



AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Citrus spp.* QUANTO A RESISTÊNCIA DE INFECÇÃO DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Andressa Cazetta (PIBIC/CNPq/Uem), Juliana Glória Franco (Mestranda), Paula Thaís Requena Nocchi (Doutoranda), Dauri Jose Tessmann (co-orientador) William Mário de Carvalho Nunes (Orientador), e-mail: wmcnunes@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Agronomia

5.01.00.00-9 Agronomia/5.01.02.00-1 Fitossanidade

Palavras-chave: *Xanthomonas*, inoculação, resistência.

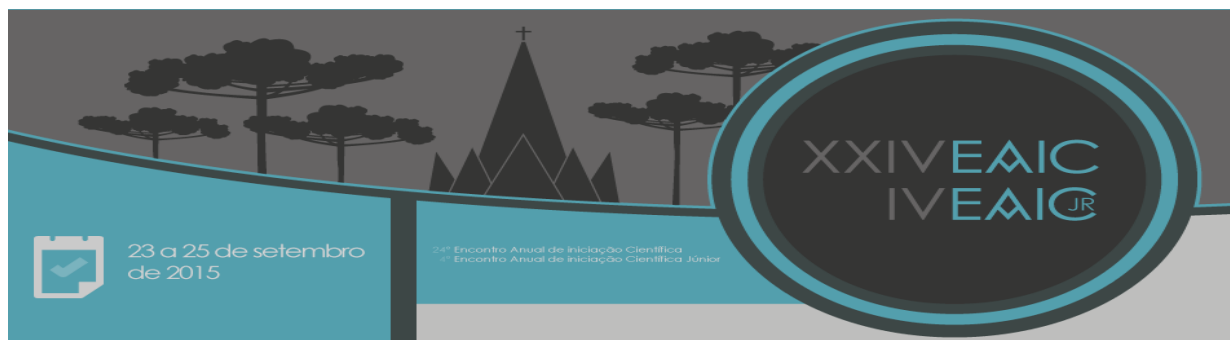
Resumo:

Por sofrer severos prejuízos quando atacado por doenças e pragas, o setor citrícola brasileiro é responsável por grandes pesquisas que visam à busca de melhoramento de sua resistência e produtividade. Uma das doenças mais severas é o Cancro Cítrico Asiático, transmitida pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causando danos irreversíveis a planta, estes podem ser visualizados em toda sua parte aérea, tendo como porta de entrada estômatos, hidatódios, lenticelas ou ferimentos trazendo lesões salientes circundadas por um halo amarelo. Em contato com os frutos apresenta lesões semelhantes e os sintomas se agravam com a queda antes da maturação. Não há um controle eficaz para o seu fim, o que se aconselha é o uso de variedades resistentes tornando-se uma opção viável ao produtor e sustentável ao ambiente. Neste trabalho buscou-se avaliar a severidade de cancrose em folhas destacadas de duas variedades com diferentes níveis de resistência, inoculadas a partir de perfurações com agulha em folhas coletadas e desinfetadas, as avaliações foram medidas a partir de um micrômetro e os resultados submetidos ao Teste de Scott-Knott onde observou-se que a severidade da doença foi maior na variedade menos resistente. Para a melhor avaliação do desenvolvimento da doença e da anatomia dos estômatos as amostras foram encaminhadas à Microscopia Eletrônica de Varredura.

Introdução

Por mais produtiva que venha a ser, a citricultura assim como outras culturas sofre constantemente o ataque de alguns patógenos. Nesta categoria destacamos o cancro cítrico, que tem como agente etiológico a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006) que acarreta danos e perdas a citricultura, diminuindo o potencial produtivo e a qualidade dos frutos (DOCENA, 2006).

Testes diagnósticos são usados para medir a resistência da patogenicidade, o mais importante deles é a inoculação do hospedeiro por ferimentos com agulha imersa em solução com inoculo (10^6 a 10^8 UFC/ml) (BELASQUE JR. e JESUS JR., 2006), juntamente com a técnica de estimativa do diâmetro das lesões de cancro cítrico (NOCITI et al., 2006). Uma técnica eficaz, de baixo custo econômico e de rápida



obtenção de resultados é a inoculação em folhas destacadas, método usado durante este trabalho que teve por objetivo avaliar dois genótipos cítricos com diferentes níveis de resistência a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e estudar sua morfologia através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Materiais e métodos

Avaliou-se duas variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) sem sintomas ou sinais de patógeno, uma mais resistente (PERA IAC) e uma menos resistente (VALENCIA FROST), a coleta foi realizada na casa de vegetação do Centro Tecnológico de Irrigação da Universidade Estadual de Maringá (CTI-UEM) e encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da Universidade Estadual de Maringá (NBA-UEM).

Os ramos coletados foram lavados e desinfetados com hipoclorito 1%, e realizado o corte das folhas permitindo que parte do ramo permanecesse junto à folha com o pecíolo. A inoculação da bactéria *X. citri* foi através da estirpe Xcc 306 com auxílio de uma agulha esterilizada, perfurando oito vezes cada folha com o inoculo ajustado a uma concentração de 10^8 UFC/ml (BELASQUE JR. e JESUS JR., 2006) em espectrofotômetro a 600 nm. Ao fim da inoculação as folhas foram mantidas em Tubo Falcon com cerca de 1,5 ml de água da torneira ou o suficiente para cobrir parte do ramo e metade do pecíolo sem atingir o limbo foliar, o tubo não foi fechado completamente para que a folha continuasse normalmente sua transpiração, seu armazenamento foi mantido a temperatura ambiente.

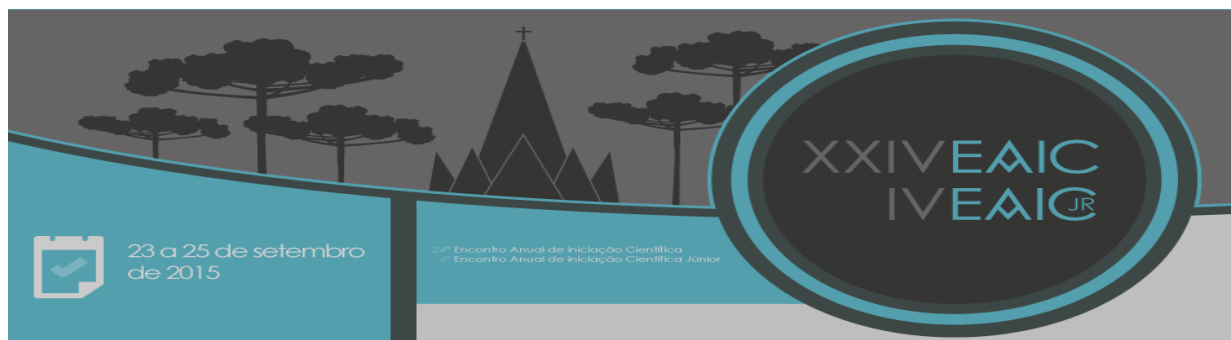
Cada tratamento foi composto de oito repetições, consideradas uma unidade experimental. As avaliações foram realizadas através da medida do diâmetro de lesões com o auxílio de um micrômetro externo (*Disma* 0-25 mm) nos períodos de 7, 10 e 13 dias após a inoculação. Com os resultados dessas avaliações e utilizando o software SISVAR, versão 5.1 foi feito o teste de Scott Knott, ao nível de 5% de significância, que visa comparar as médias dos parâmetros avaliados.

As folhas inoculadas que apresentaram os sintomas de cancro cítrico foram observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e analisadas através do aparelho SHIMADZU SS-550. Realizaram-se cortes de 5x5 mm antes da inoculação e ao 3º, 7º e 10º após a inoculação (DAI) sendo armazenados em solução fixadora de Cacodilato 0,1 M com Glutaraldeído 2,5%, armazenados em geladeira.

Posteriormente as amostras foram lavadas três vezes com Cacodilato 0,1M e desidratadas em gradiente crescente de etanol. Para chegar ao ponto crítico, substituiu-se o etanol por CO₂ em aparelho BALZERS CPD 030, depois foram metalizadas em ouro e levadas ao MEV a fim de observar a morfologia dos estômatos e colonização bacteriana.

Resultados e Discussão

Observou-se que o desenvolvimento da bactéria começou no 3º dia após a inoculação se estendendo até o 10º dia (Figura 1), estando de acordo com Deng et. al., (2010) onde na variedade moderadamente resistente, a bactéria se desenvolveu de maneira mais lenta e menos severa quando comparada a outra variedade menos resistente, que teve o desenvolvimento da bactéria muito visível.



Em relação à medida dos diâmetros (Figura 1), em teste estatístico de Scott-Knot ao nível de 5% de significância as médias comprovaram a ideia de resistência de cada variedade, a Pera IAC (0,24 mm) sendo mais resistente e a Valência Frost (1,07 mm) com o título de menos resistente. Informações que são comprovadas a partir de avaliações já feitas por Amaral et. al., (2010) e por Gonçalves-Zuliani et. al., (2011b) em seu trabalho de campo.



Figura 1 – Resultado da inoculação da bactéria (esquerda) e medida do diâmetro das lesões (direita).

Com os resultados gerados pelo MEV, observou-se que há diferença estomática entre as variedades, na Pera IAC a abertura estomática é vista de forma pequena e estreita, além de terem menos estômatos distribuídos pela superfície foliar, já na Valência Frost a abertura estomática é bem mais larga e a quantidade de estômatos também é maior, essa informação obtida faz relação com os resultados de Wang et. al. (2011). Com isso, a presença de mais estômatos e a diferença de aberturas podem favorecer a entrada bacteriana e explicar o grau de resistência de cada variedade.

Referente aos dias avaliados após a inoculação de *X. citri*, vimos que as variedades são extremamente diferentes em relação ao ataque da doença.

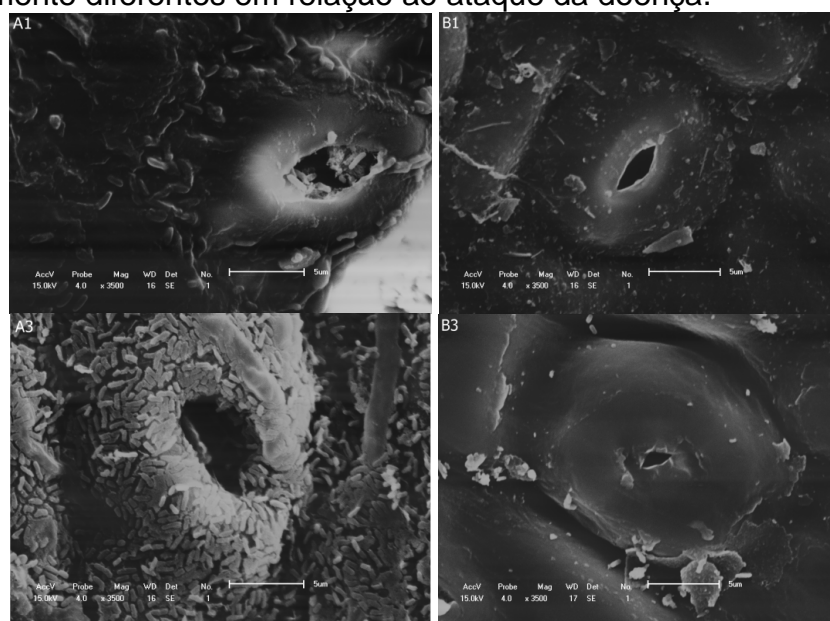
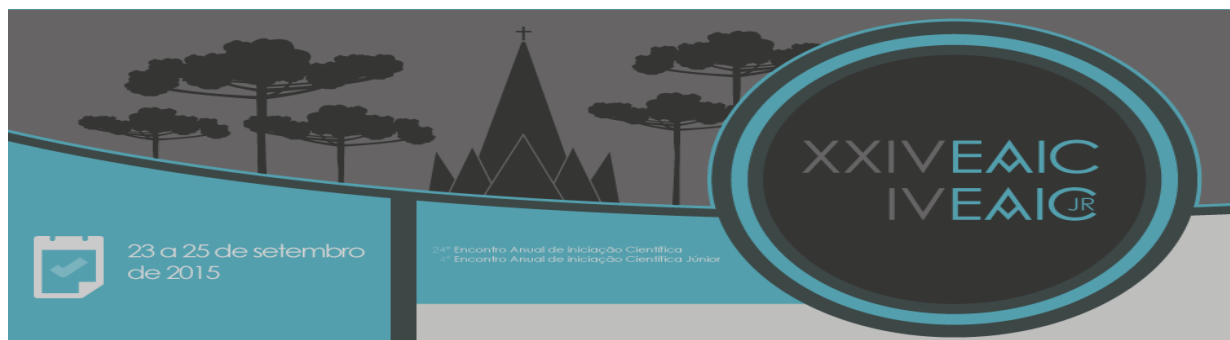


Figura 2: Observação do desenvolvimento de *X.citri* subsp. *citri* e anatomia dos estômatos nas variedades em aumento de 3500x. A1-A3: Valência Frost; B1-B3- Pera IAC.



Conclusões

Aliando o método de folhas destacadas e inoculadas, onde a variedade menos resistente Valencia Frost teve um ataque mais severo da doença e ao observar na Microscopia Eletrônica de Varredura que a variedade Pera IAC dita como mais resistente teve diâmetro de lesões menores sendo relacionados à menor abertura estomática formando uma barreira física que defende a planta do ataque da doença. Conclui-se que combinar estudos de resistência genética com a visualização destes em MEV é importante na obtenção de informações para a compreensão das formas de defesa das plantas atacadas por *X. citri*.

Agradecimentos

A Deus pela proteção diária, ao professor Willian por toda paciência, a minha família por todo o apoio e ao CnPq pelo investimento.

Referências

- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A. E AGARKOVA, I. V. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 29, p. 690-695, 2006.
- GOTTWALD, T.R. & GRAHAM, J.H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial
- BELASQUE, JR., J.; JESUS JR., W. C. Concentração de inoculo de métodos de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Laranja*, v. 27, p. 263-272, 2006.
- NOCITI, L. A. S.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J.; FRANCISCHINI, F.J.B.; BELASQUE JR., J. Agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolli* tipo C em lima acida Galego. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 140-146, 2006.
- DENG, Z. N.; XU, L.; LI, D. Z.; LONG, G. Y.; LIU, L. P.; FANG, F.; SHU, G. P. Screening citrus genotypes for resistance to canker disease (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). *Plant Breeding*, v. 129, p. 341-345, 2010.
- AMARAL, A.M.; CARVALHO, S.A.; SILVIA, L.F.C; MACHADO, M.A. Reaction of genotypes od citrus species and varieties to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under Greenshouse conditions. *Journal of Plant Pathology*, 92, p. 519-524, 2010.
- GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O; BELASQUE JR.,J.; ZANUTTO, C. A.; REMOLLI, J.A.; NUNES, W. M.C. Resistance of 'Pera' sweet orange (*Citrus sinensis*) genotypes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in field conditions. *Workshop on Xanthomonas citri/Citrus canker*, p. 78-80, 2011b.
- DOCENA, C. Identificação das interações envolvendo proteínas relacionadas aos sistemas de Dois-Componentes e aos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. 2006, 217 f. Tese (Doutorado) – Programa em Pós-Graduação em Química, USP, São Paulo, 2006.