Estudo aplicado ao teste de métodos de inoculação da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em condições controladas.

Gabriela Bissoli Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Andressa Cazetta (Mestranda), William Mário de Carvalho Nunes (Orientador), e-mail: ra105298@uem.br.

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

5.01.00.00-9 Agronomia/5.01.02.00-1 Fitossanidade

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

Resumo: O cancro cítrico, causado pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é uma das doenças mais severas que ameaçam a citricultura em todo o mundo. Seus sintomas estão em toda a parte aérea da planta atingindo folhas, ramos e frutos, sua disseminação aumenta significativamente com o clima tropical do Brasil, o qual favorece sua entrada nos pomares de citros. O processo de infecção está relacionado com o desenvolvimento e crescimento do hospedeiro, já que a forma mais importante de sobrevivência da bactéria é em lesões da doença que permanecem nas plantas cítricas. Um dos fatores mais importantes nessa doença é o tipo de inoculação da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* no seu processo infeccioso, assim este trabalho tem como objetivo analisar três métodos distintos de inoculação: perfuração do limbo foliar com agulha emergida na bactéria, sendo oito perfurações em cada folha, fricção de algodão na superfície foliar e em seguida aspersão de suspensão bacteriana com borrifador, e o uso de abrasivo (carborundum), seguido da fricção com gaze embebido na bactéria sobre o limbo foliar. Utilizou-se 120 folhas destacadas de laranja doce (*Citrus sinensis*), dividida em duas variedades, Pera IAC e Valencia Frost, inoculadas com a estirpe Xcc 306 e mantidas em condições parcialmente controladas. As avaliações foram feitas durantes 03, 07, 14 e 21 dias após a inoculação, e analisadas pelo programa Sisvar 5.6. Com os resultados obtidos, o método agulha e o método abrasivo se tornaram significativos no desenvolvimento da bactéria em condições parcialmente controladas.

Introdução

Os citros são um grupo de espécies vegetais que possuem alto potencial de produção, mas são suscetíveis a várias doenças, como o cancro cítrico que é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Da mesma maneira que outras bactérias, a do cancro cítrico penetra no hospedeiro por aberturas naturais, principalmente estômatos, e por ferimentos causados por espinhos, grãos de areia, pelo homem ou por insetos. Sua temperatura ótima de crescimento é de 25ºC a 30ºC e, apresentam colônias lisas, viscosas e, geralmente, amarelas. O tipo de inoculação é um dos fatores mais relevantes, além da presença de ferimentos no hospedeiro e do contato com o patógeno.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho é avaliar a eficácia do desenvolvimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em três métodos distintos de inoculação, como a perfuração do limbo foliar com agulha emergida na bactéria, a fricção de algodão na superfície foliar e em seguida aspersão de suspensão bacteriana com borrifador e o uso de abrasivo (carborundum), seguido da fricção de gaze embebido na bactéria sobre o limbo foliar.

Materiais e métodos

O experimento foi conduzido em laboratório no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), pertencente a Universidade Estadual de Maringá (UEM). Utilizou-se 120 folhas destacadas de 6 mudas de laranja doce provenientes do Viveiro de Mudas Pratinha, do município de Paranavaí, Paraná. O método folha destaca foi empregado a fim de facilitar a análise dos diâmetros, sendo 60 folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) da variedade Pêra IAC e 60 folhas da variedade Valencia Frost, utilizou-se folhas com o mesmo estádio de maturação e com boa sanidade (sem sintomas ou sinais de patógenos). A estirpe Xcc 306, foi preparada em tampão fosfato (0,075M, pH 7,0), ajustado a 10^8 unidades formadoras de colônia/mL com o auxílio de um espectrofotômetro ajustado para leitura a 630 nm (BELASQUE JR.; JESUS JR. et al. 2006). As folhas destacadas foram lavadas e desinfetadas com hipoclorito 1% e logo após realizou-se o corte próximo ao local de inserção do pecíolo no ramo, com o auxílio de uma tesoura. Imediatamente após o corte, as folhas foram inoculadas com 3 métodos diferentes: o primeiro foi por perfuração com agulha (0,55 x 0,20 mm), com seis perfurações por folha, o segundo método foi a aspersão de suspensão bacteriana com borrifador, após a fricção de algodão na superfície foliar e o terceiro método inoculado; uso de abrasivo (carborundum), o qual foi polvilhado sobre a superfície foliar, e posteriormente, de forma suave, friccionado um chumaço de gaze previamente imerso em suspensão bacteriana sobre a superfície da folha.

As folhas inoculadas foram mantidas em tubo Falcon de 50 mL, contendo 1,5 mL de água destilada. As avaliações ocorreram aos 03, 07, 14 e 21 dias após a inoculação (DAI), através da aferição do tamanho das lesões com auxílio de um paquímetro. As mensurações foram feitas apenas das lesões presentes na epiderme abaxial das folhas a fim de padronizar o experimento e o delineamento experimental foi inteiramente casual. A mensuração dos diâmetros das lesões em cada método foi comparada por análise de variância (teste F) e teste de médias Scott-Knott a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Observaram-se os primeiros sintomas de cancro cítrico entre o terceiro e sétimo dia após a inoculação no método agulha, diferencialmente dos outros dois métodos, que apenas manifestaram sinais com 14 DAI. No vigésimo primeiro dia após a inoculação, as quantidades de lesões que aparecem nas folhas no método algodão foram poucas, porém com um diâmetro

relativamente maior. Já no método carvão as lesões foram distribuídas em grandes quantidades, mas com diâmetros menores. Todos os sintomas iniciaram na parte abaxial da folha como pústulas brancas, salientes e esponjosas (Figura 1).

Figura 1: Expressão dos sintomas da doença nos diferentes métodos aos 21DAI.

As lesões provocadas pelo método agulha possuem maior severidade sob os outros tratamentos, já que alcançaram médias maiores no teste. Outro fator significativo é que a área lesionada fica restrita a área perfurada, dando certeza ao pesquisador a efetividade sobre a inserção do patógeno (tabela 1). Lesões que são feitas por ferimentos, como a agulha, os sintomas obtidos são mais uniformes, rápidos, precisos, comprovando o que Belasque Jr., et al. afirmaram em 2008 em seu experimento.

Tabela 1: Eficiência dos métodos analisadas através do teste de Scott-Knott.

TRATAMENTOS	MÉDIAS	RESULTADOS DO TESTE
Algodão	0.846000	a1
Carvão	0.864438	a1
Agulha	1.417312	a2

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

Para dados qualitativos onde permite compreender a complexidade e os detalhes das informações obtidas, o método carvão é o mais sugerido, porque gera altos índices de lesões na folha, possibilitando a determinação de diâmetros médios do cancro cítrico em casas de vegetação semelhantes aos processos naturais de infecção, como pode ser visto na Figura 1.

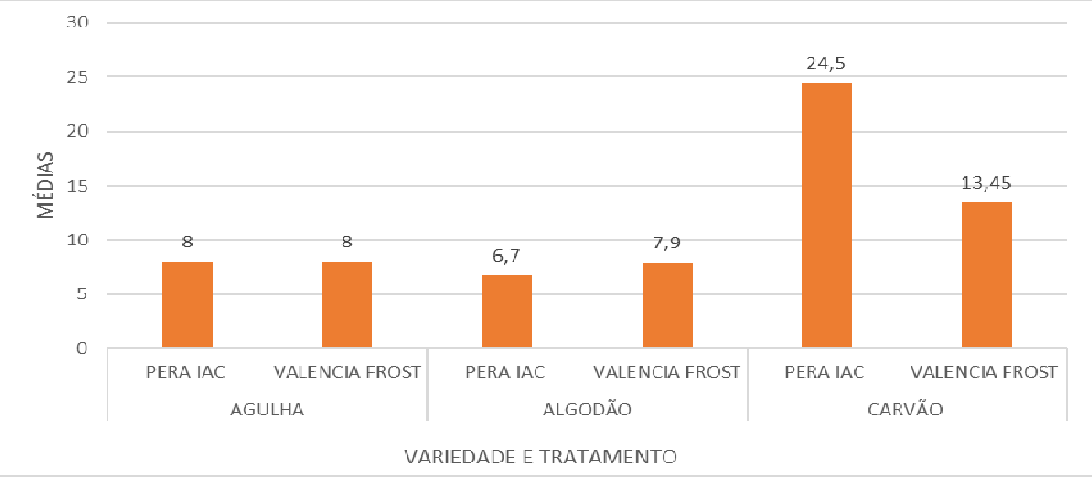

Figura 1. Média das lesões por tratamento e variedade.

Conclusões

O estudo conclui que a avaliação pelo método agulha é indicado para avaliações de patogenicidade da *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, procedimentos que tenham como objetivo a rápida e uniforme obtenção de sintomas de cancro cítrico. Já o método com a pulverização do carvão ativado, sugere-se para estudos que tenham o objetivo de avaliar fatores quantitativos, o qual obtém sintomas mais próximos da realidade a campo.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa contemplada.
E aos integrantes do NBA, por toda a paciência e ensinamentos.

Referências

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.

BELASQUE JÚNIOR, J.; JACIANI, F.J.; MARIN, D.R.; BARBOSA, J.C. Tamanho da amostra para quantificação do diâmetro de lesões de cancro cítrico. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v.33, n.4, p.317-322, 2008.

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

ROSSETTI, V.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus. **Fundação Cargill**, Campinas,1993. 84 p.