



DESENVOLVIMENTO DA BACTÉRIA *XANTHOMONAS CITRI* SUBSP. *CITRI* IN VITRO

Juliana Glória Franco¹, Paula Thaís Requena Nocchi², Camila de Cassia da Silva¹, Danielle Sayuri Yoshida Nanami², Andressa Cazzeta¹, William Mário de Carvalho Nunes³

RESUMO: O Cancro Cítrico, considerado como uma das doenças mais importantes da citricultura no mundo, é causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e ocorre em diversas regiões citrícolas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento in vitro de isolados de *X. citri* subsp. *citri*, provenientes de genótipos de *Citrus* spp. com diferentes níveis de suscetibilidade ao cancro. Folhas de diferentes genótipos de *Citrus* spp. com sintomas de cancro cítrico foram coletadas de 11 variedades mais suscetíveis, 10 variedades menos suscetíveis e de 2 plantas mutantes do Pomar Experimental do município de Maringá-PR. A partir das lesões foliares, isolou-se a bactéria em meio de cultivo. Foram obtidos 23 isolados bacterianos, além da estirpe Xcc 306, totalizando 24 amostras de *X. citri* subsp. *citri*. Suspensões bacterianas das 24 amostras tiveram sua concentração ajustada para serem transferidas para os meios de cultivo Nutriente Agar (NA), 523, Manitol Glutamate Yeast (MGY), Luria Bertani (LB), Dextrose Yeast Glutamate (DYGS), Yast Dextrose Carbonate (YDC), Wilbrink (WB), ao qual foram incubadas à 28°C. A avaliação foi realizada durante cinco dias em intervalos de 12 em 12 horas, contando-se o número total de colônias por placa e mensurando o diâmetro de 10 colônias por placa com auxílio de um paquímetro digital. Como resultado, verificou-se que todos os isolados apresentaram diferenças significativas de desenvolvimento entre si em todos os meios de cultivo avaliados.

Palavras-chaves: Cancro cítrico, Meios de cultivo, Número de colônias.

1 INTRODUÇÃO

O Cancro Cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006) ocorre em diversas regiões citrícolas do mundo (DAS, 2003; SCHUBERT et al., 2001). É difundido no sul do Brasil, onde tem efeito substancial sobre o rendimento dos citros (BEHLAU et al., 2010).

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

²Doutorandos 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. thaisnocchi@hotmail.com

³Orientador, Professor Doutor do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM. Bolsista de produtividade, CNPq. william.nunes@pq.cnpq.br

Não existe ainda uma medida de controle totalmente eficaz, as medidas de controle utilizadas se baseiam na exclusão para evitar a entrada de inóculo e na erradicação para diminuir o inóculo já existente (BELASQUEJR.; BERGAMIM FILHO, 2006).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de folhas de diferentes variedades de laranja doce com sintomas de cancro. Folhas de diferentes genótipos de *Citrus* spp. com sintomas de cancro cítrico foram coletadas de 11 variedades mais suscetíveis, 10 variedades menos suscetíveis (CARVALHO et al., 2014) e de 2 plantas mutantes (DADOS NÃO PUBLICADOS) do Pomar Experimental do município de Maringá-PR.

A estirpe Xcc 306, obtida do acervo de culturas puras do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), também foi utilizado neste estudo, que juntamente com os 23 isolados de *X. citri* subsp. *citri*, totalizou 24 amostras (Tabela 1). As amostras coletadas foram encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), onde foi realizado o isolamento da bactéria em estudo cultura. O isolamento foi realizado através das lesões foliares, utilizando-se uma lesão foliar de cada genótipo de *Citrus* sp.

A extração de DNA de todos os isolados foi realizada para certificar-se de que todos correspondessem à espécie *X. citri* subsp. *citri*. Posteriormente foram realizadas a amplificação do DNA através da técnica de PCR utilizando um par de primer de *X. citri* subsp. *citri* (Xac 1 e Xac 2) e a corrida em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. As bandas geradas foram visualizadas com radiação UV. Com o auxílio de uma aparelho de espectrofotômetro, a suspensão bacteriana teve sua concentração ajustada para 10 Unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. De acordo com a literatura, uma leitura de 0,3 à 630nm de comprimento de onda em aparelho de espectrofotômetro corresponde a 10 8 UFC/mL (BELASQUE JUNIOR; JESUS JUNIOR,



2006). Foram ainda realizadas 7 diluições seriada e contagem e mensuração do diâmetro das colônias individualizadas nos diferentes meios de cultura testados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 24 amostras de *X. citri* subsp. *citri* apresentaram diferenças de desenvolvimento em todos os meios de cultura e em todos os períodos de avaliação, tanto em número quanto em diâmetro de suas colônias. Não houve uma relação entre o desenvolvimento da bactéria com a origem do isolado, sendo que isolados provenientes de genótipos com diferentes níveis de suscetibilidade ao cancro apresentaram menores e maiores diâmetros de colônias, além de que em cada meio de cultura utilizado, o desenvolvimento também foi diferente para cada isolado. No meio 523, o maior número de colônias foi apresentado pelo isolado 13 proveniente de Comuna ivia, variedade correspondente à espécie *C. sinensis*, mais suscetível ao cancro, enquanto que o menor número foi apresentado pelo isolado 140, proveniente de Shamouti, também *C. sinensis*, porém menos suscetível ao cancro.

Em meio de cultura DYGS, os isolados que se destacaram foram outros. O isolado 76 (Tangerina Ponkan – *C. reticulata* – menos suscetível) apresentou o maior número de colônias e o isolado 135 (Harris – *C. reticulata* – menos suscetível) apresentou o menor número.

No meio WB o isolado 318 (Muscia – *C. reticulata* – menos suscetível) apresentou o maior número de colônias, enquanto que o isolado 121 (Satsuma okitsu – *C. unshui* – menos suscetível) e a estirpe Xcc 306, (proveniente do Fundecitrus), utilizada na inoculação das plantas utilizadas para isolamento da bactéria neste estudo) apresentaram os menores números de colônias.

Pode-se observar que o isolado 13, proveniente de variedade mais suscetível, apresenta-se com maior número de colônias nos meios de cultura 523 e YDC e o isolado 318, proveniente de variedade menos suscetível, destacou-se em meio WB apresentando o maior número de colônias e em MGY e YDC apresentando os menores números (Figura 1).

Quanto ao diâmetro das colônias, em todos os períodos de avaliação, pode-se observar diferenças significativas em seus tamanhos, porém nem todos os isolados se diferenciaram entre si. Os isolados que se diferenciaram entre si foram 318 e 135; 318 e 298; 318 e 78; 318 e 85; 83 e 298; 83 e 78; 83 e 85; 201 e 85. Os demais isolados não apresentaram diferenças significativas quando comparadas pelo teste de Tukey-Kramer ao nível de 5% (p-valor $\geq 5\%$).

Tabela 1: Médias dos diâmetros das colônias dos isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provenientes de genótipos de *Citrus* spp. com diferentes níveis de suscetibilidade ao cancro cítrico.

Isolado	Média diâmetro (cm)
318	1,30
83	1,32
201	1,40
142	1,42
5	1,43
4M	1,45
Xcc	1,46
81	1,48
133	1,49
84	1,49
5M	1,49
140	1,50
13	1,51
65	1,53
327	1,54
300	1,54
76	1,55
121	1,56
27	1,56
15	1,57
135	1,61
298	1,64
78	1,68
85	1,72

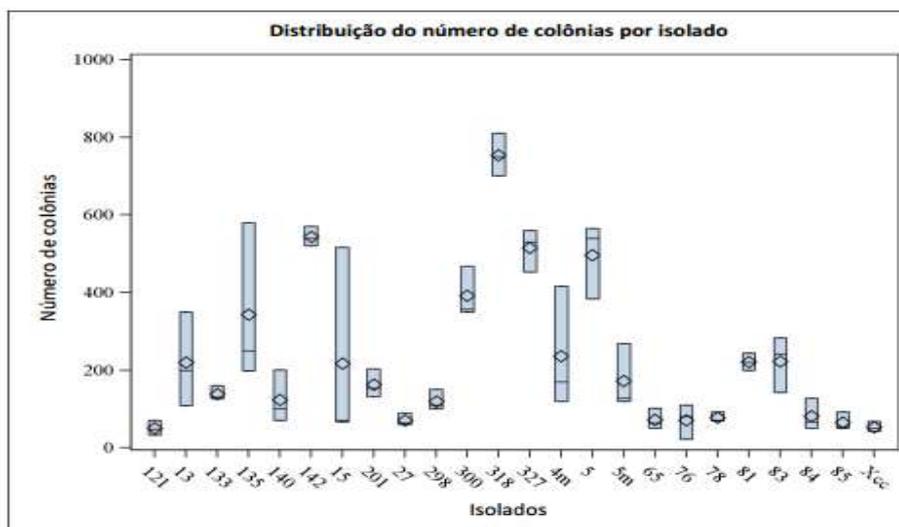


Figura 01. Distribuição do número de colônias por isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em meio de cultura WB.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se neste estudo que os isolados de *X. citri* subsp. *citri* provenientes de diferentes genótipos de *Citrus* spp. inoculados com a mesma estirpe bacteriana no ano de 2005 (Xcc 306), apresentaram diferença de desenvolvimento quando cultivadas in vitro em superfície de meios de culturas. Porém esta diferença de desenvolvimento não possui relação com a suscetibilidade do genótipo de origem ao cancro cítrico, sendo que isolados provenientes de variedades com maior e menor grau de suscetibilidade apresentaram menores e maiores números e diâmetros de colônias.

REFERÊNCIAS

AMARAL, A. M. O que torna o cancro cítrico uma doença Laranja, v. 25, p. 375–387, 2004.

BEHLAU, F., BELASQUE JR., J., GRAHAM, J. AND LEITE JR., R. Effect of frequency of copper application on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. *Crop Protection*, v. 29, p. 300-305, 2010.

BEHLAU, F., BELASQUE, J., BERGAMIN-FILHO, A., GRAHAM, J., LEITE JR., R. AND GOTTWALD, T.R. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. *Crop Protection*, v.27, p. 807-813, 2008.