

PAULA RACHEL RABELO CORRÊA - BASILIO

**Caracterização de isolados de *Sphaeropsis sapinea* e avaliação da
resistência em progênies de *Pinus radiata***

CURITIBA
2008

PAULA RACHEL RABELO CORRÊA - BASILIO

**Caracterização de isolados de *Sphaeropsis sapinea* e avaliação da
resistência em progênies de *Pinus radiata***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no curso de pós-graduação em Engenharia Florestal no setor de Ciências Agrárias, no Centro de Ciências Florestais e da Madeira, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Co-orientadores: Dr. Álvaro Figueredo dos Santos
Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa

CURITIBA
2008

DEDICATÓRIA

À minha família pelo exemplo,
pela força e orientação nos
momentos difíceis.

OFEREÇO

Aos meus amados filhos ,
Flávio Augusto,
Ana Carolina e Ana Paula pelo
apoio, incentivo e compreensão
em todos o momentos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por ter permitido está graça na minha vida e por ter providenciado para o meu convívio pessoas tão maravilhosas que tanto contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

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

Ao professor Antonio Rioyei Higa, pelo apoio, pela confiança e pela amizade porque sem ele eu nem teria começado esta jornada.

Ao Dr Álvaro Figueredo dos Santos, pelas orientações e apoio no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas.

À empresa Norske Skog Pisa Ltda, pelo apoio e confiança demonstrado pelo meu trabalho. Agradecimento especial ao Henrique Just Graeml e ao Admir Lopes Mora.

Ao Dr. Edilson Batista de Oliveira por seu auxílio, paciência e principalmente, por sua amizade.

Ao Dr Marcos Deon Vilela de Resende e ao Diego Tyszka Martinez pelo apoio, sugestões e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Dra Juliana Vitória Bittencourt e Luciano Medina de Macedo pelo apoio providencial sempre na hora certa.

Aos amigos e estagiários do LAMEF, pela compreensão e apoio nos momentos mais difíceis, especialmente aos estagiários deste trabalho Bruno Schultz e Douglas Zeni.

À minha amiga Carmem Daluz Ceccon pela sua compreensão, pelo seu apoio e sua amizade durante toda a execução deste trabalho.

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

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

Aos amigos e estagiários do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas pelo apoio e auxílio nas tarefas diárias, em especial à Francine Bontorin Silva e Suelen dos Santos Rego.

À Embrapa Florestas pelo apoio neste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

BIOGRAFIA

Paula Rachel Rabelo Corrêa – Basilio nasceu na cidade de Três Pontas no estado de Minas Gerais em 15 de agosto de 1961. Iniciou seus estudos na cidade natal onde ficou até os seus 16 anos, cursando o ensino fundamental e o primeiro ano do segundo grau, na Escola “Coração de Jesus”. Finalizou o segundo grau profissionalizante no Colégio Pitágoras, em Belo Horizonte, como Técnica em Enfermagem, em 1979.

Em 1980 ingressou na Universidade Federal de Minas Gerais no curso de Ciências Biológicas. Durante este período foi estagiária no Laboratório de Microbiologia do solo sob orientação da Profa. Dra. Maria Celli Dantas Tavares. Em 1985 recebeu o título de bacharel em Ciências Biológicas, com ênfase em Microbiologia, defendendo a monografia “Isolamento de microrganismos solubilizadores de fosfato”, sob orientação da Profa. Maria Celli. Em 1986 recebeu bolsa de aperfeiçoamento do CNPq para trabalhar no projeto “Microrganismos solubilizadores de fosfato e solubilização quantitativa de fosfatos naturais”, sob orientação da mesma professora.

Em 1988 ingressou no laboratório Gene, onde ficou sob orientação do Prof. Dr. Sérgio Danilo Penna até 1991. Após este período, até o ano de 2001 foi professora do Ensino Médio, no sistema Objetivo e Positivo em Minas Gerais e Santa Catarina, obtendo diversas premiações.

Em 2003, iniciou seu trabalho como pesquisadora voluntária no Laboratório de Melhoramento Florestal (LAMEF/ UFPR), sob orientação do Prof. Dr. Antonio Rioyei Higa. Em maio de 2006 ingressou no programa de pós graduação em Engenharia Florestal, área de concentração Silvicultura, onde, sob orientação do Prof. Dr. Celso Garcia Auer, obteve em 2007 o título de Mestre em Engenharia Florestal.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 <i>Pinus radiata</i>	20
2.1.1 Classificação botânica.....	20
2.1.2 Distribuição geográfica de <i>Pinus radiata</i>	21
2.1.3 limitações ecológicas da espécie.....	25
2.2 <i>Sphaeropsis sapinea</i>	26
2.2.1 A doença provocada pelo <i>Sphaeropsis sapinea</i>	27
2.2.2 Métodos de controle de <i>Sphaeropsis sapinea</i>	28
2.3 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	30
2.3.1 Características morfológicas	30
2.3.2 Compatibilidade vegetativa.....	32
2.3.3 Caracterização molecular de fungos fitopatogênicos.....	32
2.3.4 Teste de agressividade em frutos de maçã var. Granny Smith.....	33
2.4 ESTUDOS DE AGRESSIVIDADE DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> E SELEÇÃO PRECOCE DE MATERIAL RESISTENTE.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i>	36
3.2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i>	40
3.2.1 Teste de compatibilidade vegetativa (CV).....	40
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO <i>Sphaeropsis sapinea</i>	42
3.3.1 Metodologia de extração de DNA total de microrganismos.....	42
3.3.2 Técnica de RAPD em <i>Sphaeropsis sapinea</i>	44
3.3.3 Análise do polimorfismo.....	44
3.4 AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM FRUTOS DE MAÇÃ.....	45
3.5 AVALIAÇÃO DO TIPO DE INOCULAÇÃO, DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> E REGIME HÍDRICO NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA EM MUDAS DE <i>Pinus taeda</i>	46
3.5.1 Tipo de inoculação.....	46

3.5.2 Regime hídrico da estufa.....	46
3.5.3 Inoculação das mudas de <i>Pinus taeda</i>	47
3.5.4 Recuperação de <i>Sphaeropsis sapinea</i> de mudas de <i>Pinus taeda</i>	48
3.6 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA E HERDABILIDADE DE PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i> À <i>Sphaeropsis sapinea</i>	48
3.6.1 Inoculação dos isolados <i>Sphaeropsis sapinea</i> em mudas de <i>P.</i> <i>radiata</i>	49
3.6.2 Recuperação de <i>Sphaeropsis sapinea</i> de mudas de <i>Pinus</i> <i>radiata</i>	49
3.6.3 Avaliação da herdabilidade para resistência das progênies de <i>Pinus radiata</i>	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS.....	51
4.1.1 Crescimento em meio de cultura.....	51
4.1.2 Esporulação em meio de cultura.....	51
4.2 TESTE DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA.....	56
4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Sphaeropsis sapinea</i>	59
4.3.1 Resultado da técnica RAPD em <i>Sphaeropsis sapinea</i>	59
4.3.2 Análise do polimorfismo.....	62
4.4 AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM FRUTOS DE MAÇÃ.....	66
4.5 AVALIAÇÃO DO TIPO DE INOCULAÇÃO, DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> E REGIME HÍDRICO NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA EM MUDAS DE <i>Pinus</i> <i>taeda</i>	69
4.5.1 Recuperação de <i>Sphaeropsis sapinea</i> de lesões em mudas.....	71
4.6 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA E HERDABILIDADE DE PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i> À <i>Sphaeropsis sapinea</i>	73
4.6.1 Avaliação da agressividade dos isolados e resistência das progênies de <i>Pinus radiata</i>	73
4.6.2 Avaliação da herdabilidade da resistência de progênies de <i>Pinus</i> <i>radiata</i> contra <i>Sphaeropsis sapinea</i>	82
5 CONCLUSÕES	85

6 RECOMENDAÇÕES FINAIS.....	86
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	INFORMAÇÕES SOBRE OS ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> E SUA ORIGEM.....	38
TABELA 2	COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i>	52
TABELA 3	AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE VEGETATIVA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i>	57
TABELA 4	LESÕES (CM) EM FRUTOS DE MAÇÃ VAR, GRANNY SMITH INOCULADAS COM ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> OBTIDOS DE <i>Pinus spp</i>	67
TABELA 5	LESÕES (CM) EM MUDAS DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADAS COM ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> OBTIDOS DE <i>Pinus spp</i>	70
TABELA 6	AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS PARA REISOLAMENTO DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> APÓS INOCULAÇÃO EM MUDAS DE <i>Pinus taeda</i>	72
TABELA 7	LESÕES (CM) PRODUZIDAS PELA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS SS1.3, SS2.4, SS4.10 DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM MUDAS DE PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	75
TABELA 8	SECAMENTO DE PONTEIROS PRODUZIDO PELA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS SS1.3, SS2.4, SS4.10 DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM MUDAS DE PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	77
TABELA 9	CLASSES DE TAMANHO DAS LESÕES (CM) PRODUZIDAS PELA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM MUDAS DE PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	79

TABELA 10	CLASSES DE GRAU DE SECAMENTO DE PONTEIROS PELA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> NAS MUDAS DE PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	80
TABELA 11	MORTALIDADE (%) DAS MUDAS DE PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i> INOCULADAS COM OS ISOLADOS MONOSPÓRICOS SS1.3, SS2.4, SS4.10 DE <i>Sphaeropsis sapinea</i>	81
TABELA 12	HERDABILIDADE PARA TAMANHO DE LESÕES PRODUZIDAS PELA INOCULAÇÃO DE ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	84
TABELA 13	HERDABILIDADE PARA SECAMENTO DE PONTEIROS PRODUZIDAS PELA INOCULAÇÃO DE ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS PLANTIOS DE <i>P. radiata</i> ...	24
FIGURA 2	LOCAIS DE COLETA DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> NA REGIÃO SUL DO BRASIL.....	39
FIGURA 3	ESQUEMA DE PAREAMENTO DE DISCOS DE MICÉLIO-ÁGAR CONTENDO DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM MEIO ÁGAR-ÁGAR PARA AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE VEGETATIVA.....	41
FIGURA 4	PICNÍDIO (SETA BRANCA) DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> FORMADO EM MEIO ACÍCULA-ÁGAR.....	54
FIGURA 5	CONÍDIOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> SOBRE MEIO ÁGAR-ÁGAR.....	54
FIGURA 6	REAÇÃO DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA (CV – SETA BRANCA) E INCOMPATIBILIDADE VEGETATIVA (ICV – SETA AMARELA) ENTRE ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM MEIO AA...	58
FIGURA 7	PLACAS COM OS ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> MOSTRANDO MÉDIA COMPATIBILIDADE VEGETATIVA (MCV - SETA AMARELA) E COMPATIBILIDADE VEGETATIVA (CV – SETA VERDE) EM MEIO BDA.....	58
FIGURA 8	REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD EM <i>Sphaeropsis sapinea</i> APRESENTANDO MONOMORFISMO ENTRE OS ISOLADOS.....	60
FIGURA 9	REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> APRESENTANDO POLIMORFISMO ENTRE ISOLADOS.....	61
FIGURA 10	DENDROGRAMA DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA A PARTIR DO ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE JACCARD.....	63
FIGURA 11	LESÕES EM FRUTOS DE MAÇÃ VAR. GRANNY SMITH INOCULADAS COM ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> ...	68

ANEXOS

ANEXO 1	DADOS ORIGINAIS DAS LESÕES CAUSADAS POR <i>Sphaeropsis sapinea</i> EM FRUTOS DE MAÇÃ VAR. GRANNY SMITH.....	96
ANEXO 2	SECAMENTO DO PONTEIRO DE MUDAS DE <i>Pinus taeda</i> CAUSADO POR ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i>	97
ANEXO 3	ANÁLISE DE LESÕES (CM) EM PONTEIROS DE <i>Pinus taeda</i> INOCULADOS COM ISOLADOS DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> OBTIDOS DE <i>Pinus spp</i> , EM TRÊS AMBIENTES DIFERENTES.....	98
ANEXO 4	ANALISE DE VARIÂNCIA DO ENSAIO DE AGRESSIVIDADE EM MUDAS DE <i>Pinus taeda</i>	99
ANEXO 5	ANALISE DE VARIÂNCIA PARA SECAMENTO DE PONTEIRO DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS1.3 DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> INOCULADO EM PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	99
ANEXO 6	ANALISE DE VARIÂNCIA PARA SECAMENTO DE PONTEIRO DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS2.4 DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> INOCULADO EM PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	99
ANEXO 7	ANALISE DE VARIÂNCIA PARA SECAMENTO DE PONTEIRO DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS4.10 DE <i>Sphaeropsis sapinea</i> INOCULADO EM PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	99
ANEXO 8	ANALISE DE VARIÂNCIA PARA TAMANHO DE LESÕES DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS1.3 INOCULADO EM PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	100
ANEXO 9	ANALISE DE VARIÂNCIA PARA TAMANHO DE LESÕES DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS2.4 INOCULADO EM PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	100

ANEXO 10	ANALISE DE VARIÂNCIA PARA TAMANHO DE LESÕES DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS4.10 INOCULADO EM PROGÊNIES DE <i>Pinus radiata</i>	100
----------	--	-----

RESUMO

Sphaeropsis sapinea é conhecido como um importante patógeno de várias espécies de *Pinus*, causando a seca de ponteiros e a morte de árvores em plantios comerciais. Esse patógeno foi introduzido no Brasil, provavelmente, durante as introduções do gênero *Pinus*. Seu primeiro relato ocorreu na década de 1940, com os primeiros plantios de *P. radiata* no estado de São Paulo, os quais foram dizimados. Um projeto de reintrodução dessa espécie florestal no Brasil foi delineado para a seleção de famílias de *P. radiata* resistentes a *S. sapinea*. Desse modo, este estudo objetivou a caracterização morfológica, molecular e patogênica de isolados de *S. sapinea*, para escolher os isolados mais agressivos para uso na seleção de material resistente. Quatro isolados da região Sul do Brasil foram obtidos e a caracterização morfológica e patogênica indicou que os isolados estudados pertencem ao morfotipo "A" de *S. sapinea*. Houve diferenças na agressividade e na diversidade genética dos isolados em todos os testes *in vitro* e *in vivo*. A maior herdabilidade de *P. radiata* para tamanho das lesões foi obtida com o isolado SS1.3 ($H^2_M = 0,3357870$), enquanto que para secamento dos ponteiros a maior herdabilidade foi obtida com o isolado SS2.4 ($H^2_M = 0,256347$). Os resultados mostraram a possibilidade de seleção precoce de material resistente à seca de ponteiros em mudas de *P. radiata*.

Palavras-chave: agressividade, morfotipo, *Pinus*, resistência genética, seca de ponteiros.

Título: Caracterização de isolados de *Sphaeropsis sapinea* e avaliação da resistência em progênies de *Pinus radiata*.

ABSTRACT

Sphaeropsis sapinea is known as an important pathogen of some species of *Pinus*, causing the tip blight and the death of trees in commercial plantings. This pathogen was introduced in Brazil during introduction of genus *Pinus* hosts. The first report of pathogen was done in 1940 decade, during introduction of *P. Radiata* in São Paulo State, but these plantations were destroyed by *S sapinea*. A project for the reintroduction of this forest species in Brazil was “delineado” for the selection of families of *P. radiata* resistant against *S. sapinea*. For this reason, the objective of this research was a morphological, molecular and pathogenic characterization of *S. sapinea* isolates to select the more aggressive for use in the selection of resistant material. Four isolates were obtained and the morphological and pathogenic characterization indicated that the isolates belong to the morphotype “A” of *S sapinea*. There were differences in aggressiveness and genetic diversity of isolates in all *in vitro* and *in vivo* tests. The highest herdability of *P. radiata* for size of lesions was observed with isolate SS1.3 ($H^2_M = 0,3357870$), while the highest herdability of *P. radiata* for shoot blight was observed with isolate SS2.4 ($H^2_M = 0,256347$). The results had shown to the possibility of “precocious” selection of resistant material to *P. radiata* shoot blight.

Keywords: aggressiveness, genetic resistance, morphotype, *Pinus*, shoot blight.

Title: Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates and evaluation of the resistance of *Pinus radiata* progenies.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Pinus* é plantado em escala comercial, no Brasil, há mais de 30 anos, sendo que os mais extensos foram estabelecidos na região Sul e Sudeste do Brasil, para atender uma 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. Este gênero apresenta uma boa adaptação para as condições edafo-climáticas brasileiras, dependendo o seu sucesso da escolha correta da espécie, da área escolhida para o seu estabelecimento e do manejo correto dos plantios (SHIMIZU; MEDRADO, 2005).

Novas introduções de diversas espécies do gênero *Pinus* estão ocorrendo, inclusive nas regiões tropicais, e o plantio está se expandindo para todo o Brasil. O estabelecimento de florestas plantadas com pinus, quando bem manejadas, fornecem madeira anteriormente originada da que até muito da floresta nativa, como por exemplo, a mata com araucária (SHIMIZU; MEDRADO, 2005).

O principal patógeno da seca de ponteiros é o fungo *Sphaeropsis sapinea* (Fr.:Fr.) Dyko & Sutton (= *Diplodia pinea* (Desmaz.) J. Kickx f.), cuja característica é atacar os plantios depois de uma condição de estresse ambiental nas plantas hospedeiras, provocando a morte de mudas recentemente plantadas ou de árvores em plantios já estabelecidos (STANOSZ; CUMMINGS CARLSON, 1996). Este fungo é responsável também por outras doenças em pinus como a queima das acículas, o tombamento, o cancro, a murcha da copa e azulamento interno da madeira (STANOSZ; CUMMINGS CARLSON, 1996; BLODGETT; STANOSZ, 1999; FLOWERS *et.al*, 2001). Estes sintomas podem não ser diferenciados de outros provocados por outros patógenos e insetos, por isso, o diagnóstico requer o reconhecimento de corpos de frutificação e conídios do *S. sapinea* nas hastes ou nas raízes afetadas ou o isolamento do fungo em meio de cultura, no laboratório (STANOSZ; CUMMINGS CARLSON, 1996).

Um importante passo que pode fornecer medidas mais eficientes para o controle do *S. sapinea* é a seleção de indivíduos resistentes ao patógeno. Mas, antes de se realizar esta seleção é importante o conhecimento dos

diferentes graus de agressividade do patógeno, pois variedades de plantas suscetíveis inoculadas com isolados de baixa agressividade, poderão mostrar-se falsamente resistentes (RODRIGUES CASSIOLATO, 1994).

No Brasil, o primeiro relato da ação do *S. sapinea* ocorreu na década de 1940, durante a introdução de *P. radiata* no estado de São Paulo, mas estes plantios foram totalmente dizimados pelo *S. sapinea*. No entanto, não foram realizados estudos com o fungo *S. sapinea* para relação patógeno hospedeiro e trabalhos dirigidos à seleção de materiais resistentes no Brasil.

Pinus radiata é uma das coníferas mais plantadas no mundo devido ao seu rápido crescimento, as qualidades excepcionais de sua polpa na fabricação de papel e às facilidades de serrar e entalhar sua madeira. Todas estas qualidades fizeram com que esta espécie fosse introduzida 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, quatro milhões de hectares (ROGERS, 2002).

Outros fatores que tornam esta espécie muito especial são a sua alta produtividade ($>20 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$), sua grande facilidade em adaptar-se a diversos sítios e condições climáticas (TURNER; LAMBERT, 1986) e sua capacidade em produzir mais madeira por hectare num espaço de tempo menor, sendo por isso uma das espécies que fornece os maiores retornos financeiros nas áreas plantadas (KREBS, 1976).

Em todos os aspectos, técnicos e comerciais, o Brasil apresenta amplas condições para o plantio florestal, como áreas disponíveis com forte apelo pelo ambiental e para o uso silvicultural, uma legislação atualizada que favorece a formação e a colheita de florestas plantadas (HIGA; SILVA, 2006) e variadas características edafoclimáticas capazes de suprir as necessidades da maioria das espécies florestais. Acompanhando este favorável histórico florestal brasileiro existe a boa adaptação desta espécie no Hemisfério Sul justificando o interesse do Brasil pelo plantio do *P. radiata*.

Considerando a possibilidade de reintrodução de *P. radiata* no Brasil e a ocorrência da seca de ponteiros, este trabalho teve como objetivos: (1) a caracterização morfológica e molecular de isolados de *S. sapinea* da região Sul do Brasil, (2) a agressividade em mudas de pínus, (3) a reação de progênies

importadas de *P. radiata* frente aos isolados de *S. sapinea* e (4) a seleção precoce de material resistente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Pinus radiata*

2.1.1 Classificação botânica

A primeira notificação sobre a espécie *P. radiata* foi realizada por Thomas Coulter em Monterey, na Califórnia, em 1830. O nome científico refere-se às fortes marcas nas escamas de seus cones. O nome popular Pinho de Monterey é relativo à península de onde ele é originário (POYTON, 1979; MCDONALD; LAACKE, 2007). Esta espécie também é conhecida como pinho insignis, pinho insular e pinheiro radiata (LAVERRY, 1986; EARLE, 2007; MCDONALD; LAACKE, 2007; MILLER, 2008). A espécie *P. radiata* pertence ao gênero *Pinus* cujos indícios geológicos sugerem ter surgido na terra a cerca de 100 milhões de anos atrás (SHAW, 1914, MILLAR, 2000).

A maioria das classificações para o gênero *Pinus* reconhece duas maiores linhagens, o subgênero *Strobus*, reconhecido popularmente como “soft pine”, e o subgênero *Pinus*, reconhecido popularmente como “hard pine”. Esta classificação é baseada na filotaxia das suas acículas (SHAW, 1914; PRICE *et al.*, 1998; POYTON, 1979). Esta divisão é consistente com dados coletados da anatomia da madeira e químicos secundários, e foram corroborados por recentes estudos de filogenia usando ferramentas moleculares (PRICE *et al.*, 1998). A espécie *P. radiata* faz parte de um pequeno subgrupo dos pinus conhecidos como “pínus costeiros de cone fechado” ou “pinus marítimos” e está relacionada com o *Pinus muricata* e o *Pinus attenuata* (PRICE *et al.*, 1998).

P. radiata é classificado como um pínus de cone fechado, relativamente pequeno, em relação aos cones de outras coníferas. Essa espécie é de crescimento rápido e precoce, comportando-se como pioneira e preferindo expandir-se em ambientes queimados ou totalmente limpos. A maior característica do *P. radiata* é o fato de manterem seus cones nas árvores durante vários anos, abrindo e fechando as suas escamas, dependendo das condições ambientais, permitindo assim, que suas sementes permaneçam viáveis ao longo dos anos (FORDE, 1964). As árvores com seus troncos

cônicos podem ficar arredondados, e até mesmo retos, alcançando em torno de 15 a 30 m de altura e 30 a 90 cm de diâmetro. Sua casca, profundamente sulcada, é cinza ou marrom escuro, podendo assumir uma coloração avermelhada, ou azulada quando colonizada por fungos (CHOU, 1987; CHOU; MACKENZIE, 1988). As folhas possuem um formato de agulhas bem delgadas e são de um verde profundo e se organizam, densamente, nos galhos, de forma solitária ou em grupos de três, cinco ou mais folhas. Nas árvores adultas, estas folhas podem ter de 75 a 150 mm de comprimento, por 60 a 80 mm de largura. As sementes, acima de 200 por cone, são elípticas, com seis mm de comprimento, possuindo um anel marrom claro bem visível, de 25 mm de comprimento ao redor delas (DALLIMORE; JACKSON, 1966).

De acordo com Eldridge, 1978; Lavery, 1986 e Rogers, 2002 são reconhecidos três variedades da espécie: variedade radiata, variedade binata e variedade cedrosensis, representadas por cinco pequenas e separadas populações de suas folhas e pelo formato piramidal de suas árvores (MARSH, 1978).

2.1.2 Distribuição geográfica de *Pinus radiata*

A distribuição natural de *P. radiata* é muito restrita. Esta espécie é encontrada apenas em três pontos da costa da Califórnia ao sul de São Francisco, e nas ilhas de Guadalupe e Cedros, no México (ELDRIDGE, 1978; LAVERY, 1986; ROGERS, 2002).

A variedade radiata é formada pelas três populações presentes na costa da Califórnia: a população Ano Novo, encontrada na latitude 37° 00' N, a população Monterey, encontrada na latitude 36° 50' N e a população conhecida por Cambria, encontrada na latitude 35° 50' N (Califórnia, USA). A variedade binata é encontrada naturalmente somente na Ilha de Guadalupe na latitude 29° 00' N e a sua população recebe o mesmo nome da ilha (México). A variedade cedrosensis é encontrada apenas na Ilha de Cedros, na latitude 28° 30' N e a sua população recebe o mesmo nome da ilha continental (México), (ELDRIDGE, 1978; LAVERY, 1986; ROGERS, 2002).

A maior floresta natural do *P. radiata* encontra-se na península de Monterey, em Del Monte, cobrindo uma área de 5.500 a 6.000 ha. O clima

onde se encontram as populações nativas do *P. radiata* é basicamente mediterrâneo, com chuvas moderadas em torno de 400 a 800 mm anuais bem distribuídas, durante o inverno (75 %), que ocorrem de dezembro a março, podendo ocorrer geadas fortes, mas restrita a três meses do inverno. No verão as temperaturas são moderadas e as secas do verão são suavizadas pela presença intensa dos nevoeiros vindos do mar (SCOTT, 1960; OFFORD, 1964).

Revisão feita por Poyton (1979) indica que a espécie entrou na África do Sul, antes de 1850, e depois foi trazida para a América do Sul e Oceania onde se expandiu. A causa do sucesso desta espécie no Hemisfério Sul não é muito bem explicada. Na Austrália, Ovington (1971), sugeriu que este sucesso advinha de três fatores principais: (1) a falta de pragas e patógenos, quando plantada longe do seu ambiente natural; (2) o desenvolvimento de modernas técnicas silviculturais e técnicas pedológicas, e (3) a variabilidade genética e plasticidade da espécie, como indicada pelo fato que dentro das plantações, árvores expressam, de forma individual, diferentes graus de tolerância, para cada fator limitante como: suscetibilidade a doenças, deficiências de nutrientes e secas.

Lavery (1986) acredita que a redução na distribuição da espécie no seu ambiente natural não foi acompanhada por uma redução na sua diversidade genética. Este mesmo autor relatou que a espécie tinha, provavelmente, uma capacidade genética latente, e sugere que isto pode ter acontecido pelas características das primeiras plantações, onde os cruzamentos das árvores eram livres e, logo após, iniciou-se os programas de seleção de árvores e os programas de melhoramento. No caso de *P. radiata* é mais correto e relevante estudar a sua plasticidade genética. A explicação, para esta plasticidade, pode estar ligada ao fato de que a espécie evoluiu, largamente, na ausência de frio e de seca, como fator limitante, no seu hábitat. Como consequência, a espécie tornou-se extremamente oportunista mais que as outras coníferas, que desenvolveram um mecanismo de gatilho, que paralisa o seu desenvolvimento, quando o ambiente é desfavorável (LIVERY, 1986).

Segue-se a descrição das localidades, onde a espécie foi introduzida com sucesso. Estas localidades podem ser visualizadas na FIGURA 1.

Nova Zelândia: a introdução do *P. radiata* ocorreu no século XIV, sendo comercializada pela primeira vez em 1876. As primeiras sementes foram da

variedade Monterey e da variedade Ano Novo, ambas da Califórnia (LIVERY, 1986).

Austrália: a primeira introdução da espécie foi realizada provavelmente com material proveniente da Califórnia, para uso em parques e jardins. Atualmente, as sementes dos plantios australianos de *P. radiata* são procedentes da Nova Zelândia e de material próprio (LIVERY, 1986).

Chile: a espécie foi introduzida em larga escala em 1885. O primeiro lote de sementes veio, provavelmente, das regiões de Monterey e Ano Novo, na Califórnia (POYNTON, 1979). Os plantios concentram-s entre as latitudes 36° e 38° S.

Espanha: a espécie é plantada na região Basca, no Norte e nordeste do país, em 160 km ao longo da Baía de Biscay.

Portugal: a área plantada com o *P. radiata* ultrapassa 2.000 ha. Encontra condições favoráveis na região litorânea ao norte do Tejo, em direção a região de Lisboa, desde que os solos não sejam rasos e a área esteja sujeita a ventos fortes (QUINTA DO PRAZO, 2007).

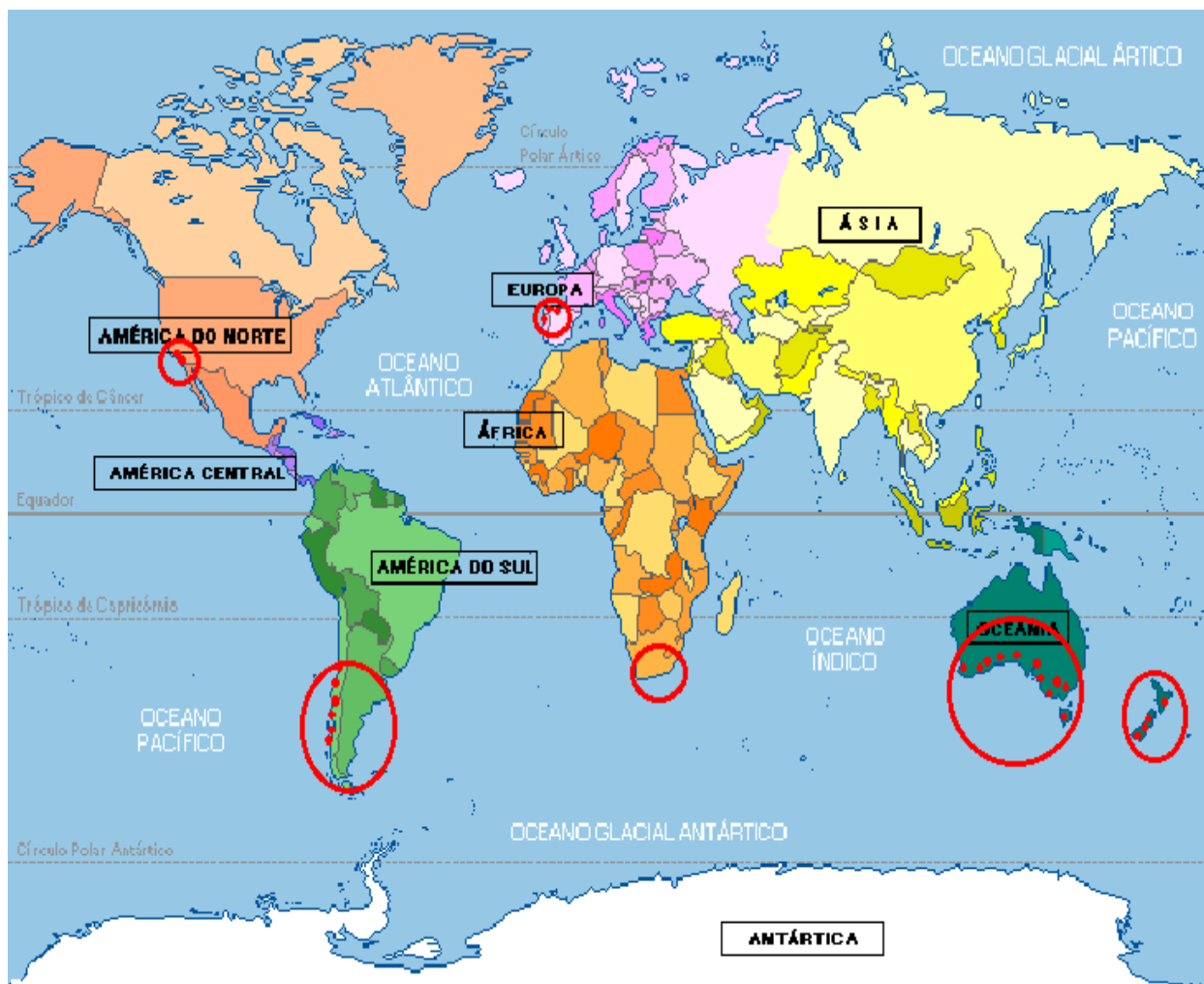


FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS PLANTIOS DE *P. radiata*.
Círculos vermelhos indicam as principais áreas de plantio.
FONTE: CSIRO, 2000

2.1.3 Limitações ecológicas da espécie

Na Califórnia existe um balanço ecológico entre o *P. radiata*, o *Quercus sp* (carvalho) e o bioma chaparral, com uma interação entre fogo e neblina (RECHER, 1982). O fogo permite o *P. radiata* regenerar novas florestas, e se a espécie conseguir sobreviver o ambiente fica propício para o crescimento dos carvalhos. Para que esta interação aconteça, o *P. radiata* tem que conseguir absorver bastante umidade trazida pelo mar. A circunstância propícia para esta interação, segundo Recher (1982), está relacionada com a topografia da região, que permite a umidade vinda do mar chegar até onde se encontra o *P. radiata*, caso contrário a espécie não sobrevive.

De acordo com Flowers e Allen (2004), o *P. radiata* precisa de uma média de chuva de 600 a 750 mm anuais para se desenvolver bem. Em regiões onde o clima no verão é muito seco, e que podem ocorrer secas muito drásticas, neste período, ou o solo da região for muito deficiente, o *P. radiata* terá problemas de sobrevivência. Na região oeste da Austrália, onde este fenômeno acontece normalmente, práticas silviculturais, como maior espaçamento no plantio e poda alta, são adotadas para amenizar os danos que podem provocar no plantio (MCKINNELL, 1981).

O frio excessivo é fator limitante para esta espécie porque o *P. radiata* não forma botões dormentes verdadeiros e o frio forte e prolongado, abaixo de 0 °C, por vários dias, compromete de forma definitiva o seu plantio. Se o inverno não for excessivamente severo o *P. radiata* continuará crescendo, durante todo o ano, sem entrar em dormência durante o inverno (LAVERY,1986).

Na Austrália e Nova Zelândia as regiões que mais sofreram com ataque de patógenos, foram aquelas com verão mais úmido. Na Nova Zelândia duas zonas são consideradas problemáticas com relação à patógenos: as regiões úmidas das ilhas ao Norte e as Ilhas Centrais da Nova Zelândia. Nesta última zona citada, os plantios localizados nas latitudes 38° a 39° S com maiores altitudes conseguiram controlar os ataques dos patógenos, especialmente, *Dothistroma pini* e *Cyclaneusma minus*. Na Austrália o verão muito úmido favorece o estabelecimento do fungo *Dothistroma*, especialmente dentro das regiões New South Wales (NSW) entre as latitudes 34° e 36° S. Nas

regiões sul da Austrália o clima característico é o mediterrâneo, no qual o *P. radiata* tem uma história de boa adaptação. As regiões de plantio com *P. radiata*, na Austrália, são limitados pelo regime de chuvas e pela latitude. As chuvas de verão ocorrem na região norte favorecendo os ataques do *S. sapinea* e limitando a expansão do *P. radiata* para esta região, neste país (LAVERY, 1986).

Depois de várias experiências em todo mundo, é razoável se concluir, que os climas quentes e úmidos são extremamente inadequados para a viabilidade do *P. radiata*, num plantio comercial. As limitações da espécie, para implantação de plantios comerciais são: tempo de exposição à geada, temperatura extremamente baixa, ou média anual baixa, calor excessivo no verão favorecendo a ocorrência de doenças (OFFORD, 1964).

As características do solo também são fatores limitantes para a espécie, uma vez que o *P. radiata* possui uma raiz muito profunda e necessita de grande quantidade de água para seu crescimento (LAVERY, 1986). Uma revisão detalhada dos parâmetros que influenciam o crescimento do *P. radiata* pode ser encontrada em Gandullo *et al.* (1974).

2.2 *Sphaeropsis sapinea*

O patógeno está atualmente classificado como *Sphaeropsis sapinea* (Fr.: Fr.) Dyko & Sutton (= *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f.) (PHILLIPS, 2005, SUTTON, 1980).

O fungo *S. sapinea* possui forma conidiomata picnidial, imerso, separado ou agregado, globoso, marrom escuro, unilocular, parede fina de composição angular. Nos conídios desta espécie constata-se a presença de um ostíolo central, circular e a presença de papilas (PHILLIPS, 2005). Quando maduros alguns conídios do *S. sapinea* tornam-se septados (DE WET *et al.*, 2000).

Palmer *et al.* (1987) caracterizou dois grupos morfologicamente diferentes de *S. sapinea* isolados, inicialmente, nos Estados Unidos, que foram denominados como morfotipos “A” e “B”. Esta caracterização é baseada nas dimensões dos conídios, na morfologia das paredes conidiais, no aspecto dos micélios, na taxa de crescimento micelial, na virulência e nas características

moleculares (DE WET *et al.*, 2000). Outros dois morfotipos foram classificados para o *S. sapinea*: o morfotipo “I” e o morfotipo “C”. O morfotipo “I” foi considerado através de análises moleculares relacionado com o fungo *Botryosphaeria obtusa*. As análises com o morfotipo “C” revelaram que ele está muito mais relacionado com o morfotipo “A” do que com o morfotipo “B”, sendo considerado, atualmente, como um variante do morfotipo “A” (BURGESS *et al.*, 2004).

2.2.1 A doença provocada por *Sphaeropsis sapinea*

S. sapinea 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). Os efeitos severos da doença estão associados a situações de estresse na planta, como seca, temperatura adversa, ou ainda, pela redução de sua resistência, quando esta sofre algum tipo de injúria durante uma chuva de granizo ou podas (SMITH *et al.*, 2000; BLODGETT; STANOSZ, 1997; 1999). Tais fatores bióticos e abióticos normalmente predis põem as árvores à doença e provoca a mortalidade de árvores nos plantios comerciais (LAUGHTON, 1937; PALMER *et al.*, 1987).

Sobre os tecidos infectados o *S. sapinea* forma os picnídios, únicos corpos de frutificação conhecidos deste fungo. Estes parecem fundidos aos tecidos dos hospedeiros (PALMER, 1983; 1987). São formados na subepiderme, posteriormente tornando-se erumpentes. Quando os picnídios amadurecem, eles se liberam os conídios que serão disseminados pelo vento ou pela chuva (STANOSZ, 2002).

De acordo com Flowers *et al.* (2001) a infecção se estabelece com os tubos germinativos dos conídios entrando através dos estômatos das acículas nos brotos jovens no começo da primavera. Estes brotos jovens infectados param de crescer, tornam-se turvos e logo morrem. Cones não infectados são vistos ao lado de cones infectados o que sugere que a doença ocorre primeiro em cones mais velhos e depois ocorre em cones mais novos. 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, 1997; 2005), os quais são: necrose, seca e quebra dos ponteiros e o declínio, sendo que este último é considerado o mais comum. Este fungo pode ainda induzir, nas plantas atacadas, a formação de cancrios, morte de raízes e murcha da copa (AUER; GRIGOLETTI JUNIOR; SANTOS, 2001; GIBSON, 1979; CHOU, 1987).

Também são importantes no estabelecimento da doença, as condições ambientais propícias para a colonização do fungo. No caso de *S. sapinea*, estas condições são as chuvas fortes no verão com injúrias nas plantações, associadas a plantios estabelecidos em sítios inadequados com solos mal drenados e pouco profundos.

Praticamente todas as espécies do gênero *Pinus* são atacadas pelo fungo, mas existem diferenças entre as espécies na suscetibilidade ao ataque (WINGFIELD, KNOX-DAVIES, 1980; SWART, WINGFIELD, 1991; CEDEÑO *et al.*, 2001). Na África do Sul, este fungo infecta *P. patula* e *P. radiata* e existem relatos de infecção em raízes de *P. taeda* e *P. elliottii*, sendo que *P. taeda* parece ser o mais suscetível. Também, neste caso, o fungo ocorre depois de uma situação de estresse no plantio (TPCP, 2002). O *P. radiata* é considerado uma das espécies mais suscetível ao *S. sapinea*. Em contrapartida, o *P. pinaster* possui, segundo Garcia e Diez (2003) uma alta resistência a este patógeno.

As árvores de *P. radiata* são suscetíveis ao fungo em todas as idades, mas nos povoamentos mais antigos os danos provocados por seus ataques são mais severos, principalmente nas árvores com 30 anos de idade (PETERSON, 2005).

2.2.2 Métodos de controle de *Sphaeropsis sapinea*

O plantio de variedades resistentes é o melhor método de controle de doenças de plantas porque proporciona vantagens como: baixo custo, fácil uso, alta eficácia e ecologicamente desejável (MIZUBUTI; MAFFIA, 2006).

A qualidade da muda também é fator que merece atenção, principalmente com relação ao sistema radicular. Em espécies florestais, a má formação do sistema radicular, seja por recipiente ou por manejo inadequados

no viveiro, provoca enovelamento das raízes e predispõem estas mudas ao estresse (GOMES, 2005). Quando ocorre deformidade no crescimento radicial, as plantas ficam prejudicadas na absorção de água e nutrientes comprometendo o seu desenvolvimento e favorecendo uma condição de estresse e estabelecimento das doenças fúngicas. No caso da infecção provocada pelo *S. sapinea* este pode ser um dos fatores principais para o estabelecimento da doença (DE WET *et al.*, 2000). A eliminação de focos antigos do *S. sapinea* em árvores mais velhas é considerado, também, um método de controle importante para o *S. sapinea* (STANOSZ; CUMMINGS CARLSON, 1996).

Outra condição que merece atenção na relação patógeno-hospedeiro é a infecção latente. Esta situação tem sido freqüentemente observada e é considerada como importante, pois hospedeiro e parasita coexistem com mínimo dano ao hospedeiro, sem apresentar sintomas, persistindo neste quadro até que os sintomas surjam por condições favoráveis do ambiente, do hospedeiro ou do patógeno (SINCLAIR, 1991). A infecção latente pode ser reconhecida como um tipo de tolerância ou resistência da planta a certos patógenos, resultado da co-evolução entre a planta e o patógeno, permitindo a coexistência de hospedeiro e patógeno. A alta suscetibilidade individual das plantas e a alta virulência dos patógenos podem ter sido eliminadas no início do processo evolutivo. A informação sobre o tipo de infecção é importante no controle de doenças de plantas e na obtenção de resistência ou tolerância a um patógeno (GLIENKE, 1995). *S. sapinea* tem sido encontrado como endofítico em cones e tecidos do tronco de árvores saudáveis e somente se a planta ficar estressada é que os sintomas de doenças poderão aparecer (STANOSZ; CUMMINGS CARLSON, 1996).

O maior problema para o *P. nigra* e para o *P. radiata* é o *S. sapinea* porque o controle deste fungo por podas ou por pulverização é muito difícil e geralmente ineficaz. A maioria das árvores afetadas morre ou tem que ser removidas do plantio. As árvores novas, que ainda não estão produzindo cones raramente são afetadas pela seca do ponteiro, se não existir um foco de dispersão do inóculo no plantio, funcionando como fonte primária de dispersão (HARTMAN *et al.*, 2002; STANOSZ, 2002). De acordo com Stanosz (2002) a severidade da doença provocada pelo *S. sapinea* difere dependendo do

morfotipo presente no local do plantio. O morfotipo “A” é considerado bastante agressivo e neste caso o melhor fator de controle da doença é o plantio de árvores resistentes, uma vez que o controle deste morfotipo tanto nos plantios como nos viveiros através de fungicida não apresenta bons resultados.

Como forma de prevenção, Pataky (1997) recomendou observar as exigências de sítio para cada espécie e evitar o plantio árvores novas próximo de outras doentes ou em sítios favoráveis para o desenvolvimento da doença.

No Chile, os métodos de controle considerados mais eficazes para o controle do *S. sapinea* são através de podas fitossanitárias preventivas e o plantio de plantas resistentes (CORMA, 2003).

Apesar da grande importância, o conhecimento da forma de atuação desses microrganismos endofíticos ainda é escasso. Plantas lenhosas e perenes, cuja expansão dos plantios se faz cada vez mais por propagação vegetativa, são hospedeiros estratégicos para esse grupo de microrganismos (GLIENKE, 1995).

No Brasil, a técnica de propagação vegetativa em espécies do gênero *Pinus* ainda está em fase de experimentação, mas em alguns países como Chile e Argentina, esta técnica já faz parte da rotina das empresas. Neste caso, uma das melhores estratégias para evitar doenças como a seca de ponteiro provocada pelo *S. sapinea* seria a seleção e o plantio de clones resistentes (STANOSZ, 2002).

2.3 ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO

2.3.1 Características morfológicas

Na década de 1980, dois morfotipos (“A” e “B”) foram descritos para o *S. sapinea*, baseado nas diferentes dimensões dos conídios, diferentes dimensões e morfologia das paredes conidiais (SUTTON, 1980), na aparência dos micélios, na taxa de crescimento em cultura, na agressividade e nos padrões enzimáticos (PALMER *et al.*, 1987; BLODGET; STANOSZ, 1999; DE WET *et al.*, 2002). O morfotipo “A” é caracterizado por apresentar um micélio branco para cinza esverdeado, macio e com conídios de paredes lisas. O tipo “B” tem um micélio branco para preto, prensado na superfície do ágar e com

paredes conidiais marcadas por depressões (WANG *et al.*, 1986; PALMER *et al.*, 1987; DE WET *et al.*, 2003).

Um terceiro morfotipo “C” foi descrito por De Wet *et al.* (2003) baseando-se na morfologia dos seus esporos. Também por tecnologia molecular, como por exemplo: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e nas seqüências de rDNA. Este morfotipo apresenta micélio macio e conídios de parede lisa como o tipo “A”, mas significativamente mais longos. De Wet *et al.* (2003) descreveu este morfotipo de isolados obtidos do Norte da Indonésia. Os trabalhos revelaram que o morfotipo “C” comportou-se como o mais agressivo entre os três morfotipos, seguido pelo tipo “A” e depois pelo tipo “B”.

Outro morfotipo chamado de morfotipo “I” foi descrito por Hausner *et al.* (1999) e depois relacionado com a espécie *Botryosphaeria obtusa*, através de técnicas de seqüenciamento de DNA (DE WET *et al.*, 2003).

Vários estudos realizados com isolados de *S.phaeropsis* obtidos de populações nativas e introduzidas de *P. radiata*, em várias partes do mundo, mostram que o morfotipo “A” é mais amplamente distribuído e coloniza muitos tipos de coníferas, enquanto que o tipo “B” e “C” possuem uma distribuição mais restrita (WANG *et al.*, 1985 e PALMER *et al.*, 1987) sendo considerados raros (DE WET *et al.*, 2003). O morfotipo “C” foi isolado apenas em plantas doentes na Indonésia, e os morfotipos “B” foram isolados no México, na América do Norte e em 2001 na Venezuela em um trabalho de Cedeño *et al.* (2001).

O morfotipo tipo “B” é considerado de baixa freqüência em plantações exóticas de pínus no Hemisfério Sul. O morfotipo “A” se dissemina através de sementes e o morfotipo “B” infecta o hospedeiro preferencialmente em processo de pós-germinação (PALMER *et al.*, 1987).

Trabalhando com dados morfológicos e patogênicos combinados com uma genealogia gerada por dados de microsátélites, De Wet *et al.* (2003) sugeriram que o morfotipo “B” fosse tratado como uma nova espécie, *Diplodia scrobiculata*. Neste mesmo estudo, De Wet *et al.* (2003) relatam que o morfotipo “C” deve ser considerado como um leve variante do morfotipo “A”, porque nos resultados das análises moleculares estes morfotipos ficaram muito próximos geneticamente um do outro. Divergências genéticas visíveis foram encontradas sem nenhuma correlação com distribuição geográfica.

De Wet *et al.* (2000) afirmam que um grande esforço está sendo feito nos EUA no sentido de caracterizar os morfotipos dos isolados de *S. sapinea* usando as características morfológicas, moleculares e de virulência. Esta caracterização é muito importante, porque a estratégia de ação para prevenir a doença depende do morfotipo presente no local (BLODGETT; STANOSZ, 1999; DE WET *et al.*, 2000; STANOSZ, 2002).

2.3.2 Compatibilidade vegetativa

Várias são as técnicas empregadas para análise de diversidade em microrganismos, sendo mais comum as técnicas que fazem caracterização de fenótipos. A compatibilidade vegetativa (CV) é uma característica fenotípica muito usada no estudo de diversidade genotípica em fungos (ANAGNOSTAKIS, 1983; LESLIE, 1993). Esta compatibilidade é medida pela formação de micélios confluentes que são visualizados como um tufo algodado entre os isolados. Os isolados que apresentam crescimento vegetativo e formam linhas com micélios confluentes, quando pareados, são considerados vegetativamente compatíveis pela diferença ou similaridade dos isolados. Esta característica é comandada por um loci chamado de *vic loci* (LESLIE, 1993). Em *S. sapinea* este número ainda é desconhecido, mas em *Fusarium moniliforme* sabe-se que este número é superior a 10 *vic loci* (LESLIE, 1993).

2.3.3 Caracterização molecular de fungos fitopatogênicos

As técnicas baseadas em marcadores de DNA como não estão sujeitas às influências do ambiente são extremamente eficazes para a complementação da caracterização de isolados e de populações, uma vez que estas técnicas detectam diretamente a variação genética. Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Algumas destas técnicas se baseiam na amplificação aleatória de fragmentos de DNA, através de reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

permitindo uma avaliação rápida da diversidade genética entre os indivíduos isolados (GLIENKE, 1995).

A técnica de RAPD é uma técnica barata, amplamente utilizada, com uma grande quantidade de marcadores já disponíveis e que não requer nenhum trabalho preliminar antes de sua realização (GLIENKE, 1995). A técnica de RAPD foi descrita por Williams *et al.* (1990) e permite identificar o grau de similaridade entre genótipos no nível inter e intra-específico. O RAPD baseia-se na repetição cíclica das seqüências complementares de DNA que vão se anelando nos dois opostos de uma fita de DNA molde. Utiliza-se um único *primer* de seqüência arbitrária, portanto sua seqüência alvo é desconhecida. Com esta técnica é possível amplificar fragmentos não específicos de DNA, utilizando oligonucleotídeos de 10 a 15 bases como iniciadores da amplificação, numa PCR. Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos (GLIENKE, 1995).

Esta reação de RAPD é muito eficiente na identificação de polimorfismo e pode ser usada para identificação e classificação de diferentes variedades com respeito ao nível de similaridade genética. Esta técnica tem gerado mapas genéticos detalhados em plantas (HALWARD *et al.*,1991) e identificado diferentes isolados de *Colletotrichum truncatum* causador da antracnose em soja (VASCONCELLOS *et al.*,1994). A diferenciação de patógenos também é possível via RAPD, sendo possível separar linhagens patogênicas e não patogênicas em grupos distintos (MANULIS *et al.*,1991).

2.3.4 Teste de agressividade em frutos de maçã var. Granny Smith

Um importante passo que pode fornecer medidas mais eficientes para o controle da doença, é a seleção de indivíduos resistentes ao patógeno. Mas, antes de se realizar esta seleção é importante o conhecimento dos diferentes níveis de agressividade do fitopatógeno, pela possibilidade de erros na indicação de resistência com o uso de isolados pouco agressivos (RODRIGUES CASSIOLATO, 1994).

A avaliação inicial da agressividade entre isolados fitopatogênicos em maçãs variedade Granny Smith pode ser útil na análise da agressividade e,

também, para a caracterização dos morfotipos. Com este objetivo, esta técnica foi utilizada por De Wet *et al.* (2002) em maçãs do tipo Granny Smith onde estes pesquisadores determinaram a agressividade e realizaram a caracterização de vários morfotipos de *S. sapinea*. O teste com frutos de maçã Granny Smith foram considerados, por estes autores, como rápidos, de baixo custo, de fácil visualização e por oferecerem resultados confiáveis, prestando-se, portanto, como testes de caracterização e determinação da agressividade em *S. sapinea*.

2.4 ESTUDOS DE AGRESSIVIDADE DE *Sphaeropsis sapinea* E SELEÇÃO PRECOCE DE MATERIAL RESISTENTE

Estudos de seleção precoce realizados para testar a resistência de espécies de pínus a fungos podem produzir resultados confiáveis, quando realizados sob condições de casa de vegetação (DE SOUZA *et al.*, 1991; 1992). Os testes de seleção quando realizados no campo são caros e requerem anos para se obter resultados confiáveis e assim mesmo, no que se refere ao inóculo, nunca se sabe, com precisão, nas condições de campo, a quantidade com que cada planta foi inoculada, uma vez que o inóculo é natural (DE SOUZA *et al.*, 1991, 1992).

A suscetibilidade dos hospedeiros ao *S. sapinea* não pode ser determinada através da literatura, por causa da ausência de experimentos realizados sob condições controladas e usando isolados do patógeno bem caracterizado. Como consequência desta lacuna a relação do patógeno com os vários hospedeiros que são atacados pelo fungo *S. sapinea*, apesar de largamente estudada, não é compreendida. Esta compreensão surge, segundo Blodgett e Stanosz (1999) com estudos realizados em casa de vegetação com inóculo bem caracterizado fornecendo informações para estudos de resistência do hospedeiro. Esta estratégia de seleção precoce visando encontrar espécies ou variedades resistentes ao *S. sapinea* auxilia os trabalhos de campo, inclusive estimando os riscos de danos causados pela doença (BLODGETT; STANOSZ, 1999).

Burdon (1982) inoculou artificialmente 100 mudas de *P. radiata* oriundas de sementes colhidas de árvores aparentemente resistentes,

localizadas em um povoamento atacado pelo fungo *S. sapinea*. Ao mesmo tempo foram inoculadas outras 300 mudas, oriundas de povoamento com histórico de plantas jovens atacadas pelo *S. sapinea* e de povoamento sem histórico da doença, como controle. Este trabalho mostrou que existem diferenças individuais na resposta ao *S. sapinea* pelo hospedeiro e que estas diferenças eram herdáveis e aditivas.

Swart e Wingfield (1991) inocularam com *S. sapinea* 6 diferentes espécies de pinus cultivados na África do Sul, com objetivo de determinar a suscetibilidade destas espécies ao patógeno e confrontaram os resultados obtidos em casa de vegetação com os experimentos no campo e encontraram consistência nos seus resultados.

Em trabalho semelhante, Blodgett e Stanosz (1999) inocularam artificialmente, em casa de vegetação, mudas de vários hospedeiros do *S. sapinea*. Os resultados destes experimentos mostraram que a incidência de sintomas da doença diferenciou de acordo com o morfotipo inoculado, com os diferentes hospedeiros e entre variedades dos hospedeiros. Os testes realizados em casa de vegetação com metodologia padronizada para inoculação do patógeno no hospedeiro visando determinar as diferenças de agressividade entre os isolados em relação à suscetibilidade do hospedeiro foram considerados satisfatórios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea*

Os isolados do fungo empregados nesse estudo foram obtidos de árvores com sintomas de ataque do patógeno, coletados de ponteiros de *P. taeda* (São José do Ouro/RS e Rancho Queimado/SC) e de mudas mortas de *P. maximinoi* (Santa Maria do Oeste/PR) e de cones doentes de *Pinus sp.* (Curitiba/PR), no período de 2006 a 2007, conforme TABELA 1. Foi realizado isolamento direto de conídios em meio de cultura ou por meio da esporulação em material coletado doente mantido em câmara úmida e posterior transferência de conídios para meio de cultura.

Para o isolamento direto em meio de cultivo dos isolados utilizou-se os meios batata-ágar-dextrose-BDA (extrato comercial de batata e ágar, 39 g; 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) e incubados por três a quatro dias. Dos ponteiros e das mudas mortas foram retirados fragmentos de tecidos doentes e frutificações. No caso dos cones foram removidas as brácteas, lavadas as suas superfícies e cortadas em três a quatro segmentos.

No isolamento indireto, após confirmação ao microscópio da presença de frutificações de *S. sapinea* no material doente, os picnídios formados foram cuidadosamente retirados e colocados em tubos de *Eppendorf* com água destilada estéril. Este material foi centrifugado rapidamente para sedimentação dos resíduos e com auxílio de uma micropipeta retirou-se 300 µL do conteúdo dos tubos e colocadas algumas gotas em placas com meio ágar-ágar - AA (20 g de ágar e água destilada, 1000 mL). Estas placas foram levadas ao microscópio para confirmar a presença de conídios e depois os conídios foram postos para germinar. Este período até que o primeiro conídio começasse a germinar foi monitorado, sendo possível observar o momento exato da germinação. Neste tipo de isolamento, os isolados monospóricos foram obtidos diretamente, sem a obtenção dos isolados originais.

Para a obtenção das culturas monospóricas um quadrado de micélio de cinco mm² foi retirado da colônia de cada isolado e colocado em placas de Petri com o meio acícula de pínus-ágar - APA (20 g de ágar e água destilada,

1000 mL, suplementado com três a 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) de acordo com trabalho de Basilio *et al.* (2007). As placas foram incubadas sob luz fluorescente, a 25 °C, até os picnídios se desenvolverem. Os picnídios individualizados foram suspensos, em água esterilizada e misturados com ajuda de um Vortex. Depois eles foram plaqueados em placas com meio AA por uma noite, a 25 °C. Dessas placas, os conídios germinados foram transferidos para o meio EMA a 25 °C e cultivados por 7 dias, conforme utilizado por De Wet *et al.* (2000).

Para induzir a produção de picnídios e de conídios os isolados foram transferidos para placas contendo meio APA e incubados a 25 °C, sob luz constante, conforme mencionado por De Wet *et al.* (2000). Os picnídios individualizados (contendo conídios) foram colocados em tubos de ensaio com água esterilizada, triturados com estilete e misturados com ajuda de um agitador ou de forma manual. Alíquotas de 100 a 300 µl da suspensão de conídios foram tomadas com uma micropipeta, plaqueados em meio AA, e incubados por duas horas, a 25° C. Neste período de tempo, os conídios iniciaram a germinação e a formação de hifas. Sob microscópio estereoscópico, os conídios germinados foram coletados com um estilete, transferidos para placas com meio extrato de EMA, cada placa com apenas um conídio germinado. Posteriormente, as placas foram repicadas e mantidas em câmara BOD, a 25 °C, para o desenvolvimento das colônias monospóricas.

Após a confirmação da identificação baseada na morfologia dos conídios e picnídios segundo a descrição de Sutton (1980), os isolados monospóricos cultivados em meio EMA ou meio BDA foram transferidos para tubos de ensaio contendo BDA, cultivados, recobertos com óleo mineral esterilizado e colocados em geladeira a 4 °C para fim de preservação.

Os isolados originais e os monospóricos estão listados na TABELA 1 e sua origem podem ser visualizadas na FIGURA 2. Todos os isolados foram identificados de acordo com as características dos conídios (SUTTON, 1980; DE WET *et al.*, 2002) e estão armazenados em geladeira a 4 °C, para fins de preservação.

TABELA 1 – INFORMAÇÕES SOBRE OS ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* E SUA ORIGEM

ISOLADOS ORIGINAIS/ ISOLADOS MONOSPÓRICOS	LOCAL DA COLETA	HOSPEDEIRO	PARTE COLETADA
SS1 SS1.1 SS1.2 SS1.3	São José do Ouro/RS	<i>Pinus taeda</i>	Ponteiros doentes
SS2 SS2.4 SS2.5 SS2.6	Rancho Queimado/SC	<i>Pinus taeda</i>	Ponteiros doentes
SS3 SS3.7 SS3.8 SS3.9	Santa Maria do Oeste/PR	<i>Pinus maximinoi</i>	Mudas mortas
SS4 SS4.10 SS4.11 SS4.12	Curitiba/PR	<i>Pinus sp.</i>	Cones doentes

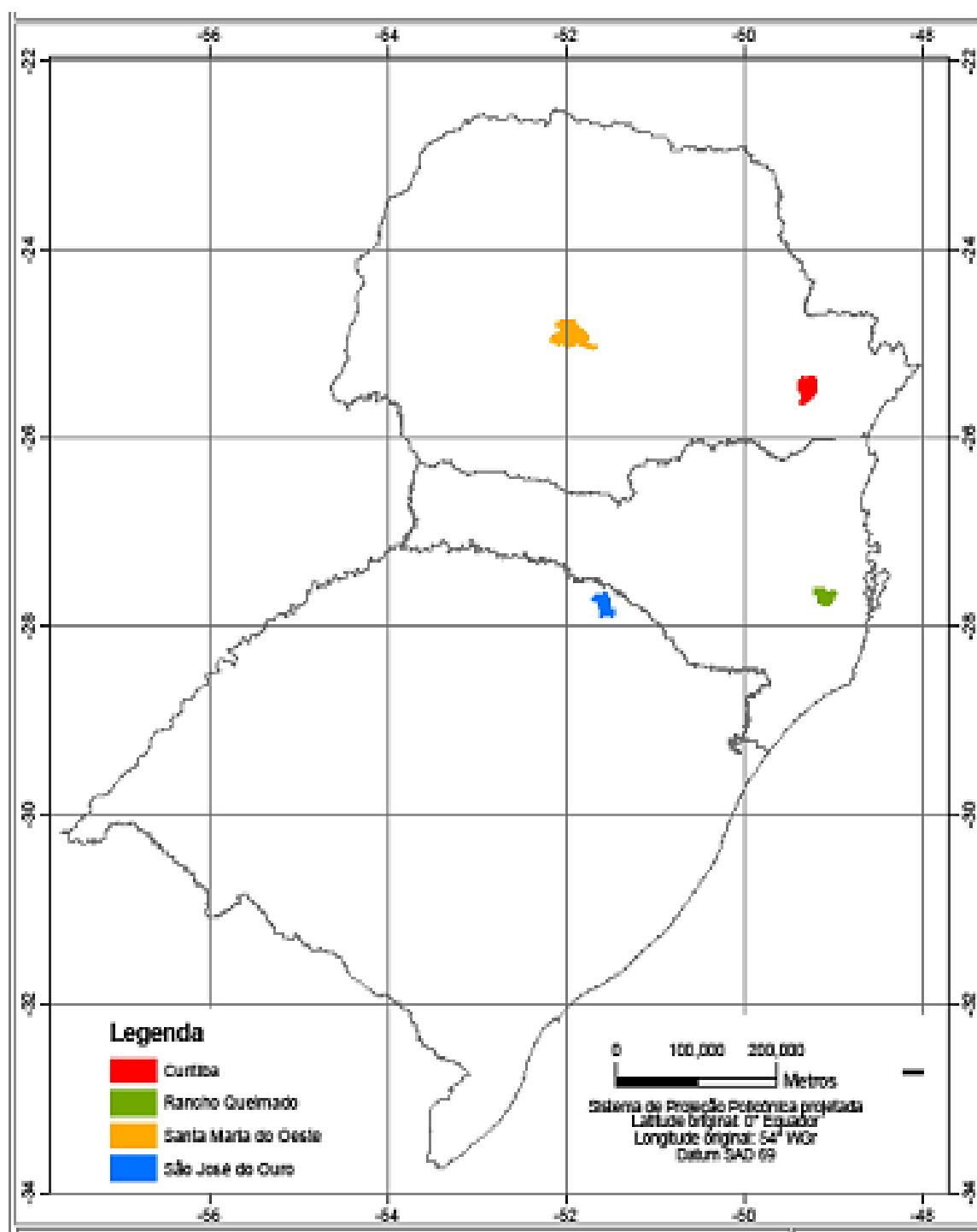


FIGURA 2 LOCAIS DE COLETA DE *Sphaeropsis sapinea* NA REGIÃO SUL DO BRASIL.

Legenda: São José do Ouro – isolado SS1; Rancho Queimado – isolado SS2; Santa Maria do Oeste – isolado SS3; Curitiba – isolado SS4.

FONTE: LABORATÓRIO DE MONITORAMENTO – EMBRAPA FLORESTAS (2007)

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea*

A caracterização morfológica dos isolados de *S. sapinea* foi feita em diferentes meios de cultura para observar o tipo de crescimento, a coloração do micélio, a aparência das colônias e as diferenças entre os conídios, baseando-se em trabalhos de Blodget e Stanosz (1999) e De Wet *et al.* (2002). Os isolados foram cultivados nos meios BDA, EMA e APA. A velocidade de crescimento dos isolados foi acompanhada diariamente até que as colônias atingissem os bordos das placas. Avaliou-se, também, o aspecto do micélio e sua coloração e a textura, em cada meio testado.

Os isolados SS1, SS2, SS3 e SS4 com seus respectivos isolados monospóricos foram colocados em meio APA para formação de picnídios e conídios, conforme metodologia citada no item 3.1. Os conídios foram avaliados qualitativamente quanto às diferenças de tamanho, a textura da parede e a presença de septos.

3.2.1 Teste de compatibilidade vegetativa (CV)

A diversidade genotípica dos isolados foi estimada usando-se teste de compatibilidade vegetativa (Burgess *et al.*, 2001).

Discos com micélio-ágar dos isolados SS1, SS2, SS3, SS4 e seus monospóricos com sete a dez dias de crescimento foram transferidos para placas de Petri com meio AA a uma distância de 1 cm entre si e incubados por quatro dias em BOD, a 25° C. Estes discos foram distribuídos nas placas de Petri de forma que em cada quarto da placa os isolados originais e seus monospóricos (mesma origem) ficassem próximos (FIGURA 3), confrontando-se entre si, e ao mesmo tempo, confrontando com os outros isolados das outras origens.

Depois das comparações iniciais, onde todos os isolados foram colocados para crescer juntos na mesma placa, foram realizadas comparações com um menor número de isolados por placa de Petri, em geral de dois em dois, ou no máximo, de três em três isolados monospóricos por placa.

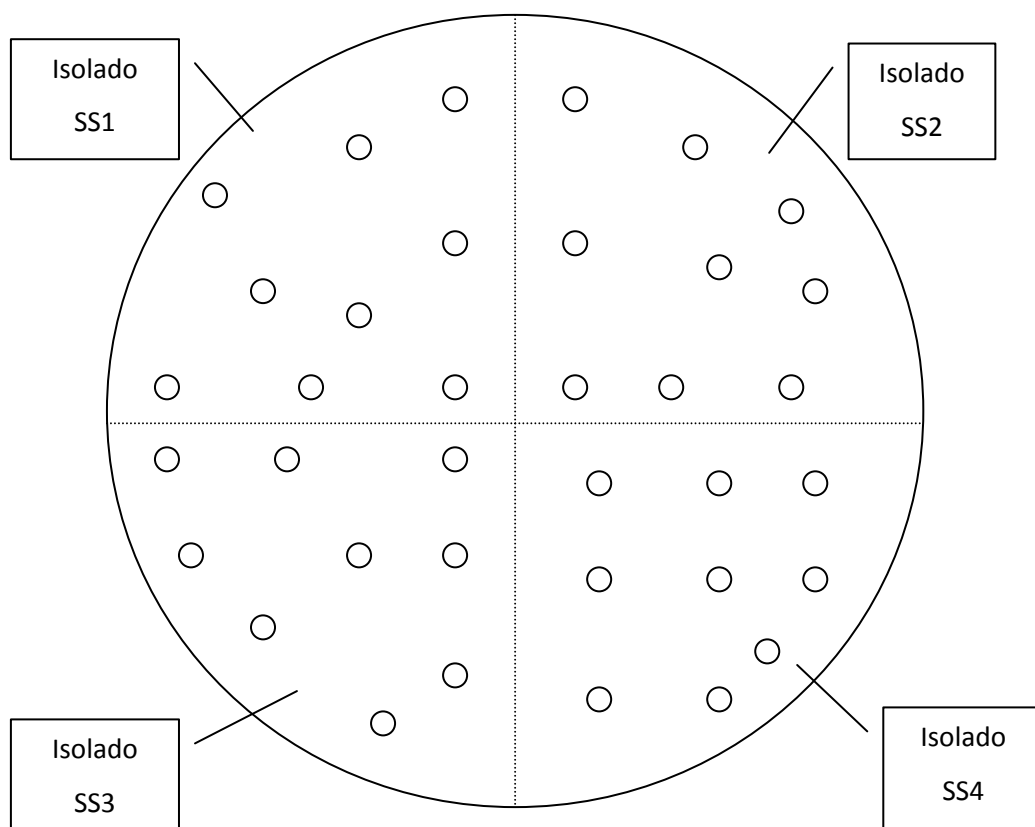


FIGURA 3 ESQUEMA DE PAREAMENTO DE DISCOS DE MICÉLIO-ÁGAR CONTENDO DIFERENTES ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* EM MEIO ÁGAR-ÁGAR PARA AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE VEGETATIVA.

Cada isolado foi confrontado com ele mesmo, com os outros isolados monospóricos obtidos do mesmo isolado original, e confrontado com os isolados monospóricos obtidos de isolado monospórico das outras localidades. Foi necessária a realização de todas estas comparações, inclusive do isolado monospórico com ele mesmo, para que pudessem ser montados os padrões de reações denominados de: compatibilidade vegetativa (CV), média compatibilidade vegetativa (MCV) e incompatibilidade vegetativa (ICV), para facilitar a análise das reações de compatibilidade.

Dois isolados monospóricos foram considerados vegetativamente incompatíveis (ICV) quando se formou uma linha preta bem definida com posterior formação de picnídios entre os isolados confrontados. Os isolados monospóricos foram considerados como vegetativamente compatíveis (CV) quando formou uma densa linha clara ou cinza com entrelaçamento micelial entre eles. A média compatibilidade foi obtida quando apareceu uma linha fina escura com algum entrelaçamento micelial entre os isolados confrontados. O ponto de encontro entre as colônias dos isolados foi analisado ao microscópico estereoscópico, de acordo com o observado por Burgess *et al.* (2001).

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *Sphaeropsis sapinea*

Para as análises moleculares, a numeração dos isolados foi organizada como SS1 (4) com os monospóricos: SS1.1 (1), SS1.2 (2), SS1.3 (3); SS2 (8) com os monospóricos SS2.4 (5), SS2.5 (6), SS2.6 (7); SS3 (12) com os monospóricos: SS3.7 (9), SS3.8 (10), SS3.9 (11) e SS4.10 (13), SS4.11 (14), SS4.12 (15). Os números entre parênteses correspondem à numeração que os isolados receberam na eletroforese.

3.3.1 Metodologia de extração de DNA total de microrganismos

A extração de DNA dos fungos de *S. sapinea* foi realizada em amostras obtidas de micélio cultivado em meio BDA. Para tanto dois métodos foram testados: uma por meio de raspagem direta com alça de platina e a outra por meio da remoção direta de aproximadamente um cm² de meio com bisturi cirúrgico, eliminando-se o máximo do gel. Esses métodos fazem parte da rotina

de testes para extração de DNA em microrganismos do Laboratório de Microbiologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

As amostras oriundas do meio BDA foram adicionadas a um tubo de *Eppendorf* (2 mL) contendo cultura em meio líquido e o conjunto foi centrifugado (2500 rpm), por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e então adicionado 400 µL de CTAB¹ (brometo de cetiltrimetilamônio) 2X com uma mistura de sílica e celite (2:1).

O conjunto foi homogeneizado e aplicado Sonicador, alternando com banho de gelo de 2 x 30 minutos. Após esta etapa foi adicionado 250 µL de CTAB, e colocado em banho maria a 65 ° C por 10 minutos.

O conjunto foi resfriado a temperatura ambiente e então adicionado 700 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24/1, v/v), agitando suavemente por 2 minutos até a sílica soltar do fundo. Passou-se para centrifugação por 7 minutos a 12.000 rpm. Retirando-se cuidadosamente o sobrenadante (500 µL) para outro tubo estéril e identificado. Adicionou-se o mesmo volume de CIA (500 µL) nesse tubo de *Eppendorf* e centrifugado por 7 minutos a 12.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 2 volumes de etanol 96 % gelado homogeneizando suavemente. O DNA foi precipitado, mínimo 2 horas no freezer. Após este período centrifugou-se o DNA por 7 minutos a 12.000 rpm e descartou-se o sobrenadante, com o auxílio de micropipeta, e secou-se a temperatura ambiente. O DNA isolado foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA² 1 mM) 1x e armazenado em freezer.

A qualidade do DNA foi verificada utilizando-se gel de agarose a 1 % corado em brometo de etídio e fotografado em fotodocumentador sistema KODAK. A partir da foto foi estimada a concentração do DNA isolado.

¹ 2 % (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM

² Ácido etilenodiamono tetracético

3.3.2 Técnica de RAPD em *Sphaeropsis sapinea*

Para a amplificação do DNA, pela técnica de RAPD, utilizou-se um Mix contendo os seguintes elementos: 1,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase; 5 μM para cada dNTP; 3,0 μM de cloreto de magnésio (MgCl_2); 0,4 μM de *primers* 20 mM de Tris-HCl pH 8,4; 5 mM KCl e 10 ng de DNA por 25 μL de reação.

Foram utilizados 35 ciclos nas seguintes condições: 1 minuto a 92 °C; 1,5 minutos a 37 °C e 1 minuto a 72 °C. Foram utilizados 5 minutos a 94 °C para desnaturação inicial e 5 minutos a 72 °C de extensão final.

A mistura contendo 15 μL de cada amostra mais 5 μL de tampão de carregamento foi aplicada no gel (1,5 %). Nas extremidades foram aplicado marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (MPM). A corrida do DNA no gel foi realizada sob voltagem constante de 3 V por cm.

Neste trabalho foram utilizados 11 *primers* aplicando-se a técnica de Marcadores RAPD Os *primers* (iniciadores) utilizados foram OPA (07, 16, 10); OPX (12, 13, 14, 11, 03, 17, 19), OPA 16; OPAX 19.

3.3.3 Análise de Polimorfismo

Após a corrida do gel de agarose, os perfis obtidos por RAPD foram corados por 10 minutos com brometo de etídio. Por ser um agente intercalante, ele permite que o DNA possa ser evidenciado e fotografado sob luz UV em transluminador (GLIENKE, 1995).

A análise da variabilidade genética dos morfotipos foi realizada de acordo com os princípios adotados de taxonomia numérica. Utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard, que permite calcular similaridades com base em variáveis binárias: (0) para ausência de banda e (1) para presença de banda (GLIENKE, 1995). Os morfotipos foram considerados como unidades e bandas foram consideradas como as variáveis.

O coeficiente foi calculado segundo a fórmula $J=M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, subtraindo

as concordâncias negativas (SNEATH; SOKAL, 1973). Quanto maior for a semelhança entre dois morfotipo, maior é o valor do coeficiente de similaridade.

O agrupamento dos morfotipos (unidades) foi realizado pelo método UPGMA (Unweighted Pari-Group Method with Arithmetical Average). Este agrupamento é um modelo hierárquico que permite a construção de dendrogramas (SNEATH; SOKAL, 1973). Os dendrogramas foram elaborados com auxílio do programa NTSYS-PC.

3.4 AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* EM FRUTOS DE MAÇÃ

A agressividade dos isolados de *S. sapinea* foi inicialmente testada usando-se a técnica de inoculação em frutos de maçã. Essa técnica foi utilizada por De Wet *et al.* (2002) em frutos de maçã var. Granny Smith para caracterizar os morfotipos de *S. sapinea*. Os isolados SS1, SS2, SS3 e SS4 foram cultivados em meio BDA para produção de inóculo (discos de micélio-ágar).

Cada maçã foi desinfestada superficialmente com álcool 70 %. Furadores de cortiça foram usados para fazer um orifício de cinco mm de largura em um dos lados da maçã. Um disco de micélio-ágar foi retirado de placas de Petri contendo meio BDA e colocado em cada orifício, que foram recobertos com fita de PVC. Como testemunha utilizou-se disco de meio BDA sem micélio. Cada isolado foi inoculado em três frutos, com cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Os frutos foram mantidos por duas semanas em BOD, a 25 °C, no escuro.

Foram realizadas duas medições, uma aos sete dias após a inoculação (sete DAI) e outra medição aos 14 DAI. Com auxílio de uma régua foi medido o tamanho das lesões no sentido vertical e no sentido horizontal.

3.5 AVALIAÇÃO DO TIPO DE INOCULAÇÃO, DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* E REGIME HÍDRICO NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA EM MUDAS DE *Pinus taeda*

O ensaio foi realizado nas estufas do Laboratório de Melhoramento Florestal – LAMEF/ UFPR, Curitiba, PR. Mudanças de *P. taeda*, com aproximadamente sete meses de idade, foram inoculadas com isolados de *S. sapinea*.

A área do experimento continha duas estufas agrícolas, em forma de túnel, com 5 m x 8 m recoberta por sombrite de 12 m x 20 m. Duas estufas tinham 6 m de comprimento por 4 m de largura, estruturadas por tubos de PVC, com 5,5 cm de diâmetro e 6 m de comprimento (normalmente usados em estufas agrícolas) e recobertas com lona plástica transparente. Uma terceira foi recoberta somente com sombrite 75 % de passagem de luz solar.

O monitoramento dos ambientes foi realizado medindo-se a quantidade de água diária de cada estufa, através de provetas. Na área coberta apenas pelo sombrite, a água da chuva foi coletada, separadamente, da água dos aspersores. A temperatura e a umidade dentro das estufas foram monitoradas diariamente, durante todo experimento, usando-se um Hobbo®. Este equipamento foi aferido periodicamente com o termômetro de máximo e mínimo e a umidade com o uso de termômetro de bulbo seco e úmido.

Neste ensaio avaliou-se o efeito do tipo de inoculação, do regime hídrico no desenvolvimento da doença em casa de vegetação, da agressividade dos isolados de *S. sapinea*.

3.5.1 Tipo de inoculação

Foram testados dois tipos de inoculação: com e sem injúria, com duas testemunhas com e sem injúria.

3.5.2. Regime hídrico da estufa

Três regimes hídricos foram escolhidos para determinar o mais favorável ao estabelecimento da doença: No ambiente 1, o regime foi de uma aspersão

diária (8:00 h) com 4 minutos de duração. No ambiente 2, o regime foi de duas aspersões ao dia (9:00 h e 17:00 h), com 4 minutos de duração cada aspersão. No ambiente 3 (sombrite), o regime foi três aspersões ao dia (9:30 h, 12:00 h e 18:00 com 20 minutos de duração cada aspersão).

As mudas foram submetidas a uma condição de estresse hídrico, antes da inoculação, sem molhamento por sete dias, segundo De Wet *et al.* (2002).

3.5.3 Inoculação das mudas de *Pinus taeda*

Os isolados foram cultivados em meio BDA e transferidos para meio AA para produção do inóculo (disco de micélio-ágar). Para a inoculação, utilizaram-se discos de micélio-ágar retirados do meio AA com 10 dias de crescimento. Cada disco de meio AA, contendo ou não o fungo, foi fixado na planta com fita adesiva por quatro dias. As plantas inoculadas foram mantidas em câmara umedecida com água destilada, por 48 h. Depois deste período, as mudas foram transferidas para as estufas e mantidas por cerca de 30 dias sob observação.

Este experimento foi montado em delineamento em blocos ao acaso com arranjo fatorial, num total de 864 plantas (12 isolados monospóricos, dois tipos de inoculação, três regimes hídricos, três repetições, duas plantas por parcela). Para as análises estatísticas foi feito ANOVA e teste de Duncan pelo programa Statistic (1998).

Na avaliação da doença, mediu-se o comprimento da lesão com o auxílio de uma régua, a partir do ponto de inoculação (BLODGETT; STANOSZ, 1999). Dois modos de avaliar a severidade foram empregados. No primeiro modo, o comprimento da lesão foi avaliado de acordo com uma escala, que variou de pequena (0 a 3 cm), média (4 a 7 cm) e grande (8 a 10 cm). No segundo, o secamento do ponteiro foi avaliado de acordo com uma escala, onde 0 significou ausência de sintoma da doença, 1 para o início de lesão, 2 quando houve seca de ponteiro, 3 para seca de ponteiro sem anelamento, 4 para seca de ponteiro com anelamento e 5 para muda morta (BURDON *et al.*, 1982).

3.5.4 Recuperação de *Sphaeropsis sapinea* de mudas de *Pinus taeda*

Foram avaliadas três metodologias para confirmação da presença do fungo nas lesões. A primeira metodologia foi através do reisolamento por meio de amostragem das mudas inoculadas de *P. taeda*. Essa amostragem foi feita através da coleta de material de cinco parcelas (duas plantas por parcela) em cada bandeja do experimento para a realização do reisolamento em placas de Petri com meio BDA, mantidas em BOD, a 25 °C.

A segunda metodologia testada foi manter os ponteiros de todas as plantas inoculadas em câmara úmida. Os ponteiros foram coletados após 1 mês de inoculação e mantidos em sacos plásticos individualizados, devidamente identificados.

A terceira metodologia testada foi colocar os ponteiros em câmara úmida dentro de gerbox com papel de filtro esterilizado e umedecido com água destilada estéril. Todo o material foi analisado semanalmente, por 30 dias. Após esse período, realizaram-se os exames dos ponteiros em microscópio estereoscópico e montadas lâminas coradas com lactoglicerol-azul de metileno para verificar a presença de picnídios ou conídios de *S. sapinea*.

3.6 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PROGÊNIES DE *Pinus radiata* À *Sphaeropsis sapinea*

O experimento foi realizado em novembro de 2007 em estufa do LAMEF-UFPR, com mudas de *P. radiata* com sete meses de idade, originadas de sementes de 16 famílias selecionadas oriundas de um teste de progênie de polinização controlada da Nova Zelândia. As sementes foram cedidas pelo ENSIS – CSIRO/SCION.

As mudas foram produzidas em tubetões, usando-se o substrato orgânico composto por casca de pínus compostada e vermiculita. O regime hídrico e o tipo de inoculação mais favorável para o desenvolvimento da seca de ponteiro em casa de vegetação foram escolhidos pelos resultados com os testes realizados com mudas de *P. taeda* (regime hídrico com duas aspersões diárias, com quatro minutos de duração cada, uma pela manhã e outra pela tarde e inoculação com injúria).

3.6.1 Inoculação dos isolados *Sphaeropsis sapinea* em mudas de *Pinus radiata*

Os isolados monospóricos SS1.3, SS2.4 e SS4.10 de *S. sapinea*, anteriormente avaliados, foram selecionados como os mais agressivos (itens 3.5 e 3.6) para esse ensaio. Os isolados foram cultivados em meio BDA e transferidos para meio AA para produção do inóculo (disco de micélio-ágar). Para a inoculação, utilizaram-se discos de micélio-ágar retirados do meio AA com 10 dias de crescimento. Cada disco de meio, contendo ou não o fungo, foi fixado em mudas de *P. radiata* com fita adesiva por quatro dias, conforme metodologia do item 3.6.3. Durante 48 horas as mudas inoculadas foram mantidas em câmara úmida com apenas água destilada. Depois deste período as mudas foram transferidas para as estufas e mantidas por cerca de 10 dias sob observação.

Na avaliação da doença, mediu-se o comprimento da lesão com o auxílio de uma régua, a partir do ponto de inoculação (BLODGETT; STANOSZ, 1999). Dois modos de avaliar a severidade foram empregados. No primeiro modo, o comprimento da lesão foi avaliado de acordo com uma escala, que variou de pequena (0 a 3 cm), média (4 a 7 cm) e grande (8 a 10 cm). No segundo, o secamento do ponteiro foi avaliado de acordo com uma escala, onde 0 significou ausência de sintoma da doença, 1 para o início de lesão, 2 quando houve seca de ponteiro, 3 para seca de ponteiro sem anelamento, 4 para seca de ponteiro com anelamento e 5 para muda morta (BURDON *et.al.*, 1982).

3.6.2 Recuperação de *Sphaeropsis sapinea* de mudas de *Pinus radiata*

Os ponteiros de todas as mudas de *P. radiata* inoculadas foram coletados e mantidos em sacos plásticos, devidamente identificados, para posterior análise da presença ou ausência do patógeno. Os ponteiros das mudas foram retirados, tomando-se o cuidado de incluir os pontos de inoculação do fungo.

Os ponteiros foram analisados individualmente sob microscópio estereoscópico em busca de picnídios ou conídios do *S. sapinea*. No caso

positivo da presença de picnídios e conídios de *S. sapinea*, foram montadas lâminas coradas com lactoglicerol - azul de metileno para confirmação.

3.6.3 Avaliação de herdabilidade para resistência das progênes de *Pinus radiata*

A herdabilidade de *P. radiata* foi determinada com base em duas variáveis: o tamanho das lesões e o secamento dos ponteiros (item 4.6.2). O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com 16 progênes, quatro tratamentos (três isolados monospóricos mais uma testemunha), com quatro repetições e duas plantas por parcela. O coeficiente de herdabilidade foi determinado de acordo com estudo de Cruz (2005) em nível de médias de família, segundo a fórmula:

$$\text{herdabilidade} = \frac{\sigma^2_m}{\sigma^2_m + \frac{\sigma^2_o}{r}} = \frac{Q_{mp} - Q_{me}}{Q_{mp}} \quad (1)$$

ONDE: σ^2_m = Variância da progênie
 σ^2_o = Variância do resíduo
 r = Número de repetições do experimento
 Q_{mp} = Quadrado médio das progênes
 Q_{me} = Quadrado médio do resíduo

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

4.1.1 Crescimento em meio de cultura

A metodologia de isolamento utilizada neste trabalho mostrou-se adequada para a obtenção dos isolados de *S. sapinea*, verificando-se que o fungo desenvolveu-se bem nos meios BDA e EMA a 25 °C, sendo que em meio BDA os isolados atingiram a borda da placa com cinco dias em média. Em meio AA os isolados cresceram mais lentamente, demorando em média de 14 dias para atingir a borda da placa, dependendo do isolado monospórico, similar ao crescimento em meio APA.

Em meio BDA, as colônias apresentaram inicialmente uma coloração branca algodoadas formando, aos poucos, raios esverdeados, visíveis, a princípio, mais facilmente no fundo da placa. Com o tempo estes raios foram tomando um tom verde-musgo a cinza-chumbo e com aspecto cotonoso. Em meio APA, o micélio apresentou-se ralo de coloração escura e gelatinosa. No meio AA, o micélio apresentou-se também ralo e de coloração cinza chumbo sem a presença de picnídios.

4.1.2 Esporulação em meio de cultura

A metodologia utilizada neste trabalho para esporulação do fungo *S. sapinea*, baseada em trabalho de De Wet *et al.* (2000) mostrou-se adequada para este propósito. Com esta técnica foi possível obter picnídios e quantidades adequadas de conídios, em meio APA, utilizado para produção de isolados monospóricos.

Os isolados de *S. sapinea* comportaram-se de forma diferente em seu crescimento e esporulação dependendo do meio em que foram cultivados, mas conseguiram desenvolver-se em todos os meios testados. Os resultados destas avaliações estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea*

ISOLADO/ ISOLADOS MONOSPÓRICOS	MEIOS TESTADOS			CONÍDIOS	ESPORULAÇÃO (formação de conídios)	CRESCIMENTO
	BDA	APA	AA			
SS1	Coloração:			Jovens:	SS1	SS1
SS1.1	Verde musgo			hialino	XXX	X X X
SS1.2	para cinza			sem septo	XXX	X X
SS1.3	chumbo				XXX	X X X
SS2	Aspecto:			Maturos:	SS2	SS2
SS2.4	algodoado			Marrom	XX	X X
SS2.5				um ou dois	XX	X X X
SS2.6				septos	XX	X X
SS3					SS3	SS3
SS3.7					X	X X
SS3.8					X	X
SS3.9					X	X
SS4					SS4	SS4
SS4.10					XX	X X X
SS4.11					X	X
SS4.12					XX	X X

Avaliação qualitativa do crescimento micelial: X (crescimento baixo), XX (crescimento médio), XXX (crescimento alto). Esporulação: X (baixa), XX (média), XXX (alta).

Os picnídios de *S. sapinea* apresentaram-se de forma variada, normalmente globosos, imersos, separados ou agregados (PHILLIPS, 2005). Na FIGURA 4, pode-se observar um picnídio de *S. sapinea*, produzido sobre acícula em meio APA. Os conídios jovens tiveram aspecto hialino permanecendo dentro do picnídio até amadurecerem quando passaram para uma coloração marrom clara, e na maturidade, tornaram-se escuros, com tonalidade marrom mostarda e marrom escuro. Os conídios jovens raramente eram septados, como pode ser observado na FIGURA 5, mas com a maturidade grande parte tornou-se septado. Na grande maioria dos casos foi evidenciado apenas um septo em cada conídio, mas foi observado também conídios com dois septos.

Verificou-se que existem diferenças na capacidade e na velocidade de formação de picnídios *in vitro* entre os diferentes isolados. Os isolados SS1 (SS1.1, SS1.2 e SS1.3) foram os mais rápidos em iniciar a formação dos picnídios no meio APA., conforme evidenciado na TABELA 2. Com sete dias neste meio, os picnídios já podiam ser observados em cima das acículas. Após 14 dias, alguns picnídios dos isolados SS1 (SS1.1, SS1.2, SS1.3) apresentaram conídios maduros. Para garantir uma maior quantidade de conídios foi necessário deixar o material em incubação por 21 dias. Os isolados SS2 (SS2.4, SS2 e SS2.6) e SS4 (SS4.10, SS4.11 e SS4.12) começaram a formar os picnídios depois de 10 dias de incubação. Os conídios destes isolados ficaram maduros depois de cerca de 21 dias de incubação.

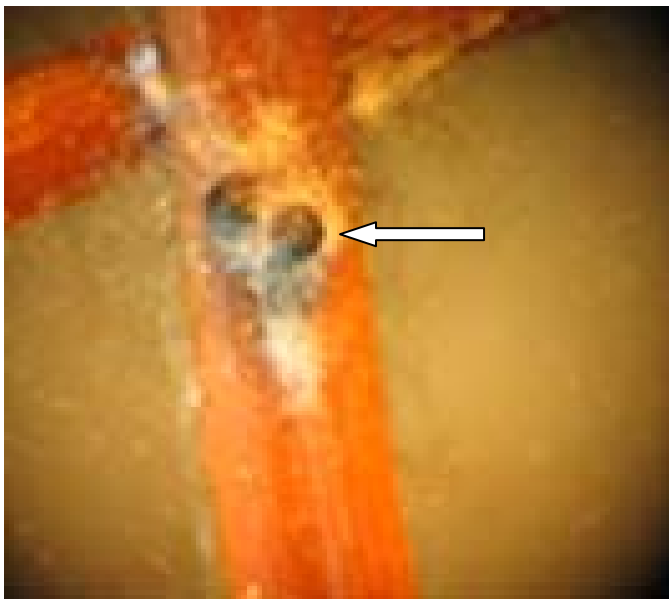


FIGURA 4 - PICNÍDIO (SETA BRANCA) DE *Sphaeropsis sapinea* FORMADO EM MEIO ACÍCULA-ÁGAR.
FONTE: CELSO GARCIA AUER, 2007

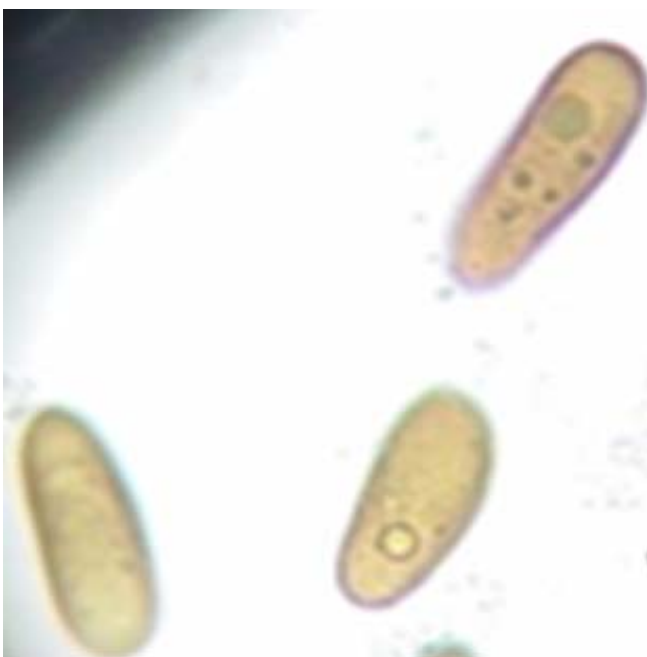


FIGURA 5 - CONÍDIOS DE *Sphaeropsis sapinea* SOBRE MEIO ÁGAR-ÁGAR.
FONTE: O autor, 2007

Os isolados SS3 (SS3.7, SS3.8, SS3.9) foram os mais lentos na formação dos picnídios. Com estes isolados pode-se observar a formação de picnídios sobre as acículas, somente após 21 dias de incubação e para se obter uma boa quantidade de conídios maduros foi necessário deixá-los em incubação por pelo menos 30 dias.

Outro aspecto observado foi a formação de picnídios no ponto de retirada dos discos de micélio-ágar para a repicagem das colônias, principalmente se estes isolados estavam crescendo em meios AA e APA. Para que estes picnídios produzissem conídios maduros eram necessários que permanecessem em incubação por mais 14 dias.

Para a obtenção de culturas monospóricas necessitou-se saber o tempo exato em que os conídios começaram a germinar, para que sejam repicados antes que os tubos germinativos se cruzem. Para o *S. sapinea* foi recomendado deixar 8 horas germinando para depois iniciar o isolamento dos conídios (BURGESS *et al.*, 2001). Os testes realizados nesse trabalho mostraram que os conídios de *S. sapinea* iniciaram sua germinação após 1 hora e 50 min. de incubação em meio AA. Com duas horas após o início da germinação mais de 50 % dos conídios já estavam germinando.

A descrição do crescimento dos isolados SS1, SS2, SS3, SS4 e seus monospóricos em meio BDA sugere que são morfotipos do tipo "A". De acordo com De Wet *et al.* (2002) e Stanosz (2002) é importante conhecer os morfotipos presentes, pois as estratégias de controle de *S. sapinea* dependem do morfotipo. O morfotipo "A" está mais amplamente distribuído e ataca vários de coníferas. Os morfotipos "B" e "C" possuem uma distribuição mais restrita, sendo considerados mais raros (WANG *et al.*, 1985; PALMER *et al.*, 1987). O uso de fungicidas no viveiro não é eficaz no controle do morfotipo "A", que é mais agressivo. Para o morfotipo "A", o plantio de árvores resistentes onde o fungo tem maior probabilidade de ocorrer é o melhor método de controle (STANOSZ, 2002).

4.2 TESTE DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA (CV)

Na TABELA 3 são apresentados os resultados do testes de CV entre os isolados de *S. sapinea*. Foi evidente a formação de uma linha escura na placa de Petri, quando estava ocorrendo incompatibilidade vegetativa (ICV) entre os isolados. Esta linha escura, visualizada ao microscópio estereoscópico, revelou a ausência de contato entre as colônias e a formação de picnídios. Porém, quando não ocorreu formação de uma linha escura entre os isolados observou-se a formação de um micélio claro-algodado contínuo entre eles, que ao microscópio revelou ser um entrelaçamento das hifas na região de contato entre as colônias. Os isolados que formaram uma linha escura e rala com formação de poucos picnídios foram considerados como média compatibilidade vegetativa (MCV). Quando as placas de Petri foram mantidas por um período acima de 30 dias, houve formação de picnídios entre os isolados.

Os isolados SS1, SS2, SS3, SS4 e seus monospóricos comportaram-se de modo a formarem grupos locais, como pode ser visto nas FIGURAS 6 e 7. Em cada quarto da placa foi colocado um grupo diferente de isolados e pode-se perceber que neste arranjo entre os isolados monospóricos geralmente ocorreu CV e entre os isolados originais apareceu uma linha de ICV, similar ao relatado por Burgess *et al.* (2002).

Na FIGURA 7 são mostrados casos de MCV e CV em *S. sapinea*. Na FIGURA 7 A, pode-se observar uma linha escura e rala separando os isolados, indicativa de MCV entre os isolados. Nas FIGURAS 7 B, C e D as colônias foram consideradas CV. Esta reação é evidenciada pela formação de uma linha branca formada por crescimento micelial entre eles (BURGESS *et al.*, 2001).

TABELA 3 - AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE VEGETATIVA ENTRE OS ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea*

PAREAMENTO ENTRE ISOLADOS /MONOSPÓRICOS	COMPATIBILIDADE	ASPECTO DAS COLÔNIAS NA RERGIÃO DE CONTATO MICELIAL
SS1		
SS1.1 x SS1.1	CV	Micélio claro denso
SS1.2 x SS1.2	CV	Micélio claro sem separação
SS1.3 x SS1.3	CV	Micélio claro
SS1.1 x SS1.2 x SS1.3	CV	Micélio claro contínuo
SS2		
SS2.4 x SS2.4	CV	Micélio claro ralo
SS2.5 x SS2.5	CV	Micélio claro ralo
SS2.6 x SS2.6	CV	Micélio claro ralo
SS4.4 x SS5 x SS5.6	MCV	Micélio ralo escuro
SS3		
SS3.7 x SS3.7	CV	Micélio claro ralo
SS3.8 x SS3.8	CV	Micélio claro ralo
SS3.9 x SS3.9	CV	Micélio claro ralo
SS3.7 x SS3.8 x SS3.9	MCV	Micélio ralo escuro
SS4		
SS4.10 x SS4.10	CV	Micélio claro
SS4.11 x SS4.11	CV	Micélio claro
SS4.12 x SS4.12	CV	Micélio claro
SS4.10 x SS4.11 x SS4.12	CV	Micélio claro
SS1.2 x SS2.5 x SS3.8	ICV	
SS1.3 x SS2.6 x SS3.9	ICV	Micélio escuro

CV = compatibilidade vegetativa, MCV = média compatibilidade vegetativa, ICV = incompatibilidade vegetativa.

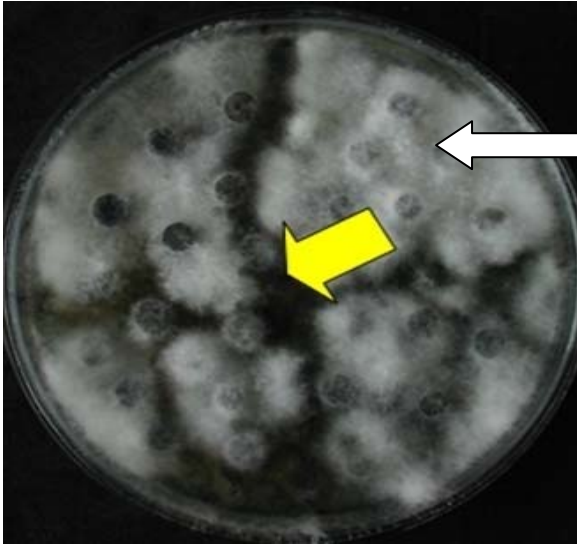


FIGURA 6- REAÇÃO DE COMPATIBILIDADE VEGETATIVA (CV – SETA BRANCA) E INCOMPATIBILIDADE VEGETATIVA (ICV – SETA AMARELA) ENTRE ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE *Sphaeropsis sapinea* EM MEIO AA.
FOTO: ALBINO GRIGOLETTI JUNIOR, 2006

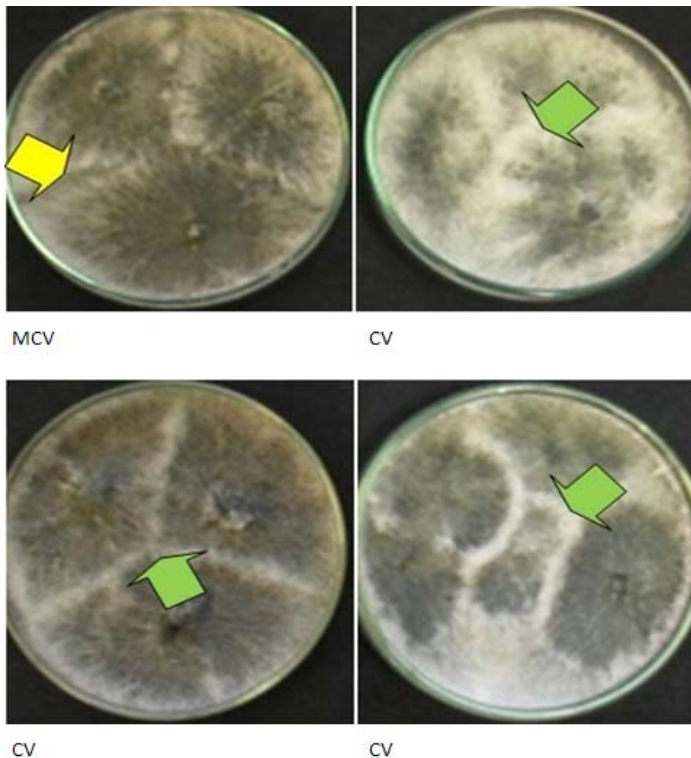


FIGURA 7 – PLACAS COM OS ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* MOSTRANDO MÉDIA COMPATIBILIDADE VEGETATIVA (MCV - SETA AMARELA) E COMPATIBILIDADE VEGETATIVA (CV – SETA VERDE) EM MEIO BDA.

FOTO: ALBINO GRIGOLETTI JUNIOR, 2006

4.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Sphaeropsis sapinea*

4.3.1. Resultado da técnica RAPD em *Sphaeropsis sapinea*

Para a extração do DNA, dois métodos haviam sido testados: a raspagem direta do micélio com alça de platina e a remoção direta de aproximadamente um cubo com um cm² de micélio-ágar com bisturi cirúrgico, eliminando-se o máximo do gel. Desses métodos, o melhor foi o método do cubo de micélio-ágar, por apresentar maior uniformidade na quantidade de DNA extraído.

Durante a caracterização molecular de microrganismos é necessária a variação nos perfis eletroforéticos dos mesmos. Entretanto, nos trabalhos de caracterização molecular, não foi este o resultado obtido com os *primers* testados, pois em sua maioria houveram comportamentos monomórficos, como pode ser visualizado na FIGURA 8. O comportamento monomórfico ocorre quando se formam perfis de bandas similares entre si. Dos 11 *primers* testados apenas um apresentou bandas polimórficas.

Como somente um *primer* apresentou polimorfismo, os resultados serviram para uma interpretação preliminar sobre o perfil genético dos isolados de *S. sapinea*. O dendrograma obtido com o perfil desse *primer* apresentou tendência similar aos resultados do teste de CV. É importante ressaltar que o número de isolados para ambos os testes foi pequeno, mas que esta limitação ocorreu pela dificuldade de se obter isolados oriundos de material doente em *P. taeda*, espécie considerada resistente ao fungo.

A FIGURA 9 apresenta o *primer* com características polimórficas usadas para análise do *S. sapinea*. Nota-se que os isolados numerados de 1 e 2 apresentaram problemas na amplificação do DNA e foram descartados para a análise dos resultados. Como as bandas são as variáveis procuradas dentro de uma análise molecular, logo se não há bandas estes devem ser tratados como parcela perdida. Na continuação deste tipo de estudo, a seleção de novos *primers* e repetição de isolados que possuam problemas de amplificação deverá ser efetuada.

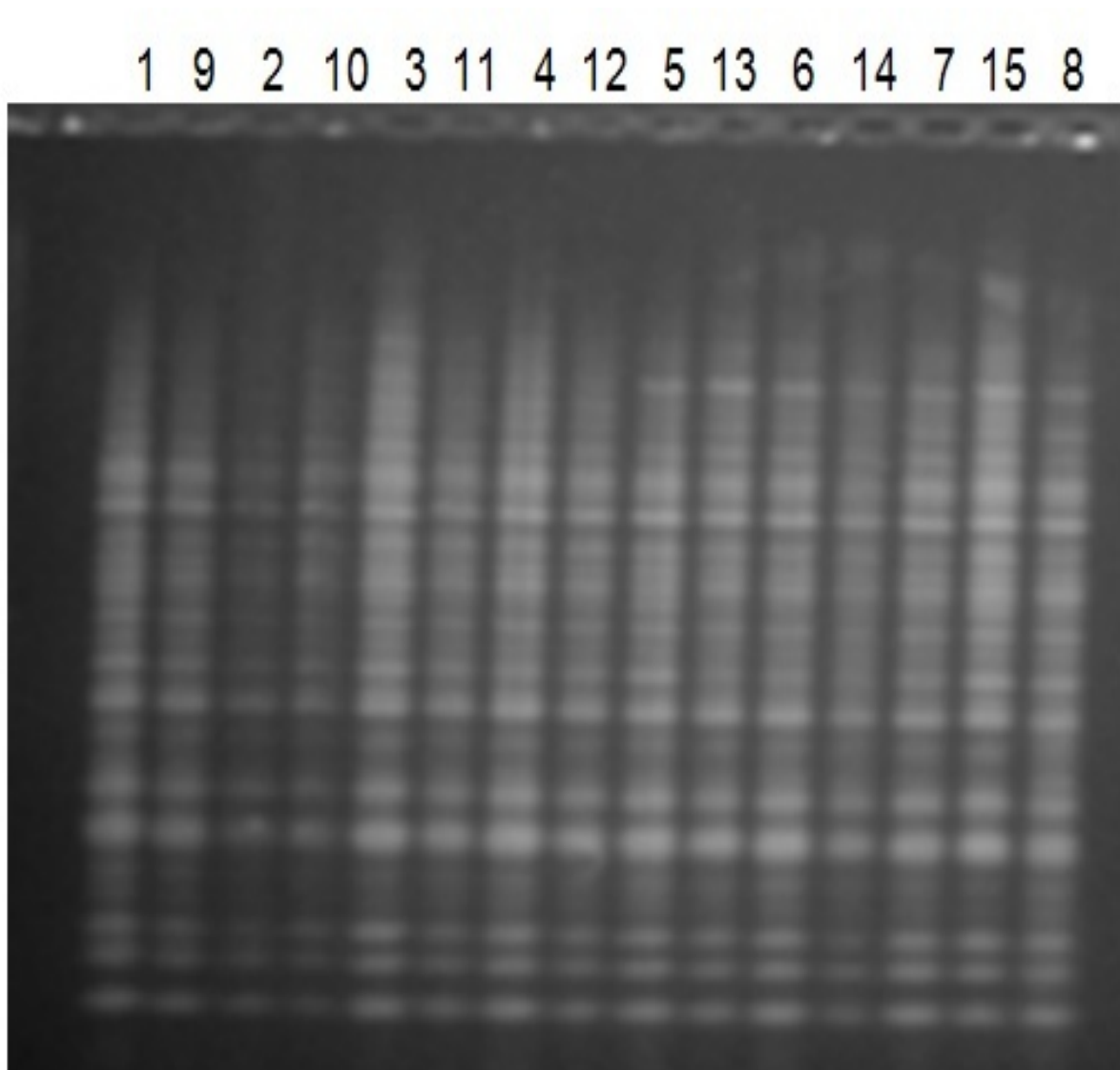


FIGURA 8 - REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD EM *Sphaeropsis sapinea* APRESENTANDO MONOMORFISMO ENTRE OS ISOLADOS.

Os números acima da figura correspondem a distribuição dos morfotipos como SS1 (4) com os monospóricos: SS1.1 (1), SS1.2 (2), SS1.3 (3); SS2 (8) com os monospóricos SS2.4 (5), SS2.5 (6), SS2.6 (7); SS3 (12) com os monospóricos: SS3.7 (9), SS3.8 (10), SS3.9 (11); SS4 (ausente) e os monospóricos: SS4.10 (13), SS4.11 (14), SS4.12 (15). Os números entre parênteses correspondem a numeração que os isolados receberam na eletroforese.

FONTE: O AUTOR, 2007

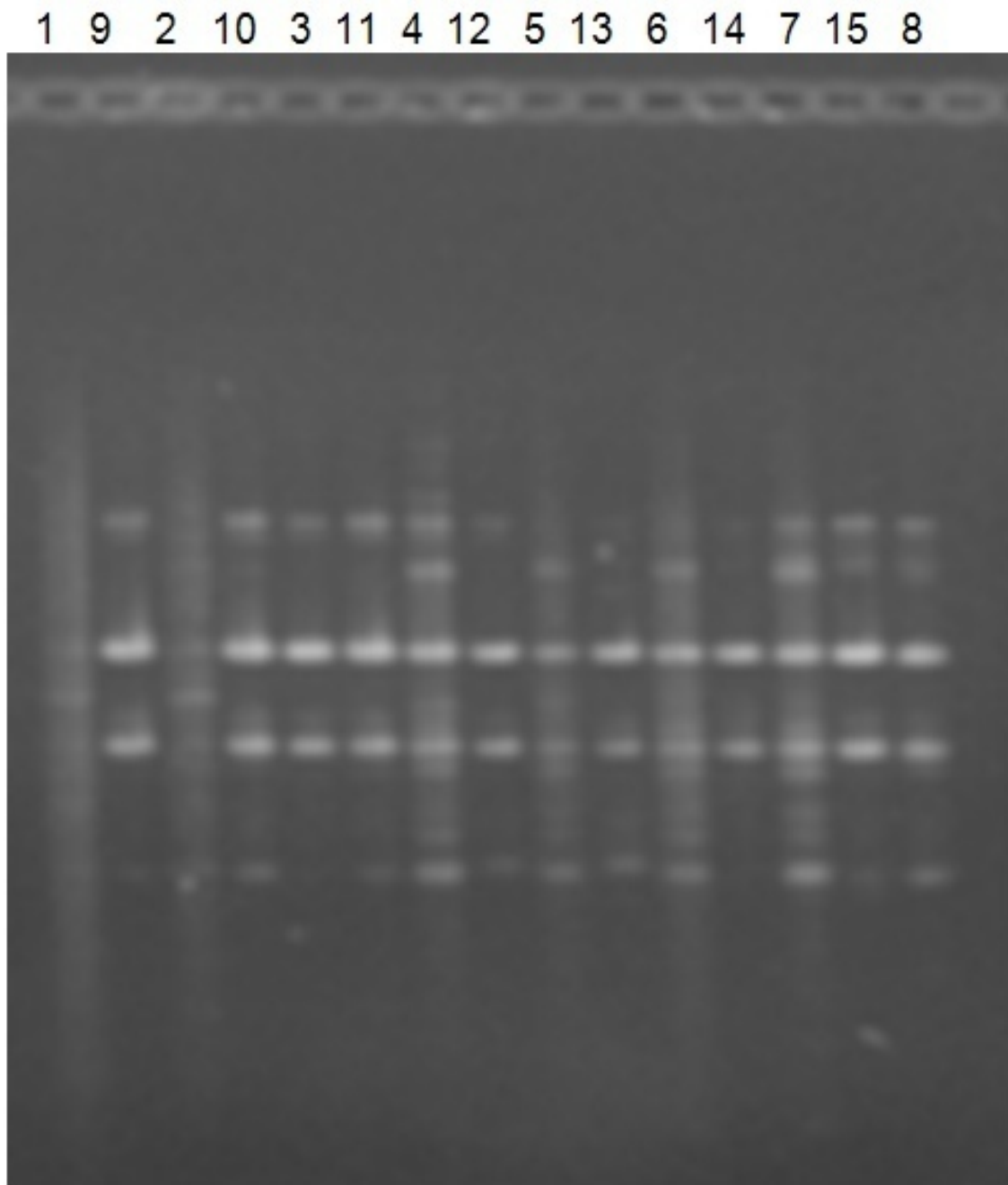


FIGURA 9 - REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DE *Sphaeropsis sapinea* APRESENTANDO POLIMORFISMO ENTRE ISOLADOS.

Os números acima da figura correspondem a distribuição dos morfotipos na SS1 (4) com os monospóricos: SS1.1 (1), SS1.2 (2), SS1.3 (3); SS2 (8) com os monospóricos SS2.4 (5), SS2.5 (6), SS2.6 (7); SS3 (12) com os monospóricos: SS3.7 (9), SS3.8 (10), SS3.9 (11); SS4 (ausente) e os monospóricos: SS4.10 (13), SS4.11 (14), SS4.12 (15). Os números entre parêntese correspondem a numeração que os isolados receberam na eletroforese.

FONTE: O AUTOR, 2007

4.3.2 Análise do polimorfismo

A análise das bandas do perfil com polimorfismo revelou, apesar do pequeno número de isolados, algumas tendências na distribuição geográfica destes isolados similares aos resultados encontrados na caracterização morfológica. Portanto, os comentários sobre o dendrograma (FIGURA 10) serão acompanhados com as tendências obtidas com a caracterização morfológica e compatibilidade vegetativa.

O dendrograma mostrou a formação de três agrupamentos geográficos no ponto de corte de 75. No nó superior estão agrupados isolados mais similares entre si, quando comparados com o terceiro grupo de isolados monospóricos 4 (SS1) e 5, 6, 7 e 8 (SS2). Este grupo apresentou uma boa estruturação entre seus isolados monospóricos, mas mostrou duas situações bem peculiares. O isolado monospórico 8 (SS2), que representa o conjunto gênico dos monospóricos 5, 6, 7 (SS2.4, SS2.5, SS2.6), arranjou-se como um subgrupo de seus monospóricos, mas apresentando a mesma similaridade. Este comportamento do isolado 8 (SS2) pode indicar que ele possui ainda no seu conjunto muitos outros isolados monospóricos divergentes podendo ser um indicativo de uma boa variabilidade intra-específica deste isolado.

Entretanto, verificou-se que o isolado de São José do Ouro/RS, monospórico 4 (SS1) apresentou-se no mesmo grupamento dos isolados monospóricos 5, 6 e 7 (SS2.4, SS2.5, SS2.6) de Rancho Queimado/SC. Nestes dois grupos encontram-se os isolados monospóricos mais agressivos. O fato do isolado 4 (SS1) ter-se agrupado com os isolados monospóricos de SS2 pode ser um indício que eles tiveram uma origem comum ou ainda esta tendência poderia ser subdividida se aumentado o número de bandas analisadas ou de isolados estudados.

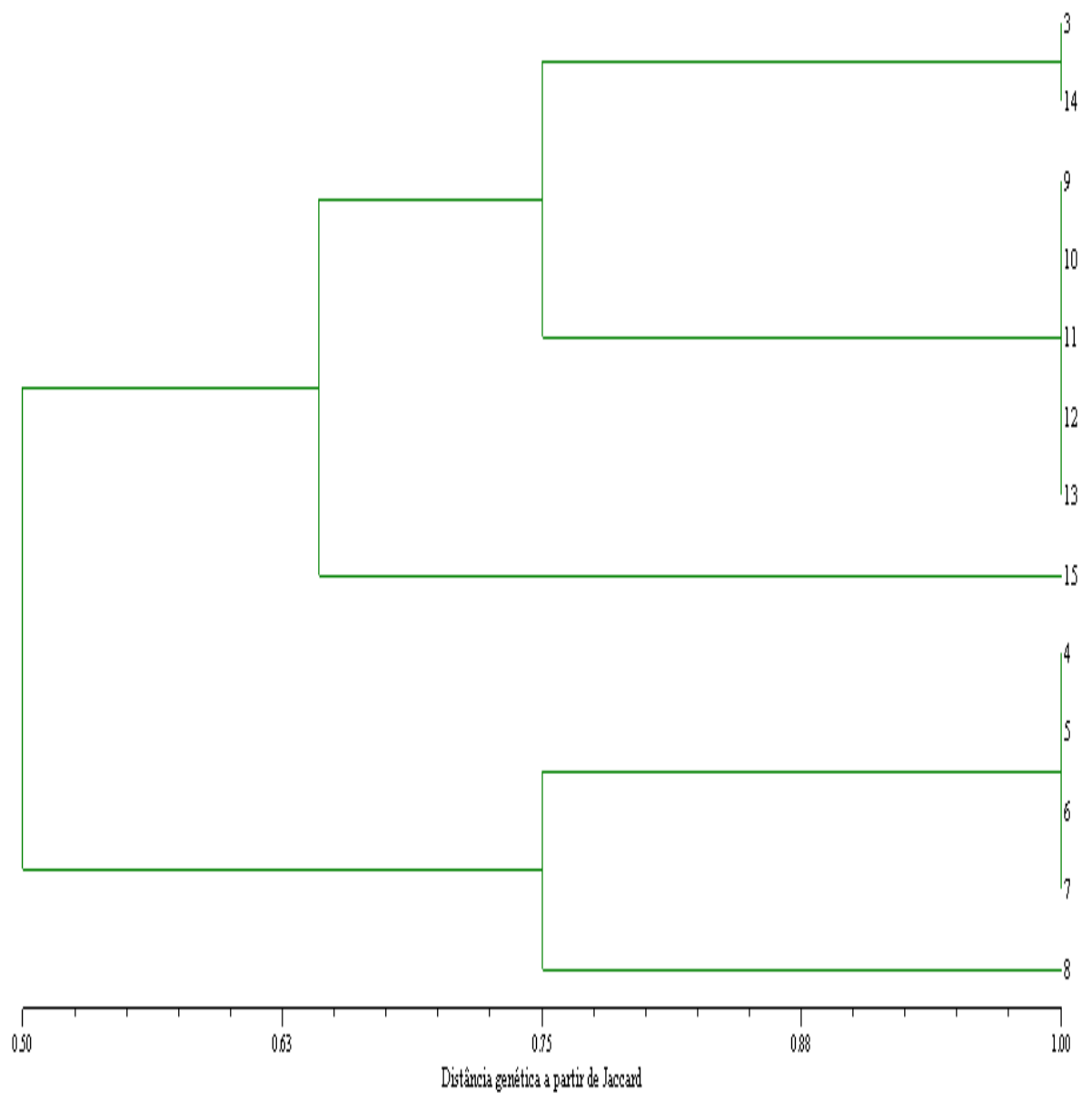


FIGURA 10 - DENDROGRAMA DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA A PARTIR DO ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE JACCARD.

Os números correspondem aos isolados monospóricos: SS1 (4) com os isolados monospóricos SS1.1 (1), SS1.2 (2), SS1.3 (3); SS2 (8) com os isolados monospóricos SS2.4 (5), SS2.5 (6), SS2.6 (7); SS3 (12) com os isolados monospóricos SS3.7 (9), SS3.8 (10), SS3.9 (11); SS4 (ausente) com os isolados monospóricos SS4.10 (13), SS4.11 (14), SS4.12 (15).

FONTE: O AUTOR, 2007

O isolado monospórico 3 (SS1.3) que pertence ao grupo do isolado 4 (SS1) apresentou uma grande divergência genética, não apenas no dendrograma, pois apresentou tendências distintas nos demais experimentos realizados. Esta divergência em relação ao isolado 4 (SS1) é muito evidente. No dendrograma (Figura 10), o isolado monospórico 3 (SS1.3) de São José do Ouro se agrupou com o isolado monospórico 14 (SS4.11), que fez parte do grupo dos isolados monospóricos de Curitiba (SS4). Esta divergência pode ser considerada como a formação de uma linhagem clonal dentro de populações, como citado por McDonald (1997) onde ele afirma que há esta tendência para fungos com reprodução assexuada.

Outra possibilidade, para este comportamento do monospórico 3 (SS1.3) pode ser um indício de ancestralidade comum com os monospóricos de Curitiba (SS4). Esta situação, se comprovada, ligaria os monospóricos de Curitiba (SS4) com os monospóricos de Rancho Queimado (SS2/SC) o que os ligariam a um ancestral comum proveniente de uma mesma procedência exógena.

Com a distribuição das procedências pelo Brasil, impondo uma separação geográfica, cada isolado divergiu-se de acordo com o ambiente e com as pressões ambientais do seu novo hábitat. Esse isolado monospórico 3 (SS1.3) comportou-se como um dos mais patogênicos e agressivos durante os testes de patogenicidade. Mostrando, portanto, que sua divergência genética pode estar refletindo na sua capacidade de provocar lesões no seu hospedeiro.

O material proveniente de Santa Maria do Oeste (PR) formado pelos isolados monospóricos 9, 10, 11, e 12 (SS3) apresentou-se muito bem estruturado formando um grupo bem compacto com todos os seus isolados monospóricos SS3 (SS3.7, SS3.8, SS9). A estruturação deste grupo pode ser um indicativo de baixa variabilidade intrapopulacional. Este agrupamento mostrou-se o menos agressivo nos testes de agressividade. Este grupo foi também o que apresentou crescimento mais lento entre todos os grupos testados.

Os isolados monospóricos 13, 14, 15 (SS4) apresentaram uma baixa estruturação genética. Mas, dois componentes deste grupo mostraram similaridade acima de 75 % com os isolados monospóricos 9, 10, 11, 12.(SS3). Isto pode ser um indício de uma origem comum dos isolados SS3 e SS4 no seu

habitat. Estes indícios, se comprovados, ligariam o grupo dos isolados monospóricos de Curitiba com os isolados monospóricos de Santa Maria do Oeste, sugerindo a possibilidade de uma introdução comum no Paraná.

O agrupamento de Curitiba (PR) e São José do Ouro (RS) foram os que se apresentaram menos estruturados neste dendrograma e estão presentes nestes dois grupos os isolados monospóricos com maior capacidade de provocar lesões nos hospedeiros.

Este dendrograma mostrou uma tendência clara de uma melhor estruturação entre os grupos monospóricos de Santa Catarina e Rio Grande do Sul e os grupos monospóricos do Paraná (Santa Maria do Oeste e Curitiba).

Este dendrograma mostrou também a grande divergência entre os isolados monospóricos do RS e do isolado monospórico 15 (SS4.12) de Curitiba que apresentou entre todos os monospóricos a menor similaridade genética. Não existe, nos outros testes realizados de caracterização morfológica, uma resposta clara para esta divergência. Mas, este isolado monospórico é proveniente do grupo de Curitiba, que cresceu bem em meio BDA, formou picnídios rapidamente em meio AA e teve boa capacidade de provocar lesões no hospedeiro. Esta seria a única indicação, que poderia ser fornecida por este trabalho, para a divergência apresentada por este dendrograma para este monospórico 15.

As causas que podem levar uma população original semelhante a divergir-se e decidir qual fator atuou para que esta divergência tenha ocorrido é muito especulativo, mas neste caso a separação geográfica dos isolados e as diferentes pressões ambientais dos isolados foram provavelmente os motivos principais da divergência e das diferentes estratégias de sobrevivência destes isolados.

Os testes de CV entre os isolados mostraram um padrão regionalizado na divergência genética entre os isolados obtidos na região Sul do Brasil. Como o *S. sapinea* apresenta apenas reprodução assexuada a divergência genética encontrada nestes isolados não pode ser explicada pela distância geográfica entre os isolados. O isolamento geográfico deve ser acompanhado por um isolamento sexual intenso e prolongado quanto existe apenas reprodução assexuada. Segundo Burgess *et al.* (2004) na ausência de reprodução sexual, deve-se pensar que esta divergência pode ser em

conseqüência de várias introduções do *S. sapinea* e neste caso podem estar envolvidos mais de um morfotipo do fungo.

A análise molecular dos isolados pelo método de RAPD também revelou a divergência genética mostrada nos testes de Compatibilidade Vegetativa, sendo esta divergência mais evidente entre os isolados de SS4 e SS1.

4.4. AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* EM FRUTOS DE MAÇÃ

Os isolados SS1, SS2, SS3 e SS4 de *S. sapinea* foram patogênicos nos frutos de maçã var. Granny Smith, formando grandes lesões (FIGURA 11). Houveram diferenças na agressividade entre os isolados testados (TABELA 4). Essas variações foram significativas ($P < 0,05$) pelo teste F, aos 7 e 14 dias D.A.I. A diferença na agressividade dos isolados é um indicativo de divergências genéticas entre os isolados, as quais podem ser comprovadas através dos testes de agressividade (DE WET *et al.*, 2002, DE WET *et al.*, 2003, BURGESS *et al.*, 2001).

Observou-se que aos 7 DAI foi encontrado um coeficiente de variação alto (43 %) indicando dispersão entre os dados. A análise de variância com os dados das medições aos 14 DAI mostrou um valor de coeficiente de variação mais baixo (23,84 %) indicando menor erro experimental. O isolado SS1 mostrou-se o mais agressivo, aos 7 DAI e aos 14 DAI, por isso, de acordo com os resultados recomenda-se que a seja feita aos 14 dias.

Estudo similar realizado por De Wet *et al.* (2002) testou a agressividade de *S. sapinea* ao inocular três diferentes morfotipos (A, B, C) em frutos de maçã, encontrando diferenças significativas no tamanho das lesões. As lesões do morfotipo “C” foram maiores que as do morfotipo “A”, que por sua vez, foram maiores que do morfotipo “B”. Segundo estes autores o teste de patogenicidade em maçãs é muito eficiente em predizer a agressividade dos isolados de diversos fungos, inclusive de *S. sapinea*.

TABELA 4 – LESÕES (CM) EM FRUTOS DE MAÇÃ VAR, GRANNY SMITH INOCULADAS COM ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* OBTIDOS DE *Pinus spp.*

ISOLADOS TESTADOS	TAMANHO DA LESÃO (cm)*	
	7 DAI	14 DAI
SS 1	4,84 a	7,93 a
SS 2	3,46 b	6,33 b
SS 3	3,17.b	6,33 b
SS 4	3,89 b	5,32 b
TESTEMUNHA	1,43 c	1,48 c
VALOR DE P	0,02	0,01
CV (%)	43,0	23,8

*Valores correspondem à média de 5 repetições por isolado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5 %. DAI = dias após inoculação.



A



B

FIGURA 11 – LESÕES EM FRUTOS DE MAÇÃ VAR. GRANNY SMITH INOCULADAS COM ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea*. A. vista externa. B. vista interna.
FOTO: ALBINO GRIGOLETTI JUNIOR, 2006

4.5 AVALIAÇÃO DO TIPO DE INOCULAÇÃO, DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* E REGIME HÍDRICO NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA EM MUDAS DE *Pinus taeda*

A análise de variância mostrou que existem diferenças significativas ($P < 0,05$) com relação à agressividade dos diversos isolados inoculados em mudas de *P. taeda*. Entretanto, ocorreram outras fontes de variação como as condições em que experimento foi realizado, sugerindo, portanto, que houve interação entre os isolados monospóricos e o tipo de inoculação, e, entre os isolados monospóricos e o regime hídrico nas estufas.

O melhor regime hídrico para a realização dos testes foi o de duas aspersões diárias e foi nesse regime que a doença provocada pelo *S. sapinea* desenvolveu-se melhor (ANEXO 3).

De acordo com os resultados, os isolados mais agressivos foram SS2. 4, SS4.10, SS1.3 e SS1.1 (TABELA 5). Os resultados mostraram também que o tipo de inoculação 1 (com fungo e com injúria) foi o mais eficaz em provocar os sintomas. O isolado monospórico SS2.4 foi o mais agressivo em mudas de *P. taeda* seguido pelos isolados SS4.10, SS1.3, os quais podem ser selecionados para os testes de agressividade e de seleção para resistência.

Uma das explicações para a grande variação na agressividade entre os isolados monospóricos do isolado SS2 pode ser obtida no trabalho de McDonald (1997) onde ele evidencia que a variabilidade do *S. sapinea* decorre da presença de linhagens clonais dentro de suas populações.

A TABELA 5 mostra que SS.3 (SS3.7, SS3.8, SS3.9) foram pouco agressivos quando inoculados em *P. taeda*. Em conjunto com o baixo desempenho destes isolados verificou-se que a velocidade de crescimento de seus isolados monospóricos foi a menor entre todos os isolados monospóricos analisados.

TABELA.5 - LESÕES (CM) EM MUDAS DE *Pinus taeda* INOCULADAS COM ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* OBTIDOS DE *Pinus spp.*

ISOLADO MONOSPÓRICO	INOCULAÇÃO		MÉDIA
	TIPO 1	TIPO 2	
SS2.4	8,42	1,33	4,87 a
SS4.10	7,22	1,11	4,16 a
SS1.3	6,89	0,33	3,61 a
SS1.1	6,06	0,61	3,33 ab
SS4.12	6,44	0,11	3,27 bc
SS2.5	3,78	0,00	1,89 bcd
SS3.7	3,33	0,39	1,86 bcd
SS3.8	2,83	0,61	1,72 bcd
SS2.6	2,33	0,67	1,50 cd
SS4.11	2,50	0,00	1,25 d
SS1.2	0,61	0,00	0,30 d
SS3.9	0,33	0,00	0,16 d
MÉDIA	4,23 A	0,43 B	

Médias seguidas por letras minúsculas (coluna) e maiúsculas (linha) diferente diferem significativamente entre si ($P < 0,05$, Duncan). Inoculação: tipo 1 (com fungo, com injúria) e tipo 2 (com fungo, sem injúria).

Os resultados obtidos neste experimento com *P. taeda* mostraram diferenças na agressividade dos isolados, os quais estariam ligados à divergência genética entre os mesmos (De Wet *et al.*, 2000). A explicação de como estas diferenças na agressividade foram desenvolvidas e distribuídas entre as populações não está muito claro, uma vez que o *S. sapinea* se reproduz apenas assexuadamente. A variabilidade possível de se obter via reprodução assexuada é muito baixa e geralmente insuficiente para responder por tal divergência genética. Por outro lado, as linhagens clonais são comuns em fungos que se reproduzem apenas assexuadamente (MCDONALD, 1997).

4.5.1 Recuperação de *Sphaeropsis sapinea* de lesões em mudas

Os resultados da eficiência das três metodologias no reisolamento do fungo *S. sapinea* nos quatro tipos de inoculação testados são mostrados na TABELA 6.

Os resultados mostraram que a metodologia de isolamento por plaqueamento foi a menos eficaz em reisolar o fungo e que manter o material em câmara úmida (saco plástico ou gerbox) foi muito mais eficiente. O isolamento por plaqueamento foi o primeiro método a ser testado, mas após sucessivas avaliações ficou claro que este método não estava sendo eficiente para avaliar o experimento.

O reisolamento efetuado por câmara úmida (saco plástico) é o mais prático e conseguiu um bom resultado entre os testados e pode ser recomendado.

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS PARA REISOLAMENTO DE *Sphaeropsis sapinea* APÓS INOCULAÇÃO EM MUDAS DE *Pinus taeda*.

MÉTODO DE REISOLAMENTO	FREQÜÊNCIA DE REISOLAMENTO (%)				TOTAL	PONTEIROS COLETADOS
	TIPO DE INOCULAÇÃO					
	1	2	3	4		
CÂMARA ÚMIDA EM SACO PLÁSTICO	12,8	1,7	0,0*	0,0	16,2	360
CAMARA ÚMIDA E GERBOX	30,0	25,0	0,0	0,0	55,0	20
PLAQUEAMENTO EM MEIO BDA	1,7	0,8	0,0	0,8	3,3	360

Inoculação: tipo 1 (com injúria, com fungo); tipo 2 (com injúria, sem fungo); tipo 3 (sem injúria, com fungo); tipo 4 (sem injúria, sem fungo).

* resultado indicando endofitismo do fungo.

É importante ressaltar, que em todos os métodos avaliados neste experimento, foi baixo o reisolamento de *S. sapinea* em mudas de *P. taeda*. Em várias mudas com grandes lesões a partir do ponto de inoculação do fungo o *S. sapinea* não foi reisolado, em nenhum dos métodos avaliados. Em outras situações, algumas mudas de *P. taeda* que não foram inoculadas e não apresentaram lesão, o fungo foi reisolado. A explicação para este fato pode ser encontrada no trabalho de Stanosz (2002) onde este autor sugere que nestas situações é difícil saber se o fungo já estava presente no pínus, comportando-se como endofítico. Burgess *et al.* (2004) acreditam que foi comportando-se desta forma que *S. sapinea* foi sendo disseminado pelo mundo. Como *S. sapinea* é patogênico para vários gêneros de *Pinus*, estes autores acreditam que o fungo foi sendo distribuído juntamente com as introduções de mudas de pínus pelos países. Baseado nesta hipótese, *S. sapinea* pode ter sido introduzido no Brasil, na década de 1940, e provocado a doença em arboretos de *P. radiata*, a espécie considerada mais suscetível ao fungo.

4.6. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE PROGÊNIES DE *Pinus radiata* À *Sphaeropsis sapinea*

4.6.1 Avaliação da agressividade dos isolados e resistência das progênies de *Pinus radiata*

Os dados de agressividade dos isolados monospóricos de *S. sapinea* inoculados nas mudas de *P. radiata* foram analisados de duas formas: com e sem interação entre fungo e progênies. Os testes foram realizados com isolados monospóricos, para que toda variação observada nas progênies fosse proveniente da capacidade das mudas de *P. radiata* em reagir aos isolados inoculados. As análises e os resultados originais com interação entre os fungos e as progênies estão disponíveis nos ANEXOS.

Os resultados apresentados na TABELA 7 referem-se às análises de variância realizadas sem interação para o tamanho da lesão que os isolados SS1.3, SS2.4 e SS4.10 provocaram nas 16 progênies de *P. radiata*. Na análise com interação, o resultado do isolado monospórico SS4.10, o menos agressivo

em mudas de *P. radiata*, mascarou os resultados dos isolados monospóricos SS1.3 e SS2.4 que foram muito mais agressivos em *P. radiata*.

Com relação à reação das progênies aos três isolados foi observado que houve resposta diferencial, ou seja, de acordo com o isolado testado encontraram-se diferentes progênies resistentes ao mesmo. Assim, para o controle de um dado isolado deverá ser utilizada uma progênie específica a esse isolado.

As progênies 7, 9 e 15 foram mais resistentes ao isolado monospórico SS1.3, seguidas pelas outras progênies que estatisticamente não se diferenciaram no tamanho da lesão provocada por este isolado. A progênie 16 foi a mais suscetível ao isolado SS1.3.

As progênies 10, 14 e 16 foram mais resistentes ao isolado monospórico SS2.4, seguidas pelas outras progênies que estatisticamente não se diferenciaram no tamanho da lesão provocada por esse isolado. A progênie 6 foi a mais suscetível ao SS2.4.

As progênies de *P. radiata* não se diferenciaram estatisticamente quanto ao ataque do isolado monospórico SS4.10. Tal comportamento indicou que esse isolado foi pouco agressivo e possivelmente apresente caráter endofítico e saprófita.

O fato da progênie 16 ter sido a mais suscetível ao isolado SS1.3 e uma das mais resistentes ao isolados SS1.4 indica que houve interação entre as progênies e os isolados.

Na média geral, as progênies que apresentaram menor tamanho de lesões foram as progênies 14, 15 e 13. Porém, essa classificação não seria recomendada pelo mascaramento causado pelo isolado monospórico SS4.10.

TABELA 7 - LESÕES (CM) PRODUZIDAS PELA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS SS1.3, SS2.4, SS4.10 DE *Sphaeropsis sapinea* EM MUDAS DE PROGÊNIES DE *Pinus.radiata*.

PROGÊNIES	LESÕES (cm)* / ISOLADOS						MÉDIA
	SS1.3		SS2.4		SS4.10		
1	3,25	abc	2,37	ab	0,50	a	2,02
2	2,37	abc	1,62	ab	0,87	a	1,62
3	3,12	abc	1,25	ab	0,50	a	2,43
4	2,62	abc	2,87	ab	0,37	a	1,95
5	2,75	abc	2,37	ab	0,62	a	1,91
6	2,37	abc	3,50	a	0,00	a	1,96
7	2,00	bc	1,75	ab	0,00	a	1,87
8	4,87	ab	1,87	ab	1,00	a	2,58
9	1,87	c	2,62	ab	0,75	a	1,75
10	4,12	abc	1,00	b	0,00	a	1,71
11	3,12	abc	1,25	ab	0,62	a	1,66
12	4,12	abc	2,12	ab	1,00	a	2,41
13	2,25	abc	1,87	ab	0,75	a	1,62
14	2,75	abc	1,00	b	0,37	a	1,37
15	2,00	bc	2,25	ab	0,12	a	1,46
16	5,00	a	1,12	ab	0,62	a	2,25

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

A TABELA 8 apresenta a avaliação da agressividade com que os isolados SS1.2, SS2.4 e SS4.10 causaram seca e morte de ponteiros nas mudas de 16 progênies de *P. radiata* inoculadas. Como no caso do tamanho das lesões (TABELA 7) houve resposta diferencial das progênies em relação ao isolado testado.

A progênie 9 foi a mais resistente ao SS1.3 quanto à seca de ponteiros. A progênie 16 foi a mais suscetível ao ataque do SS1.3. Com as outras progênies os resultados não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

A progênie 16 foi a mais resistente ao secamento causado pelo isolado SS2.4, seguida pelas progênies 3, 10 e 11 que não apresentaram diferenças estatísticas entre si. A progênie 12 foi mais suscetível ao isolado SS2.4.

Os resultados mostraram que houve interação entre as progênies e os isolados SS1.3, SS2. 4 e SS4. 10 inoculados. As progênies resistentes a um isolado podem ser suscetíveis a outro isolado.

As progênies de *P. radiata* inoculadas com o isolado monospórico SS4.10 foram as que mais sobreviveram e não se diferenciaram estatisticamente quanto ao seu ataque. Pode-se observar que foi o menos agressivo com todas as progênies estudadas, a exemplo do observado com o tamanho das lesões (TABELA 7).

Na média geral, as progênies que apresentaram os menores graus de secamento e morte de ponteiro foram as progênies 7, 10 e 11. Porém, essa classificação não seria recomendada pelo mascaramento causado pelo isolado monospórico SS4.10.

TABELA 8 - SECAMENTO DE PONTEIROS PRODUZIDO PELA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS SS1.3, SS2.4, SS4.10 DE *Sphaeropsis sapinea* EM MUDAS DE PROGÊNIES DE *Pinus radiata*.

PROGÊNIES	GRAU DE SECA DE PONTEIRO* / ISOLADOS						
	SS1.3		SS2.4		SS4.10		MÉDIA
1	3,00	Ab	2,37	ab	0,25	a	1,87
2	2,00	Ab	1,62	abc	0,50	a	1,37
3	2,50	Ab	0,87	bc	0,37	a	1,25
4	2,00	Ab	1,50	abc	0,25	a	1,25
5	1,75	Ab	1,87	abc	0,62	a	1,41
6	2,62	Ab	2,00	abc	0,00	a	1,54
7	1,50	Ab	1,62	abc	0,00	a	1,04
8	3,75	Ab	1,12	abc	0,75	a	1,87
9	1,37	B	2,12	abc	0,75	a	1,41
10	2,62	Ab	0,62	bc	0,00	a	1,08
11	1,87	Ab	0,87	bc	0,62	a	1,12
12	3,37	Ab	2,75	a	1,00	a	2,37
13	2,62	Ab	0,87	bc	0,87	a	1,45
14	2,37	Ab	1,62	abc	0,37	a	1,45
15	2,50	Ab	1,12	abc	0,12	a	1,25
16	3,87	A	0,50	c	0,87	a	1,75

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

O grau de secamento do ponteiro foi avaliado de acordo com uma escala, onde 0 significou ausência de sintoma da doença, 1 para o início de lesão, 2 quando houve seca de ponteiro, 3 para seca de ponteiro sem anelamento, 4 para seca de ponteiro com anelamento e 5 para muda morta.

As TABELAS 9 e 10 apresentam os isolados monospóricos SS1.3, SS2.4 e SS4.10 são separados em classes de agressividade pelo tamanho das lesões, complementando as informações sobre a agressividade dos isolados de *S. sapinea*.

Nenhuma progênie quando inoculada com o isolado monospórico SS1.3 teve lesão menor que 1 cm, na média. A grande maioria das progênies quando inoculadas com este isolado monospórico apresentaram lesões acima de 2 cm. O isolado monospórico SS1.3 foi muito agressivo nas progênies de *P. radiata* provocando extensas lesões nas mudas.

O isolado monospórico SS2.4 não provocou lesões tão extensas como o isolado monospórico SS1.3, como pode ser observado nas TABELAS 7 e 9, porém a severidade foi alta e a maioria das mudas suscetíveis acabaram apresentando seca de ponteiro e morreram (TABELA 11).

As lesões provocadas pelo isolado monospórico SS4.10 foram muito menores e menos severas e a maioria das progênies inoculadas por este monospórico não tiveram lesões acima de 1 cm, em média (TABELA 11).

A mortalidade decorrente da inoculação dos isolados monospóricos SS1.3, SS2.4 e SS4.10 foi variada. Observou-se que tanto o isolado SS1.3 como o isolado SS2.4 causaram lesões severas em mudas de *P. radiata* provocando a morte de muitas mudas, confirmando que o *S. sapinea* é muito patogênico em *P. radiata*.

Quando o *S. sapinea* formou lesões e elas não eram extensas no *P. radiata*, a severidade era fator limitante para a sobrevivência. Neste caso, se as feridas não foram muito severas foi evidenciado que as mudas conseguiram sobreviver, conforme pode ser comprovado com as progênies 5, 10, 15, 7, 11. Por outro lado, se as lesões foram muito severas mesmo sendo pequenas as taxas de mortalidade entre as progênies pode ser alta. Quando as lesões foram extensas e severas como aconteceu com as progênies 12 e 1, as taxas de mortalidade foram altas para as duas progênies. Quando as lesões foram extensas e não muito severas algumas progênies conseguiram sobreviver.

TABELA 9 – CLASSES DE TAMANHO DAS LESÕES (CM) PRODUZIDAS PELA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS MONOSPÓRICOS SS1.3 SS2.4 SS4.10 DE *Sphaeropsis sapinea* EM MUDAS DE PROGÊNIES DE *Pinus radiata*.

CLASSES DE LESÕES (cm)/ISOLADOS													
	0 a 1			1 a 1,99			2 a 2,99			3 a 3,99			4 a 5
	SS1.3	SS2.4	SS4.10	SS1.3	SS2.4	SS4.10	SS1.3	SS2.4	SS4.10	SS1.3	SS2.4	SS4.10	SS1.3
9*	14	10		7	16	12	3	12		12	6		16
	10	6		15	3	8	11	16		10			
		7		13	11		1	5		8			
		15		2	2			1					
		14		6	7			9					
		4		4	8			4					
		3		5	13								
		1		14									
		5											
		16											
		11											
		9											
		13											
		2											

*Número das progênies de *Pinus radiata* (1 até 16).

TABELA 10 – CLASSES DE GRAU DE SECAMENTO DE PONTEIROS PELA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE *Sphaeropsis sapinea* NAS MUDAS DE PROGÊNIES DE *Pinus radiata*.

CLASSES DE GRAU DE SECAMENTO/ISOLADOS												
0 a 1			2			3			4			5**
SS1.3	SS2.4	SS4.10	SS1.3	SS2.4	SS4.10	SS1.3	SS2.4	SS4.10	SS1.3	SS2.4	SS4.10	
	16*	6	9	15		4	6		1			
	10	7	7	8		2	9		12			
	3	10	5	4		14	1		8			
	13	15	11	7		15	12		16			
	11	4		2		3						
		1		14		10						
		3		5		6						
		14				13						
		2										
		5										
		11										
		8										
		9										
		13										
		16										
		12										

*Número das progênies de *Pinus radiata* (1 até 16)

**A classe 5 não apresentou progênies.

TABELA 11 – MORTALIDADE (%) DAS MUDAS DE PROGÊNIES DE *Pinus radiata* INOCULADAS COM OS ISOLADOS MONOSPÓRICOS SS1.3, SS2.4, SS4.10 DE *Sphaeropsis sapinea*.

PROGÊNIE	MORTALIDADE (%)				TOTAL
	SS1.3	SS2.4	SS4.10	TESTEMUNHA	
1	12,5	8,3	-	-	20,8
2	8,3	4,2	-	-	12,5
3	12,5	-	-	-	12,5
4	4,2	4,2	-	-	8,3
5	-	-	-	-	-
6	4,2	4,2	-	-	8,3
7	-	8,3	-	-	8,3
8	8,3	-	-	-	8,3
9	-	12,5	4,2	-	16,7
10	4,2	-	-	-	4,2
11	-	-	4,2	-	4,2
12	4,2	8,3	4,2	-	16,7
13	4,2	4,2	-	-	8,3
14	4,2	4,2	-	-	8,3
15	4,2	-	-	-	4,2
16	8,3	-	4,2	-	12,5

Vinte e quatro plantas inoculadas por família.

- ausência de plantas mortas.

Com os resultados apresentados nessa tabela observou-se que as progênies 5 e 11 foram resistentes aos isolados SS1.3 e SS2.4. Estas progênies tiveram lesões provocadas pelos isolados, mas como estas lesões não foram muito severas as progênies conseguiram sobreviver.

As progênies 7 e 10 tiveram comportamento semelhante Apesar dessas progênies terem sido atacadas pelo *S. sapinea* a maioria conseguiu sobreviver porque as lesões não foram muito severas.

As progênies 16 e 15 também merecem destaque. A progênie 16 foi bem suscetível ao isolado SS1.3, mas sem muita severidade, e apresentou boa sobrevivência para esse isolado. A progênie 15 foi resistente em relação ao SS2.4 e grande parte das mudas sobreviveram aos ataques do SS1.3.

Em uma avaliação geral das respostas das progênies de *P. radiata* à inoculação de *S. sapinea*, as progênies que se destacaram foram:

- a) Progênies 5 e 11 - pela ausência de mortalidade em decorrência do ataque dos isolados;
- b) Progênies 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15 e 16 - pela boa taxa de sobrevivência;
- c) Progênies 7 e 9 - pela resistência ao isolado SS1.3, que foi o isolado monospórico mais agressivo, com *P. taeda* e com *P. radiata*;
- d) Progênies 3, 8, 15 e 16 - pela resistência ao isolado SS2.4 que se foi o mais agressivo em *P. radiata*.

4.6.2 Avaliação da herdabilidade da resistência de progênies de *Pinus radiata* contra *Sphaeropsis sapinea*

A análise da herdabilidade da resistência de *P. radiata* foi dividida em duas variáveis: tamanho de lesão e grau de secamento de ponteiros. A TABELA 12 mostra os resultados obtidos para herdabilidade de *P. radiata* com relação ao tamanho da lesão causada pelos isolados SS1.3, SS2.4 e SS4.10. A herdabilidade das progênies para esta característica com o isolado monospórico SS1.3 foi de 0,33578, para o isolado monospórico SS2.4 foi 0,080677 e para o isolado monospórico SS4.10 foi nula (0,0).

Com relação ao grau de secamento de ponteiros causado pelos isolados monospóricos SS1.3, SS2.4, SS4.10, houveram resultados diferentes do observado com o tamanho da lesão (TABELA 13). A herdabilidade das

progênies para esta característica para o isolado monospórico SS1.3 foi de 0,0388, para o isolado monospórico SS2.4 foi 0,256347 e para o isolado monospórico SS4.10 foi de 0,025891.

A herdabilidade do *P. radiata* com relação às duas características foi baixa pelo fato da fraca patogenicidade desse isolado nas progênies, como já discutido anteriormente.

As análises dos experimentos mostraram que existem diferenças significativas na herdabilidade entre as progênies de *P. radiata*, Este trabalho encontrou herdabilidade de $H^2_M = 0,3357870$ para característica “tamanho de lesão” e $H^2_M = 0,256347$ para a característica “grau de secamento de ponteiro”. Estes valores são considerados muitos bons (RESENDE, 2002) e indicam que a característica é herdável. Estes resultados são importantes porque dão sustentação para a continuidade dos trabalhos de seleção de progênies/indivíduos de *P. radiata* resistentes ao fungo *S. sapinea* permitindo os inícios dos testes de campo.

TABELA 12 - HERDABILIDADE PARA TAMANHO DE LESÕES PRODUZIDAS PELA INOCULAÇÃO DE ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE *Sphaeropsis sapinea* EM PROGÊNIES DE *Pinus radiata*.

ISOLADOS			
PARÂMETRO	SS1.3	SS2.4	SS4.10
V_0	2,655295	1,915017	0,652517
V_M	0,33559	0,042014	-0,04757
H^2_M	0,335787	0,080677	0,0

V_0 = quadrado médio do resíduo. V_M = quadrado médio das progênies.
 H^2_M = herdabilidade das progênies

TABELA 13- HERDABILIDADE PARA SECAMENTO DE PONTEIROS PRODUZIDAS PELA INOCULAÇÃO DE ISOLADOS MONOSPÓRICOS DE *Sphaeropsis sapinea* EM PROGÊNIES DE *Pinus radiata*.

ISOLADOS			
PARÂMETRO	SS1.3	SS2.4	SS4.10
V_0	2,113542	1,261111	0,444184
V_M	0,021354	0,108681	0,002952
H^2_M	0,038844	0,256347	0,025891

V_0 = quadrado médio do resíduo. V_M = quadrado médio das progênies.
 H^2_M = herdabilidade das progênies

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, as seguintes conclusões podem ser listadas:

- a) A caracterização morfológica dos isolados de *S. sapinea* indica que o morfotipo predominante é do tipo “A”.
- b) O teste de Compatibilidade Vegetativa (CV) mostrou uma divergência genética, entre os isolados, coincidindo com a sua origem.
- c) A divergência genética observada no teste de CV pode ser indicativa da presença de mais de um morfotipo de *S. sapinea* na região Sul do Brasil.
- d) A análise molecular dos isolados pelo método de RAPD confirmou a divergência genética observada no teste de CV, mais evidente entre os isolados monospóricos de SS1 e SS4.
- e) Os isolados testados foram patogênicos em frutos de maçã var. Granny Smith e o isolado SS1 foi o mais agressivo.
- f) Os isolados monospóricos SS1.3, SS2.4 e SS4.10 foram os mais agressivos em mudas de *P. taeda*.
- g) A inoculação com injúria foi a mais eficiente em causar lesões e secamento de ponteiros em mudas de *P. taeda*, em casa de vegetação.
- h) O regime de aspersão mais favorável ao desenvolvimento da seca de ponteiro em mudas de *P. taeda*, em casa de vegetação, foi o regime com duas aspersões diárias em período de 4 minutos cada.
- i) Os isolados de *S. sapinea* patogênicos em *P. taeda* também foram patogênicos em mudas de *P. radiata*.
- j) Existe resposta diferencial das progênies em função do isolado testado e da variável da doença avaliada.
- k) Existem diferenças significativas na herdabilidade entre as progênies de *P. radiata*, com herdabilidade de $H^2_m = 0,3357870$ para a variável tamanho de lesão e $H^2_m = 0,256347$ para a variável secamento de ponteiro.
- l) A seleção de progênies de *P. radiata* para a seca de ponteiro por *S. sapinea* dependerá do isolado presente na região, onde serão feitos os plantios comerciais.

6 RECOMENDAÇÕES FINAIS

As análises de caracterização morfológica e molecular apresentaram uma variação fenotípica que foi sustentada pelas análises moleculares. Esta divergência observada é constantemente apresentada nos ensaios com *S. sapinea* realizados em várias partes do mundo (PALMER *et al.*, 1987; BLODGET; STANOSZ, 1999; BURGESS, 2001; DE WET *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 1986; PALMER *et al.*, 1987; DE WET *et al.*, 2003.). De acordo com estes autores, no caso do fungo *S. sapinea*, esta divergência não pode ser explicada por via sexual, sendo portanto, uma evidência da presença de diferentes morfotipos nos locais onde o patógeno foi obtido. Este resultado merece atenção porque a presença de vários morfotipos exige estratégias diferentes na instalação de testes no campo, porque estas estratégias serão determinadas de acordo com a presença do morfotipo do fungo presente no local, conforme recomendação de Stanosz (2002).

Os resultados também mostraram que é importante saber qual morfotipo do *S. sapinea* está presente no Brasil. Qualquer estratégia de ação e prevenção contra a doença causada por este fungo, de acordo com Stanosz (2002) depende desta informação, uma vez que, cada morfotipo comporta-se de forma distinta. Para uma caracterização final, serão necessárias feitas fotografias ao microscópio eletrônico da parede dos conídios dos isolados do *S. sapinea* usados neste trabalho. Estudos feitos por De Wet *et al.* (2004) com fotografias eletrônicas da parede dos conídios serviram para confirmar o morfotipo existente e se pertence ao tipo "A".

A seleção praticada neste estudo visou explorar as diferenças naturais dentro das progênies testadas, de uma forma bem direcionada, procurando favorecer apenas aqueles indivíduos que manifestaram as características consideradas como desejáveis para este trabalho, em função do produto final desejado: material resistente de *P. radiata* para montagem de um jardim clonal visando à produção massal de material vegetativo para testes clonais e de progênies no campo. De acordo com Resende (2002), a propagação vegetativa é muito útil porque permite a fixação de genótipos superiores, já selecionados, visando plantios clonais.

Todas as progênies sobreviventes nesta avaliação de resistência serão propagadas vegetativamente para a realização de novos testes de resistência em casa de vegetação e testes clonais. Esses testes clonais deverão ser realizados em vários locais de acordo com um mapeamento de morfotipo/isolados de *S. sapinea* na região Sul do Brasil. Tal mapeamento não deverá ser difícil, uma vez que as caracterizações morfológicas e moleculares apontam para uma regionalização dos isolados. Devem-se buscar locais apropriados para a instalação dos testes clonais, atentando-se para a escolha de sítios adequados para o *P. radiata*. Recomenda-se, também, que seja incluída a avaliação das características silviculturais dos materiais resistentes à doença.

Os testes clonais poderão ser montados com 100 progênies, 20 indivíduos por progênie e 3 clones por indivíduo com o esquema de repetições clonais (RESENDE, 2002). Este material deve ser disponibilizado ao mesmo tempo no momento da montagem dos testes no campo. Por isso é necessário propagar massivamente o material já selecionado e selecionar outros, de acordo com a metodologia apresentada nesta dissertação com o objetivo de aumentar o número de populações e procedências.

Futuramente, deverá ser montado um teste de progênie com todo material pré-selecionado. O teste deve ser montado com indivíduos repetidos por meio de clones, diferentes famílias e diferentes procedências ou populações. Para obter o máximo possível de informações, bem como a precisão na avaliação dos indivíduos, os propágulos de cada indivíduo devem ser divididos em várias parcelas (repetições) com uma planta por parcela. Deve ser adotado também um esquema hierárquico de indivíduos dentro de família e família dentro de procedências, segundo o delineamento em blocos de famílias compactas (RESENDE E ARAÚJO, 1993, citados por RESENDE, 2002).

Por último, considera-se importante a busca por marcadores moleculares para genes de resistência à seca de ponteiros causada por *S. sapinea* em material genético de *P. radiata*, para um maior avanço no programa de sua reintrodução no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ANAGNOSTAKIS, S.L. Conversion of curative morphology in *Endothia parasitica* and its restriction by vegetative compatibility. **Mycologia**, New York, v.75, n. 5 p. 777-780, set./out.1983.
- AUER, C.G.; GRIGOLETTI, J.A. A ocorrência de *Sphaeropsis sapinea* em *Pinus* no Sul do Brasil In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 18., 1995, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1995p.121.
- 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.
- BLODGETT, J.T.; STANOSZ, G.R. *Sphaeropsis sapinea* morphotypes differ in aggressiveness, but both infect nonwounded red or jack pines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 2, p.143-147, 1997.
- BLODGETT, J. T.; STANOSZ, G. R. Differences in aggressiveness of *Sphaeropsis sapinea* RAPD marker group isolates on several conifers. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n.9, p.853-856, 1999.
- BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Simple sequence repeat (SSR) markers distinguish between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.1, p. 354–362, jan, 2001.
- BURGESS, T.I.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M. J. Comparison of genotypic diversity in nature and introduced populations of *Sphaeropsis sapinea* isolated from *Pinus radiata*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 11, p. 1331-1339, nov. 2001.
- 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.
- 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.

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. 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.

CHOU, C.; MACKENZI, M. E. Effect of pruning intensity and season on *Diplodia pinea* infection of *Pinus radiata* stem through pruning wounds. *European Journal of Forest Pathology*, Hamburg, v.18, n.7, p. 437-444, 1988.

CORMA -Corporación Chilena De La Madera VIII Región Del Bío Bío Concepción, 2003. Disponível em: www.cormabiobio.cl/.../Jefe%20de%20Faena%20Silv.%20M%F3dulo%20General%20Control%20Fitosanitario.pdf. Acesso em: 7/11/2007.

CRUZ, C. D. **Princípios de Genética Quantitativa**. Viçosa, MG: UFV, 2005. 391 p.

CSIRO. 2000. CSIRO Forestry and Forest Products. Kingston, Austrália: CSIRO. E.S, ed. Wood supply worries: Prospects of fibre shortage are forcing action by producers. *Financial Post*, v.90, n.9, p.14, 1996.

DALLIMORE, W.; JACKSON, A. **Handbook on Coniferae and Ginkgoaceae**. 4. ed. London: Edward Arnold, 1966.

DE WET, J.; WINGFELD, M.J.; COUTINHO, T.A; WINGFELD, B.D. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa, Mexico and Indonesia. **Plant Diseases**, St. 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, p.181-188, 2002.

DE WET, J.; BURGESS, T. SLIPPERS, B. PREISIG, O.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, 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, maio 2003.

ELDRIDGE, K.G. **Refreshing the genetic resources of radiata pine plantations: Detailed internal report on seed collections of *Pinus radiata* from its five natural populations**. February and March 1978. CSIRO Division of Forest Research, Genetics Section Report number 7, 120p. CSIRO, Canberra, 1978.

EARLE, C.J. 2007. Gymnosperm Database. Disponível em: www.conifers.org/pi/pin/radiata.htm. Acesso em: 29/1/2008

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

FLORES, F.J.; ALLEN H.L. Efectos del clima y capacidad de almacenamiento de água del suelo en la productividad de rodales de pino radiata em chile: un análisis utilizando el modelo 3-PG. **Bosque**, Valdivia, v.25, n.3, p.23-24. 2004.

FORDE, M.B. Variation in Natural populations of *Pinus radiata* in California. Parte 3 Cone Characters, Forest Research Institute, Rotorua. **New Zeland Journal of Botany**, Wellington, v. 2, p. 459-485, 1964.

GANDULLO, J. M; GONZÁLEZ A., S.; SÁNCHEZ, P., Ecología de los pinares Españoles, IV *Pinus radiata* D. Don., Colección Monografías INIA n. 13. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ministerio de Agricultura, Madrid, 1974.

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

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. Acesso em: 7/11/2007.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endofítico *Guinardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD.** Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1995.

GOMES, N.S.B. **Armilariose em *Pinus elliotti* e *Pinus taeda* na região Sul do Brasil.** Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, 2005.

HALWARD, T.M.; STALKER, H.T.; LARUE, E.A.; KOCHERT, G. Genetic variation detectable markers among unadapted germoplasm resources of cultivated peanut and related wild species. **Genome**, Ottawa, v. 34, p.1013-1020, 1991.

HARTMAN, J; JENNIFER, F.; LISA, V.; MARIE, S; JERRY, H; LARRY, H. **Research Report Nursery and Landscape Program. Injections with Fungicides for Management of Pine Tip Blight—A Four-Year Study 2002.** Disponível em: www.ca.uky.edu/agc/pubs/pr/pr468/pr468.htm. Acesso em: 15/1/2008.

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**, Ontário, v. 21, n. 3, p. 256-264, 1999.

HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomar de Sementes de Espécies Florestais Nativas**. Curitiba: FUPEF do Paraná, 2006.

KREBS, J. S. Monterey Pine: An Introduced Species in Chile. Elmer, **NEW JOURNAL: C W** Thronthwaite Associates, 1976.

LAVERY, P. B. *Pinus radiata*—An introduction to the species. In: Plantation Forestry with *Pinus radiata* (P. B. Lavery, ed.): 5–12. [Review Papers No. 12.] School of Forestry, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand. Legat, C. E. (1930) The cultivation of exotic conifers in South Africa. 1986.

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

LESLIE J F Fungal Vegetative Compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, n. 9, p. 127-150, sep. 1993.

MANULLIS, S.; WILLIAMS, J.G,K.; TANSKLEY, S.D. Rapid identification markers linked to a pseudomonas resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.88, p. 2336-2340, 1991.

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

MCDONALD, P. M.; LAACKE R. **Discovery Life Pinaceae Pinus radiata D. Don. Services United State Department of Agriculture-Natural Resources Conservation service**. Disponível em: <<http://www.discoverlife.org>>. Acesso em: 2/1/2008.

MACKNELL, F.H. Wide Spacing silviculture un western Australia's pine plantation. Proceedings wood: Future growth and conversion workshop, Canberra, 1981.

MARSH, E.K. 1978. (Compiler): The cultivation and management of commercial pine plantations in South Africa. Bulletin 56, Department of Forestry, Pretoria.

MILLER, R. ***Pinus radiata* D. Don. USDA Forest Service, 2008**. Disponível em: <www.cnr.vt.edu/DENDRO/dendrology/syllabus/Pradiata.htm>. Acesso em: 15/1/2008.

MILLAR, C.I. Evolution and Biogeography of *Pinus radiata*, with a propose revision of its quaternary history. USDA Forest Service. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Wellington, v. 29, n. 3, p. 335-365, 2000.

- MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A. **Introdução à Fitopatologia**: caderno didático. Viçosa: Ed. Viçosa 2006. 190 p.
- OFFORD, H.R. Diseases of Monterrey pine in native stands of California and in plantations of Western North America. Paper PSW –14, 1964.
- OVINGTON, J.D. Some aspects of the biology of radiate pine plantations . proceedings Pines Radiate symposium, Camberra, 1970. The Australian National University. 1971.
- PALMER, A.M. **How to identify and control *Diplodia* shoot blight, collar rot and canker of conifers. University of Minnesota.** Disponível em: www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/howtos/ht_conifers/ht_conifers.htm. Acesso em : 7/11/2007.
- PALMER, M.A.; STEWART, E.L.; WINGFIELD, M. J. Variation among isolates of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States. **Phytopathology**, Lancaster, v. 77, n. 6, p. 944-948, 1987.
- PATAKY, NANCY R., ***Sphaeropsis* Blight or *Diplodia* Tip Blight of Pines.** Disponível em: <www.ipm.uiuc.edu/landturf/diseases/sphaeropsis/index.html>. Acesso em: 7/11/2007.
- PETERSON, G. W. Infection, epidemiology, and control of diplodia blight of Austrian, ponderosa, and Scots pines. **Phytopathology**, Lancaster, v. 67, p.511-514, 1977. Disponível em: <ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3041.html>. Acesso em: 15/1/2008.
- PETERSON, G. W ***Diplodia pinea*.** Version 01.1 saved 4 January 2005. Disponível em: <ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3041.html>. Acesso em: 15/1/2008.
- PHILLIP, 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: 7/11/2007.
- POYTON, R. J. **Tree Planting in Southern Africa.** Pretoria: Department of Forestry, 1979. v. 1- The pines.
- PRICE, R. A.; A. LISTON; S. H. STRAUSS. Phylogeny and systematics of *Pinus*. Pp. 49-68 In: Richardson, D.M. (ed.), Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. 1998.
- QUINTA DO PRAZO : viveiros florestais Ltda. Disponível em: <<http://www.qtprazo.naturalink.pt/services.htm>>. Acesso em: 2/10/2007.
- RECHER, H.F. *Pinus radiata* – a million dollar miscalculation? **Australian Natural History**, Sydney, v. 20, n. 10, p. 318-325, 1982.

RESENDE, M. D. V. Genética Biométrica e Estatística no Melhoramento de Plantas Perenes. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002.,975p.

ROGERS, DEBORAH 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

RODRIGUES CASSIOLATO, A. M.; MELO, I. S. de. Reação de resistência de genótipos de tomateiro (*Lycopersicum spp.*) à infecção por *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.51, n.3 sep./dec.1994.

SAG -Serviço Agrícola e Ganadera. División de protección agrícola Coordinación General de la edición: Subdepartamento de vigilancia y control de plagas forestales y exóticas invasoras. Informe anual 2004. Disponível em: <[http://: www.sag.cl](http://www.sag.cl)>. Acesso em: 16/10/2007.

SCOTT, C. W. *Pinus radiata*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Forestry and Forest Products Study 14. Rome, Italy. 328 p. *Pinus radiata* **Disponível em:** <www.gvmelle.com/bomen/pi_radi.htm>. Acesso em:20/10/2007

SHAW, G.S. 1914 Genus Pine. Arnould Arboretum Publication. N. 5. Riverside Press Cambridge.

SHIMIZU, J.Y.; MEDRADO, M. J. S. **Cultivo de Pinus**. Embrapa floresta 2005. Disponível em: sistema.producao.cnptia.embrapa.br/ Acesso 7/11/2007

SINCLAIR, J.B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. St Paul. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n.3, p. 220-224, 1991.

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

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

SOUZA. S.M.de ; WHITE, T. L.; HODGE, G. R.; SCHMIDT, R. A. Genetic Parameter Estimates for Greenhouse traits of Slash Pine Artificially inoculated with Fusiform Rust Fungus. **Forest Science**, Lawrence v.37, n.3, p.836-848, 1991.

SOUZA. S.M. de; HODGE, G.R.; WHITE, T. L. Indirect Prediction of Breeding Values for Fusiform Rust Resistance of Slash Pine Parents Using Greenhouse Tests. **Forest Science**, Lawrence, v 38, n.1, p.45 - 65, 1992.

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**, St. Paul, v. 80, n. 7 p. 750-753, 1996.

STANOSZ G. R.;KIMBLER D. L. Shoot Blight of Lodgepole Pine Seedlings in Nebraska Caused by *Sphaeropsis sapinea* . **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 3, p.311, mar. 1997

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

STANOSZ, G. R. Univ. of Wisconsin-Madison, Depts. of Plant Pathology and Forest Ecology and Management, 1630 Linden Drive, Madison. Evaluation distribution and structure of epidemic populations of *Sphaeropsis sapinea*.2002. Disponível em <http://fhm.fs.fed.us/em/funded/04/eval_sphaeropsis_sapinea.pdf>. Acesso em: 26/09/2007

SUTTON, B.C. *Sphaeropsis sapinea*. In: COELOMYCETES. (Commonwealth. Mycological Institute) Inst/assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey. England. p.120/121,1980.

SWART, W.J.; WINGFIELD, M.J. Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n. 8, p.761-766,1991.

TPCP: *Sphaeropsis sapinea* diseases.2002. Modi LTDA. Disponível em: <<http://.up.ac.za/academic/fabi/tpcp>>. Acesso em: 26/09/2007

TURNER, J.; LAMBERT, M.J.Nutrition and Nutritional relationships of *Pinus radiata*. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.17, n.11 p. 325-350, nov.1986.

VASCONCELLOS, M.J.V; MACHADO, M.A.; ALMEIDA, A.M.R.; HENNING, A.A.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Differentiation of *Colletotrichum truncatum* isolates by random amplified polymorphic DNA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n. 4, p.520-530, 1994.

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

WANG, C.G.; BLANCHETTE, R. A.;PALMER, M. A.. Ultrastructural aspects of the conidium cell wall of *Sphaeropsis sapinea*. **Mycologia**, Lawrence, v. 78, n.6, p. 960-963, nov./dec.1986.

WANG, C.G.; BLANCHETTE, R. A.;PALMER, M. A.. Ultrastructural aspects of the conidium cell wall of *Sphaeropsis sapinea*. **Mycologia**, Lawrence, v. 78, n.6, p. 960-963, nov./dec.1986.

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

WINGFIELD, M.J.; KNOX-DAVIES, P.S. Association of *Diplodia pinea* with a root disease of pines in South Africa. **Plant. Disease**, St. Paul, v. 64, n. 2, p. 221-223, 1980.

ANEXOS

ANEXO 1 – DADOS ORIGINAIS DAS LESÕES CAUSADAS POR *Sphaeropsis sapinea* EM FRUTOS DE MAÇÃ VAR. GRANNY SMITH

Local	Repetição	Isolados	7 dias	10 dias
1	1	1	9,7	9,7
1	2	1	2,36	5,66
1	3	1	4,23	8,5
1	4	1	4,16	8,166
1	5	1	3,76	8,6
1	1	2	2,96	7
1	2	2	3,53	5,43
1	3	2	2,33	4,8
1	4	2	4,26	8,83
1	5	2	4,23	5,6
1	1	3	1,9	7
1	2	3	2,9	5,43
1	3	3	2,3	4,8
1	4	3	5,13	8,83
1	5	3	3,6	5,6
1	1	4	4,4	4,9
1	2	4	3,6	6
1	3	4	3,96	4,5
1	4	4	4,13	6,77
1	5	4	3,36	4,43
1	1	5	1,3	1,3
1	2	5	1,26	1,4
1	3	5	1,53	1,53
1	4	5	1,53	1,53
1	5	5	1,63	1,63

ANEXO 2 - SECAMENTO DO PONTEIRO DE MUDAS DE *Pinus taeda* CAUSADO POR ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea*

modo	Túnel 1												Túnel2												sombrite 0															
	M1			M2			M3			M4			M1			M2			M3			M4			M1			M2			M3			M4						
repet	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	
1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4	0	3	0	0	0	0	0	4		
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	1	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	4	2	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0		
	2	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0		
4	1	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	1	5	4	0	5	0	0	0	0	4	0	0			
	2	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	4	5	4	0	6	0	0	0	0	4	0	0			
5	1	2	0	2	0	1	0	0	8	0	0	0	0	3	3	2	0	1	0	0	8	0	0	0	0	3	4	4	0	0	0	0	8	0	4	0	0			
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0			
6	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0	3	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0		
	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
7	1	4	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	3	4	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	4	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	1	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	3	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	0	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0	
11	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1	2	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	1	4	0	0	0	0	0	0	4	4	4	2	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0		
	2	2	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	2	1	7	0	0	0	0	0	0	4	1	4	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0		

Modo de inoculação: M1 – com injúria e com fungo; M2 – sem injúria e com fungo; M3 – com injúria e sem fungo; M4 – sem injúria e sem fungo.
Ambientes testados: Túnel 1, Túnel 2 e Sombrite (0).

ESCALA DE SEVERIDADE	
Sem sintoma	0
Sintoma inicial	1
Seca de ponteiro	2
Seca sem anelamento	3
Seca com anelamento	4
Morte da planta	5

ANEXO 3 – ANÁLISE DE LESÕES (CM) EM PONTEIROS DE *Pinus taeda* INOCULADOS COM ISOLADOS DE *Sphaeropsis sapinea* OBTIDOS DE *Pinus spp*, EM TRÊS AMBIENTES DIFERENTES.

ISOLADO	Túnel 1				Túnel 2				Sombrite			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
1	3,00	0,00	0,00	0,00	8,67	1,33	0,00	0,00	6,50	0,50	0,00	1,50
2	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,17	0,00	0,00	0,00
3	6,17	0,00	0,00	0,00	7,33	0,00	0,00	0,00	7,17	1,00	0,00	0,00
4	7,00	0,00	0,00	0,00	10,00	3,67	0,00	0,00	8,25	0,33	0,00	0,00
5	1,33	0,00	0,00	0,00	5,17	0,00	1,33	0,00	4,83	0,00	0,00	0,00
6	2,00	0,00	0,00	0,00	4,67	1,50	0,00	0,00	0,33	0,50	0,00	0,00
7	4,50	1,17	0,00	0,00	4,50	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
8	0,17	0,00	0,00	0,00	6,67	1,83	0,00	0,00	1,67	0,00	0,00	0,00
9	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00
10	7,17	0,00	0,00	0,00	8,00	0,00	0,00	0,00	6,50	3,33	0,00	0,00
11	1,33	0,00	0,00	0,00	6,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	8,50	0,00	0,00	0,00	2,83	0,00	0,00	0,00	8,00	0,33	0,00	0,00
Médias	3,53	0,10	0,00	0,00	5,33	0,69	0,11	0,00	3,83	0,50	0,00	0,13

ANEXO 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DO ENSAIO DE AGRESSIVIDADE EM MUDAS DE *Pinus taeda*

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QM	F	Nível de significância
BLOCO	2	14,77	4,01	0,0191
TRATAMENTO	3	444,02	120,68	0,0000
LOCAL	11	20,42	5,55	0,0000
BLOCO X TRATAMENTO	6	7,51	2,04	0,0602
BLOCO X LOCAL	22	4,82	1,31	0,1633
TRATAMENTO X LOCAL	33	15,21	4,13	0,0000
BLOCO X TRATAMENTO X LOCAL	66	3,56	0,97	0,5536
ERRO	287	3,68		

ANEXO 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA SECAMENTO DE PONTEIRO DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS1.3 DE *Sphaeropsis sapinea* INOCULADO EM PROGÊNIES DE *Pinus radiata*

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QM	F	P-LEVEL
BLOCO	3	1,296875	0,613603	0,609737
PROGÊNIES	15	2,198958	1,040414	0,434846
RESÍDUOS	45	2,113542		

ANEXO 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA SECAMENTO DE PONTEIRO DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS2.4 DE *Sphaeropsis sapinea* INOCULADO EM PROGÊNIES DE *Pinus radiata*

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QM	F	P-LEVEL
BLOCO	3	0,250000	0,198238	0,897047
PROGÊNIES	15	1,695833	1,344714	0,216822
RESÍDUOS	45	1,261111		

ANEXO 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA SECAMENTO DE PONTEIRO DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS4.10 DE *Sphaeropsis sapinea* INOCULADO EM PROGÊNIES DE *Pinus radiata*

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QM	F	P-LEVEL
BLOCO	3	0,250000	0,198238	0,897047
PROGÊNIES	15	1,695833	1,344714	0,216822
RESÍDUOS	45	1,261111		

ANEXO 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA TAMANHO DE LESÕES DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS1.3 INOCULADO EM PROGÊNIES DE *Pinus radiata*

FONTES DE VARIÇÃO	GL	QM	F	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA
BLOCO	3	6,566406	2,472948	0,073776
PROGÊNIES	15	3,997656	1,505541	0,143928
RESÍDUOS	45	2,655295		

ANEXO 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA TAMANHO DE LESÕES DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS2.4 INOCULADO EM PROGÊNIES DE *Pinus radiata*

FONTES DE VARIÇÃO	GL	QM	F	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA
BLOCOS	3	1,170573	0,611260	0,611216
PROGÊNIES	15	2,083073	1,087757	0,611216
RESÍDUOS	45	1,915017		

ANEXO 10 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA TAMANHO DE LESÕES DO ISOLADO MONOSPÓRICO SS4.10 INOCULADO EM PROGÊNIES DE *Pinus radiata*

FONTES DE VARIÇÃO	GL	QM	F	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA
BLOCOS	3	3,983073	6,104164	0,001417
PROGÊNIES	15	0,462240	0,708394	0,762810
RESÍDUOS	45	0,652517		