

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Guignardia* sp. DE MANGUEIRA E GOIABEIRA. Andressa de Souza, Antonio de Goes, Ester Wickert, Fernanda Dias Pereira, Davi Rinaldo. - Agronomia - Departamento de Fitossanidade – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

Fungos do gênero *Guignardia* causam importantes doenças em frutíferas. A espécie mais conhecida é *Guignardia citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros, uma importante doença que tem ocasionado grandes perdas de produção na citricultura. Embora *Guignardia citricarpa* seja responsável pela expressão dos sintomas da doença, há uma outra forma do fungo encontrada em tecidos assintomáticos (McOnie, 1964) e classificada como endofítica, designada *Guignardia mangiferae* (Baayen et al., 2002). Sabe-se, porém, que fungos do gênero *Guignardia* podem ser encontrados em outros hospedeiros, como mangueira (*Mangifera indica*) e goiabeira (*Psidium guajava*). Devido à provável coexistência de populações de *Guignardia* endofíticas e patogênicas nesses hospedeiros, conhecimentos acerca dessas populações nas diferentes variedades de citros como também em outros hospedeiros, mostram-se fundamentais para elucidar a estrutura genética das populações e uma possível relação genética estabelecida entre ambas.

O presente trabalho teve por objetivo realizar levantamentos quanto à presença de *Guignardia* sp. em mangueira e goiabeira, bem como distinguir as formas patogênicas e endofíticas deste fungo por meio de testes diferenciais em meio de cultura aveia-ágar e PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para isolados patogênicos.

Para o isolamento foram utilizadas folhas de mangueiras e de goiabeiras, assintomáticas, coletadas aleatoriamente, em dois municípios do Estado de São Paulo. A primeira amostragem de folhas de mangueiras e goiabeiras foi realizada no pomar da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal. A segunda amostragem de folhas de mangueiras foi realizada no município de Conchal, em uma propriedade citrícola e a segunda amostragem de folhas de goiabeiras foi realizada no município de Monte Alto. Foram coletadas 30 folhas por amostra, das quais foram obtidos fragmentos de aproximadamente 5 mm², desinfestados superficialmente e justapostos em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Após 4 a 7 dias, em condição ambiente, as colônias típicas de *Guignardia* sp. obtidas foram repicadas para placas de Petri contendo meio de cultura aveia-ágar. Cada isolado foi repicado para duas placas de Petri, sendo que cada uma representou uma unidade amostral. Apenas os isolados que apresentassem típica pigmentação amarela nas duas repetições, foram considerados patogênicos. Posteriormente, as colônias foram repicadas para tubos contendo meio de cultura líquido BD (batata-dextrose), para que, no estágio adequado de crescimento, os fungos fossem macerados com nitrogênio líquido para extração de DNA. Os isolados foram armazenados em tubos de ensaio contendo BDA, recobertos com óleo mineral esterilizado, para paralisação do metabolismo e preservação das culturas.

Assim, retirou-se a colônia já desenvolvida do frasco contendo meio líquido com o auxílio de peneiras de pequena trama que permitissem a filtragem restando a colônia e dispensando o meio restante. Ainda na peneira, a colônia foi lavada com água destilada e colocada para secar em placas de Petri limpas, em temperatura ambiente por cerca de 24 horas. A extração de DNA baseou-se no protocolo de Kuramae-Izioka (1997), que se mostrou adequada, tanto em termos de tempo necessário para sua realização, quanto no número de extrações realizadas ao mesmo tempo. Posteriormente, a quantificação do DNA e sua qualidade foram realizadas em biofotômetro, medindo-se a absorbância de cada amostra em contraste com uma amostra de água destilada, livre de DNA, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (SAMBROOK et al., 1989). A relação da absorbância entre esses comprimentos de onda deve ser entre 1,7 e 1,9, o que caracteriza um DNA de boa qualidade. A seguir, foram realizadas reações de PCR utilizando-se o par de “primers”, designado GCP1/GCP2 (Blanco, 1999), para amplificação de uma banda exclusiva de isolados patogênicos de *Guignardia citricarpa* com tamanho de 373 pb.

O número de isolados obtidos de folhas assintomáticas de mangueiras e goiabeiras, sua procedência e o número de plantas amostradas encontram-se apresentados na Tabela 1.

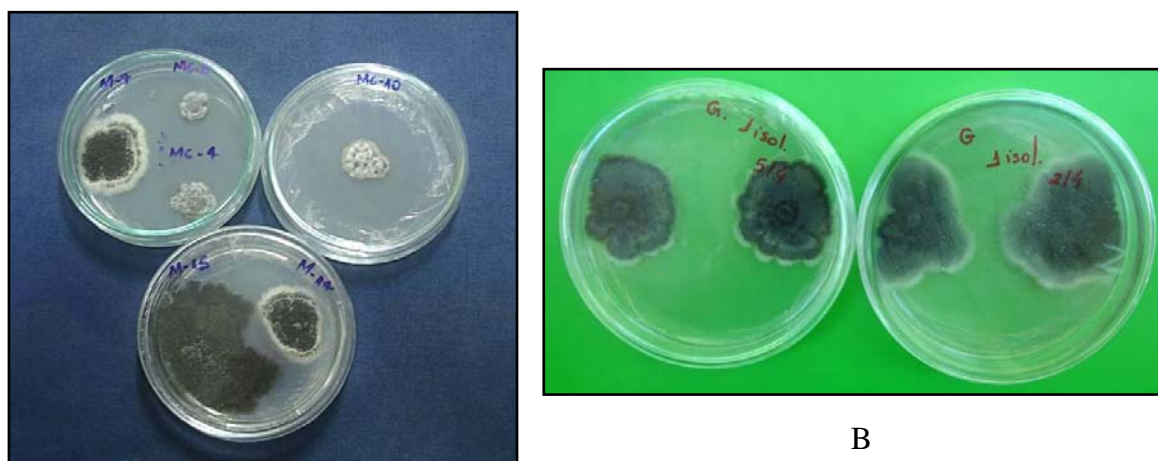
Tabela 1. Procedência, número de plantas amostradas e de isolados obtidos de folhas assintomáticas de mangueira e goiabeira.

Tipo de planta	Procedência	Nº. de plantas amostradas	Nº. de isolados obtidos
Mangueira	Conchal/SP	10	24
	Jaboticabal/SP	10	22
Goiabeira	Monte Alto/SP	50	10
	Jaboticabal/SP	50	24

O número de isolados obtidos de folhas assintomáticas de goiabeiras coletadas no município de Monte Alto foi inferior ao número de isolados obtidos em Jaboticabal. Presume-se que esse menor número de isolados deu-se, provavelmente, devido à coleta ter sido feita em época de poucas chuvas. Observa-se que isolados de *Guignardia* sp. provenientes de tecidos assintomáticos são mais facilmente obtidos em épocas de chuva, pois provavelmente condições de stress hídrico favoreça a redução da população endofítica, levando a uma maior dificuldade para sua obtenção.

Quanto à morfologia das colônias de *Guignardia* sp. oriundas de folhas assintomáticas de mangueiras notou-se que algumas colônias apresentaram coloração cinza, com crescimento muito lento em relação àquele observado nos demais isolados. Alguns isolados apresentaram colônias com bordas de coloração preto, branco e cinza, alternadamente, cujo tamanho das colônias apresentava, em média, a metade daqueles observados nos demais isolados. Adicionalmente foram também observadas colônias com características semelhantes àsquelas observadas em isolados de goiabeiras, com colônia de tamanho superior àquele observado em colônias de outros isolados de folhas de mangueiras em meio BDA (Figura 1A).

As colônias de *Guignardia* sp. provenientes de folhas assintomáticas de goiabeira apresentam coloração verde musgo escuro, com crescimento micelial irregular, de desenvolvimento rápido. As colônias apresentam, geralmente, bordos brancos, não rendilhados, com ausência de invaginações, apresentando características morfológicas semelhantes entre si em meio BDA (Figura 1B). Também foram obtidos 3 isolados de *Guignardia* sp. de tecidos sintomáticos de frutos de goiaba apresentando lesões necróticas, avermelhadas e deprimidas. Esses isolados apresentam características morfológicas semelhantes àsquelas apresentadas pelos isolados de folhas assintomáticas de goiabeira.



A

B

Figura 1. (A) Colônias de *Guignardia* sp. de folhas assintomáticas de mangueira mostrando diferentes características morfológicas em meio BDA. (B) Colônias de isolados de *Guignardia* sp. obtidos de folhas assintomáticas de goiabeira em meio BDA.

O teste do meio aveia-água foi empregado a todos os isolados. Alguns dos isolados obtidos de folhas assintomáticas de mangueira apresentaram colônias com presença de halo de cor amarelo claro (Figura 2A), porém com características diferentes daquele amarelo típico apresentado por isolados caracterizados como patogênicos. No entanto, colônias de outros isolados obtidos de folhas de mangueira não apresentaram nenhum tipo de halo quando em meio aveia-água (Figura 2B). Em ambos

os casos faz-se necessário a realização de teste molecular com o “primer” específico para obtenção de resultados mais conclusivos.

Os isolados de *Guignardia* sp. obtidos de folhas assintomáticas de goiabeira e submetidos ao teste do meio aveia-água não apresentaram nenhum tipo de halo (Figura 2C). Resultados semelhantes foram obtidos mediante testes realizados com isolados provenientes de tecido sintomático de goiaba, não sendo observado a presença de halo em meio aveia-água.

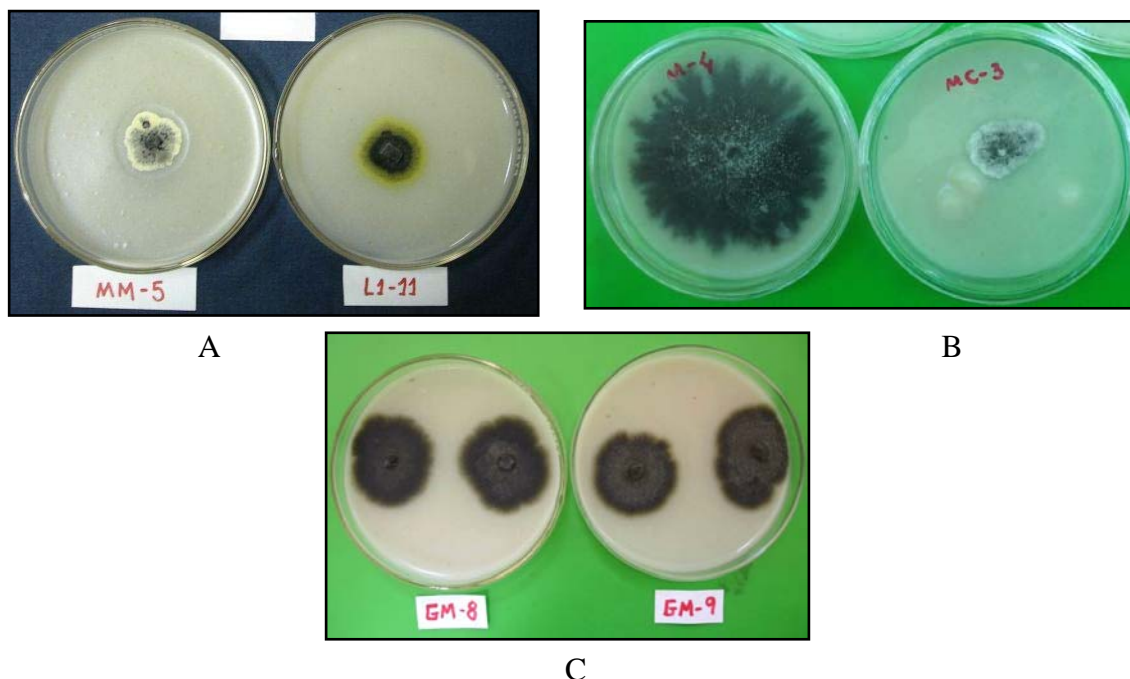


Figura 2. (A) Comparação entre o halo amarelo típico apresentado por isolados patogênicos (L1-11) e o halo amarelo claro apresentado por alguns isolados provenientes de folhas assintomáticas de mangueira (MM-5). (B) Isolados de *Guignardia* sp. provenientes de folhas assintomáticas de mangueira (halo amarelo ausente em meio aveia-água). (C) Isolados de *Guignardia* sp. provenientes de folhas assintomáticas de goiabeira (halo amarelo ausente em meio aveia-água).

O meio de cultura aveia-água foi utilizado por Baayen et al. em 2002 para distinguir os isolados patogênicos e endofíticos de *Guignardia* sp.. Posteriormente, em 2005, Baldassari verificou que os isolados que apresentaram halo amarelo em meio aveia-água mostraram-se patogênicos em testes de patogenicidade a campo. Assim, para fins de comparação com os resultados obtidos em meio aveia-água, os isolados de mangueira e goiabeira foram submetidos à amplificação seletiva com oligonucleotídeo específico para isolados patogênicos de *Guignardia* sp..

Os isolados obtidos de folhas assintomáticas de mangueiras, tanto de Jaboticabal, quanto de Conchal, não apresentaram formação de banda característica dos isolados patogênicos (Figura 3). Em isolados de folhas assintomáticas de goiabeiras e de tecidos sintomáticos de frutos de goiaba, os resultados confirmaram os obtidos em meio aveia-água, pois não apresentaram a formação da banda característica de isolados patogênicos (Figura 3). Entretanto, visando a confirmação do comportamento de cada um dos isolados, os mesmos estão sendo submetidos a teste de patogenicidade a campo.

A formação de uma coleção de isolados provenientes de tecidos assintomáticos de mangueira e goiabeira é um trabalho pioneiro que, baseado nos resultados apresentados pode resultar numa excelente ferramenta de pesquisa para estudos subseqüentes acerca da diversidade genética existente, bem como relacionar geneticamente estes isolados com outros obtidos de tecidos sintomáticos e assintomáticos de citros. Acredita-se que tais resultados se constituirão em elementos de significativa importância no conhecimento do patossistema *Citrus-Guignardia* e talvez contribua à melhoria do controle da doença sob condições de campo. Essa coleção será utilizada em estudos posteriores de estrutura de populações e da interação entre patógenos e seus hospedeiros.

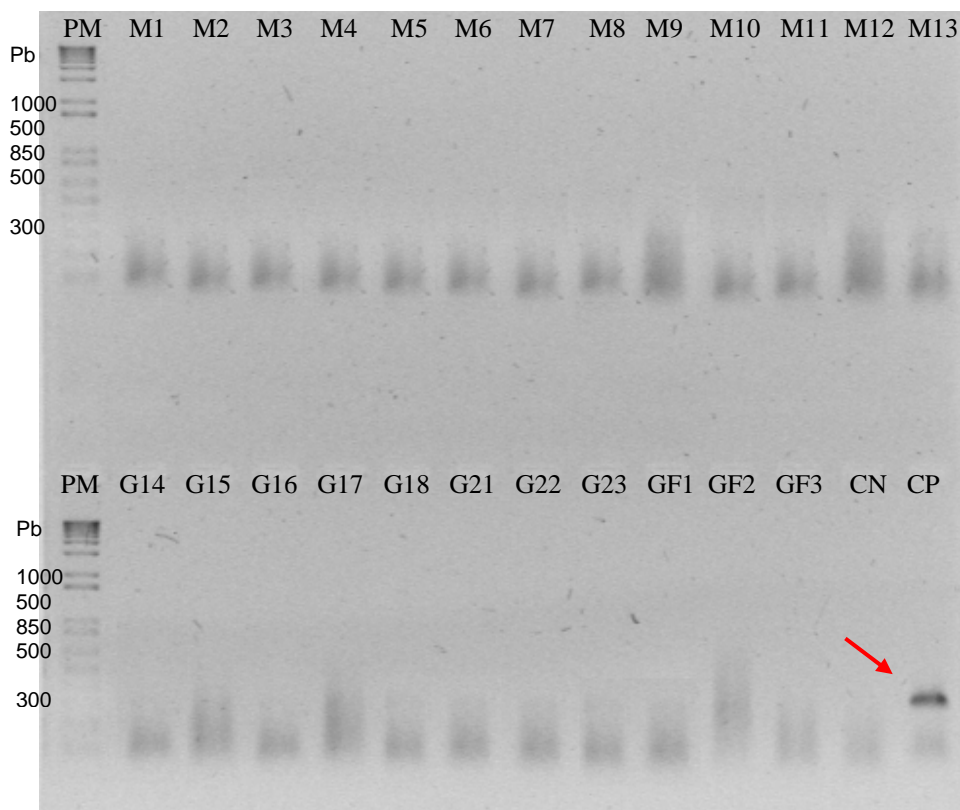


Figura 3. Eletroforese do produto da PCR com GCP1/GCP2 em isolados provenientes de folhas assintomáticas de goiabeira (G), de tecidos sintomáticos de goiaba (GF) e de folhas assintomáticas de mangueira (M) de Jaboticabal, mostrando ausência do fragmento amplificado característico de isolados patogênicos. PM: padrão de tamanho molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). CN: controle negativo. CP: controle positivo (isolado patogênico PI-1.2 oriundo de tecido sintomático de fruto de laranja 'Pêra-Rio').

Referências bibliográficas

- BAAYEN, R. P. et al. Nonpathogenic Isolates of Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa* Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, St. Paul: v.92, p.464-477, 2002.
- BALDASSARI, R. B. Patogenicidade, morfologia de colônias e diversidade de isolados de *Guignardia citricarpa* E *G. mangiferae* obtidos de *Citrus* spp. Jaboticabal, 2005. 66p. **Tese (Doutorado em Produção Vegetal)** – UNESP/FCAV.
- BLANCO, C. G. *Guignardia citricarpa* Kiely: análise genética cariotípica e interação com o hospedeiro. 1999. 200 p. **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba.
- KURAMAE-IZIOKA, E.E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, v.19, p.683-689, 1997.
- MCONIE, K.C. The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogens. **Phytopathology**, v.54, p.40-43, 1964.
- SAMBROOK, J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual, **Cold Spring Harbor**, 2ª ed., New York: Cold Sprig Harbor Laboratory, 1989.

Bolsa: CNPq/PIBIC