

VISUALIZAÇÃO DE CONÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa* INOCULADOS EM FOLHAS DE PLANTAS CÍTRICAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).

Davi Rinaldo, Antonio de Goes, Jaime Maia dos Santos, Andressa de Souza. Agronomia. Departamento de fitossanidade. FCAV-UNESP-Campus de Jaboticabal

A Mancha Preta dos Citros (MPC) é uma doença quarentenária causada por *Guignardia citricarpa* Kiely [*Phyllosticta citricarpa* (Mc Alp.) van der Aa.], a qual afeta praticamente todas as variedades de laranjas doces (*Citrus sinensis*), sobretudo as de maturação tardia. Além dessas, mostra-se igualmente importante em limões verdadeiros (*C. limon*), pomelos (*C. paradisi*) e tangerinas (*C. reticulata*), além do tangor 'Murcott' (*C. reticulata* x *C. sinensis*).

No Brasil, a doença foi descrita em 1980 (ROBBS et al., 1980), porém, foi encontrada na Austrália, por volta de 1895, e na África do Sul, sua primeira constatação deu-se em 1929 (KOTZÉ, 1981). A doença caracteriza-se pela presença de lesões em frutos, depreciando-os para comercialização no mercado interno e, devido às restrições impostas pelos países importadores, praticamente inviabiliza sua exportação. Além da depreciação comercial, provoca a queda prematura dos frutos e eleva substancialmente o custo de produção, dada à necessidade do uso de fungicidas visando o controle desta doença, causando prejuízos em diversas regiões produtoras (GOES, 2002; REIS et al., 2003). Além dos frutos, sintomas da doença podem ser observados em folhas, pecíolo, pedúnculo e em ramos (AGUILAR-VILDOSO, 2002).

Atualmente a MPC encontra-se registrada em sete Estados brasileiros, sendo que em São Paulo sua presença ocorre em praticamente todos os municípios produtores. O controle baseia-se no uso de fungicidas, sendo gastos milhões de dólares anualmente. A MPC caracteriza-se pela produção de diferentes tipos de sintomas, sendo designados mancha dura ou mancha preta, mancha sardenta, falsa melanose, mancha virulenta, mancha trincada e mancha rendilhada (GOES et al., 2000; AGUILAR-VILDOSO, 2002).

A doença pode resultar da presença de duas fontes de inóculo: os ascósporos e os picnidiosporos. Os ascósporos são formados em pseudotécios produzidos exclusivamente em folhas cítricas em decomposição no solo. Tal produção resulta da alternância do molhamento e secamento das folhas. Os picnidiosporos são produzidos nas lesões contidas nos frutos, em folhas aderidas na planta ou caídas no solo, em ramos e em outros diferentes tecidos (KOTZÉ, 1981).

Os picnidiosporos são dispersos pela água até à superfície de órgãos suscetíveis próximos, onde normalmente são formadas infecções (KOTZÉ, 1981; 1988, SPÓSITO, 2003). Segundo BALDASSARI et al. (2001), os frutos cítricos mostram-se suscetíveis por pelo menos 24 semanas, desde a fase de queda das pétalas.

O presente trabalho teve como objetivo visualizar o processo de germinação de conídios de *P. citricarpa* após 40 horas de inoculação mediante o uso de MEV.

Para o preparo do inóculo, foi utilizada uma colônia de *P. citricarpa*, de um isolado sabidamente patogênico, determinado mediante testes prévios. Um disco contendo meio de cultura e colônia do fungo foi transferido para uma placa de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA), sob luz constante e temperatura ambiente de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, durante 25 dias.

A suspensão de conídios foi lavada inicialmente com solução de Tween 20 (0,02%), através de uma boa agitação. Logo após a primeira centrifugação, adicionou-se à suspensão conidial uma solução de sacarose (30g/L). Ao final de três centrifugações, foi adicionado ácido cítrico 0,3% à suspensão, seguindo a metodologia proposta por KIELY (1948), que, em testes prévios mostrou aumentar significativamente a taxa de germinação.

Após 40 horas da inoculação, foram coletados dez disco de 10 mm de diâmetro de folhas destacadas de lima ácida 'Tahiti' e laranjeira 'Valência', os quais foram submetidos aos estudos em microscópio eletrônico de varredura.

No momento que a folha foi coletada, a partir dos locais onde ocorreram a germinação do fungo, foram retirados fragmentos das folhas submetidos a fixação em glutaraldeído a 3% (v/v), em tampão fosfato de potássio 0,5M pH 7,4, por aproximadamente 7 dias. Posteriormente, o material foi lavado em água corrente por cerca de 2 minutos. Em seguida, os fragmentos contendo as estruturas do

fungo foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% (p/v), no mesmo tampão, por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas, como no caso anterior, desidratadas em série gradual de acetona, 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100, 100, 100 secas em secador de ponto crítico, utilizando-se CO₂, metalizadas com liga de ouro-paládio, e electrón-micrografadas em microscópio eletrônico de varredura, operando em 15 KV.

De acordo com as ilustrações verificadas nas micrografias no caso das inoculações em folhas de lima ácida 'Tahiti', foram observados poucos conídios germinados, porém não foi constatado nenhum conídio exibindo o apressório (Figura 1A). Por outro lado, observa-se que na superfície superior das folhas dessa planta denota-se a presença de uma camada compacta de cera (Figura 1B), a qual pode ser um dos fatores que restringiram a germinação dos conídios. De acordo com a literatura (PASCHOLATI, 1996), a superfície das folhas das plantas é composta de cutícula, a qual é composta de cera de cutina. Tais camadas representam a primeira barreira a ser superada pelos patógenos para uma infecção. No caso da lima ácida 'Tahiti', embora isolados de *G. citricarpa* possam ser isolados de folhas e frutos assintomáticos, tal hospedeiro é considerado resistente (AGUILAR-VILDOSO, et al., 2000) ou insensível (BALDASSARI, 2005). Nesse caso, embora a ausência de sintomas possa estar associada a fatores bioquímicos e genéticos, a importância dos mecanismos estruturais não podem ser subestimados.

Nas inoculações em folhas de laranja 'Valência', ainda que contidamente, foi observada a presença de conídios germinados (Figura 1C), dada às características morfológicas observadas. Presume-se que tenha ocorrido o início de formação de apressório (Figura 1D), estrutura essa de grande importância no processo de penetração no hospedeiro.

No caso das inoculações em folhas de laranja 'Valência', um destaque significativo refere-se à ausência de mucilagem na periferia dos conídios germinados, ao contrário daqueles não germinados, cuja presença de mucilagem mostra-se bastante acentuada (Figura 1E). De acordo com literatura (NICHOLSON et al., 1991), as mucilagens estão associadas aos mecanismos de defesa do patógeno, já que restringe a sua dessecação sob condições adversas, ou constitui-se em mecanismos de auto-regulador da germinação, dada à presença de inibidores, especialmente as glicoproteínas, entre outras.

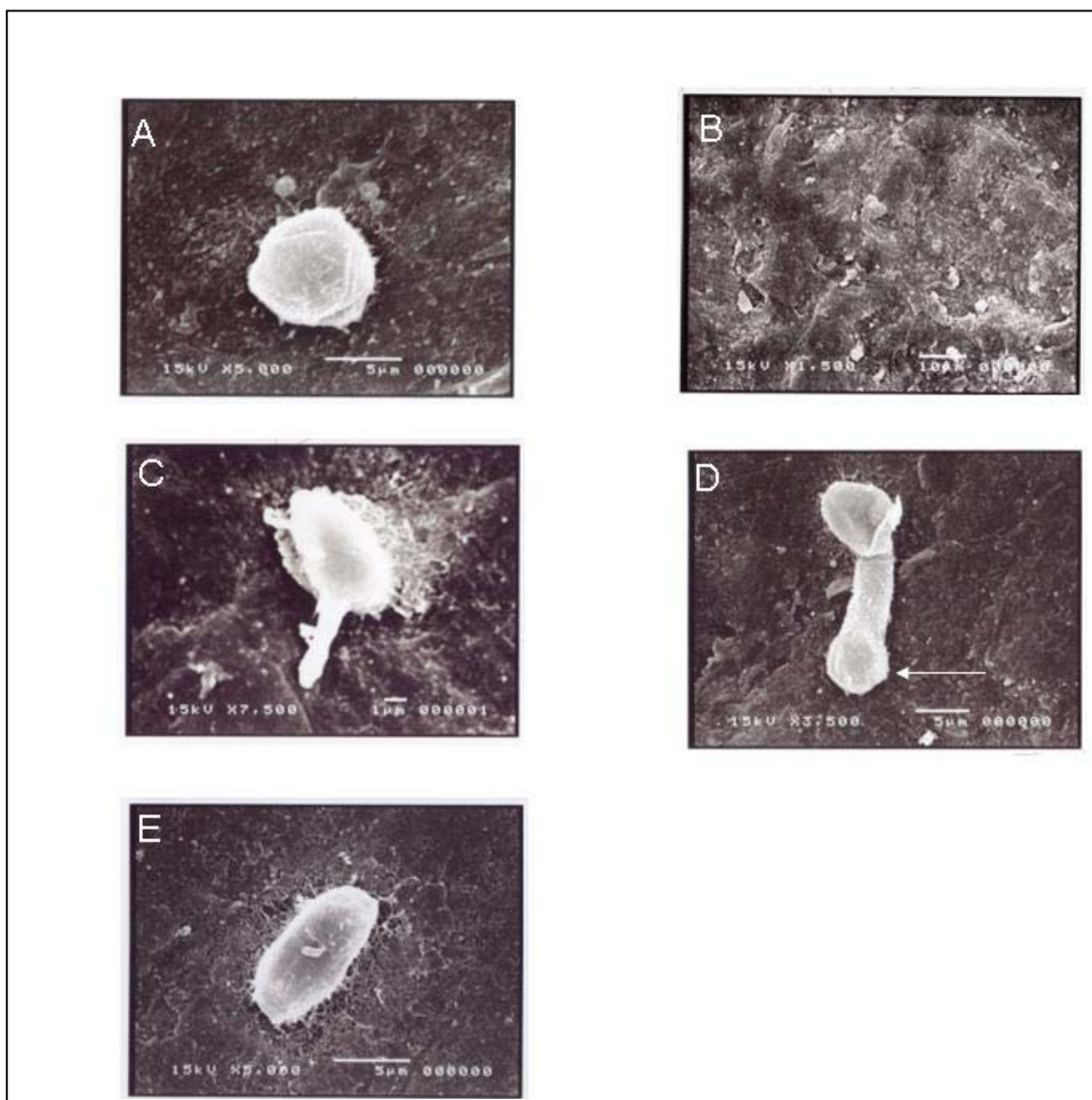


Figura 1. A - Folha de lima ácida Tahiti com conídio de *Phyllosticta citricarpa* não germinado, após 40 horas de inoculação; B - camada compacta de cera de folha de lima ácida Tahiti; C - Folha de laranja 'Valência' com conídio de *P. citricarpa* germinado, após 40 horas de inoculação; D - conídio de *P. citricarpa* germinado e com suposta formação de apressório, em folha de laranja 'Valência' após 40 horas de inoculação; E - conídio de *P. citricarpa* envolto em grande quantidade de mucilagem, sob folha de laranja 'Valência' após 40 horas de inoculação.

Referência Bibliográfica.

- AGUILAR-VILDOSO, C.I. *et. al.* **Manual Técnico de procedimentos da mancha preta dos citros.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, D.F. 72p. 2002.
- BALDASSARI, R.B. **Patogenicidade, morfologia de colônias e diversidade de isolados de *Guignardia citricarpa* e *G. mangiferae* obtidos de *Citrus* spp.** Jaboticabal, 2005. Tese (Doutorado em genética e melhoramento de plantas) 66p. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.
- BALDASSARI, R.B.; GOES, A.; SANTOS J.M. dos; TIMOSSI, A.J. Microscopia eletrônica de varredura de isolados de *Guignardia citricarpa* obtidos de plantas cítricas. **Summa Phytopathologica**, v.27, p. 88-92, 2001.
- GOES, A. de. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 1, p. 9-13, 2002.
- GOES, A. de; BALDASSARI, R.B.; FEICHTENBERGER, E.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; SPÓSITO, M.B. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot (*Guignardia citricarpa*) in Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF CITRICULTURE, 9. Orlando, 2000. **Anais...** Orlando, International Society of Citriculture, p.145, 2000.
- KIELY, T.B.; Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* and its relation to black spot of citrus. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, v.93, p.240-292, 1948.
- KOTZÉ, J. M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v.65, p.945-950, 1981.
- KOTZÉ, J.M. Black spot. In: WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. (Ed). **Compendium of Citrus Diseases**. St. Paul: APS Press, 1988. p. 10-12.
- NICHOLSON, R. L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In: Cole, G. T. & Hoch, H.C. (Ed.).The fungal spore and disease initiation in plants and animals. New York, **Plenum Press**, p.3-23, 1991.
- PASCHOLATI, S. F. Fitopatógenos: Arsenal enzimático. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed., São Paulo. Ed. Agron. Ceres, v.1, cap. 19, p. 343-364, 1995.
- REIS, R.F. dos; GOES, A. de; PEREIRA, G.T. Efeito da aplicação de oxicleto de cobre em diferentes épocas no controle da mancha preta dos citros causada por *Guignardia citricarpa*. **Summa Phytopathologica**, v.29, n. 1, p. 12-18, 2003.
- ROBBS, C.F.; PIMENTEL, J.P. & RIBEIRO, R.L.D. A mancha preta dos frutos cítricos causada por *Phoma citricarpa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 13., Itaguaí, 1980. **Anais...** Brasília, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1980. p. 455.
- SPÓSITO, M. B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados a cultura dos citros.** Piracicaba, 2003. 112p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Bolsa: CNPq / PIBIC