



## RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE LARANJA DOCE (*Citrus sinensis*) VARIEDADE ‘PÊRA’ À *Xanthomonas citri* subsp. *citri* EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

Aline Maria Orbolato Gonçalves-Zuliani<sup>1</sup>; Larissa Siqueira Soares<sup>2</sup>; Paula Thais Requena Nocchi<sup>2</sup>; Diego Henrique Pereira Catan<sup>2</sup>; Carlos Alexandre Zanutto<sup>3</sup>; William Mário de Carvalho Nunes<sup>4</sup>

**RESUMO:** O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ocasiona graves perdas econômicas à citricultura mundial. A utilização de genótipos resistentes é uma importante ferramenta no controle de patógenos em diversas culturas, inclusive nos citros. Para avaliação da bactéria, estudos evidenciam que a inoculação artificial apresenta sintomas típicos de cancro cítrico, quando utilizado ferimentos, aspersão ou infiltração do inoculo no tecido vegetal. Diante disso o presente trabalho avaliou a resistência de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis*), variedade ‘Pêra’ a bactéria *X. citri*, em condições controladas (casa de vegetação). Um total de 25 genótipos de laranja ‘Pêra’ foram avaliados em dois ensaios, sendo que as folhas das plantas foram inoculadas por perfuração com agulha (0,55 x 0,20 mm), com constante molhamento no inoculo. O inoculo *X. citri* foi ajustado a uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL através de espectrofotômetro 600 nm e avaliações foram feitas pela medida do diâmetro das lesões. A quantificação bacteriana foi realizada através da contagem da Unidade Formadora de Colônia (UFC), isolada de cada lesão. Os resultados mostraram que os genótipos ‘Pera EEL’, ‘IAC 2000/1’ se destacaram com os menores diâmetros de lesão nos dois ensaios, além disso, ‘Pera Bianchi/CC’ e ‘IAC’ obtiveram os menores diâmetros no segundo ensaio e as menores populações bacterianas, sugerindo que esses genótipos apresentem certa resistência ao patógeno.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cancro cítrico; inoculação; quantificação; UFC.

### 1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico, provoca sérios problemas nas plantas cítricas. A suscetibilidade a *X. citri* pode variar amplamente entre as variedades cítricas. Para a medida da suscetibilidade do tecido foliar a avaliação por meio de diâmetros de lesão é uma importante ferramenta para verificação da interação entre *Xanthomonas citri* x genótipos (NOCITI et al., 2006). Estudos evidenciam que há correlação na comparação dos diâmetros de lesões em plantas mantidas em condições de campo e em casa de vegetação (GRAHAM & GOTTWALD, 1990). Da mesma forma, a técnica de inoculação das folhas é melhor realizada por ferimentos com

<sup>1</sup> Doutoranda do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. alineorb@hotmail.com

<sup>2</sup> Mestrandos do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES, CNPq. paizinhos\_larissa@hotmail.com

<sup>3</sup> Eng. Agrônomo, Dr. da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. cazanutto@uem.br.

<sup>4</sup> Orientador, Professor Doutor do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM. william.nunes@pq.cnpq.br

agulhas, comparada a inoculação por aspersão ou infiltração (GRAHAM & GOTTWALD, 1990; BELASQUE JR., JESUS JR., 2006; NOCITI et al., 2006).

Avaliações prévias em condições controladas podem facilitar o estudo da resistência de espécies cítricas, principalmente em programas de melhoramento, que envolvam grande número de genótipos no estudo. Nesse sentido o estudo tem por objetivo avaliar a resistência de 25 genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis*), variedade 'Pêra' a bactéria *X. citri*, em condições controladas (casa de vegetação), por inoculação da folha com agulha e avaliação do diâmetro da lesão.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 25 genótipos de laranja doce (*C. sinensis*), variedade 'Pêra', sendo eles: 'EEL' (201), 'Bianchi/CC' (202), 'IAC' (203), 'Ipigua' (204), 'Olimpia' (205), 'IAC 2000/1' (206), 'Ovale Siracusa' (207), 'Ovale' (208), 'Dibbern' (209), 'Coroada' (210), 'Roberto Gulo' (211), 'Perão' (212), 'Pirangi' (213), 'Ovo' (214), 'Fumio' (215), 'IAC 2000/2' (216), 'C' (217), 'M6' (218), 'M5' (219), 'Roque' (220), 'Arapongas' (221), 'D6' (222), '58' (223), 'Bianchi/IP' (224) e '59' (225).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em duas épocas diferentes, sendo o primeiro ensaio em novembro a janeiro de 2011 e o segundo em abril a junho de 2012. As plantas foram podadas aproximadamente 50 dias antes da inoculação, com objetivo de obter folhas homogêneas e imaturas, entre 75 e 100% da completa expansão foliar, conforme Vilorio et al. (2004).

O inóculo foi preparado a partir de cultura pura de *X. citri* (isolado Xcc 306) e mantida em tampão fosfato (0,075 M, pH 7,0) em geladeira. Para reativação, a bactéria foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura nutriente-ágar [NA] (3 g extrato de carne, 5 g peptona, 5g cloreto de sódio, 15 g de ágar/L de água destilada) por aproximadamente 48 horas a 28°C, mantidas em estufa bacteriológica. O inóculo foi preparado em tampão fosfato (0,075 M, pH 7,0), ajustado a  $10^8$  unidades formadoras de colônia/mL (BELASQUE JR., JESUS JR., 2006) em espectrofotômetro a 600 nm.

O método de inoculação empregado foi o de ferimento do limbo foliar com agulha de 0,55 x 0,20 mm imediatamente após a imersão da mesma na suspensão bacteriana. Em cada folha foram realizadas oito perfurações e inoculadas quatro folhas por planta, num total de cinco plantas por genótipo.

Foi realizada a quantificação bacteriana nas lesões de *X. citri* ao final do experimento. Para isto, as lesões foram cortadas em discos de aproximadamente 2,0 cm de diâmetro e maceradas em 1000 µl de solução salina (8g de NaCl; 1Litro de água destilada). Após feitas diluições seriadas, foi plaqueada 50 µl da solução diluída a  $10^{-4}$  em meio nutriente-ágar [NA] (3 g extrato de carne, 5 g peptona, 5g cloreto de sódio, 15 g de ágar/L de água destilada) e após 48 horas procedeu-se a contagem das UFCs (Unidades Formadoras de Colônia) de *Xanthomonas* por placa.

Os diâmetros das lesões nos dois ensaios e a quantificação bacteriana foram comparados entre os tratamentos por análise de variância (teste F) e teste de médias Scott-knott a 5% de probabilidade. As análises foram feitas com auxílio do software ASSISTAT versão 7.6 beta.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois ensaios, todos os genótipos mostraram suscetibilidade ao cancro cítrico, sendo que os sintomas observados em condições controladas foram característicos de cancro cítrico. Da mesma forma, Deng et al. (2010) em seus estudos de resistência

constataram que todos os acessos testados de *C. ichangensis* Swing. e *C. junos* Seib. mostraram lesões típicas de cancro cítrico sob inoculação artificial.

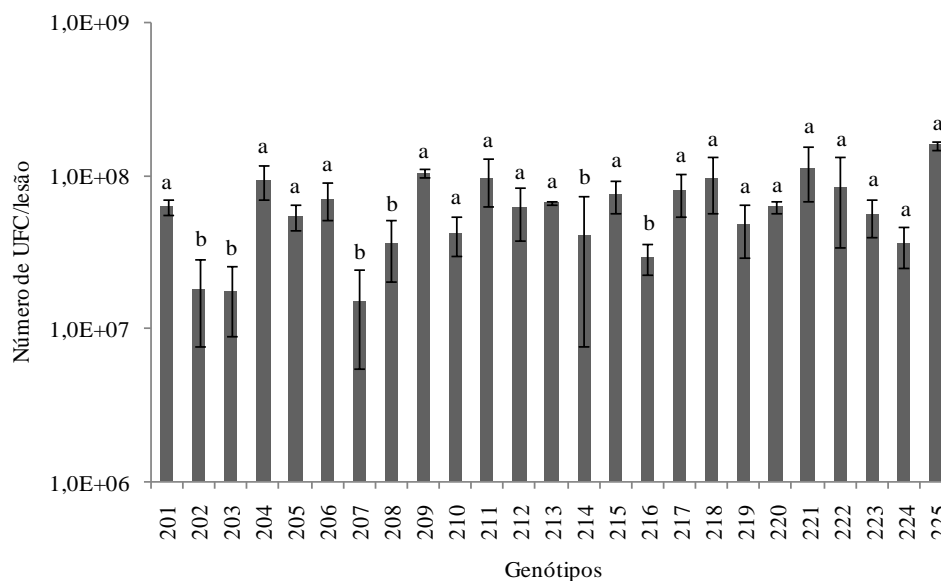
No primeiro ensaio, os sintomas iniciaram aos 12 dias após a inoculação do patógeno, diferindo do segundo onde os genótipos mostraram sintomas há aproximadamente 10 dias após a inoculação. De acordo com Nociti et al. (2006), o período médio de incubação foi diferente entre as linhagens de *Xanthomonas*, com os sintomas tornando-se visíveis entre 9,1 e 17,3 dias após a inoculação.

Durante o período de avaliação dos experimentos (76 dias), as lesões evoluíram continuamente. No primeiro ensaio os diâmetros médios das lesões variaram de aproximadamente 1,20 a 1,56 mm, sendo que no segundo os diâmetros médios variaram de 1,30 a 1,97 mm.

No primeiro ensaio os genótipos de laranja 'Pêra EEL', 'Ipiguá', 'IAC 2000/1' e 'Ovale Siracusa' se destacaram apresentando os menores diâmetros de lesão na maioria das avaliações realizadas nesse período. Os genótipos de laranja 'Pêra C', 'Roque', 'Arapongas', 'D6', '58', 'Bianchi/IP' e '59' mostraram os maiores diâmetros de lesão nas avaliações. No segundo ensaio os genótipos 'Pêra EEL', 'Bianchi/CC', 'IAC' e 'IAC 2000/1' apresentaram os menores diâmetros de lesão na maioria das oito avaliações realizadas. Em contrapartida, os genótipos 'M5', '58', 'Bianchi/IP' e '59' apresentaram na maioria das avaliações os maiores diâmetros de lesão.

Esses resultados mostram que em uma mesma espécie, no caso *C. sinensis* e até dentro de clones de uma mesma variedade foi possível detectar diferenças quanto à resistência a *X. citri*. Deng et al. (2010) avaliaram diferentes genótipos de citros quanto a suscetibilidade ao cancro cítrico por inoculação artificial do patógeno e verificaram que oito acessos de *C. michangensis* e cinco de *C. junos* tiveram respostas bastante diferentes a inoculação artificial, tanto in vivo como in vitro, indicando assim a diversificação dos níveis de suscetibilidade dentro de uma mesma espécie.

Aos 76 DAI foi realizada a quantificação bacteriana nas lesões apresentadas pelos 25 genótipos de laranja 'Pera'. A 5% de probabilidade foi observada diferença significativa na população bacteriana de cada genótipo. Os genótipos 202, 203, 207, 208, 214 e 216 apresentaram os menores números de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) por lesão, se comparados aos demais (Figura 1).



\*Médias transformadas em log x de UFC/lesão para cada genótipo nas colunas, seguidas pelas barras de erros e letras diferentes que diferem pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) com coeficiente de variação de 4,5%.

**Figura 1.** Número médio de Unidades Formadoras de colonias (UFCs) por lesão obtidas através do isolamento bacteriano das lesões nas folhas dos 25 genótipos de laranja ‘Pera’.

#### 4 CONCLUSÃO

Nos dois ensaios realizados os genótipos de laranja doce ‘Pera EEL’ e ‘IAC 2000/1’ mostraram os menores diâmetros de lesão. Além destes, as ‘Pêras’ ‘Bianchi/CC’ e ‘IAC’ mostraram menores diâmetros de lesões no segundo ensaio e menores populações medias de *X. citri* subsp. *citri* na quantificação bacteriana. Sugerindo que estes genótipos apresentem certa resistência ao patógeno.

#### REFERÊNCIAS

BELASQUE JR., J.; JESUS JR., W.C. Concentração de inoculo e método de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Laranja**, 27, n.2, p. 263-272, 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**, 129 p. 341-345, 2010.

GRAHAM, J.H. & GOTTWALD, T.R. Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. **Phytopathology**, 80, p.190–196, 1990.

NOCITI, L.A.S.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J.; FRANCISCHINI, F.J.B.; BELASQUE JR., J. Agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* tipo C em lima ‘acida ‘Galego’. **Fitopatologia Brasileira**, 31, p. 140-146, 2006.

VILORIA, Z.; DROUILLARD, D.L.; GRAHAM, J.H.; GROSSER, J.W. Screening triploid hybrids of ‘Lakeland’ limequat for resistance to citrus canker. **Plant Disease**, 88, p. 1056-1060, 2004.