

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA DA COSTA SENKIV

**AVALIAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DE *Phyllostica citricarpa* EM SEU
HOSPEDEIRO *Citrus sp*, ATRAVÉS DE OBSERVAÇÃO DE MUTANTES
FLUORESCENTES E QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR qPCR**

CURITIBA

2014

CAMILA DA COSTA SENKIV

**Avaliação de desenvolvimento de *Phyllostica citricarpa* em seu hospedeiro
Citrus sp, através de observação de mutantes fluorescentes e quantificação de
DNA por qPCR**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Genética no Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo José Silva Junior

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Senkiv, Camila da Costa

Avaliação de desenvolvimento de *Phyllostica citricarpa* em seu hospedeiro *Citrus* sp, através de observação de mutantes fluorescentes e quantificação de DNA por qPCR./ Camila da Costa Senkiv. – Curitiba, 2014.
52 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Chirlei Glienke

Co-orientador: Geraldo José Silva Junior

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Fungos. 2. Citrus. 3. Reação em cadeia de polimerase . I. Título II. Glienke, Chirlei. III. Silva Junior, Geraldo José. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **CAMILA DA COSTA SENKIV**, 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 à candidata o conceito "A".

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

Curitiba, 30 de junho de 2014



Doutor Fabrício Packer Gonçalves
IAPAR – Membro Titular



Doutora Vanessa Kava-Cordeiro
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular



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

Visto



Prof. Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matricula 176702

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

Dedico a todas as mulheres que, durante tantos anos, lutaram e ainda lutam pela igualdade de gênero. Sua luta me abriu portas e me permite chegar onde estou hoje. Se não fosse por elas talvez eu não tivesse sido alfabetizada e não fosse capaz de estar escrevendo essa frase, quanto mais uma dissertação. Minha educação, minha cultura, meu voto, minha liberdade, tantos direitos negados às minhas antepassadas, hoje eu tenho como garantido, graças à essas mulheres. Dedico a todas que não se contentaram em ser apenas coadjuvantes no mundo, e que acreditam e fazem outros acreditarem na ideia louca de que homens e mulheres são iguais.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Carlos e Cinthya da Costa Senkiv, por todo o amor, carinho, cuidado e confiança depositados em mim desde o momento em que eu nasci. É esse amor incondicional que me fez seguir meus sonhos e ser tão feliz como sou hoje. Seu exemplo sempre me mostrou como eu queria ser quando crescesse e sinto muito orgulho e admiração em ser sua filha. Agradeço também a minha irmã Joana, que, do seu jeito, sempre me ajudou a entender o tipo de pessoa que eu queria ser. Eu também não seria a mesma sem você, sis.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Prof^a Dr^a Chirlei Glienke, pela oportunidade que me deu, quando eu iniciei minha iniciação científica no LabGeM, há quatro anos atrás e por todas as outras oportunidades que vieram em seguida. De lá pra cá, sua orientação, seu exemplo como profissional, seu apoio, incentivo e amizade me ajudaram a chegar até aqui e me fizeram crescer muito como profissional e como pessoa.

As Prof^a Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro e Prof^a Dr^a Lygia Vitória Galli-Terasawa, por toda a amizade e auxílio no laboratório.

Aos meus queridos amigos do LabGeM, que durante toda a minha permanência no laboratório foram imprescindíveis para o meu trabalho, me auxiliando no que era preciso. Agradeço pela amizade, Alan Silva, Rodrigo Aluizio, Ana Paula Chiaverini, Daiani Savi, Eduardo Goulin, Juliana Wobeto, Marcos Paulo Rosa, Renata Amorim, Marcella Caesar, Desirrê Petters e Juliana Marta Muehmann Fischer. Agradeço em especial minha mamãe LabGênia Lisandra Santos Ferreira Maba, pela amizade, risadas, Skittles, bolachas, carinho, cuidados e preocupações que você teve comigo. E agradeço em especial também meu querido amigo Paulo José Camargo dos Santos, que tanto me ajudou dentro e fora do laboratório. Minhas agrotransformações e minhas sextas à noite não teriam sido as mesmas sem você. Obrigada por tudo e, especialmente, por apagar todas as fotos do Ron.

A todos do FUNDECITRUS, em especial ao Geraldo José Silva Junior, Nelson Arno Wulff e Rosana Gonçalves Pereira, que tanto me auxiliaram na execução desse trabalho e na minhas idas até Araraquara.

A Maria Carolina Vieira da Rocha, pelo imenso auxílio com a PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Trindade e a Prof^a Dr^a Célia Regina Cavichiolo Franco, e ao técnico Israel Bini, por todo o apoio e disponibilidade para me auxiliar.

Ao meus queridos amigos da faculdade Fábio “Japa” Yamasaki, Diego Venantte, Karin Arruda, Samuel Schwaida e demais amigos da turma de 2007/1 de Ciências Biológicas UFPR, pela amizade, pelos inesquecíveis momentos que passamos juntos e pelos momentos que ainda estão por vir. Agradeço especialmente ao Vinicius Richardi, meu querido amigo e companheiro na vida da pós-graduação, para todas as horas e situações definidoras.

A Lisa Welch, por todo o apoio e amizade, apesar dos 10.000 km que nos separam.

A Mayra Limeira da Silva Melo, my beautiful moth, my naïve, sophisticated, newborn baby, o melhor resultado do meu mestrado foi sua amizade. Agradeço a você por tudo que passamos juntas e que venham muito mais momentos assim.

E agradeço especialmente ao meu amado Msc. Antonio Ernesto Meister Luz Marques. Acreditava que namorar meu melhor amigo era o mais feliz que eu podia ser, mas te ver todos os dias me faz acreditar que não há nada que não possamos fazer juntos. Você é minha maior força, meu maior sorriso, meu maior amor.

A CAPES e ao FUNDECITRUS pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Mancha Preta do Citros (MPC) é causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* e afeta praticamente todas as linhagens comerciais de Citros. Está presente em todos os continentes, com exceção da Europa, e causa pontuações escuras, descoloração, lesões deprimidas e manchas pretas na casca do fruto. Para fins de controle da doença, pontos importantes da relação entre a planta hospedeira e o patógeno precisam ser elucidados. O gênero *Phyllosticta* inclui 3.000 espécies, sendo até o momento, 46 espécies bem resolvidas filogeneticamente, e compreende fitopatógenos e endofíticos. O fungo *P. citricarpa* é hospedeiro específico, pois é isolado exclusivamente de plantas cítricas, enquanto outras espécies deste gênero, como *P. capitalensis*, são capazes de colonizar a planta de citros e diversos outros hospedeiros de maneira assintomática e também como patógeno de diversas culturas. O esclarecimento do estilo de vida de cada espécie é extremamente importante para o entendimento e controle das doenças. Desta forma, o presente trabalho teve como foco o estudo da interação das espécies *P. citricarpa* e *P. capitalensis* com plantas de citros, utilizando duas diferentes metodologias. A primeira foi o estudo da interação de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* em folhas de citros aderidas a planta e após serem destacadas. Para tanto, foram obtidas e utilizadas linhagens expressando genes repórteres para proteínas fluorescentes. Os processos de infecção e colonização foram observados em microscopia de fluorescência. Os resultados sugerem diferentes estilos de vida para as duas espécies, sendo que ambas penetram no tecido de folhas destacadas de citros, enquanto somente *P. capitalensis* apresentou penetração quando a folha permanece aderida à planta. Na segunda metodologia empregada, foi realizada a análise do processo de colonização de tecidos da casca de frutos cítricos pela espécie *Phyllosticta citricarpa*, em frutos destacados e não destacados. Para tanto, frutos foram inoculados em diferentes condições e foi avaliada a quantidade de DNA do fungo recuperado 0, 3, 7, 14 e 21 dias após a inoculação. A quantificação do DNA recuperado a partir dos tecidos do fruto foi realizada por meio de qPCR. O experimento foi realizado utilizando-se duas fontes de inóculo: micélio e suspensão de esporos. Observou-se que quando o micélio é inoculado, o desenvolvimento nos primeiros 14 dias após a inoculação (dpi) é crescente, e atinge um crescimento exponencial entre o 14^o e o 21^o dpi. Quando a suspensão de esporos foi utilizada, houve pouca variação na quantidade de DNA de *P. citricarpa* recuperado até o 14^o dpi. Entre o 14^o e o 21^o dpi, houve crescimento exponencial, resultante da germinação dos esporos e subsequente colonização do fruto pelo fungo. Não foram encontradas diferenças entre o desenvolvimento do fungo em frutos destacados ou mantidos na planta, para ambas as formas de inoculação. A sonda de Van Gent-Pelzer et. al (2007) detectou com sucesso o DNA do fungo nas amostras, mesmo quando em pequenas quantidades, mas apontou falso-positivos em amostras controle contendo *P. capitalensis*. Dessa forma, o seu uso não é recomendado como único método de avaliação qualitativa para a presença de *P. citricarpa* em amostras de frutos.

Palavras-chave: *Phyllosticta citricarpa*, *Phyllosticta capitalensis*, Mancha Preta do Citros, PCR em tempo real, transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

ABSTRACT

The Citrus Black Spot (CBS) is caused by the pathogenic fungal *Phyllosticta citricarpa* and affects virtually all commercial strains of Citrus. It is present worldwide, except Europe, and causes discoloration, depressed lesions and black spots on the fruit skin. So the disease can be controlled, some important points of the relationship between the host plant and the pathogen need to be elucidated. Thus, in this paper, we focus on the study of the interaction with *P. citricarpa* and its host plant through two strategies. One it was the transformation of strains of *P. citricarpa* and *P. capitalensis*, a species capable of colonizing citrus plants asymptotically, to obtain transformants capable of expressing the reporter protein DsRed. The transformants were then inoculated on detached and attached leaves and the development was observed by microscopy. The evaluation resulted in signs of colonization by both species in detached leaves, but only *P. capitalensis* was able to enter the leaves that remains adhered to the plant, suggesting an better colonization capacity to the endophytic fungus. Another approach to experimentation focused on the study of methods for inducing symptoms, by inoculation of a strain of *P. citricarpa* in attached and detached fruits, and evaluating the amount of DNA of the fungus five times (day 0, day 3, day 7, day 14 and day 21 after inoculation). Since the induction studies are conducted with detached fruits, and the disease occurring in the field in fruits that are still detached, it is important to investigate possible differences between the behaviors of the fungus in both situations. It was possible to follow the development process of the fungus inoculated either as mycelium or as spore, in both detached and attached fruits. When the mycelium is inoculated, the development in the first 14 days after inoculation increases, and reaches an exponential growth between the 14th and the 21th day. When the spore suspension was inoculated, there is little variation in the amount of DNA until the 14th. Between the 14th and the 21th day, there is an exponential growth, resulting from the outbreak of the spore and subsequent colonization of the fruit by the fungus. No differences were found between the development of the fungus in detached or attached fruits, for both forms of inoculation. The Van Gent-Pelzer et. al (2007) probe successfully detected the DNA of the fungus in the samples, even in small amounts, but noted false positives in control samples containing *P. capitalensis*. Thus, its use is not recommended as sole method of qualitative assessment for the presence of *P. citricarpa* in fruit samples.

Keywords : *Phyllosticta capitalensis* , *Phyllosticta citricarpa* , Citrus Black Spot, real-time PCR , transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PLASMÍDEO pCAMDSRED CONTENDO GENE DE RESISTÊNCIA À HIGROMICINA (hph) E O GENE REPÓRTER dsred.....	16
FIGURA 2 - FOTOMICROGRAFIA DE LINHAGEM TRANSFORMADA LGMF220dsred04 (A e B) E SELVAGEM (C e D) DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> (LGMF220) NOTA: A e C: MICROSCOPIA ÓPTICA; B e D: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	22
FIGURA 3 - IMAGEM DE MICROSCÓPIO MULTIPHOTON CONFOCAL DE LINHAGENS TRANSFORMADAS DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> EXPRESSANDO DSRED (A e B) E <i>Phyllosticta citricarpa</i> EXPRESSANDO GFP (C e D). NOTA: A e C – SOMENTE MICÉLIO; B e D – LINHAGENS INOCULADAS EM FOLHAS. NÃO FOI OBSERVADA FLUORESCÊNCIA EM D. SETAS: ÁREA ESCURA CORRESPONDENTE AO MICÉLIO NÃO FLUORESCENTE.....	23
FIGURA 4 - IMAGEM DE MICROSCÓPIO MULTIPHOTON CONFOCAL DE <i>Phyllosticta capitalensis</i> LGMF220-dsred04 E <i>Phyllosticta citricarpa</i> LGMF06-gfp02 INOCULADOS EM FOLHA DE CITROS DESTACADAS E NÃO DESTACADAS DÁS PLANTAS. AS IMAGENS 3D MOSTRAM A CONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL FEITA PELO MICROSCÓPIO DA SUPERFÍCIE DA FOLHA E DO MICÉLIO SOBRE ELA, COM FOCO EM UM PONTO DA IMAGEM. AS IMAGENS DE CORTE MOSTRAM ESSE MESMO PONTO EM CORTE TRANSVERSAL E LONGITUDINAL. SETAS: REGIÃO ONDE O FUNGO PERFURA A SUPERFÍCIE DA FOLHA.	24
FIGURA 5 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FOLHAS DE CITROS DESTADAS E INOCULADAS COM <i>P. capitalensis</i> LGMF220dsred04 (A-C) E <i>P. citricarpa</i> LGMF06gfp02 (D-F).....	25
FIGURA 6 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE LUZ (A-C) E DE EPIFLUORESCÊNCIA (D-F) DE ESPOROS DE LGMF06- gfp02 INOCULADOS EM FOLHAS DESTACADAS. NOTA: A-D: APÓS 2 DIAS; B-E: APÓS 7 DIAS; C-F: APÓS 14 DIAS. AUMENTO: 20x.	28
FIGURA 7 - CURVA PADRÃO DERIVADA DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL	37

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DIFERENTES TRATAMENTOS REALIZADOS NO EXPERIMENTO DE INOCULAÇÃO EM FOLHAS DE <i>Citrus sp.</i>	19
QUADRO 2 - PROPORÇÕES UTILIZADAS PARA O INÓCULO DE CO-CULTIVO.	20
QUADRO 3- DIFERENTES TRATAMENTOS REALIZADOS EM EXPERIMENTO DE INOCULAÇÃO DE <i>Phyllosticta citricarpa</i> EM FRUTOS DE LARANJEIRA	35

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - VALORES MÉDIOS DE Ct	37
GRÁFICO 2 – RESULTADO MÉDIO DA QUANTIDADE DE DNA (ng) DOS TRATAMENTOS 1 A 6, POR DIA. NOTA: DESTACADO – FRUTO NÃO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CAMARA ÚMIDA; PLANTA – FRUTO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO; MICÉLIO/ESPORO/CONTROLE – FONTE DE INÓCULO UTILIZADO NO FRUTO.....	38
GRÁFICO 3 – QUANTIFICAÇÃO DO DNA DOS TRATAMENTOS 3 E 4, POR DIA EM FRUTOS DESTACADOS E NA PLANTA. DESTACADO – FRUTO NÃO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CAMARA ÚMIDA; PLANTA – FRUTO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO; MICÉLIO – FONTE DE INÓCULO UTILIZADO NO FRUTO.....	38
GRÁFICO 4 - QUANTIFICAÇÃO DO DNA DOS TRATAMENTOS 1 E 2, POR DIA EM FRUTOS DESTACADOS E NA PLANTA. DESTACADO – FRUTO NÃO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CAMARA ÚMIDA; PLANTA – FRUTO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO; ESPORO – FONTE DE INÓCULO UTILIZADO NO FRUTO.....	39
GRÁFICO 5 - VALORES MÉDIOS DE Ct DO SEGUNDO EXPERIMENTO.....	40
GRÁFICO 6 - QUANTIFICAÇÃO DO DNA DOS TRATAMENTOS 7 A 10, POR DIA EM FRUTOS DESTACADOS E NA PLANTA. DESTACADO – FRUTO NÃO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CAMARA ÚMIDA; PLANTA – FRUTO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO; ESPORO/CONTROLE – FONTE DE INÓCULO UTILIZADO NO FRUTO.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
3	CAPÍTULO I – Comparação dos processos de colonização de plântulas cítricas por linhagens das espécies <i>Phyllosticta citricarpa</i> e <i>P. capitalensis</i> expressando genes repórteres.	14
3.1	Introdução	14
3.2	Materiais e Métodos	16
3.2.1	Material Biológico	16
3.2.2	Agrotransformação das linhagens de <i>P. capitalensis</i>	17
3.2.2.1	Avaliação dos transformantes	17
3.2.3	Avaliação da infecção em folhas de citros	18
3.2.3.1	Avaliação das folhas inoculadas	19
3.3	Resultados	20
3.3.1	Agrotransformação das linhagens de <i>P. capitalensis</i>	20
3.3.2	Avaliação dos transformantes	21
3.3.3	Avaliação da infecção em folhas de citros	22
3.4	Discussão	25
3.5	Conclusões	29
3.6	Referências	29
4	CAPÍTULO II – Análise por qPCR de desenvolvimento de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em frutos destacados e na planta.	33
4.1	Introdução	33
4.2	Materiais e Métodos	34
4.2.1	Material biológico	34
4.2.2	Inoculação de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em frutos	34
4.2.3	Avaliação dos experimentos	36
4.3	Resultados	36
4.3.1	Inoculação de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em frutos	36
4.3.2	Avaliação dos experimentos	36
4.4	Discussão	41
4.5	Conclusões	44
4.6	Referências	45
5	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se mundialmente na produção agrícola, e dentre suas atividades mais representativas está a citricultura. O país é o maior produtor mundial de laranja, com 18 milhões de toneladas produzidas em 2012 (FAO, 2014). O cultivo de citros está presente em vários municípios do país, sendo seus maiores produtores os estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Bahia, e Sergipe (IBGE, 2013).

Mesmo com a sua grande representatividade no cenário internacional da exportação de citros, a produtividade brasileira é afetada por problemas fitossanitários, como a clorose variegada dos citros, a leprose, o cancro cítrico, o “greening”, e a Mancha Preta do Citros (MPC). A MPC é causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa (1973), (fase sexual: *Guignardia citricarpa* Kiely(1948)). Com a deleção do Artigo 59 do Código Internacional de Nomenclatura de algas, fungos e plantas, que permitia nomes diferentes para formas sexuais diferentes do fungo, em vigor desde 1º de janeiro de 2013, permaneceu em uso o nome cujo o gênero foi descrito primeiro (HAWKSORTH, 2011). Como *Phyllosticta* foi descrito em 1818, e *Guignardia* em 1892, o nome atualmente em uso é *Phyllosticta citricarpa* (GLIENKE *et al.*, 2011; WIKKEE *et al.*, 2013).

Todas as linhagens comerciais de laranja-doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), assim como os limões (*C. limon* (L.) Burm.) e outras variedades de *Citrus* spp. são suscetíveis à doença. São exceção a laranja azeda (*C. aurantium* L.) e seus híbridos, que são resistentes (KOTZÉ, 1981), e a lima ácida Tahiti (*C. latifolia*), que é insensível a doença, embora o fungo possa ser isolado de suas folhas e frutos (BALDASSARI *et al.*, 2008).

A doença se manifesta através de pontuações escuras, descoloração, lesões deprimidas e manchas pretas na casca do fruto. Atualmente está presente em países da África, Ásia, Oceania, América do Sul, América do Norte e Caribe. É um patógeno quarentenário A1 na Europa, sendo a entrada de frutos com sintomas de MPC impedida por barreiras fitossanitárias, o que impede sua exportação. Apesar de não alterar a qualidade interna do fruto, a presença da MPC ocasiona depreciação do produto no mercado interno, devido aos sintomas na casca, sendo o

fruto pouco atrativo ao consumidor. Além disto, pode ocorrer a queda prematura dos frutos, o que também acaba comprometendo a produção.

O controle da MPC se dá, principalmente, pelo emprego de fungicidas, que devem ser pulverizados de duas a seis vezes por ano, devido ao longo período de suscetibilidade dos frutos, e números maiores de aplicações caso os frutos sejam destinados para o comércio de fruta fresca (FUNDECITRUS, 2008). Essas aplicações elevam o custo do controle para o produtor e acabam encarecendo o produto.

Há necessidade de que alternativas eficientes de controle da doença, mais baratas e menos prejudiciais, sejam desenvolvidas. Entretanto, pontos importantes da relação entre a planta hospedeira e o patógeno ainda são desconhecidos. Esses pontos precisam ser esclarecidos para a total compreensão da epidemiologia da MPC e subsequente desenvolvimento de alternativas de medida de controle. Desta forma, o presente trabalho teve como foco o estudo da interação *P. citricarpa* com sua planta hospedeira.

O estudo foi realizado por meio de duas diferentes metodologias. A primeira foi o estudo de interação de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* (espécie capaz de colonizar a planta de citros de maneira assintomática) com a sua planta hospedeira. Para tanto, foram obtidas linhagens expressando genes repórteres para proteínas fluorescentes, que foram inoculadas em folhas aderidas à planta e após serem destacadas. Os processos de infecção e colonização foram então observados em microscopia.

Na segunda metodologia empregada, foi realizada a análise do processo de colonização de tecidos da casca de frutos cítricos pela espécie *Phyllosticta citricarpa*, em frutos destacados e não destacados. Este experimento visa auxiliar no esclarecimento das diferenças observadas nos processos de desenvolvimento de lesões de MPC em frutos cítricos. Observou-se que em experimentos de indução de sintomas de MPC em frutos na planta, ocorre o desenvolvimento de lesões mesmo na ausência de injúria. Entretanto, quando tais experimentos são realizados em frutos destacados em condições de laboratório, o desenvolvimento de lesões somente ocorre se o fungo for inoculado em injúrias provocadas artificialmente na superfície do fruto (Goulin, 2012). Três hipóteses são levantadas para tentar explicar tal diferença: 1) Os esporos de *P. citricarpa* não germinam na superfície do fruto

quando este não está aderido ao fruto; 2) Os esporos de *P. citricarpa* germinam mas não ocorre a infecção da casca em frutos destacados da planta; 3) O fungo apresenta germinação e penetração mas as lesões características de MPC dependem da resposta do fruto ao processo de infecção, que não ocorrem quando o fruto foi destacado. Essa avaliação foi realizada por meio de avaliação diferencial da quantidade do DNA do patógeno nos frutos nas duas situações, ao longo do tempo.

2 OBJETIVOS

- Obter transformantes do fungo *Phyllosticta capitalensis* expressando o gene repórter *DsRed*, que codifica para a proteína fluorescente vermelha, via *Agrobacterium tumefaciens*.

- Comparar os processos de colonização de plântulas cítricas por linhagens transformadas das espécies *Phyllosticta citricarpa* e *P. capitalensis*.

- Comparar os processos de infecção e colonização de frutos cítricos na planta e destacados pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* por meio de qPCR.

3 CAPÍTULO I – Comparação dos processos de colonização de plântulas cítricas por linhagens das espécies *Phyllosticta citricarpa* e *P. capitalensis* expressando genes repórteres.

3.1 Introdução

A Mancha Preta do Citros (MPC) é uma doença que causa muitas perdas para as culturas de frutos cítricos no Brasil e no mundo. A MPC ocasiona formações de manchas escuras nas cascas dos frutos, sem danificar internamente o produto, e é causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa. Anteriormente também chamada de *Guignardia citricarpa*, nome da sua forma sexuada, desde 1º de Janeiro de 2013 é usado exclusivamente o nome cujo gênero é o mais antigo, sendo então utilizado *Phyllosticta citricarpa* (HAKSWORTH *et al*, 2011; GLIENKE *et al*, 2011; WIKKEE *et al.*, 2013).

O risco da MPC está associado à queda prematura dos frutos e sua desvalorização no mercado, por ser menos atrativo ao consumidor devido às lesões na casca. Diversas variedades de *Citrus sp.* são suscetíveis à doença, incluindo todas as linhagens comerciais de laranja-doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e limões (*C. limon* (L.) Burm.). A MPC está presente na Oceania, África, Ásia e América, tendo sido relatada em pomares da Florida em 2010 (SCHUBERT, 2013). É considerada doença quarentenária A1 na Europa, o que impede a exportação de frutos oriundos de pomares localizados em regiões onde a MPC esteja presente.

A facilidade de disseminação pelo vento ou por material propagativo faz com que a doença se espalhasse facilmente. O ciclo da MPC no fruto se inicia quando as folhas de citros infectadas caem e entram em decomposição. Nelas surgem os ascósporos, que são dispersos pelo vento e são responsáveis por infectar folhas e frutos de outras plantas do pomar de citros (HUANG, 1972; REIS, 2006). Quando isso ocorre o fungo causa lesões nas cascas dos frutos, onde são produzidos os picnidíósporos, que podem dispersar a doença em curtas distâncias, por água da chuva (SPOSITO, 2008). A doença pode permanecer em fase latente, sem que apareçam sintomas (McONIE, 1964). A espécie *P. citricarpa* foi até o momento, relatada exclusivamente em plantas de citros, sendo um fungo hospedeiro-específico.

Por outro lado, *Phyllosticta capitalensis*, é um fungo cosmopolita (Glienke *et al.*, 2011), sendo encontrado como endofítico de plantas cítricas e presente em diversas famílias de plantas lenhosas. Em citros, foi durante muito tempo confundido com a espécie *Phyllosticta citricarpa*, por serem morfológicamente muito semelhantes e serem isolados associados. Entretanto, o fungo *P. capitalensis* não causa a doença MPC (BAAYEN *et al.*, 2002; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; EVERETT, 2006; GLIENKE *et al.*, 2011), mas é relatada como uma espécie patogênica em diversos hospedeiros, como por exemplo, orquídeas (HENNING, 1908; GLIENKE *et al.*, 2011, WIKKE *et al.*, 2013)

Os processos de colonização dessas duas espécies de fungos em plantas de citros ainda são desconhecidos, entretanto, sabe-se que nestas plantas, *P. capitalensis* apresenta colonização como fungo endofítico, enquanto *P. citricarpa* apresenta colonização restrita, mas promove a doença MPC. O estudo comparativo da interação destas duas espécies com plantas de citros pode contribuir para elucidar o mecanismo pelo qual *P. citricarpa* promove a doença MPC. Uma estratégia para esse estudo é a utilização de linhagens que expressem genes para produção de proteínas fluorescentes e subsequente utilização de microscopia de epifluorescência. A inserção de genes repórteres em fungo tem sido realizada com sucesso utilizando-se *Agrobacterium tumefaciens*. A metodologia de agrotransformação já foi utilizada com sucesso para a inserção do gene para a proteína fluorescente verde (GFP) em *Phyllosticta citricarpa* (FIGUEIREDO *et al.*, 2010) e *P. capitalensis* (GOULIN, 2010).

Tendo em vista a autofluorescência verde emitida pela planta de citros, em estudos de interação citros-fungos, é mais indicado o uso de genes que codifiquem para proteína fluorescente vermelha do que a verde, como por exemplo, DsRed. Assim, o presente trabalho visou a obtenção de transformantes da espécie *Phyllosticta capitalensis* expressando o gene repórter *DsRed*, que codifica para a proteína fluorescente vermelha, via *Agrobacterium tumefaciens*. Objetivou ainda comparar os processos de colonização de plântulas cítricas por linhagens transformadas das espécies *Phyllosticta citricarpa* e *P. capitalensis*.

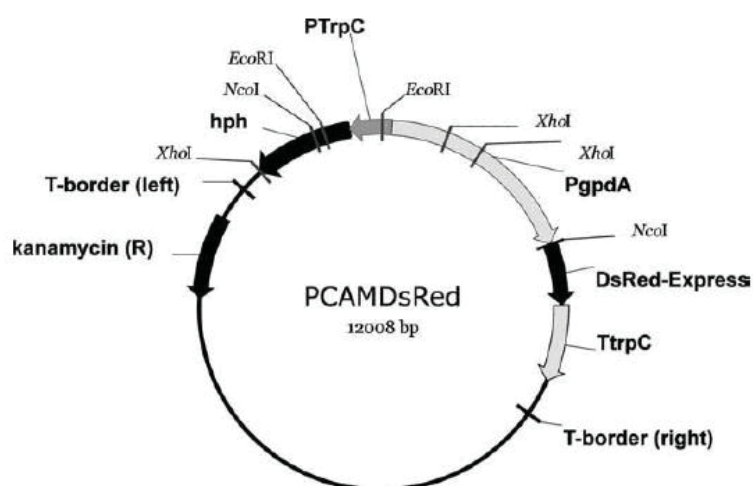
3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Material Biológico

A linhagem selvagem de *Phyllosticta capitalensis* (LGMF220) e a linhagem de *P. citricarpa* transformada com o gene para a proteína repórter GFP (LGMF06-2-GFP) pertencem a coleção de cultura do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná. O transformante LGMF06-2-GFP foi selecionado por possuir crescimento semelhante ao do fungo selvagem (TORQUES, 2011).

A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal (Embrapa/Soja – Londrina, PR), e contém o plasmídeo *pCAMDsRed* (FIGURA 1 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**), que possui o gene *DsRed*, capaz de codificar para a proteína fluorescente vermelha, o gene *hph*, que confere resistência à higromicina, e o gene *npt II*, que codifica para neomicina fosfotransferase II, que confere resistência à canamicina, para seleção em bactéria.

FIGURA 1 - PLASMÍDEO pCAMDSRED CONTENDO GENE DE RESISTÊNCIA À HIGROMICINA (*hph*) E O GENE REPÓRTER *dsred*.



FONTE: Eckert *et al.* (2005).

3.2.2 Agrotransformação das linhagens de *P. capitalensis*

A agrotransformação foi realizada segundo Figueiredo *et al.* (2010), com modificações. A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo *pCAMDsRed* foi repicada em meio Luria-Bertani (LB), acrescida de rifampicina (50µl/ml) e de canamicina (50µl/ml), e mantida a 28 °C por 24h a 180rpm. Após esse tempo, a cultura foi repicada em meio de indução líquido (IM) (10 mM de K₂HPO₄, 10 mM de KH₂PO₄, 2,5 mM de NaCl, 2,0 mM de MgSO₄, 0,7 mM de CaCl₂, 9,0 µM de FeSO₄, 4,0 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% (v/v) de glicerol, 10 mM de glicose e 40 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração, pH 5,3), acrescentado de acetoseringona (AS) 250 µmol, e diluída para uma OD₆₆₀ de 0,15. Quando a OD₆₆₀ atingiu 0,3, foi feita a inoculação de 100 µl da cultura de bactérias em placas contendo meio IM sólido, acrescido de acetoseringona 250 µmol, que já haviam sido inoculadas com o fungo aproximadamente 48h antes. A inoculação do fungo foi feita extraíndo uma pequena quantidade de micélio de uma placa de Petri (com 10 dias de crescimento) e colocando em tubos contendo solução salina. Após homogeneização, a solução foi incubada a 40^o C por 5 minutos. Dessa solução, 100 µl foram colocados em cada placa de Petri e distribuídos pelo meio IM com o auxílio de uma alça de Drigalski.

Após a inoculação da bactéria sobre as placas contendo o fungo, seguiu-se um tempo de 48h de co-cultivo, em que as placas foram mantidas a 28^o C. Ao término do tempo, o meio seletivo M-100, acrescido de higromicina (100 µl/ml) e cefatoxima (200 µl/ml) foi derramado sobre as placas, para que somente os fungos transformados, resistentes à higromicina, fossem capazes de crescer por ele. Cada possível transformante foi transferido para placas contendo meio Batata-Dextrose-Agar (BDA), e foram repicados nesse meio por mais cinco vezes, e após, novamente repicado em meio seletivo, para avaliação de estabilidade mitótica.

3.2.2.1 Avaliação dos transformantes

Os fungos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, modelo Zeiss Axiophot, câmera de captura de imagens monocromática CCD e software Spectral Acquisition), filtro TRITC (545/30 nm, 620/60 nm).

Para confirmar a presença do gene de resistência a higromicina (*hph*), o DNA dos transformantes foi extraído com o kit de extração UltraClean® microbial DNA Isolation Kit (MO BIO®), segundo instruções do fabricante, e submetido a PCR com os *primers* *hph1* (5'AGCGTCTCCGACCTGATG3) e *hph2* (5'CGACGGACGCACTGACGG3'), segundo Malonek e Meinhardt (2001). Para cada reação, utilizou-se 20 ng de DNA do fungo transformado, 2mM MgCl₂, 0,1mM de cada dNTP, tampão de PCR 1X, 0,4µM de cada um dos *primers* e 1U de Taq Polimerase. As condições da PCR foram: 94°C por 5min; seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 30s e 72°C por 7min. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler da Eppendorf. O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, visualizado em luz UV (Ultraviolet Benchtop transilluminators) e em seguida fotografado (Digi doc it software).

Os transformantes foram avaliados quanto ao seu crescimento em comparação com a linhagem selvagem durante 30 dias. As linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura BDA pH 5,8, a partir de discos de 1 cm de diâmetro, contendo micélio com 10 dias de crescimento. As placas foram incubadas em B.O.D a 28°C. A taxa de crescimento micelial das linhagens foi avaliada por medidas realizadas ao longo dos eixos x e y, a cada 7 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

3.2.3 Avaliação da infecção em folhas de citros

Após a avaliação de crescimento, um transformante de *P. capitalensis* (LGMF220-dsred04) foi selecionado para inoculação em laranjeiras (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) com aproximadamente dois anos de vida.

O experimento foi realizado em seis tratamentos, conforme Quadro 1. A inoculação foi realizada utilizando-se duas metodologias: uma inoculando as folhas com suspensão de micélio e a outra com suspensão de esporos dos transformantes.

Os fungos foram repicados em meio BDA e, após 10 dias, uma pequena quantidade de micélio foi retirada e colocada em tubos contendo solução salina, que

foram homogeneizados e incubados por 5 minutos a 40⁰ C. A suspensão de esporos foi obtida de fungos crescidos em meio BDA por aproximadamente 20 dias, através de lavagem das placas com solução salina, e a concentração utilizada foi de 2 x 10⁵ esporos/ml.

As folhas a serem inoculadas foram lavadas com água, e metade delas foram destacadas das plantas. Cada folha recebeu duas gotas de 20µl da suspensão de micélio ou esporos, conforme Quadro 1.

QUADRO 1 – DIFERENTES TRATAMENTOS REALIZADOS NO EXPERIMENTO DE INOCULAÇÃO EM FOLHAS DE *Citrus sp.*

Tratamento	Espécie / Linhagem inoculada	Fonte de inóculo	Condição da folha	Avaliação	Resultado
1	<i>P. citricarpa</i> / LGMF06-gfp02	Esporos	Na planta	Microscopia Eletrônica de Varredura	Baixa germinação
2		Micélio	Na planta	Confocal Multifoton	Sem penetração
3			Destacada	Confocal Multifoton	Penetração
4	<i>P. capitalensis</i> / LGMF220-dsred04	Esporos	Na planta	Microscopia Eletrônica de Varredura	Germinação e apressório
5		Micélio	Na planta	Confocal Multifoton	Penetração
6			Destacada	Confocal Multifoton	Penetração

FONTE: A autora (2014).

3.2.3.1 Avaliação das folhas inoculadas

Nas folhas dos tratamentos 2, 3, 5 e 6, após 20 dias, a região onde foi realizado o inóculo foi recortada e colocada em lâmina de vidro sobre uma gota de água destilada, coberta com lamínula e selada com esmalte. As lâminas foram avaliadas em microscópio Nikon A1R MP+ Multiphoton Confocal.

As folhas dos tratamentos 1 e 4 , após 90 dias, foram preparadas para análise em microscópio de varredura, através de desidratação com álcool, ponto crítico e metalização com ouro (SILVEIRA, 1989). As amostras foram avaliadas em microscópio de varredura VEGA3 Tescan.

3.3 Resultados

3.3.1 Agrotransformação das linhagens de *P. capitalensis*

Para a obtenção do protocolo apresentado e das linhagens transformadas, diversas variações foram testadas. A aplicação do protocolo segundo Figueiredo (2010) foi tentada sem sucesso. A dificuldade de conseguir esporos em alta concentração (maior ou igual a 10^6) levou a necessidade de buscar a utilização do micélio para a transformação.

Testes foram feitos com realização da inoculação do fungo com *A. tumefaciens* em papéis filtros (DE GROOT, 1998; SEBASTIANES *et al.*, 2012) autoclavados, que, após o tempo de co-cultivo, eram transferidos para o meio seletivo BDA, acrescido de higromicina (100 μ l/ml) e cefatoxima (200 μ l/ml). Essa técnica não apresentou resultados positivos e mostrou-se trabalhosa e com grande demanda de materiais.

A concentração de acetoseringona (AS) adicionada ao meio IM também foi variada. Enquanto grande parte dos experimentos utilizou-se de 200 μ M de AS, no protocolo que apresentou resultados positivos foi utilizada a concentração de 250 μ M. A proporção do volume de inóculo de *A. tumefaciens* e dos fungos também foi variado (QUADRO 2), sendo que o volume de 100 μ l para ambos foi o que resultou em transformantes.

QUADRO 2 - PROPORÇÕES UTILIZADAS PARA O INÓCULO DE CO-CULTIVO.

Tratamento	Volume de inóculo do fungo	Volume de inóculo de <i>A. tumefaciens</i>	Resultado
1	100 μ l	100 μ l	+
2	100 μ l	200 μ l	-
3	200 μ l	100 μ l	-
4	200 μ l	200 μ l	-

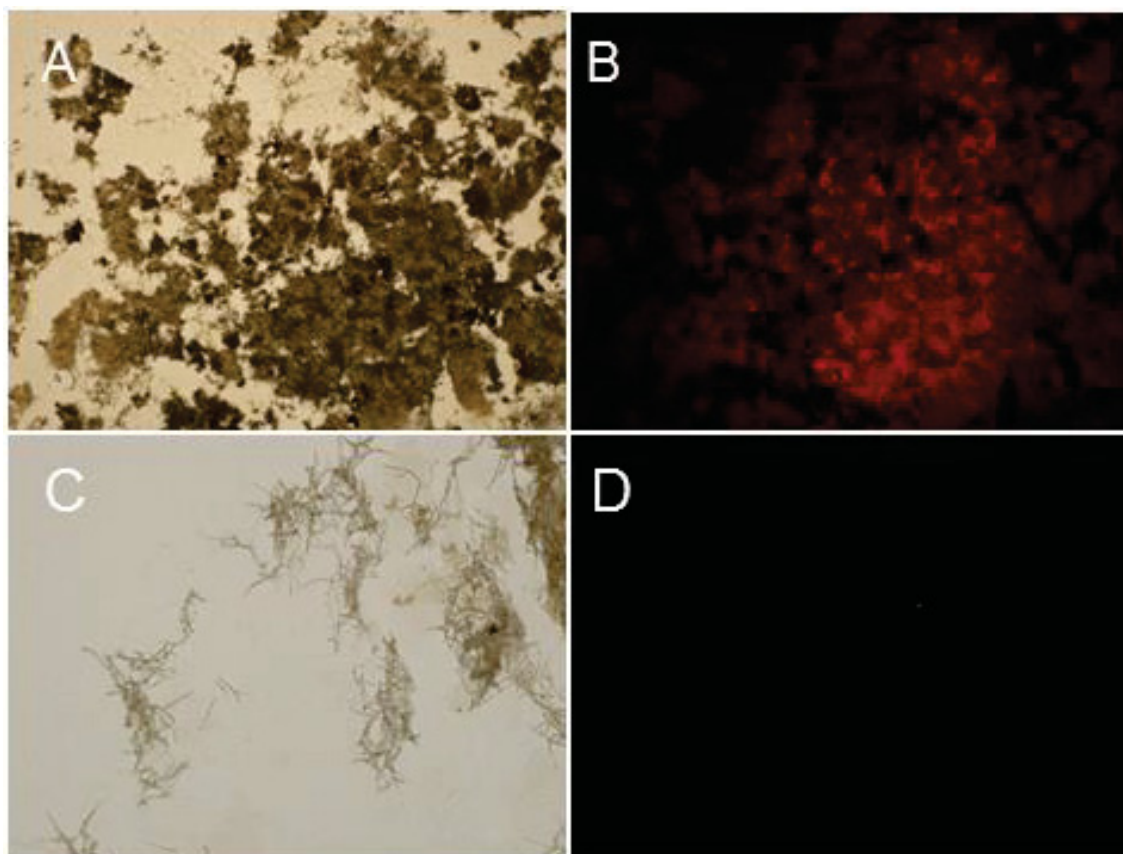
Após tentativas sem sucesso de inocular o fungo e *A. tumefaciens* ao mesmo tempo para o co-cultivo, a variação de inocular o fungo horas antes da inoculação da bactéria foi testada. Isso se justifica pelo crescimento muito lento da linhagem em oposição ao crescimento rápido da bactéria. A intenção era que o fungo já estivesse crescendo sobre a placa quando *A. tumefaciens* fosse inoculada, (ABUODEH *et al.*, 2000). Testes foram feitos com placas inoculadas com *P. capitalensis* 48h e 24h antes da inoculação da bactéria. Todas as linhagens transformantes obtidas vieram de placas que haviam sido inoculadas 48h antes.

O tempo de duração do co-cultivo foi variado para aumentar as chances de interação entre o fungo e a bactéria. Foram feitos experimentos com placas em co-cultivo por 48h e por 72h, sendo que todas as linhagens transformadas vieram de placas com 48h de co-cultivo.

3.3.2 Avaliação dos transformantes

Inicialmente, 53 possíveis transformantes de *P. capitalensis* foram retirados das placas de meio seletivo e submetidos a avaliação de estabilidade mitótica. Destes, cinco transformantes continuaram a crescer e foram avaliados em microscopia de epifluorescência. Todos apresentaram emissão de fluorescência vermelha (FIGURA 2). O transformante LGMF220-dsred04 apresentou o crescimento similar à linhagem selvagem após 30 dias, e foi selecionado para as análises subsequentes.

FIGURA 2 - FOTOMICROGRAFIA DE LINHAGEM TRANSFORMADA LGMF220dsred04 (A e B) E SELVAGEM (C e D) DE *Phyllosticta capitalensis* (LGMF220) NOTA: A e C: MICROSCOPIA ÓPTICA; B e D: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA



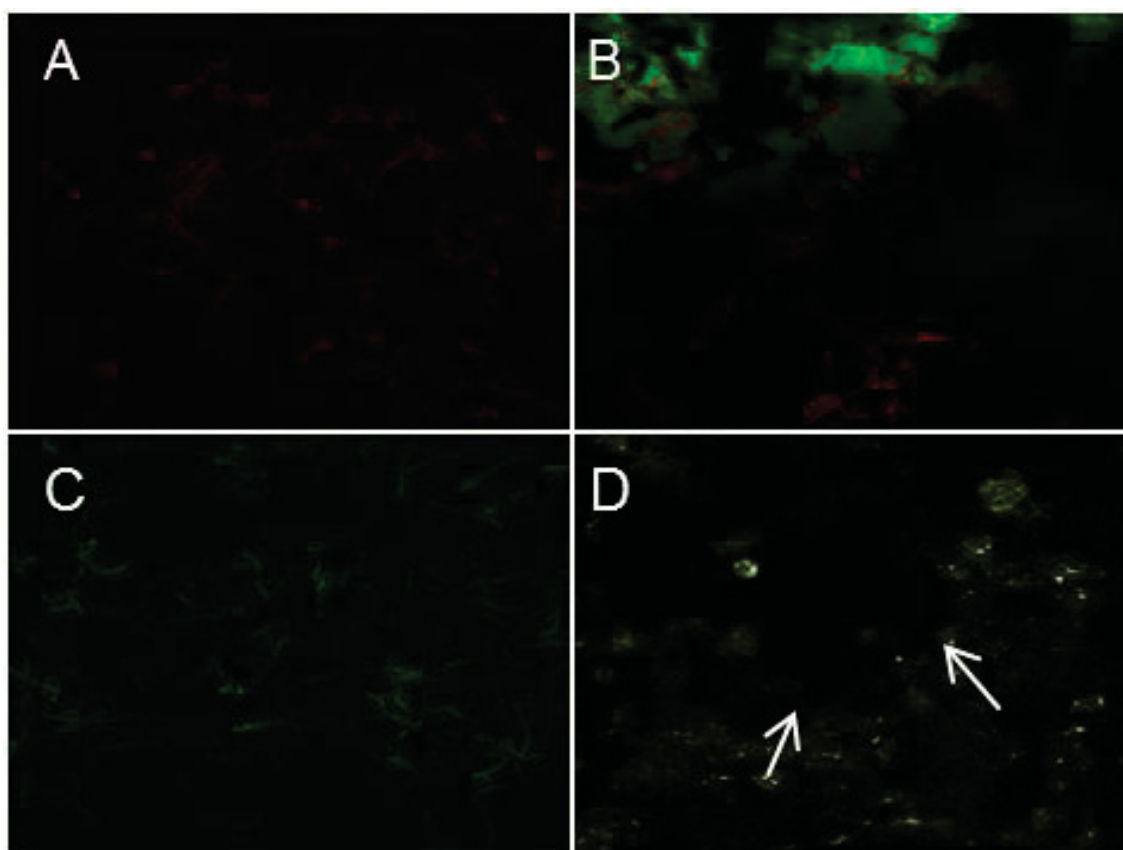
FONTE: A autora (2014)

3.3.3 Avaliação da infecção em folhas de citros

A observação das folhas de citros foi realizada em microscópio Nikon A1R MP+ Multiphoton Confocal. Após inoculação com a linhagem LGMF220-dsred04 utilizando-se o filtro TRITC revelou a emissão de fluorescência vermelha pelo transformante (FIGURA 3). No entanto, utilizando o filtro FITC, não observou-se emissão de fluorescência quando a linhagem LGMF06- gfp02 de *P. citricarpa* foi inoculada em folhas de citros, (FIGURA 3). Isso provavelmente ocorreu devido ao espectro da fluorescência emitida pela folha de laranjeira e da fluorescência da proteína GFP expressada pelo fungo serem muito similares, tornando difícil sua diferenciação. Desta forma, optou-se pela utilização da construção de canais virtuais

(496-508 nm; 526- 556 nm; 586-658 nm) para escaneamento do microscópio Nikon A1R MP+ Multiphoton Confocal. Assim, observou-se a emissão de fluorescência pela linhagem LGMF06gfp02 (FIGURA 4).

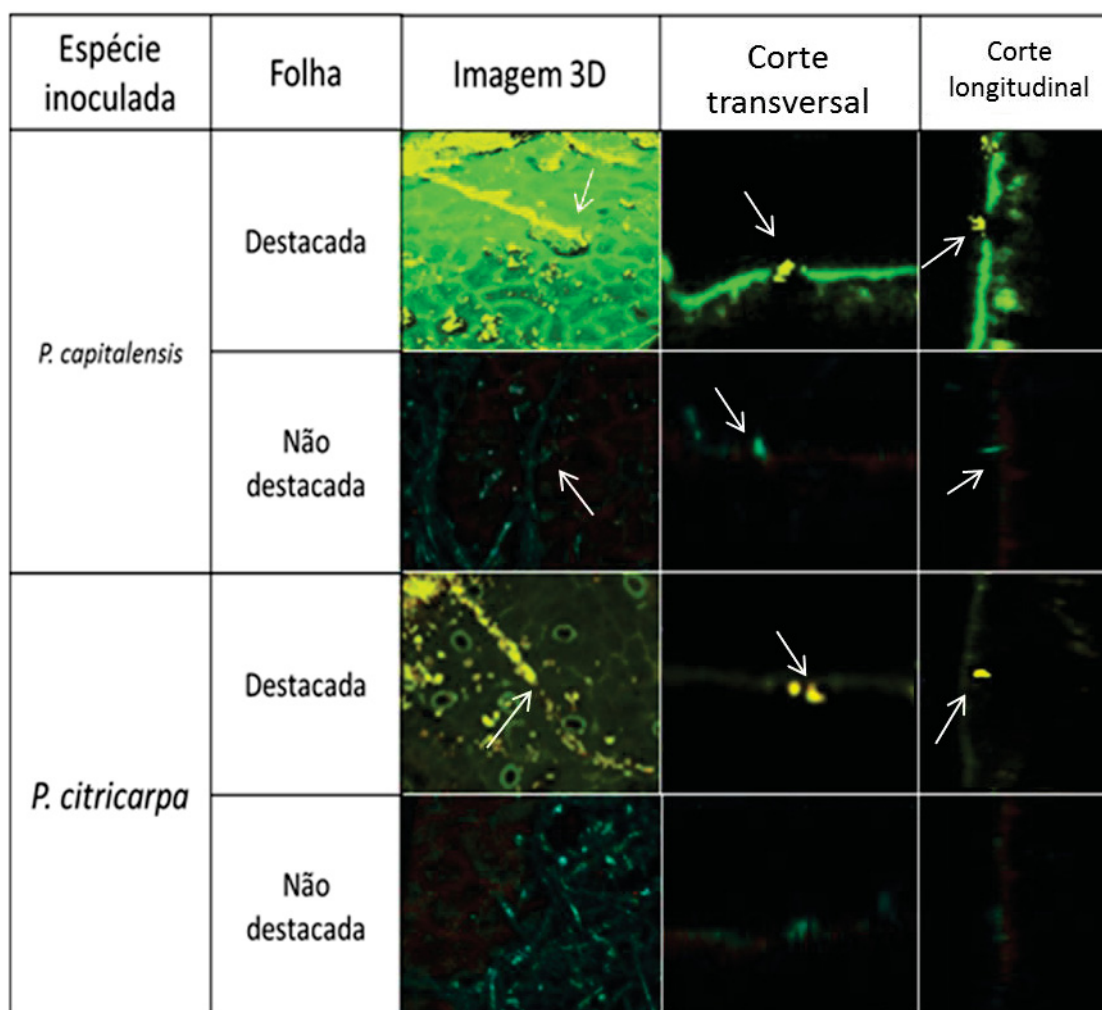
FIGURA 3 - IMAGEM DE MICROSCÓPIO MULTIPHOTON CONFOCAL DE LINHAGENS TRANSFORMADAS DE *Phyllosticta capitalensis* EXPRESSANDO DSRED (A e B) E *Phyllosticta citricarpa* EXPRESSANDO GFP (C e D). NOTA: A e C – SOMENTE MICÉLIO; B e D – LINHAGENS INOCULADAS EM FOLHAS. NÃO FOI OBSERVADA FLUORESCÊNCIA EM D. SETAS: ÁREA ESCURA CORRESPONDENTE AO MICÉLIO NÃO FLUORESCENTE



FONTE: A autora (2014).

Após a visualização das lâminas, podem-se perceber regiões onde o fungo *P. capitalensis* LGMF220Dsred04 penetra na folha de citros (FIGURA 4), sugerindo o início de sua colonização em ambas os tratamentos: folhas destacadas e na planta. Por outro lado, o transformante gfp02 de *P. citricarpa* LGMF06, foi observado penetrando os tecidos foliares apenas quando inoculados em folhas destacadas (FIGURA 4 e QUADRO 1).

FIGURA 4 - IMAGEM DE MICROSCÓPIO MULTIPHOTON CONFOCAL DE *Phyllosticta capitalensis* LGMF220-dsred04 E *Phyllosticta citricarpa* LGMF06-gfp02 INOCULADOS EM FOLHA DE CITROS DESTACADAS E NÃO DESTACADAS DÁS PLANTAS. AS IMAGENS 3D MOSTRAM A CONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL FEITA PELO MICROSCÓPIO DA SUPERFÍCIE DA FOLHA E DO MICÉLIO SOBRE ELA, COM FOCO EM UM PONTO DA IMAGEM. AS IMAGENS DE CORTE MOSTRAM ESSE MESMO PONTO EM CORTE TRANSVERSAL E LONGITUDINAL. SETAS: REGIÃO ONDE O FUNGO PERFURA A SUPERFÍCIE DA FOLHA.

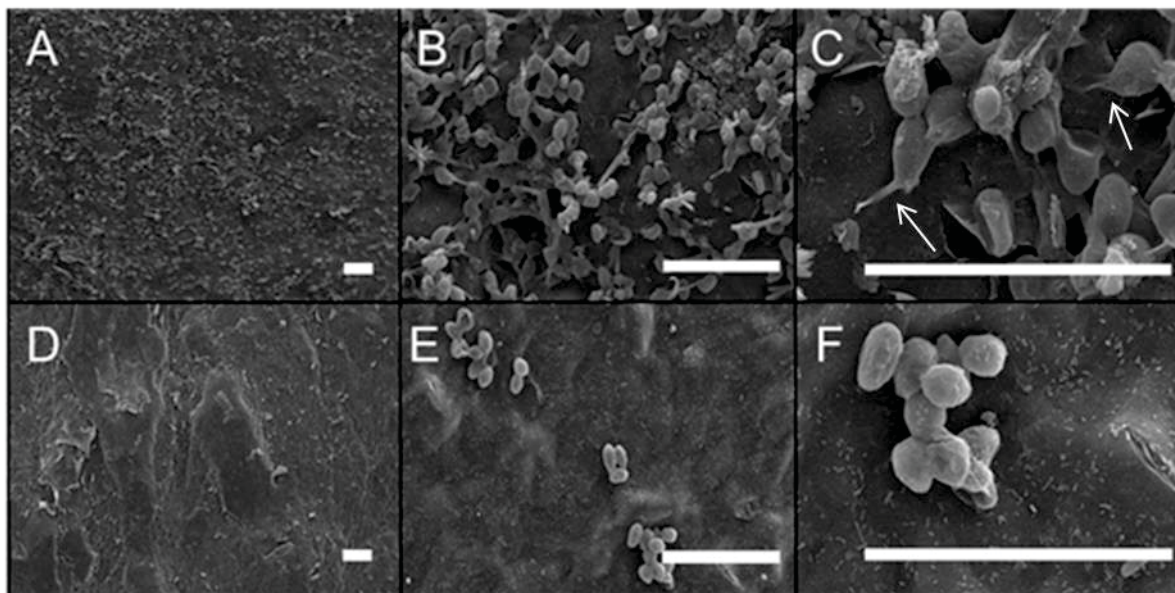


NOTA: PARA *P. citricarpa* INOCULADA EM FOLHA NÃO DESTACADA DA PLANTA DE CITROS, NÃO HÁ INDÍCIOS DE PERFURAÇÃO DA SUPERFÍCIE FOLIAR E PENETRAÇÃO.

FONTE: A autora (2014)

As imagens resultantes da microscopia de varredura demonstram o desenvolvimento dos esporos dos transformantes de *P. citricarpa* e *P. capitalensis* inoculados em folhas de laranjeira (FIGURA 5).

FIGURA 5 - IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE FOLHAS DE CITROS DESTADAS E INOCULADAS COM *P. capitalensis* LGMF220dsred04 (A-C) E *P. citricarpa* LGMF06gfp02 (D-F).



FONTE: A autora (2014).

NOTA: SETAS INDICAM FORMAÇÃO DE APRESSÓRIO EM ESPOROS. BARRA = 50 μm.

3.4 Discussão

Controles sem o uso de AS foram feitos, mas não houve transformação, evidenciando a importância de AS para a indução dos genes *vir* e consequentemente, para o processo da transferência do plasmídeo de *A. tumefaciens* (DE GROOT *et al.*, 1998; BUNDOCK *et al.*, 1995). Apesar de ter sido demonstrado que para *Hebeloma cylindrosporum* e *Colletotrichum trifolii*, AS não é estritamente necessária nas pré-culturas (COMBIER *et al.*, 2003; TAKAHARA *et al.*, 2004; MÛNCH *et al.*, 2011), a sua concentração na fase de co-cultivo, além de necessária, tende a ser proporcional ao número de transformantes obtidos. Segundo Leclerque *et al.* (2004), que estudaram o sucesso da variação na concentração de AS no co-cultivo desde 100 μM até 500 μM, quanto maior a concentração, maior o número de transformantes obtidos.

O aumento na quantidade de bactérias inoculadas não resultou em sucesso na transformação, similarmente aos resultados obtidos por Meyer *et al.* (2003),

provavelmente devido a limitações nutricionais e espaciais. Uma maior quantidade inoculada dos fungos também não se mostrou eficiente neste trabalho, provavelmente pelos mesmos motivos limitantes de crescimento.

Diversos estudos com transformação demonstram que fungos diferentes apresentam tempos ótimos de co-cultivo diferentes (MEYER *et al.*, 2003; MICHIELSE *et al.*, 2005; COMBIER *et al.*, 2003; MULLINS *et al.*, 2001). No presente trabalho, placas em co-cultivo por 48h e por 72h foram testadas, sendo que todos os transformantes foram obtidos das placas com 48h. Esse resultado está de acordo com Figueiredo *et al.* (2010), que realizou a transformação de *P. citricarpa* com a inserção do gene *gfp*, e também manteve o co-cultivo por 48h.

Apesar de que todas as linhagens apresentam fluorescência quando somente seus micélios são observados, durante a avaliação das lâminas das folhas inoculadas, no microscópio Nikon A1R MP+ Multiphoton Confocal, foi possível observar somente a fluorescência do transformante que continha o gene para a proteína DsRed. A fluorescência emitida pela proteína GFP apresentou interferência com a autofluorescência das folhas da laranja, e não foi possível separá-las nas imagens obtidas. Resultados semelhantes foram obtidos por Santos (2013) que relataram que transformantes de *P. citricarpa* expressando a proteína GFP e de *Diaporthe* sp. expressando a proteína DsRed não apresentaram fluorescência quando inoculados em folhas de citros.

No presente trabalho, a utilização do microscópio Nikon A1R MP+ Multiphoton Confocal foi essencial para a observação da fluorescência do DsRed, que aparece discreta em comparação à autofluorescência da folha. Enquanto o DsRed expressa pelo fungo possui um pico de comprimento de onda de 580 nm, as folhas observadas possuem um pico de emissão em torno de 500 nm, sendo possível a sua diferenciação pelo microscópio. Já para o transformante LGMF06-gfp02, observou-se que a proteína GFP é expressa pelo fungo quando em contato com a planta, mas a sua diferenciação não é possível devido ao comprimento de onda do pico de emissão da folha e do GFP serem próximos (aproximadamente 510 nm). Assim, para experimentos futuros envolvendo inoculação de fungos em laranjeira, recomenda-se a utilização de genes repórteres diferentes do *gfp*.

Em relação às análises de infecção de folhas de citros pelas linhagens LGMF06gfp02 de *P. citricarpa* e LGMF220dsred04 de *P. capitalensis*, foi possível

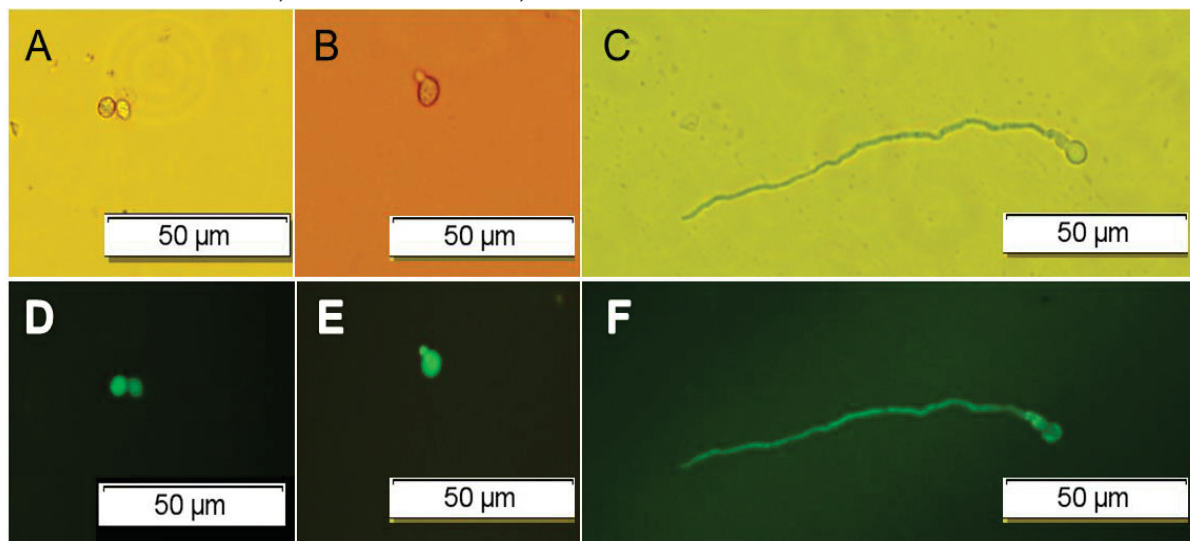
observar diversas regiões onde o fungo apresenta penetração do tecido foliar. Essa penetração é melhor observada na Figura 4 nas imagens tridimensionais obtidas, e também com as imagens em corte, que oferecem a visão de corte transversal e longitudinal de qualquer ponto da imagem.

As regiões que sugerem a penetração da folha pelos fungos na folha apresentam a superfície da folha intacta, com a hifa do fungo visível por cima dela, até um dado ponto onde a superfície da folha é rompida e a hifa parece atravessá-la (Figura 4). Tal penetração foi observada para *P. capitalensis* LGMF220dsred04 tanto nas inoculações em folhas destacadas quanto em folhas mantidas na planta. Por outro lado, o fungo *P. citricarpa* LGMF06gfp02 apenas penetrou no tecido foliar quando inoculado em folhas destacadas.

Na observação das imagens obtidas em microscopia de varredura, nota-se que mesmo após 90 dias, enquanto *P. capitalensis* apresentou germinação dos esporos, formação de apressório e *peg* de penetração, o *P. citricarpa* apresentou baixa taxa de germinação de esporos. Pode-se observar que mesmo após 90 dias, a maioria dos esporos permaneceram na superfície foliar sem apresentar germinação (FIGURA 5).

Em experimento visando observar a sobrevivência de esporos de *P. citricarpa* LGMF06gfp02 em folhas destacadas de laranjeira, folhas esterilizadas foram colocadas em placa de Petri e 30 μ l de suspensão de esporos (10^5 esporos/ml, obtidos de placas com 20 dias de crescimento, através de lavagem com solução salina) foram depositados em suas superfícies. Algodão hidratado foi utilizado para manter câmara úmida. As placas foram mantidas em temperatura ambiente. Após 2, 7 e 14 dias, as gotas contendo os esporos eram recolhidas com utilização de micropipeta. Em caso de evaporação, 30 μ L de solução salina eram recolados sobre o local de inoculação e, após homogeneização, a nova gota era recolhida. Aplicou-se em lâmina de vidro coberta com lamínula para avaliação em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, modelo Zeiss Axiophot) (FIGURA 6). As imagens mostram a germinação dos esporos a partir do sétimo dia e a formação de hifas no 14º dias.

FIGURA 6 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE LUZ (A-C) E DE EPIFLUORESCÊNCIA (D-F) DE ESPOROS DE LGMF06- gfp02 INOCULADOS EM FOLHAS DESTACADAS. NOTA: A-D: APÓS 2 DIAS; B-E: APÓS 7 DIAS; C-F: APÓS 14 DIAS. AUMENTO: 20x.



FONTE: A autora (2013).

Estes resultados demonstram que *Phyllosticta citricarpa* apresenta desenvolvimento (germinação e crescimento) na superfície de folhas de citros destacadas, sendo que após 14 dias de inoculação de uma suspensão de esporos, é observado o desenvolvimento de hifas. Isso, no entanto não ocorre quando a folha ainda se encontra aderida à planta (FIGURA 5). Entretanto, os esporos de *P. capitalensis* germinam na folha não destacada, e ocorreu penetração da folha em ambas as situações (folhas destacadas e aderidas a planta). Sabe-se que mesmo *in vitro*, *P. citricarpa* apresenta crescimento micelial mais lento e apresenta menor taxa de esporulação do que *P. capitalensis* (BAAYEN *et al.*, 2002).

Fungos fitopatógenos, além de possuírem o metabolismo normal encontrado em outros fungos de vida livre, desenvolveram ao longo da evolução conjuntos de enzimas especializadas, que os permitem penetrar na parede celular, superar as defesas naturais da planta e completar seu ciclo de vida no hospedeiro (BOWYER, 1995; SOANES *et al.*, 2002). *P. capitalensis* apresenta esse estilo de vida, sendo encontrado como patógeno em orquídeas (OKANE *et al.*, 2001) em diversos hospedeiros da família Rutaceae e Ericaceae (GLIENKE *et al.*, 2011a; OKANE *et al.*, 2001). Além disso, *P. capitalensis*, como demonstrado por Glienke *et al.* (2011), possui grande variabilidade intraespecífica, resultante de sua alta capacidade de colonizar diferentes plantas. Mesmo em laranjeiras, onde já se é conhecido que não

causa a doença MPC (BAAYEN *et al.*, 2002), esta espécie apresenta maior facilidade de colonizar a folha quando comparada com *P. citricarpa*.

A baixa capacidade de *P. citricarpa* em colonizar a própria planta hospedeira, onde ele é exclusivamente encontrado na natureza, mostra que a sua classificação como patógeno de *Citrus* sp. pode ser mais artificial do que natural. A MPC não causa danos aos frutos propriamente ditos, e não interfere na dispersão natural das sementes. As manchas pretas na casca, bem como seus outros sintomas, amadurecimento e queda prematura dos frutos afetam negativamente a indústria da produção de laranja e seu comércio, enquanto a planta não tem seu desenvolvimento afetado pela presença de *P. citricarpa*. Possivelmente, *P. citricarpa* seja um fungo simbiote que, por ocasião de sua interação com a planta hospedeira, ocasione situações que não são interessantes para o cultivo comercial da planta, levando-o a ser classificado como patógeno.

No entanto, mais estudos são necessários para compreender melhor essa dinâmica, principalmente a genética da interação tanto de *P. citricarpa* quanto de *P. capitalensis* com a planta de citros. Estudos de comparação de genoma destas espécies podem contribuir para o entendimento dos estilos de vida destes patógenos.

3.5 Conclusões

A transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, inserindo o gene repórter *DsRed* em linhagens de *Phyllosticta capitalensis*, foi realizada, sendo metodologia viável para este tipo de estudo.

A avaliação da colonização de *Phyllosticta citricarpa* e de *Phyllosticta capitalensis* *in planta* resultou em indícios de colonização da folha destacada por ambas as espécies, mas somente *P. capitalensis* penetra no tecido foliar quando a folha permanece aderida à planta.

3.6 Referências

- ABUODEH, R. O.; ORBACH, M. J.; MANDEL, M. A.; DAS, A.; GALGANI, J. N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 6, p. 2106–10, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837205>>. .
- BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; *et al.* Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, n. 5, p. 464–77, 2002.
- BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 14, n. 13, p. 3206–14, 1995.
- COMBIER, J.-P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, n. 1, p. 141–148, 2003.
- DE GROOT, M. J. A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 839–842, 1998.
- ECKERT, M.; MAGUIRE, K.; URBAN, M.; *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria spp.* and *Oculimacula spp.* with the reef coral gene *DsRed* and the jellyfish gene *gfp*. **FEMS microbiology letters**, v. 253, n. 1, p. 67–74, 2005.
- EVERETT, K. R. Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. **Plant pathology**, v. 55, n. 2, p. 194-199, 2006.
- FIGUEIREDO, J. G.; GOULIN, E. H.; TANAKA, F.; *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of microbiological methods**, v. 80, n. 2, p. 143–7, 2010.
- GLIENKE, C.; PEREIRA, O.L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L.; 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: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, p. 47-56, 2011.
- GLIENKE-BLANCO, C., AGUILAR-VILDOSO, C. I., VIEIRA, M. L. C., BARROSO, P. A. V., & AZEVEDO, J. L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 251-255, 2002.

GOULIN, E. H. **Agrotransformação de *Guignardia mangiferae* e *Xylaria spp* e produção de plantas axênicas para estudos de controle biológico**. 57 f. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

HAWKSWORTH, D. L.; CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A; REYNOLDS, D. R.; SAMSON, R. A.; SEIFERT, K. A.; TAYLOR, J. W.; GLIENKE, C.; *et al.* The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. **IMA Fungus**, v. 2, p. 105-112, 2011.

HUANG, C. S. *et al.* Leaf infection with citrus black spot and perithecial development in relation to ascospore discharge of *Guignardia citricarpa* Kiely. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, v. 21, n. 4, p. 256-263, 1972.

LECLERQUE, A.; WAN, H.; ABSCHÜTZ, A.; *et al.* *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Current Genetics**, v. 45, n. 2, p. 111–9, 2004.

MALONEK, S.; MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. **Current Genetics**. v. 40, n. 2, p. 152–155, 2001.

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

MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. **Current genetics**, v. 43, n. 5, p. 371–7, 2003.

MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J. J.; VAN DEN HONDEL, C. A M. J. J.; RAM, A. F. J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current genetics**, v. 48, n. 1, p. 1–17, 2005.

MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; *et al.* *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 173–80, 2001.

MÜNCH, S., LUDWIG, N., FLOSS, D. S., SUGUI, J. A., KOSZUCKA, A. M., VOLL, L. M., DEISING, H. B. Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 1, p. 43-55, 2011.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia sp.* inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 79, n. 1, p. 101–109, 2001.

REIS, R. F.; TIMMER, L. W.; GOES, A. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on back spot severity on sweet orange. **Fitopatol. bras.**, v. 31, n. 1, 2006.

SANTOS, P. J. C. **Agrotransformação de duas novas espécies de *Diaporthe* e sua aplicação no controle biológico de *Phyllosticta citricarpa***. 70 f. Dissertação

– Programa de Pós- Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SCHUBERT, T. S., DEWDNEY, M. M., PERES, N. A., PALM, M. E., JEYAPRAKASH, A., SUTTON, B., MONDAL, S. N., WANG, N. Y., RASCOE, J., AND PICTON, D. D.. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 3, p. 635-647, 2013.

SEBASTIANES, F. L. S.; LACAVAL, P. T.; FÁVARO, L. C. L.; RODRIGUES, M. B. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Genetic transformation of *Diaporthe phaseolorum*, an endophytic fungus found in mangrove forest, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetic**. v. 58, pág. 21-33, 2012.

SILVEIRA, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. São Paulo: USP, v.1, p.71-79, 1989.

SOANES, D. M.; SKINNER, W.; KEON, J.; HARGREAVES, J.; TALBOT, N. J. Genomics of phytopathogenic fungi and the development of bioinformatic resources. *Molecular plant-microbe interactions* : **MPMI**, v. 15, n. 5, p. 421–7, 2002.

SPOSITO, M. B., AMORIM, L., BASSANEZI, R. B., FILHO, A. B. AND 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.

TAKAHARA, H.; TSUJI, G.; KUBO, Y.; *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 70, n. 2, p. 93–96, 2004.

TORQUES, A. A. **Avaliação das linhagens transformadas do fungo *Phyllosticta citricarpa* com o gene repórter *gfp*, para estudo da interação fungo-planta**. 42 f. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

WIKEE, S.; UDAYANGA, D.; CROUS, P. W.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H. C.; BAHKALI, A. H.; DAÍ, D.; HYDE, K. D. *Phyllosticta*—an overview of current status of species recognition. **Fungal Diversity**, v. 51, n. 1, p. 43-61, 2011.

4 CAPÍTULO II – Análise por qPCR de desenvolvimento de *Phyllosticta citricarpa* em frutos destacados e na planta

4.1 Introdução

A mancha preta do Citros (MPC) causa grandes perdas para a produção de frutos cítricos no mundo. Causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa, a doença leva ao amadurecimento e queda precoce dos frutos, e a formação de lesões na casca, que, apesar de não afetar a qualidade interna, torna os frutos pouco atrativos para o comércio *in natura*. Além disso, impede que pomares contaminados exportem seus frutos para a Europa, onde é imposta uma barreira fitossanitária e o fungo é considerado um patógeno quarentenário A1.

Apesar da grande importância da doença, ainda não há uma maneira totalmente efetiva de erradicá-la. O controle químico pode ser feito realizando-se aplicações de fungicidas a partir da queda das pétalas das flores e até o final do período de chuvas (FUNDECITRUS, 2008). Outras medidas envolvem a remoção de folhas e outros materiais vegetais do solo dos pomares, antecipação da colheita, sistema de irrigação por gotejamento e poda de ramos (SILVA-PINHATI et al., 2009).

No entanto, há a necessidade de se compreender melhor a interação do fungo com a planta hospedeira para que novas estratégias de controle mais efetivas sejam desenvolvidas. Com esse intuito, experimentos de inoculação do fungo e indução de sintomas em fruto foram propostos (BALDASSARI et al., 2008; KORF et al., 2001). Também foram desenvolvidos *primers* específicos para detecção de *P. citricarpa* através de PCR (GLIENKE, 1999; GLIENKE-BLANCO et al., 2002; BONANTS et al., 2003; EVERETT & REES-GEORGE, 2006b; MEYER et al., 2006). Entretanto, apesar de serem altamente espécie-específicas e poderem ser utilizadas para detectar DNA do fungo em amostras de folhas e frutos de citros contaminados, essas metodologias não são capazes de quantificar o DNA com precisão.

Para esse fim, o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é amplamente utilizado para detectar e quantificar diversos patógenos fúngicos (ATALLAH et al., 2007; IOOS et al., 2010; CROUCH & SZABO, 2011), incluindo *Phyllosticta citricarpa* (VAN GENT-PELZER et al., 2007; HU et al., 2014). A quantificação é necessária, entre outros motivos, para a avaliação de desenvolvimento do fungo em

experimentos de indução de sintoma. Observou-se que em experimentos de indução de sintomas de MPC em frutos na planta, ocorre o desenvolvimento de lesões mesmo na ausência de injúria. Entretanto, quando tais experimentos são realizados em frutos destacados em condições de laboratório, o desenvolvimento de lesões somente ocorre se o fungo for inoculado em injúrias provocadas artificialmente na superfície do fruto (GOULIN, 2012). Três hipóteses são levantadas para tentar explicar tal diferença: 1) Os esporos de *P. citricarpa* não germinam na superfície do fruto quando este não está aderido ao fruto; 2) Os esporos de *P. citricarpa* germinam mas não ocorre a infecção da casca em frutos destacados da planta; 3) O fungo apresenta germinação e penetração mas as lesões características de MPC dependem da resposta do fruto ao processo de infecção, que não ocorrem quando o fruto foi destacado. Assim, objetivou-se aqui auxiliar no esclarecimento das diferenças observadas nos processos de desenvolvimento de lesões de MPC em frutos cítricos. Essa avaliação foi realizada por meio de avaliação diferencial da quantidade do DNA do patógeno nos frutos nas duas situações, ao longo do tempo.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Material biológico

A linhagem utilizada para a inoculação nos frutos foi LGMF06, *Phyllosticta citricarpa*, pertencente a coleção de cultura do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Paraná. As plantas, laranjeiras da variedade Valencia, foram cedidas pela Fundação de Amparo ao Citricultor do Estado de São Paulo (FUNDECITRUS), localizada em Araraquara, SP, onde o trabalho foi parcialmente realizado.

4.2.2 Inoculação de *Phyllosticta citricarpa* em frutos

Vinte plantas, situadas em casa de vegetação, e 90 de seus frutos, foram selecionadas para o experimento. A metade desses frutos foi destacada das plantas (QUADRO 3).

Previamente à inoculação, com o objetivo de eliminar microrganismos epifíticos, a superfície de todos os frutos foi lavada em água, mergulhada em frascos com etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% por 3 minutos, etanol 70% por 30 segundos e em água destilada esterilizada por 1 minuto.

Após esse procedimento, quatro pequenos orifícios de mesmo tamanho foram feitos na superfície de cada fruto, com o auxílio de um objeto perfurocortante. Os frutos foram separados nas seguintes situações: os que foram inoculados com suspensão de esporo, com micélio do fungo, e o grupo controle. A suspensão de esporos foi preparada em concentração de 1×10^6 esporos/ml e 5 μ l dela foi depositada no interior do orifício feito na casca dos frutos. A inoculação por micélio foi feita introduzindo o micélio de *P. citricarpa* nos orifícios da casca. No grupo controle, nada foi inoculado nos orifícios.

QUADRO 3- DIFERENTES TRATAMENTOS REALIZADOS EM EXPERIMENTO DE INOCULAÇÃO DE *Phyllosticta citricarpa* EM FRUTOS DE LARANJEIRA

Tratamento	Fonte de inóculo	Frutos	Quantidade
1	Esporos	Na planta	15
2		Destacados	15
3	Micélio	Na planta	15
4		Destacados	15
5	Controle	Na planta	15
6		Destacados	15
7	Esporos	Na planta	10
8		Destacados	10
9	Controle	Na planta	10
10		Destacados	10

FONTE: A autora (2014).

Os frutos destacados foram colocados em potes de plástico, devidamente isolados, contendo algodão umedecido, mantendo uma câmara úmida. Eles foram mantidos em BOD a 25⁰ C, sob iluminação constante. Os frutos nas plantas foram mantidos em casa de vegetação.

Um segundo experimento foi realizado com a mesma metodologia, mas utilizando-se de 40 frutos, sendo 20 destacados e 20 mantidos na planta (em ambas as situações, 10 frutos inoculados com esporo e 10 mantidos como controle).

4.2.3 Avaliação dos experimentos

As leituras dos experimentos foram feitas no mesmo dia da inoculação (dia 0) e após 2, 7, 14 e 21 dias. As regiões dos orifícios na casca dos frutos foram retiradas com um cortador circular de 1 cm de diâmetro, permitindo retirar amostras de mesmo tamanho. Em seguida, foram congeladas, e posteriormente maceradas com nitrogênio líquido. Desse material macerado foi realizada a extração de DNA com o kit de extração UltraClean® microbial DNA Isolation Kit (MO BIO®) seguindo instrução do fabricante. Após a obtenção do DNA, foi realizada PCR em tempo real, em aparelho 7500 Real-Time PCR System, da Applied Technologies, com metodologia segundo Van Gent-Pelzer et al. (2007). A quantificação relativa foi feita através de diluições de 1:5 de DNA de *Phyllosticta citricarpa* em água destilada (concentrações de 50 ng/μl, 10 ng/μl, 2 ng/μl e 0,4 ng/μl).

4.3 Resultados

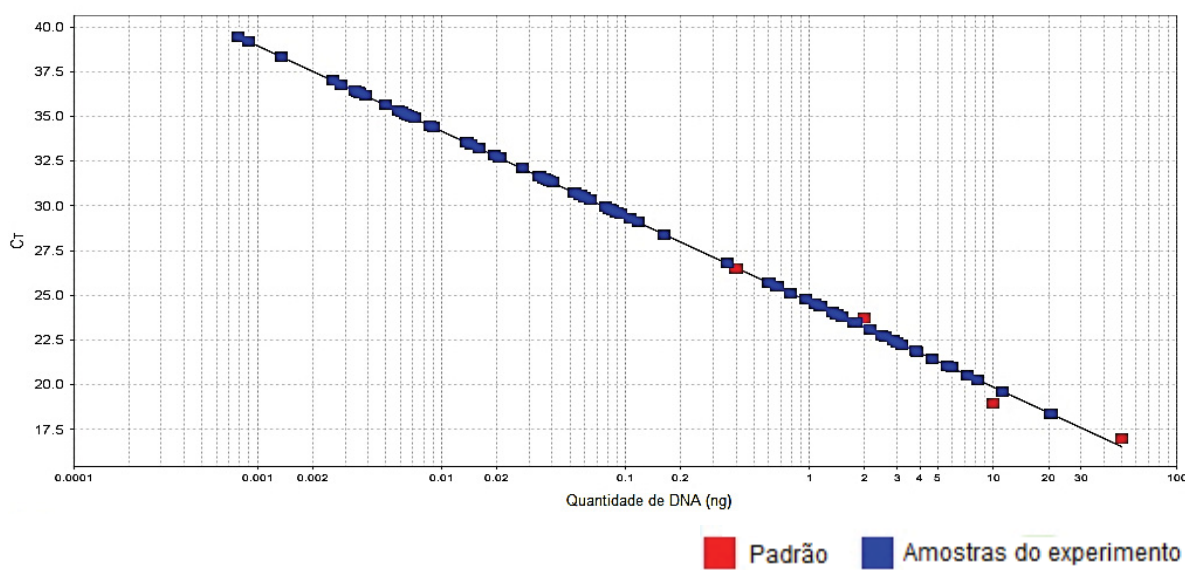
4.3.1 Inoculação de *Phyllosticta citricarpa* em frutos

Nos dias de leitura do experimento, as quatro áreas inoculadas da casca de cada fruto eram retiradas com o auxílio de um cortador de formato circular, estocadas em um tubo plástico, e congeladas em freezer.

4.3.2 Avaliação dos experimentos

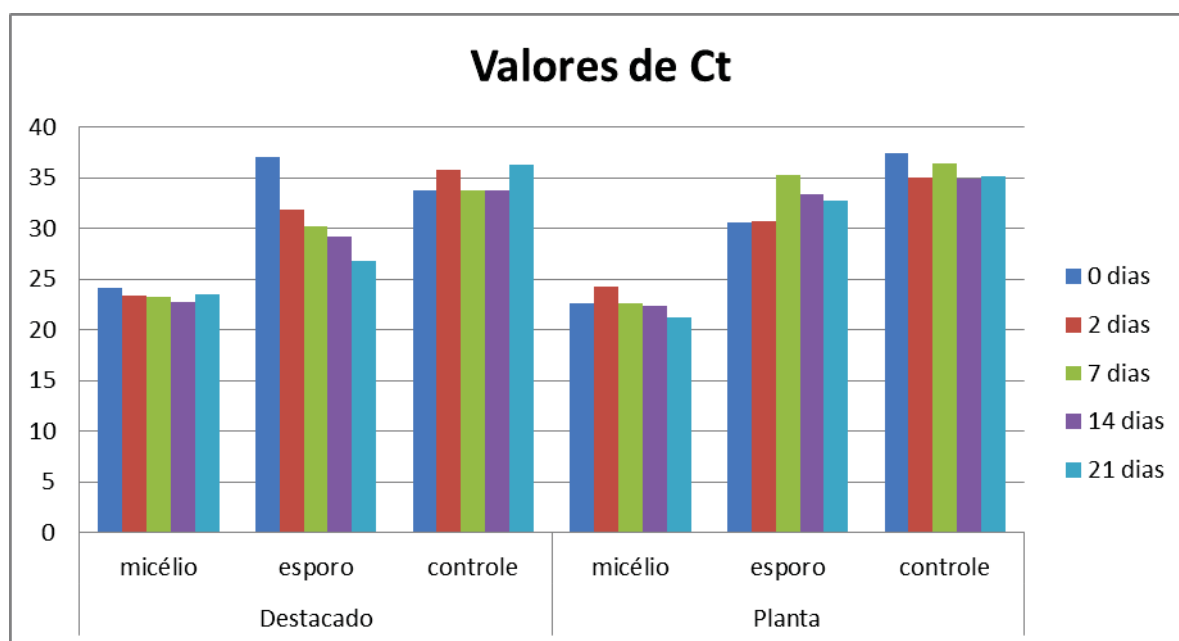
O DNA das amostras foi obtido através de extração direta das cascas dos frutos. Após a extração, seguiu-se a PCR em tempo real. As quantificações relativas das amostras e das diluições formaram uma curva padrão, mostrada na Figura 7. Os valores médios de Ct estão demonstrados no GRÁFICO 1.

FIGURA 7 - CURVA PADRÃO DERIVADA DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL



FONTE: A autora (2014).

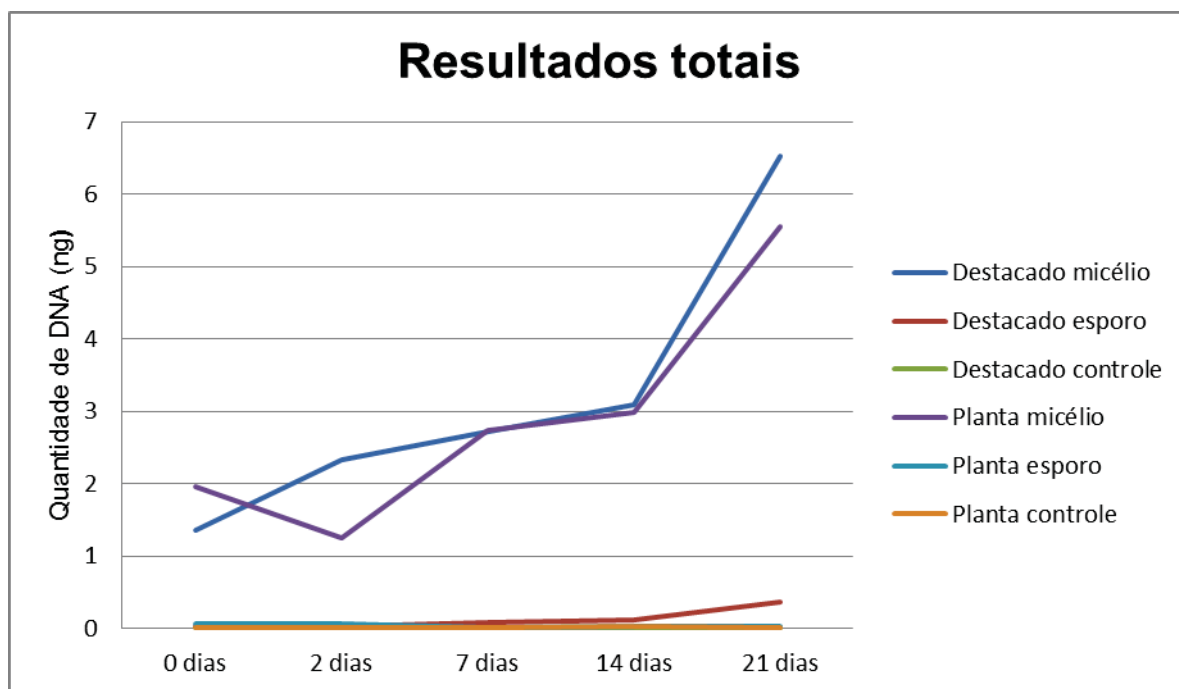
GRÁFICO 1 - VALORES MÉDIOS DE Ct



FONTE: A autora (2014).

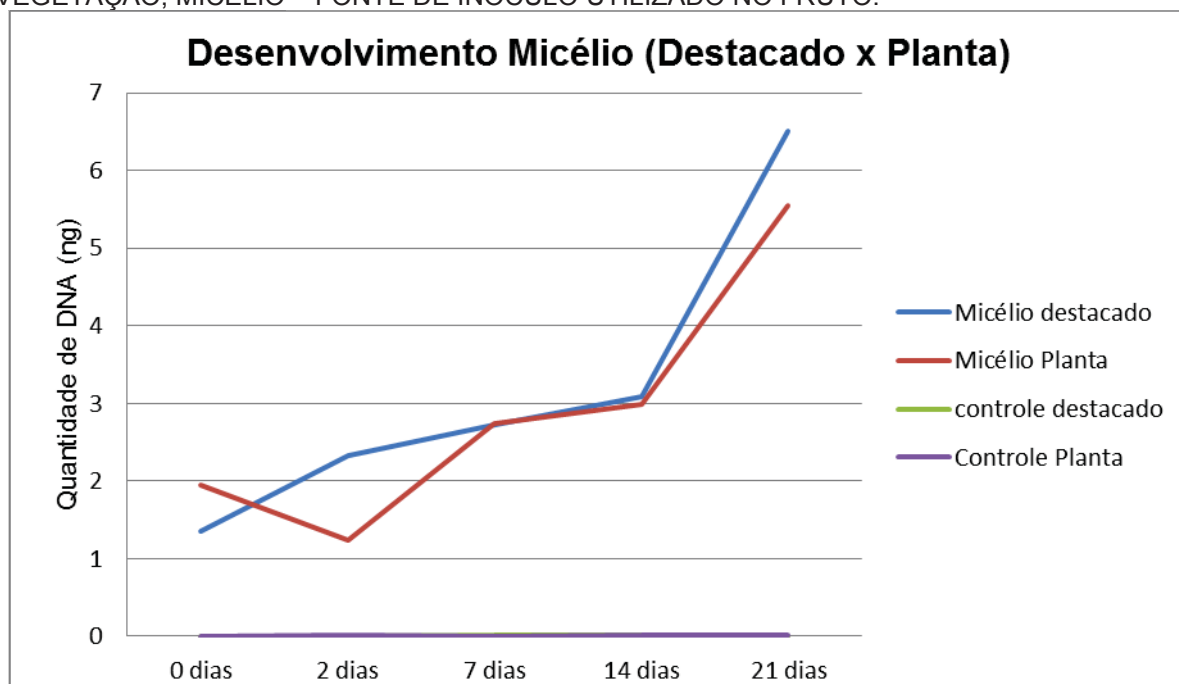
As médias para cada dia de avaliação estão apresentadas no Gráfico 1 e os mesmos resultados comparando tratamentos com a mesma fonte de inóculo estão nos Gráficos 2-4.

GRÁFICO 2 – RESULTADO MÉDIO DA QUANTIDADE DE DNA (ng) DOS TRATAMENTOS 1 A 6, POR DIA. NOTA: DESTACADO – FRUTO NÃO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CAMARA ÚMIDA; PLANTA – FRUTO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO; MICÉLIO/ESPORO/CONTROLE – FONTE DE INÓCULO UTILIZADO NO FRUTO.



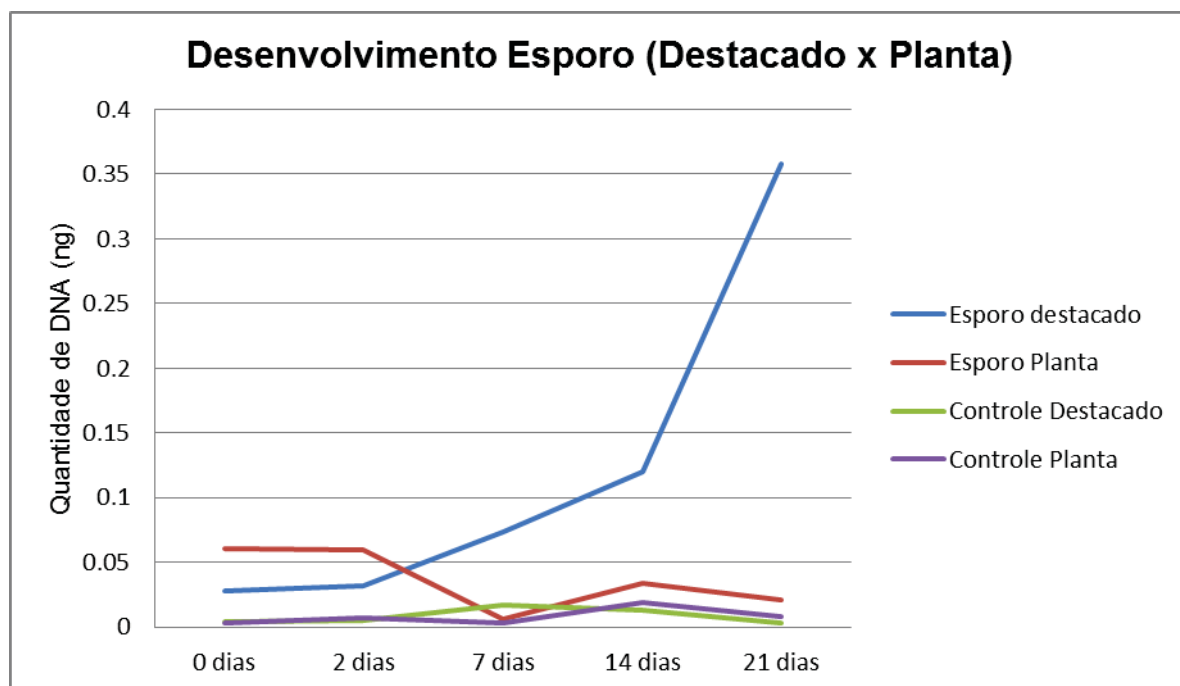
FONTE: A autora (2014)

GRÁFICO 3 – QUANTIFICAÇÃO DO DNA DOS TRATAMENTOS 3 E 4, POR DIA EM FRUTOS DESTACADOS E NA PLANTA. DESTACADO – FRUTO NÃO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CAMARA ÚMIDA; PLANTA – FRUTO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO; MICÉLIO – FONTE DE INÓCULO UTILIZADO NO FRUTO.



FONTE: A autora (2014).

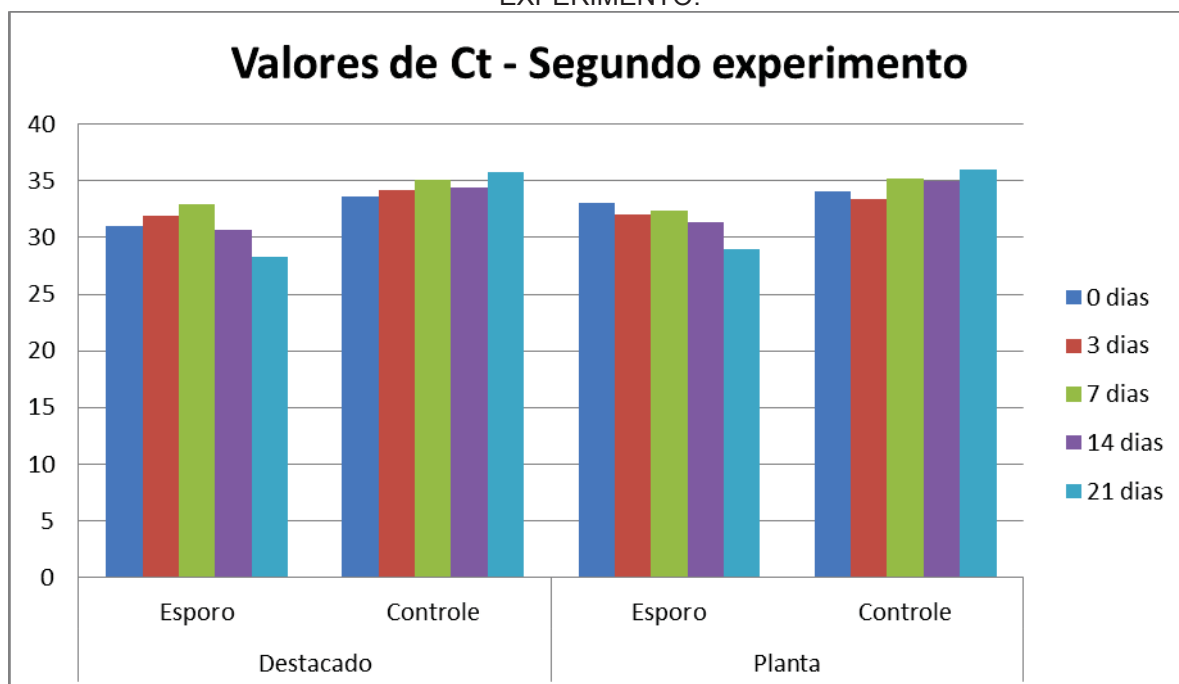
GRÁFICO 4 - QUANTIFICAÇÃO DO DNA DOS TRATAMENTOS 1 E 2, POR DIA EM FRUTOS DESTACADOS E NA PLANTA. DESTACADO – FRUTO NÃO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CAMARA ÚMIDA; PLANTA – FRUTO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO; ESPORO – FONTE DE INÓCULO UTILIZADO NO FRUTO.



FONTE: A autora (2014).

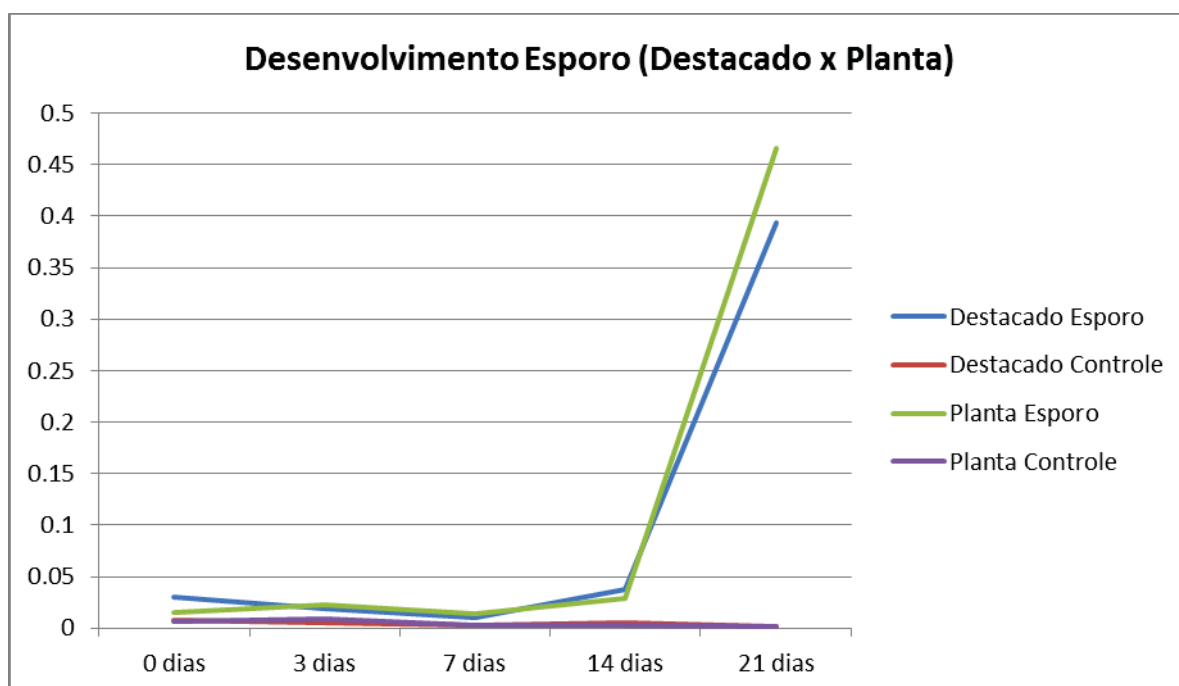
O segundo experimento realizado com esporos (tratamentos 7-10, QUADRO 3) foi avaliado da mesma maneira, com os mesmos padrões, em duplicata. Os valores de Ct são mostrados no GRÁFICO 5 e as médias para cada dia estão apresentadas no GRÁFICO 6.

GRÁFICO 5 - VALORES MÉDIOS DE Ct DO SEGUNDO EXPERIMENTO.



FONTE: A autora (2014).

GRÁFICO 6 - QUANTIFICAÇÃO DO DNA DOS TRATAMENTOS 7 A 10, POR DIA EM FRUTOS DESTACADOS E NA PLANTA. DESTACADO – FRUTO NÃO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CAMARA ÚMIDA; PLANTA – FRUTO ADERIDO A PLANTA, MANTIDO EM CASA DE VEGETAÇÃO; ESPORO/CONTROLE – FONTE DE INÓCULO UTILIZADO NO FRUTO.



FONTE: A autora (2014).

4.4 Discussão

Devido aos grandes prejuízos que causa ao mercado de citros no mundo e as restrições e dificuldades de exportação gerada pela Mancha Preta do Citros, fica evidente a necessidade de geração de conhecimento relacionado tanto à metodologias de detecção de *Phyllosticta citricarpa* em amostras de planta quanto à compreensão do desenvolvimento do fungo em seu hospedeiro.

A precisão na quantificação e a capacidade de detectar quantidades muito pequenas de DNA fazem da PCR quantitativa em tempo real uma importante ferramenta na avaliação de amostras oriundas diretamente de pomares com suspeita de presença da MPC. Van Gent-Pelzer et al. (2007) reportaram sucesso da sua sonda de hidrólise em amplificar pequenas quantidades de DNA de *P. citricarpa*, delimitando um limite de detecção de 10 fg. Em comparação, Bonants et al. (2003) determinaram um alcance de até 20000 fg para seus primers de PCR convencional. No presente trabalho, a menor quantidade detectada foi de 900 fg, e 26% das amostras avaliadas não atingiram mais do que 2000 fg, ou seja, teriam sido consideradas negativas se testadas em PCR convencional.

Outro ponto significativo é a alta especificidade da sonda. Sendo *P. citricarpa* frequentemente encontrado associado ao fungo endofítico *P. capitalensis*, é importante que a metodologia seja capaz de diferenciar as duas espécies.

Devido a sua grande semelhança e por serem geralmente isoladas juntas, *P. capitalensis* foi erroneamente classificada como uma cepa não patogênica de *P. citricarpa* (McONIE, 1964) até ser identificada como *Guignardia mangiferae* (BAAYEN et al., 2002), e então reclassificada com seu nome atual por Glienke et al. (2011b). Apesar de sua semelhança morfológica, *P. capitalensis* cresce mais rapidamente do que *P. citricarpa*. É possível diferenciá-las utilizando meio de cultura aveia-ágar, já que *P. citricarpa* forma um halo amarelo ao redor da colônia quando em crescimento nesse meio, o que não ocorre com *P. capitalensis*. Métodos moleculares de PCR convencional e em tempo real também foram desenvolvidos para a detecção de *P. capitalensis* (KAVA-CORDEIRO, 2004; HU et al., 2014).

Como *P. capitalensis* não é patogênica em citros, é preciso que a sonda não amplifique em amostras onde somente esta espécie esteja presente, para que

identificações falso-positivas não ocorram. Utilizando a mesma sonda proposta por Van Gent-Pelzer et al. (2007), Adamoski (2012) encontrou duas linhagens de *P. brazilianiae* e duas de *P. capitalensis* que foram amplificadas como amostras altamente diluída de *P. citricarpa*. No presente trabalho, uma das linhagens utilizadas por Adamoski (LGMF002) foi utilizada (em concentração de 15 ng/μl) como controle nas reações de qPCR, e em cinco repetições, apresentou um Ct médio de 30,3841, correspondendo a uma quantidade média de 0,0592 ng de *P. citricarpa*. Os resultados em ambos os trabalhos demonstram que a sonda GcP1 de Van Gent-Pelzer et al. (2007) é capaz de gerar falso-positivos, provavelmente devido a variações intra e interespecíficas nas regiões espaçadoras ribossomais. Adamoski (2002) também demonstrou que a sonda e os primers propostas por ele se mostraram mais específicas, não havendo detecção de falso-positivo entre *P. citricarpa* e *P. capitalensis*, sendo esse ensaio mais recomendado para identificação e caracterização entre essas duas espécies. No entanto, para a proposta do presente trabalho, a sonda GcP1 foi satisfatória, pois o ensaio proposto por Adamoski (2002) apresentou um limite de detecção de 0,1 ng (100000 fg), muito maior do que a sonda de Van Gent-Pelzer, e que não possibilitaria a amplificação de 61% das amostras utilizadas nesse estudo. Além disso, a ausência de detecção de amostras com maiores quantidades de DNA nos frutos controles ao longo dos 21 dias demonstra que não houve interferência de uma possível detecção falso-positiva de *P. capitalensis*.

Experimentos anteriores de indução de sintoma em frutos obtiveram resultados variados, desde o desenvolvimento de sintomas em frutos da variedade Valencia em 73 dias após a inoculação (dai) e em 55 dias dai com frutos da variedade Pera-Rio, com o fruto na planta (BALDASSARI et al., 2008) e em até 15 dias quando inoculado em fruto destacado (GOULIN et al., 2011). Porém, somente houve desenvolvimento de lesões quando foram realizadas inoculações em locais com prévia injúria nos frutos.

Dessa maneira, visando observar mais detalhadamente o desenvolvimento do fungo *P. citricarpa* no fruto, foi realizada a avaliação temporal das amostras, durante cinco leituras, após 0, 2, 7, 14 e 21 dias. A avaliação do dia 0 foi feita com o objetivo de quantificar a inoculação inicial recebida pelos frutos.

Nos frutos que receberam micélio inoculado, o crescimento do fungo segue um aumento gradual nas 4 primeiras avaliações, resultando em um aumento exponencial entre os dias 14 e 21 (GRÁFICO 3). O fungo *P. citricarpa* apresenta tipicamente um crescimento lento *in vitro*, o que parece refletir seu comportamento quando *in planta*. A exceção é a segunda avaliação realizada na planta, que diminuiu a quantidade quando

em comparação com o inóculo inicial. Isso pode ser resultado de problemas com a extração de DNA do material ou de uma variação natural que seria menos percebida se o número amostral fosse maior.

Nos frutos onde foi inoculada a suspensão de esporos, o DNA do fungo apresentou uma flutuação natural de sua quantidade durante os primeiros 14 dias de experimento (GRÁFICOS 4-6). Isso foi provavelmente causado pela degradação de alguns dos esporos, que permaneceram em estado latente, durante as duas primeiras semanas de experimento. Já na avaliação após 14 dias, o aumento na quantidade de DNA pode refletir a eclosão dos esporos e o início do desenvolvimento do fungo, resultando no grande crescimento obtido no 21º dia.

Os resultados obtidos com os esporos inoculados em frutos na planta, no primeiro experimento (GRÁFICO 4), não acompanham os outros resultados. Possivelmente os esporos não obtiveram sucesso para eclodir e foram degradados ao longo do tempo, resultando em uma quantidade de DNA inferior à inicial. Em compensação, os resultados do segundo experimento ficaram muito similares às dos frutos destacados inoculados no primeiro experimento. Houve uma flutuação nas quantidades durante os primeiros 14 dias, seguido de um crescimento consistente e exponencial (GRÁFICO 6), o que sustenta a hipótese de que há uma demora de pelo menos 14 dias para que o esporo se estabeleça e passe a crescer e colonizar o fruto.

Para experimentos de avaliação de crescimento em fruto e indução de sintomas de MPC posteriores, é recomendado um tempo maior, de pelo menos 7 dias, para o início das leituras das amostras, e aguardar entre 14 e 21 dias após a inoculação para que o fungo inicie sua expansão e colonização do fruto.

A inoculação com micélio, apesar de não refletir o ciclo de vida do fungo, já que *P. citricarpa* é disperso a longas distâncias pelo vento em forma de ascósporos (HUANG, 1972; REIS, 2006) ou a curtas distâncias pela água da chuva, em forma de picnidiósporos (SPOSITO, 2008), demonstrou um crescimento linear através do tempo que pode ser utilizado em experimentos em laboratório. A utilização de quantidades maiores de DNA torna mais fácil detectar e observar o aumento do fungo, e em decorrência, a observação dos sintomas.

Não houve diferença entre os desenvolvimentos de micélio e esporo com relação a frutos mantidos no pé ou destacados. Esse fator demonstra que os resultados obtidos em experimentos com frutos destacados (KORF et al., 2001; SENKIV, 2010; GOULIN, 2011) podem ser extrapolados para frutos *in planta*, e válida a experimentação em frutos em laboratório para simular condições no campo.

4.5 Conclusões

Foi possível acompanhar o processo de desenvolvimento do fungo inoculado tanto como micélio quanto como esporo em frutos destacados e mantidos na planta.

A sonda publicada por Van Gent-Pelzer et. al (2007) cumpriu com o objetivo de detectar quantidades pequenas de DNA de *Phyllosticta citricarpa* em amostras oriundas de cascas de laranja da variedade Valencia inoculadas com o fungo. Mesmo sendo capaz de detectar pequenas quantidades do causador da Mancha Preta do Citros, a sonda e seus respectivos *primers* não são recomendadas como método único para avaliação qualitativa de contaminação por *P. citricarpa*, pois existe a chance de se apontar falso-positivos devido a similaridades interespecíficas com linhagens de *P. capitalensis*, espécie endofítica que não causa a doença.

Pode-se perceber que tanto quando esporos quanto o micélio do fungo *P. citricarpa* são inoculados, ocorre o crescimento do fungo, independente do fruto estar destacado ou não. Assim, as duas primeiras hipóteses levantadas (1 - Os esporos de *P. citricarpa* não germinam na superfície do fruto quando este não está aderido ao fruto; 2 - Os esporos de *P. citricarpa* germinam mas não ocorre a infecção da casca em frutos destacados da planta) provavelmente são falsas. A terceira hipótese (3 - O fungo apresenta germinação e penetração mas as lesões características de MPC dependem da resposta do fruto ao processo de infecção, que não ocorrem quando o fruto foi destacado) é o que possivelmente esteja ocorrendo.

Quando o micélio é inoculado, o desenvolvimento nos primeiros 14 dias após a inoculação é crescente, e atinge um crescimento exponencial entre o 14º e o 21º dai. Já em frutos onde a suspensão de esporos foi inoculada, há pouca variação na quantidade de DNA até o 14º dai. Entre o 14º e o 21º dia, similar ao que acontece com o micélio do fungo, há um crescimento exponencial, resultante da eclosão do esporo e subsequente colonização do fruto pelo fungo. Não foram encontradas diferenças entre o desenvolvimento do fungo em frutos destacados ou mantidos na planta, para ambas as formas de inoculação.

4.6 Referências

- ADAMOSKI, D. **Desenvolvimento de metodologias eficientes de diagnóstico molecular dos fungos *Phyllosticta citricarpa* e *Phyllosticta capitalensis***. 120 f. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012
- ATALLAH, Z. K.; BAE, J.; JANSKY, S. H.; ROUSE, D. I.; STEVENSON, W. R. Multiplex Real-Time Quantitative PCR to Detect and Quantify *Verticillium dahliae* Colonization in Potato Lines that Differ in Response to *Verticillium wilt*. **Phytopathology**, v. 97, n. 7, p. 865–72, 2007.
- BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; *et al.* Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, n. 5, p. 464–77, 2002.
- BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F.; GOES, A. A new method for inoculation of fruit with *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, n. 1, p. 1–4, 2008.
- BONANTS, P. J. M.; CARROLL, G. C.; WEERDT, M. DE; BROUWERSHAVEN, I. R. VAN. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109 p. 503–513, 2003.
- CROUCH, J. A.; SZABO, L. J. Real-Time PCR Detection and Discrimination of the Southern and Common Corn Rust Pathogens *Puccinia polysora* and *Puccinia sorghi*. **Plant Disease**, v. 95, n. 6, p. 625–632, 2011.
- EVERETT, K. R.; REES-GEORGE, J. Horticulture Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. **Plant Pathology**, v. 55, p. 194–199, 2006a.
- EVERETT, K. R. REES-GEORGE, J. Species-specific PCR *primers* for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. **New Zealand Plant Protection**, v. 59, p.141-145, 2006b.
- FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre Pinta Preta. Fundo Paulista de Defesa da Agricultura**, 2008. 10p. (Boletim Técnico, Edição especial). Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/PageFlip/pageflip.aspx?idPage=71>>
- FIGUEIREDO, J. G.; GOULIN, E. H.; TANAKA, F.; *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of microbiological methods**, v. 80, n. 2, p. 143–7, 2010.
- GLIENKE, C.; PEREIRA, O.L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L.; 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: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, p. 47-56, 2011.

GLIENKE-BLANCO, C. **Guignardia citricarpa Kiely: Análise genética cariotípica e interação com o hospedeiro**. Tese. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1999.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; VIEIRA, C. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 251–255, 2002.

GOULIN, E. H.; FIGUEIREDO, J. ; SENKIV, C. C.; TORQUES, A.; SILVA JR., G. J.; KAVA-CORDEIRO, V. ; GLIENKE, C. Desenvolvimento de sistema de indução de sintomas de Mancha Preta dos Citros em frutos destacados. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2011, Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology - Fitopatologia Brasileira**. Piraciba: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2011. v. 36.

HU, J.; JOHNSON, E. G.; WANG, N.; *et al.* qPCR Quantification of Pathogenic *Guignardia citricarpa* and Non-Pathogenic *G. mangiferae* in Citrus. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 112–120, 2014.

HUANG, C. S. *et al.* Leaf infection with citrus black spot and perithecial development in relation to ascospore discharge of *Guignardia citricarpa* Kiely. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, v. 21, n. 4, p. 256-263, 1972.

IOOS, R.; FABRE, B.; SAURAT, C.; *et al.* Development, comparison, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing brown spot and red band needle blights of pine. **Phytopathology**, v. 100, n. 1, p. 105–114, 2010.

KAVA-CORDEIRO, V. **Guignardia citricarpa, G. mangiferae e Phyllosticta spinarum: caracterização morfológicas, SCARs e RNA dupla fita**. Tese. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

KORF, H. J. G.; SCHUTTE, G. C.; KOTZÉ, J. M. Effect of packhouse procedures on the viability of *Phyllosticta citricarpa*, anamorph of the citrus black spot pathogen. **African Plant Protection**, v. 7, n. 2, p.103-109, 2001.

McONIE, K. C. The latent occurrence in Citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, v.54, p.40-43, 1964.

MEYER, L.; SANDERS, G. M.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. A One-Day Sensitive Method to Detect and Distinguish Between the Citrus Black Spot Pathogen *Guignardia citricarpa* and the Endophyte *Guignardia mangiferae*. **Plant Disease**, v. 90, n. 1, p. 97–101, 2006.

REIS, R. F.; TIMMER, L. W.; GOES, A. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on back spot severity on sweet orange. **Fitopatol. bras.**, v. 31, n. 1, 2006.

SENKIV, C. C. **Avaliação de lesões produzidas por transformantes de *Phyllosticta citricarpa* em frutos de citros destacados.** 38 f. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; DE GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T. F.; MACHADO, M. A. Fitopatologia mancha preta dos citros : epidemiologia e manejo. **LARANJA**, v. 30, n. 1-2, p. 45–64, 2009.

VAN GENT-PELZER, M. P. E.; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; KOX, L. F. F.; BONANTS, P. J. M. A TaqMan PCR Method for Routine Diagnosis of the Quarantine Fungus *Guignardia citricarpa* on Citrus Fruit. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 6, p. 357–363, 2007.

SPOSITO, M. B., AMORIM, L., BASSANEZI, R. B., FILHO, A. B. AND 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.

5 REFERÊNCIAS

- ABUODEH, R. O.; ORBACH, M. J.; MANDEL, M. A; DAS, A; GALGIANI, J. N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of infectious diseases**, v. 181, n. 6, p. 2106–10, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837205>>. .
- ADAMOSKI, D. **Desenvolvimento de metodologias eficientes de diagnóstico molecular dos fungos *Phyllosticta citricarpa* e *Phyllosticta capitalensis***. 120 f. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012
- ATALLAH, Z. K.; BAE, J.; JANSKY, S. H.; ROUSE, D. I.; STEVENSON, W. R. Multiplex Real-Time Quantitative PCR to Detect and Quantify *Verticillium dahliae* Colonization in Potato Lines that Differ in Response to *Verticillium wilt*. **Phytopathology**, v. 97, n. 7, p. 865–72, 2007.
- BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; *et al.* Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v. 92, n. 5, p. 464–77, 2002.
- BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F.; GOES, A. A new method for inoculation of fruit with *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **European Journal of Plant Pathology**, v. 123, n. 1, p. 1–4, 2008.
- 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, n. 2, p. 103–110, 2008.
- BONANTS, P. J. M.; CARROLL, G. C.; WEERDT, M. DE; BROUWERSHAVEN, I. R. VAN. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus , *Guignardia citricarpa*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109 p. 503–513, 2003.
- BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A; BEIJERSBERGEN, A; HOOYKAAS, P. J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 14, n. 13, p. 3206–14, 1995.
- COMBIER, J.-P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, n. 1, p. 141–148, 2003.
- CROUCH, J. A.; SZABO, L. J. Real-Time PCR Detection and Discrimination of the Southern and Common Corn Rust Pathogens *Puccinia polysora* and *Puccinia sorghi*. **Plant Disease**, v. 95, n. 6, p. 625–632, 2011.

DE GROOT, M. J. A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 839–842, 1998.

ECKERT, M.; MAGUIRE, K.; URBAN, M.; *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria spp.* and *Oculimacula spp.* with the reef coral gene *DsRed* and the jellyfish gene *gfp*. **FEMS microbiology letters**, v. 253, n. 1, p. 67–74, 2005.

EVERETT, K. R. Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. **Plant pathology**, v. 55, n. 2, p. 194-199, 2006.

EVERETT, K. R. REES-GEORGE, J. Species-specific PCR *primers* for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. **New Zealand Plant Protection**, v. 59, p.141-145, 2006b.

EVERETT, K. R.; REES-GEORGE, J. Horticulture Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. **Plant Pathology**, v. 55, p. 194–199, 2006a.

FAO, 2014. **Food and Agricultural commodities production** Disponível em: <http://faostat.fao.org/CountryProfiles/Country_Profile/Direct.aspx?lang=en&area=21 >

FIGUEIREDO, J. G.; GOULIN, E. H.; TANAKA, F.; *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. **Journal of microbiological methods**, v. 80, n. 2, p. 143–7, 2010.

FUNDECITRUS. **Manual técnico sobre Pinta Preta. Fundo Paulista de Defesa da Agricultura**, 2008. 10p. (Boletim Técnico, Edição especial). Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br/ImageBank/PageFlip/pageflip.aspx?idPage=71>>

GLIENKE, C.; PEREIRA, O.L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L.; 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: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, p. 47-56, 2011.

GLIENKE-BLANCO, C. **Guignardia citricarpa Kiely: Análise genética cariotípica e interação com o hospedeiro**. Tese. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1999.

GLIENKE-BLANCO, C., AGUILAR-VILDOSO, C. I., VIEIRA, M. L. C., BARROSO, P. A. V., & AZEVEDO, J. L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 251-255, 2002.

GOULIN, E. H. **Agrotransformação de *Guignardia mangiferae* e *Xylaria spp* e produção de plantas axênicas para estudos de controle biológico**. 57 f.

Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GOULIN, E. H.; FIGUEIREDO, J. ; SENKIV, C. C.; TORQUES, A.; SILVA JR., G. J.; **KAVA-CORDEIRO, V. ; GLIENKE, C.** Desenvolvimento de sistema de indução de sintomas de Mancha Preta dos Citros em frutos destacados. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2011, Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology - Fitopatologia Brasileira**. Piraciba: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2011. v. 36.

HAWKSWORTH, D. L.; CROUS, P. W.; REDHEAD, S. A; REYNOLDS, D. R.; SAMSON, R. A.; SEIFERT, K. A.; TAYLOR, J. W.; GLIENKE, C.; *et al.* The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. **IMA Fungus**, v. 2, p. 105-112, 2011.

HU, J.; JOHNSON, E. G.; WANG, N.; *et al.* qPCR Quantification of Pathogenic *Guignardia citricarpa* and Non-Pathogenic *G. mangiferae* in Citrus. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 112–120, 2014.

HUANG, C. S. *et al.* Leaf infection with citrus black spot and perithecial development in relation to ascospore discharge of *Guignardia citricarpa* Kiely. **Journal of Taiwan Agricultural Research**, v. 21, n. 4, p. 256-263, 1972.

IBGE. **Indicadores IBGE - Estatística da Produção Agrícola**, 2013. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201309.pdf>

IOOS, R.; FABRE, B.; SAURAT, C.; *et al.* Development, comparison, and validation of real-time and conventional PCR tools for the detection of the fungal pathogens causing brown spot and red band needle blights of pine. **Phytopathology**, v. 100, n. 1, p. 105–14, 2010.

KAVA-CORDEIRO, V. ***Guignardia citricarpa*, *G. mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*: caracterização morfológicas, SCARs e RNA dupla fita.** Tese. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

KORF, H. J. G.; SCHUTTE, G. C.; KOTZÉ, J. M. Effect of packhouse procedures on the viability of *Phyllosticta citricarpa*, anamorph of the citrus black spot pathogen. **African Plant Protection**, v. 7, n. 2, p.103-109, 2001.

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

LECLERQUE, A.; WAN, H.; ABSCHÜTZ, A.; *et al.* *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Current Genetics**, v. 45, n. 2, p. 111–9, 2004.

MALONEK, S.; MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii*. **Current Genetics**. v. 40, n. 2, p. 152–155, 2001.

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

McONIE, K. C. The latent occurrence in Citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *G. citricarpa*, the citrus black spot pathogen. **Phytopathology**, v.54, p.40-43, 1964.

MEYER, L.; SANDERS, G. M.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. A One-Day Sensitive Method to Detect and Distinguish Between the Citrus Black Spot Pathogen *Guignardia citricarpa* and the Endophyte *Guignardia mangiferae*. **Plant Disease**, v. 90, n. 1, p. 97–101, 2006.

MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. **Current genetics**, v. 43, n. 5, p. 371–7, 2003.

MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J. J.; VAN DEN HONDEL, C. A M. J. J.; RAM, A. F. J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current genetics**, v. 48, n. 1, p. 1–17, 2005.

MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; *et al.* *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 173–80, 2001.

MÜNCH, S., LUDWIG, N., FLOSS, D. S., SUGUI, J. A., KOSZUCKA, A. M., VOLL, L. M., DEISING, H. B. Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 1, p. 43-55, 2011.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 79, n. 1, p. 101–109, 2001.

REIS, R. F.; TIMMER, L. W.; GOES, A. Effect of temperature, leaf wetness, and rainfall on the production of *Guignardia citricarpa* ascospores and on back spot severity on sweet orange. **Fitopatol. bras.**, v. 31, n. 1, 2006.

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

SCHUBERT, T. S., DEWDNEY, M. M., PERES, N. A., PALM, M. E., JEYAPRAKASH, A., SUTTON, B., MONDAL, S. N., WANG, N. Y., RASCOE, J., AND PICTON, D. D.. First report of *Guignardia citricarpa* associated with citrus black spot on sweet orange (*Citrus sinensis*) in North America. **European Journal of Plant Pathology**, v. 137, n. 3, p. 635-647, 2013.

SEBASTIANES, F. L. S.; LACAVALA, P. T.; FÁVARO, L. C. L.; RODRIGUES, M. B. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Genetic transformation of *Diaporthe phaseolorum*, an endophytic fungus found in mangrove

forest, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetic**, v. 58, pág. 21-33, 2012.

SENKIV, C. C. **Avaliação de lesões produzidas por transformantes de *Phyllosticta citricarpa* em frutos de citros destacados**. 38 f. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; DE GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T. F.; MACHADO, M. A. Fitopatologia mancha preta dos citros : epidemiologia e manejo. **LARANJA**, v. 30, n. 1-2, p. 45–64, 2009.

SILVEIRA, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. São Paulo: USP, v.1, p.71-79, 1989.

SOANES, D. M.; SKINNER, W.; KEON, J.; HARGREAVES, J.; TALBOT, N. J. Genomics of phytopathogenic fungi and the development of bioinformatic resources. *Molecular plant-microbe interactions* : **MPMI**, v. 15, n. 5, p. 421–7, 2002.

SPOSITO, M. B., AMORIM, L., BASSANEZI, R. B., FILHO, A. B. AND 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.

TAKAHARA, H.; TSUJI, G.; KUBO, Y.; *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation as a tool for random mutagenesis of *Colletotrichum trifolii*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 70, n. 2, p. 93–96, 2004.

TORQUES, A. A. **Avaliação das linhagens transformadas do fungo *Phyllosticta citricarpa* com o gene repórter *gfp*, para estudo da interação fungo-planta**. 42 f. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

VAN GENT-PELZER, M. P. E.; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; KOX, L. F. F.; BONANTS, P. J. M. A TaqMan PCR Method for Routine Diagnosis of the Quarantine Fungus *Guignardia citricarpa* on Citrus Fruit. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 6, p. 357–363, 2007.

WIKKEE, S.; UDAYANGA, D.; CROUS, P. W.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H. C; BAHKALI, A. H.; DAÍ, D.; HYDE, K. D. *Phyllosticta*—an overview of current status of species recognition. **Fungal Diversity**, v. 51, n. 1, p. 43-61, 2011.