

Efeito de fontes de carbono e nitrogênio no crescimento e reprodução de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros.

André Luiz Menezes MACHADO¹, Maria MENEZES²

RESUMO: O presente trabalho objetivou comparar o efeito da combinação de diferentes fontes de nitrogênio com diferentes fontes de carbono no crescimento e reprodução do fungo *Guignardia citricarpa*, na proporção de 1:10 (1g de nitrogênio para 10g de carbono). Foram utilizadas quatro fontes de nitrogênio (peptona, caseína, nitrato de cálcio e sulfato de amônio) e quatro fontes de carbono (sorbitol, glucose, glicerina e sacarose), distribuídas num meio basal (fosfato de potássio e sulfato de magnésio) solidificado com ágar. Discos de micélio de *G. citricarpa* foram depositados no centro das placas de Petri, contendo as fontes de nitrogênio e as fontes de carbono. As culturas foram incubadas em condições de alternância luminosa, à temperatura de 25°C, e umidade relativa de 60%, durante oito dias. A avaliação foi efetuada através da medição diária do crescimento micelial do fungo; observações sobre a produção e fertilidade dos picnídios, bem como, a presença de pseudotécios. Das fontes de carbono e nitrogênio estudadas, o nitrato de cálcio x glucose ou sacarose induziram o maior crescimento do fungo, enquanto que a produção de pseudotécios e picnídios férteis foi estimulada, principalmente, nas combinações envolvendo glicerina x caseína e glicerina x peptona.

Palavras-chave: Fontes de Nutrientes, *Guignardia citricarpa*.

INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, a citricultura brasileira tem-se desenvolvido bastante, constituindo-se, atualmente, num importante campo de exploração agrícola. Entretanto, os citros estão sujeitos a várias doenças que reduzem a produção e a produtividade. Dentre elas, encontra-se aquela causada por *Guignardia citricarpa* Kiely, para o qual as condições climáticas do Brasil parecem ser favoráveis a sua ocorrência, embora não haja relatos sobre perdas, no país. Entretanto, *G. citricarpa* ocorre como importante patógeno na África do Sul, Austrália, China, Taiwan e Japão, afetando folhas e frutos de todas as variedades comerciais de cirros (Rossetti, 1975). No Brasil, Araújo, Glienke e Aguilar e Azevedo (1995) detectaram *Guignardia* sp. em tangerinas e cirros numa frequência de 27% e 33%, respectivamente. Em Pernambuco, o patógeno foi isolado de frutos infectados no Laboratório de Micologia, do DEPA - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em 1993 (dado não publicado)*.

O gênero *Guignardia*, segundo Alexopoulos e Mims e Blackwell (1996), pertence a classe dos Ascomycetes (Loculoascomycetes), ordem Pleosporales e família Botryosphaeriaceae. Apresenta como seu anamorfo o fungo *Phyllostictina*, da classe dos Deuteromycetes (Coelomycetes), que produzem picnídios. Tanto os ascósporos como os conídios são disseminados pelo vento,

respingos de chuva e mudas infectadas, e ambos podem causar infecção, desempenhando papéis importantes na disseminação da doença. Os esporos ao atingir a superfície foliar ou de frutos de hospedeiros suscetíveis, germinam e penetram através de ferimentos ou dos estômatos das folhas, colonizando o tecido. O tecido necrosado é, a princípio, de coloração escura, daí o nome "Citrus Black Spot" para a doença (Whiteside e Garnsey e Timmer, 1988), tornando-se mais tarde de cor parda com halo amarelo, mais visível no tecido foliar. A superfície da lesão pode apresentar um aspecto feltroso, áspero ao tato. Sobre as lesões são produzidos picnídios e pseudotécios estromáticos, que liberam, respectivamente, conídios e ascósporos, que poderão infectar novos tecidos da mesma planta ou de outro hospedeiro suscetível da mesma espécie. Os sintomas da doença podem aparecer quando o fruto está totalmente crescido e em mudança da coloração da casca.

Em geral, as espécies de *Guignardia* citadas na literatura, causam lesões necróticas em diferentes hospedeiros, como *G. bidwelli* em videira, *G. musae* em bananeira, *G. arachidis* em amendoim, *G. cocoicola* em coqueiro, *G. heveae* em seringueira, *G. mangiferae* em mangueira, além de outros (Punithalingam, 1974). Em estudos realizados por Glienke et al. (1995), *G. citricarpa* foi isolado de folhas de quatro variedades de tangerinas, em Cordeirópolis, São Paulo. Apesar de sua

¹ Bolsista do PIBIC.

² Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da U.F.R.PE Pesquisadora do CNPq.

ocorrência, aparentemente comum, há escassez de trabalhos sobre as espécies do gênero e também sobre condições de cultivo de *Guignardia*. Tozetto e Ribeiro (1995a) estudaram alguns meios de cultura para obtenção de conídios e ascósporos de *G. psidii*, patógeno da goiabeira (*Psidium guajavae*) e verificaram que aprovação de conídios foi mais eficiente em meio de aveia-sacarose-ágar, a 17°C, sob luz contínua, por 18 dias. Também, Tozetto e Ribeiro (1995b) determinaram a influência de alguns fatores físicos sobre a germinação de conídios e ascósporos de *G. psidii* (*Phyllosticta psidii*) e verificaram que a temperatura mínima para ocorrer a germinação foi de 12°C para os ascósporos e de 21°C para os conídios. Os autores não observaram influência da luminosidade na germinação e nem na formação de apressórios.

Tentando suprir esta lacuna, a presente pesquisa objetivou comparar o efeito da combinação de diferentes fontes de nitrogênio e carbono no crescimento micelial e reprodução de *G. citricarpa*, fornecendo subsídios básicos para outros trabalhos, visando a obtenção de esporos em abundância para estudos envolvendo a inoculação de plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

As folhas coletadas foram lavadas com água e sabão e, em seguida, partes periféricas das lesões foram retiradas e, em ambiente asséptico, expostas ao tratamento, para desinfecção, com álcool 50%, por 30s; hipoclorito de sódio 1,5%, por 2min e água destilada estéril pelo tempo desejado, para remoção do excesso de hipoclorito, sendo então secas em papel de filtro esterilizado e transferidas para placas de Petri contendo BDA. A incubação foi efetuada em condições de alternância luminosa, à temperatura de 25°C. Após o crescimento, o patógeno foi repicado para tubos de ensaio, em condições de cultura pura.

Para o estudo do efeito de fontes de carbono e nitrogênio, no crescimento e reprodução de *G. citricarpa*, foram utilizadas quatro fontes de nitrogênio, sendo duas orgânicas (peptona e caseína) e as demais inorgânicas (nitrato de cálcio e sulfato de amônio), e quatro fontes de carbono (sorbitol, glucose, glicerina e sacarose), adicionadas, na proporção 10:1 (10g de carbono para 1g de nitrogênio), a um meio basal constituído de fosfato monobásico de potássio (1g), sulfato de magnésio (0,5g) e ágar (17g) (Lilly e Barnett, 1957), quantidade suficiente para 1000ml de

meio. Os diferentes meios foram autoclavados a 120°C, durante 20min. Após a esterilização, os meios foram vertidos em placas de Petri, aproximadamente 20ml por placa.

Paralelamente, foi preparada uma "matriz" de *G. citricarpa*, através da repicagem do fungo para placas de Petri contendo BDA, em condições assépticas. Quando o crescimento do patógeno atingiu mais de 50% da superfície do meio, discos de micélio (5mm de diâmetro, aproximadamente) foram removidos da colônia, com o auxílio de um canudo plástico, e transferidos, individualmente, para o centro de cada placa contendo a combinação das diferentes fontes de nitrogênio e carbono. As culturas foram incubadas em condições de alternância luminosa, à temperatura de 25°C, durante oito dias, seguindo-se o delineamento inteiramente casualizado, com 16 tratamentos, representados pelas fontes de nitrogênio e carbono, com quatro repetições.

A avaliação, para o crescimento, foi feita diariamente em intervalos de 24h, através de medições do diâmetro da colônia, em duas direções perpendiculares, estabelecendo-se uma média para cada substrato.

Decorrido o período de incubação foi realizada a leitura final das placas, com o auxílio de lupa estereoscópica, para a observação da presença de picnídios (férteis ou estéreis) e pseudotécios (férteis ou estéreis) nas diferentes combinações de carbono nitrogênio. Para a verificação da fertilidade, lâminas foram preparadas com o emprego do azul de Amann e examinadas ao microscópio. Do mesmo modo, as culturas foram analisadas para a observação da presença de pseudotécios, ascos e ascósporos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do efeito da relação carbono / nitrogênio no crescimento micelial de *G. citricarpa* são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Médias de crescimento de *G. citricarpa* em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Fontes de carbono	Fontes de nitrogênio				Médias de carbono
	Nitcal	Caseína	Peptona	Sulfamon	
Glucose	8,03 a	4,13 b	4,64 a	1,36 b	4,54 a
Sorbitol	4,25 c	5,23 a	4,23 b	1,21 c	3,73 b
Sacarose	6,46 b	3,16 c	2,80 c	1,10 d	3,38 c
Glicerina	2,53 d	1,06 d	0,95 d	2,45 a	1,75 d
Médias de nitrogênio	5,32 A	3,39 B	3,16 C	1,53 D	

C.V.=17,3%

Médias de quatro repetições. Médias seguidas da mesma letra minúscula (na vertical) e maiúscula (na horizontal) não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Considerando-se as diferentes fontes de carbono, independentes do tipo da fonte de nitrogênio, observa-se um efeito significativo da Glucose no crescimento de *G. citricarpa* em relação ao sorbitol, sacarose e glicerina. Esta última comportou-se como uma fonte de carbono muito pobre para o crescimento vegetativo do patógeno em estudo. Por outro lado, considerando-se as fontes de nitrogênio, independentes do tipo de fonte de carbono, verifica-se um maior destaque para o nitrato de cálcio, que proporcionou melhor crescimento em comparação as médias obtidas em peptona, caseína e sulfato de amônio. Esta última foi considerada muito pobre para o crescimento de *G. citricarpa*.

Os resultados da interação carbono x nitrogênio mostraram efeito significativo para as médias de crescimento do fungo em glucose x nitrato de cálcio, glucose x peptona, sorbitol x peptona e sorbitol x caseína. Embora a interação glicerina x sulfato de amônio tenha revelado efeito significativo, em relação às demais combinações dentro do nível sulfato de amônio, observa-se no entanto, um fraco desempenho do crescimento micelial de *G. citricarpa* neste substrato.

Dos dados obtidos através de leituras diárias do crescimento, foram determinadas curvas de crescimento de *G. citricarpa* nas diferentes combinações de carbono/nitrogênio, conforme mostrado na Figura 1.

Em geral, foi observada a formação de picnídios e pseudotécios estromáticos e bem formados. As colônias apresentaram uma coloração negra superfície rugosa, com bordos irregulares (Figura 2). Tanto os picnídios, como os pseudotécios, mostraram-se férteis, com abundância de conídios e ascósporos (Figura 3).

Os aspectos fisiológicos de *G. citricarpa* indicaram exigências nutricionais diferentes para o crescimento vegetativo e reprodução. No que diz respeito ao crescimento, o glucose X nitrato de cálcio foi o melhor. Segundo Cochrane (1958), a glucose é a melhor fonte de carbono para crescimento da maioria dos fungos; também o nitrato é uma fonte de nitrogênio utilizada por muitos fungos, sendo o nitrato de cálcio um dos mais usados, como fonte de nitrogênio nítrico.

Para utilizar o nitrato, um fungo deve ser capaz de reduzi-lo a amônia (Cochrane, 1958). Segundo Robins, apud Cochrane (1958), não existe exemplo de organismos que sejam capazes de utilizar o nitrato e não utilizar a amônia. Isso, aparentemente, contradiz com os resultados obtidos para crescimento, já que o sulfato de amônio proporcionou um

crescimento pobre. O sulfato de amônio é um sal derivado de um ácido forte, o que torna o meio mais ácido, alterando a faixa de pH ideal para o crescimento, enquanto os nitratos tornam o meio mais básico (Lilly e Barnett, 1951). Segundo estes autores, uma variação básica ou neutra na faixa de pH é melhor que uma variação ácida, para o crescimento.

A fonte de carbono supre o carbono necessário para a síntese de compostos que formam as células vivas, já que a principal fonte de energia é a oxidação dos compostos de carbono. Sendo a glucose utilizada para o crescimento de todos os fungos cultiváveis (Cochrane, 1958), isto justifica a obtenção do maior crescimento de *G. citricarpa* nesta fonte. O Sorbitol sendo um álcool da Glucose, também promoveu um bom crescimento, porém sua diferença consiste na preferência de muitos fungos pela utilização do açúcar do que do álcool correspondente e que, provavelmente, *Guignardia* seja um deles.

No tocante a formação de picnídios, quando a fonte de carbono foi a sacarose, o nitrato de cálcio promoveu a maior produção de picnídios, não ocorrendo o mesmo em sulfato de amônio. Provavelmente a queda do pH, induzida pelo último, e a variação alcalina, no primeiro, levou a este resultado. Já a caseína, fonte de nitrogênio orgânico e utilizada por todos os fungos, induziu maior fertilidade, juntamente com a peptona e o nitrato de cálcio. Caseína e peptona são fontes utilizadas por todos os fungos e possuem a maioria das vitaminas hidrossolúveis, as quais são importantes para a reprodução. Nakamura (1975) obteve uma maior produção de picnídios de *Ascochyta phaseolorum* altamente significativa, quando a fonte de nitrogênio foi sulfato de amônio associado a diferentes níveis de glucose. O efeito do sulfato de amônio induziu uma boa formação de picnídios, em combinação com glicerina, dentro do nível sulfato de amônio, o que sugere a ocorrência de alguma substância indutora da reprodução de *G. citricarpa* neste substrato.

Considerando a quase inexistência de estudos sobre *G. citricarpa*, e a sua frequência em plantas cítricas, estes resultados servem de base para o desenvolvimento de pesquisas sobre a fiso-morfologia da fase teliomórfica do referido patógeno.

ABSTRACT

The present work was carried out with the objective to compare the effect of four nitrogen and four carbon sources associated in a basal medium, on growth and reproduction of *Guignardia citricarpa*. Disks of mycelium removed from a pure colony, were placed

on the center of Petri dishes containing each medium. The cultures were incubated under alternated luminosity, at 25°C, and 60% UR, during eight days. The evaluation was made by daily measurements of mycelial growth, observation on picnidial production and fertility, as well formation of pseudotecia. The results showed that calcium nitrate combined with glucose or sucrose induced superior fungal growth, while glicerol combined with casein or peptone stimulated the reproduction, presenting *G. citricarpa* pseudotecia and picnidia fertiles.

Key-words: Nutrient Sources, *Guignardia citricarpa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. New York: John Wiley, 1996. 868 p.
- 2 ARAÚJO, W. L.; GLIENKE, C.; AGUILAR, C. I. et al. Verificação da flora micótica do interior de tecidos foliares de quatro cultivares de tangerinas e onze porta-enxertos de citrus. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p. 379, ago., 1995. Suplemento.
- 3 COCHRANE, V. W. *Physiology of fungi*. New York: John Wiley, 1958. 524 p.
- 4 GLIENKE, C. I.; AGUILAR, V.; ARAÚJO, W. L. et al. O fungo *Guignardia citricarpa* isolado como endofítico de quatro variedades de tangerineiras em Cordeirópolis, S. P. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p. 309, ago., 1995. Suplemento.
- 5 LILLY, V. G.; BARRETT, H. L. *Physiology of the fungi*. New York: McGraw-Hill Book Company, 1951. 461 p.
- 6 NAKAMURA, A. M. Fisiologia da reprodução e patogenicidade de *Ascochyta phaseolorum* Saccardo. São Paulo, 1975. p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitossanidade) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo.
- 7 PUNITHALINGAM, E. Studies on *Sphaeropsidales* in culture. II. Mycological papers, C. A. B. Conim. Mycol. Institute, Kew, Surrey, England, n. 136, p. 1-63, 1974.
- 8 ROSSETTI, V. Citrus diseases. In: CIBA-GEIGY. *Citrus*. Basle, 1975. p. 45-50.
- 9 TOZETTO, L. J.; RIBEIRO, W. R. C. Obtenção de conídios e ascósporos de *Guignardia psidii* (*Phyllosticta psidii*) e sua inoculação em frutos e folhas de goiaba (*Psidium guajavae*) e outras hospedeiras. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.318., ago., 1995a. Suplemento.
- 10 TOZETTO, L. J.; RIBEIRO, W. R. C. Germinação in vitro de conídios e ascósporos de *Guignardia psidii* (*Phyllosticta psidii*), causador de podridão em frutos de goiaba. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, p.318, ago, 1995 b. Suplemento.
- 11 WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W.(Ed.). *Compendium of Citrus Diseases*. St. Paul: APS PRESS, 1988. 80 p.

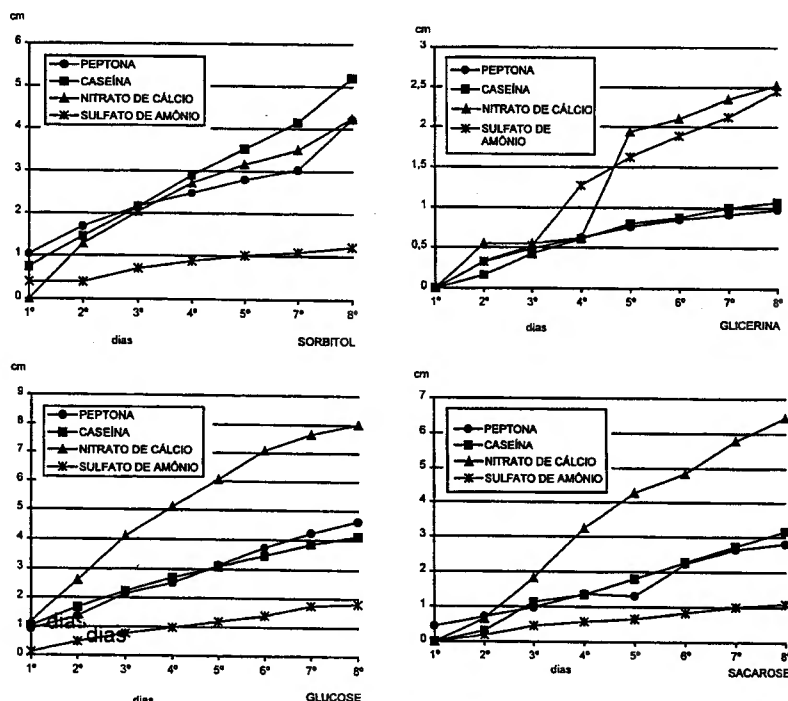


Figura 1 - Curvas de crescimento de *G. citricarpa* em diferentes combinações de carbono x nitrogênio.