pinea*.

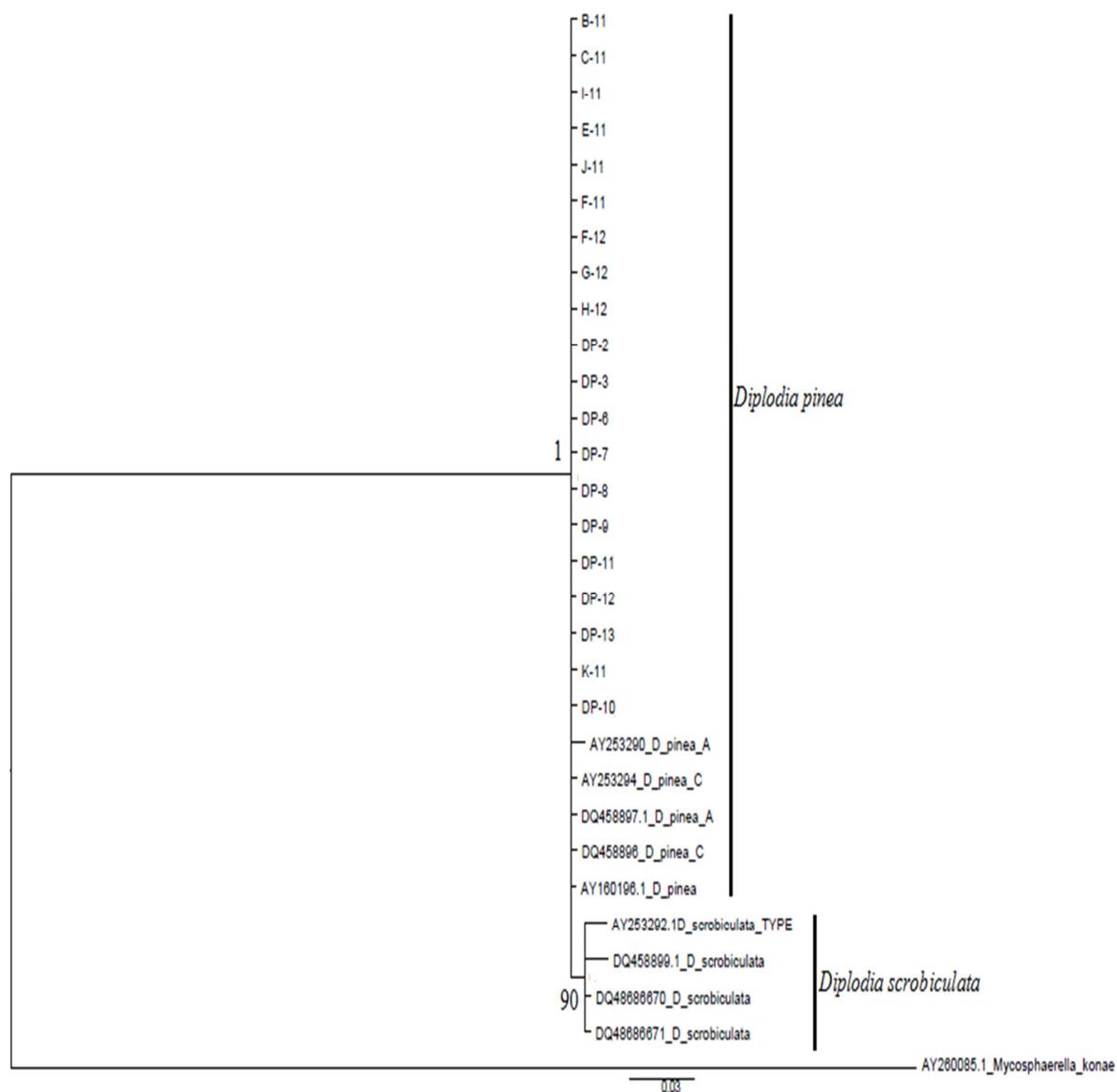


FIGURA 9. ARVORE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE *Diplodia pinea* PELA INFERÊNCIA BAYESIANA BASEADA NAS SEQUÊNCIAS ITS1 -5.8S-ITS4 rDNA. OS VALORES DOS RAMOS REPRESENTAM AS PROBABILIDADES POSTERIORES. FONTE: O autor (2013)

Os 20 isolados de *D. pinea* formaram um clado robusto e separado das sequências de *D. scrobiculata*, formando grupos monofiléticos (FIGURA 9). A região ITS1- 5.8S - ITS4 do rDNA foi capaz de separar as duas espécies porque foram agrupadas nesse estudo com sequências type de *D. pinea*

(ALVES; CORREIA; PHILLIPS, 2006; DE WET *et al.*, 2003; DE WET *et al.*, 2009). Na ausência desse critério, o resultado poderia ser o agrupamento das sequências com diferentes espécies, inviabilizando um resultado confiável.

Os isolados apresentaram-se com baixa variabilidade, fato que pode ser evidenciado nas sequências analisadas nesse trabalho onde apenas dois nucleotídeos apresentaram variação em um total de 460 nucleotídeos analisados por isolado, o que caracteriza a presença de linhagens clonais. A baixa diversidade genética dos isolados de *D. pinea* já havia sido relatada por Basílio (2008), através de análises de RAPD de 4 isolados, que estão presentes nesse estudo (DP6, DP7, DP10, F11).

A tendência de formar linhagens clonais foi relatada em trabalhos de caracterização de *D. pinea* por McDonald (1997). De Wet *et al.* (2002) relataram que a tendência de formar linhagens clonais é uma característica ligada ao morfotipo A, porque apresentam baixa diversidade genética e dividem muitos locos genotípicos entre as populações nos diferentes continentes (WANG *et al.*, 1985; SMITH; STANOSZ, 1995; STANOZ; SMITH; MARK, 1996; BURGESS *et al.*, 2004).

A diversidade genotípica observada no *D. pinea* nos países do Hemisfério Sul é consistente com registros históricos da quantidade e frequência de sementes e germoplasma introduzido dentro e entre esses países. Na África do Sul, Nova Zelândia e Austrália a diversidade do *D. pinea* coincide com o número de introduções de *D. pinea* que ocorreu nesses países. Na África do Sul onde ocorreram várias introduções antes de ser obrigatório o procedimento de quarentena, o fungo possui diversidade genética maior do que na Nova Zelândia e Austrália (BURGESS; WINGFIELD, 2002). Portanto, a diversidade dentro de uma população introduzida de *D. pinea* fornece uma boa indicação do número de introduções do fungo (BURGESS; WINGFIELD, 2002).

Sob essa ótica, pode-se imaginar que os 20 isolados de *D. pinea*, apesar de terem sido isolados de 14 localidades diferentes na região Sul e Sudeste, devem ter sido introduzidos no Brasil de uma única origem e provavelmente uma única vez.

O conhecimento do morfotipo de *D. pinea* presente nas áreas de plantio de pinus é importante, principalmente se o plantio for de espécie suscetível ao patógeno. O morfotipo A é amplamente distribuído por várias

partes do mundo inclusive no Hemisfério sul e o morfotipo C apresenta distribuição restrita tendo sendo isolado apenas na Indonésia e México (De WET *et al.*, 2003). Altos níveis de similaridade genética foram observados entre os isolados de *D. pinea* morfotipo A e C e nenhuma correlação geográfica foi observada entre eles (DE WET *et al.*, 2001)

As análises morfológicas e fisiológicas realizadas nesse estudo indicaram que os isolados presentes são morfotipo A. No entanto, o comprimento dos conídios dos isolados DP10, DP8 e C11 pode ser compatível com os morfotipos A ou C. Mas, não foram observadas outras diferenças relatadas na literatura que poderiam dar suporte a essa hipótese, como diferença de agressividade, especificidade ao hospedeiro e maior taxa de crescimento em meio BDA (WANG *et al.*, 1985; SMITH; STANOSZ, 1995; STANOSZ; SMITH; MARK, 1996; BURGESS *et al.*, 2004).

As populações de *D. pinea* morfotipo A tem baixa diversidade genética, pouca diferença gênica entre as populações e compartilha alelos entre as populações nos diferentes continentes (BURGESS; WINGFIELD; WINGFIELD, 2004; BURGESS *et al.* 2004) sugerindo uma longa história de reprodução assexuada e uma constante seleção. Essa situação peculiar pode ter sido a conexão para o fungo *D. pinea* ser endofítico.

Diante dessa hipótese, é possível que as populações do morfotipo A de *D. pinea* tenham dificuldade em vencer uma resistência do hospedeiro. Portanto, um programa de melhoramento visando seleção para resistência ao hospedeiro para o morfotipo A deve ser considerado uma opção viável e duradoura (BURGESS; WINGFIELD, 2002; BIHON *et al.*, 2011).

Esses resultados são promissores para os programas de melhoramento de *Pinus* visando resistência ao *D. pinea* no Brasil. Uma das possibilidades é o desenvolvimento de material genético de *P. radiata* resistente ao fungo (BASÍLIO, 2008) e estimular o plantio dessa espécie na região Sul do Brasil.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- a. As análises morfofisiológicas e moleculares mostram que os isolados analisados pertencem ao morfotipo A de *Diplodia pinea*.
- b. Existe baixa diversidade genética entre os isolados analisados, apontando para presença de linhagens clonais.
- c. Houve interação entre os isolados de *Diplodia pinea* e *Pinus taeda* e *Pinus elliottii* evidenciada pela avaliação da severidade.
- d. O isolado B11 foi o mais agressivo para as duas espécies de *Pinus*.

REFERÊNCIAS

- ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2013** - ano base 2012 /ABRAF. Brasília.
Disponível em:<<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF11/ABRAF11EN.pdf>>Acesso em: 10/08/2013
- ALVES, A.; CORREIA, A., LUQUE, J.; PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeriocorticola* sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*. **Mycologia**, New York, v. 96, n.3, p.598-613, 2004.
- ALVES, A.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp.nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp *cupressi*, as a distinct species. **Fungal Diversity**, v.23, p.1-15, 2006.
- ALVES, A.; CROUS, P. W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, 1-13, 2008.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AUER, C.G.; GRIGOLETTI, J. A.. SANTOS, A. F. **Doenças em Pinus: identificação e controle**. Embrapa Florestas. Circular técnica. 48. 28p. Colombo. 2001.
- 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.
- BASILIO, P. R. R. C. **Caracterização de isolados de Sphaeropsis sapinea e avaliação da resistência em progênie de Pinus radiata**. 2008. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- BIHON, W; BURGESS, T; SLIPPERS, B; WINGFIELD, M. J; WINGFIELD, B. D.

Distribution of *Diplodia pinea* and its genotypic diversity within asymptomatic *Pinus patula* trees. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 40, n.5, p.540-548, 2011

BLODGETT, J. T., KRUGER, E. L.; STANOSZ, G. R. *Sphaeropsis sapinea* and water stress in a red pine plantation in central Wisconsin. **Phytopathology**, Saint Paul, v.87, n. 4, p.429-434, 1997.

BLODGETT, J. T.; STANOSZ, G. R. Differences in aggressiveness of *Sphaeropsis sapinea* RAPD marker group isolates on several conifers. **PlantDisease**, Saint Paul, v. 83, n.9, p.853-856, 1999.

BLODGETT, J.T.; BONELLO, P. The aggressiveness of *Sphaeropsis sapinea* on Austrian pine varies with isolate group and site of infection. **Forest Pathology**, v.33, n. 1, p.15-19, 2003.

BLODGETT, J.T.; HERMS, D. A.; BONELLO, P. Effects of fertilization on red pine defense chemistry and resistance to *Sphaeropsis sapinea*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 208, n.1/3, p.373-382, 2005.

BROOKHOUSER L. W.; PETERSON, G.W. Infection of Austrian, Scots, and *Ponderosa Pines* by *Diplodia pinea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 4, p. 409-414, 1971.

BURDON, R. D.; CURRIE, D.; CHOU, C.K.S. Responses to inoculation with *Diplodia pinea* in progenies of apparently resistant trees of *Pinus radiata*. **Australian Journal of Plant Pathology**, Melbourne, v.11, n. 4, p.37-39, 1982.

BURGESS, T.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. W. Comparison of genotypic diversity in native and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolate from *Pinus radiata*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 1331-1339, 2001a.

BURGESS, T.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. W. Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.1, p. 354–362, 2001b.

BURGESS T.; WINGFIELD, M. J. Quarantine is important in restricting the spread of exotic seed-borne tree pathogens in the southern hemisphere. **International Forestry Review**, Dinchope, v. 4, n. 1, p.56-65, 2002.

BURGESS, T.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. W. Global distribution of *Diplodia pinea* genotypes revealed using sequence repeat (SSR) markers. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v.33, n. p.513-519, 2004.

BURGESS, T. I.; GORDON, T. R.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B.D. Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n.12, p. 1399-1406, dec, 2004.

BUTIN, H.; PEREDO, H. Hongos parásitos en coníferas de América del Sur con especial referencia a Chile. J. Cramer, Berlin-Stuttgart, **Biblioteca Mycológica**, v. 101, p. 100, 1986.

CEDEÑO, L.; CARRERO, C.; FRANCO W.; TORRES LEZAMA, A. *Sphaeropsis sapinea* asociado con quema del cogollo, muerte regresiva y cáncer en troncos, ramas y raíces del pino Caribe en Venezuela. **Interciencia**, Caracas, v.26, n. 5, p. 210-214, 2001.

CHOU, C.K.S. A shoot dieback in *Pinus radiata* caused by *Diplodia pinea*. II. inoculation studies. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, v. 6, p. 409-420, 1976.

CHOU, C.K.S. Penetration of young stems of *Pinus radiata* by *Diplodia pinea*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 13, n. 2, p.189–192, 1978.

CHOU, C.K.S. Crown wilt of *Pinus radiata* associated with *Diplodia pinea* infection or woody stems. **European Journal of Forest Pathology**, Hamburg, v.17, n.7, p. 398-411, 1987.

CORRÊA, P. R. R.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F dos; HIGA A. R. Metodologia de avaliação da agressividade de isolados de *Sphaeropsis sapinea* em *Pinus taeda*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 41, n. 2, p. 347-354, 2011.

CORRÊA, P; R. R.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. dos; HIGA, A. R. Seleção precoce de progênies de *Pinus radiata* a *Sphaeropsis sapinea*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 275-281, abr.-jun., 2012.

CROUS, P. W; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F.O.; PHILIPS, A. J.L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v.55, n. 1, p. 235–253, 2006.

DE WET, J.; WINGFELD, M.J.; COUTINHO, T.A; WINGFELD, 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.

DE WET, J.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T.; WINGFIELD, B. D. Characterisation of “C” morphotype of the pine pathogen *Sphaeropsis sapinea*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 161, n. 1/3, p.181-188, 2002.

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.

DE WET, J; SLLIPPERS, B.; PRELSIG, O.; WINGFIELD, B. D ; WNGFIELD, M. J. Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. **Molecular Phylogenetics and Evolution**,San Diego, v 46, n.1, p. 116-126, 2008.

DENMAN, S.; CROUS, P.W.; TAYLOR, J.E.; CHUAN KANG-JI; PASCOE, I. WINGFIELD, M.J. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies inMycology**, v. 45, p.129-140, 2000.

DICK, M. A. *Sphaeropsis sapinea*Diseases of Pines – A Review from a New Zealand Perspective.**Forest Research Contract Report No. 8990**. Rotorua: Scion ,nov., 1999. Disponível em :<<http://www.nzffa.org.nz/farm-forestry-model/the-essentials/forest-health-pests-and-diseases/diseases/Sphaeropsis-sapinea/sphaeropsis-sapinea-a-review/>>. Acessado em 21 de novembro de 2013.

ELDRIDGE, K. G. 1957. *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx,a parasite on *Pinus radiata*. M.S. thesis, University of Melbourne, Melbourne, Australia. 67 p.

ELDRIDGE, K. G. 1978.**Refreshing the genetic resources of radiata pine plantations**. Detailed Internal report of seed collections of *Pinus radiata* from its 5 natural populations,Feb./march 1978. 7. Canberra, CSIRO Division of Forest Research, Genetics Section.

FERREIRA, F. A. 1989 **Patologia Florestal; principais doenças florestais do Brasil**. Viçosa, Sociedade de investigação florestal, 1989, 570p.

FIGTREE **Visualizador gráfico de árvores filogenéticas**. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>> Acesso em fevereiro de 2013.

FISHER, M. C.; KOENIG, G.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n.8, p. 1164–1174, 2000.

FLOWERS, J.; NUCKLES, E.; HARTMAN, J.; VAILLANCOURT, L. Latent infection of Austrian and Scots pine tissues by *Sphaeropsis sapinea*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n.10, p.1107-1112, 2001.

FLOWERS, J; HARTMAN, J.; VAILLANCOURT, L. Detection of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in Austrian Pine tissues Using nested-polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n.12, 2003

FLOWERS, J. L.; HARTMAN, J. R.; VAILLANCOURT L. J. Histology of *Diplodia pinea* in diseased and latently infected *Pinus nigra* shoots. **Forest Pathology**, Cambridge, v. 36, n. 6, p. 447–459, 2006.

FURLAN, R. de A.; MORI, E. S.; TAMBARUSSI, E., V.; MORAES, C. B. de; JESUS, F. A. de; ZIMBACK, L. Estrutura genética de populações de melhoramento de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* por meio de marcadores microsatélites. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 553-563, 2007.

GARCIA, B.; DIEZ, J. Uso del método de rodales y sistemático para evaluar daños por *Sphaeropsis sapinea* en *Pinus radiata* afectado por granizo em Bizkaia, España. **Bioagro**, Barquisimeto, v.15, n.1, p. 3-16, jan. 2003.

PROGRAMA GENE5. **Aplicativo computacional em Genética e Estatística Experimental**. Disponível em : <<http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>> <https://www.google.com.br/>

GERHOLD, H. D.; RHODES, H. L. H.; WENNER, N. G. Screening *Pinus sylvestris* for resistance to *Sphaeropsis sapinea*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, n. p. 333-338, 1994.

GIBSON, I. A. S. **Diseases of Forest Trees widely planted on Exotics in the Tropics and Southern Hemisphere**. Part 2. The genus *Pinus*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.London, 135 p.,1979.

GIESLER, L. J. **Extension Plant Pathologist File G646 under:** Plant Diseases B-6, Trees Revised June 2000, 5,000 Electronic version issued May 2003. Disponível em: <www.oznet.kstate.edu/pathext/factSheets/Trees/Pines/Sphaeropsis%20Tip%20Blight%20of%20Pines.asp>.

HADDOW, W. R., NEWMAN, F. S.. **A disease of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) caused by the fungus *Diplodia pinea* Kicky, associated with the pine spittle-bug (*Aphrophora parallela* Say).** I, symptoms and etiology. Royal Canadian Institute, Transactions, v. 24, n. 1, p. 19, 1942.

HALL, T. A. **BioEdit 4.8.** Raleigh, 1997-2001. 1arquivo (11,5 M). Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/.html>> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.

HANSO, M.; DRENKHAN, R. *Diplodia pinea* is a new pathogen on Austrian pine (*Pinus nigra*) in Estonia. **Plant Pathology**, London, v. 58, p.797, 2009.

HAUSNER, G.; HOPKINS, A.A.; DAVIS, C.N.; REID, J. Variation in culture and rDNA among isolates of *Sphaeropsis sapinea* from Ontario and Manitoba. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, v. 21, n. 3, p. 256-264, 1999.

HILDEBRAND, D. M. 2005. **PestReport-USDA Forest Service -Pacific Northwest Region.** Disponível em: <[http://www. Pest Reports-EXFOR Database.mht](http://www.PestReports-EXFORDatabase.mht)> Acesso em 22-03 2012

HOUSE, E. S. ***Diplodia pinea*, *Diplodia scrobiculata* and *Lasiodiplodia theobromae* in South Georgia pine plantations and their respective roles in causing Tip Dieback in Southern pine species.** A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of The University of Georgia in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science, Under the Direction of Jean Williams-Woodward Athens, Georgia, 2007.

JACOBS, K. A.; REHNER, S. A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. **Mycologia**, New York, v.90, n.4, p. 601-610, 1998.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p.137-138, 1965.

KAY, S. J.; CHEE, A. AH; SALE, P. O.; TAYLOR, J. T.; HADAR, E; HADAR, Y.; FARREL, R.L. Variation among New Zealand isolates of *Sphaeropsis sapinea*. **Forest Pathology**, v. 32, n. 2, p. 109-121, 2002.

LAUGHTON, E.M. The incidence of fungal disease on timber trees. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 33, p. 377-382, 1937.

LUCHI, N.; CAPRETTI, P.; BONELLO, P. Production of *Diplodia scrobiculata* and *Diplodia pinea* pycnidia on ground Austrian pine needle agar medium. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v.46, n. 2, p. 230–235, 2007.

LUCHI, N., MANCINI, V., FEDUCCI, M., SANTINI, A.; CAPRETTI, P. *Leptoglossus occidentalis* and *Diplodia pinea*: a new insect-fungus association in Mediterranean forests. **Forest Pathology**, v. 42, n.3, p. 246–251, 2012.

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

MORELET, P. M.; CHANDELIER, P. A case for variability in *Sphaeropsis sapinea*. **European Journal Forest Pathology**, Hamburg, v. 23, n. 5, p. 317-320, 1993.

MUNCK, I.; STANOSZ, G. R. Excised shoots of top-pruned red pine seedlings, a source of inoculum of the *Diplodia* shoot blight pathogen. **Forest Pathology**, v. 38, p.196-202, 2008.

MUNCK, I. A.; STANOSZ, G. R. Quantification of conidia of *Diplodia* spp. extracted from red and jack pine cones. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n.1, p. 81-86, 2009.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). **Blast** Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> > Acesso em Novembro de 2012)

NICHOLLS, T. H.; OSTRY, M. E. *Sphaeropsis sapinea* cankers on stressed red and jack pines in Minnesota and Wisconsin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n.1, p. 54-56, 1990.

PALMER, M. A.; NICHOLLS, T. H. **How do identify and control Diplodia shoot blight, collar rot and cancer of conifers**. U.S.D.A. Forest

Service.1983.Disponível
em:<http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/howtos/ht_conifers/ht_conifers.htm>.
Acesso em: 20/10/2012.

PALMER, M.A.; NICHOLLS, T.H. Shoot blight and collar rot of *Pinus resinosa* caused by *Sphaeropsis sapinea* in forest nurseries. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n.9, p. 739-740, 1985.

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.

PALMER, M.A.; McROBERTS, R.E.; NICHOLLS, T.H. Sources of inoculum of *Sphaeropsis sapinea* in forest tree nurseries.**Phytopathology**, Saint Paul, v.78, n.6, p. 831-835, 1988.

PALMER, M. A. Isolate types of *Sphaeropsis sapinea* associated with main stem cankers and top-kill of *Pinus resinosa* in Minnesota and Wisconsin. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, n. 5, p. 507-510, 1991.

PATAKY, N. R., ***Sphaeropsis* blight or *Diplodia* tip blight of pines. 1987.**Disponível em:
<www.ipm.uiuc.edu/landturf/diseases/sphaeropsis/index.html>.
Acesso em: 7/10/2012.

PETERSON, G. W. Infection, epidemiology, and control of *Diplodiablight* of Austrian, ponderosa, and Scots pines. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, p. 511-514, 1977.

PETERSON, G. W. Control of *Diplodia* and *Dothistroma* blight of pines in the urban environment. **Journal of Arboriculture**, Urbana, v.7, p.15, 1981.

PETERSON, G. W ***Diplodia pinea***. Version 01.1 saved 4 January 2005. Disponível em: <ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3041.html>. Acesso em: 15/1/2010.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (ed.)**Microbial ecology of leaves**. Spring Verlag. p.179-197, 1991.

PHILLIPS, A. J. L. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 41, n.1, p.3–18, April, 2002.

PHILLIPS, A. J. L. **Diplodia pinea**. Version 01 saved 30 March 2005. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/diplodia_pinea_2.htm>. Acesso em: 7/11/2012.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; CORREIA A.; LUQUE, J. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, New York, v.97, n.2, p.513–529, 2005.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; PENNYCOOK, S. R. ; JOHNSTON, P. R.; RAMALEY, A.; AKULOV, A.; CROUS, P. W. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. **Persoonia**, v. 21, p. 29-55, 2008.

PUNITHALINGAM, E.; WATERSTON, I. M. **Diplodia pinea**. **CMI Description of Plant Pathogenic Fungi and Bacteria**. No. 273. Commonw. Mycology Institute/Associate. Applied Biology, Kew, Surrey, England.1970

REES, A. A.; WEBBER, J. F. Pathogenicity of *Sphaeropsis sapinea* to seed, seedlings and saplings of some Central American pines. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 91, n. 2, p. 273-277, 1988.

ROGERS, D. L **In situ genetic conservation of Monterey pine (*Pinus radiata* D. Don): Information and recommendations**. Report No.26. ed.P.E. McGuire University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Genetic Resources Conservation Program, Davis CA USA. September 2002

RONQUIST, F; HUELSENBECK, J. P. Mr Bayes 3. Bayseana phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p.1572-1574, 2003.

SANTAMARÍA, O.; SMITH, D. R.; STANOSZ, G. R. Interaction between *Diplodia pinea* and *D. scrobiculata* in red and jack pine seedlings. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 101, n.3, p. 334 - 339, 2011.

SERNA, I. G. **Diplodia pinea (Desm.) Kickx y Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell, principales hongos de chancro delas masas**

forestales de *Pinus radiata* D. Don en el País Vasco. Tesis Doctoral. Universidade del País Vasco. 2011

SINCLAIR, W. A.; LYON, H. H.; Johnson, W. T. **Diseases of trees and shrubs**. Ithaca: Cornell University Press. 574 p. 1987.

SHIMIZU, J. Y. **Memórias do “Workshop” sobre conservação e uso de recursos genéticos florestais** (Paranaguá, PR, 2000). Embrapa Florestas, 1ª edição, Colombo, 2001.

SMITH, D. R.; STANOSZ, G. R. Confirmation of two distinct populations of *Sphaeropsis sapinea* in the North Central United States using RAPDS. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n.6, p.699-704, 1995.

SMITH, H., WINGFIELD, M. J., CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus spp.* and *Eucalyptus spp.* in South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 62, n. 2, p. 86-88, 1996.

SMITH, H.; WINGFIELD, M.J.; de WET, J.; COUTINHO, T. A. Genetic diversity of *Sphaeropsis sapinea* from South Africa and Northern Sumatra. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 2, p.139-142, 2000.

SMITH, H.; WINGFIELD, M. J.; COUTINHO, T. A. The role of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in post-hail associated dieback of *Pinus patula*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 164, n 1-3, p.177-184, 2002.

SMITH, D. R.; STANOSZ, G. R. A species-specific PCR assay for detection of *Diplodia pinea* and *D. scrobiculata* in dead red and jack pines with collar rot symptoms. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n.3, p.307-313, 2006.

STANOSZ, G. R.; SMITH, D. R.; GUTHMILLER, M. A.; STANOSZ, J. C. Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic stems of red pine nursery seedlings. **Phytopathology**. Saint Paul, v. 85, n. 4, p.1196, 1995.

STANOSZ, G. R.; CUMMINGS-CARLSON, J. Association of mortality of recently planted seedlings and established saplings in red pine plantations with *Sphaeropsis* collar rot. **Plant Disease**, Saint Paul, v.80, n. p750-753, 1996.

STANOSZ, G. R., SMITH, D. R.; MARK, A. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* from the West Central United States by means of random amplified polymorphic DNA marker analysis. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, p. 1175-1178, 1996.

STANOSZ, G. R.; SMITH, D. R.; GUTHMILLER, M. A.; STANOSZ, J. C.. Persistence of *Sphaeropsis sapinea* in or on asymptomatic shoots of red and jack pines. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 4, p. 525-530, 1997.

STANOSZ, G. R.; BLODGETT, J. T.; SMITH, D. R.; KRUGER, E. L. Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings. **New Phytologist**, v.149, p.531-538, 2001.

STANOSZ, G. R. **Evaluation distribution and structure of epidemic populations of *Sphaeropsis sapinea***.2002. Acesso em: 12/12/2012. Disponível em: <http://fhm.fs.fed.us/em/funded/04/eval_sphaeropsis_sapinea.pdf>.

STANOSZ, G. R.; SMITH, D. R.; ALBERS, J. S. Surveys for asymptomatic persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in stems of red pine seedlings from seven Great Lakes region nurseries. **Forest Pathology**, Berlin, v.35, n.4, p.233-244, 2005.

STANOSZ, G. R.; SMITH, D. R. ; FRAEDRICH, S. W.; MANGINI, A. *Diplodia pinea*, the cause of Diplodia blight of pines confirmed in Alabama, Louisiana, and Mississippi. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, n. 2, p.198-198, 2009.

STATISTICA 8 Download Disponível em: <http://www.4shared.com/get/LyZJpOM_/statistica_7.html>. Acessado em 15 março de 2012.

STRINGARI, D.; GLIENKE, C.; CHRISTO, D.; MACCHERONI, W. JR.; AZEVEDO, J. L. High molecular diversity of fungus *Guinardia citricarpa* and *Guinardia mangiferae* and new primers for diagnosis of citrus black spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.1063-1073, 2009.

SUTTON, B.C. *Sphaeropsis sapinea*. In: **The Coelomycetes**. Kew: Commonwealth. Mycological Institute, p.120- 121, 1980.

SWART, W.J.; KNOX-DAVIES, P.S.; WINGFIELD, M.J. *Sphaeropsis sapinea*, with special reference to its occurrence in *Pinus* spp. In South Africa. **South African Forestry Journal**, Pretoria, n.135, p.1-8, 1985.

SWART, W.J.; WINGFIELD, M.J.; KNOX-DAVIES, P.S. Factors associated with *Sphaeropsis sapinea*. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 19, p. 505-510, 1987.

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. 61–766, 1991.

SWART, W. J., WINGFIELD, M. J.; PALMER, M. A.; BLANCHETTE, R. A. Variation among South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.81, p. 489-493, 1991.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA 4**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-1599. 2006.

THWAITES, J. M.; FARRELL, R. L.; HATA, K.; CARTER, P.; LAUSBERG, M. Sapstain fungi on *Pinus radiata* logs – from New Zealand forest to export in Japan. **Journal of Wood Science**, v. 50, p. 459–465, 2004.

USDA Forest Service 1992. **Pest risk assessment of the importation of Pinus radiata and Douglas-fir logs from New Zealand**. Miscellaneous Publication 1508. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service

USDA Forest Service. **Exotic Forest Pest Information System for North America: *Sphaeropsis sapinea***. January 2008. Disponível em: <<http://spfnic.fs.fed.us/exfor/data/pestreports.cfm?pestidval=91&langdisplay=english>> Acesso em Janeiro de 2012

VASILJEVIĆ, A., GLAVONJIĆ, B. Certification of forests and wood products in Serbia in the context of new European Union legislations - current situation, problems and challenges. **Bulletin of the Faculty of Forestry**, v. 103, n.6, p.7-28, 2011.

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.

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.

WATERMAN, A. *Diplodia pinea* and *Sphaeropsis malorum* on soft pines. **Phytopathology**, Saint Paul, v.12, n. 3, p. 828-831, 1943.

WINGFIELD, M.J.; KNOX-DAVIES, P. S. Observations of diseases in the pine and *Eucalyptus* plantations in South Africa. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 12, n. 2, p.57-63, 1980a.

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, 1980b.

WINGFIELD, M.J; PALMER, M. A. *Diplodia pinea* associated with insect damage on pines in Minnesota and Wisconsin In: **Proceedings of the Fourth International Congress of Plant Pathology**, p. 249. 1983

WHITE, T. M.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: **PCR protocols: a guide to methods and applications**. INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. (ed.). San Diego: Academic Press, p. 315-321, 1990.

ZWOLINSKI, J.B.; SWART, W.J.; WINGFIELD, M.J. Association of *Sphaeropsis sapinea* with insect infestation following hail damage of *Pinus radiata*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 72, n. 2/3., p.293-298, 1995.

ZHOU, S.; STANOSZ, G. R. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analyses of ITS and 5.8S rDNA sequences. **Mycologia**, New York, v.93, n.3, p.516-527, 2001.