

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Alan de Oliveira Silva

SOBREVIVÊNCIA EM RAMOS E CONTROLE ALTERNATIVO DE
Phyllosticta citricarpa, AGENTE CAUSAL DA MANCHA PRETA DOS CITROS

Curitiba, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Alan de Oliveira Silva

SOBREVIVÊNCIA EM RAMOS E CONTROLE ALTERNATIVO DE
Phyllosticta citricarpa, AGENTE CAUSAL DA MANCHA PRETA DOS CITROS

Dissertação de Mestrado, na linha de pesquisa Genética de Microrganismos, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Chirlei Glienke

Co-orientador: Dr. Fabrício Packer Gonçalves

Curitiba, 2014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **ALAN DE OLIVEIRA SILVA**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 28 de março de 2014

Doutor Geraldo José da Silva Junior
FUNDECITRUS – Membro Titular

Doutor Fabrício Packer Gonçalves
IAPAR – Membro Titular

Doutora Josiane Aparecida Gomes Figueiredo
FAFIPAR – Membro Titular

Doutora Chirlei Glienke
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Dedico

À minha mãe Maria Hermosa, e minhas tias-mães Maria Nivelinda e Josefa Batista (Nenê). Sem vocês eu não teria chegado até aqui com tanta integridade, respeito e amor próprio. Essa conquista é dedicada a vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por acompanhar cada novo passo com zelo, concedendo a saúde espiritual que muitos precisam e não é encontrada na ciência.

À prof^a Dr^a Chirlei Glienke, por aceitar me orientar e compartilhar generosamente seus conhecimentos, idéias e recursos, oferecendo sempre a sua visão otimista de resultados promissores, tão importante para quem está no caminho, além da agradável e divertida companhia em momentos “off lab”.

Ao Fabrício Gonçalves, por me co-orientar com tanta responsabilidade, dedicação e empolgação.

À prof^a Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro, que como poucas pessoas consegue conciliar um grande profissionalismo didático e científico a uma imagem tão meiga e carinhosa. O mundo precisa de mais seres humanos como você.

À prof^a Dr^a Lygia Terasawa, pela pequena convivência grande em atenção e carinho, e por mostrar que além de competência, o respeito, honestidade, senso de humor e boa postura são diferenciais de um bom profissional.

À colega Lisandra Ferreira, que se tornou uma amiga, uma irmã, responsável por muito do que eu aprendi e por acompanhar de perto alegrias e momentos difíceis da minha vida pessoal, sempre com o conforto de um olhar verdadeiro e uma amizade pura.

Aos colegas de laboratório: Camila Senkiv pelo companheirismo e coleguismo únicos, Daiani Savi pelo exemplo de competência e dicas valiosas, Juliana Marta e Caroline Waculicz por me receberem sempre com atenção e carinho desde o primeiro dia, Eduardo Goulin pelas inúmeras dicas sempre práticas, aos demais colegas Lorena Peña, Angela Ikeda, Josiele Polzin, Aliandra Medeiros, Marcella Cesar, pela agradável convivência e ótimo relacionamento.

Aos meus estagiários Renata Amorim, que hoje é colega de mestrado, suficiente pra atestar sua dedicação e competência, e Paulo Raiser, por oferecer sua valiosa ajuda, sempre com a certeza de um trabalho com excelente qualidade.

Aos estagiários do LabGeM, em especial Desirrê Petters e Marcos Paulo, por doarem um pouco do seu tempo com bastante disposição para ajudar.

Ao Rodrigo Alúzio pelos “meios”. Seu trabalho e sua ajuda tão valiosos são a garantia de um ambiente com um padrão de qualidade e organização fundamentais para chegarmos aos “fins”. Agradeço seu profissionalismo, coleguismo e amizade.

À Ana Paula Chiaverini por cuidar tão bem dos nossos “filhotes” e por estar sempre acessível e disponível a ajudar. Obrigado também pelo carinho e amizade.

Aos colegas de turma de Mestrado, por compartilhar conhecimentos e pela agradável convivência nas disciplinas e conversas de corredor.

Aos professores do Departamento de Genética, por compartilharem conosco um pouco do seu vasto conhecimento e vivência acadêmica e científica, em especial à Profa Dra Lupe Alle, a quem gostaria de salientar minha admiração pela maravilhosa didática, visão crítica e aulas tão ricas para seus alunos.

Ao Departamento de Bioquímica, pelas facilidades concedidas.

Ao Departamento de Genética e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética, por permitirem minha formação e a realização deste trabalho.

Ao IAPAR, pela parceria no uso das suas instalações, viagens e outras facilidades.

Ao Sr. Sebastião, pelo acesso à sua propriedade, sempre com uma forma humilde de valorizar e contribuir com a pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus irmãos de coração Herbert Costa e Jeneson Cruz que contribuíram para que a difícil vinda para Curitiba se transformasse em momentos de alegria, conforto e crescimento pessoal e profissional. Aos valiosos amigos Raphael, Edi, Odair, Daniele, Repka, Benedito, dentre outros, pelo companheirismo e apoio de sempre.

À minha mãe, irmãos e demais familiares, que torcem por mim e vibram junto comigo em cada conquista.

“We must be curious to see if what we see is what we seem to see. We must analyze it, open it up, turn it over, look underneath it, and look behind. The conformist is simply not programmed for this.”

James G. Horsfall

RESUMO

A Mancha Preta dos Citros (MPC) é uma doença que ameaça a Citricultura brasileira, causando lesões em frutos e sua queda prematura em estágios mais severos, levando a prejuízos de produção e rejeição no mercado consumidor. É causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, presente em folhas caídas em decomposição na forma sexuada (ascósporos) e nas lesões dos frutos, em folhas aderidas à planta e ramos secos na forma assexuada (picnidiosporos). O uso de fungicidas sistêmicos ainda é a principal alternativa de controle, mas se depara com os principais problemas do seu uso excessivo como toxicidade ambiental, acúmulo de resíduos nos frutos e seleção de patógenos resistentes. A busca por um controle alternativo pode envolver microrganismos endofíticos de plantas medicinais, uma vez que é conhecido seu potencial biotecnológico e poder protetor da planta hospedeira, mas depende do conhecimento do ciclo infeccioso do patógeno sob vários aspectos. Sabe-se da importância do manejo de ramos secos no controle da doença mas pouco se conhece sobre a participação dos ramos na epidemiologia da MPC. Técnicas tradicionais de isolamento em meio de cultura juntamente com ensaios moleculares têm agilizado o diagnóstico de doenças, oferecendo dados importantes sobre vários patossistemas. Adicionalmente, o uso de microrganismos transformados geneticamente para expressão de uma proteína repórter, como a *green fluorescent protein (gfp)*, trazem uma nova ferramenta para o monitoramento desses microrganismos e entendimento do seu ciclo infeccioso. No presente estudo foram avaliados 128 ramos de área de alta incidência da MPC, pertencentes a quatro estados fenológicos: novo, jovem, velho e seco. O isolamento destes tecidos revelou 1,6% de amostras positivas para *P. citricarpa*, apenas em tecidos de estado fenológico velho, enquanto a extração de DNA direto dos tecidos seguido de PCR espécie específico não revelou a presença do patógeno. Foi avaliada a sobrevivência do fungo patogênico em ramos de citros destacados, pela inoculação de suspensão conidial da linhagem transformante LGMF06-T2 (*gfp*) de *P. citricarpa*. Foi possível recuperar o fungo inoculado dos tecidos após 45 dias da sua inoculação, não sendo recuperado após 90 e 135 dias. A espécie inoculada foi confirmada por microscopia de fluorescência, e este resultado sugere a sobrevivência do patógeno nos ramos por pelo menos 45 dias. Adicionalmente, foi avaliado o efeito do extrato metabólico do fungo endofítico *Diaporthe terebinthifolii* sobre a formação de picnídios de *P. citricarpa* em ramos autoclavados. Fragmentos de 1 cm de ramos autoclavados foram depositados sobre meio ágar-água e em suas laterais foram inoculados fragmentos miceliais do patógeno. Comparou-se o crescimento micelial e formação de picnídios nos ramos tratados com o extrato do fungo endofítico com relação aos ramos não tratados e ramos tratados com fungicida comercial. Observou-se que o extrato reduz a formação de picnídios comparativamente ao controle negativo, apresentando efeito similar ao promovido pelo fungicida. Tais resultados confirmam o potencial do extrato do fungo *D. terebinthifolii* no controle do patógeno *P. citricarpa*.

Palavras-chave: Mancha Preta dos Citros, *Phyllosticta citricarpa*, endófitos, controle alternativo

ABSTRACT

The Citrus Black Spot (CBS) is a threat to the Brazilian Citrus, causing fruit lesions and premature fruit drop in more severe cases, leading to yield losses and fruit rejection in the consumer market. CBS is caused by the fungus *Phyllosticta citricarpa*, which ascospores are the sexual stage, found in decomposing fallen leaves, and pycnidiospores are the asexual stage, present in fruit lesions, attached leaves and dried branches. Systemic fungicides are the main control alternative, but its overuse causes problems like the environmental toxicity, residues accumulation in fruits and also the selection of resistant pathogens. The search of an alternative disease control method may involve endophytic microorganisms of medicinal plants, due to their biotechnological potential and protective power of the host plant, but it is important to know about the infectious cycle of the pathogen. We know the importance of handling dry branches for CBS control but there is a lack of information about this pathosystem, mainly about the influence of branches in the disease epidemiology. The use of traditional isolation techniques coupled with molecular techniques have enhanced the diagnosis of diseases, providing important data on the interaction between the plant and the pathogen. Additionally, the use of genetically transformed microorganisms for the expression of a reporter protein, such as green fluorescent protein (GFP) brings a new tool to understand the pathogen infectious cycle. In the present study, we evaluated 128 branches in area of high incidence of CBS, belonging to four growth stages: new, young, old and dried. The isolation of these tissues showed 1.6% of samples with the presence of *P. citricarpa*, only in branches in old growth stages, while the method used for DNA extraction and PCR directly from the branches tissue did not reveal the pathogen. We also evaluated the fungus survival in detached citrus branches by inoculating a conidial solution of the LGMF06-T2 transformed strain expressing the green fluorescent protein (GFP). The pathogen was reisolated from the branches after 45 days of inoculation, with the *gfp* strain confirmed by fluorescence microscopy. These findings suggests that the pathogen can survive in branches for at least 45 days. Additionally, we evaluated the control effect of metabolic extract of the endophytic fungus *Diaporthe terebinthifolii* over micelial growth and pycnidia formation of *P. citricarpa* in autoclaved branches. Branches fragments (1 cm) were placed on water agar media and mycelium fragments of the pathogen were inoculated on its sides. It was evaluated the micelial growth and pycnidia formation on the branches treated with the the endophytic fungus extract, compared with non-treated branches and branches treated with commercial fungicide. The extract treatment reduced the formation of pycnidia compared to the non-treated branches, and its inhibition was similar to the fungicide treatment. These findings confirm the potential of *D. terebinthifolii* extract in the control of *P. citricarpa*.

Keywords: Citrus Black Spot, *Phyllosticta citricarpa*, epidemiology, disease control, endophytes, alternative control

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA ÁREA DE COLETA. 27
- FIGURA 2 – COLETA E ISOLAMENTO DE MATERIAL VEGETAL DO CAMPO: (A) RAMOS DOS 4 ESTADOS FENOLÓGICOS (DA ESQUERDA PARA DIREITA: NOVOS, JOVENS, VELHOS E SECOS) E (B) SUAS RESPECTIVAS PLACAS DE ISOLAMENTO RECÉM INOCULADAS. 29
- FIGURA 3 – EXPERIMENTO DE SOBREVIVÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS: (A) PLANTAS UTILIZADAS NO EXPERIMENTO, (B) FRAGMENTO DE RAMO INOCULADO COM 100 μ L DE SUSPENSÃO CONIDIAL DO FUNGO EM PLACA DE PETRI COM CÂMARA ÚMIDA. 30
- FIGURA 4 – EXPERIMENTO DE COLONIZAÇÃO DE *Phyllosticta citricarpa*: (A) FOLHA COM 1 INÓCULO, (B) FOLHA COM 2 INÓCULOS, (C) CÂMARA ÚMIDA EM MUDA DE CITROS VAR. 'PERA', (D) FOLHA DESINFESTADA E SECCIONADA APÓS 30 DIAS E (E) FRAGMENTOS DA SECÇÃO 3 EM PLACA DE ISOLAMENTO. 32
- FIGURA 5 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PATÓGENO DO RAMO: (A) PLACA DE ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO RAMO COM CERCA DE 15 DIAS, SETA APONTANDO O FUNGO DE INTERESSE. (B) COLÔNIA DO FUNGO EM MEIO DE CULTURA ÁGAR AVEIA APRESENTANDO HALO AMARELO CARACTERÍSTICO DE *Phyllosticta Citricarpa*. (C) ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DOS PRODUTOS DE PCR ESPECÍFICO PARA *Phyllosticta citricarpa*. 34
- FIGURA 6 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS: (A) CRESCIMENTO MICELIAL EM PLACAS DE ISOLAMENTO APÓS 45 DIAS DE INOCULADO; (B) MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DO MICÉLIO OBTIDO NO ISOLAMENTO CONFIRMANDO SER A LINHAGEM LGMF06-T2 UTILIZADA NO INÓCULO DOS RAMOS. 37
- FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DO FUNGO *Phyllosticta citricarpa* EM PLANTAS DE CITROS 180 DIAS APÓS INOCULAÇÃO EM FOLHAS. (A) FOLHA DESINFESTADA E SECCIONADA, (B) IMAGEM AMPLIADA DA REGIÃO DO INÓCULO (aumento: 10x), (C) FUNGO CRESCENDO A PARTIR DO FRAGMENTO FOLIAR (aumento: 10x), (D) MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE MICÉLIO DO ISOLADO A PARTIR DE FOLHAS; A EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA CONFIRMA QUE O ISOLADO OBTIDO É A LINHAGEM UTILIZADA NA INOCULAÇÃO (aumento: 20x). 39

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 – EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE SINAIS DE *P. citricarpa* EM RAMOS INOCULADOS NA PLANTA: (A) PLANTAS INOCULADAS, (B) RAMOS INOCULADOS COM DISCO DE MICÉLIO DE DO FUNGO E ENVOLVIDOS COM ALGODÃO ÚMIDO (SETA), (C) CAIXA TRANSPARENTE COM SUBSTRATO ESTÉRIL ADAPTADA COM IRRIGAÇÃO E VENTILAÇÃO. 50
- FIGURA 2 – EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE SINAIS DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS DESTACADOS E INOCULADOS COM SUSPENSÃO CONIDIAL: (A) RAMO JOVEM DE CITROS VAR. 'PERA' INOCULADO COM 100 µL DA SUSPENSÃO, (B) PLACA DE PETRI PARA ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS CONTENDO FRAGMENTOS DO RAMO APÓS XX DIAS DE INOCULAÇÃO. 52
- FIGURA 3 – EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE SINAIS DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMO DESTACADO COM MICÉLIO: (A) RAMOS PARAFINADOS E DESINFESTADOS; (B) PLACA DE PETRI CONTENDO RAMO INOCULADO COM FRAGMENTOS MICELIAIS DO FUNGO LGMF06-T2. 53
- FIGURA 4 – EXPERIMENTO DE INDUÇÃO DE SINTOMAS DE *P. citricarpa* EM RAMOS AUTOCLAVADOS: (A) FRAGMENTOS DE RAMOS AUTOCLAVADOS, (B) TRÊS FRAGMENTOS DE RAMO EM PLACA INOCULADOS COM MICÉLIO DO FUNGO, (C) SEPARAÇÃO DA CASCA COLONIZADA PARA EXTRAÇÃO DE DNA. 54
- FIGURA 5 – AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DO FUNGO *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS DE CITROS POR MEIO DE INJÚRIA COM LIXA, 7 E 28 DIAS APÓS INOCULAÇÃO. 56
- FIGURA 6 – EM (A) e (B), RAMOS DE CITROS AUTOCLAVADOS E INOCULADOS COM O FUNGO *Phyllosticta citricarpa* LGMF06-T2 (SETA APONTANDO FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS). EM (C) E (D) MICÉLIO E CONÍDIOS RECUPERADOS DO TECIDO, COMPROVANDO A LINHAGEM INOCULADA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA. 57
- FIGURA 7 – AVALIAÇÕES DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS E CONTROLE ALTERNATIVO DE RAMOS DE CITROS AUTOCLAVADOS E INOCULADOS COM MICÉLIO DE *P. citricarpa* APÓS 7, 14 E 21 DIAS. 58

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS COLETAS DE RAMOS DE CITROS E IDENTIFICAÇÃO DO PATÓGENO POR ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DIRETAMENTE DOS RAMOS. 33

QUADRO 2 – AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE *Phyllosticta citricarpa* EM PLANTAS DE LARANJA VAR. 'PERA' A PARTIR DE FOLHAS. 38

CAPÍTULO 2

QUADRO 1 – TRATAMENTOS REALIZADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES PARA A INDUÇÃO DE LESÕES E PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS DE CITROS. 56

QUADRO 2 – TRATAMENTOS DO EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DE *P. citricarpa* EM RAMOS. 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 MANCHA PRETA DOS CITROS.....	16
3.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	19
3.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS E SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	20
5 SOBREVIVÊNCIA DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> EM RAMOS DE CITROS EM DIFERENTES ESTADOS FENOLÓGICOS.....	23
1 Introdução.....	25
2 Material Biológico.....	26
3 Métodos.....	26
3.1 Avaliação de plantas de região com alta incidência de MPC.....	26
3.1.1 Área de Estudo.....	26
3.1.2 Coleta de ramos.....	27
3.1.3 Análise por isolamento e identificação.....	27
3.1.3.1 Isolamento dos ramos coletados.....	27
3.1.3.2 Identificação dos isolados de <i>P. citricarpa</i>	28
3.1.4 Análise por extração de DNA e PCR direto dos ramos.....	29
3.2 Sobrevivência de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em ramos de citros destacados.....	30
3.3 Sobrevivência de <i>P. citricarpa</i> em mudas de citros.....	31
4 Resultados e Discussão.....	32
5 Considerações Finais.....	41
6 Referências Bibliográficas.....	42
6 CONTROLE DE <i>P. citricarpa</i> UTILIZANDO EXTRATO DE <i>D. terebinthifolii</i>.....	45
1 Introdução.....	47
2 Material Biológico.....	49
3 Métodos.....	49
3.1 Suspensão de conídios de <i>P. citricarpa</i>	49
3.2 Produção de estruturas reprodutivas em ramos de citros.....	49
3.2.1 Ramos inoculados na planta.....	49
3.2.2 Ramos destacados e inoculados.....	51

3.2.2.1 Ramos destacados inoculados com suspensão de conídios.....	51
3.2.2.2 Ramos destacados inoculados com micélio.....	52
3.2.3 Ramos autoclavados inoculados com micélio.....	53
3.3 Inibição do crescimento micelial e formação de picnídios por extrato do fungo endofítico <i>D. terebinthifolii</i>	53
3.3.1 Obtenção do extrato.....	54
3.3.2 Inibição da formação de picnídios de <i>P. citricarpa</i> em ramos.....	54
4 Resultados e Discussão.....	55
5 Considerações Finais.....	60
6 Referências Bibliográficas.....	61
7 DISCUSSÃO GERAL.....	64
8 CONCLUSÕES GERAIS.....	66
9 REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro, representa a maior parte da produção mundial de suco de laranja, gerando empregos diretos e indiretos e respondendo por parte do PIB nacional. O consumo de laranja *in natura* também absorve parte da produção brasileira, sendo menor que 1% a quantidade destinada ao mercado internacional. Desde 1962, quando começaram as primeiras exportações, a citricultura tem contribuído de forma definitiva para com o desenvolvimento do Brasil (NEVES *et al*, 2010).

Pragas e doenças representam uma forte ameaça à citricultura, trazem prejuízos expressivos na produção e são responsáveis pela erradicação de milhões de plantas nos principais parques citrícolas do país. O fungo *Phyllosticta citricarpa* Van der Aa é um fitopatógeno presente em diversos países e que compromete a citricultura brasileira. Ele causa a Mancha Preta do Citros (MPC), responsável por lesões nos frutos que os depreciam comercialmente e reduzem sua aceitação no mercado consumidor. Embora não exerça efeito sobre a qualidade interna do fruto, alguns países caracterizam a MPC como praga quarentenária A1 e proíbem a entrada de frutos com sintomas da doença.

O fungo *P. citricarpa* possui duas fontes de inóculo, os ascósporos que se formam em folhas caídas em decomposição, e os picnidiósporos que se formam nas lesões dos frutos, em folhas aderidas à planta e especialmente em ramos secos. Os ascósporos carregados pelo vento são responsáveis pelas novas fontes de inóculo a curtas e longas distâncias enquanto os picnidiósporos espalham-se com a água e aumentam o desenvolvimento da doença nas plantas ((KIELY, 1948; KOTZÉ, 1981, 1996; SPÓSITO, 2003; SPÓSITO *et al.*, 2007; SILVA-PINHATI *et al*, 2009).

As estratégias de manejo da MPC são: uso de decompositores das folhas caídas, uso do mato na entrelinha de plantio para cobrir as folhas de citros caídas sob a copa das árvores, poda de limpeza de ramos secos, antecipação da colheita, associados ao controle químico com compostos cúpricos e fungicidas sistêmicos (FUNDECITRUS, 2014). Embora conhecido o efeito controlador do manejo de ramos secos, ainda não se sabe por quanto tempo o fungo permanece viável sobre as estruturas da planta e se o fungo pode sobreviver em ramos mais novos.

Embora as estratégias de manejo aumentem eficientemente o controle da doença, o método mais utilizado é o uso do controle químico com fungicidas. Problemas relacionados ao uso de fungicidas são frequentes, como o surgimento de isolados de *P. citricarpa* resistentes a carbendazim (RODRIGUES *et al.*, 2007). Impactos negativos ao ambiente e restrições de ordem pública e econômica estimulam a busca de novas alternativas de controle de doenças, principalmente pela introdução de agentes de biocontrole e de produtos alternativos (BERNARDO e BETTIOL, 2010). Por este motivo vem crescendo o número de estudos com produtos que possam substituir os fungicidas.

Os microrganismos endofíticos podem ser uma alternativa ao uso dos fungicidas. Esses microrganismos vivem nos tecidos das plantas sem causar danos, e podem competir por espaço e nutrientes com os patógenos ou até sintetizando compostos que inibem a herbivoria ou são antagonistas a patógenos, podendo atuar no controle de doenças causadas por bactérias, fungos e nematoides (ESPOSITO E AZEVEDO, 2010).

A transformação genética tem sido explorada extensivamente como ferramenta para mapear genes de fungos necessários para o estabelecimento da interação de patogenicidade com a planta hospedeira (MÜNCH *et al.*, 2011), e o uso da técnica na obtenção de transformantes de importantes patógenos de plantas como o fungo *P. citricarpa*, abre a possibilidade de estudos da função de genes para determinar fatores de patogenicidade (FIGUEIREDO *et al.*, 2010). A adição de genes que expressam proteínas repórteres podem oferecer uma nova abordagem para o monitorar o comportamento de microrganismos pelos tecidos do seu hospedeiro, permitindo observar sua infecção, colonização e sobrevivência.

2. OBJETIVOS

o presente trabalho teve como objetivos: i) avaliar a sobrevivência de transformantes de *P. citricarpa* em ramos de citros destacados; ii) avaliar a presença de *P. citricarpa* em ramos de diferentes estados fenológicos em plantas de *Citrus sinensis*; iii) avaliar o efeito de extratos de microrganismos endofíticos no controle de *P. citricarpa*;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MANCHA PRETA DOS CITROS

A Mancha Preta, Pinta Preta ou 'Citrus Black Spot' foi descrita inicialmente em pomares da Austrália, em 1895, onde causou grandes perdas em frutos de laranja doce, tanto em frutos nos pomares quanto em fase de pós-colheita (SUTTON & WATERSTON, 1966). Hoje é encontrada em inúmeros países da África, Ásia, Oceania, América do Sul e recentemente descrita nos Estados Unidos. No Brasil foi descoberta em 1940 no Estado de São Paulo, mas permaneceu latente durante vários anos, certamente por uma redução temporária do inóculo causada pela eliminação de cerca de 11 milhões de árvores devido à epidemia da tristeza dos citros nas décadas de 30 e 40 (GOES, 1998).

A Mancha Preta dos Citros (MPC) é causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* Van der Aa, fase anamórfica (assexuada) inicialmente descrita e designada como *Phoma citricarpa* por McAlpine (McONIE, 1964). A fase teleomórfica (sexuada) do patógeno foi descoberta por Kiely, em 1948, sendo chamada de *Guignardia citricarpa* Kiely (KOTZÉ, 1981). Em 1964, McOnie descreveu duas variantes do fungo, que ocorriam em citros e com morfologia idêntica, sendo uma patogênica e a outra endofítica, entretanto em 2002, Baayen *et al.* descreveram que a forma endofítica correspondia a uma espécie distinta denominada *Phyllosticta capitalensis* (teleoformo: *Guignardia mangiferae*). Atualmente, sabe-se que a espécie endofítica corresponde ao fungo *P. capitalensis*, entretanto *G. mangiferae* não é a forma teleomórfica associada a *P. capitalensis* (GLIENKE, *et al.*, 2011).

O fungo *Phyllosticta citricarpa*, até então pertencente ao Filo *Ascomycota*, Classe *Dothideomycetes*, Ordem *Botryosphaeriales*, Família *Botryosphaeriaceae*, sofreu uma pequena e importante reclassificação. Após a Declaração de Amsterdã de Nomenclatura Fúngica (HAWKSWORTH *et al.*, 2011) os fungos perderam a nomenclatura dupla e as fases sexuada e assexuada correspondentes passaram a ter apenas um nome. Muitas espécies do gênero *Guignardia* eram relacionadas ao estágio assexual de *Phyllosticta* por estudos culturais e observação da coexistência dos dois estágios em relação próxima no hospedeiro (WULANDARI *et al.*, 2013). Estas mudanças foram fortemente influenciadas por comparações filogenéticas de

sequências de DNA, que trouxeram uma nova abordagem à taxonomia e sistemática da família *Botryosphaeriaceae* durante a última década (CROUS *et al.*, 2006). Comparando a morfologia e filogenia de análise combinada de genes em fungos da ordem *Botryosphaeriales*, Liu *et al.* (2012) observou um Clado de organismos distintos da família *Botryosphaeriaceae*, sugerindo sua inclusão na nova família *Phyllostictaceae*. A distinção foi observada em análise morfológica e multigênica por Slippers *et al.* (2013), juntamente com Wikee *et al.* (2013), e então passou-se a considerar a nova família *Phyllostictaceae*, que acomoda a espécie *Phyllosticta citricarpa*, investigada neste estudo.

O ciclo de vida deste fungo envolve tanto ascósporos, fase sexuada, quanto picnidiósporos, fase assexuada. Tanto ascósporos quanto picnidiósporos têm papel na chegada da doença à planta, mas uma vez atingido o estágio epidêmico, a importância dos ascósporos é destacada sobre a de picnidiósporos (KOTZÉ, 1988). Isso se deve ao fato que os picnidiósporos são frequentemente encontrados em folhas aderidas à planta, na casca dos frutos e principalmente em ramos e galhos secos, são envolvidos por uma mucilagem e não são liberados no ar, assim dependem do orvalho e água das chuvas para serem transportados, sendo então responsáveis pelo agravamento da doença e dispersão para plantas próximas. Os ascósporos, por outro lado, são frequentemente encontrados em folhas caídas em decomposição e possuem uma forma que facilita seu transporte pelo vento, atingindo pequenas e grandes distâncias, sendo então os grandes responsáveis pela instalação da doença e sua disseminação para outras regiões. (KIELY, 1948; KOTZÉ, 1981, 1996; SPÓSITO, 2003; SPÓSITO *et al.*, 2007)

Uma vez instalada, a doença pode ter um estágio de latência e o aparecimento de sintomas ocorrer após 5 a 30 anos, dependendo das condições ambientais e da variedade da planta. Altas temperaturas quando o fruto está maduro ou próximo da maturidade podem favorecer o aparecimento de sintomas (McOnie, 1964). Mesmo infectados, os frutos não perdem suas características organolépticas, uma vez que a doença ataca apenas a casca dos frutos, tendo o mesocarpo como limitação.

De qualquer forma, sua comercialização no mercado de frutas *in natura* é prejudicada, assim como sua exportação, por ser considerada uma praga quarentenária A1 pela União Européia, maior mercado importador da laranja brasileira. Pragas com esta classificação são consideradas inexistentes no país mas

com grande potencial para causar sérios prejuízos econômicos, o que faz com que um único fruto sintomático seja necessário para a devolução de toda a carga. (SCALOPPI, 2006; AGUILAR-VILDOSO *et al.*, 2002).

A existência de frutos de diferentes tamanhos e idades, associados com chuvas frequentes nos períodos de suscetibilidade dos mesmos, proporciona o aumento da doença com grandes variações de um ano para outro (SILVA-PINHATI *et al.*, 2009). Mesmo que os frutos contaminados de uma estação fossem totalmente recolhidos antes do aparecimento de frutos suscetíveis da próxima geração, a presença de galhos secos contaminados traria grande fonte de inóculo para o agravamento da doença e contaminação dos novos frutos. Isso mostra que o bom manejo das plantas, particularmente em relação aos ramos secos, poderia contribuir para minimizar a importância dos picnídios (BALDASSARI *et al.*, 2006).

O uso de fertilizantes nitrogenados e decompositores de folhas, bem como cobrir o pomar com folhagens ou o cultivo de plantas rasteiras nas ruas de plantio e abaixo das copas das árvores podem reduzir a fonte de inóculos por acelerar a decomposição de folhas caídas contendo o patógeno e servir de barreira para a formação e liberação de ascósporos (BELLOTE *et al.*, 2009; BELLOTE *et al.*, 2013).

As chuvas e alternâncias entre períodos secos e molhados foram citadas por Kotzé (2000) como importantes fatores na produção e maturação de ascósporos e uma forte correlação entre quantidade total de chuvas e severidade da doença foi verificada por Reis *et al.* (2009), embora não observada correlação entre a severidade da doença com o molhamento foliar e quantidade de ascósporos.

Com relação à influência de frutos sintomáticos coexistindo com frutos jovens da florada seguinte, Baldassari *et al.* (2006) não detectaram variação na severidade da doença entre pomares de laranja Valência e Natal onde os frutos sintomáticos foram colhidos e não colhidos. Similarmente, Spósito (2004) não verificou supressão da doença com a retirada dos frutos sintomáticos da florada anterior. Além disso, dados mostram que frutos caídos no pomar não foram capazes de infectar folhas caídas embaixo da copa das árvores (TRUTER *et al.*, 2007).

3.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

Em todas as plantas até hoje estudadas foi possível detectar a presença de microrganismos vivendo em seus tecidos. De uma forma simplificada, endófito poderia indicar apenas uma região, nesse caso, endo significa dentro, e fito, planta, de modo que endófito seria um organismo que vive dentro de uma planta. O termo hoje aponta para o tipo de associação formada entre o organismo e seu hospedeiro, assim como ocorre com o termo patógeno, indicando a natureza dessa associação (WILSON, 1995).

Endófitos são em sua maioria bactérias e especialmente fungos que se associam de forma mutualística, sem causar prejuízos para a planta hospedeira. Os microrganismos endofíticos penetram nos tecidos vegetais de seus hospedeiros pelos estômatos e raízes, ferimentos ou cicatrizes, ou ainda através da secreção de enzimas hidrolíticas (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010). Uma vez habitando a planta, recebem abrigo e nutrientes e em troca protegem e aumentam a tolerância da planta a estresses, diminuem a herbivoria e competem com patógenos, reduzindo a incidência de pragas e doenças. Segundo Punja e Utkhede (2003), alguns fungos reduzem o crescimento e desenvolvimento de fitopatógenos por produção de antibióticos, secreção de enzimas, parasitismo, competição por nutrientes e espaço de colonização, interferência nos fatores de patogenicidade e indução de resistência na planta hospedeira.

Fungos associados a plantas são usualmente divididos em cinco grupos funcionais: micorrízicos, patogênicos, epifíticos, saprófitos e endofíticos, sendo que muitos estudos focam em apenas um grupo, enquanto outros consideram as interações entre eles (PORRAS-ALFARO e BAYMAN, 2011). Um microrganismo epifítico pode, eventualmente, ser encontrado dentro de um vegetal; um endofítico, em certas condições, pode tornar-se um patógeno e um patógeno, em determinadas condições, não afeta o seu hospedeiro, podendo ser considerado um endófito (AZEVEDO, 1998). Alguns organismos endofíticos isolados de uma espécie vegetal podem ser patogênicos a outra espécie se introduzidos na sua condição selvagem, visto que a relação de patogenicidade pode representar um momento particular de interação do microrganismo com seu hospedeiro, assim como ocorre com a relação

entre o endofítico e o hospedeiro, onde a variedade do vegetal e as demais condições ambientais, climáticas e fisiológicas contribuem para que tais relações se estabeleçam (SCHULZ & BOYLE, 2005).

É possível obter microrganismos endofíticos em laboratório a partir do isolamento direto dos tecidos vegetais e sua transferência para crescimento em meios de cultura nutritivos, com os devidos cuidados para evitar a contaminação com a microbiota epífita assim como outros contaminantes presentes nas estruturas da planta. Algumas espécies possuem limitações para crescimento em meio de cultura ou são mascaradas por outros microrganismos de crescimento mais acelerado, podendo então ser identificadas por técnicas moleculares, oferecendo uma visão mais realista da comunidade endofítica do hospedeiro (LACAVA *et al.*, 2006).

As plantas que crescem em áreas de grande biodiversidade são propensas a serem hospedeiras de uma ampla gama de endófitos (STROBEL *et al.*, 2004), assim como plantas de habitats especiais, com adaptações à sobrevivência, plantas assintomáticas em meio a outras infectadas por patógenos, plantas que têm sido exploradas pelo seu potencial para uso humano na medicina, e plantas que ocupam uma massa de terras antigas, mais propensas a apresentar endófitos com produtos naturais bioativos (STROBEL, 2003). Assim, o Brasil ainda possui grande potencial na bioprospecção de microrganismos endofíticos com potencial biotecnológico. A exemplo temos a espécie vegetal brasileira *Vochysia divergens* Pohl, popularmente conhecida como Cambará, que está presente nas regiões de planície inundadas do Pantanal Mato-Grossense e apresenta relevância econômica para a população pantaneira. (POTT & POTT, 1994).

3.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS E SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Sempre atribuiu-se às plantas o efeito medicinal das substâncias ativas extraídas em seus chás, quando muitas vezes tais compostos seriam produzidos por microrganismos endofíticos vivendo silenciosamente em seus tecidos. A significância dos fungos como fonte de compostos bioativos foi inicialmente verificada com a descoberta da penicilina a partir do fungo *Penicillium notatum* em 1928, por Alexander Fleming, e a contínua busca por fontes de novas drogas mostrou que os fungos

endofíticos são uma reserva inexplorada e promissora de produtos naturais de enorme variedade química (ALY *et al*, 2010).

Embora a primeira descoberta de endofíticos seja datada de 1904, nas décadas seguintes não se deu muita importância a estes organismos, até a descoberta em 1967 do paclitaxel, eficiente droga antitumoral usada no tratamento de alguns tipos de câncer, inicialmente verificada na planta *Taxus brevifolia* pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, e posteriormente encontrada em outras espécies endofíticas de outros hospedeiros. Tal descoberta abriu margem a uma grande busca por produtos bioativos produzidos a partir de fungos endofíticos. Em sua revisão sobre fungos endofíticos de plantas superiores, Aly *et al* (2010) citam um aumento na publicação de artigos científicos em metabólitos secundários de fungos endofíticos, de 18 artigos entre 2000 e 2001 para 113 artigos entre 2008 e 2009, demonstrando que as pesquisas estão focando na detecção de substâncias antimicrobianas, antiparasíticas e citotóxicas nos metabólitos secundários de plantas que hospedam fungos endofíticos.

Mesmo sendo comprovada a eficiência dos fungos endofíticos como controladores biológicos de fitopatógenos, sabe-se que nem sempre é possível inserir o organismo diretamente no vegetal em estudo, devido à variável relação entre o microrganismo e a planta, influenciada por diversas condições ambientais, climáticas e fisiológicas. O endofítico de uma espécie vegetal pode não estabelecer esta mesma relação com outras espécies e tornar-se inerte ou mesmo patogênico nos tecidos do novo hospedeiro. Faz-se necessário desenvolver protocolos para a obtenção de seus metabólitos bioativos, cuja alternativa vem a ser a fermentação em meio de cultura líquido sob agitação, onde o fungo libera os produtos do seu metabolismo, que são filtrados, separados e testados quanto à eficiência de sua atividade biológica e então utilizados independentemente da presença do organismo vivo do qual foram extraídos.

Na descoberta de novas drogas naturais hoje existe um problema relacionado à redundância química, visto que em certo ponto da busca por novos compostos acaba-se encontrando em diversos organismos e condições compostos semelhantes ou de mesmo princípio ativo. Esta situação tem sido contornada com a criação de estratégias para maximizar a diversidade química de compostos obtidos de cada espécie. Estudos genômicos indicam que certas bactérias e fungos possuem dezenas

de vias para metabólitos secundários que não são expressas sob condições comuns de crescimento em laboratório (PETTIT, 2009). Essas vias podem estar associadas a condições específicas como temperatura, pH, fontes de carbono e energia, e especialmente a competição com outros microrganismos. A padronização de protocolos para a maior e mais eficiente extração de metabólitos vem sendo acompanhada de estudos com culturas mistas de diferentes espécies, na tentativa de ativar vias metabólicas alternativas e aumentar a variedade e rendimento dos produtos metabólicos.

Resultados da fermentação mista envolvem aumento da atividade antibiótica em extratos brutos, aumento no rendimento de metabólitos descritos e não identificados, produção de análogos de metabólitos já conhecidos e indução de vias não expressas para novos constituintes bioativos (PETTIT, 2009). Uma vez que a competição resultante do co-cultivo de microrganismos pode leva-los a produzir moléculas que não produziram se deixados isolados, a cultura fermentativa mista pode ser uma alternativa para a redundância química, na obtenção de novos compostos de efeito inibitório ou para o maior rendimento na produção de compostos de efeito fungicida já utilizados contra fitopatógenos.

Gomes *et al.* (2013) descreveram a nova espécie fúngica *Diaporthe terebinthifolii*, habitando de forma endofítica a planta medicinal *Schinus terebinthifolius*, conhecida como Aroeira Vermelha, cujos extratos metabólicos foram testados por Santos (2013) no controle de *P. citricarpa*. Estes isolados encontram-se depositados na coleção de fungos do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob os códigos LGMB259 (*Microbispora sp.*) e LGMF914 (*Diaporthe terebinthifolii*), onde terão seu potencial biotecnológico e antimicrobiano explorados.

5 SOBREVIVÊNCIA DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS DE CITROS EM DIFERENTES ESTADOS FENOLÓGICOS

Resumo

O fungo *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da Mancha Preta dos Citros, possui em seu ciclo infeccioso ascósporos (forma sexuada) em folhas caídas em decomposição e pycnidiosporos (forma assexuada) em folhas aderidas, frutos e ramos secos. Algumas técnicas de manejo associadas com aplicação de fungicidas sistêmicos são as formas de controle disponíveis, e embora seja conhecida a influência dos ramos secos como fontes de inóculos, pouco se conhece sobre a relação epidemiológica do patógeno com os ramos. O presente estudo investigou a presença de *P. citricarpa* em ramos de diferentes estados fenológicos em área com alta incidência da doença e a sobrevivência do patógeno em ramos destacados. Para avaliar a presença do fungo no campo foram coletados 128 ramos de 4 estados fenológicos previamente definidos: novos, jovens, velhos e secos. Estes ramos foram submetidos a análise por isolamento em meio de cultura BDA e por extração de DNA direto do ramo para PCR espécie específico. Para avaliar a sobrevivência do fungo em ramos destacados foi utilizada a linhagem transformada LGMF06-T2 expressando a proteína *gfp*. Este isolado foi inoculado (100 µL - 10⁵ conídios/mL) sobre ramos destacados de aproximadamente 10 cm de comprimento, que permaneceram em placas de Petri em câmara de crescimento a 25 °C ± 1 e fotoperíodo 12/12h e umidade nas primeiras 72h. A avaliação da sobrevivência do patógeno ocorreu após 45, 90 e 135 dias da inoculação mediante isolamento em meio de cultura BDA e confirmação da espécie inoculada por microscopia de fluorescência. O método de isolamento detectou a presença do patógeno somente em ramos de estado fenológico velho, com uma frequência de isolamento de 1,6%. Não foi possível detectar a presença do patógeno mediante extração de DNA e PCR direto dos ramos. Foi possível recuperar o patógeno após 45 dias da inoculação nos ramos, no entanto não foi possível detectar o fungo após 90 e 135 dias da inoculação. Este resultado mostra que o patógeno sobrevive em ramos por pelo menos 45 dias.

Palavras chave: MPC, *Phyllosticta citricarpa*, epidemiologia

Abstract

The Citrus Black Spot (CBS) is a plant disease caused by the fungus *Phyllosticta citricarpa*. Infections can originate from both ascospores and pycnidiospores. Ascospores are the sexual stage, produced in decomposing leaves, whereas pycnidiospores are the asexual stage, produced in attached leaves, dead twigs and fruits. CBS control is primarily based on the use of fungicides, and although it is known the importance of dried branches as source of inoculum, little is known about the role of dead twigs in this pathosystem. The objective of the present study was to evaluate the presence of *P. citricarpa* in branches of different phenological stages in area of high incidence of CBS disease, and investigate the survival of the pathogen in detached dried branches. To investigate the presence of the pathogen in the field it was collected 128 branches in 4 phenological stages previously determined: new,

young, old and dead. These branches were isolated in PDA medium and subjected to DNA extraction and specific PCR reaction for *P. citricarpa* species. To evaluate the survival of the pathogen in branches, it was used the transformant LGMF06-T2 of *P. citricarpa* expressing the GFP protein. The transformant was inoculated (100 μ L – 10^5 conidia/mL) in branches of approximately 10 cm length and incubated at 25 °C \pm 1 and the photoperiod kept constant at 12h light/12h dark, with an initial wet period of 72h. After 45, 90 and 135 days of inoculation the branches were isolated in PDA medium and the transformant inoculated was confirmed in fluorescent microscope. The isolation of different phenological branches detected the presence of the pathogen only in old branches, with an isolation rate of 1.6%. The pathogen was not detected by DNA extraction and PCR with the method used. The fungus inoculated was isolated from branches after 45 days of inoculation, though it was not observed on isolation plates after 90 and 135 days. This result shows that the pathogen can survive in branches for at least 45 days.

Keywords: CBS, *Phyllosticta citricarpa*, epidemiology

1 Introdução

Dentre as doenças com importância econômica para a cultura de citros no Brasil, podemos destacar a Mancha Preta dos Citros (MPC). Esta doença é responsável por lesões nos frutos, que são depreciados comercialmente e rejeitados pelos mercados importadores isentos da doença, e em estágio mais severo causa queda prematura dos frutos, acarretando prejuízos expressivos na produção.

O fungo *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da MPC, possui duas formas de inóculo: os ascósporos (fase sexuada) que se desenvolvem em folhas caídas em decomposição, e os picnidiósporos (fase assexuada) que se desenvolvem especialmente na casca dos frutos, causando lesões, mas também em folhas aderidas à planta e ramos secos.

A principal forma de controle da doença é a aplicação de compostos cúpricos associados com fungicidas sistêmicos, e algumas técnicas de manejo do pomar podem auxiliar no controle da doença, como deslocamento do mato nas entrelinhas para baixo das copas das árvores, remoção ou decomposição de folhas caídas, irrigação, antecipação da colheita, instalação de quebra-ventos e a poda de limpeza dos ramos (FUNDECITRUS, 2014).

O conhecimento da interação entre a planta e o patógeno é o ponto de partida para a seleção dos métodos mais eficientes de manejo e controle, no intuito de eliminar ou minimizar os danos causados pela presença do microrganismo. Neste sentido é conhecida a importância dos ramos secos como fonte de inóculos da doença (BALDASSARI *et al*, 2006; SILVA-PINHATI *et al.*, 2009; SPÓSITO *et al.*, 2011; FUNDECITRUS, 2014). No entanto, ainda não se sabe se ramos de outros estágios de desenvolvimento são fontes de inóculos. Além disso, pouco se conhece sobre a sobrevivência de *P. citricarpa* em ramos de citros.

A transformação genética de importantes patógenos de plantas como o fungo *P. citricarpa* abre a possibilidade de estudos da função de genes para determinar fatores de patogenicidade (FIGUEIREDO *et al*, 2010). A adição de genes que expressam proteínas repórteres pode oferecer uma nova abordagem para o monitorar o comportamento de microrganismos pelos tecidos do seu hospedeiro, permitindo observar sua infecção, colonização e sobrevivência.

Dessa forma, este estudo tem como objetivo investigar a presença de *P. citricarpa* em ramos novos, jovens, velhos e secos no campo, bem como estudar a sobrevivência da linhagem transformante do patógeno em ramos destacados.

2 Material Biológico

Nos experimentos de inoculação foi utilizada a linhagem transformada LGMF06-T2 de *Phyllosticta citricarpa*, que expressa a proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP) e possui resistência a Glifosinato de Amônio, por conta dos genes *bar* e *gpf*, inseridos com sucesso via Agrotransformação por Figueiredo *et al.* (2010). Essa linhagem foi obtida a partir da linhagem selvagem LGMF06, isolada de lesões da MPC no Estado de São Paulo, Brasil, e que apresenta teste de patogenicidade feito por Baldassari *et. al* (2008).

As espécies fazem parte da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil, estocadas em meios específicos.

3 Métodos

3.1 Avaliação de plantas de região com alta incidência de MPC

3.1.1 Área de Estudo

Em parceria com o Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), que desenvolve trabalhos na região citrícola do município de Cerro Azul – PR, foi selecionada uma propriedade privada com alta incidência de MPC nesse município (latitude - 24°48'34.367" e longitude -49°13'59.576") (Figura 1).

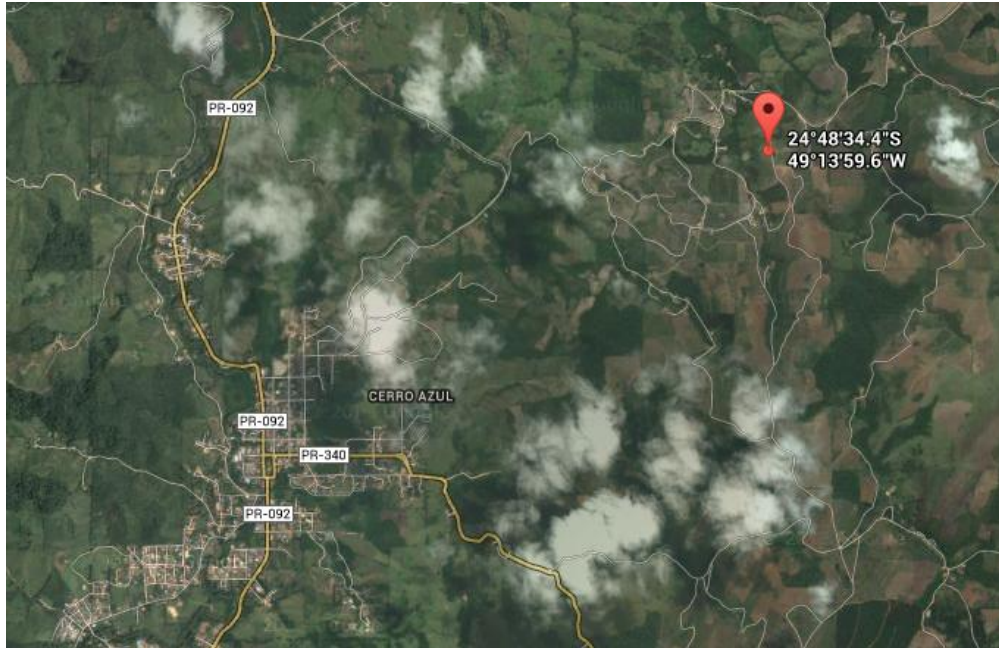


FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA ÁREA DE COLETA.
 Fonte: Google Maps – 2014 (<http://maps.google.com>)

3.1.2 Coleta de ramos

Quatro coletas foram realizadas, nas quais foram retirados 8 ramos de cada estado fenológico previamente definidos: (i) ramo novo (novas brotações, ainda sem botões florais ou frutos), (ii) ramo jovem (ramos adultos com fruto em sua extremidade), (iii) ramo velho (em estágio de secagem, coloração mais escura, com folhas velhas facilmente destacáveis) e (iv) ramo seco (totalmente seco e quebradiço) (Figura 2, A). Foram retirados 4 ramos de cada estado fenológico, sendo dois destinados à análise por isolamento e dois para análise por extração direta de DNA.

3.1.3 Análise por isolamento e Identificação

3.1.3.1 Isolamento dos ramos coletados

Todos os ramos coletados dos diferentes estados fenológicos foram submetidos ao processo de isolamento. Inicialmente foi feita desinfestação dos tecidos para remoção de microrganismos epifíticos, conforme sugerido por Petrini (1992) e com adaptações. Os tecidos foram lavados suavemente em água corrente, submersos em etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio comercial (2% de

cloro ativo) por 3 minutos, novamente em etanol 70% por 30 segundos e por fim em água destilada estéril por 6 minutos, de modo que uma alíquota desta água foi depositada em placa com meio BDA para atestar a eficiência da desinfestação. Após a desinfestação eles foram fragmentados e transferidos para placas de isolamento, então acondicionados em câmara de crescimento a 25°C ±1 e fotoperíodo 12/12h.

Para isolamento dos frutos, as lesões da casca foram retiradas e fragmentadas com bisturi, os fragmentos foram desinfestados e transferidos para placas de isolamento (BDA pH 5.8 + tetraciclina 100µg/mL), acondicionadas em câmara de crescimento a 25°C ±1 e fotoperíodo 12/12h.

Os fungos de interesse quando surgiram no meio de cultura, foram repicados em novas placas e mantidos em estufa para crescimento e identificação.

3.1.3.2 Identificação dos Isolados de *P. citricarpa*

A identificação dos isolados ocorreu por análise de marcador morfológico e por PCR espécie-específico.

A análise de marcador morfológico foi feita pela transferência do fungo para placa de Petri contendo meio Ágar Aveia, sendo que a formação de halo amarelo em meio de cultura com aproximadamente 7 dias de crescimento indica resultado positivo para *P. citricarpa* (BAAYEN *et al.*, 2002).

A reação de PCR espécie-específico foi feita pela amplificação do fragmento genômico GCP, com cerca de 300 pares de base, amplificado pelos *primers* GCP1 (5'AAGTGTGAGTGTCGAAGGTGG3') e GCP2 (5'GACGACTCGCTTTTCTACGGC3') previamente descritos (STRINGARI *et al.*, 2009), cuja detecção caracteriza a presença de *P. citricarpa*, foi amplificado em uma reação contendo 1X de Tampão de PCR, 0,2mM de cada nucleotídeo, 1,5mM de cloreto de magnésio, 0,3µM de cada *primer* e 0,8U de *Taq* DNA Polimerase, com volume final de 20µL e 10 ng de DNA molde. Os ciclos utilizados foram 94°C por 4 minutos, seguido de dois conjuntos de amplificação: um primeiro, de 15 ciclos com 30 segundos a 94°C, 2 segundos (aumentando 2 segundos a cada passo do ciclo) na temperatura de anelamento do *primer* e 16 segundos (aumentando 1 segundo a cada passo do ciclo) a 72°C; e um segundo, de 25 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento do *primer* e 30 segundos a 72°C. Ao fim, um

ciclo único de 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento do *primer* e uma extensão final de 4 minutos a 72°C (ADAMOSKI *et al.*, 2011). A avaliação do resultado da amplificação foi realizada em eletroforese com gel de agarose 1,5%. O DNA utilizado foi extraído de micélio do fungo com o “UltraClean Microbial DNA Isolation Kit”, seguindo protocolo do fabricante.

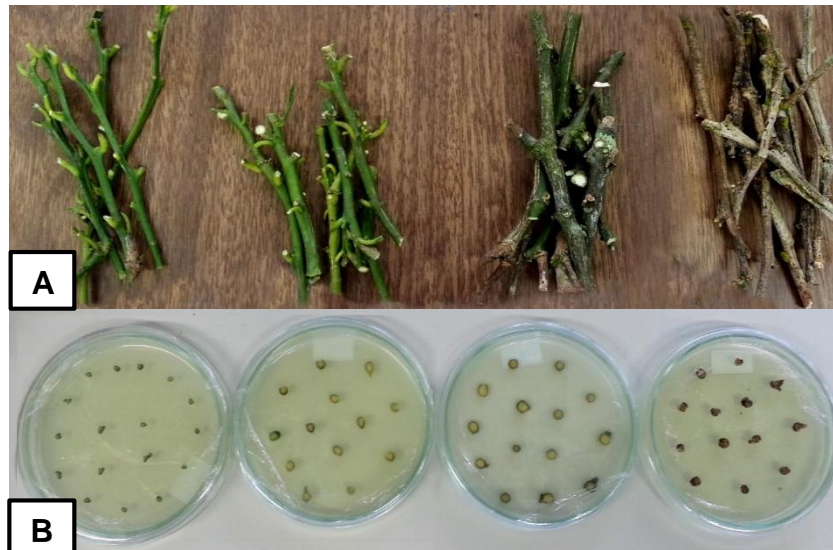


FIGURA 2 – COLETA E ISOLAMENTO DE MATERIAL VEGETAL DO CAMPO: (A) RAMOS DOS 4 ESTADOS FENOLÓGICOS (DA ESQUERDA PARA DIREITA: NOVOS, JOVENS, VELHOS E SECOS) E (B) SUAS RESPECTIVAS PLACAS DE ISOLAMENTO RECÉM INOCULADAS.
 FONTE: O Autor (2013)

3.1.4 Análise por extração de DNA e PCR direto dos ramos

As amostras de ramos foram previamente liofilizadas e maceradas com nitrogênio líquido em cadinho com pistilo. Aproximadamente 8 mg de macerado foi utilizado com o “UltraClean Microbial DNA Isolation Kit”, seguindo o protocolo do fabricante com modificações para folhas (ADAMOSKI *et al.*, 2011). O macerado do ramo foi diretamente adicionado ao “MicroBead Tube”, com a normal adição de “BeadSolution” e “MD1 Solution”. O resultado foi homogeneizado em agitador tipo “vortex” por 10 minutos e mantido em banho maria a 60°C por mais 10 minutos. A segunda modificação ocorreu no passo de adição da “MD2 Solution”, sendo mantida a 0°C, por 5 minutos ao invés de ser incubada a 4°C. O DNA obtido foi amplificado pelos primers GCP1 e GCP2, que revela um fragmento de 300pb específico para *P. citricarpa* (STRINGARI *et al.*, 2009), em gel de agarose 1,5%.

3.2 Sobrevivência de *Phyllosticta citricarpa* em ramos de citros destacados

Para avaliar a sobrevivência de *P. citricarpa* em ramos de citros, foi utilizada a linhagem LGMF06-T2 e oito plantas jovens de laranja var. 'Pera' (Figura 3 – A). Neste experimento, os ramos das oito plantas foram cortados, desinfestados (item 3.1.3.1) e divididos em três partes de aproximadamente 10 cm cada. Sobre esse ramos foi depositado 100 µL de uma suspensão conidial do fungo preparada pela lavagem de placas de crescimento micelial de 15 a 20 dias com 1 a 2 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e inferência em câmara de Neubauer para concentração de 10^5 conídios/mL. Após esta etapa, os ramos foram transferidos para placas de Petri vazias, e mantidos em câmara de crescimento a $25^\circ\text{C} \pm 1$ e fotoperíodo de 12/12h, com umidade nas primeiras 72h mediante adição de algodão embebido em água (Figura 3 – B).

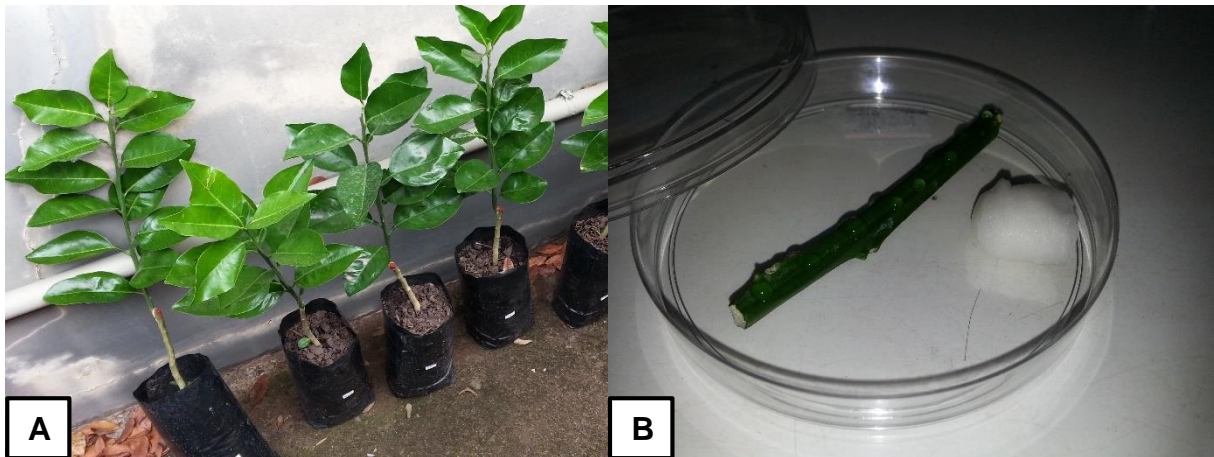


FIGURA 3 – EXPERIMENTO DE SOBREVIVÊNCIA DE CONÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS: (A) PLANTAS UTILIZADAS NO EXPERIMENTO, (B) FRAGMENTO DE RAMO INOCULADO COM 100µL DE SUSPENSÃO CONIDIAL DO FUNGO EM PLACA DE PETRI COM CÂMARA ÚMIDA. FONTE: O Autor (2013).

Após 45, 90 e 135 dias de incubação, os ramos foram fragmentados e transferidos, sem desinfestação prévia, para placas de Petri contendo meio seletivo para a linhagem utilizada (BDA pH 5.8 + glifosinato de amônio 100µg/mL), e incubadas em estufa BOD à temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 1$ com fotoperíodo 12/12h. Os fungos reisolados foram visualizados em Microscópio Olympus UV com filtros Fit C de 488 nm de excitação e emissão de 515 nm, correção de luminosidade automática para fotos óticas convencionais, ISO 200 e exposição de 1 segundo.

3.3 Sobrevivência de *P. citricarpa* em mudas de citros

Para realização deste experimento, foram utilizadas duas mudas de *Citrus sinensis* var. 'Pera' com 6 meses de idade. As folhas das mudas foram previamente desinfestadas, borrifando etanol 70%, seguido de hipoclorito de sódio comercial (2% de cloro ativo) diluído 1:1 e em seguida lavadas suavemente em água corrente. Após secagem, foram marcadas 10 folhas de cada planta, das quais 5 receberam um inóculo sobre a nervura central e 5 receberam dois inóculos de cada lado do limbo foliar (Figura 4 – A e B). Das 5 folhas, 4 receberam solução de conídios e 1 recebeu solução salina 0,85% como controle negativo, totalizando 16 folhas inoculadas e 4 controles. A figura 4 – A mostra a divisão da folha em 5 secções, com a secção 3 representando o ponto dos inóculos. As plantas foram acomodadas em caixa transparente com câmara úmida nas primeiras 72h (Figura 4 – C).

Após 30, 90, 180 e 360 dias da inoculação, foram retiradas 4 folhas inoculadas (2 de cada planta com cada posição do inóculo) e 1 folha controle (inoculada com solução salina). As folhas foram lavadas suavemente, visualizadas em microscópio estereoscópio, em seguida desinfestadas para remoção de microbiota epífita (Item 3.1.3.1) e então cortadas assepticamente em 5 secções, sendo cada secção inclusive o pecíolo fragmentados e transferidos para placas de isolamento. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e fotoperíodo 12/12h. Os reisolados foram repicados em novas placas das quais foram feitas lâminas para visualização em microscópio Olympus UV com filtros Fit C de 488 nm de excitação e emissão de 515 nm, correção de luminosidade automática para fotos óticas convencionais, ISO 200 e exposição de 1 segundo.

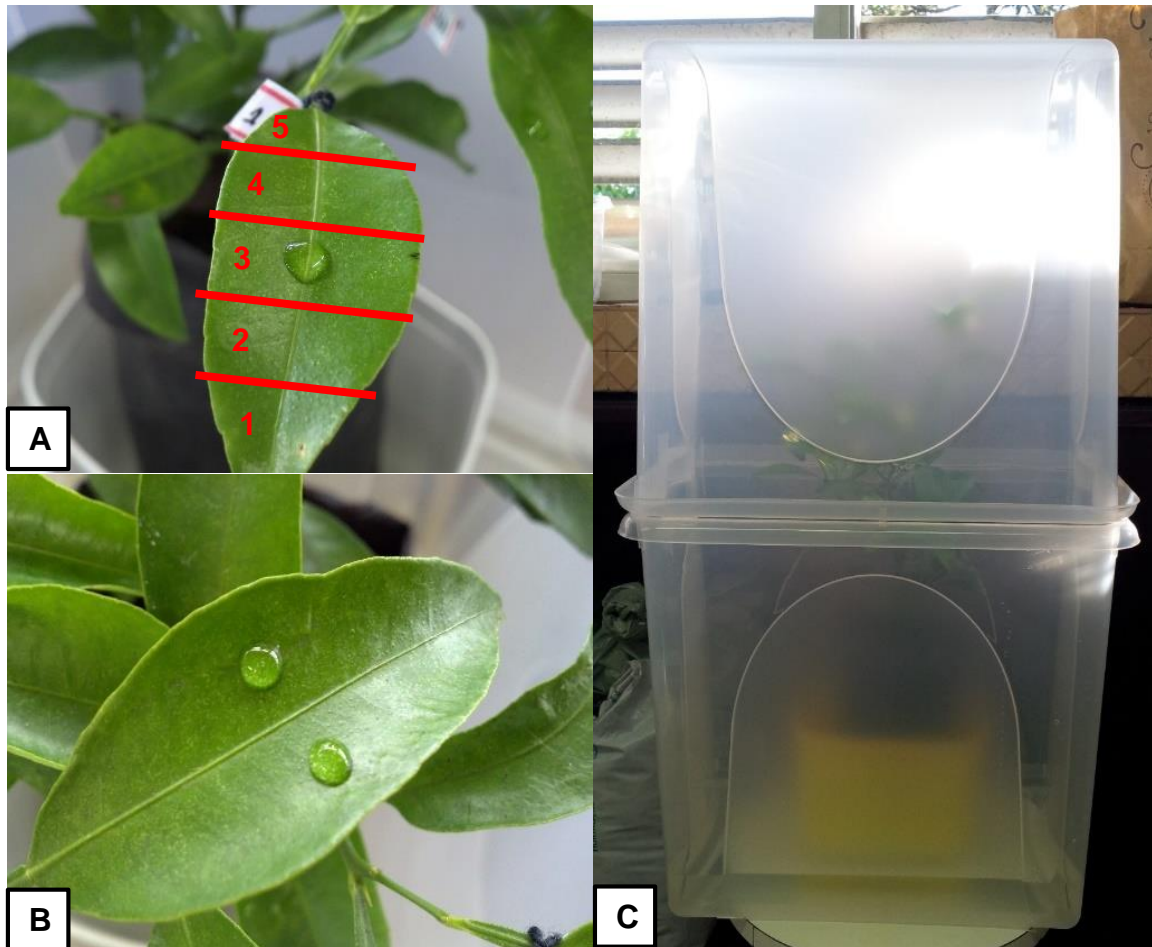


FIGURA 4 – EXPERIMENTO DE COLONIZAÇÃO DE *Phyllosticta citricarpa*: (A) FOLHA COM 1 INÓCULO, (B) FOLHA COM 2 INÓCULOS, (C) CÂMARA ÚMIDA EM MUDA DE CITROS VAR. 'PERA', (D) FOLHA DESINFESTADA E SECCIONADA APÓS 30 DIAS E (E) FRAGMENTOS DA SECÇÃO 3 EM PLACA DE ISOLAMENTO.

FONTE: O Autor (2012)

4 Resultados e Discussão

Na avaliação dos ramos coletados foi possível a detecção do patógeno somente nos ramos de estado fenológico velho (Quadro 1). Apenas o método de isolamento revelou o patógeno, em 2 dos 128 ramos avaliados, totalizando uma frequência de isolamento de 1,6%.

O baixo número de isolados pode estar associado à alta frequência de contaminantes nos ramos de estados fenológicos mais avançados (velhos e secos), que apresentam seus tecidos em decomposição. A incidência de chuvas, especialmente nos períodos que compreenderam a terceira e quarta coletas, podem ter contribuído para esta limitação. Mesmo assim foi possível isolar o patógeno de

ramos em estado fenológico velho, fato não ocorrido em ramos novos e jovens, embora ausentes da mesma contaminação.

Coleta/Mês	Fenologia do Ramo	Nº de Ramos	Isolamento ¹	PCR do Ramo ²
1ª maio/2013	Novo	8	0	0
	Jovem	8	0	0
	Velho	8	1	0
	Seco	8	0	0
2ª junho/2013	Novo	8	0	0
	Jovem	8	0	0
	Velho	8	1	0
	Seco	8	0	0
3ª agosto/2013	Novo	8	0	0
	Jovem	8	0	0
	Velho	8	0	0
	Seco	8	0	0
4ª novembro/2013	Novo	8	0	0
	Jovem	8	0	0
	Velho	8	0	0
	Seco	8	0	0
Total		128	2	0

QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS COLETAS DE RAMOS DE CITROS E IDENTIFICAÇÃO DO PATÓGENO POR ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DIRETAMENTE DOS RAMOS.

¹ Número de amostras em que ocorreu o isolamento de *Phyllosticta citricarpa*.

² PCR espécie específico realizado a partir de DNA extraído diretamente do tecido dos ramos.

Em pomares com alta incidência da doença é conhecido o papel dos ramos secos como fonte de inóculos (BALDASSARI *et al.*, 2006; SILVA-PINHATI *et al.*, 2009; SPÓSITO *et al.*, 2011; FUNDECITRUS, 2014) e a poda desses ramos é uma medida de controle eficientemente comprovada, por isso esperava-se isolar o patógeno a partir de ramos secos. O isolamento dos ramos e a comprovação da espécie *P.*

citricarpa por marcador morfológico em meio de cultura e PCR espécie-específico a partir de DNA extraído de micélio dos isolados estão representados na figura 5.

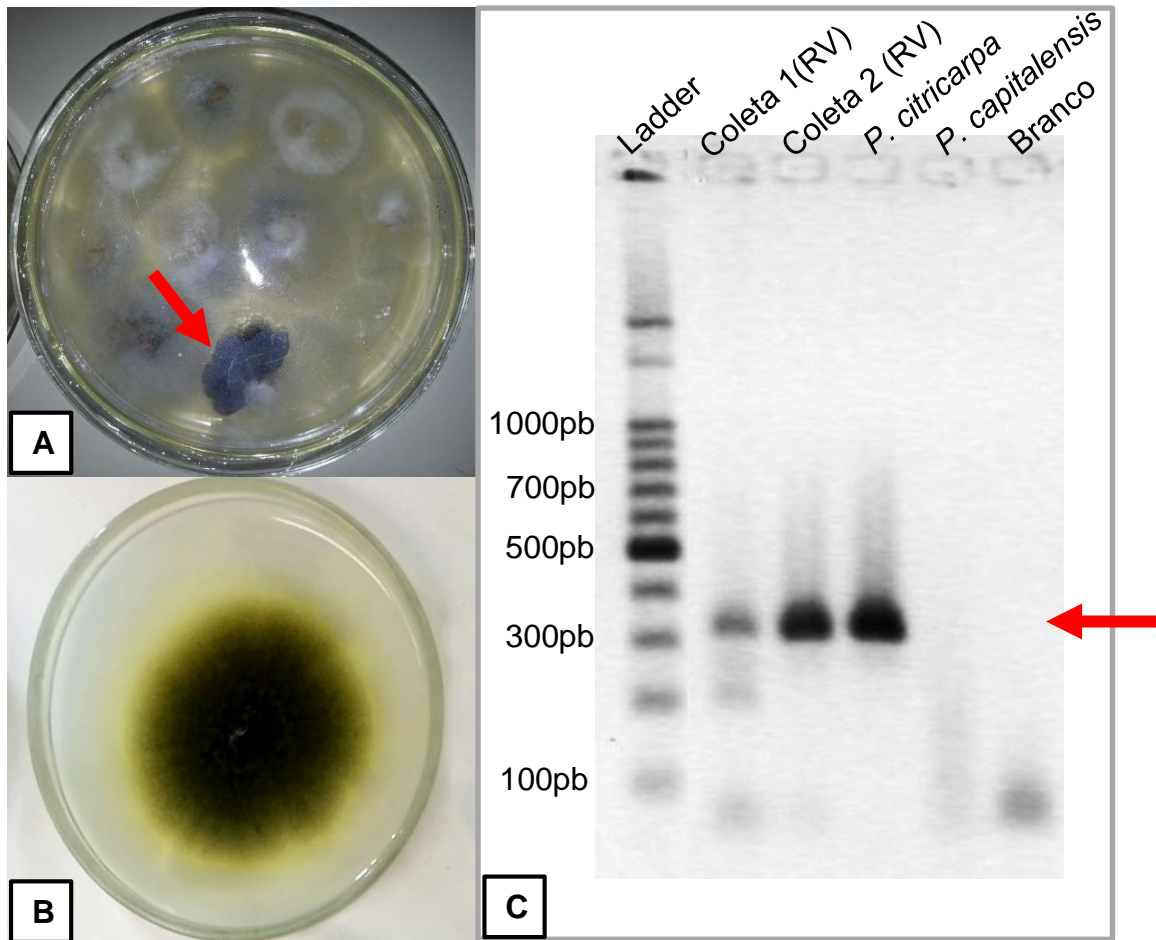


FIGURA 5 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PATÓGENO DO RAMO: (A) PLACA DE ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS DO RAMO COM CERCA DE 15 DIAS, SETA APONTANDO O FUNGO DE INTERESSE. (B) COLÔNIA DO FUNGO EM MEIO DE CULTURA ÁGAR AVEIA APRESENTANDO HALO AMARELO CARACTERÍSTICO DE *Phyllosticta Citricarpa*. (C) ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DOS PRODUTOS DE PCR ESPECÍFICO PARA *Phyllosticta citricarpa* (Seta).

FONTE: O Autor (2013)

NOTA: Coleta 1 (RV): DNA do fungo proveniente da coleta 1, ramo velho; Coleta 2 (RV): DNA do fungo proveniente da coleta 2, ramo velho; Amostra *P. citricarpa* corresponde à linhagem LGMF06 (controle positivo) e a amostra *P. capitalensis* corresponde à linhagem LGMF01 (controle negativo). *Ladder*: Marcador de peso molecular Ladder de 100pb; Branco: Controle negativo sem DNA.

A baixa frequência de isolamento bem como a não detecção do patógeno por PCR espécie-específico a partir de DNA diretamente extraído dos ramos podem estar associados à baixa concentração de inóculo do patógeno nos tecidos avaliados. Em meio de cultura é comprovada a baixa competitividade do fungo

P. citricarpa frente a outros microrganismos, e para a detecção molecular, ensaios conduzidos por Silva (2013) e Pivello (2013) mostraram a necessidade de pelo menos 300 conídios para detecção do patógeno em folhas com DNA extraído por método CTAB. Aqui foram testados 3 protocolos de extração de DNA diretamente do ramo, por kit Mobio®, por método CTAB (MURRAY & THOMPSON, 1980) e por método Raeder & Broda (1985) adaptado por Glienke (1999). Embora os três métodos apresentaram resultado negativo, foi padronizado o método de extração de DNA por kit Mobio® devido sua eficiência na extração de DNA fúngico a partir de micélio e detecção de *P. citricarpa* em folhas de plantas sintomáticas (ADAMOSKI, 2011).

Também foi testada a extração de DNA adicionando ao macerado de ramo 10 µL de suspensão conidial (10^5 esporos/mL) e uma pequena alçada de micélio do patógeno, utilizando o kit Mobio®. Não houve amplificação da amostra contendo esporos, mas houve a presença da banda específica para *P. citricarpa* na amostra contendo micélio. Os conídios de *P. citricarpa* são na maioria bi e trinucleados (GLIENKE, 1995) e a amostra contendo conídios contabilizou cerca de 1000 esporos, quantidade suficiente para atingir a sensibilidade mínima da reação.

Aqui consideramos não apenas a baixa concentração de inóculo, como também a resistência dos conídios aos protocolos de extração de DNA utilizados, sendo necessária a otimização do procedimento para permitir a extração do DNA a partir de estruturas de resistência, facilitando o diagnóstico molecular em tecidos onde não há formação micelial e o isolamento é inviável. A resistência dos conídios de *P. citricarpa* já foi comprovada em estudos prévios com UV-C in vitro (BLANCO, 1999) e na pós-colheita (CANALE *et al.*, 2011). O patógeno é favorecido em campo, mesmo com a alta incidência de luz ultravioleta.

Os conídios não germinam prontamente e requerem condições especiais para iniciar o processo, o qual pode ocorrer até 12h após liberados quando estimulados por extratos de casca de laranja, e após 3 dias têm sua germinação prejudicada ou inviabilizada (KIELY, 1948). Sua taxa de germinação é baixa e reduzida com o passar do tempo, embora tal desvantagem possa ser amenizada pela grande disponibilidade dessa forma de inóculo (MENDES *et al.*, 2005) e pela completa liberação dos conídios até no máximo 21 dias após sua formação nos picnídios (HOTO *et al.*, 2001). Na coexistência de frutos sintomáticos e novos frutos suscetíveis na mesma planta é aconselhável remover os frutos velhos para minimizar as infecções, mas uma vez a

doença atingindo proporções epidêmicas, a importância dos conídios é ofuscada pela importância dos ascósporos (KOTZÉ, 1981). Baldassari *et al.* (2006) também atribuíram aos ascósporos a função no agravamento da sintomatologia de novos frutos, quando não detectaram efeito de frutos velhos sintomáticos na ocorrência de sintomas em frutos novos suscetíveis. Ainda, por serem carregados pela água que dissolve a substância mucilaginosa onde estão protegidos, a infecção por conídios ocorre de forma descendente, e a ausência de maior frequência de frutos sintomáticos nas porções inferiores da planta reforça a maior importância dos ascósporos produzidos nas folhas caídas em decomposição e carregados pelo vento como eficiente fonte de inóculos na instalação e agravamento da doença.

Os resultados obtidos revelam que ensaios mais rápidos baseados em PCR, como a amplificação do fragmento GCP específico para *P. citricarpa*, agilizam o processo de identificação e facilitam a distinção entre espécies, mas necessita do DNA do organismo cultivado, o que nem sempre é possível, devido às diversas e variáveis condições do material em isolamento. Na busca por fungos que habitam tecidos vegetais, Porrás-Alfaro e Bayman (2011) investigam o melhor método entre o isolamento e cultura do microrganismo ou a amplificação direta, a “PCR ambiental”, mas concluem que embora a amplificação direta revele maior número de novas linhagens (em especial as que não crescem facilmente em meio de cultura), a melhor estratégia é combinar ambos os métodos. No diagnóstico de doenças acredita-se que o teste molecular direto do tecido alvo pode agilizar a detecção do patógeno, reduzindo o tempo entre a coleta de amostras e emissão do resultado, para isso removendo etapas, como o cultivo dos microrganismos.

Sabe-se que a espécie endofítica *P. capitalensis* é comumente encontrada habitando folhas de citros e coabitando lesões da Mancha Preta dos Citros. Embora a distinção entre a espécie endofítica e a patogênica seja difícil morfológicamente, o ensaio morfológico com marcador em meio de cultura proposto por Baayen *et al* (2002) mostrou-se eficiente na triagem dos isolados, uma vez que a formação do halo amarelo indica resultado positivo para *P. citricarpa*, embora o resultado positivo não exclua a coexistência do endófito, o que ressalta a importância dos ensaios moleculares.

Ao avaliar o tempo de sobrevivência de conídios de *P. citricarpa* sobre ramos destacados em secagem no presente trabalho, foi possível reisolar o fungo após 45

dias de inoculado (Figura 6). A inspeção visual dos ramos precedente ao isolamento não apontou a formação de micélios, estruturas reprodutivas ou lesões, sugerindo que os esporos permaneceram no ramo assumindo algum estágio de quiescência. A fragmentação sem desinfestação prévia e transferência dos 8 ramos inoculados para meio de cultura seletivo (BDA pH 5.8 + tetraciclina 100 µg/mL + glifosinato de amônio 100 µg/mL) relevou o aparecimento do fungo em 5 ramos inoculados, confirmando que o tecido em secagem pode abrigar o patógeno viável por pelo menos 45 dias, nas condições testadas. Nas duas avaliações seguintes, com 90 e 135 dias, não houve recuperação do fitopatógeno, o que pode estar associado à perda de viabilidade em função do período de tempo prolongado em dessecação.

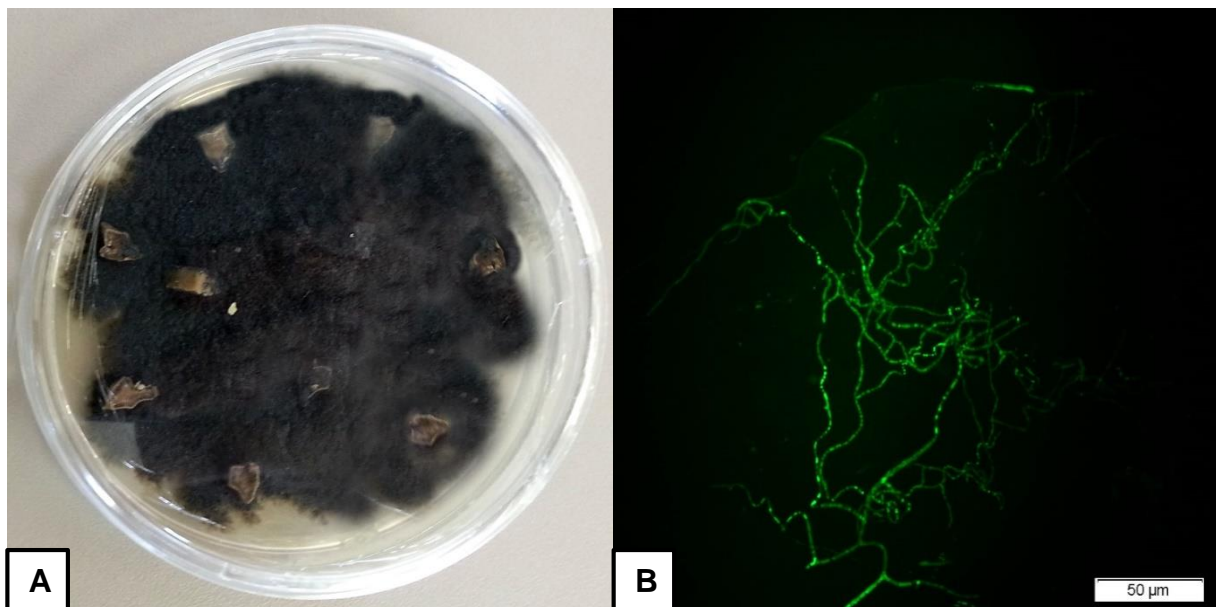


FIGURA 6 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS: (A) CRESCIMENTO MICELIAL EM PLACAS DE ISOLAMENTO APOÓS 45 DIAS DE INOCULADO; (B) MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DO MICÉLIO OBTIDO NO ISOLAMENTO CONFIRMANDO SER A LINHAGEM LGMF06-T2 UTILIZADA NO INÓCULO DOS RAMOS.

FONTE: O Autor (2013)

Comparando o efeito de ascósporos e picnidiósporos sobre novas infecções em plantas assintomáticas, Spósito *et al.* (2011) demonstraram que embora o ascósporo estivesse presente durante o período de suscetibilidade dos frutos numa frequência muito superior à encontrada em áreas endêmicas da doença, apenas os tratamentos com picnidiósporos revelaram novas infecções. Nesse trabalho eles destacam a importância dos ramos secos como a principal fonte de inóculos deste patógeno.

A baixa taxa de germinação imediata dos conídios pode ser uma condição epidemiológica vantajosa a esta fonte de inóculo e mesmo as condições de dessecação podem não representar grande problema, visto que a presença de substância mucilaginosa nas extremidades polares dos conídios minimiza o efeito dessa possível adversidade biológica, especialmente em condições de baixa umidade (MENDES *et al.*, 2005). Estes fatores, associados à sua alta disponibilidade, sugerem que os conídios não tenham um papel tão secundário como citado na literatura e também servem de ponto de partida na elucidação do papel dos ramos no ciclo infeccioso da doença.

Ao investigar a sobrevivência de *P. citricarpa* em mudas de citros, a linhagem LGMF06-T2 foi recuperada no tempo máximo de 180 dias após a inoculação (Quadro 2). A inspeção visual do tecido foliar não apresentou sinais de lesões, formação micelial ou estruturas reprodutivas e a linhagem inoculada foi confirmada por microscopia de fluorescência (Figura 7).

Avaliação	Tempo	Isolamento	Fluorescência
1	30 dias	+	+
2	90 dias	-	-
3	180 dias	+	+
4	360 dias	-	-

QUADRO 2 – AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE *Phyllosticta citricarpa* EM PLANTAS DE LARANJA VAR. 'PERA' A PARTIR DE FOLHAS.
 FONTE: O Autor (2013)

Não se pode descartar a permanência do fungo na planta por tempo superior a 180 dias, visto que aos 90 dias ele também não foi reisolado, sendo necessários novos testes com um maior número de repetições para avaliar tal condição. Nos dois casos positivos, 30 e 180 dias, o sucesso no isolamento apenas a partir do ponto inoculado sugere algum tipo de interação do fungo com a planta e não apenas sua colonização superficial.

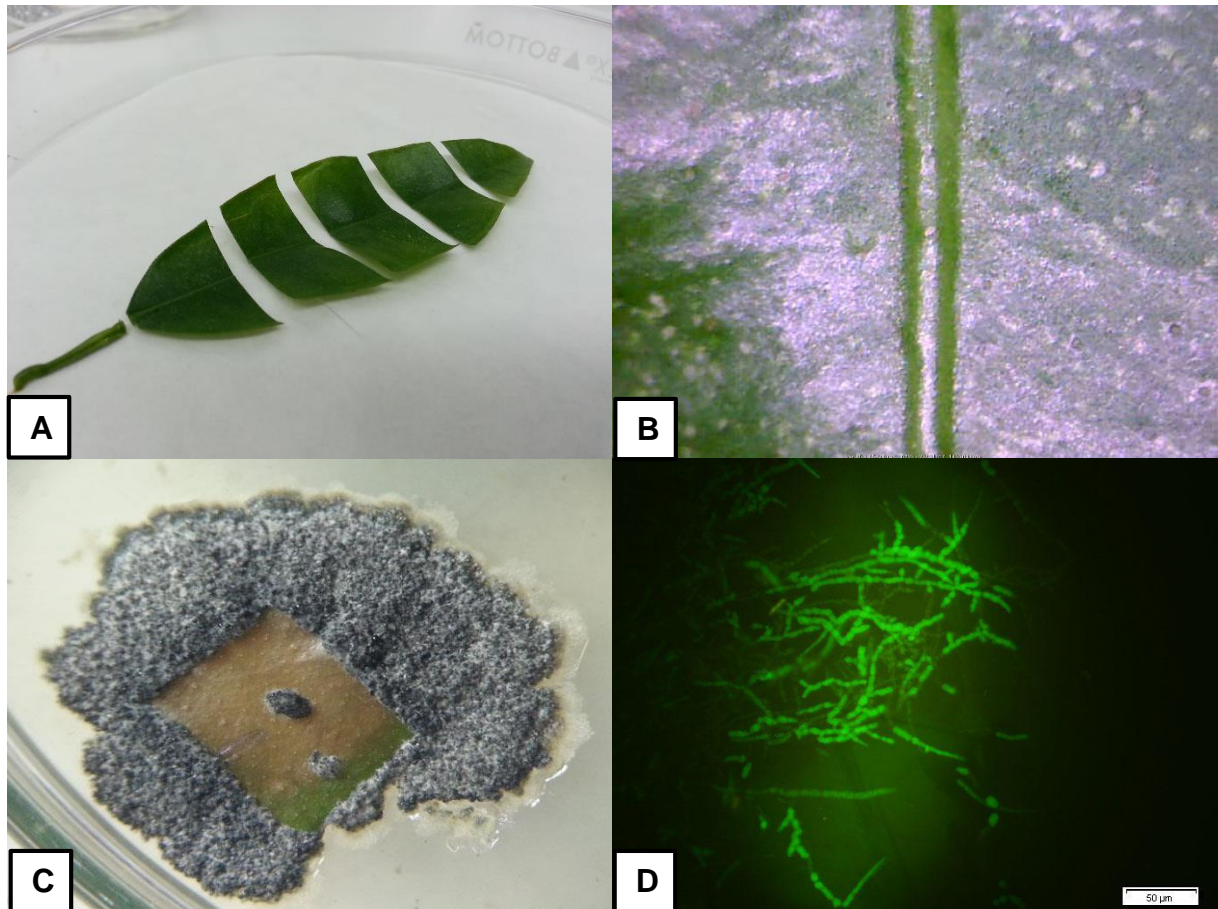


FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DO FUNGO *Phyllosticta citricarpa* EM PLANTAS DE CITROS 180 DIAS APÓS INOCULAÇÃO EM FOLHAS. (A) FOLHA DESINFESTADA E SECCIONADA, (B) IMAGEM AMPLIADA DA REGIÃO DO INÓCULO (aumento: 10x), (C) FUNGO CRESCENDO A PARTIR DO FRAGMENTO FOLIAR (aumento: 10x), (D) MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE MICÉLIO DO ISOLADO A PARTIR DE FOLHAS; A EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA CONFIRMA QUE O ISOLADO OBTIDO É A LINHAGEM UTILIZADA NA INOCULAÇÃO (aumento: 20x).

FONTE: O Autor (2013)

Por outro lado, Santos (2013) obteve sucesso na colonização de plantas de citros por duas espécies de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* (*D. therebinthifolii* e *D. endophytica*), após inoculação de suspensão micelial sobre folhas tratadas previamente com injúria feita com instrumento perfurocortante. Neste experimento, o autor utilizou igualmente linhagens transformadas expressando a proteína vermelha fluorescente *DsRed*, e constatou que as linhagens foram reisoladas de pontos distantes do inóculo e inclusive a partir de folhas não inoculadas na mesma planta. Este resultado revela que a metodologia de inoculação e reisolamento é uma estratégia viável quando o fungo apresenta capacidade de colonização das plantas. Os resultados obtidos no presente trabalho com inoculação de *P. citricarpa* e

reisolamento apenas no local no inóculo, sugerem que ao contrário do que ocorre com fungos endofíticos, este patógeno apresenta quiescência como parte do seu ciclo infeccioso.

Um esporo pode germinar imediatamente após ser liberado ou demorar um tempo até a germinação ocorrer, e a partir daí pode-se passar um tempo até que a relação de patogenicidade ocorra, período considerado como relação parasítica quiescente ou dormente (VERHOEFF, 1974). Quando se trata de frutos, verifica-se nas doenças pós-colheita que os patógenos se instalam no fruto quando ainda no pomar, mantendo-se quiescentes até que um sinal induza a quebra da dormência e a infecção quiescente se torne ativa. Este sinal pode ser um fator constitutivo ou exógeno. Esporos de algumas espécies fúngicas, como *Penicillium digitatum*, têm sua germinação estimulada por elementos voláteis liberados por fermentos, tais como CO₂, etanol, limoneno e acetaldeído (ECKERT e RATNAYAKE, 1994), enquanto outras espécies podem produzir as próprias substâncias reguladoras de quiescência, como ocorre com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (PRUSKY, 1996), mas a regulação da quiescência depende de inúmeros fatores ligados ao patógeno, à planta e às características da interação entre eles.

Os dados obtidos não permitem inferir que tipo de relação foi estabelecida entre o patógeno e a planta, ou se houve germinação, penetração e infecção latente, uma vez que a própria quiescência de um patógeno pode ocorrer em variados estágios. Prusky (1996) descreve mecanismos de quiescência em frutos ao nível de esporos germinados, esporos não germinados, na formação de apressório, no apressório e na penetração da hifa e colonização. Em cada mecanismo, a quiescência é controlada por fatores que vão desde barreiras físicas, substâncias liberadas em fermentos e no amadurecimento, substâncias liberadas por outros microrganismos, requerimento nutricional adequado ou até ativação de fatores de patogenicidade no momento oportuno. A exemplo desta especificidade, Flaishman e Kolattukudy (1994) explanaram o efeito do etileno na indução da formação de apressórios em fungos do gênero *Colletotrichum*. Verificaram que baixas concentrações de etileno, muito inferiores às produzidas durante o amadurecimento de frutos climatéricos, foram suficientes para a germinação e formação de apressórios em esporos em *C. gloeosporioides* e *C. musa*, mas não causou efeito nas espécies que infectam frutos não climatéricos, e confirmaram a adaptação da espécie *C. gloeosporioides* a frutos

que produzem etileno pela ausência de germinação e formação de apressórios desta espécie em frutos não climatéricos como laranja e tomate, e sua indução pela adição de etileno exógeno.

5 Considerações Finais

Com base nas condições testadas e resultados obtidos, o presente estudo permitiu inferir que:

a) Aparentemente o patógeno não está presente em ramos novos no campo, sendo encontrado apenas a partir dos ramos velhos, no entanto necessita-se a avaliação de um número maior de amostras para concluir tal observação. Por outro lado, os resultados mostram que ramos em início de senescência já abrigam o patógeno e tornam-se fontes de inóculos da doença.

b) O fungo sobrevive por pelo menos 45 dias nos ramos.

c) O fungo pode permanecer em mudas de citros sem manifestar sintomas por pelo menos 180 dias.

6 Referências Bibliográficas

- ADAMOSKI, D.; FABRIS, JULIANA; STRINGARI, DANYELLE; BINI, A. P.; GLIENKE, CHIRLEI. Desenvolvimento de Metodologia Eficiente de Diagnóstico Molecular do Fungo Fitopatogênico *Guignardia citricarpa*. 19º Evento de Iniciação científica e 4º Evento de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. **Anais...** v. 0, p.185–185, 2011. Curitiba: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).
- BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN der Aa, H. A.; WEERDT, M. de; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI Jr., W.; de BLANCO, C. G.; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v.92, p. 464-477, 2002.
- BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F. and GOES, A. de. Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p.337-341, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000400002>>. Acesso em: 12/01/2014.
- BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus spp.* **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 103-110, 2008.
- BLANCO, C. G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Piracicaba.** 200p. Tese (Doutorado – área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1999.
- CANALE, M. C.; BENATO, E. A.; CIA, P.; HADDAD, M. L.; PASCHOLATI, S. F. *In vitro* effect of UV-C irradiation on *Guignardia citricarpa* and on postharvest control of citrus black spot. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 6, p. 356-361, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762011000600003>>. Acesso em: 19/02/2014.
- ECKERT, J. W.; RATNAYAKE, M. Role of Volatile Compounds from Wounded Oranges in Induction of Germination of *Penicillium digitatum* Conidia. **Postharvert Pathology and Mycotoxins**, v. 84, n. 7, p. 746-750, 1994.
- FABRIS, J. **Diagnóstico Molecular e distribuição de *Guignardia citricarpa* nos estados do Paraná e São Paulo.** Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FIGUEIREDO, J. G.; GOULIN, E. H.; TANAKA, F.; STRINGARI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; GLIENKE, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 2, p. 143-147, 2010.

FLAISHMAN, M. A.; KOLATTUKUDY, P. E. Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. **Plant Biology**, v. 91, p. 6579-6583, 1994.

FUNDECITRUS. **Doenças e Pragas: Pinta Preta**. 2014. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pintapreta/12>>. Acesso em: 02/03/2014.

FUNDECITRUS. **Doenças e Pragas: Pinta Preta**. 2014. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pintapreta/12>>. Acesso em: 02/03/2014.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v. 31, p. 1-41, 2013. Disponível em: <<http://www.persoonia.org/Issue/31/01.pdf>>. Acesso em: 26/02/2014.

HOTO, F. V.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ROSSI, M. L.; NOGUEIRA, N. L. Acompanhamento do processo ontogênico de picnídios de *Guignardia citricarpa*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.430, 2001. Suplemento apresentado ao 34º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, 2001 – Resumo.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* and its relation to black spot of citrus. **Proc. Linn. Soc. of New South Wales**, v. 73, p. 249-292, 1948.

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

MENDES, D.; REIS, R. F. dos; OCA, A. G. M. de; PEREIRA, G. T.; GOES, A. de. 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 Phytopathologica**, Botucatu, v.31, n.4, p.349-357, 2005.

MÜNCH, S.; LUDWIG, N.; FLOSS, D. S.; SUGUI, J. A.; KOSZUCKA, A. M.; VOLL, L. M.; SONNEWALD, U.; DEISING, H. B. Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 01, p. 43-55, 2011.

PETRINI, O., SIEBER, T.N., TOTI, L. & VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1992.

PIVELLO, M. A. Detecção de *Phyllosticta citricarpa* em folhas e manejo da mancha preta dos citros em limão verdadeiro. 51f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2013.

PORRAS-ALFARO, A; BAYMAN, P. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 49, p. 291-315, 2011.
PRUSKY, D. Pathogen Quiescence in Postharvest Diseases. **Annu. Ver. Phytopathol.**, v. 34, p. 413-434, 1996.

PRUSKY, D. Pathogen Quiescence in Postharvest Diseases. **Annu. Ver. Phytopathol.**, v. 34, p. 413-434, 1996.

RAEDER, U., BRODA, P. Rapid Preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology. v. 1, p. 17-20, 1985.

SANTOS, P. J. C. **Agrotransformação de duas novas espécies de *Diaporthe* e sua aplicação no controle biológico de *Phyllosticta citricarpa***. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SAVI, D. C. Biodiversidade e Bioprospecção de Actinomicetos da Planta *Volchysia divergens* (Cambará). 107f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SILVA, L. F. B. Monitoramento de inóculo de *Phyllosticta citricarpa* e efeito do controle cultural da mancha preta dos citros em pomar de laranja doce. 41f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2013.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha preta dos Citros: Epidemiologia e Manejo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 30, n. 1-2, p. 45-64, 2009.

SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; CZERMAINSKI, A. B. C. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. **Crop Protection**, v. 30, n. 12, p. 1546-1552, 2011.

STRINGARI, D. GLIENKE, C.; CHRISTO, D.; MACCHERONI JR, W.; AZEVEDO, J.L. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the citrus black spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1063–1073, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132009000500002&lang=pt>. Acesso em: 25/02/2014.

VERHOEFF, K. Latent infections by fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 12, p. 99–110, 1974.

6 CONTROLE DE *P. citricarpa* UTILIZANDO EXTRATO DE *D. terebinthifolii*

Resumo

A Mancha Preta dos Citros (MPC), causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, é responsável por lesões nos frutos e sua queda prematura em estágios mais severos, ocasionando perdas de produção e rejeição nos mercados consumidores. A principal forma de controle da doença ainda é o uso de fungicidas sistêmicos. No entanto, estes acarretam danos à saúde humana e ao meio ambiente. Uma alternativa ao uso de fungicidas é a utilização de microrganismos endofíticos e seus extratos. O fungo endofítico *Diaporthe terebinthifolii* exibe potencial para o controle de doença de plantas. Desta forma o objetivo do presente trabalho é avaliar *in vitro* do extrato metabólico de *D. terebinthifolii* no controle de *P. citricarpa*. Para isso, foram utilizados fragmentos de 1cm de ramos autoclavados depositados em meio de cultura ágar-água. Em seguida foram inoculados 2 fragmentos miceliais do patógeno ao lado dos ramos autoclavados e na sequência foram aplicados os tratamentos a seguir: (i) aplicação do extrato; (ii) reaplicação do extrato com 7 e 14 dias; (iii) fungicida Derosal®; (iv) controle do solvente Metanol absoluto; (v) controle negativo, sem aplicação. O volume aplicado nos tratamentos foi de 50 µL, sendo a dose do extrato de 10 mg/mL e a do fungicida de 5 µg/mL. Cada tratamento foi composto por 3 repetições (placa de Petri) contendo três ramos cada. As avaliações foram realizadas nos intervalos de 7, 14 e 21 dias. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento a 25 °C ± 1 com fotoperíodo de 12/12h. O extrato reduz a formação de picnídios sobre os ramos comparativamente ao controle negativo. Além disso, o efeito do extrato foi similar ao observado com o uso do fungicida. Não houve efeito do tratamento com reaplicação do extrato. O solvente não mostrou efeito na redução da formação de picnídios. Nossos resultados mostraram que o extrato do fungo endofítico *D. terebinthifolii* tem potencial no controle de *P. citricarpa*.

Palavras-chave: MPC, *Phyllosticta citricarpa*, endófitos, controle alternativo

Abstract

The Citrus Black Spot (CBS), caused by the fungus *Phyllosticta citricarpa*, is responsible for lesions and premature fruit drop in more severe stages, causing yield losses and rejection of fruits. CBS control is primarily based on the use of systemic fungicides. Even though, they may cause damages to human health and the environment. The use of endophytic fungi and their metabolic extracts has been an alternative to fungicides in controlling plant diseases. The fungus *Diaporthe terebinthifolii* shows a good biological control over *P. citricarpa*. The aim of this study was to evaluate *in vitro* control of the metabolic extract of *D. terebinthifolii* over *P. citricarpa*. For this, 1 cm fragments of autoclaved branches were placed on Petri dishes with water agar medium. Two micelial fragments of the pathogen were inoculated on the medium, on both sides of the autoclaved branches. The branches inoculated were treated as following: (i) extract application; (ii) extract reapplication after 7 and 14 days; (iii) Derosal™ fungicide application; (iv) Methanol p. a. application; (v) Negative control,

without any application. The five treatments had three repetitions (3 Petri dishes with 3 branches fragments each) and it was used a volume of 50 μ L of each substance application. The evaluations were conducted after 7, 14 and 21 days of inoculation and the experiment was carried at 25 °C \pm 1 with constant photoperiod of 12h light/ 12h dark. The extract reduced the pycnidia formation on the branches compared to the negative control. The extract effect was similar to the fungicide. The treatment with extract reapplication showed no difference compared to the single application. The treatment with solvent methanol did not reduce the pycnidia formation. These results show that the extract of the endophytic fungus *D. terebinthifolii* has potential in controlling *P. citricarpa*.

Keywords: CBS, *Phyllosticta citricarpa*, endophytes, alternative control

1 Introdução

A Mancha Preta dos Citros (MPC) é uma doença causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, que causa lesões nos frutos depreciando-os comercialmente e em estágios mais severos provoca queda prematura dos frutos, causando perdas na produção. O fungo possui os dois tipos de reprodução, sexuada por meio de produção de ascósporos, presentes em folhas em decomposição entre 40 a 180 dias após caírem no chão (KOTZÉ, 1981), e a reprodução assexuada, por meio de produção de conídios, presentes em folhas aderidas à planta, pecíolos, espinhos, frutos infectados e ramos secos (BALDASSARI *et al.*, 2006).

Medidas como remoção da vegetação nas entrelinhas de cultivo, sendo direcionada para baixo da copa das plantas, remoção ou decomposição de folhas caídas, irrigação e instalação de quebra-ventos podem auxiliar no controle da doença (FUNDECITRUS, 2014). Tais práticas de manejo reduzem a queda de folhas ou aceleram sua decomposição no solo, impedindo a formação e liberação dos ascósporos, que são transportados pelo vento. Uma vez instalada a doença, são os conídios carregados pela água que agravam os sintomas na planta e suas vizinhas, de modo que a antecipação da colheita e poda de limpeza dos ramos representam práticas úteis na redução desse tipo de inóculo (FUNDECITRUS, 2014).

No Brasil, o controle da doença baseia-se na aplicação de fungicidas protetores, sistêmicos ou a mistura deles, associados a óleos minerais ou vegetais, de modo que suas concentrações e épocas de aplicação encontram-se bem definidas (GOES, 2002; FEICHTENBERGER; SPÓSITO, 2003; BALDASSARI *et al.*, 2007; FUNDECITRUS, 2014), estes inevitavelmente acarretam danos à saúde dos trabalhadores, ao solo e água, além de acumularem resíduos acima do recomendável nos frutos, trazendo riscos à saúde dos consumidores. Recentemente o Brasil foi alvo de denúncias sobre o excesso de resíduos do fungicida carbendazim no suco exportado, o que trouxe uma imagem negativa do produto brasileiro no mercado internacional. Este composto, embora eficiente no controle do patógeno, acabou sendo removido da Grade de Defensivos PIC em 2012, não podendo ser utilizado em pomares cuja produção é destinada a suco para exportação (FUNDECITRUS, 2014).

A coexistência de frutos sintomáticos e novos frutos suscetíveis na mesma planta podem agravar os sintomas da doença (KOTZÉ, 1981). Tal condição,

associada com chuvas frequentes nos períodos de suscetibilidade dos frutos, proporciona aumento da doença com grandes variações de um ano para o outro (SILVA-PINHATI *et al.*, 2009), mas mesmo que todos os frutos de uma estação fossem recolhidos antes do aparecimento de frutos suscetíveis da próxima geração, a presença de galhos secos contaminados traria grande fonte de inóculo para o agravamento da doença e contaminação dos novos frutos (BALDASSARI *et al.*, 2006).

Microrganismos endofíticos, especialmente os habitantes de plantas medicinais ou de áreas naturais com grande biodiversidade, têm sido explorados pelo seu efeito protetor ao hospedeiro e pelo potencial biotecnológico na síntese de substâncias para uso na agricultura, medicina e indústria. É possível obter estas substâncias em laboratório por processo fermentativo, e elas podem conter ativos antimicrobianos muito úteis no controle alternativo de doenças que acometem as produções agrícolas.

O fungo *Diaporthe terebinthifolii* (LGMF914), isolado da planta medicinal Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius*), descrito por Gomes *et al* (2013), apresentou potencial inibitório sobre *P. citricarpa in vitro* (SANTOS, 2013). Este isolado poderá ser explorado em novos ensaios para o controle biológico da doença MPC.

Devido à dificuldade de se testar novos compostos no campo, faz-se necessária a produção de sinais da doença em ambiente controlado, como o crescimento micelial e produção de picnídios nos tecidos da planta, na busca por um protocolo rápido e viável que permita testar a eficiência de novas substâncias candidatas ao controle da doença.

Neste contexto, e diante da importância dos ramos para a epidemiologia da doença e ausência de estudos focados no controle da MPC a partir dos ramos, este estudo tem como objetivos: 1) Criar um protocolo de produção de sinais do patógeno em ramos de citros em condições de laboratório; 2) Avaliar o efeito dos extratos metabólicos do fungo endofítico *Diaporthe terebinthifolii* (LGMF914) sobre a colonização e formação de estruturas de reprodução de *P. citricarpa* nos ramos.

2 Material Biológico

Nos experimentos de inoculação foi utilizada a linhagem transformada LGMF06-T2 de *Phyllosticta citricarpa*, que expressa a proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP) e possui resistência a Glifosinato de Amônio, por possuir os genes *gpf* e *bar* inseridos via Agrotransformação por Figueiredo *et al.* (2010).

Para produção de extratos metabólicos foi utilizada a linhagem LGMF914 do fungo *Diaporthe terebinthifolii*, espécie descrita por Gomes *et al.* (2013) como endofítica da planta *Schinus terebinthifolius* (Aroeira Vermelha).

As espécies fazem parte da Coleção de Culturas do Laboratório de Genética de Microrganismos (LabGeM) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil (www.labgem.ufpr.br).

3 Métodos

3.1 Suspensão de conídios de *P. citricarpa*

Foi obtida suspensão conidial do fungo *P. citricarpa* LGMF06-T2, pela lavagem de placas de crescimento micelial de 15 a 20 dias com 1 a 2 mL de solução salina (NaCl 0,85%). A concentração de esporos foi estimada em câmara de Neubauer, e a suspensão foi ajustada para concentração de 10^5 conídios/mL.

3.2 Produção de estruturas reprodutivas em ramos de citros

Foram utilizados ramos aderidos à planta e ramos destacados utilizando como inóculo suspensão de conídios e fragmentos miceliais do fungo *Phyllosticta citricarpa*. Os tratamentos realizados estão descritos a seguir.

3.2.1 Ramos inoculados na planta

Quatro mudas de citros var. 'Pera' foram desinfestadas e em seu ramo principal foram marcados 4 pontos de inóculo e cada planta recebeu um dos seguintes tratamentos: i) tecido intacto e depositado disco de micélio; ii) tecido tratado com

injúria por lixa e depositado disco de micélio; iii) tecido tratado com injúria por furos e depositado disco de micélio; iv) injeção intraepidérmica de 20 μ L de suspensão conidial. Em cada planta foram feitos 3 tratamentos e 1 controle negativo com disco de meio de cultura ou injeção de solução salina. Os inóculos foram cobertos com algodão umedecido e vedadas com filme PVC para manutenção da umidade e após 15 dias, os fragmentos inoculados foram destacados e transferidos para caixa transparente contendo substrato autoclavado e adaptada com irrigação, de onde foram retirados com os intervalos de 7, 14, 21 e 28 dias para visualização na lupa Dino-Lite Digital Microscope, utilizando o programa DinoCapture versão 3.3.0.16 para captura de imagens. O experimento está ilustrado na Figura 1.

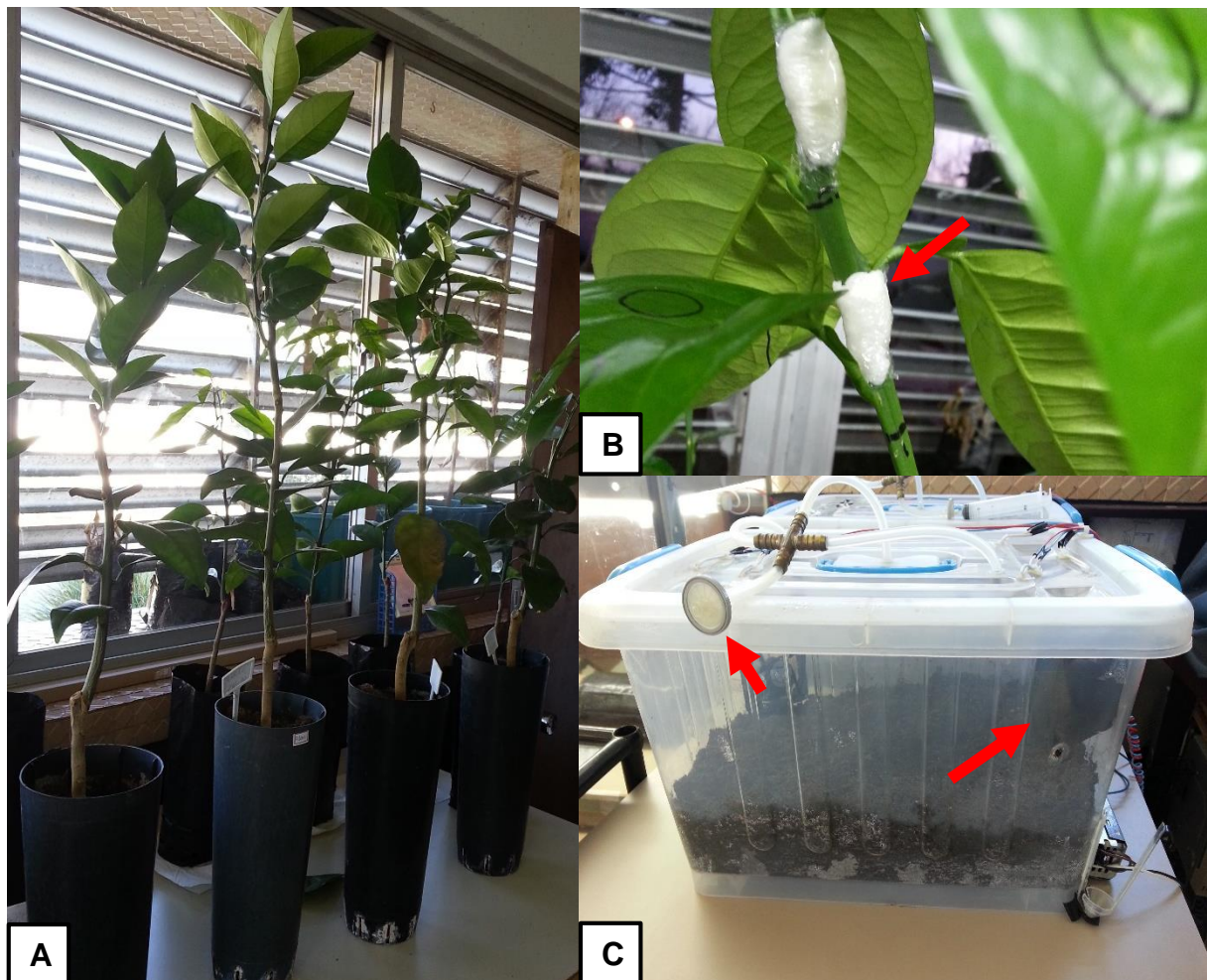


FIGURA 1 – EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE SINAIS DE *P. citricarpa* EM RAMOS INOCULADOS NA PLANTA: (A) PLANTAS INOCULADAS, (B) RAMOS INOCULADOS COM DISCO DE MICÉLIO DE DO FUNGO E ENVOLVIDOS COM ALGODÃO ÚMIDO (SETA), (C) CAIXA TRANSPARENTE COM SUBSTRATO ESTÉRIL ADAPTADA COM IRRIGAÇÃO E VENTILAÇÃO (SETAS). FONTE: O Autor (2013).

3.2.2 Ramos destacados e inoculados

3.2.2.1 Ramos destacados inoculados com suspensão de conídios

Dez ramos de mudas de citros var. 'Pera' com aproximadamente 10cm de comprimento foram submetidos a uma desinfestação superficial para eliminação da microbiota epifítica, conforme sugerido por Petrini (1992) e com adaptações. Os tecidos foram lavados suavemente em água corrente, submersos em etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio comercial (2% de cloro ativo) por 3 minutos, novamente em etanol 70% por 30 segundos e por fim em água destilada estéril por 6 minutos, de modo que uma alíquota desta água foi depositada em placa com meio BDA para atestar a eficiência da desinfestação. Os ramos desinfestados foram transferidos para placas de Petri vazias.

Sobre nove ramos de citros foram depositados 100 μ L da suspensão de esporos de *P. citricarpa* (item 3.1) (Figura 2 – A) enquanto um dos ramos recebeu apenas solução salina como controle negativo. As placas foram acondicionadas em estufa BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12/12h com câmara úmida nas primeiras 72h mediante algodão embebido em água.

Os ramos foram fragmentados em 2 partes que foram avaliados em 2 etapas. A primeira parte dos ramos foi avaliada com os intervalos de tempo de 0, 24, 48 e 72h e 7, 14, 21, 28 e 35 dias e a segunda parte dos ramos permaneceu secando em estufa e foi avaliada após 90 dias de secagem. As avaliações foram feitas mediante inspeção visual em microscópio estereoscópio a fim de identificar formação de estruturas reprodutivas do fungo e na sequência o isolamento dos ramos com prévia desinfestação, fragmentação asséptica e transferência para placas de Petri com meio BDA pH 5.8 acrescido de antibiótico tetraciclina 100 μ g/mL (Figura 2 – B).

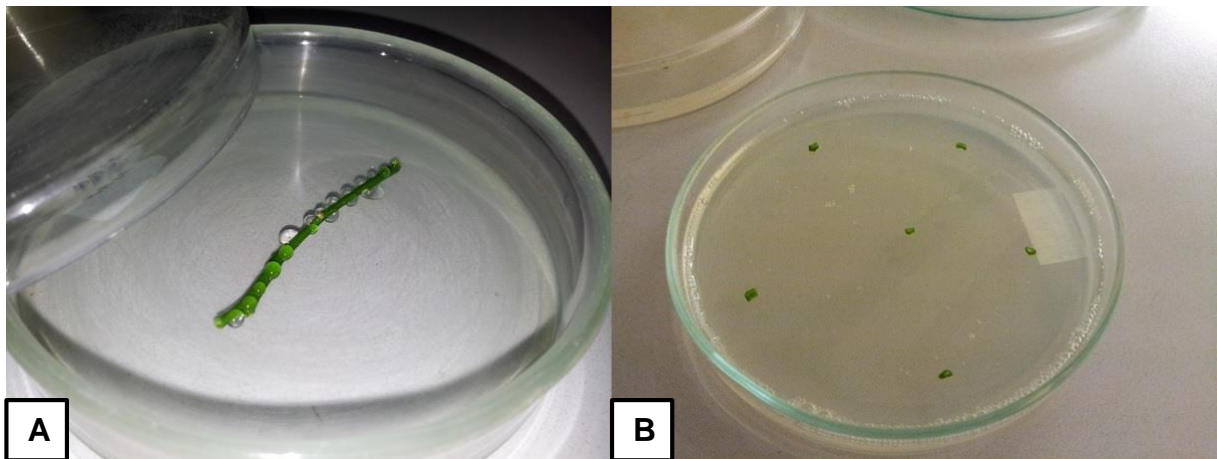


FIGURA 2 – EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE SINAIS DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS DESTACADOS E INOCULADOS COM SUSPENSÃO CONIDIAL: (A) RAMO JOVEM DE CITROS VAR. 'PERA' INOCULADO COM 100 µL DA SUSPENSÃO, (B) PLACA DE PETRI PARA ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS CONTENDO FRAGMENTOS DO RAMO APÓS XX DIAS DE INOCULAÇÃO.

Fonte: O autor (2012)

3.2.2.2 Ramos destacados inoculados com micélio

Dez ramos de mudas de citros var. 'Pera' com aproximadamente 10 cm de comprimento tiveram suas extremidades seladas com parafina e foram desinfestados para remoção da microbiota epifítica (item 3.2.2.1) (Figura 3 – A). Cada ramo foi submerso em solução de Glifosinato de Amônio (100 µg/mL) e transferido para uma placa de Petri contendo meio Ágar-Água acrescido de tetraciclina 100 µg/mL e glifosinato de amônio 100 µg/mL. Cinco fragmentos miceliais de aproximadamente 2 mm do fungo foram inoculados no meio de cultura ao longo da extensão dos ramos (Figura 3 – B) e 3 ramos foram tratados com o fungicida Derosal® (5 µg/mL) como controle positivo. As placas foram acondicionadas em estufa BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12/12h. Após 7, 14 e 21 dias de incubação os ramos foram visualizados na lupa Dino-Lite Digital Microscope em busca de formação micelial e de estruturas reprodutivas. As imagens foram capturadas utilizando o programa DinoCapture versão 3.3.0.16.

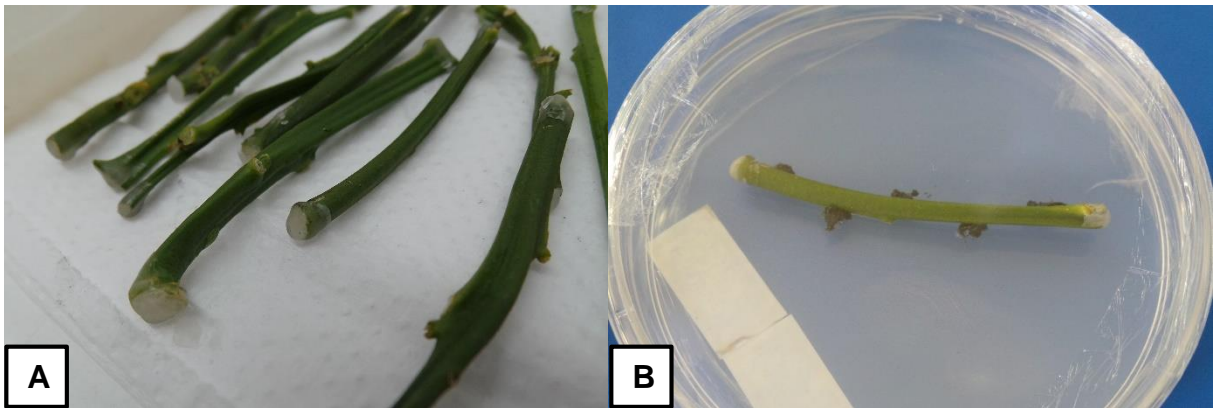


FIGURA 3 – EXPERIMENTO DE PRODUÇÃO DE SINAIS DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMO DESTACADO COM MICÉLIO: (A) RAMOS PARAFINADOS E DESINFESTADOS; (B) PLACA DE PETRI CONTENDO RAMO INOCULADO COM FRAGMENTOS MICELIAIS DO FUNGO LGMF06-T2. FONTE: O Autor (2013)

3.2.3 Ramos autoclavados inoculados com micélio

Dez ramos de mudas de citros var. 'Pera' com aproximadamente 10 cm de comprimento foram autoclavados em recipiente com água destilada por 20 min a 1 atm. Cada ramo foi transferido para uma placa de Petri contendo meio Ágar-Água acrescido de tetraciclina 100 µg/mL e glifosinato de amônio 100 µg/mL. Cinco fragmentos miceliais de aproximadamente 2 mm do fungo LGMF06-T2 foram inoculados no meio de cultura ao longo da extensão dos ramos e 3 ramos foram tratados com o fungicida Derosal® (5 µg/mL) como controle positivo. As placas foram acondicionadas em estufa BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12/12h. Após 7, 14 e 21 dias de incubação os ramos foram visualizados na lupa Dino-Lite Digital Microscope para visualização da formação micelial e de estruturas reprodutivas. As imagens foram capturadas utilizando o programa DinoCapture versão 3.3.0.16.

3.3 Inibição do crescimento micelial e formação de picnídios por extrato do fungo endofítico *D. terebinthifolii*

3.3.1 Obtenção do extrato

Cinco discos de micélio (\varnothing 8 mm) fermentaram em meio extrato de malte sob agitação (120rpm, 28°C) por 28 dias. Em seguida o micélio foi separado do líquido por filtração em papel Whatman nº 4. Uma segunda extração foi conduzida usando acetato de etila (EtOAc) (Merck), e em seguida o solvente foi evaporado em rotaevaporador a 45 °C. O extrato final foi pesado e diluído em metanol em concentração de 10 mg/mL, consistindo no extrato hidrofóbico.

3.3.2 Inibição da formação de picnídios de *P. citricarpa* em ramos

Foi padronizada a metodologia de formação de estruturas reprodutivas em ramos autoclavados. Fragmentos de 1 cm de ramos de mudas de citros var. 'Pera' foram autoclavados em recipiente com água por 20 min a 1 atm, secos em papel filtro estéril (Figura 4 – A) e posicionados em número de 3 fragmentos por placa de Petri contendo meio Ágar-Água acrescido de tetraciclina 100 µg/mL e glifosinato de amônio 100 µg/mL. Sobre o meio de cultura, nas laterais de cada fragmento, foram posicionados inóculos de aproximadamente 2 mm de micélio de *Phyllosticta citricarpa* LGMF06-T2 (Figura 4 – B). Os ramos foram tratados da seguinte forma: i) Controle negativo: sem tratamento; ii) Controle solvente: 50 µL de Metanol absoluto, usado para diluir o extrato; iii) Controle positivo: 50 µL de Derosal® 5µg/mL; iv) Extrato LGMF914: 50 µL do extrato; v) Extrato LGMF914 reaplicado: 50 µL do extrato reaplicado após cada avaliação. Cada tratamento foi feito em triplicata.

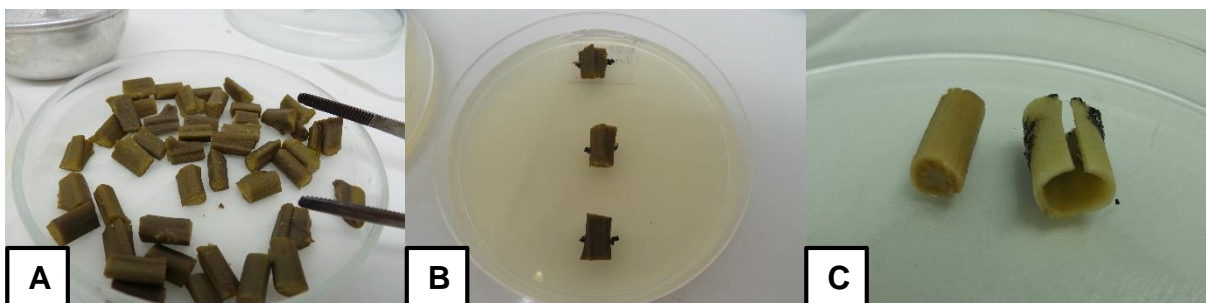


FIGURA 4 – EXPERIMENTO DE INDUÇÃO DE SINTOMAS DE *P. citricarpa* EM RAMOS AUTOCLAVADOS:(A) FRAGMENTOS DE RAMOS AUTOCLAVADOS, (B) TRÊS FRAGMENTOS DE RAMO EM PLACA INOCULADOS COM MICÉLIO DO FUNGO, (C) SEPARAÇÃO DA CASCA COLONIZADA PARA EXTRAÇÃO DE DNA.

FONTE: O Autor (2013).

Após 7, 14 e 21 dias, um fragmento de cada placa foi retirado e fotografado na lupa Dino-Lite Digital Microscope utilizando o programa DinoCapture versão 3.3.0.16. Em seguida, os ramos tiveram a casca retirada (Figura 4 – C), liofilizada, macerada em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo, e o DNA extraído com o “UltraClean Microbial DNA Isolation Kit”, seguindo o protocolo do fabricante com modificações para folhas (ADAMOSKI *et al.*, 2011). O macerado do ramo foi diretamente adicionado ao “MicroBead Tube”, com a normal adição de “Bead Solution” e “MD1 Solution”. O resultado foi homogeneizado em agitador tipo “vortex” por 10 minutos e mantido em banho maria a 60°C por mais 10 minutos. A segunda modificação ocorreu no passo de adição da “MD2 Solution”, que seria incubada a 4°C, mas foi mantida a 0°C, pelo mesmo período de tempo.

A identificação molecular do patógeno foi feita por PCR espécie específico descrito por Stringari *et al.* (2009), pela amplificação do fragmento genômico GCP, com cerca de 300 pares de base, amplificado pelos *primers* GCP1 (5’AAGTGTGAGTGTCGAAGGTGG3’) e GCP2 (5’GACGACTCGCTTTTCTACGGC3’), cuja detecção caracteriza a presença de *P. citricarpa*. A avaliação do resultado da amplificação foi realizada em eletroforese com gel de agarose 1,5%.

4 Resultados e Discussão

O quadro 1 mostra os resultados obtidos para os diferentes métodos de inoculação do patógeno. Dentre os métodos utilizados para produção de sinais da doença em ramos, o uso de micélio mostrou maior eficiência como fonte de inóculo. Ramos destacados e inoculados apresentaram crescimento micelial e formação de picnídios (Item 2, anexo), porém os resultados foram variáveis e apresentou contaminação em algumas amostras, inviabilizando o uso da técnica.

Resultado semelhante foi observado nos ramos tratados com injúria e inoculados com micélio ainda na planta, onde foi possível destacar o efeito da injúria por lixa na formação de lesões (Figura 5), provavelmente devido à maior superfície de contato do fungo com os tecidos lesionados, com disponibilidade de nutrientes e sem as devidas barreiras de proteção, podendo facilitar sua penetração e a colonização desses tecidos.

Ramos	Inóculo	Tratamento ¹	Formação de picnídios ²	Isolamento ³
Na Planta	Conídios	Injeção	0	-
		Nenhum	0	-
	Micélio	Lixa	0	-
		Furos	0	-
Destacados	Conídios	Nenhum	0	-
	Micélio	Nenhum	1	1
		Autoclavado	1	1

QUADRO 1 – TRATAMENTOS REALIZADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES PARA A INDUÇÃO DE LESÕES E PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS DE *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS DE CITROS.

NOTAS: ¹ o tratamento com seringa consistiu em injeção intra-epidérmica de 20 µL de suspensão conidial; ² 0: Ausência de picnídios; 1: Presença de picnídios. ³ -: Não realizado por ausência de estruturas. 1: Reisolamento da linhagem LGMF06-T2;

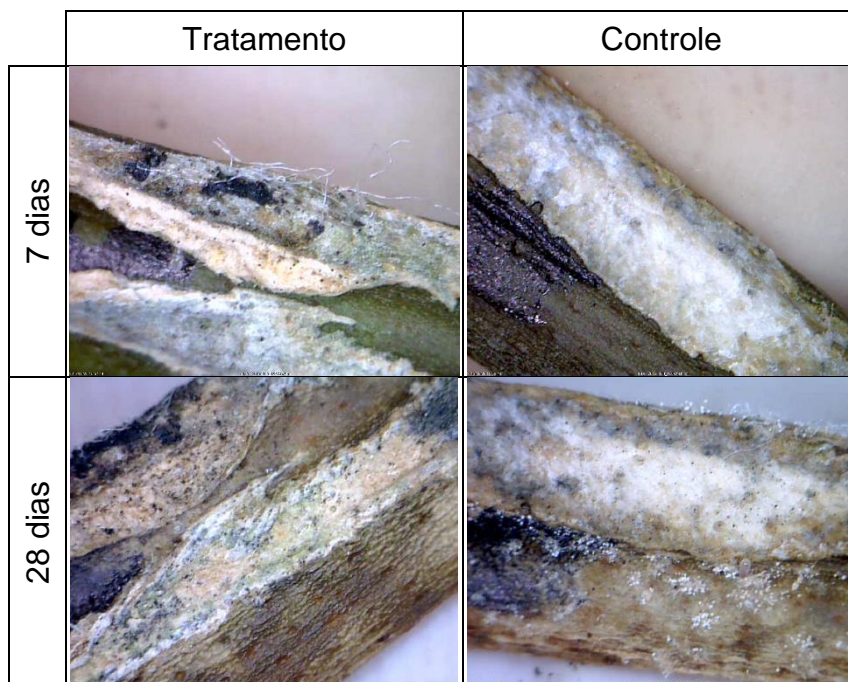


FIGURA 5 – AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DO FUNGO *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS DE CITROS POR MEIO DE INJÚRIA COM LIXA, 7 E 28 DIAS APÓS INOCULAÇÃO. Aumento: 10X

FONTE: O Autor (2013)

O ramo autoclavado, embora não represente a condição natural do tecido, apresentou-se mais eficiente na promoção de sinais do patógeno (Figura 6 – A e B), com padrão de crescimento micelial e formação de picnídios a partir do sétimo dia da inoculação. A busca por um protocolo de indução de sintomas de um patógeno para estudos de epidemiologia e controle biológico sugere uma metodologia rápida, eficiente e livre de interferências. Devido à dificuldade de manuseio de *P. citricarpa* em laboratório por sua reduzida taxa de crescimento em meio de cultura, baixa competitividade e dificuldade em causar lesões em tecidos vegetais sob condições controladas, este protocolo mostra-se eficiente, visto que obteve sucesso na produção de picnídios sobre os ramos em curto tempo. O reisolamento de transformantes a partir dos ramos ocorreu de forma positiva, confirmado por microscopia de fluorescência de micélio e conídios coletados nos ramos (Figura 6 – C e D).

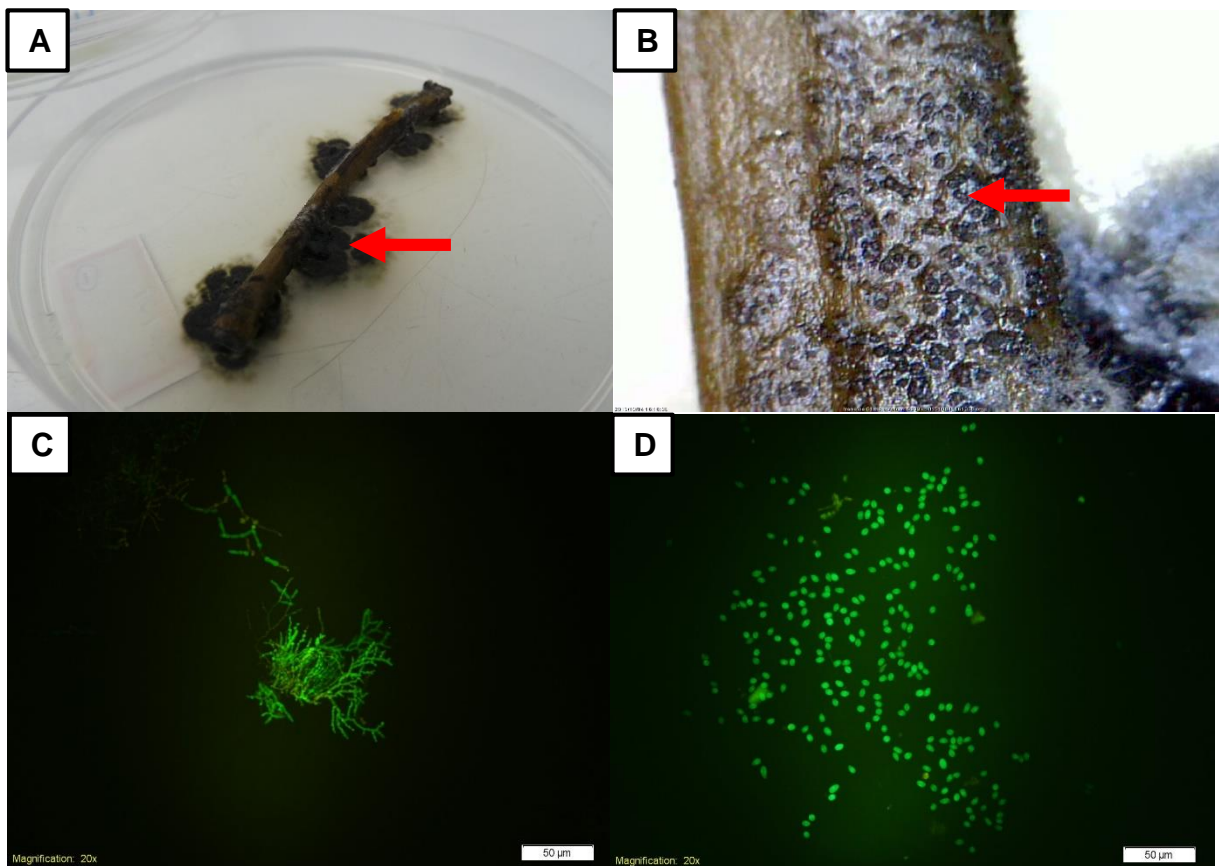


FIGURA 6 – EM (A) e (B), RAMOS DE CITROS AUTOCLAVADOS E INOCULADOS COM O FUNGO *Phyllosticta citricarpa* LGMF06-T2 (SETA APONTANDO FORMAÇÃO DE PICNÍDIOS). EM (C) E (D) MICÉLIO E CONÍDIOS RECUPERADOS DO TECIDO, COMPROVANDO A LINHAGEM INOCULADA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.

Notas: B (aumento: 10x)

FONTE: O Autor (2013).

Após definido o método de inoculação e produção de estruturas reprodutivas, avaliou-se a ação de extratos metabólicos do fungo ascomiceto *Diaporthe terebinthifolii* (LGMF914) sobre a colonização e formação de estruturas reprodutivas de *P. citricarpa* nos ramos de citros, que está representado no Quadro 2. A Figura 7 compara o controle negativo sem extrato com o tratamento pelo extrato nas avaliações feitas com 7, 14 e 21 dias após inoculados e tratados. No anexo 4 encontram-se as imagens comparativas de todos os tratamentos.

Experimento	Descrição	Tratamento ¹	Picnídios ²	PCR
1	Controle Negativo	Nenhum	+++	+++
2	Controle Solvente	Metanol absoluto	++	+
3	Controle Positivo	Derosal ® 5 µg/mL	+	-
4	LGMF914	Extrato 10 mg/mL	+	+
5	LGMF914 reaplicado	Extrato 10 mg/mL+ Extrato 10 mg/mL	-	+

QUADRO 2 – TRATAMENTOS DO EXPERIMENTO DE INIBIÇÃO DE *P. citricarpa* EM RAMOS. NOTAS: ¹ Em cada aplicação foi depositado 50 µL da solução descrita sobre os ramos. ² Presença de picnídios aos 21 dias após inoculação. - indica ausência e + indica presença em uma repetição.

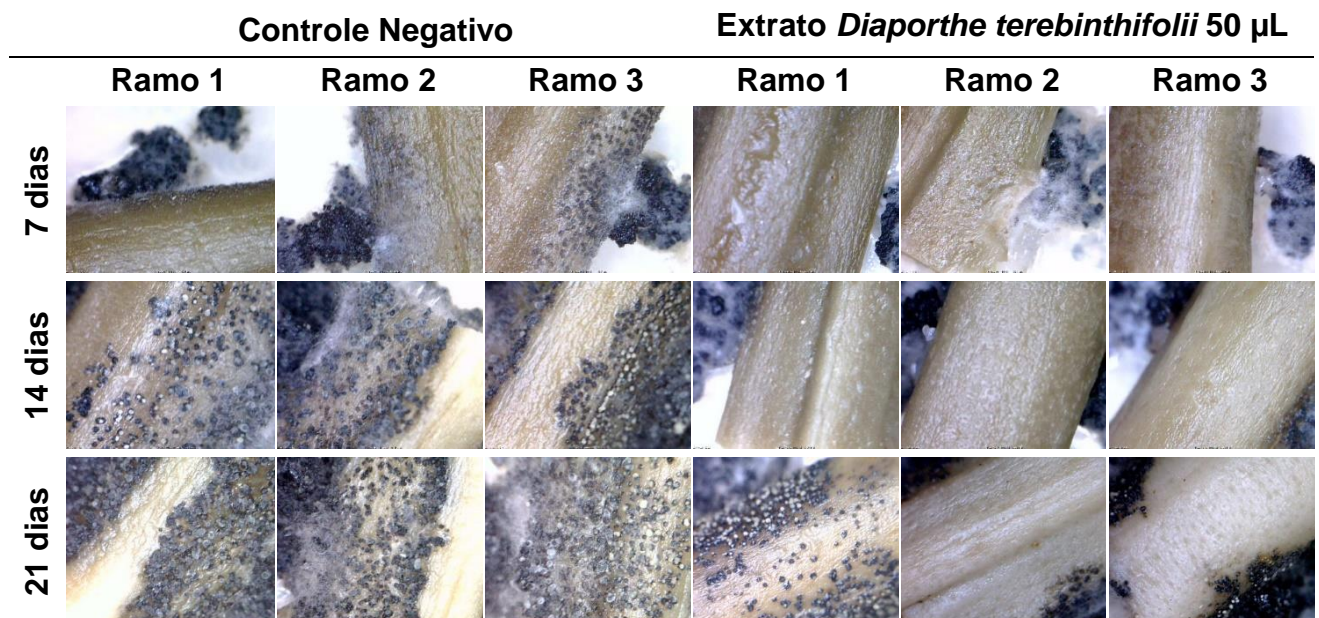


FIGURA 7 – AVALIAÇÕES DA PRODUÇÃO DE PICNÍDIOS E CONTROLE ALTERNATIVO DE RAMOS DE CITROS AUTOCLAVADOS E INOCULADOS COM MICÉLIO DE *P. citricarpa* APÓS 7, 14 E 21 DIAS. Aumento: 10x
FONTE: O Autor (2013)

Verifica-se a eficiência do extrato LGMF914 contra o desenvolvimento do patógeno nos ramos. Nota-se a formação de picnídios nos controles negativos 7 dias após inoculados, fato não ocorrido no tratamento com extrato do fungo LGMF914. O efeito do extrato é melhor evidenciado a partir da segunda avaliação, quando o controle do solvente exibe uma colonização acentuada pelo fungo, não observada no tratamento com o extrato, que atingiu um padrão de inibição semelhante apenas ao tratamento com o fungicida comercial (Item 4, anexo).

Apesar de o fungicida Derosal® ter sido excluído da Grade de Defensivos PIC, não devendo ser utilizado em pomares cuja produção é destinada a suco para exportação (FUNDECITRUS, 2014), sua utilização como controle positivo neste estudo deve-se ao efeito controlador comprovado sobre várias espécies fúngicas, permitindo comparar a ação dos extratos a um composto cuja eficiência é conhecida e que necessita de um substituto de ação semelhante.

Os tratamentos com reaplicação do extrato não revelaram variação no efeito inibitório, tornando-se necessário investigar condições que potencializem a aplicação e permita um intervalo maior de ação ou a continuidade do controle na reaplicação.

O protocolo de extração de DNA utilizado mostrou eficiência em comprovar a presença do patógeno nos ramos avaliados, podendo ser útil para evidenciar a colonização do fungo nesses tecidos, embora a PCR convencional não tenha revelado a variação de colonização observada nos tecidos tratados. O mesmo protocolo mostrou eficiência no diagnóstico do patógeno colonizando folhas de citros (ADAMOSKI, 2011), e espera-se que uma análise mais sensível, como a reação de qPCR possa quantificar a presença do patógeno e melhor avaliar o efeito inibitório das substâncias em uso. Ainda assim, a baixa pressão de inóculo ou presença de estruturas de resistência do patógeno podem dificultar a análise molecular direta dos tecidos, como foi verificado pela baixa sensibilidade deste protocolo na extração de DNA de *P. citricarpa* em ramos vivos de amostras do campo (SILVA, dados não mostrados).

Embora não quantificada, a ação inibitória do extrato LGMF914 contra o patógeno *P. citricarpa* pode ser evidenciada neste trabalho, assim como foi observada em testes de crescimento micelial e formação de picnídios em folhas (SANTOS, 2013). Outros microrganismos endofíticos já foram testados no controle deste patógeno,

como fungos do gênero *Nigrospora* e da família *Xylariaceae* (HOKAMA, 2012), e fungos do gênero *Mycosphaerella* e *Phanerochaete* (OLIVEIRA, 2012), isolados da planta cambará, bem como da família *Xylariaceae* isolados da espécie vegetal *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) (FIGUEIREDO, 2006).

Diante da importância dos ramos como fontes de inóculo da MPC e da ausência de um controle alternativo com foco no ramo, este estudo oferece uma nova abordagem na busca de ferramentas para o estudo da doença e sinaliza que é possível investir nos compostos oriundos de fungos endofíticos como fontes promissoras de substâncias com eficiência similar ou até superior aos fungicidas. Propõe-se aprimorar as condições de obtenção e estoque dos extratos ativos, aumentando seu rendimento e durabilidade e permitindo o isolamento dos compostos ativos, bem como extrapolar os testes realizados ao estudo *in vivo*, aproximando-se cada vez mais do uso prático em campo.

5 Considerações Finais

Com base nos resultados obtidos, considera-se que a utilização de ramos autoclavados é eficiente como protocolo de produção de sinais da MPC nos ramos, metodologia que permite a obtenção de ramos contendo colonização superficial e formação de picnídios num curto intervalo de tempo, com 100% de amostras positivas e viáveis, e permite testar substâncias alternativas para o controle do patógeno nos ramos.

O extrato do fungo *Diaporthe terebinthifolii* LGMF914 eficientemente inibe o desenvolvimento de picnídios e o crescimento do fungo *Phyllosticta citricarpa* e pode ser explorado no controle alternativo para redução da fonte de inóculos da doença a partir de ramos sintomáticos.

6 Referências Bibliográficas

- ADAMOSKI, D.; FABRIS, JULIANA; STRINGARI, DANYELLE; BINI, A. P.; GLIENKE, CHIRLEI. Desenvolvimento de Metodologia Eficiente de Diagnóstico Molecular do Fungo Fitopatogênico *Guignardia citricarpa*. 19º Evento de Iniciação científica e 4º Evento de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. **Anais...** v. 0, p.185–185, 2011. Curitiba: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PRPPG) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).
- BALDASSARI, R. B.; BRANDIMARTE, I.; ANDRADE, A. G.; SOUZA, D. C. G.; MORETTO, C.; GOES, A. Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja 'Pêra-Rio'. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 269-275, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v29n2/14.pdf>>. Acesso em: 23/02/2014.
- BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F. and GOES, A. de. Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p.337-341, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000400002>>. Acesso em: 12/01/2014.
- BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus spp.* **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 103-110, 2008.
- BECKER, WALTER F. *Nectria pseudotrachia*, como Agente Causal de Cancro de Ramos, Ocorrendo em Pereira Japonesa no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, 2003.
- BECKER, WALTER F. *Nectria pseudotrachia*, como Agente Causal de Cancro de Ramos, Ocorrendo em Pereira Japonesa no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, 2003.
- FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B. Tratamentos com fungicidas no controle de mancha preta (*Guignardia citricarpa*) em laranjeiras 'Valência'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 310S, 2003.
- FIGUEIREDO, J. A. G. **Bioprospecção, Caracterização Morfológica e Molecular de Endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com Ênfase em *Pestalotiopsis spp.*** 152f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Departamento de Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- FIGUEIREDO, J. G.; GOULIN, E. H.; TANAKA, F.; STRINGARI, D.; KAVACORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; GLIENKE, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 2, p. 143-147, 2010.
- FUNDECITRUS. **Doenças e Pragas: Pinta Preta**. 2014. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pintapreta/12>>. Acesso em: 02/03/2014.

FUNDECITRUS. **Doenças e Pragas: Pinta Preta**. 2014. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pintapreta/12>>. Acesso em: 02/03/2014.

GOES, A. Efeito da combinação de fungicidas sistêmicos e protetores no controle da mancha preta dos frutos cítricos causados por *Guignardia citricarpa*. *Summa Phytopathologica*, v. 28, p. 9-13, 2002.

GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, v. 31, p. 1-41, 2013. Disponível em: <<http://www.persoonia.org/Issue/31/01.pdf>>. Acesso em: 26/02/2014.

GOULIN, E. H. **Indução de Sintoma de Mancha Preta dos Citros em Frutos Destacados e Estudo da Epidemiologia da Doença**. 63f. **Dissertação**. 63f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

HOKAMA, Y. M. **Identificação Molecular de Fungos Endofíticos de *Vochysia divergens* Pohl (*Vochysiaceae*) do Pantanal Sul-Mato-Grossense e Controle Biológico de *Phyllosticta citricarpa***. 118f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

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

KRUGNER, T. L.; CANEVA, R. A.; TOMAZELLO F°, MÁRIO. Seca de Ramos em Plantas Enxertadas de Eucaliptos no Estado do Espírito Santo. *IPEF*, n.6, p. 69-75, 1973.

OLIVEIRA, R. **Bioprospecção de isolados fúngicos da planta *Volchysia divergens* Pohl e Controle Biológico de *Phyllosticta citricarpa* Van Der AA**. 86f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

PETRINI, O., SIEBER, T.N., TOTI, L. & VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, v. 1, p. 185-196, 1992. SAVI, D. C. Biodiversidade e Bioprospecção de Actinomicetos da Planta *Volchysia divergens* (Cambará). 107f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SANTOS, P. J. C. **Agrotransformação de duas novas espécies de *Diaporthe* e sua aplicação no controle biológico de *Phyllosticta citricarpa***. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SAVI, D. C. Biodiversidade e Bioprospecção de Actinomicetos da Planta *Volchysia divergens* (Cambará). 107f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha preta dos Citros: Epidemiologia e Manejo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 30, n. 1-2, p. 45-64, 2009.

STRINGARI, D. GLIENKE, C.; CHRISTO, D.; MACCHERONI JR, W.; AZEVEDO, J.L. High molecular diversity of the fungus *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae* and new primers for the diagnosis of the citrus black spot. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1063–1073, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132009000500002&lang=pt>. Acesso em: 25/02/2014.

7 DISCUSSÃO GERAL

A área escolhida neste estudo possui algumas particularidades: pertence a uma região com alta incidência da doença Mancha Preta dos Citros, não apresenta um sistema adequado de manejo quanto a poda e remoção de mato e apresenta como controle químico apenas uma aplicação anual de herbicida contra ervas daninhas. A presença de inúmeros frutos sintomáticos, ramos secos e folhas e frutos caídos caracterizam um ambiente onde a doença já atingiu nível epidêmico.

Ao selecionar ramos dos quatro estados fenológicos para serem investigados quanto a presença do fungo *P. citricarpa*, ofereceu-se condições para avaliar em que estágio o ramo passa a abrigar o patógeno. Embora o isolamento dos ramos mais senescentes tenha sido dificultado pelo excesso de contaminantes, a não detecção do patógeno nos ramos novos e jovens sugere sua ausência nesses tecidos.

Mesmo obtendo-se sucesso no isolamento de apenas 1,6% dos ramos coletados, as amostras positivas originadas de ramos velhos e sua ausência nos ramos novos e jovens, podem sugerir que o fungo só esteja presente em tecidos do ramo a partir de sua senescência.

A perda de resistência atrelada à colonização do oportunista pode ser verificada durante os experimentos de indução de sintomas em ramos. Notou-se a maior alteração do tecido em contato com o fungo quando houve lesão, condição observada em trabalhos com outras espécies fúngicas que acometem ramos (KRUGNER *et al.*, 1973; BECKER, 2002), e especialmente no protocolo padronizado, onde a colonização e formação de estruturas de reprodução ocorreu somente após a perda de resistência dos ramos, condição provocada pela autoclavagem dos tecidos.

Verificou-se, nas condições testadas, que o fungo permaneceu viável por pelo menos 45 dias nos ramos. Sugerem-se novos ensaios para avaliar se foram os esporos que permaneceram viáveis na superfície no ramo ou se houve germinação, penetração no tecido hospedeiro e lá o fungo permaneceu em quiescência. Tal quiescência pode ocorrer desde os estágios iniciais de desenvolvimento até depois da penetração da hifa e colonização (PRUSKY, 1996). Goulin (2013) verificou a formação de apressórios e conídios de *P. citricarpa* fixados sobre a cutícula de frutos maduros e formação de hifas superficiais com 7 dias. Mesmo que não foram observadas estas hifas aos 20 dias, não permite inferir a ausência do patógeno, já que

aos 60 dias ocorreu o aparecimento de microlesões. É esse momento particular entre a penetração e ocorrência de sintomas que precisa ser investigado.

Foi verificado *in vivo* que o fungo inoculado em folhas em plantas de citros foi reisolado pelo menos 6 meses após a inoculação. O fungo não causou lesões, formou micélio ou estruturas reprodutivas na região inoculada, nem pode ser detectado em pontos distantes do inóculo, o que não permite concluir, mas sugere algum estágio de quiescência pós-germinação, já que a desinfestação para remoção de epífitos teria eliminado qualquer estrutura superficial.

Diferentemente do que ocorre na África do Sul onde os sintomas da MPC estão distribuídos de forma homogênea nas partes superior e inferior da planta (KOTZÉ, 1963) e na Austrália, onde os sintomas são mais frequentes na parte mais alta da copa (KIELY, 1948), no Brasil a maior severidade ocorre nas partes inferiores da planta (SPÓSITO *et al.*, 2008). Spósito *et al.* (2008) ao observar a distribuição agregada dos sintomas, sugeriram que os conídios são responsáveis pelo agravamento da doença. A frequência de chuvas nos pomares no Brasil é um fator que incrementa a participação dos conídios e o fato de frutos de uma florada não influenciarem significativamente os frutos suscetíveis da próxima florada (BALDASSARI *et al.*, 2006; SPÓSITO, 2004), e os frutos caídos no chão não servirem de inóculos para folhas caídas (TRUTER *et al.*, 2007), pode-se atribuir aos ramos a fonte de inóculos principal no agravamento da doença, como foi observado por Spósito *et al.* (2011).

Pouco se conhece sobre a participação dos ramos na epidemiologia do fungo *P. citricarpa*, embora seja conhecido o efeito positivo do manejo de ramos secos no controle da doença. Este estudo se torna válido por promover a formação de sinais da doença em ramos, cujas metodologias podem ser aprimoradas para a melhor compreensão deste patossistema, bem como para testar novos compostos promissores no controle da doença. Este estudo também trouxe novos conhecimentos sobre a viabilidade do fungo nos ramos e sua interação com ramos em diferentes estados fenológicos em campo, agregando informações úteis ao entendimento da epidemiologia da doença.

8 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nas condições testadas e resultados obtidos, o presente estudo permitiu observar que:

- O patógeno aparentemente só é encontrado em ramos no campo a partir do estado fenológico velho. Este ramo, em início de senescência, já pode ser uma fonte de inóculo da doença.
- O patógeno podem permanecer viável nos ramos em secagem por pelo menos 45 dias.
- O fungo pode permanecer quiescente em mudas de laranja var. 'Pera' por pelo menos 180 dias na região inoculada.
- Ramos autoclavados são uma alternativa eficiente de colonização do patógeno e obtenção de picnídios, garantindo 100% de amostras positivas e viáveis para testes de controle do patógeno.
- Extratos metabólicos do fungo endofítico *Diaporthe terebinthifolii* inibem eficientemente o desenvolvimento de picnídios do fungo *P. citricarpa* em ramos sintomáticos, sendo promissor no controle alternativo para redução da fonte de inóculos da doença a partir de ramos sintomáticos.

9. REFERÊNCIAS

ALY A. H.; DEBBAB, A; KJER, J; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products.

Fungal Diversity, v. 41, p. 1-16, 2010.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos Endofíticos. IN: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (EDS.). **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p.117-137, 1998.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN der Aa, H. A.; WEERDT, M. de; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI Jr., W.; de BLANCO, C. G.; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*).

Phytopathology, v.92, p. 464-477, 2002.

BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F. and GOES, A. de. Susceptibility of fruits of the 'Valência' and 'Natal' sweet orange varieties to *Guignardia citricarpa* and the influence of the coexistence of healthy and symptomatic fruits. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p.337-341, 2006. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000400002>>. Acesso em: 12/01/2014.

BECKER, WALTER F. *Nectria pseudotrachia*, como Agente Causal de Cancro de Ramos, Ocorrendo em Pereira Japonesa no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, 2003.

BELLOTE, J. A. M; KUPPER, K. C.; RINALDO, D.; SOUZA, A. de; PEREIRA, F.D.; GOES, A. de. Acceleration of the decomposition of Sicilian lemon leaves as an auxiliary measure in the control of citrus black spot. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 34, n.2, p. 71-76, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762009000200001>>. Acesso em 19/02/2014.

BELLOTTE, J. A.; KUPPER, K. C.; RINALDO, D.; SOUZA, A.; GOES, A. de. The effects of inter-crop cultivation between rows of citrus crop on spreading of *Guignardia citricarpa* ascospores and in the citrus black spot occurrence. **Rev. Bras. Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p.102-111, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000100013>>. Acesso em: 19/02/2014.

BERNARDO, E. R. A.; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. **Trop. plant pathol**, v.35, n.1, p.37-42, 2010. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000100006>>. Acesso em: 19/02/2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Segurança Química: Agrotóxicos. 2014.

Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 25/01/2014.

CHABOUSSOU, F. **Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos**. 1.ed. São Paulo: Editora Expressão Popular, 2006.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235–253, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2104729/pdf/0235.pdf>>. Acesso em: 26/02/2014.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO; J. L. **Fungos**. 2.ed. Caxias do Sul: Educ, 2010.

FIGUEIREDO, J. G; GOULIN, E. H.; TANAKA, F.; STRINGARI, D.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; GLIENKE, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 2, p. 143-147, 2010.

FUNDECITRUS. **Doenças e Pragas: Pinta Preta**. 2014. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pintapreta/12>>. Acesso em: 02/03/2014.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; CUNNINGTON, J.; SHIVAS, R. G.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Endophytic and Pathogenic *Phyllosticta* species with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia**, v. 26, p. 47-56, 2011.

GLIENKE, C.; PEREIRA, O. L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; CUNNINGTON, J.; SHIVAS, R. G.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Endophytic and Pathogenic *Phyllosticta* species with reference to those associated with Citrus Black Spot. **Persoonia**, v. 26, p. 47-56, 2011.

GOES, A. de. Controle da mancha preta dos frutos cítricos. **Laranja**, v.19, p.305-320. 1998.

GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v. 31, p. 1-41, 2013. Disponível em: <<http://www.persoonia.org/Issue/31/01.pdf>>. Acesso em: 26/02/2014.

GOULIN, E. H. **Indução de Sintoma de Mancha Preta dos Citros em Frutos Destacados e Estudo da Epidemiologia da Doença**. 63f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINNOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**, v.92, p. 976-985, 2002.

HAWKSWORTH, D. L.; CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A.; REYNOLDS, D. R. *et al.* The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. **Mycotaxon**, v. 166, p. 491-500, 2011.

HORSFALL J.G. Fungi and fungicides. The story of a non-conformist. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 13, pp. 1-14, 1975.

KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* spp.: the ascigerous stage of *Phoma citricarpa* and its relation to black spot of citrus. **Proc. Linn. Soc. N. S. W.**, v. 93, p. 249-292, 1948.

KOTZÉ, J.M. **Black spot**. In: Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H. (Eds.), *Compendium of Citrus Diseases*. APS Press, St. Paul, USA, p. 23-25, 2000

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.

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

KOTZÉ, J.M. **Studies on the black spot disease of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely with particular reference to its epiphytology and control at Lebata**. Pretoria, South Africa: University of Pretoria, PhD thesis, 1963.

KRUGNER, T. L.; CANEVA, R. A.; TOMAZELLO F°, MÁRIO. Seca de Ramos em Plantas Enxertadas de Eucaliptos no Estado do Espírito Santo. **IPEF**, n.6, p. 69-75, 1973.

LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; ARAUJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 637-642, 2006.

LIU, J. K.; PHOOKAMSAK, R.; DOILOM, M.; WIKKEE, S.; LI, Y.M., *et al.* Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity**. v. 57, p. 149–210, 2012. Disponível em:
<http://www.researchgate.net/publication/235720105_Towards_a_natural_classification_of_Botryosphaeriales/file/60b7d51e4f8ebd41eb.pdf>. Acesso em: 26/02/2014.

McONIE, K. C. Source of inoculum of *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, v. 54, p. 64-67, 1964.

NEVES, M.; TROMBIN, V.; MILAN, P.; LOPES, F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da Citricultura Brasileira**. São Paulo: Maskestrat, 138 p., 2010.
PRUSKY, D. Pathogen Quiescence in Postharvest Diseases. **Annu. Ver. Phytopathol.**, v. 34, p. 413-434, 1996.

PETTIT, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 83, p. 19–25, 2009.

PORRAS-ALFARO, A; BAYMAN, P. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 49, p. 291-315, 2011.

PORRAS-ALFARO, A; BAYMAN, P. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 49, p. 291-315, 2011.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá, Embrapa - CPAP. 1994.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v,11, p. 400-407, 2003.

PRUSKY, D. Pathogen Quiescence in Postharvest Diseases. **Annu. Ver. Phytopathol.**, v. 34, p. 413-434, 1996.

REIS, R. F.; TIMMER, L. W. GOES, A. de. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on back spot severity on sweet orange. **Fitopatologia brasileira**, v. 31, n. 1, p. 29-34, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582006000100005>>. Acesso em 19/02/2014.

RODRIGUES, M. B. C.; ANDREOTE, F. D.; SPÓSITO, M. B.; AGUILLAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.42, n.3, p. 323-327, 2007. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000300004>>. Acesso em: 19/02/2014

SANTOS, P. J. C. **Agrotransformação de duas novas espécies de *Diaporthe* e sua aplicação no controle biológico de *Phyllosticta citricarpa***. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SAVI, D. C. **Biodiversidade e Bioprospecção de Actinomicetos da Planta *Volchysia divergens* (Cambará)**. 107f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SCHULZ, B; BOYLE, C. The endophyte continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha preta dos Citros: Epidemiologia e Manejo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 30, n. 1-2, p. 45-64, 2009.

SLIPPERS, B.; BOISSIN, E.; PHILLIPS, A. J. L.; GROENEWALD, J. Z. *et al.* Phylogenetic lineages in the *Botryosphaerales*: a systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 31-49, 2013.

SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; FILHO, A. B.; HAU, B. Spatial pattern of black spot incidence within citrus trees related to disease severity and pathogen dispersal. **Plant Pathology**, v. 57, p. 103-108, 2008.

SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; FELIPPE, M. R.; CZERMAINSKI, A. B. C. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. **Crop Protection**, v. 30, n. 12, p. 1546-1552, 2011.

SPÓSITO, M.B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros**. 124f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004. Disponível em:

<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-19042004-133413/publico/marcel.pdf>>. Acesso em: 19/02/2014.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257–268, 2004.

SUTTON, B.C. & WATERSTON, J.M. *Guignardia citricarpa* Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. **Surrey**, England, Kew: Commonwealth Mycological Institute, n.85, 2p., 1966.

TRUTER, M.; LABUSCHAGNE, P. M.; KOTZÉ, J. M.; MEYER, L.; KORSTEN, L.; Failure of *Phyllosticta citricarpa* pycnidiospores to infect Eureka lemon leaf litter. Australasian. **Plant. Pathol.**, v. 36, p. 87-93, 2007. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/227132723_Failure_of_Phyllosticta_citricarpa_pycnidiospores_to_infect_Eureka_lemon_leaf_litter/file/60b7d528b34ceb6151.pdf>. Acesso em: 27/02/2014.

WIKEE, S.; LOMBARD, L.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; CHEEWANGKON, R.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; CROUS, P. W. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (*Botryosphaerales*). **Studies in Mycology**, v. 76, p. 1-29, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3825230/pdf/simycol_76_1_001.pdf>. Acesso em: 26/02/2014.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, p. 274–76, 1995.

WULANDARI, N. F.; BHAT, D. J.; TO-ANUN, C. A modern account of the genus *Phyllosticta*. **Plant Pathology & Quarantine**, v. 3, n. 2, p. 145-159, 2013. Disponível em: <http://plantpathologyquarantine.org/PDFs/PPQ_3_2_4.pdf>. Acesso em: 02/03/2014.

ANEXOS

ANEXO 1 - MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

1.1 Meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar)

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

A batata foi picada e cozida em 500 mL de água destilada por 20 minutos, o caldo formado foi filtrado, a dextrose foi adicionada e o volume completado para 1000 mL. O pH foi ajustado para 5.8 ou 6.8 conforme necessidade, o ágar foi adicionado e o meio autoclavado por 20 min a 1 atm.

1.2 Meio Ágar-Aveia

Aveia em flocos	20 g
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

A aveia foi fervida em 300 ml de água destilada por 20 minutos, filtrada em gaze e o volume completado para 1000 mL, seguido da adição do ágar. O meio foi autoclavado por 20 min a 1 atm.

1.3 Meio Ágar Água

Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O ágar foi misturado à água e o meio autoclavado por 20 min a 1 atm.

1.4 Tetraciclina 50 mg/mL

O conteúdo de uma cápsula (500mg) foi diluído em 10 mL de água destilada. A solução foi armazenada a 4°C em vidro âmbar até sua utilização.

1.5 Glifosinato de Amônio

Diluiu-se o composto concentrado para uma concentração estoque de 40 mg/mL. A solução foi armazenada a 4 °C em vidro âmbar até sua utilização

1.6 Tampão De Extração DNA Genômico (RAEDER & BRODA, 1985)

Tris-HCl pH 8,0	200 mM
EDTA dissódico pH 8,0	25 mM
Cloreto de sódio (NaCl)	250 mM
SDS (p/v)	1%
H ₂ O	120 mL

A solução foi preparada no momento do uso.

1.7 Tris-HCl pH 8,0 - 1 Mol/L

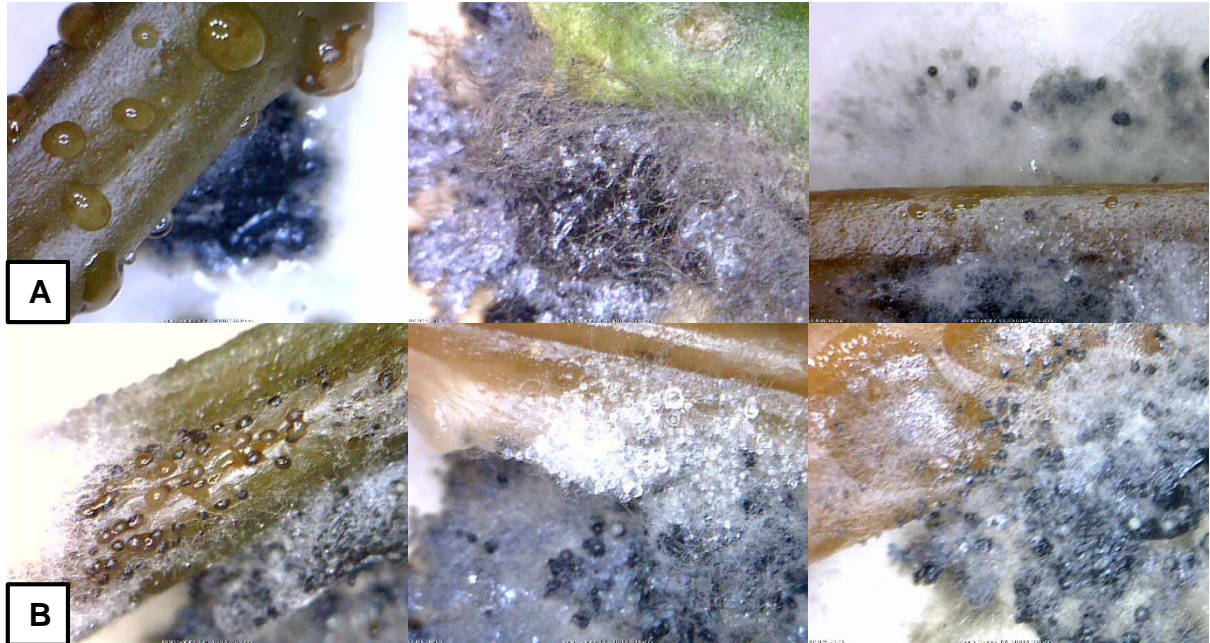
Dissolva 121,1g de Tris base em 800mL de água destilada ou ultrapura. Ajusta o pH adicionando HCl concentrado (37%) para 8,0 (aproximadamente, 42mL98 de ácido). Espere a solução esfriar e faça os ajustes finais de pH e complete o volume para 1000mL. Deve ser autoclavado e armazenado a 4°C.

1.8 Derosal Bayer®

Carbendazim	10,0 mg
Água destilada	10,0 mL

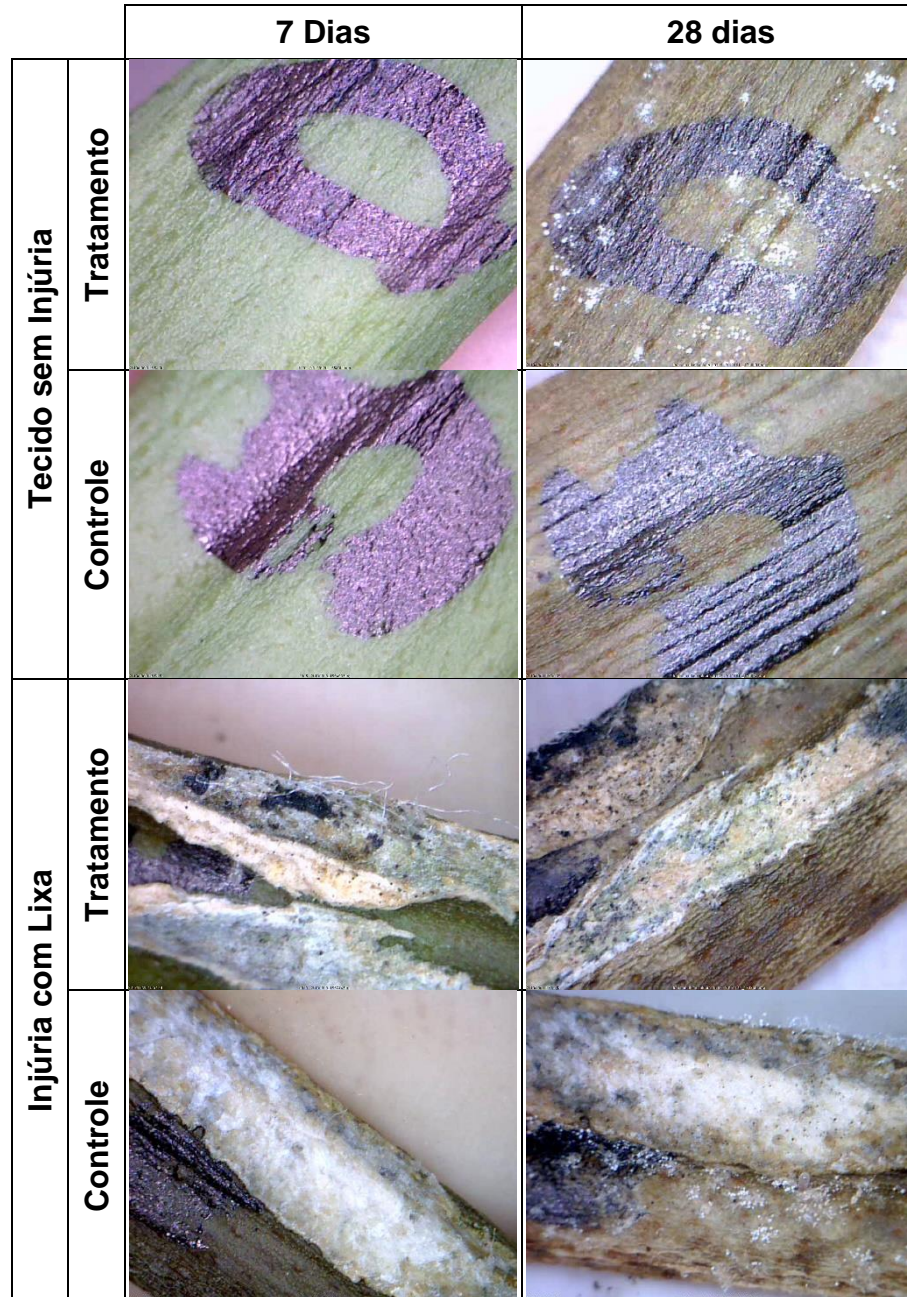
A solução diluída foi armazenada a 4 °C em vidro âmbar até sua utilização.

ANEXO 2 - PADRÕES DE COLONIZAÇÃO DE *P. citricarpa* EM RAMOS DESTACADOS INOCULADOS COM MICÉLIO APÓS 14 DIAS (A) E 21 DIAS (B).



FONTE: O Autor (2013).

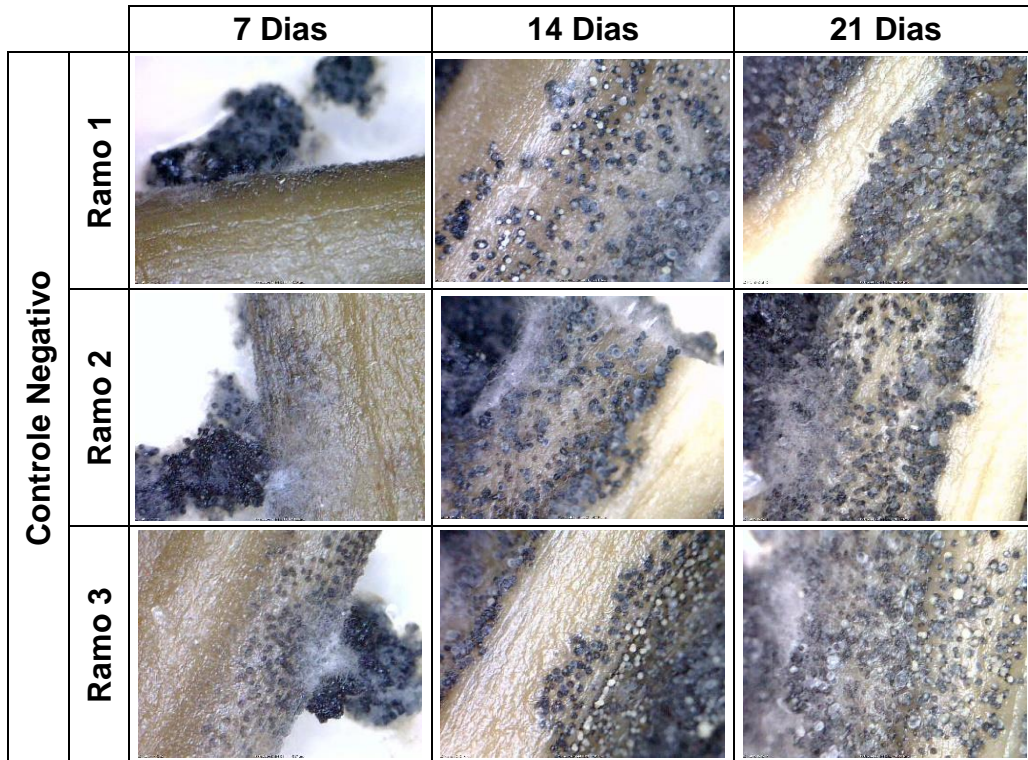
ANEXO 3 - AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE SINTOMAS DO FUNGO *Phyllosticta citricarpa* EM RAMOS DE CITROS POR MEIO DE INJÚRIA, 7 E 28 DIAS APÓS INOCULADOS.



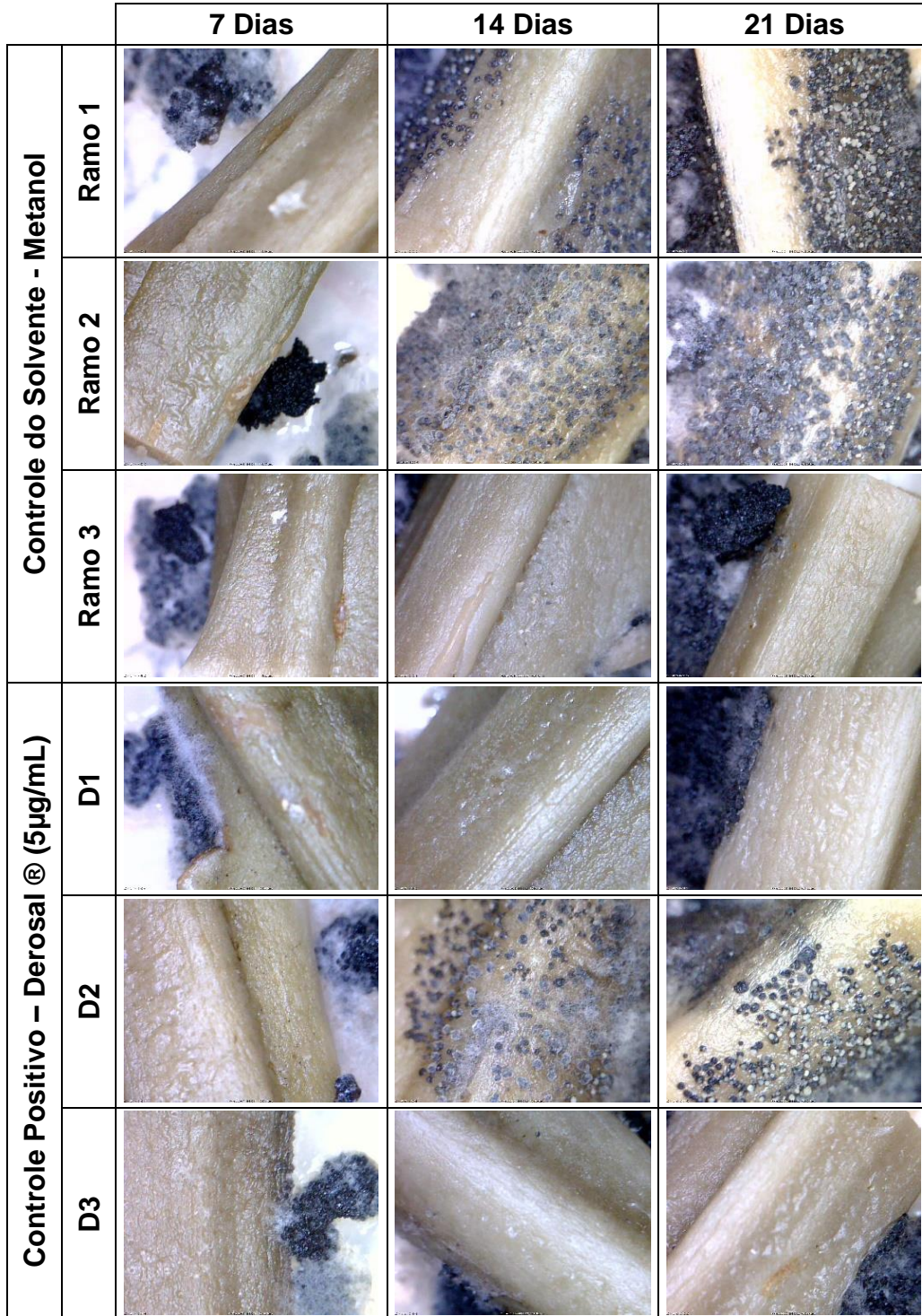
Aumento: 10X

FONTE: O Autor (2013)


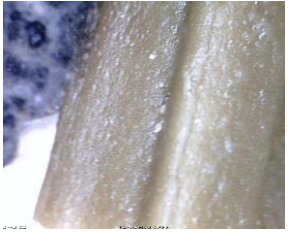
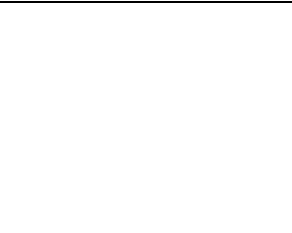


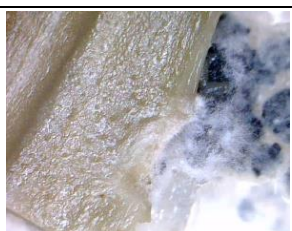


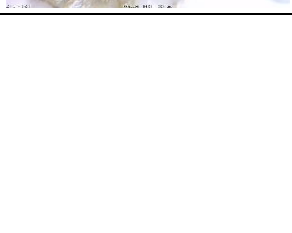




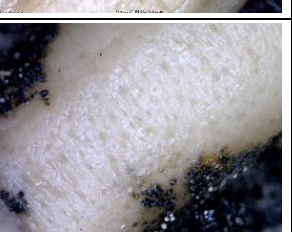
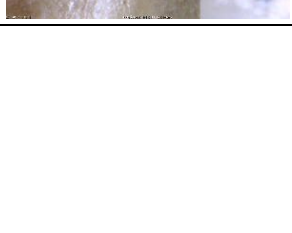

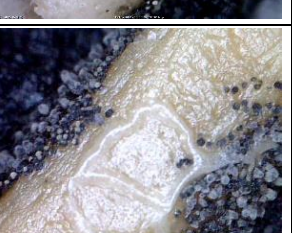
ANEXO 4 - AVALIAÇÕES DA INDUÇÃO DE SINTOMAS E CONTROLE ALTERNATIVO DE RAMOS DE CITROS AUTOCLAVADOS E INOCULADOS COM MICÉLIO DE *P. citricarpa* APÓS 7, 14 E 21 DIAS.



Aumento: 10x
FONTE: O Autor (2013)



Aumento: 10x
 FONTE: O Autor (2013)

Tratamento Extrato Hidrofóbico <i>Diaporthe terebinthifolii</i> (LGMF914)		7 Dias	14 Dias	21 Dias
		Ramo 1		
Ramo 1 Reaplicado				
Ramo 2				
Ramo 2 Reaplicado				
Ramo 3				
Ramo 3 Reaplicado				

Aumento: 10x
 FONTE: O Autor (2013)