

## **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Guignardia* sp. EM EUCALIPTO (*Eucalyptus* spp.).** Fernanda Dias Pereira, Antonio de Goes, Ester Wickert, Adys Gómez Montes de Oca, Andressa de Souza - Agronomia - Depto. de Fitossanidade – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

O eucalipto pertence à ordem *Myrtales*, família *Myrtaceae* e gênero *Eucalyptus* e é uma das principais espécies utilizadas em reflorestamentos comerciais. Em 1999, o Brasil possuía a maior área plantada com florestas de rápido crescimento do mundo, especialmente com os gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* (4.805.930 ha). Desse total, 51,77% da área reflorestada era constituída por *Eucalyptus*. A cultura é responsável por 4,5% do PIB nacional e representa 8% das exportações nacionais, além de assegurar 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, proporcionando o sustento de aproximadamente 10 milhões de brasileiros e desempenhando importante e significativo papel no contexto geral da economia brasileira (Sociedade Brasileira de Silvicultura).

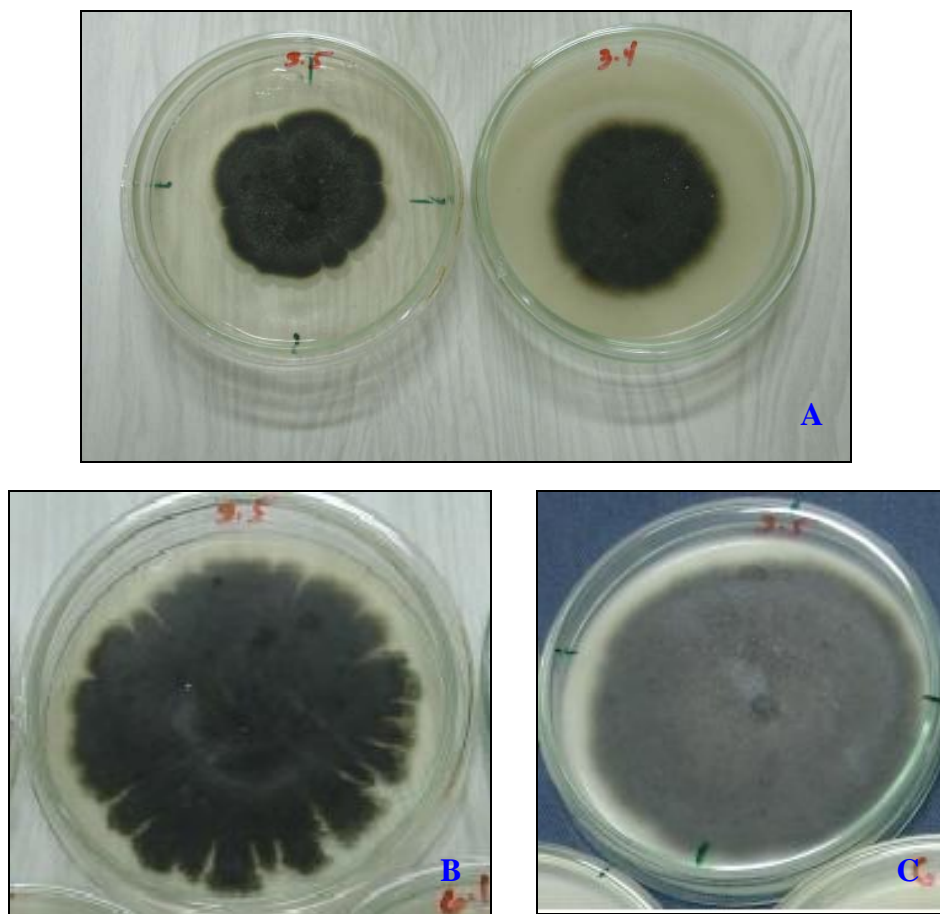
Largamente utilizado para diferentes fins, em função da versatilidade de sua madeira, o eucalipto é amplamente cultivado em propriedades rurais, não sendo raro observar plantas próximas a pomares cítricos. Estudos mostram que o eucalipto pode ser hospedeiro da forma endofítica de *Guignardia mangiferae* (Blanco, 1999; Baayen et al., 2001) e também da forma patogênica do fungo, *G. citricarpa* (EPPO Bulletin, 2003). O fungo *G. citricarpa*, agente causal da MPC (Mancha Preta dos Citros) que causa grandes perdas em produção e produtividade na citricultura brasileira, é de difícil controle, e um dos motivos é possuir uma ampla gama de hospedeiros alternativos. Até o momento, no Brasil, apenas a forma endofítica foi encontrada colonizando eucaliptos, desconhecendo-se assim, a sua importância como hospedeiro alternativo da forma patogênica da MPC. Entretanto, levando-se em consideração que formas endofíticas e patogênicas coexistem em citros, pode haver a possibilidade de o mesmo ocorrer em eucaliptos em função de sua proximidade com pomares cítricos - pois é muitas vezes utilizado como quebra-vento - o que faria do mesmo uma importante fonte alternativa de inóculo e sobrevivência do patógeno.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar quais formas de *Guignardia* spp. são encontradas em eucaliptos, identificando-as através de características morfológicas e fisiológicas em meios de cultura BDA e Aveia-água.

Os isolamentos foram realizados através da deposição de fragmentos de folha de eucalipto (*Eucalyptus* sp.), de 2mm x 2mm, em meio de cultura BDA (batata-dextrose-água), seguido de incubação em estufas para B.O.D., sob fotoperíodo 12/12 h, a 27 °C. Foram obtidas várias colônias, a partir das quais montou-se uma coleção que foi armazenada em óleo. A partir de um dos isolados foi realizada caracterização em meio BDA (batata-dextrose-água) e Aveia-água, onde, após 15 dias de incubação descreveu-se cor e forma das colônias, características do micélio e possível presença de pigmentos amarelos no meio Aveia-água. Além disso, foram realizadas mensurações em 50 estruturas reprodutivas do fungo, representadas por conídios, picnídios, ascos, ascósporos e pseudotécios. Concomitantemente, foi também determinada a dinâmica de crescimento do mesmo isolado, de cujas colônias foram retirados discos de colônia de 5 mm de diâmetro, seguido da sua deposição em placas de Petri, contendo meios de cultura BDA e Aveia-água. As placas foram colocadas em estufas B.O.D., sob fotoperíodo 12/12 h, a 27 °C., durante 15 dias. As medições de diâmetro das colônias foram realizadas alternadamente, a cada 2 dias, sendo tomadas as dimensões em sentidos perpendiculares entre si. Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (2x8x5), correspondente a meios de cultura, número de avaliações e número de repetições. Cada unidade amostral foi representada por uma placa de Petri. Os dados obtidos foram analisados mediante o programa Statistica 6.0, cujas médias foram comparadas mediante o teste de Tukey.

O isolado utilizado para caracterização morfológica apresentou colônias de coloração cinza escura à preta, com bordas irregulares evidentes em meio de cultura BDA, com formação de invaginações bem definidas, desde a área de deposição do disco até a zona da periferia das mesmas. O micélio apresentou-se de aspecto aveludado (Figura 1).

Em meio Aveia-água, as colônias não produziram pigmento de cor amarela, com indicação, portanto, de tratar-se da forma endofítica, como definido por Baayen et al. (2001) e Baldassari (2005), já que a forma patogênica, *G. citricarpa*, caracteristicamente produz colônias com bordas tipicamente amarelas.



**Figura 1.** Colônias de *Guignardia* obtida a partir de folhas de eucalipto, em meios BDA e Aveia-ágar. A: após 7 dias de incubação em meio de cultura BDA (à esquerda) e em meio Aveia-ágar (à direita); B: 14 dias de incubação em meio BDA e C: 14 dias de incubação em meio Aveia-ágar

De acordo com os dados morfométricos obtidos (Tabela 1), o isolado apresentou descrição semelhante à *Guignardia mangiferae*, sendo que suas dimensões concordaram com as realizadas por Sivanessan (1984). Em meio Aveia-ágar o isolado também apresentou características culturais semelhantes às descritas para *G. mangiferae*, (Baayen et al., 2002; Baldassari, 2005). Ilustrações de estruturas reprodutivas do fungo, caracterizando as formas anamorfa (*Phyllosticta capitalensis*) e teleomorfa (*Guignardia mangiferae*), com presença de conídios e ascos/ascósporos, respectivamente, encontram-se na Figura 2.

**Tabela 1.** Dados referentes às características morfométricas das estruturas reprodutivas de isolado de *Guignardia* sp. obtido de folha de eucalipto.

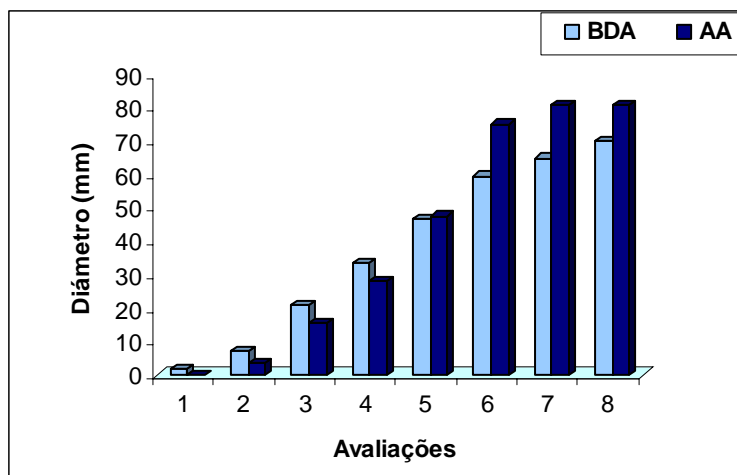
Estruturas	Máximo (µm)		Mínimo (µm)		Média (µm)	
	comprimento	largura	comprimento	largura	comprimento	largura
conídios	20	12	12	8	16	11
corpo	600	280	220	116	392	183
ascos	120	24	72	16	78	19
ascósporos	28	12	20	8	23	10
corpo	280	280	80	80	178	156,66



**Figura 2.** Imagens de estruturas de *Guignardia* sp. obtido de folha de eucalipto, observadas ao microscópio óptico em aumento de 33x60.

De acordo com os resultados de análise estatística verificou-se que houve diferença significativa quanto aos meios de culturas avaliados, número de avaliações e interação meios de culturas *versus* número de avaliações (Tukey,  $P \leq 0,05$ )

Conforme dados apresentados na Figura 3, observa-se que até a 5ª avaliação o tamanho das colônias foi maior no meio BDA. Entretanto, nas avaliações subsequentes, observou-se que o maior tamanho de colônias foi observado em meio Aveia-água. Esta mudança no padrão de crescimento deve-se possivelmente à redução da quantidade de nutrientes disponíveis no meio BDA.



**Figura 3.** Dinâmica de crescimento dos isolados de *Guignardia* sp. a partir de folhas de eucalipto em meios de cultura BDA e Aveia-água, em diferentes períodos de avaliações.

Os resultados obtidos no presente trabalho assemelham o isolado em estudo às características apresentadas por *G. mangiferae*, tanto em termos de características culturais (Kotzé, 2000; Baayen et al., 2002; Baldassari, 2005), como em termos morfológicos (Sivanessan, 1984).

A análise molecular do fungo utilizando primer específico para *G. citricarpa* desenvolvido por Blanco(1999) concordou com o caráter endofítico do isolado em estudo, pois o mesmo não apresentou a banda característica de isolados patogênicos (resultado não mostrado).

Dessa forma, estudos complementares fazem-se necessários para a obtenção de resultados mais abrangentes, utilizando-se um número maior de isolados e técnicas moleculares para melhor inferir sobre a importância de eucalipto como hospedeiro alternativo de *Guignardia* spp.

### **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.** Piracicaba, 1999. 200p. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Guignardia citricarpa*. **EPPO Bulletin** 33 (2), 271-280.
- KOTZÉ, J. M. Black spot. In: **Compendium of Citrus Diseases**, 2<sup>nd</sup> ed..The American Phytopathology Society, St. Paul, MN, 2000.
- SIVANESAN, A. The Bitunicate Ascomycetes and their anamorphs. J. CRAMER 1984. Germany. 701p.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (SBS). Dados estatísticos sobre a produção nacional de eucalipto. <http://www.sbs.org.br>