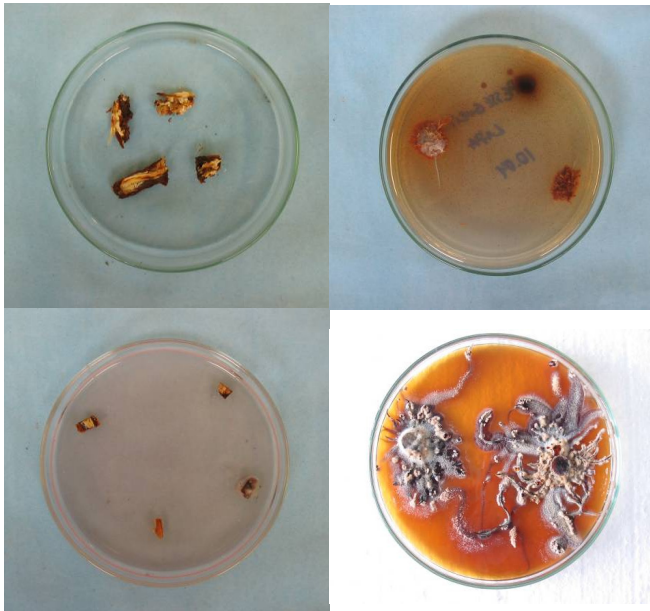


Fotos: Celso Garcia Auer



Coleta de amostras, isolamento e cultivo de isolados de *Armillaria* sp. de *Pinus*

Celso Garcia Auer¹
Francine Bontorin Silva²
Nei Sebastião Braga Gomes³

A cultura do pínus tem participado ativamente na silvicultura brasileira por ser uma importante fonte de madeira e fibras para diversos usos industriais. Muitas espécies são plantadas e manejadas para a produção de madeira, em especial, no Hemisfério Sul, destacando-se na América do Sul países como o Brasil, Chile, Argentina, Uruguai e Colômbia (SHIMIZU; SEBBENN, 2008).

A principal doença desta cultura no Brasil é a armilariose causada pelo fungo *Armillaria*, provocando o apodrecimento da casca e do lenho das raízes e do colo da planta, resultando em sua morte (KRUGNER; AUER, 2005). De acordo com Auer e Gomes (2007), a morte de árvores pode chegar a 8,5% em plantios com idade variando entre um e sete anos e a 20% em plantios com 25 anos de idade.

Vários estudos foram feitos com este patógeno visando a um maior conhecimento do seu ciclo de vida, variabilidade genética e o estabelecimento de medidas de controle em condições brasileiras

(AUER; GOMES, 2007). Este trabalho tem como objetivo descrever protocolos de isolamento, purificação dos isolados, cultivo e manutenção de culturas utilizados pelo Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas.

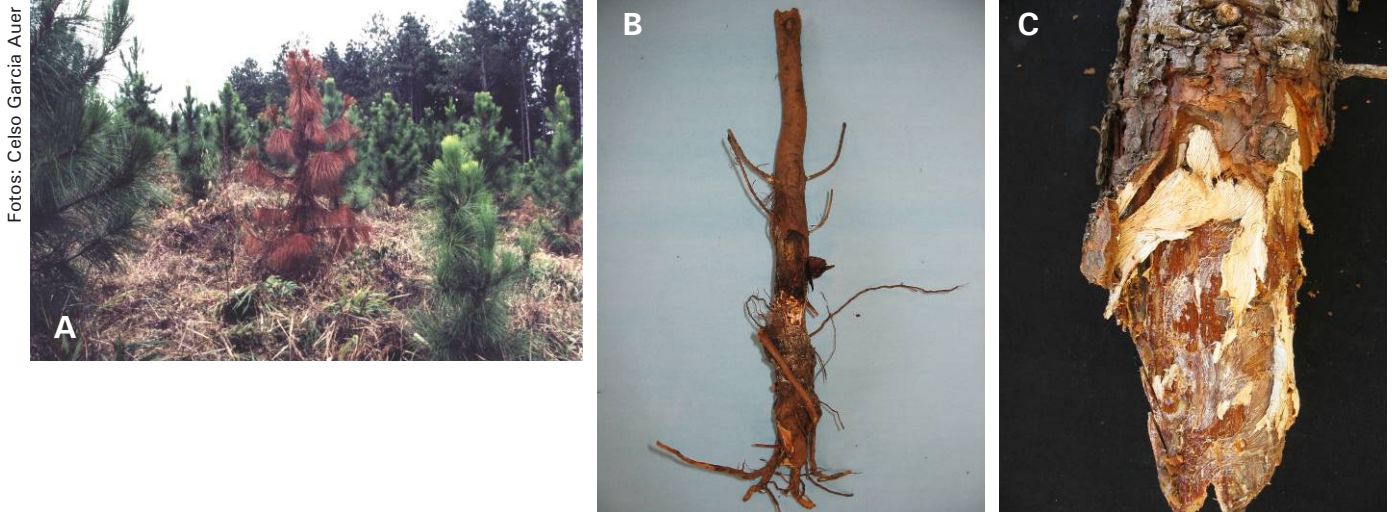
Coleta de amostras de plantas doentes

A partir da constatação da ocorrência da armilariose em campo por meio dos sintomas característicos da doença: secamento de acículas e morte de plantas (Figura 1A), faz-se a coleta das amostras de troncos de plantas doentes. O material doente deve ser coletado de árvores recém-mortas (Figura 1B), para facilitar o isolamento de *Armillaria*, sem que seja retirada a casca da planta, reduzindo a chance de contaminação por fungos antagonistas (GOMES, 2005). Estas amostras de tronco devem ser embaladas em sacos plásticos para minimizar a contaminação por fungos antagonistas como *Trichoderma* ou colocadas em caixa de papelão e prontamente remetidas ao laboratório.

¹Engenheiro Florestal, Doutor, Embrapa Florestas, auer@cnpf.embrapa.br

²Bióloga, Mestre, franbontorin@yahoo.com.br

³Engenheiro Florestal, Doutor, Universidade Federal do Acre, neibraga@ufac.br



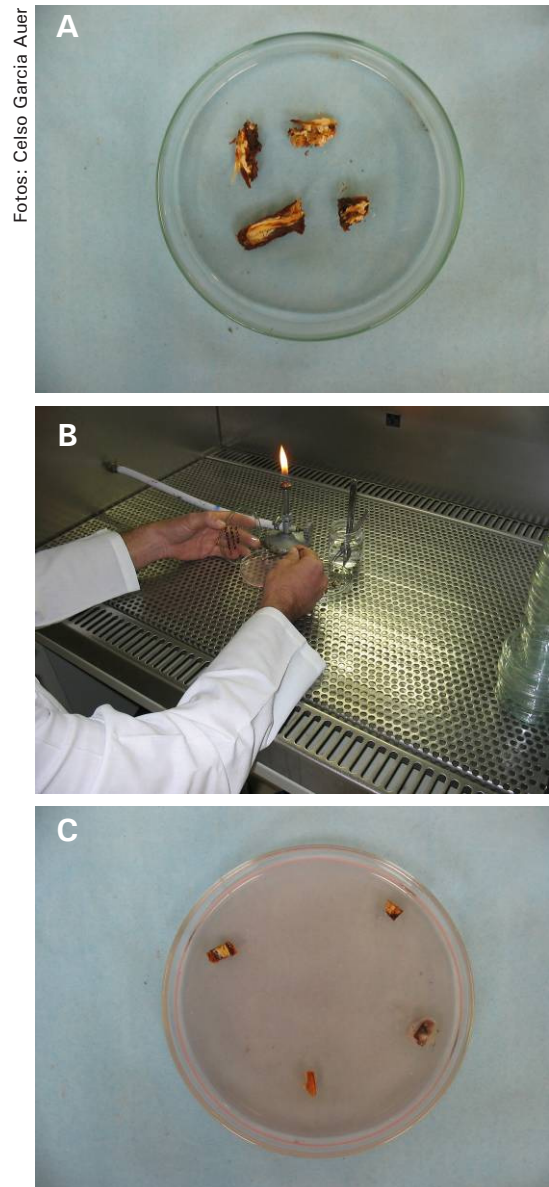
Fotos: Celso Garcia Auer

Figura 1. Sintomas da armilarirose em árvores de pínus. A) Árvore morta; B) Árvore doente coletada para isolamento de *Armillaria*; C) Casca de árvore doente apresentando placa micelial.

Isolamento do fungo

O material coletado deve ser limpo antes de entrar no laboratório, escovando-se ou raspando-se a casca da planta, para a retirada de solo e de resíduos do campo (FERNANDEZ, 1993). Após limpar a superfície, retira-se a camada externa da casca, usando-se uma faca ou lâmina previamente flambada. A casca contendo placa micelial visível (Figura 1C) é levada então ao laboratório.

Na capela de fluxo laminar, pequenos fragmentos da placa micelial são retirados (Figura 2A) e inseridos diretamente em placas de Petri (Figura 2B) contendo meio seletivo para *Armillaria* modificado (MSA) (GOMES; AUER, 2004). Este meio é preparado em frascos de Erlenmeyer nos quais se colocam extrato comercial de batata-dextrose-agar (BDA), 39 g; rosa bengala – 3,3 mg; carbendazim – 20 mg; etanol 96 °GL – 25 mL; cloranfenicol – 250 mg; solução de ácido láctico a 25%, 1 mL e água ultrapurificada, 1.000 mL. Todos os reagentes são misturados antes da esterilização, à exceção do cloranfenicol e do ácido láctico. Os frascos com o meio MSA são esterilizados em autoclave, a 120 °C, por 15 minutos. As placas de MSA (Figura 2C) com os fragmentos são incubadas em BOD à temperatura de 22 °C, no escuro (AUER et al., 2007), a fim de permitir o desenvolvimento do patógeno para fora do fragmento e seu crescimento como uma colônia no meio de cultura (Figura 3A).



Fotos: Celso Garcia Auer

Figura 2. A) Fragmentos de casca com placa micelial para isolamento de *Armillaria*; B) Inserção de fragmentos em placas de Petri com meio de cultura MSA. C) Placas com meio MSA e fragmentos de placa micelial.

Purificação de culturas

Após o crescimento de micélio típico de *Armillaria* nas placas de Petri com o meio seletivo, as culturas de *Armillaria* são transferidas para placas de Petri com meio BDA e incubadas em BOD à temperatura de 22 °C, no escuro. Pequenas porções do meio contendo o micélio da borda das colônias são transferidas para tubos de ensaio ou para novas placas com meio BDA, a fim de se obterem colônias puras do patógeno.

Cultivo do fungo *Armillaria*

Para os estudos de fisiologia (GOMES, 2005) e para a produção de micélio para as análises moleculares (SILVA, 2009), os isolados podem ser repicados para novas placas com meio BDA e incubados em câmara BOD à temperatura de 22 °C. Os isolados também podem ser cultivados em outro meio sólido

como extrato de malte-ágar (extrato de malte, 30 g; ágar, 20 g, água ultrapurificada, 1.000 mL), indicado para o cultivo de basidiomicetos (RISHBETH, 1968). O fungo *Armillaria* também pode ser cultivado em meio líquido como o caldo BD (infuso de batata e dextrose, 24 g; água ultrapurificada, 1.000 mL) e o meio MSA sem a adição de ágar.

O fungo forma culturas de crescimento micelial irregular em meio sólido, de aspecto crustoso, de coloração clara a creme e marrom, podendo causar o escurecimento do meio pela liberação de substância corante (Figura 3A e 3B). Outras estruturas observadas, no meio BDA ou MSA, são as rizomorfas (Figura 3 B), as quais são características do gênero *Armillaria*. O fungo *Armillaria* é o único que produz rizomorfas similares às encontradas em plantas com armilariose (Figura 3C).



Figura 3. A) Culturas iniciais de *Armillaria* em meio MSA; B) Aspecto da cultura e de rizomorfas de *Armillaria*; C) Detalhe da rizomorfa em casca de pínus de árvore morta.

Preservação de culturas de *Armillaria*

Os isolados purificados e identificados podem ser preservados por meio de dois métodos. Pelo método da cultura imersa em óleo mineral (Figura 4), a preservação ocorre sob refrigeração a 4 °C. As culturas são crescidas em tubos de ensaio contendo meio BDA por 30 dias, sendo posteriormente recobertas com óleo mineral estéril (FERNANDEZ, 1993; GONÇALVES et al., 2007). Por este método, as culturas podem ser preservadas por até 10 anos, sem a necessidade de repicagem periódica.



Figura 4. Preservação de culturas de *Armillaria* pelo método de imersão em óleo mineral.

O outro método é o da repicagem periódica em meio BDA (FERNANDEZ, 1993; GONÇALVES et al., 2007), que consiste em, a cada 6 meses, tubos de ensaio ou placas de Petri com meio BDA mantidas em condições ambientes ou sob refrigeração a 4 °C.

Referências

- AUER, C. G.; GOMES, N. S. B. **Armilariose em *Pinus elliottii* var. *elliottii***: etiologia, determinação de danos e medidas de controle nos estados de Santa Catarina e Paraná. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 43 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, n. 34).
- AUER, C. G.; GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Crescimento *in vitro* de isolados de *Armillaria* sp. obtidos de *Pinus elliottii* var. *elliottii* sob várias temperaturas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 187-189, 2007.
- FERNANDEZ, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. 128 p.
- GOMES, N. S. B. **Armilariose em *Pinus elliottii***: etiologia, determinação de danos e medidas de controle, nos estados do Paraná e de Santa Catarina. 2005. 96 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- GOMES, N. S. B.; AUER, C. G. Meio seletivo para *Armillaria* sp. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 3., 2004, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2004. p. 007a-007c. (Embrapa Florestas. Documentos, 102).
- GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase a fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Org.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. v. 1. p. 92-102.
- KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças em pinheiros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. p. 517-522.
- RISHBETH, J. The growth rate of *Armillaria mellea*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 51, n. 3/4, p. 575-586, 1968.
- SILVA, F. B. **Caracterização molecular de isolados de *Armillaria* sp. na região Sul do Brasil**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- SHIMIZU, J. Y.; SEBBENN, A. M. Espécies de *Pinus* na silvicultura brasileira. In: SHIMIZU, J. Y. (Ed.). **Pinus na silvicultura brasileira**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. p. 49-74.

Comunicado Técnico, 287

Embrapa Florestas
Endereço: Estrada da Ribeira Km 111, CP 319
 Colombo, PR, CEP 83411-000
Fone / Fax: (0***) 41 3675-5600
E-mail: sac@cnpf.embrapa.br



1ª edição
 Versão eletrônica (2011)

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Patrícia Póvoa de Mattos
Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida
Membros: Álvaro Figueredo dos Santos,
 Antonio Aparecido Carpanezi, Claudia Maria Branco de
 Freitas Maia, Dalva Luiz de Queiroz, Guilherme Schnell
 e Schuhli, Luís Cláudio Maranhão Froufe,
 Marilice Cordeiro Garrastazu, Sérgio Gaíad

Expediente

Supervisão editorial: Patrícia Póvoa de Mattos
Revisão de texto: Mauro Marcelo Berté
Normalização bibliográfica: Francisca Rasche
Editoração eletrônica: Mauro Marcelo Berté