

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Guignardia* spp.

Marília Pitombo Bixilia¹; Welington Luiz Araújo²

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: marilia_pb@hotmail.com¹
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: welingtonluiz@umc.br²

Área de conhecimento: Genética molecular e de microrganismos.

Palavras-chave: *Guignardia citricarpa*, Mancha Preta de Citrus, Diversidade Genética, RAPD, rDNA.

INTRODUÇÃO

A exportação de suco de laranja concentrado gera ao Brasil uma receita de aproximadamente US\$ 1,5 bilhão anuais, sendo o Brasil o maior produtor mundial. Além das exportações, tendo grande valor na produção, bem como na geração de aproximadamente 500 mil empregos diretos e indiretos. Entretanto, a citricultura brasileira é afetada por um grande número de doenças e pragas, proporcionando um gasto exaustivo com produtos químicos e perda de grandes áreas de plantio. Pinta preta ou mancha preta dos citros (MPC) é um sintoma causado pelo fungo *Guignardia citricarpa* Kiely (*Phyllosticta citricarpa* Mc Alpine anamorfo) que desqualifica o produto nacional, e prejudica a exportação. Esta doença que ataca citros é originária da Austrália e África do Sul, tendo ocorrência nas Américas somente no Caribe e no Brasil, primeiramente sendo detectada em São Paulo no ano de 1940 (TIMOSSI *et al*, 2003).

As lesões causadas pelo patógeno não interferem na qualidade interna dos frutos são restritas as suas cascas podem causar a queda prematura deles. São descritos os cinco diferentes tipos de lesões causados por *G. citricarpa*, os quais foram denominados de mancha dura, mancha sardenta, mancha virulenta, falsa melanose e mancha trincada. Esta doença pode fazer com que o fruto fique com a face externa totalmente necrosada, mas a parte interna não é afetada. Sintomas em ramos, folhas e inflorescências, são menos freqüentes (NORONHA, 2002)

As fases que se apresentam os ciclos reprodutivos, primários e secundários, são bem distintas. Primeiramente a fase sexual do ascomiceto, com estruturas reprodutivas infecciosas como ascósporos, que inoculam o microrganismo dando inicio as epidemias a cada ciclo da cultura. Seu ciclo secundário é pela fase assexuada, quando seus conídios são responsáveis pela fixação da doença na planta e ao seu redor (MENDES & FREITAS, 2005).

A queda das pétalas dá inicio ao período crítico para infecção, que se estende de quatro a cinco meses de desenvolvimento dos frutos, mas no Brasil pode chegar até seis meses. Na superfície dos órgãos os esporos produzem tubo germinativo e apressório que inicia a penetração na cutícula e epiderme, desta maneira o fungo pode permanecer latente por até um ano, este estágio pode ser interrompido quando o fruto atingir seu tamanho final e iniciar a maturação ou quando a folha já caída começar a se decompor. Nesta fase, o micélio subcuticular coloniza os tecidos mais internos, iniciando o aparecimento dos sintomas. Altas temperaturas, alta umidade e radiação solar são fatores fundamentais no

desencadeamento da pinta preta (NORONHA, 2002).

O ascomiceto *Guignardia citricarpa* Kiely (*Phyllosticta citricarpa* Mc Alpine anamorfo), pertence à ordem Dothideales e família Botryosphaeriaceae. *G. citricarpa* era conhecido anteriormente por apresentar dois biótipos: um virulento e outro avirulento e endofítico; portanto a simples presença do fungo não caracterizava a presença dos sintomas da doença. Posteriormente, foi observado que o biótipo endofítico pertence a espécie *G. mangiferae* (*P. capitalensis*: anamorfo) (BAAYEN et al., 2002), é detectado em várias plantas hospedeiras, e pode ser distinguido de *G. citricarpa* por meio de características culturais, morfológicas e testes de DNA (MENDES & FREITAS, 2005).

OBJETIVOS

Tendo em vista que a distribuição deste patógenos em pomares sadios é motivo de estudos, visto que permitirá o desenvolvimento de estratégias de controle e manutenção da sanidade no pomar, o presente projeto tem como objetivo principal isolar e analisar a variabilidade genética de *Guignardia* spp. isolados de folhas e frutos de citros de uma área com histórico recente de infecção, a qual foi realizada de forma controlada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

A coleta das folhas das plantas foi realizada de 4 parcelas, sendo cada parcela formada por uma planta central, onde folhas infectadas com o patógeno foram adicionadas abaixo da copa da planta. Dois anos após a introdução da fonte de inóculo, folhas e frutos de 10 plantas foram coletados nos 4 lados da planta central (com inóculo do patógeno) de cada parcela e a população de *Guignardia* foi amostrada

Isolamento de *G. citricarpa*

Após coleta, o material foi submetido a uma desinfecção superficial e posteriormente cortadas em fragmentos de aproximadamente 0,25 cm² e adicionadas ao meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubadas a 28°C de 5 a 10 dias (ARAÚJO et al., 2003). Após este período as colônias que apresentavam micélio fortemente pigmentado e estroma plectenquimatoso, morfológicamente semelhantes à *Guignardia* spp. foram coletadas e armazenadas.

Extração de DNA de *Guignardia* spp.

A técnica de Extração de DNA foi realizada conforme Comunicado técnico 69 da Embrapa para Otimização da Metodologia de Extração e Amplificação do DNA de Fungos do Solo. Para isso, os fungos foram cultivados em meio BD (batata-dextrose líquido). Após o crescimento do fungo, o micélio foi filtrado, lavado com água destilada esterilizada e armazenada a -4°C. O micélio foi macerado com nitrogênio líquido e submetido ao método de extração por Fenol: Clorofórmio.

Variabilidade na seqüência ITS (Internal Transcript Spacer)

A variabilidade nas seqüências espaçadoras 1 e 2 (ITS) e a subunidade 5,8S do rDNA será avaliada por meio da amplificação desta região com os primers ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Após a amplificação, o produto de PCR foi clivado com as enzimas *HaeIII* e *EcoRI*. Utilizando também o material resultantes da PCR com o primer ITS foi realizado a

purificação do material com o protocolo de Purificação PEG 8000, afim de sequenciar o mesmo. O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genômica do Núcleo Integrado de Biotecnologia da UMC, e para análise da sequência foram utilizados os programas BioEdit e Mega 4.0 para a identificação e construção da árvore cladística.

Amplificação de DNA por RAPD

A partir do DNA total foram preparadas reações de RAPD com primer previamente testados e selecionados, sendo utilizados OPE01 (5'CCCAAGGTCC3'), OPE08 (5'TCACCACGGT3'), OPP02 (5'CTGATACGCC3'), OPP03 (5'CTGATACGCC3'), OPP11 (5'AACGCGTCGG3'), OPP13 (5'GGAGTGCCTC3'), OPW12 (5'TGGGCAGAAG3'), OPX04 (5'CCGCTACCGA3'), OPX11 (5'GGAGCCTCAG3'), OPX14 (5'ACAGGTGCTG3'), OPAX03 (5'CCAAGAGGCT3'), da Operon Technologies.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amostradas 96 folhas próximas à região de inoculo, bem como de um fruto com sintomas típicos de MPC, resultando no isolamento 40 colônias morfológicamente semelhantes à *G. citricarpa*.

O DNA extraído dos isolados fúngicos foi utilizado como molde para a amplificação do rDNA com os primers ITS e posterior clivagem com enzimas de restrição (figura 01). Os resultados mostraram que não existe variabilidade na população amostrada, sugerindo que os isolados amostrados pertencem à mesma espécie.

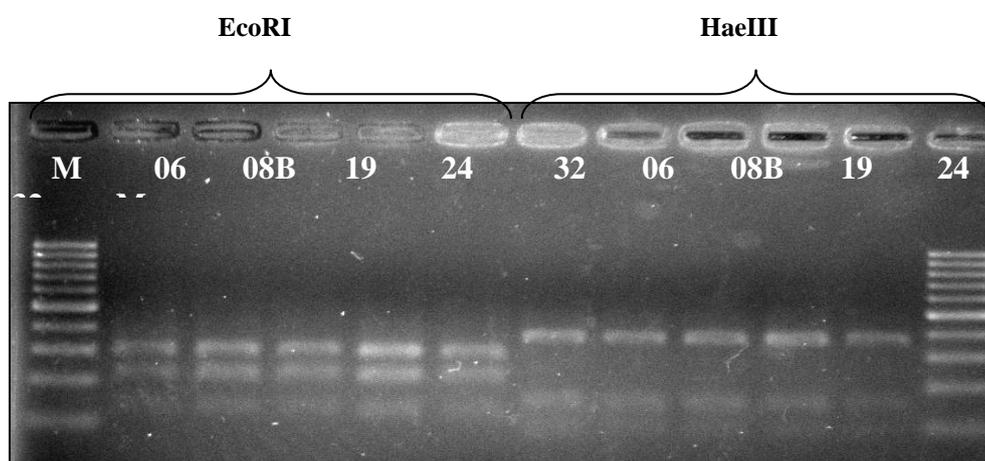


Figura 05. Gel de ARDRA dos isolados fúngicos de *Citrus sinensis*, clivados com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HaeIII* (*BsuRI*), e marcador molecular de 100pb (Fermentas).

A análise da sequência do rDNA de 17 isolados permitiu a sua identificação, confirmando que 2 isolados de lesão de frutos pertencem à espécie *G. citricarpa*, a qual é o agente causal da pinta preta dos citros. Quinze isolados (sendo 4 de frutos e 11 de folhas) foram identificados como *G. mangiferae* à qual é reconhecida como endófito de várias espécies vegetais (BAAYEN et al. 2002; GLEINKE, 1999). Estes dados mostram que embora o patógeno tenha sido introduzido na área estudada, ele não foi capaz de colonizar as plantas próximas à área de introdução. Os isolados de *G. citricarpa* observados foram coletados em frutos distantes da área de introdução do patógeno,

sugerindo que possam ter se originado de uma segunda fonte de inoculo ainda não identificada. A análise de RAPD incluindo isolados obtidos de plantas doentes na região de onde foi coletada a fonte de inoculo poderá mostrar a origem dos isolados de *G. citricarpa* observados no pomar de Jales. O presente projeto permitirá avaliar se ocorre seleção de genótipos do patógeno na área amostrada e estabelecer correlação entre estes genótipos e a distribuição de *Guignardia* spp. no campo.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que a análise da população de *Guignardia* spp. pela técnica ARDRA com as enzimas de restrição *HaeIII* e *EcoRI* não mostrou variabilidade na população amostrada, sugerindo pertencerem a um mesmo genótipo/espécie. O seqüenciamento das amostras permitiu a identificação dos isolados fungicos, confirmando a presença de *Guignardia mangiferae* (endófito) em todas as folhas coletadas e *G. citricarpa* apenas em frutos com lesão de pinta preta

Os isolados observados em folhas de citros cultivados em área com histórico recente de infecção demonstrou que embora o patógeno tenha sido inoculado na área, ele não se estabeleceu nas plantas avaliadas.

AGRADECIMENTOS

Este projeto esta sendo financiado pela FUNDECITRUS. Também agradecemos ao programa PIBIC/CNPq/UMC pela bolsa concedida à M.P. Bixilia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAAYEN, R.P., BONANTS, P.J.M., VERKLEY, G., CARROLL, G.C., VAN DER AA, H.A., DE WEERDT, M., VAN BROUWERSHAVEN, I.R., SCHUTTE, G.C., MACCHERONI JR., W., GLIENKE DE BLANCO, C., AZEVEDO, J.L., Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology* 92, 464-477. 2002.
- GLIENKE, C. *Guignardia citricarpa* Kiely: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro. Dissertação (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba Piracicaba, SP; 1999.
- MENDES, A. S.; FREITAS, V. M. Comunicado Técnico: Espécies invasoras para a citricultura, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2005.
- NORONHA, M. A. Escala diagramática para avaliações da mancha preta em folhas de citros e efeito da temperatura e da duração do molhamento na pré penetração de conídios de *Guignardia citricarpa*. 2002. Não paginado. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- TIMOSSI, A. J.; GOES, A.; KUPPER, K. C.; BALDASSARI, R. B.; REIS, R. F. Influência da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, p. 489-494, 2003.