

## ESTUDO SOBRE A INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE INOCULAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Andressa Cazetta (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Diego Henrique Pereira Catani (Doutorando) William Mário de Carvalho Nunes (Orientador), e-mail: andressa\_cazetta@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Agrárias/Maringá PR.

### 5.01.00.00-9 Agronomia / 5.01.02.00-1 Fitossanidade

**Palavras-chave:** métodos, inoculação, bactéria

**Resumo:** A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causa o Cancro Cítrico, uma doença extremamente importante e severa na citricultura que provoca danos em todas as etapas de desenvolvimento da planta. Esse tipo de bactéria apresenta reação gram-negativa, respiração aeróbica, formato baciliforme e motilidade por um flagelo polar, a produção de polissacarídeos ajuda na sua dispersão e sobrevivência. Sua colonização é restrita a área infectada e apresenta lesões salientes sobre a superfície dos tecidos. Pode ser disseminada pelas chuvas, vento, restos culturais, pessoas ou veículos transitando pela lavoura, o clima tropical facilita o desenvolvimento da doença. Laboratorialmente, o tipo de inoculação é muito relevante no processo infeccioso dessa bactéria, além da presença de ferimentos no hospedeiro e do contato com o patógeno. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar três métodos distintos de inoculação: a aspersão da bactéria sobre as folhas, o molhamento das folhas com algodão e a inoculação através de agulhas, analisando a influência e a eficácia de cada um no desenvolvimento da bactéria. Utilizou-se mudas de laranja doce (*Citrus sinensis*), variedade Pera, inoculadas com a estirpe Xcc 306 e mantidas em condições parcialmente controladas. Com as avaliações, o método mais eficiente foi o da inoculação através de agulhas, sendo o único que apresentou sintomas, o que pode estar relacionando com as lesões provocadas previamente na superfície da folha facilitando a entrada da bactéria.

### Introdução

Os sintomas característicos do Cancro Cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006) podem ser vistos nas folhas, ramos e frutos, são necroses geralmente circundadas por um halo amarelo, especialmente nos frutos, pode levar a queda e causar rachaduras que servem como porta de entrada para outros patógenos (LARANJEIRA et al., 2005). Sua porta de entrada na planta são estômatos, hidatódios, lenticelas e ferimentos (GOTWALD, GRAHAM, 1992; GRAHAM et. al., 1992), além disso, as injúrias causadas pela Larva Minadora (*Phyllocnistis citrella*) facilitam o ataque da bactéria, potencializando os danos. A infecção depende da fase de crescimento e desenvolvimento do hospedeiro, sendo assim não ocorre de forma uniforme ao longo do ano. O período de maior infecção dessa bactéria é no início do verão, onde há maiores incidências de vento, chuva e temperaturas elevadas ao mesmo tempo, típico de clima tropical nas condições brasileiras (LARANJEIRA et al., 2005).

O tipo de inoculação é um dos fatores mais relevantes no processo infeccioso da bactéria, além da presença de ferimentos no hospedeiro e do contato com o patógeno. Depois de decidido o processo de infecção, o sintoma comum em todos os métodos empregados é o de áreas necróticas (BELASQUE JR., J.; JESUS JR., W. C., 2006).

Sendo assim, o objetivo foi analisar diferentes métodos de inoculação e definir sua eficácia no desenvolvimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

## Materiais e métodos

Conduziu-se o experimento em casa de vegetação nas instalações do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá. Trabalhou-se com mudas de laranja doce (*Citrus sinensis*), variedade 'Pera IAC', provenientes do Viveiro de Mudas Pratinha, do município de Paranavaí, Paraná. As plantas passaram por poda aos 50 dias antes da inoculação, com o objetivo de obter folhas entre 75 e 100% de uniformidade. Nas inoculações, utilizou-se a estirpe Xcc 306, obtida das culturas puras do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) e ajustou-se o inoculo a  $10^8$  unidades formadoras de colônia/mL (BELASQUE JR.; JESUS JR., 2006) com auxílio de um espectrofotômetro ajustado para leitura a 600 nm.

Empregou-se três métodos de inoculação: **A.** Perfuração do limbo foliar com agulha (0,55 x 0,20 mm), após sua imersão na suspensão bacteriana, sendo realizadas seis perfurações por folha; **B.** Aspersão de suspensão bacteriana com borrifador, até o ponto de escorrimento; **C.** Fricção de algodão embebido com suspensão bacteriana, sendo cinco fricções longitudinais em toda a epiderme abaxial do limbo foliar. Em cada método de inoculação empregou-se três plantas (repetições) com 8 folhas inoculadas em cada. Nas 24 horas antes e após a inoculação umidificou-se a casa de vegetação e a manteve sob temperaturas entre 13 a 35° C durante todo o experimento. As avaliações de mensuração do diâmetro das lesões foram executadas aos 03, 06, 09, 12, 18, 27, 36, 45, 54, 63 e 72 dias após a inoculação (DAI), em cada avaliação foram mensuradas 24 lesões para cada tratamento.

Sendo um experimento em delineamento experimental inteiramente casualizado, comparou-se por análise de variância (teste F) e teste de médias Scott-knott a mensuração do diâmetro das lesões. A partir das médias dos diâmetros das lesões obtidas nas onze avaliações determinou-se a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AUDPC).

## Resultados e Discussão

Para facilitar as interpretações dos resultados, os diferentes métodos de tratamento serão denominados como AGULHA, ASPERSÃO e ALGODÃO.

Com os resultados gerados através do programa Sisvar 5.6, observou-se que apenas o método dos ferimentos provocados por agulha foi significativo (tabela 1) e gerou sintomas da doença (figura 1) durante todos os dias de avaliação, na tabela estão expressos apenas as médias ilustradas pelo programa no ultimo dia de avaliação, a fim de demonstrar a significância do método, as outras análises seguem este padrão, o fato pode ser explicado pela maneira superficial que os outros dois métodos afetam os tecidos da planta, sem causar-lhes ferimentos.

Tabela 1: Eficiência dos métodos através de análise por Scott-Knott.

TRATAMENTO	MÉDIAS	RESULTADO DO TESTE
Agulha	2.774583	a2
Aspersão	0.000000	a1
Algodão	0.000000	a1

\* médias seguidas pelo mesmo número não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.



**Figura 1:** Expressão dos sintomas da doença nos diferentes métodos aos 18DAI.

As inoculações através de algodão e aspersão, não provocam lesões nos tecidos da planta, como acontece com as inoculações por agulha, apesar de conterem uma quantidade maior de suspensão bacteriana em contato com o hospedeiro, não é o suficiente para promover entrada de doença na planta, sendo assim, as evidências nos levam a acreditar que essa bactéria (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) não é capaz de adentrar os tecidos da planta através de estômatos, se faz necessário à presença de lesões na superfície dos tecidos para facilitar sua entrada, adaptação e multiplicação.

Essa constatação vai contra os resultados obtidos por Belasque Jr e Jesus Jr em 2006, quando ao realizarem um experimento próximo a este, tiveram resultados positivos para os métodos de aspersão e algodão, e explicaram este fato com a possibilidade das células bacterianas terem sido colocadas diretamente no interior dos tecidos através dos estômatos, em função do contato direto da suspensão bacteriana sobre as folhas. Há possibilidades da aspersão feita por Belasque ter sido realizada com o uso de pressão, assim provocaria lesões na superfície da folha e permitiria a entrada da doença, no caso do algodão, a força aplicada no momento da inoculação ou talvez o uso de malhas de algodão mais grosseiras podem ter provocado lesões na superfície da planta, isso explicaria o aparecimento da doença.

As comparações de Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AUDPC) não foram possíveis determinar, pelo fato da ausência de doença em dois dos três métodos analisados. Sendo assim, um gráfico do progresso da doença foi plotado em relação aos dias de avaliação e com o desenvolvimento da doença no método de ferimento por agulha, juntamente com a não expressão de sintomas nos outros métodos, segue o gráfico abaixo (gráfico 1) com o desenvolvimento da doença durante as 11 avaliações realizadas.

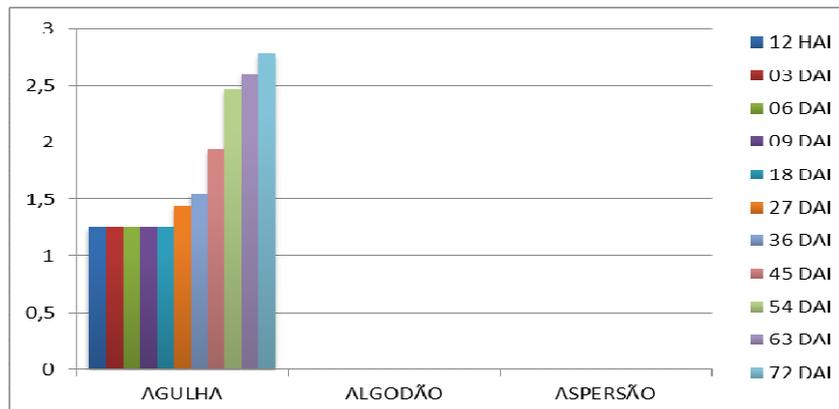


Gráfico 1: Progresso da doença nos diferentes métodos em relação aos dias avaliados.

A doença apresentou resultados semelhantes nos primeiros 18 DAI, depois seus sintomas passaram a ser aparentes e mais agressivos e durante todos os outros dias que se seguiram a bactéria se encontrou em profunda multiplicação, por conta da presença do ambiente favorável e de nutrientes em alta disponibilidade. A partir do 72º DAI seu desenvolvimento se estabeleceu.

## Conclusões

Concluí-se que o método mais eficiente de inoculação para os estudos de laboratório sobre o Cancro Cítrico é o método do ferimento por agulhas, e que o desenvolvimento da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pode não acontecer apenas com a presença dos estômatos, estando alinhado a presença de lesões na folha. Porém para conclusões mais eficazes, os estudos devem continuar, além de serem repetidos, utilizando outros métodos de inoculação e análises.

## Agradecimentos

À Deus, por proteger e iluminar a meus caminhos.

À minha família, em especial aos meus pais, por toda educação, preocupação e por nunca medirem esforços para a minha felicidade.

Aos integrantes do NBA, pelos ensinamentos, paciência e sabedoria.

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.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA-FILHO, H.D. Fungos, procaríotos e doenças abióticas. In: Mattos Junior, D., et al. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 509-566, 2005.

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.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology*, 82, p. 1319-1325, 1992.