

**FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA
MESTRADO PROFISSIONAL EM
CONTROLE DE DOENÇAS E PRAGAS DOS CITROS**

JOÃO FRANCISCO KAPP

**Faixa de hospedeiros de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*
(isolado FDC 1609) patogênica a citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus
paradisi* x *Poncirus trifoliata*)**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Prof. Dr. José Belasque Junior

Araraquara
Agosto – 2011

JOÃO FRANCISCO KAPP

**Faixa de hospedeiros de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*
(isolado FDC 1609) patogênica a citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus
paradisi* x *Poncirus trifoliata*)**

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da
Citricultura como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Orientador: Prof. Dr. José Belasque Junior

Araraquara
Agosto – 2011

JOÃO FRANCISCO KAPP

Faixa de hospedeiros de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (isolado FDC 1609) patogênica a citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*)

Dissertação apresentada ao Fundo de Defesa da Citricultura como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade

Araraquara, 30 de Agosto de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Belasque Junior
Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura

Prof. Dr. Franklin Behlau
Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura

Prof. Dr. Julio Rodrigues Neto
Instituto Biológico de São Paulo

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado principalmente nos momentos mais difíceis;

Ao Fundecitrus, pela oportunidade, apoio e confiança;

Aos meus pais e familiares, pelo apoio e certeza na conquista;

À minha esposa Eliana, aos filhos Tiago, Aline e Alessandra, pela perseverança, coragem, paciência, incentivo, mesmo nos momentos difíceis;

Aos professores, pelo empenho e dedicação, que foram importantíssimos no nosso aprendizado, muito obrigado;

Aos colegas da turma do mestrado, pelos trabalhos em equipe, pelas brincadeiras, piadas, afinal, toda sexta-feira havia uma nova, já sinto saudades;

Ao orientador e professor Dr. Belasque, pela paciência e dedicação;

meus sinceros agradecimentos.

Não deixe que a saudade de ontem e o medo do amanhã
derrubem a felicidade de hoje.

Autor desconhecido

RESUMO

Em Março de 2009 um novo isolado de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* foi encontrado em pomar de laranja doce [variedade 'Valência', enxertada sobre citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*)], no município de Severínia, interior do estado de São Paulo. Brotações do porta-enxerto apresentavam lesões necróticas circulares, de coloração escura, presentes em uma ou ambas as superfícies foliares. Não foram encontrados, por sua vez, sintomas em folhas da laranja doce (copa). Bactérias do gênero *Xanthomonas* foram isoladas de folhas sintomáticas e o postulado de Koch foi finalizado após inoculação em plantas de 'Swingle' e posterior re-isolamento. Considerando a importância mundial de bactérias do gênero *Xanthomonas*, principalmente por suas implicações quarentenárias e restritivas, objetivou-se, nesta pesquisa, determinar a faixa de hospedeiros desse novo isolado do gênero *Xanthomonas*. Plantas de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia* 'Swingle'), 'Grapefruit' (*C. paradisi* Macf.), limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck), citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*), laranjas 'Valência' e 'Natal' [*C. sinensis* (L.) Osbeck], limão verdadeiro 'Siciliano' (*C. limon*), e tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort) foram inoculadas por infiltração de suspensão bacteriana do isolado FDC 1609 na concentração de aproximadamente 10^5 UFC/mL e mantidas em casa de vegetação por dois meses para observação de sintomas. Comprovou-se que a bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* FDC 1609 foi patogênica somente a citrumelo 'Swingle', não tendo sido patogênica a lima ácida 'Galego', hospedeiro comum de todas as espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros descritas até os dias atuais.

PALAVRAS-CHAVE: Cancro Cítrico, patogenicidade

ABSTRACT

In March 2009, a new strain of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* was detected in a Valencia sweet orange orchard grafted on citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*), in Severinia, Sao Paulo state, Brazil. Forty seven plants presented circular and dark lesions, visible on one or two sides of the leaves. These symptoms were observed only in sprouts of the citrumelo ‘Swingle’ scion. No lesions were observed on Valencia leaves. *Xanthomonas*-like bacterium were isolated from the symptomatic tissues and Koch’s postulate was fulfilled after inoculation in citrumelo ‘Swingle’ plants. The objective of the present work was to determine the host range of this new strain of *Xanthomonas*. Plants of ‘Key’/‘Mexican’ lime (*Citrus aurantifolia* ‘Swingle’), ‘Grapefruit’ (*C. paradisi* Macf.), ‘Rangpur’ lime (*C. limonia* Osbeck), citrumelo ‘Swingle’ (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*), ‘Valência’ and ‘Natal’ sweet oranges [*C. sinensis* (L.) Osbeck], ‘Siciliano’ lemon (*C. limon*), and mandarin ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort) were inoculated by infiltration with a bacterium suspension at 10^5 CFU/mL. Small, dark and circular lesions were observed only on leaves of citrumelo ‘Swingle’. No other citrus genotype presented lesions typical of *Xanthomonas* infection. Interestingly, this new strain of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* is not pathogenic to ‘Key’/‘Mexican’ lime, a rutaceous plant, host of all citrus-infecting *Xanthomonas* stains described worldwide.

KEYWORDS: citrus canker, pathogenicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 A importância econômica do Cancro Cítrico	4
2.2 Etiologia	4
2.3 Sintomatologia	5
2.4 Epidemiologia	6
2.5 Interação minador dos citros e o cancro cítrico	7
2.6 Cancro cítrico e seu controle	7
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
6. CONCLUSÃO	15
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

1 INTRODUÇÃO

O cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é uma das principais doenças da cultura dos citros. Todas as variedades ou espécies cítricas comerciais são suscetíveis a essa bactéria, no entanto algumas apresentam-se menos suscetíveis, como as tangerinas, por exemplo. Sob condições naturais de infecção, a disseminação a curtas distâncias ocorre, principalmente, pela ação de respingos de chuva e de chuvas associadas com ventos, já a disseminação a longas distâncias dá-se pelo transporte de material vegetal infectado (Gottwald *et al.*, 1989; Massari & Belasque Jr. 2006). O comércio mundial impõe restrições à importação de cítricos originários de países ou regiões com cancro cítrico, sendo esta uma doença quarentenária (Gottwald *et al.*, 2002). No Estado de São Paulo são adotadas medidas de exclusão e erradicação da doença. Para isso, são necessárias inspeções constantes nos pomares, para que os focos da doença sejam detectados e erradicados e, conseqüentemente, sua dispersão seja suprimida.

Há, na literatura, o registro de seis patotipos de bactérias do gênero *Xanthomonas* agentes causais de doenças em Rutaceae, os quais são diferenciados, basicamente, pelo agente causal, pela patogenicidade em diferentes hospedeiros, por testes moleculares ou pela região geográfica em que foram relatados até os dias atuais. Dentre essas doenças, a mais importante é o cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). Essa bactéria ocorre endemicamente em muitos países na Ásia e nas Américas, afetando grande número de espécies da família Rutaceae. Encontrada apenas na América do Sul, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*) é o agente causal das cancroses B e C. Isolados do patotipo B foram encontrados na Argentina, Paraguai e Uruguai e possuem patogenicidade restrita a limões verdadeiros e limas ácidas, enquanto que, no estado de São Paulo, o patotipo C deste patógeno afeta somente Lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*). A Mancha Bacteriana dos Citros, ou Cancrose E, causada por *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, endêmica em viveiros de citros da Flórida, Estados Unidos, ataca, principalmente, o citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*). Mais recentemente, dois novos isolados da espécie *citri* foram identificados. Denominados A* (Vernière *et al.*, 1998) e A^w (Sun *et al.*, 2004), ambos possuem patogenicidade restrita a *Citrus aurantifolia* e estão limitados, respectivamente, ao sudeste asiático e à Flórida.

Em Março de 2009 uma nova *Xanthomonas* foi encontrada em um pomar de laranjeira doce (variedade ‘Valência’ enxertada sobre citrumelo ‘Swingle’) no município de Severínia, interior do Estado de São Paulo (Jaciani *et al.*, 2009). Na época 47 plantas desse pomar apresentavam lesões necróticas circulares, de coloração escura, presentes em uma ou ambas as superfícies foliares, somente em brotações do porta-enxerto. Não foram encontrados, por sua vez, sintomas em folhas da laranjeira doce (copa). Bactérias do gênero *Xanthomonas* foram isoladas de folhas sintomáticas (Figura 1) e o postulado de Koch foi finalizado após inoculação em plantas de ‘Swingle’ e posterior re-isolamento. Inoculações em plantas de laranja doce e lima ácida ‘Galego’ revelaram patogenicidade restrita a ‘Swingle’, considerando a não indução de sintomas nessas espécies cítricas testadas. Testes moleculares (Rep e Box-PCR) identificaram essa bactéria como sendo *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Jaciani *et al.*, 2009).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O cancro cítrico teve origem no sudeste asiático (Koizumi, 1985), e atualmente essa doença ocorre em pelo menos trinta países ao redor do mundo. Em 1910 constatou-se pela primeira vez, no hemisfério ocidental, mais especificamente nos Estados Unidos, a presença da bactéria causadora do cancro cítrico em mudas originárias do Japão (Stall; Seymour, 1983). Alguns anos depois, em 1916, foi relatada a presença dessa bactéria na África do Sul, em 1937, na Austrália e na Nova Zelândia, e, em 1954, nas ilhas Fuji (Jones *et al.*, 1984). Atualmente essa doença está presente em outras localidades nos continentes Oceânico, Asiático e Americano. Na América do Sul foi relatada no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai (Feichtenberger; Muller; Guirado, 1997; Leite Júnior, 1990) e, mais recentemente, na Bolívia (Braithwaite *et al.*, 2002).

No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez no ano de 1957, no município de Presidente Prudente, localizado no interior do estado de São Paulo, em material propagativo provavelmente originário do Japão (Bitancourt, 1957). Apesar dos esforços iniciais para conter a disseminação da bactéria, sua propagação não foi completamente impedida, tendo atingido outras regiões do estado, bem como os estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Maranhão e Roraima (Amaral, 1957; Barbosa *et al.*, 2001; Feichtenberger; Muller; Guirado, 1997; Maciel; Duarte; Ayub, 1998; Nascimento *et al.*, 2003).



Figura 1. Folhas de citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) com sintomas de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, detectadas em Março de 2009 em pomar de laranja 'Valência' (*Citrus sinensis*) no município de Severínia (SP).

2.1 Importância econômica do cancro cítrico

Pelo fato de não existirem métodos de controle curativos, o cancro cítrico é uma das doenças mais importantes em regiões produtoras de citros (Gottwald *et al.*, 2001; Leite Júnior, 1990; Leite Júnior *et al.*, 1987; Rossetti, 1977). Essa doença causa perdas que dependem principalmente da redução da capacidade fotossintéticas das plantas sintomáticas e depreciação e queda de frutos (Leite Júnior, 1990; Vernière; Gottwald; Pruvost, 2003). Em pomares com a ocorrência do cancro cítrico, além dos danos diretos na produção e qualidade de frutos, há também outras implicações, como a restrição à comercialização de material propagativo e frutas ‘in natura’ para regiões isentas desse patógeno. Portanto, é uma doença quarentenária, para a qual são aplicadas medidas que objetivam impedir a entrada do patógeno em regiões livres da doença (Civerolo, 1985; Gottwald *et al.*, 2001). Dessa forma, em países em que há ocorrência do cancro cítrico, a imposição de barreiras fitossanitárias, muitas vezes, compromete a comercialização da produção (Gimenes-Fernandes *et al.*, 2000; Gottwald *et al.*, 2001; Stall; Civerolo, 1991).

O Estado de São Paulo possui regiões afetadas pelo cancro cítrico desde sua detecção no ano de 1957, em Presidente Prudente. Apesar das medidas de exclusão e erradicação adotadas não resultarem na erradicação do patógeno, a doença vem sendo mantida em baixíssimos níveis de ocorrência no estado. Desse modo, a inspeção de plantas e a erradicação dos focos ainda é a forma mais efetiva de controle da doença no estado. De 1999 a 2009 foram erradicadas 4.629.091 plantas cítricas presentes em propriedades comerciais, em razão da detecção e eliminação de focos da doença no Estado de São Paulo.

2.2 Etiologia

As *Xanthomonas* são bactérias bastonetiformes, gram negativas e aeróbias que apresentam um único flagelo polar (Bedendo, 1995). A bactéria *X. citri* subsp. *citri* se desenvolve facilmente na maioria dos meios de cultura utilizados em laboratório, e é facilmente isolada de tecido vegetal infectado. Quando cultivada em meio ágar nutriente apresenta colônias amarelas, visíveis após dois ou três dias de incubação a 28°C (Bedendo, 1995; Rossetti, 1981). Em plantas inoculadas e mantidas nessa temperatura, os sintomas começam a ser visíveis depois de dez a quatorze dias.

Seis tipos de bactérias do gênero *Xanthomonas* são agentes causais de doenças em cítricos, as quais são diferenciadas, basicamente, pelo agente causal, patogenicidade, testes

moleculares ou pela região em que foram relatadas até os dias atuais. Dentre essas doenças, a mais importante e severa é o cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). Essa bactéria ocorre endemicamente em muitos países na Ásia e nas Américas, afetando a maioria das espécies botânicas de importância comercial da família rutáceas. Encontrada apenas na América do Sul, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*) é o agente causal das cancroses B e C. Isolados do tipo B foram encontrados na Argentina, Paraguai e Uruguai e possuem patogenicidade restrita a limões verdadeiros e limas ácidas, enquanto que limitado ao estado de São Paulo, o tipo C deste patógeno afeta somente lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*). A mancha bacteriana dos citros, antigamente denominada Cancrose E, causada por *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, endêmica em viveiros de citros da Flórida, Estados Unidos, é patogênica principalmente a citrumelo ‘Swingle’. Mais recentemente dois novos isolados da espécie *citri* foram identificados. Denominados A* (Vernière *et al.*, 1998) e A^w (Sun *et al.*, 2004), ambos isolados possuem patogenicidade restrita a *Citrus aurantifolia* e estão limitados, respectivamente, ao sudeste asiático e à Flórida.

2.3 Sintomatologia

Os sintomas do cancro cítrico podem ocorrer em toda a parte aérea da planta cítrica e apresentam características que variam em função do tipo e da idade do órgão afetado. Nas folhas as lesões podem ser salientes nas duas faces, e, quando em tecidos maduros, o centro das lesões velhas é corticoso, duro e lignificado, podendo apresentar círculos dispostos concêntrica. O tamanho das lesões nas folhas depende muito da suscetibilidade do hospedeiro, podendo atingir mais de um centímetro de diâmetro em cultivares suscetíveis de laranja doce e pomelo (Leite Júnior, 1990; Stall; Seymour, 1983). As folhas são mais suscetíveis até aproximadamente trinta dias, tempo necessário para sua expansão completa, quando se tornam mais resistentes (Graham, Gottwald, 1991).

Quando em altas severidades, a doença provoca a desfolha prematura da planta, comprometendo o processo fotossintético, e, como consequência, pode refletir em menor produção e no definhamento generalizado da planta (Gottwald; McGuire; Graham, 1988; Leite Júnior, 1990). Nos ramos, quando ocorrem grandes áreas lesionadas, podem provocar a morte prematura desses (Feichtenberger; Muller; Guirado, 1997). Os frutos são mais suscetíveis entre sessenta e noventa dias após a queda das pétalas. Neles os sintomas são semelhantes àqueles das folhas, mas as lesões podem ter maior diâmetro e apresentar

rachaduras no centro. Essas lesões são, geralmente, maiores que nas folhas (Feichtenberger; Muller; Guirado, 1997; Leite Júnior, 1990), servindo de abertura para outras infecções, acelerando o apodrecimento do fruto. O desenvolvimento das lesões pode induzir a queda dos frutos antes de atingirem a maturação. Além dessa queda prematura, a qualidade dos frutos remanescentes na planta é reduzida em razão da presença das lesões da doença (Vernière; Gottwald; Pruvost, 2003).

2.4 Epidemiologia

Ciclos epidêmicos do cancro cítrico têm início a partir de lesões da doença presentes em ramos, folhas ou frutos. Células bacterianas são disseminadas a partir dessas lesões principalmente por água, provenientes de chuvas, irrigação ou práticas culturais realizadas com plantas molhadas. Quando as gotas de água entram em contato com as lesões da doença, dispersam o inóculo para folhas e ramos das plantas ao redor através de gotículas, as quais podem atingir maiores distâncias na presença de ventos (Gottwald; McGuire; Graham, 1988; Gottwald; Timer, 1995). A longas distâncias, além da disseminação por meio de chuvas associadas a ventos, a bactéria também pode ser disseminada por materiais vegetais infectados, como frutos e material propagativo (Leite Júnior, 1990).

A intensidade da doença e a severidade dos sintomas não ocorrem de maneira uniforme durante todo o ano por estarem associadas às fases de crescimento do hospedeiro. O cancro cítrico é mais severo no sudeste brasileiro no início do verão, quando altas temperaturas, chuva intensa e vento ocorrem ao mesmo tempo. Provavelmente isso está relacionado ao fato de que em condições de alta umidade as lesões de cancro cítrico exsudam células bacterianas na superfície. Segundo Koizumi *et al.* (1996), as células bacterianas são mantidas ativas por mais tempo quando a umidade do ar é elevada, aumentando, com isso, a intensidade de dispersão do inóculo.

Para o desenvolvimento da doença, as condições favoráveis compreendem temperaturas entre 20° a 35°C (Bedendo, 1995). Quando essas temperaturas são acompanhadas de precipitações e presença constante de ventos, a disseminação do patógeno é favorecida (Palazzo *et al.* 1987).

Novas infecções da parte aérea das plantas cítricas não ocorrem uniformemente durante todo o ano, estando associadas ao crescimento do hospedeiro (Stall; Seymour, 1983). A bactéria penetra através dos estômatos e outras aberturas naturais ou por ferimentos e se multiplica no espaço intercelular do parênquima. A penetração natural por estômatos

normalmente é mais frequente na face inferior das folhas, devido à maior concentração dos mesmos nessa face (Graham *et al.*, 1992). As folhas são mais predispostas à infecção até atingirem aproximadamente 85% da expansão total dos tecidos (Goto, 1990; Graham; Gottwald, 1991). Graham e Gottwald (1991) mostraram que a maior suscetibilidade de frutos está entre dois a quatro centímetros de diâmetro, tornando menos acentuada até o seu crescimento completo.

Segundo Goto (1992), a bactéria não é capaz de sobreviver por longo período em restos de cultura ou plantas daninhas incorporadas ao solo, porém pode sobreviver por anos em tecidos infectados mantidos secos, livres de solo e protegidos da luz solar.

2.5 Interação do minador dos citros e o cancro cítrico

No ano de 1996, com o surgimento do minador dos citros (*Phyllocnistis citrella*) no sul do estado de São Paulo, foi preciso intensificar o controle do cancro cítrico devido às mudanças ocorridas na sua propagação (Bergamin Filho; Amorim, 1999; Gottwald; Graham; Schubert, 1997; Prates; Nakano; Gravena, 1996). Na presença desse inseto há um aumento na intensidade da doença em razão dos ferimentos provocados pelas suas fases imaturas, os quais facilitam a infecção pela bactéria (Bergamin Filho, *et al.*, 2001; Gottwald; Graham; Schubert, 1997; Rodrigues *et al.*, 1998). Antes da introdução da larva minadora, o padrão de distribuição da doença nos pomares era agregado, devido ao seu processo de disseminação por respingos de chuva e ventos. Com o surgimento da larva minadora do citros no ano de 1996, houve uma modificação na distribuição espacial do cancro cítrico, de forma que passaram a ocorrer padrões de agregação intermediários com numerosas infecções satélites e até distribuição ao acaso de plantas doentes (Bergamin Filho; Amorim, 1999).

As fases imaturas desse inseto formam galerias sinuosas na epiderme (Pasqualini *et al.*, 1996), principalmente na face inferior das folhas novas (Volpe; Castro; Glória, 1998). No processo de alimentação, as larvas rompem a cutícula e a epiderme, o que facilita a penetração das bactérias que causam o cancro cítrico (Chagas; Parra, 2000; Gottwald; Graham; Schubert, 1997; Schubert *et al.*, 2001). O inseto não é vetor da bactéria, mas facilita a infecção e o desenvolvimento do patógeno nas plantas. Adicionalmente, os ferimentos causados pelo minador deixam as folhas predispostas à infecção por mais tempo.

2.6 Cancro cítrico e seu controle

No estado de São Paulo, que é atualmente o maior produtor mundial de suco de laranja, o controle do cancro cítrico baseia-se, obrigatoriamente, em medidas de exclusão e erradicação (Barbosa *et al.*, 2001; Gottwald *et al.*, 2001; Schoulties *et al.*, 1987). Logo após a primeira constatação no Brasil, essas medidas foram estabelecidas no programa nacional de erradicação (CANECC). Esse programa, mantido até hoje, não resultou na erradicação da bactéria do estado de São Paulo, mas vem permitindo a manutenção de quase a totalidade das plantas e pomares cítricos do estado livres do patógeno (Feichtenberger; Muller; Guirado, 1997; Leite Júnior, 1990). As medidas de exclusão têm por objetivo evitar a entrada do patógeno em áreas livres do cancro cítrico e envolvem o controle da circulação de pessoas e materiais vegetais entre regiões e propriedades, e de máquinas, veículos e utensílios utilizados na produção de citros entre pomares e propriedades citrícolas.

A prática de erradicação é uma medida de controle adotada depois que o patógeno foi introduzido em uma área até então isenta de cancro cítrico. A eliminação das plantas sintomáticas, e daquelas contidas em um raio mínimo de 30 metros a partir das plantas sintomáticas, é uma medida obrigatória para conter a disseminação da doença entre plantas e pomares no estado de São Paulo.

3 OBJETIVOS

Considerando a importância mundial de bactérias do gênero *Xanthomonas*, principalmente por suas implicações quarentenárias e restritivas, e a detecção de um isolado de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (isolado FDC 1609) patogênica em citrumelo ‘Swingle’, objetivou-se, nesta pesquisa, determinar a faixa de hospedeiros dessa bactéria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho teve como objetivo determinar a faixa de hospedeiros de citros da bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, isolado FDC 1609, obtido em Março de 2009 em tecidos de porta-enxerto de citrumelo ‘Swingle’ no município de Severínia (SP) (Jaciani *et al.*, 2009). O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Instituto Biológico de São Paulo, localizado na cidade de Campinas (SP). Para a determinação da faixa de hospedeiros os seguintes genótipos de Rutaceae foram inoculados: lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* ‘Swingle’), ‘Grapefruit’ (*C. paradisi* Macf.), limão ‘Cravo’ (*C. limonia*

Osbeck), citrumelo ‘Swingle’ (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*), laranjas ‘Valência’ e ‘Natal’ [*C. sinensis* (L. Osbeck)], limão verdadeiro ‘Siciliano’ (*C. limon*), e tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reshni* Hort). Duas folhas, ainda não completamente expandidas, de plantas de cada um desses genótipos foram inoculadas e as plantas foram mantidas para avaliação por aproximadamente dois meses. O experimento foi conduzido de Abril a Junho de 2010. Os isolados foram semeados em meio de cultura LPGA (7g/L levedura, 7 g/L peptona, 7 g/L glicose e 16 g/L ágar, pH 7,0) e incubados a 28°C por 48 horas. Diluições seriadas em solução salina tamponada fosfatada, a partir da suspensão bacteriana inicial de aproximadamente 10⁸ UFC/mL (600 nm a 0,3 de absorbância em espectrofotômetro) permitiram o ajuste da concentração final de 10⁵ UFC/mL. Para fins de comparação foram inoculados também isolados 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) e FDC 1632 de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XfaC). A inoculação foi feita por perfuração do limbo foliar com agulha de 0,56 mm de diâmetro seguida da infiltração da suspensão bacteriana. As plantas inoculadas foram avaliadas quanto à presença de sintomas aos 13, 21, 26, 34, 41, 48, 55 e 69 dias após a inoculação (DAI).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primeiros indícios de infecção das folhas inoculadas foram observados aos treze DAI somente em folhas de laranja ‘Valência’ inoculadas com Xac, as quais apresentavam sintomas iniciais de cancro cítrico. Aos 26 DAI as plantas inoculadas com Xac apresentavam sintomas de cancro cítrico, enquanto folhas de lima ácida ‘Galego’ apresentavam sintomas de cancrose incitados por XfaC, e folhas de citrumelo ‘Swingle’ apresentavam-se infectadas pelo isolado FDC 1609 (Figura 2). Os sintomas decorrentes da inoculação com o isolado FDC 1609 em citrumelo ‘Swingle’ foram semelhantes aos observados em campo, quando da obtenção desse isolado (Figura 2 a,b). Esses sintomas caracterizaram-se por lesões circulares necróticas escuras, pouco salientes, com leve encharcamento e de menor tamanho, diferentes dos sintomas de cancro cítrico. O isolado FDC 1609 revelou-se pouco agressivo, em razão do limitado desenvolvimento dos sintomas em citrumelo ‘Swingle’ após dois meses da inoculação (Figura 2). O mesmo foi observado por Jaciani *et al.* (2009). Comparativamente, folhas de citrumelo ‘Swingle’ inoculadas com Xac 306 no presente estudo caíram aproximadamente aos cinquenta DAI, provavelmente em razão do avançado desenvolvimento dos sintomas de cancro cítrico.

Em nenhum dos demais genótipos de Rutaceae inoculados com o isolado FDC 1609 foram observados os sintomas apresentados pelas plantas de citrumelo ‘Swingle’ (Figuras 2 e 3). As folhas das plantas de ‘Grapefruit’, laranjas doce ‘Valência’ e ‘Natal’ e lima ácida ‘Galego’ apresentaram morte celular, típicas de reação de hipersensibilidade, com ausência de necrose saliente e encharcamento dos tecidos (Figuras 3A, 3C, 3D e 4A). As folhas de tangerina ‘Cleópatra’ não apresentaram extensiva morte celular e se caracterizaram por ausências de encharcamento e necrose saliente, como observado em citrumelo ‘Swingle’ (Figura 3F).



Figura 2. Folhas de citrumelo ‘Swingle’ (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*) com sintomas de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (isolado FDC 1609), aproximadamente setenta dias após a inoculação.

As folhas das plantas de limão ‘Cravo’ e ‘Siciliano’ apresentaram extensiva morte celular e algumas pequenas saliências nas bordas da região infiltrada (Figuras 3B e 3E). Em outro trabalho ainda em desenvolvimento, nos quais as plantas foram inoculadas por agulhas imersas na suspensão bacteriana do isolado FDC 1609, não foram observados sintomas de necrose, encharcamento ou morte celular em folhas de plantas de limão ‘Cravo’ e ‘Siciliano’, como observado no mesmo experimento em folhas de lima ácida ‘Galego’ (Figuras 4B, 4C e 4D). Não se descarta a possibilidade de as saliências observadas nas folhas de limão ‘Cravo’ e ‘Siciliano’ (Figuras 3B e 3E) serem resultado da contaminação desses tecidos com Xac, no momento da instalação do experimento. De qualquer maneira, fica caracterizado que citrumelo ‘Swingle’ é hospedeiro do isolado FDC 1609 de *X. f.* subsp. *aurantifolii*, detectado em porta-enxerto desse genótipo em condições naturais de infecção. No entanto, é possível

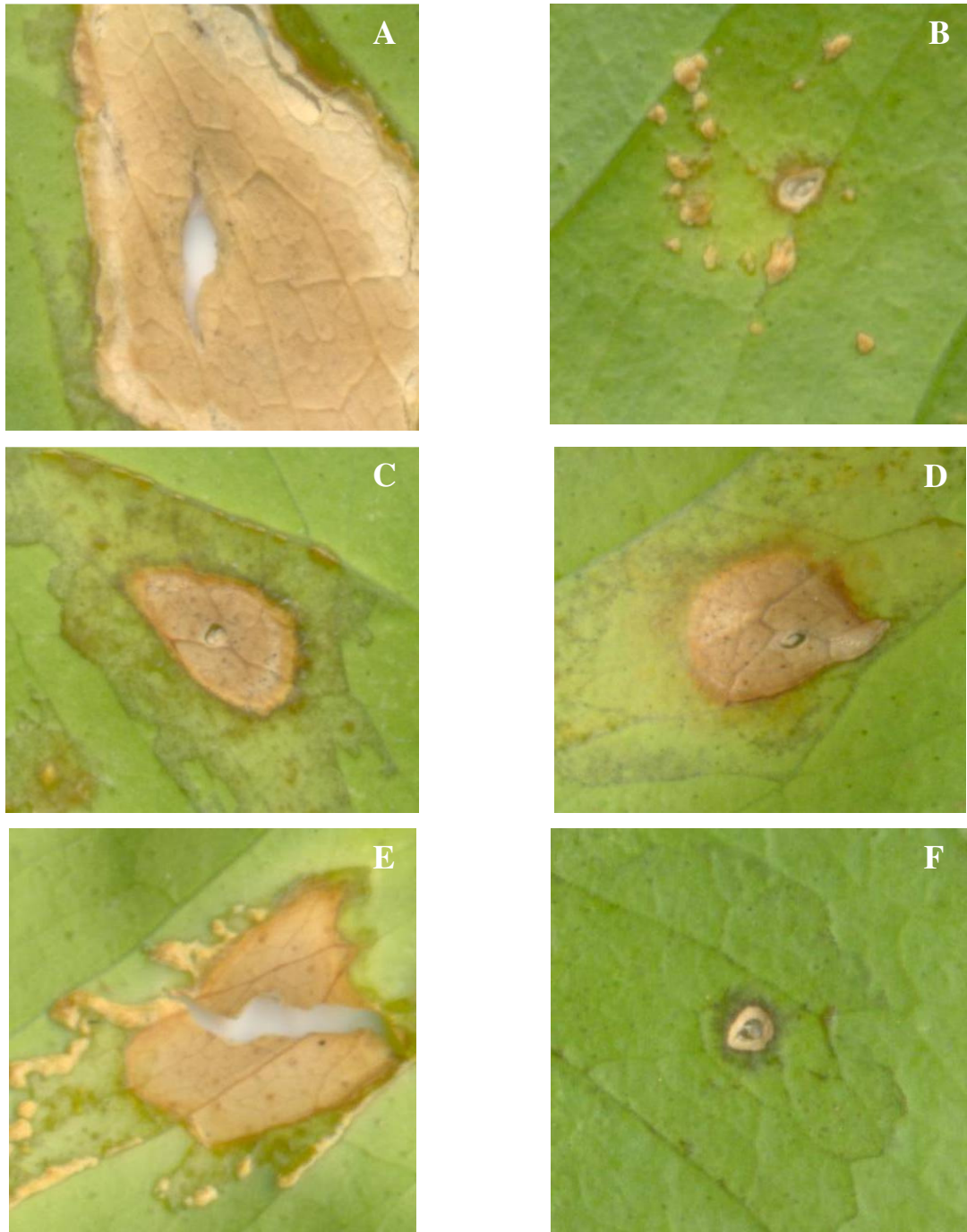


Figura 3. Folhas de 'Grapefruit' (*C. paradisi* Macf.) (A), limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) (B), laranja 'Natal' [*C. sinensis* (L.) Osbeck] (C), laranja 'Valência' [*C. sinensis* (L.) Osbeck] (D), limão 'Siciliano' (*C. limon*) (E), e tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort.) (F) aproximadamente aos setenta dias após a inoculação de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (isolado FDC 1609).



Figura 4. Folhas de Lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia*) (A e B), limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) (C), e limão 'Siciliano' (*C. limon*) (D) após a inoculação de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (isolado FDC 1609). A folha ilustrada em A (Lima ácida 'Galego') foi infiltrada com a suspensão bacteriana, enquanto as folhas ilustradas em B, C e D foram inoculadas por ferimento com agulha imersa na suspensão bacteriana do isolado FDC 1609 por Jaciani *et al.* (em preparação).

que os limões 'Cravo' e 'Siciliano' possam permitir relativo desenvolvimento desse patógeno em seus tecidos. Considerando-se que as plantas no presente estudo foram infiltradas com suspensão bacteriana desse organismo, se os limões 'Cravo' e 'Siciliano' permitirem o desenvolvimento do mesmo, isso certamente não ocorrerá de maneira extensiva e, conseqüentemente, esses genótipos possuem pouca importância epidemiológica para a disseminação dessa bactéria.

As inoculações com XfaC FDC 1632 em folhas das plantas de 'Grapefruit' e limão 'Siciliano' apresentaram extensiva morte celular (Figura 5A e 5D), provavelmente decorrentes de reação de hipersensibilidade, com ausência de necrose saliente e encharcamento dos tecidos. Por outro lado, folhas de laranja 'Natal', Citrumelo 'Swingle' e

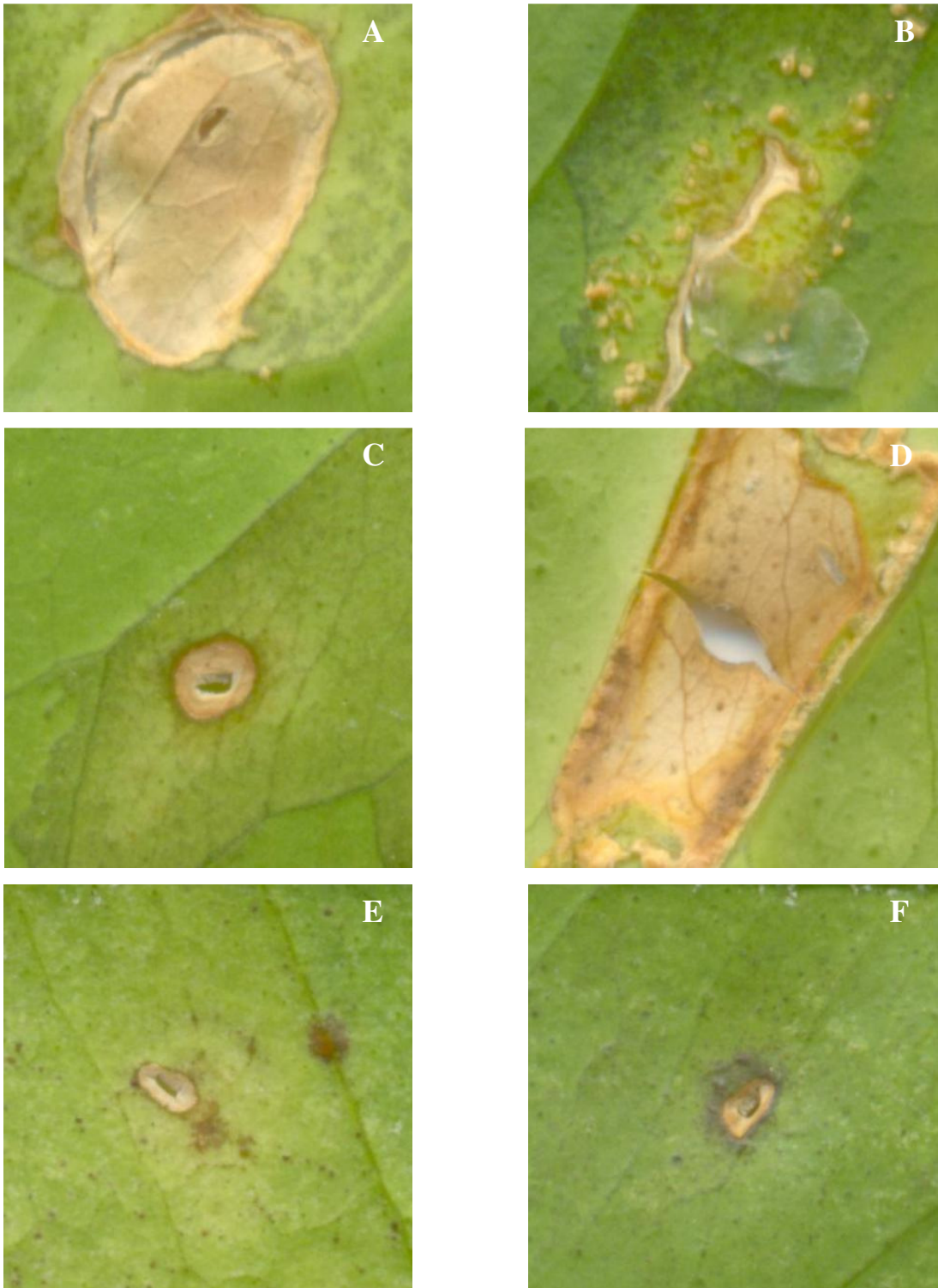


Figura 5. Folhas de 'Grapefruit' (*C. paradisi* Macf.) (A), limão 'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) (B), laranja 'Natal' [*C. sinensis* (L.) Osbeck] (C), limão 'Siciliano' (*C. limon*) (D), citrumelo 'Swingle' (E), e tangerina 'Cleópatra' (*C. reshni* Hort.) (F) aproximadamente aos setenta dias após a inoculação de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (isolado FDC 1632).

tangerina ‘Cleópatra’ não apresentaram morte celular, encharcamento ou necrose saliente, (Figura 5C, 5E e 5F), e as folhas de limão ‘Cravo’ apresentaram pequenas lesões salientes e relativo encharcamento do tecido infiltrado (Figura 5B). Não se descarta a possibilidade dessas saliências observadas nas folhas de limão ‘Cravo’ (Figura 5B) ser resultado da contaminação desses tecidos por Xac, no momento da instalação do experimento. Por outro lado, folhas de limão ‘Cravo’, limão ‘Siciliano’, ‘Grapefruit’ e laranja ‘Valência’, infiltradas com Xac, apresentaram extensiva morte celular e bordos da região de infiltração com necrose saliente e encharcamento (Figura 6).

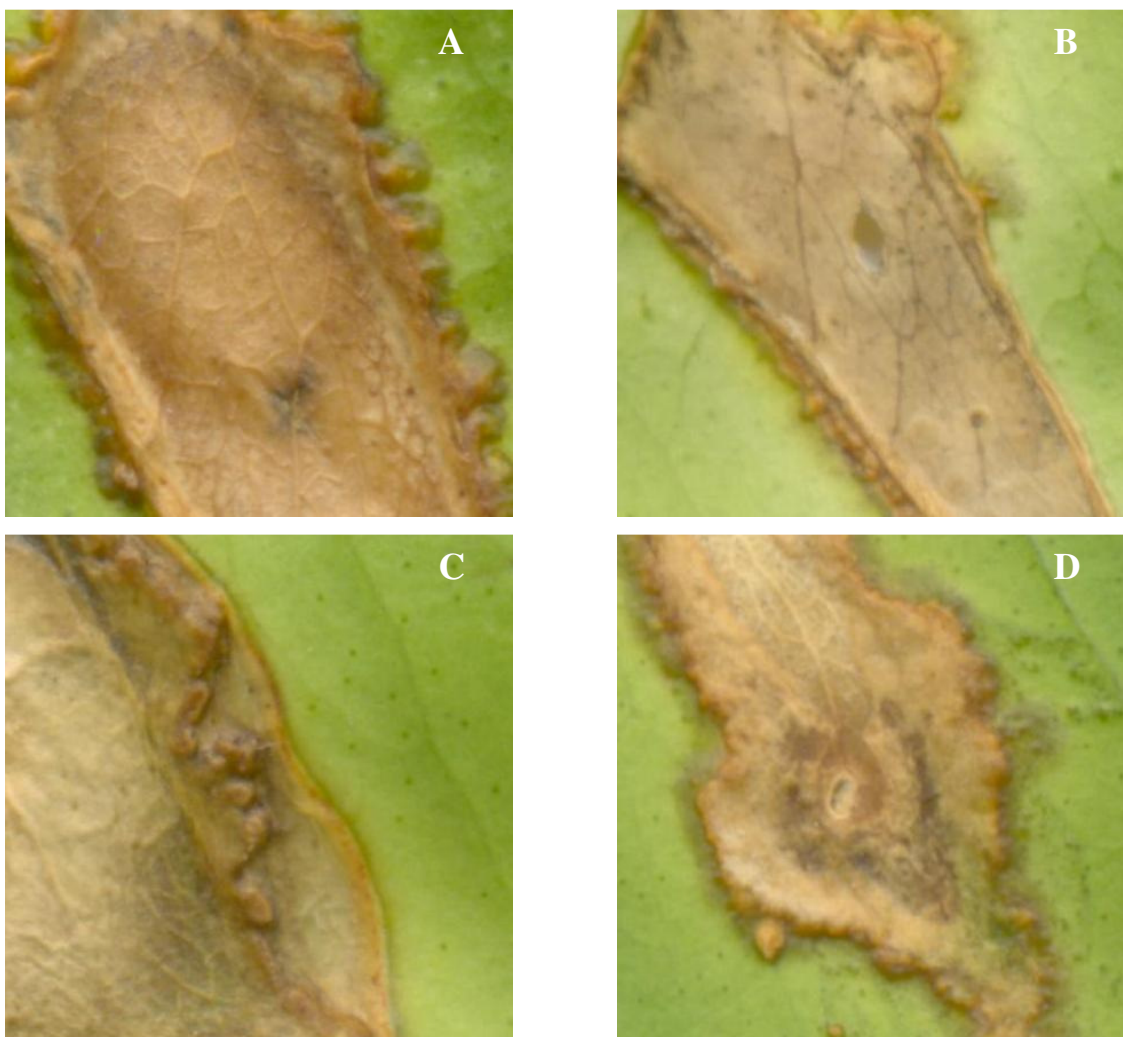


Figura 6. Folhas de limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) (A), limão ‘Siciliano’ (*C. limon*) (B), ‘Grapefruit’ (*C. paradisi* Macf.) (C), e laranja ‘Valência’ [*C. sinensis* (L.) Osbeck] (D) aproximadamente aos setenta dias após a inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (isolado 306).

X. f. subsp. *aurantifolii* está descrita na literatura como patogênica somente a lima ácida ‘Galego’ (*C. aurantifolia*). No entanto, o isolado FDC 1609 desse patógeno mostrou-se

capaz de infectar citrumelo ‘Swingle’ por Jaciani *et al.* (2009) e também no presente trabalho (Figura 2), e incapaz de infectar lima ácida ‘Galego’, espécie essa, ate então, notadamente suscetível a todas espécies e tipo de *Xanthomonas* patogênicas aos citros.

Os sintomas provocados pelo isolado FDC 1609 em citrumelo ‘Swingle’ mostraram-se como lesões necróticas circulares, de coloração escura, presentes em uma ou ambas as superfícies foliares, algumas vezes com halo amarelo ao redor da necrose. Esses sintomas podem ser confundidos com os incitados por Xac. Por essa razão, para fins de diagnóstico de tecidos de citrumelo ‘Swingle’ com sintomas caracterizados por necroses como as descritas, há necessidade da aplicação de técnicas moleculares ou da inoculação em hospedeiros diferenciais, uma vez que somente o fluxo bacteriano observado em microscópio óptico (corrída bacteriana) não permite diferenciar esses patógenos.

Em viveiros de produção de mudas cítricas, o porta-enxerto citrumelo ‘Swingle’ é amplamente utilizado. Por essa razão, quando do surgimento de sintomas característicos de cancro cítrico, ou cancrose, nesse hospedeiro, deve-se, necessariamente, aplicar técnicas adequadas para o diagnóstico objetivando a detecção correta do agente causal. Em situações nas quais *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (FDC 1609) esteja presente infectando plantas de citrumelo ‘Swingle’, o diagnóstico correto evitará a erradicação de plantas em viveiros ou pomares, suspeitos de estarem infectados com cancro cítrico em razão dos sintomas. Caso o teste diagnóstico seja baseado apenas nos sintomas ou por microscopia (corrída bacteriana), a comprovação errônea de infecção por Xac resultará na eliminação desnecessária de todas as plantas cítricas presentes, conforme a legislação vigente.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho comprovou-se que a bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* FDC 1609 tem como hospedeiro apenas citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*), dentre os genótipos testados, não sendo patogênico a lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia* ‘Swingle’), hospedeiro comum de todas as espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros descritas até os dias atuais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, S. F. 1957. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico** 23:112-123.
- Barbosa, J. C., Gimenes-Fernandes, N., Massari, C.A. & Ayres, A.J. 2001. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica** 27:30-35.
- Bedendo, I. Manchas Foliaves. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). 1995. **Manual de Fitopatologia**. Vol. 1. Doenças das Plantas Cultivadas. 3ª. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres. pp. 848-858.
- Bergamin Filho, A.; Amorim, L. 1999. Mudança no padrão espacial do cancro cítrico exige novas regras para a erradicação. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, vol. 14, n. 94, pp. 12.
- Bergamin Filho, A.; Amorim, L. Gottwald, T. R.; Laranjeira, F. F. 2001. Spatial distribution of citrus canker in São Paulo – Brazil. In: International workshop on plant disease epidemiology, Ouro Preto, 8, 2001. **Proceedings...** Ouro Preto: International Society of Plant Pathology. pp. 28-29.
- Bitancourt, A.A. 1957. O cancro cítrico. **O Biológico** 23:101-111.
- Braithwaite, M., Leite Júnior, R.P., Smith, J.J., Boa, E. & Saddler, G.S. 2002. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolivia. **Plant Pathology** 51:383.
- Chagas, M. C. M.; Parra, J. R. P. 2000. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae): técnica de criação e biologia em diferentes temperaturas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, vol. 29, pp. 227-235.
- Civerolo, E.L. Bacterial canker disease of citrus. 1984. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society** 37:127-146.
- Civerolo, E. L. 1985. Citrus bacterial canker disease: the bacterium *xanthomonas campestris* pv. *Citri*. In: CITRUS CANKER: AN INTERNATIONAL PERSPECTIVE, Lake Alfred, 1985. **Citrus Canker: An international perspective**, Lake Alfred: Citrus Research and Education Center, University of Florida. pp. 11-17.
- Feichtenberger, E.; Muller, G. W.; Guirado, N. 1997. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Ed). **Manual de fitopatologia**. Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. 3ª. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres. pp. 261-296.
- Gimenes-Fernandes, N.; Barbosa, J. C.; Ayres, A., J.; Massari, C. A. 2000. Plantas doentes não detectadas nas inspeções dificultam a erradicação do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica** 26:320-325.
- Goto, M. 1990. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego. Academic Press.

- Goto, M. 1992. Citrus canker. In: Kumar, J. et al. (Ed.). **Plant disease of international importance**. Englewood Cliff: Prentice-Hall. pp. 250-269.
- Gottwald, T.R., McGuire, R.G. & Garran, S. 1988. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology** 78:739-745.
- Gottwald, T. R., Timmer, L. W., McGuire, R. G. 1989. Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. **Phytopathology** 79:1276–1283.
- Gottwald, T.R. & Timmer, L.W. 1995. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Tropical Agriculture** 72:194-201.
- Gottwald, T. R.; Graham, J. H.; Schubert, T.S. 1997. An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with the Asian citrus leafminer. **Fruits** 52:371–378.
- Gottwald, T.R.; Hughes, G.; Graham, J. H.; Sun, X.; Riley, T. 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology** 91:30–34.
- Gottwald, T. R., Sun, X., Riley, T., Graham, J. H., Ferrandino, F., Taylor, E. L. 2002. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology** 92:361-377.
- Graham, J. H.; Gottwald, T. R. 1991. Research perspectives on eradication of citrus bacterial diseases in Florida. **Plant Disease** 75:1193–1200.
- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Riley, T.D. & Achor, D. 1992. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology** 82:1319-1325.
- Jaciani, F. J.; Destéfano, S. A. L.; Rodrigues Neto, J; Belasque Jr.; J. 2009. Detection of a new bacterium related to *Xanthomonas fuscans* subsp. *Aurantifolii* infecting ‘Swingle’ citrumelo in Brazil. **Plant Disease** 93:1074.
- Jones, D. R.; Moffett, M. L.; Navaratnam, S. J. 1984. Citrus canker on Thursday Island. **Australian Plant Pathology**, Canberra, vol. 13, pp. 64-65.
- Koizumi, M. 1985. Citrus canker: The world situation. In: Timmer, L.W. (Ed.) **Citrus canker: an international perspective**. Gainesville FL. University of Florida. Institute of Food and Agricultural Science. pp. 2-7.
- Koizumi, M.; Kimijima, E.; Tsukamoto, T.; Togawa, M.; Masui, S. 1996. Dispersal of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 8, 1996, Sun City. **Proceedings...** Riverside: International Society of Citriculture. Vol. 1, pp. 340-344.

Leite Júnior, R.P., Mohan, S.K., Pereira, A.L.G. & Campacci, C.A. 1987. Controle integrado de cancro cítrico: efeito da resistência genética e da aplicação da bactericidas. **Fitopatologia Brasileira** 12:257-263.

Leite Júnior, R. P. 1990. **Cancro Cítrico**: prevenção e controle do Paraná. Londrina: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, 51 pp. (Circular, 61).

Maciel, J.L.N., Duarte, V. & Ayub, M.A.Z. 1998. Plasmid DNA restriction profile and copper sensitivity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira** 23:116-120.

Massari, C. A., Belasque Júnior. J. 2006. A campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo – Situação atual e contaminação em viveiros. **Laranja** 27:41-55.

Namekata, T. 1988. Citrus canker disease situation in Brazil. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM OF CITRUS CANKER, DECLINIO/BLIGHT AND SIMILAR DISEASES, 1, 1987, São Paulo. **Proceedings...** Campinas: Fundação Cargil, pp. 9-14.

Nascimento, J.F.; Rodrigues Neto, J.; Alves, J.M.A.; Rêgo, M.M. & Araújo, A.E.S. 2003. Ocorrência de cancro cítrico no estado de Roraima. **Summa Phytopathologica** 29:81-82.

Palazzo, D. A.; Nogueira, E. M. C.; Ceravolo, L; C.; Montovanello, C. M. 1987. Estudos epidemiológicos em cancro cítrico (*Xanthomonas campestris* pv. *Citri*): progresso da doença no tempo. **Laranja** 8:133-140.

Pasqualini, A. J.; Fernández, R. V.; Ghiggia, L. I.; Fernandez, J. A. 1996. El minador de lãs hojas de los cítricos *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera – Gracillariidae) em Tucumán. **Revista Agronómica Del Noroeste Argentino**, Tucuman, vol. 28, n. 4, pp. 137-144.

Pino, F. A.; Igue, T.; Amaro, A. A. 1990. Delineamento amostrar para levantamento de cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, vol. 37, n. 3, pp. 61-71.

Prates, H.S., Nakano, O. & Gravena, S. 1996. **Minadora das folhas dos citros *Phyllocnistis citrella***, Stainton, 1856. Campinas: CATI, 3 pp. (CATI. Comunicado Técnico, 129).

Rodrigues, J. C. V.; Rossetti, V. Machado, M. A.; Teófilo Sobrinho, M.; Nogueira, N. L. 1998. Larva dos citros: um fator de aumento de pragas e cancro cítrico. **Laranja** 19:49-60.

Rossetti, V. 1977. Citrus canker in Latin America: A review. **Proceedings of the International Society of Citriculture** 3:918-923.

Rossetti, V. 1981. Identificação de Cancro Cítrico. **O Biológico**. São Paulo, vol. 47, n. 5, pp. 145-153.

Schoulties, C. L.; Civerolo, E. L.; Miller, J. W.; Stall, R. E; Krass, C. J.; Poe, S. R.; Ducharme, E. P. 1987. Citrus canker in Florida. **Plant Disease** 71:388-395.

- Schubert, T. S.; Rizvi, S. A.; Sun, X.; Gottwald, T. R.; Graham, J. H.; Dixon, W. N. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – again. **Plant Disease** 85:340-356.
- Stall, R.E. & Seymour, C.P. 1983. Canker, a threat to citrus in the gulf-cost states. **Plant Disease** 67:581-585.
- Stall, R.E. and Civerolo, E.L. 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Phytopathology** 29:399–420.
- Sun, X.; Stall, R. E.; Jones, J. B.; Cubero, J.; Gottwald, T. R. Graham, J. H.; Dixon, W. D. Schubert, T. S.; Chaloux, P. H.; Stromberg, V. K.; Lacy, G. H.; Sutton, B. D. 2004. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key/Mexican lime and alemow in South Florida. **Plant Disease** 88: 1179-1188.
- Vernière, C.; Hartung, J.S.; Pruvost, O.P.; Civerolo, E.L.; Alvarez, A.M.; Maestri, P.; Luisetti, J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology** 104:477–487.
- Vernière, C. J.; Gottwald, T. R.; Pruvost, O. 2003. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* in various citrus plant tissues. **Phytopathology** 93:832-843.
- Volpe, A.; Castro, P. R. C.; Glória, B. A. 1998. Alterações anatômicas causadas pela larva nas folhas de tangerina Ponkan. **Laranja** 19:27-38.