



O EFEITO FISIOLÓGICO DO REGULADOR VEGETAL 2,4-D EM FOLHAS DESTACADAS DE LARANJA DOCE (*CITRUS SINENSIS*) COM CANCRO CÍTRICO

*Diego Henrique Pereira Catani*¹, *Bruna Rafaela Barbier*², *Paula Thaís Requena Nocchi*¹, *Danielle Sayuri Yoshida Nanami*¹, *Hudson Sérgio de Souza*¹, *William Mário de Carvalho Nunes*³

RESUMO: Os reguladores vegetais são conhecidos na agricultura pelos diferentes atributos que apresentam, capazes de favorecer o enraizamento, influenciar no florescimento e reduzir a abscisão prematura de frutos. O 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), é um produto sintético capaz de exercer ação similar a uma auxina, podendo aumentar a taxa de divisão celular, retardar a senescência, como também resultar na proliferação de calos. O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é uma relevante doença para a citricultura, pois interfere diretamente na produção e qualidade dos frutos. Esta bactéria é capaz de colonizar tecidos jovens de folhas, frutos e ramos vegetais, podendo resultar em desfolha e queda prematura dos frutos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o diâmetro de lesões de *X. citri* subsp. *citri* inoculadas em folhas destacadas de laranja doce (*Citrus sinensis*) da variedade 'Pêra Rio', coletadas em Paranaíba, PR, 21 dias após a aplicação (DAA) de 2,4-D nas concentrações de 0, 0,20 0,50 e 0,80 mg de i.a. L⁻¹. Foi observado que a média do diâmetro das lesões presentes em folhas destacadas diminuiu gradativamente com o aumento da concentração de 2,4-D.

PALAVRAS-CHAVE: 2,4-D; Cancro cítrico; Folhas destacadas; Calos; Cicatrização.

1 INTRODUÇÃO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad et al., 2006), é considerado uma doença grave na cultura do citros, capaz de infectar grande parte das variedades comerciais de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Anthony & Coggins, 1999). Esta doença tem como característica a capacidade de colonizar tecidos jovens das folhas, frutos e ramos vegetais (Gottwald & Graham, 1992), por pequenos ferimentos, seguidos pela presença de água (Bock et al. 2009), podendo também infectar através de estômatos (Gottwald et al., 2002), onde em condições severas da doença, pode resultar em desfolha da planta, seca de ramos e inclusive a queda de frutos (Gottwald et al., 1989).

O 2,4-D tem sido utilizado nas concentrações entre 5 a 20 mg.L⁻¹, controlando a queda dos frutos durante o período de pré-colheita de praticamente todas as espécies cítricas, pois este regulador diminui a atividade da celulase e da poligalacturonase, inibindo a separação entre o cálice e o fruto (Monselise 1979, *apud* Almeida et al., 2002).

Ribnicky et al. (1996), demonstrou que a adição de 2,21 g L⁻¹ de 2,4-D em meio de cultura de tecidos de cenoura, apresentou uma característica peculiar de proliferação de calo nas extremidades cortadas dos hipocótilos, agindo de maneira similar a um tumor e tomando conta de todo o tecido em 4 semanas. A concentração de 2,4-D absorvida por estes tecidos se mantiveram em média entre 4,42 mg L⁻¹ da molécula livre e 6,63 mg L⁻¹ conjugada, agindo de forma direta nos calos sem interferir na concentração endógena das auxinas.

Resultados similares foram encontrados por Davidonis et al. (1980) em cultura de tecidos de soja com concentrações entre 0,26 à 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, onde é observado que estas concentrações permanecem frequentes pela característica da molécula se ligar em ambos ácido glutâmico e glicosídeos hidroxilados solúveis em água, fazendo com que o tecido aumente a taxa de divisão celular.

Ainda, em estudo realizado por Puschmann & Romani (1983), analisando a interação do 2,4-D com a produção de etileno em cultura de células de pêra, este observou que na concentração de 0,22 mg L⁻¹, houve um estímulo representado pela metade da resposta máxima da produção de etileno, e em concentrações superiores à 2,21 mg L⁻¹ foi observada a inibição da síntese do mesmo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de concentrações de 2,4-D no diâmetro de lesões de *X. citri* subsp. *citri* inoculadas em folhas destacadas.

¹ Doutorando do curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada, NBA/UEM. Bolsista CAPES. diegocatani@gmail.com

² Mestrando do curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada, NBA/UEM. Bolsista CAPES.

³ Orientador do curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada, NBA/UEM. Bolsista CAPES. wmcnunes@uem.br



2 MATERIAL E MÉTODOS

O material encaminhado ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM) foi composto de ramos e folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) da variedade 'Pêra Rio' pertencentes à área experimental implantada no mês de Junho, na Fazenda São Paulo, município de Paranaíba, Paraná. Os tratamentos empregados nessa área experimental eram constituídos da aplicação do regulador vegetal 2,4-D (806g L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, Nufarm do Brasil Ltda.) em 4 diferentes concentrações (0, 0,20 0,50 e 0,80 mg de i.a. L⁻¹), onde foram gastos 4 litros da solução por planta, utilizando um pulverizador FM Coupling Gulliver 4000 NA, ajustado a uma pressão constante de 150 lbs e com vazão de 2000 L ha⁻¹.

A estirpe de *X. citri* subsp. *citri* utilizada na inoculação foi a Xcc 306, obtida do acervo de culturas puras do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). O inoculo de *X. citri* subsp. *citri* utilizado, mantido em tampão fosfato salino (PBS) (0,075M, pH 7,0) em geladeira (8°C) pelo NBA, foi reativado em placas de Petri contendo meio nutriente-ágar (NA) (3g extrato de carne, 5 g de peptona, 5 g de cloreto de sódio, 15 g de Agar/L de água destilada) e mantido a 28 °C em estufa bacteriológica por 72 horas. Subsequentemente as colônias foram transferidas para um microtubo com PBS e a solução bacteriana foi ajustada por diluição seriada a uma concentração de 10⁸ unidades formadora de colônias UFC ml⁻¹ (Belasque Junior & Jesus Junior, 2006) na leitura de 0,3 de absorbância em espectrofotômetro ajustado à 630nm.

Este experimento foi adaptado do método utilizado por Gonçalves-Zuliani (2014), onde ramos com o mesmo estágio de maturação e com boa sanidade (sem sintomas de patógenos e ferimentos por insetos ou por atrito) foram coletados aos 21 dias após a aplicação de 2,4-D, e armazenados em 4 sacos plásticos referente a cada tratamento. Subsequentemente, o material coletado foi umedecido e os sacos lacrados. O material foi encaminhado ao laboratório do NBA onde recebeu sanitização com lavagem, desinfecção utilizando Hipoclorito 1% e posterior secagem.

A preparação das folhas teve o auxílio de um estilete, realizando o corte do ramo à 4 mm antes e 4 mm depois da zona de abscisão do pecíolo, notada a necessidade da folha permanecer ligada ao ramo para manter sua funcionalidade. Imediatamente após o corte de cada folha, essa foi inoculada com a solução bacteriana por perfuração com agulha (0,55 x 0,20mm), com 6 perfurações por folha. Em seguida, a folha foi transferida para um tubo Falcon, posicionando o ramo na parte inferior do tudo, e foi adicionada água da torneira o suficiente para cobrir o ramo, sem atingir o limbo foliar. Quando necessário, a água foi repostada nos tubos para garantir molhamento do ramo.

Foram feitas dez repetições para cada tratamento, dispostas em estante de isopor, que foram posteriormente vedadas dentro de sacos plásticos e mantidas à 28°C em estufa bacteriológica. A avaliação das lesões foi realizada sete dias após a inoculação, pela medição do diâmetro com o auxílio de um paquímetro digital.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software SAS (*Statistic Analysis System*) 9.3 através da análise exploratória dos dados. A diferença entre as médias foi avaliada estatisticamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o intuito de observar se as concentrações utilizadas foram influentes sobre o cancro cítrico, na tabela 2 é observada a média do diâmetro das lesões de cancro cítrico, 7 dias após a inoculação da bactéria, em folhas destacadas da variedade 'Pêra Rio', coletadas aos 21 dias após a aplicação de 2,4-D.

Tabela 2: Efeito de concentrações de 2,4-D no diâmetro das lesões de cancro cítrico aos 7 dias após a inoculação de *X. citri* subsp. *citri* na concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹ em folhas destacadas, destacadas de plantas aos 21 dias após a aplicação em plantas de laranja doce (*Citrus sinensis*), da variedade 'Pêra Rio', da Fazenda São Paulo, Paranaíba, Paraná.

Nº. Trat.	Tratamentos (dose/ha)	Diâmetro das lesões (mm)
1	0,00 mg L ⁻¹	2,15a
2	0,20 mg L ⁻¹	1,80b
3	0,50 mg L ⁻¹	1,58c
4	0,80 mg L ⁻¹	1,35d
CV%		26.84

*Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, no nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Foi observado em folhas destacadas que o diâmetro das lesões diminuiu gradativamente com o aumento da concentração de 2,4-D (Figura 1), com médias de 2,15 mm para a testemunha, 1,80 mm para o tratamento T2, 1,58 mm (T3) e 1,35 mm (T4), a ponto de algumas perfurações do tratamento T4 não desenvolverem o sintoma



expressivo de lesões corticosas e salientes de cancro cítrico nas folhas destacadas. A diferença entre o diâmetro das lesões foi expressiva, onde todos os tratamentos se diferenciaram significativamente entre si.

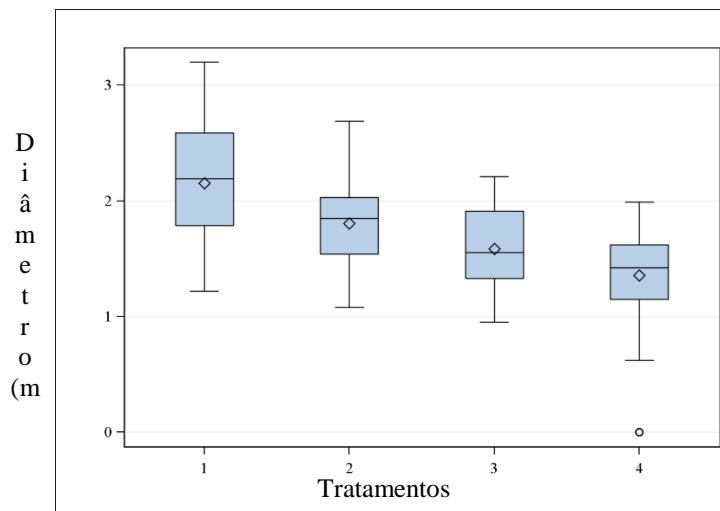


Figura 1: Box plot do diâmetro de lesões de cancro cítrico nos tratamentos de 2,4-D com 0 [água] (T1), 0,20 (T2), 0,50 (T3) e 0,80 (T4) mg de i.a. L⁻¹.

Supõe-se que os resultados encontrados estejam relacionados ao estudo de Ribnicky et al. (1996), que aplicou 2,21 g L⁻¹ de 2,4-D em meio de cultura de tecido com o intuito de observar o desenvolvimento de hipocótilos de cenoura. Neste experimento foi observado que no decorrer de 4 semanas de incubação, a molécula foi absorvida e permaneceu dentro do hipocótilo em concentrações na média de 4,42 mg L⁻¹ para 2,4-D livre e 6,63 mg L⁻¹ para ligado. Ainda, esta exposição ao regulador vegetal induziu a uma proliferação de calo que se iniciou na região dos cortes, e se proliferou por todo o hipocótilo, de forma similar a um tumor. O mesmo resultado que não se refletiu nos tratamentos com ácido indol-3-acético (AIA) e sem auxina, que por sua vez apresentaram uma pequena formação de calo e uma grande proliferação de raízes.

Assim, nas condições deste trabalho, levando em consideração que a lesão e a exposição ao inoculo aconteceram ao mesmo tempo no experimento de folhas destacadas, pode-se supor que as concentrações do regulador vegetal utilizadas foram capazes de causar os mesmos altos índices de divisão celular observados por Ribnicky et al. (1996), ocorrendo em proporções superiores ao ataque do patógeno, logo atuando como uma barreira, a ponto de prevenir a infecção da bactéria.

4 CONCLUSÃO

Foi observado que a média do diâmetro das lesões presentes em folhas destacadas diminuiu gradativamente com o aumento da concentração de 2,4-D, sendo significativas para interagir no metabolismo da planta de forma a intervir no processo de infecção da bactéria, resultando em lesões menores ou até inexistentes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA I. M. L.; JOÃO D. R.; ONO E. O. Aplicação de Reguladores Vegetais no Retardamento da Abscisão de Frutos de Laranja-'Hamlin'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.24, n.2, p.306-11. Agosto de 2002.

ANTHONY, M.F.; COGGINS, JR, C. W. The efficacy of five forms of 2,4-D to control preharvest fruit drop in citrus. **Scientia Hort.** n.81, p.267-77, 1999.

BELASQUE JR., J.; JESUS JR., W. C. Concentração de inoculo e método de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Laranja**, v. 27, p. 263-272, 2006.

GOTTWALD, T. R.; AUBERT, B.; ZHAO, X.- Y. Preliminary analysis of citrus Greening (Huanglungbin) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. **Phytopathology**, v.79, n.1, p.687-93, 1989.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology**, n.82, p.930-35, 1992.



GOTTWALD, T.R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J.H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E.L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, v.92, p.361-77, 2002.

PUSCHMANN R. & ROMANI R. Ethylene Production by Auxin-Deprived, Suspension-Cultured Pear Fruit Cells in Response to Auxins, Stress, or Precursor. **Plant Physiol.** v.73, p.1013-19, 1983.

RIBNICKY D. M.; ILIC N.; COHEN J. D.; COOKE T. J. The Effects of Exogenous Auxins on Endogenous Indole-3-Acetic Acid Metabolism: The Implications for Carrot Somatic Embryogenesis **Plant Physiol.** v. 112, p.549-58, 1996.

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.690-95, 2006.