



DESENVOLVIMENTO DE ISOLADOS DE *XANTHOMONAS CITRI* SUBSP. *CITRI*, *CITRI* DAS VARIEDADES NATAL E WESTIN EM RELAÇÃO AO DIÂMETRO DAS UFCs CULTIVADAS EM MEIO NA

Juliana Glória Franco¹, Larissa Siqueira Soares¹, Paula Requena Thaís Nocchi², Danielle Sayuri Yoshida Nanami², Carlos Alexandre Zanutto³, William Mário de Carvalho Nunes³

RESUMO: Uma das mais importantes doenças que ocorrem em citros é o cancro cítrico, afetando quase todas as variedades comerciais. A doença, causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, provoca extensos danos à cultura e, a severidade da infecção varia de acordo com as diferentes espécies bacterianas e com as condições climáticas prevalentes. Os sintomas constituem-se em lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração amarronzada, com aspecto eruptivo, presentes em folhas, ramos e frutos. Visando obter informações para estudos posteriores de controle desta doença, este trabalho teve por objetivo realizar isolamentos de *X. citri*, a partir do filoplano de duas variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) (Natal e Westin) e, avaliar o crescimento e desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFCs) em meio Nutriente Ágar a partir dos isolados. Ao todo foram obtidos 09 isolados de cada uma das variedades de laranja amostrada, sendo que, os estudos realizados mostraram que existem diferenças no desenvolvimento de UFCs pelos diferentes isolados provenientes das duas variedades de laranja estudadas. Somente para os isolados bacterianos, provenientes da variedade Westin, verificou-se que a diferença do diâmetro de suas colônias foi em função do período de avaliação, fato esse não observado para os isolados obtidos de folhas da variedade Natal.

Palavras-chaves: cancro cítrico, diâmetro, Nutriente Ágar.

1 INTRODUÇÃO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é uma das mais importantes doenças que ocorrem em citros, afetando quase todas as variedades comerciais (VERNIÈRE et al., 2003).

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

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

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

Os sintomas causados por esta bactéria constituem-se em lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração amarronzada, com aspecto eruptivo, presentes em folhas, ramos e frutos. Nas folhas as lesões são observadas em ambos os lados, sendo comum a presença de um halo amarelo circundando a lesão. Em altas severidades pode ocorrer desfolha, queda de frutos e seca de ramos (GOTTWALD et al., 1989; ROSSETTI, 2001).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo realizar isolamentos de *X. citri* a partir do filoplano de duas variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) (Natal e Westin) e, avaliar o crescimento e desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFCs) em meio Nutriente Ágar destes isolados, visando obter informações para estudos posteriores de controle da doença.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento teve início com a coleta de folhas de laranja doce com sintomas de cancro cítrico do pomar da Fazenda São Paulo, onde foram coletadas folhas de duas variedades Natal e Westin. As amostras foram encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), para proceder ao isolamento da bactéria. A técnica de isolamento foi empregada considerando uma lesão por amostra.

Inicialmente, as folhas foram lavadas em água corrente e as lesões foram recortadas das folhas e mergulhadas em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 1% também por 1 minuto e enxaguadas 3 vezes em água destilada e esterilizada, para a remoção dos produtos químicos utilizados. Cada lesão foi então triturada em almofariz, contendo 1000 µL de solução salina, tornando-se uma suspensão bacteriana. De cada suspensão foi



pipetada uma alíquota de 50µL e transferida para microtubo contendo 450 µL de solução salina. Em seguida foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .

Em seguida foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Uma alíquota de 50µL da suspensão bacteriana mais diluída (10^{-4}) foi transferida para a superfície do meio de cultura Nutriente-Ágar (NA) (extrato de carne (3g); Peptona (5g); NaCl (5g); ágar (15g) e água destilada para completar o volume para 1 litro) contido em placas de Petri. A incubação das culturas se deu a 28°C por 48 horas.

As colônias individualizadas foram novamente repicadas em meio NA contido em placas de Petri e incubadas nas mesmas condições por 24 horas. Foi realizado o ajuste de concentração da suspensão bacteriana em tampão fosfato (PBS) com auxílio de aparelho de espectrofotômetro para 10^8 UFC/mL, correspondente a uma leitura de 0,3 à 630nm de comprimento de onda (BELASQUE JUNIOR; JESUS JUNIOR, 2006). Da suspensão com concentração de 10^8 UFC/mL, uma alíquota de 25µL foi transferida para microtubo contendo 225µL de solução salina.

Foram realizadas 3 diluições em série, visando a possível visualização, contagem e mensuração dos diâmetros das colônias bacterianas. Posteriormente ao ajuste da concentração e diluições, uma alíquota de 25 µL da suspensão bacteriana foi transferida para as placas de Petri contendo o meio de cultura. As culturas foram incubadas a 28°C.

Para avaliação contou-se o número de UFCs em cada placa e os diâmetros de 10 UFCs foram mensurados, com o auxílio de um paquímetro digital às 72, 96, 120 e 144 horas após a repicagem. Utilizou-se de um delineamento inteiramente casualizado com 03 repetições (para cada isolado de cada variedade). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 09 isolados de *X. citri*, a partir de folhas da variedade Natal (01N, 02N, 03N, 04N, 05N, 06N, 07N, 08N e 09N) e 09 isolados bacterianos provenientes de laranja Westin (10W, 11W, 12W, 13W, 14W, 15W, 16W, 17W e 18W). Com relação ao desenvolvimento das UFCs dos isolados bacterianos obtidos a partir de folhas da variedade Natal, verifica-se que, os isolados N1, N6 e N8 apresentaram, significativamente, os maiores diâmetros das colônias (1,79 a 1,80 cm), enquanto que, os menores diâmetros foram obtidos com os isolados N3, N7 e N9 (1,56 a 1,60 cm).

Não houve interação entre o tamanho da UFC e o tempo de incubação das culturas. Para os isolados obtidos de folhas de Westin, verificou-se que, os mesmos também apresentaram diferentes tamanhos de colônias, os isolados W4 (1,81 cm), W8 (1,79 cm) e W9 (1,82 cm) apresentaram os maiores diâmetros de UFCs, não diferindo estatisticamente entre si. O isolado W2 apresentou o menor desenvolvimento médio da colônia (1,60 cm) (Tabela 1).

Tabela 01: Análise do diâmetro de UFCs de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provenientes de folhas das variedades Natal e Westin.

Variedade Natal		Variedade Westin	
Isolados	Diâmetro médio da bactéria (cm)	Isolados	Diâmetro médio da bactéria (cm)
N1	1,79a*	W1	1,70 bc
N2	1,70 b	W2	1,60 d
N3	1,56 d	W3	1,71 bc
N4	1,61 c	W4	1,81a
N5	1,71 b	W5	1,72 b
N6	1,77 a	W6	1,71 bc
N7	1,60 cd	W7	1,66 c
N8	1,80 a	W8	1,79a
N9	1,58 cd	W9	1,82a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se pelos dados obtidos neste trabalho que:

- Existem diferenças no desenvolvimento de UFCs pelos diferentes isolados provenientes de folhas das duas variedades de laranja estudadas;
- Isolados provenientes da variedade Westin, apresentaram interação entre o tamanho de suas colônias e o período de avaliação.



REFERÊNCIAS

Cee-Canec/SP- Resolução nº 01/2000, de 20-03-2000. Belasque Jr., J.; Jaciani, F.J.; Marin, R. D.; Barbosa, J.C. Tamanho da amostra para quantificação do diâmetro de lesões de cancro cítrico. *Trop. Plant Pathol.* 2008, 33, 317-322.

Del Campo, R.; Russi, P.; Mara, H.; Peyrou, M.; León, I.P.; Gaggero, C. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiol Lett.* 2009, 298, 143–148.

Gottwald, T.R.; Timmer, L.W.; McGuire, R.G. Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. *Phytopathology.* 1989, 79, 1276-1283.

Rosetti, V.V. *Manual ilustrado de doenças dos citros*. Piracicaba. Feal/Fundecitrus. 2001.