

# Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de isolados de *Guignardia citricarpa*, agente patogênico da mancha preta dos citros

Marilda Pereira Caixeta<sup>1</sup>, Maria Júlia Corazza<sup>1</sup>, Ricardo Ribeiro de Oliveira<sup>2</sup>, Carlos Alexandre Zanutto<sup>1</sup>, William Mário de Carvalho Nunes<sup>1\*</sup> e João Batista Vida<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: wmcnunes@uem.br

**RESUMO.** O presente trabalho teve como objetivo identificar 11 isolados de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros (MPC), obtidos de frutas cítricas sintomáticas de diferentes regiões geográficas, por meio da PCR e caracterização morfofisiológica das estruturas propagativas, esporulação e crescimento micelial em diferentes meios de cultura, temperaturas e regimes de luz, nas condições de laboratório. Pelo teste de PCR, todos os isolados foram identificados como o patógeno *G. citricarpa*. Os isolados caracterizados foram submetidos às temperaturas de 20, 25 e 30°C, em regime de luz contínua, escuro contínuo e fotoperíodos de 12 horas, durante 24 dias. Utilizaram-se os meios de cultura aveia-ágar (AA), batata-dextrose-ágar (BDA) e cenoura-dextrose-ágar (CDA). Os resultados mostraram que ocorreu interação entre os diferentes meios de cultura, temperaturas e fotoperíodos. O meio de cultura que melhor estimulou o crescimento micelial foi o CDA a 25°C sob o fotoperíodo de 12h. A maior produção de esporos (conídios) foi verificada no meio BDA a 20°C, no fotoperíodo de 12 horas. No meio CDA, não ocorreu esporulação de nenhum isolado. Sob a temperatura de 30°C, foi verificada apenas a produção de hifas e picnídios para a maioria dos isolados, em todos os meios de cultura e fotoperíodo testados.

**Palavras-chave:** *G. citricarpa*, PCR, esporulação, crescimento micelial, temperatura, meio de cultura, fotoperíodo.

**ABSTRACT.** Morphophysiological characterization and molecular identification of isolates of *Guignardia citricarpa*, a pathogenic agent of the citrus black spot. The present work aims to identify 11 isolates of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of the citrus black spot (CBS), obtained from affected fruit in different geographical regions, through PCR and morphophysiological characterization of propagative structures, sporing and mycelial growth in different means of culture, temperatures and photoperiods, under laboratory conditions. Through the PCR test, all isolates were identified as being the *G. citricarpa* pathogen. The characterized isolates were subjected to evaluations at temperatures of 20, 25 and 30°C, in continuous light, continuous darkness, and alternating 12 hours light and 12 hours darkness, during 24 days. The study used oat-agar (OA), potato-dextrose-agar (PDA) and carrot-dextrose-agar (CDA) as means of culture. The results showed an interaction between the different means of culture, temperatures and photoperiods. The mean of culture that best stimulated mycelial growth was CDA at 25°C under the 12-hour photoperiod. The greatest spore (conidia) production was verified in PDA at 20°C in the 12-hour photoperiod. There was no sporing of any isolate in the CDA mean of culture. Under the 30°C temperature, the study verified only the production of hyphae and picnids in most isolates, in all means of culture and photoperiods.

**Key words:** *G. citricarpa*, PCR, sporing, mycelial growth, temperature, mean of culture, photoperiod.

## Introdução

Algumas doenças dos citros já foram estudadas sob as condições do Paraná (Carraro *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2007), no entanto, a mancha preta dos citros (MPC) somente

agora se iniciou seu estudo. É uma doença causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, fase anamórfica *Phyllosticta citricarpa*, tem sido responsável por elevados prejuízos na citricultura de diversas regiões produtoras do mundo, devido às lesões provocadas

principalmente no flavedo dos frutos, depreciando-os para o mercado *in natura*.

Uma importante característica da MPC é o seu longo período de incubação, uma vez que a infecção ocorre desde o crescimento inicial do fruto, mas os sintomas só aparecem a partir da fase de transição entre a cor verde e a maturação, podendo ser observados após a colheita, ou, ainda, durante o armazenamento e o transporte. A principal fonte de inóculo primário do patógeno é constituída pelos ascósporos, produzidos pelos pseudotécios da fase teleomórfica, desenvolvidos em folhas em decomposição no solo (Feichtenberger, 1996). A fase anamórfica produz picnídios que se desenvolvem em frutos e folhas fixadas à planta (Spósito, 2003).

Os sintomas da MPC são favorecidos por vários fatores, os mais importantes são a radiação solar intensa e as altas temperaturas (Feichtenberger, 1996). O clima de alguns estados produtores brasileiros, como São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e, mais recentemente, Paraná, tem proporcionado condições ambientais favoráveis ao patógeno por longos períodos durante o ano e, conseqüentemente, a severidade da doença tem alcançado altos níveis quando comparados com os de outros países. Com exceção da laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) e seus híbridos, quase todas as espécies e variedades de citros são susceptíveis ao patógeno, particularmente, os limões verdadeiros [*C. limon* (L.) Burm. f.], seguidos das variedades de laranjas doces [*C. sinenses* (L) Osbeck], cujo amadurecimento dos frutos ocorre durante os períodos de temperaturas mais elevadas (Kotzé, 1981).

Diversas medidas de controle da MPC, tecnicamente viáveis, têm sido propostas, porém, muitas delas são incompatíveis do ponto de vista econômico e ambiental. A maioria das estratégias de controle tem como alvo a redução do inóculo.

O conhecimento da biologia de uma doença para o estabelecimento de medidas de controle requer a identificação e a caracterização de seu agente patogênico. Como *G. citricarpa* é um patógeno relativamente novo no Brasil, a caracterização morfológica e fisiológica de isolados de diferentes regiões do país podem fornecer informações imprescindíveis para tais estudos.

Diante dessas considerações, este estudo teve como objetivo caracterizar isolados de *G. citricarpa* de diferentes regiões citrícolas do Brasil e da África do Sul, por meio da morfologia de colônias, crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura, temperaturas e regimes de luz.

## Material e métodos

### Origem dos isolados de *G. citricarpa*

Foram utilizados 11 isolados de *G. citricarpa* obtidos de diferentes espécies de citros, pertencentes a várias regiões citrícolas do Brasil, sendo um da África do Sul. Os isolados PR1, PR2, PR3 e PR4 foram obtidos de frutos com sintomas típicos da doença, coletados em pomares comerciais do município de Cerro Azul, no Vale da Ribeira, região Sul do Estado do Paraná. Os demais isolados, gentilmente cedidos por Instituições de Ensino Superior, foram oriundos de diferentes municípios do Estado de São Paulo (Esalq1, Esalq2, Esalq3, PCP6, PC12C, PC13/36). O isolado identificado por PC3C foi proveniente da África do Sul.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná, no período de 2004 a 2005.

### Isolamento e manutenção dos isolados

Para o isolamento do fungo, foram utilizados fragmentos de tecidos das bordas das lesões, abrangendo a zona de transição entre o tecido doente e o sadio. Foi realizada uma desinfestação superficial em álcool 70%, por 30 s, e imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2%, também, durante 30 segundos, com enxágue em água destilada e esterilizada, seguida de secagem sobre papel absorvente esterilizado. Os fragmentos foram depositados em placas de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura batata-destrose-ágar (BDA) e que foram armazenadas em câmara climatizada tipo BOD, sob luz fluorescente a 25°C, durante 22 dias. Após esse período, procedeu-se a repicagem das colônias típicas do fungo para obtenção de cultura pura. Os isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio cenoura-destrose-ágar (CDA) para culturas, estoque e armazenamento em câmara fria à temperatura de 4°C.

Após a transferência em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, os isolados foram incubados em estufa climatizada, tipo BOD, a 25°C, sob luz fluorescente contínua. A cada 20 dias, procedeu-se a transferência de discos de micélio dos isolados para novas placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura e condições de crescimento para obtenção de colônias novas (vigorosas).

### Avaliação da influência do meio de cultura, da temperatura e do fotoperíodo no crescimento micelial de *G. citricarpa*

O crescimento micelial dos isolados foi avaliado nos meios de cultura BDA, CDA e AA nos fotoperíodos luz contínua, fotoperíodo de 12h e

ausência de luz, nas temperaturas de 20, 25 e 30°C. O delineamento experimental foi de blocos inteiramente casualizados (DIC), constituindo um fatorial 3 x 3 x 3 para cada isolado separadamente. Foram utilizadas cinco placas de Petri (repetições) para cada isolado, em cada meio de cultivo, temperatura e regime de luz.

O inóculo de cada isolado foi constituído de cultura com 20 dias de idade. Discos de micélio foram cortados das bordas das colônias, utilizando-se um vazador de rolha de 8,0 mm de diâmetro. Em seguida, com o auxílio de uma alça de ponta reta, os discos de micélio foram transferidos para placas de Petri contendo 20 mL dos meios BDA, CDA e AA. As placas de Petri foram armazenadas em câmaras climatizadas do tipo BOD a 20, 25 e 30°C, sob luz fluorescente contínua, escuro contínuo e fotoperíodos de 12h, durante 24 dias. Foram analisadas as seguintes variáveis: crescimento micelial, coloração, formato e espessura das colônias e esporulação.

Para obter uma estimativa do crescimento micelial, mediu-se o diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos, com o auxílio de uma régua milimetrada, 24 dias após a repicagem dos fungos para os meios, período em que a colônia cobriu toda a placa. O diâmetro da colônia foi expresso pela média aritmética dos diâmetros. A partir dos resultados, foi obtida a taxa de crescimento diário de cada isolado em cada meio, temperatura e fotoperíodo e estas foram submetidas à análise de variância, utilizando o teste F a 5% de significância para testar as hipóteses dos efeitos principais e das interações. Efetuou-se a comparação das médias pelo teste de agrupamento Scott Knott a 5% de significância. O desdobramento, bem como as análises foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar, versão 4.6.

### Formação de estruturas reprodutivas

#### Picnídios

Após a última avaliação do crescimento micelial nos diferentes meios de cultivo, regimes de luz e temperaturas, duas placas de Petri de cada tratamento foram selecionadas para avaliação da produção de picnídios. Foram selecionadas as placas de Petri que apresentaram maior uniformidade da colônia quanto à simetria diametral e formação de setores.

Em cada placa de Petri, foram adicionados 6,0 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, raspou-se suavemente a superfície do meio de cultivo, manualmente, para liberação dos picnídios.

A suspensão obtida (picnídios + hifas) foi transferida para um tubo de ensaio e agitada em vortex, por aproximadamente 1 minuto, para uniformizar a distribuição dos picnídios na suspensão.

Em seguida, com o auxílio de uma pipeta graduada, transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL de suspensão para uma lâmina de microscopia, cobriu-se com lamínula e procedeu-se a contagem do número de picnídios ao microscópio óptico.

#### Conídios

O restante da suspensão usada para a quantificação de picnídios foi reutilizada para a quantificação de picnidiósporos. Para isso, a suspensão de picnídios foi novamente agitada no vortex, por aproximadamente 1 minuto, para a total liberação dos conídios. Em seguida, a suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze para retenção de micélio e picnídios. Com o auxílio de uma pipeta graduada, uma alíquota de 0,2 mL da suspensão filtrada foi transferida para Câmara de Neubauer, procedendo-se a contagem dos picnidiósporos (conídios).

### Resultados e discussão

#### Crescimento micelial

O crescimento micelial foi avaliado após 24 dias de incubação, período em que a colônia fúngica apresentou o maior crescimento, ocupando toda a superfície do meio de cultivo na placa de Petri.

A análise dos resultados de crescimento micelial mostrou que, para cada isolado, pelo teste F a 5% de significância, houve interação de segunda ordem (interação tripla) significativa. Estas interações, meios de cultura x temperaturas x regimes de luz, foram desdobradas para cada isolado (meio de cultura dentro de cada nível de regimes de luz e temperatura, regimes de luz dentro de cada nível de meio de cultura e temperatura e temperatura dentro de cada nível de meio de cultura e regimes de luz). As condições que favoreceram ou desfavoreceram o crescimento micelial dos diferentes isolados estão expressos resumidamente na Tabela 1. Para a maioria dos isolados, as melhores condições de crescimento micelial ocorreram no meio CDA, nos três regimes de luz testados e nas temperaturas de 20 e 25°C. No caso dos isolados PC13/36 e PCP6, não foi observada nenhuma diferença para os meios CDA e AA, já o isolado PC3C apresentou maior crescimento micelial no meio AA.



com exceção dos isolados PC3 e PCP6 que, neste meio, apresentaram um padrão diferente dos demais. Suas colônias desenvolveram micélios em setores irregulares (em forma de renda), também imersos no meio de cultura. Essas formações de colônias não estão de acordo com as descritas por Baayen *et al.* (2002). Neste meio de cultura, os autores observaram a formação de pigmentos amarelos em volta das colônias, com micélios centrais, na cor cinza ou verde oliva. Esses pigmentos não foram observados no meio AA no presente estudo.

### Estruturas reprodutivas

Em relação à formação de estruturas reprodutivas (conídios) o maior destaque foi para o meio BDA, no fotoperíodo de 12 horas, nas temperaturas de 20 e 25°C. A 25°C, todos os isolados esporularam abundantemente, já a 20°C, apesar de todos isolados terem esporulado, os isolados Esalq1, Esalq3, PR1, PR2 e PC13/36 apresentaram uma produção rara de esporos. Na temperatura de 30°C, sob fotoperíodo de 12 horas, os isolados PR3, PR4 e PC12C produziram poucos esporos. No meio de cultivo BDA, sob luz contínua e temperatura de 25°C, a maioria dos isolados produziu poucos esporos, com exceção dos isolados Esalq1 e PCP6 que produziram apenas picnídios (Tabela 2). Neste fotoperíodo, a 30°C, apenas três isolados produziram picnídios raros, e, para 20°C, seis dos 11 isolados, os demais produziram picnídios vazios. Ainda para o meio BDA, sob o fotoperíodo escuro, entre as três temperaturas testadas, a de 25°C foi a que mais favoreceu a produção de conídios, com quatro isolados esporulando abundantemente (PR3, PC3C, PC12C, PC13/36). Sob 30°C, nenhum isolado produziu picnídios, ocorrendo apenas a formação de hifas. Na temperatura de 20°C, os isolados produziram apenas esporos raros.

Para o meio de cultura aveia-ágar (AA), na condição de fotoperíodo alternado e temperatura de 25°C, semelhantemente ao ocorrido para o meio BDA, todos os isolados esporularam abundantemente, com exceção do PC13/36 que produziu esporos raros. À 20°C, todos os isolados também esporularam, no entanto, raramente, com exceção do isolado Esalq1 que produziu apenas hifas. Ainda neste fotoperíodo, na temperatura de 30°C, cinco dos doze isolados produziram picnídios (Esalq3, PR1, PR2, PR3 e PC1), os demais, apenas hifas. Também no meio de cultura aveia-ágar e sob luz contínua, entre as três temperaturas, a de 25°C foi a melhor, pois houve produção de conídios raros para sete isolados (Esalq2, Esalq3, PR1, PR2, PR3, PR4 e PC3C). Já nas temperaturas de 20 e 30°C, os

isolados produziram apenas hifas e picnídios. Para o fotoperíodo escuro, na temperatura de 20°C, todos os isolados produziram conídios raros, com exceção do isolado Esalq2. Para esse fotoperíodo, na condição de 25°C, apenas quatro dos doze isolados (PR1, PR3, PR4, PC12C) produziram conídios raros e os demais, hifas e picnídios. Na condição de 30°C, apenas três dos doze isolados (PC3C, PC13/36 e PCP6) produziram conídios raros e, para os demais, hifas e picnídios.

Ao contrário do que aconteceu para os meios de cultura BDA e AA, nos diferentes fotoperíodos e temperaturas, nos quais foi observada produção de conídios abundantes ou raros para algumas condições específicas, para o meio CDA, não ocorreu a formação destas estruturas reprodutivas. Contudo, no meio CDA, foi observada a produção de picnídios para todos os isolados nos diferentes fotoperíodos e temperaturas, com exceção do fotoperíodo escuro na temperatura de 25°C, no qual os isolados PC3C, PC12C, PC13/36 e PCP6 formaram apenas hifas. Neste mesmo fotoperíodo, esta situação se repetiu para a temperatura de 20°C (isolados PC3C, PC13/36 e PCP6) e de 30°C (isolados PC12C e PCP6). A formação apenas de hifas também foi constatada na temperatura de 30°C, no fotoperíodo alternado, para o isolado PCP6 e, no fotoperíodo claro, para o isolado PC13/36.

Mendes *et al.* (2005) constataram que, para alguns dos isolados avaliados, a temperatura ótima para a esporulação em meio CDA situou-se em torno de 25°C, enquanto que para outros isolados, esta se situou entre 15 e 20°C. Neste trabalho, a esporulação não foi observada no meio CDA, contudo as temperaturas de 25 e 20°C foram as que mais favorecem a esporulação nos meios BDA e AA.

Segundo os autores, a maior esporulação no meio CDA ocorreu sob a luz contínua e uma esporulação intermediária e rara ocorreu sob condições de fotoperíodo alternado e escuro, respectivamente. Contrapondo-se, neste estudo, todos os isolados avaliados esporularam abundantemente nos meios BDA e AA, à temperatura de 25°C, com exceção do isolado PC13/36, no meio AA.

Segundo Dhingra e Sinclair (1995), o meio de cultura é reconhecidamente um determinante de crescimento e esporulação, sabendo-se que um meio que favoreça a esporulação não necessariamente favorecerá o crescimento micelial. Estes autores ainda afirmaram que meios mais pobres estimulam a esporulação de fungos, fato concordante com os resultados obtidos neste trabalho.

**Tabela 2.** Formação de estruturas reprodutivas assexuadas (conídios) por isolados de *Guignardia citricarpa* sob diferentes condições de cultivo.

Meio de Cultura	Aveia-ágar (AA)									Batata-dextrose-ágar (BDA)								
	Fotoperíodo <sup>1</sup>			Claro			Escuro			Fotoperíodo 12 horas			Claro			Escuro		
	20	25	30	20	25	30	20	25	30	20	25	30	20	25	30	20	25	30
I S O L A D O S	Esalq1		2,16				R			R	2,18					R		
	Esalq2	R	2,48		R					1,08	2,04		R	R		R	R	
	Esalq3	R	2,13		R		R			R	1,89		R	R		R	R	
	PR1	R	2,22		R		R	R		R	1,50		R	R		R	R	
	PR2	R	1,78		R		R			R	1,80		R	R	R	R	R	
	PR3	R	2,38		R		R	R		3,32	2,40	R		R		R	2,33	
	PR4	R	2,17		R		R	R		2,36	2,04	R	R	R		R	R	
	PC3C	R	1,74		R		R		R	2,32	1,60		R	R		R	2,09	
	PC12C	R	2,37				R	R		0,91	2,42	R	R	R		R	1,32	
	PC13/36	R	R				R		R	R	1,60		R	R	R	R	1,85	
PCP6	R	2,32				R		R	1,59	2,37			R	R	R	R		

<sup>1</sup>Fotoperíodos (12h; Claro (claro contínuo); Escuro (escuro contínuo)); <sup>2</sup>Temperatura em graus Celsius (20, 25 e 30°C).

## Conclusão

Este trabalho possibilitou verificar que diferentes meios de cultura, regime de luz e temperaturas podem influenciar na fisiologia de *G. citricarpa*, pois foram identificadas condições específicas que favorecem a produção de massa micelial (meio CDA) ou estruturas reprodutivas (conídios) (meio BDA), sob regime de luz contínua e temperatura de 25°C. Essas informações podem ser utilizadas em estudos posteriores, conforme a necessidade e objetivo do trabalho.

## Agradecimentos

À Profa. Dra. Chirley Glienke, por ter cedido vários isolados. Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

## Referências

- BAAYEN, R.P. et al. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, Saint Paul, v. 92, n. 5, p. 464-477, 2002.
- CARRARO, B.P. et al. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Estado do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. *Acta Sci. Agron.*, Maringá, v. 25, n. 2, p. 269-273, 2003.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. *Basic plant pathology methods*. Boca Raton: Lewis Publisher, 1995.
- FEICHTENBERGER, E. Mancha-preta dos citros no Estado de São Paulo. *Laranja*, Cordeiropolis, v. 17, n. 1,

p. 93-108, 1996.

GONÇALVES, A.M.O. et al. Incidência de *Dilobopterus costalimai* Young e *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, em pomares cítricos no noroeste paranaens. *Acta Sci. Agron.*, Maringá, v. 30, n. 3, p. 321-324, 2008.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Dis.*, Saint Paul, v. 65, n. 12, p. 945-950, 1981.

LUCON, C.M.M.; AGUILAR-VILDOSO, C.A. Estudo do crescimento micelial de isolados de *G. citricarpa* Kiely em diferentes temperaturas e meios de cultura. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 21, supl., p. 390, 1996.

MENDES, D. et al. Aspectos nutricionais e físicos no crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios de *Phyllosticta citricarpa* (*Guignardia citricarpa*), agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. *Summa Phytopathol.*, Jaguariuna, v. 31, n. 4, p. 348-356, 2005.

NUNES, W.M.C. et al. Flutuação populacional de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* em pomares comerciais de citros no noroeste do Paraná. *Neotrop. Entomol.*, Vacaria, v. 36, n. 2, p. 254-260, 2007.

SPÓSITO, M.B. *Dinâmica espacial e temporal da mancha-preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados na cultura dos citros*. 2003. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

Received on September 10, 2007.

Accepted on February 20, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.