

CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E MÉTODO DE INOCULAÇÃO DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. CITRI

JOSÉ BELASQUE JÚNIOR¹ e WALDIR CINTRA DE JESUS JUNIOR²

RESUMO

O tipo de inoculação e a concentração de inóculo são fatores relevantes no processo infeccioso de várias bactérias fitopatogênicas. A presença de ferimentos no hospedeiro, quando do contato com o patógeno, também é de suma importância em muitos patossistemas bacterianos, sobretudo no cancro cítrico. Nesse sentido, avaliou-se a indução de sintomas de cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri em plantas de limão Cravo [*Citrus limonia* (L.) Osbeck], considerando três métodos de inoculação: aspersão até o ponto de escorrimento, molhamento das folhas com algodão e ferimento das folhas seguido de inoculação por algodão, combinados com três concentrações de inóculo (10^6 , 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹). As inoculações por ferimentos nas concentrações 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹ resultaram na expressão mais rápida dos sintomas (entre 4 e 7 dias), e também em máximas incidências e severidades, o que refletiu na área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC). As inoculações de 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹ por aspersão, 10^6 UFC.mL⁻¹ por ferimentos e 10^8 UFC.mL⁻¹ com algodão resultaram em valores intermediários. Nesses tratamentos, as plantas apresentaram-se sintomáticas entre 4 e 8 dias e as severidades variaram de 1,02 a 1,19%. Por último, de modo comparativo, as

¹ Fundecitrus, Centro de Pesquisas Citricolas, Departamento Científico. 14807-040 Araraquara (SP). E-mail: belasque@fundecitrus.com.br

² Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia. 29500-000 Alegre (ES). E-mail: wcintra@cca.ufes.br

inoculações por algodão com 10^6 e 10^7 UFC.mL⁻¹ e por aspersão com 10^6 UFC.mL⁻¹, resultaram nos menores valores de *AUDPC*, e severidades, incidências máximas entre 40 e 60% e a indução dos sintomas somente a partir do sexto dia.

Termos de indexação: cancro cítrico, período de incubação, severidade, *AUDPC*.

SUMMARY

INOCULUM CONCENTRATION AND TYPE OF INOCULATION OF *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. CITRI

The type of inoculation and its concentration are important factors in the infectious process of many phytopathogenic bacterias. The presence of damages in the host, during the contact with the pathogen, is another important factor in different bacterial pathosystems. Considering these facts, we evaluated symptoms induction in Rangpur lime [*Citrus limonia* (L.) Osbeck] by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, using three types of inoculation: spray the bacterial suspension in leaves up to the run off point, sprinkle the leaves with a cotton, and damage the leaves with a pinprick followed by sprinkle the leaves with a cotton, each one combined with three inoculum concentrations (10^6 , 10^7 and 10^8 CFU.mL⁻¹). Damaged inoculation of the host with 10^7 and 10^8 CFU.mL⁻¹ incited earlier symptom expression (4 to 7 days), and highest incidence of diseased plants, area under disease progress curve (*AUDPC*), and severity. Spray inoculation with 10^7 and 10^8 CFU.mL⁻¹, damaged inoculation with 10^6 CFU.mL⁻¹, and sprinkle 10^8 CFU.mL⁻¹ with a cotton promote medium values. Plants in these treatments presented symptoms between 4 and 8 days, and severities between 1.02 and 1.19%. Cotton inoculation with 10^6 and 10^7 CFU.mL⁻¹, and spray inoculation with 10^6 CFU.mL⁻¹, promote the smallest *AUDPC* and severities, maximum incidences (40 to 60%), and induced symptoms only after the sixth day.

Index terms: citrus canker, incubation period, severity, *AUDPC*.

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [(Hasse), Vauterin et al.] (Xac) é o agente causal do cancro cítrico, uma das mais importantes doenças da cultura dos citros (STALL & SEYMOUR, 1983; GOTTWALD et al., 2001). Os sintomas ocorrem em folhas, ramos e frutos e constituem lesões necróticas, marrons, salientes, envoltas por uma anasarca e, muitas vezes, com a presença de halo amarelo ao redor do tecido necrosado. Infecções severas podem induzir desfolha, queda de frutos e morte de ramos (STALL & SEYMOUR, 1983; SCHOULTIES et al., 1987). Sob condições naturais de infecção a disseminação a curtas distâncias ocorre principalmente pela ação de respingos de chuvas, sobretudo quando associados com ventos, e a disseminação a longas distâncias dá-se pelo transporte de material vegetal infectado (DANÓS et al., 1984; GOTTWALD et al., 1988).

A penetração de bactérias fitopatogênicas em seus hospedeiros ocorre, geralmente, por aberturas naturais, como estômatos, e ferimentos (CROSSE et al., 1972; DAFT & LEBEN, 1972; GOTO, 1990). Nesse sentido, as injúrias provocadas pela larva minadora (*Phyllocnistis citrella*) facilitam, enormemente, a entrada de Xac no hospedeiro. Além disso, depois de estabelecido o processo de infecção, os sintomas induzidos coalescem e formam largas áreas necróticas (JESUS JUNIOR et al., 2006). Considerando esses aspectos, o presente trabalho teve por objetivos quantificar a influência da concentração de inóculo e do método de inoculação sobre o desenvolvimento de Xac, em condições controladas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de limão Cravo [*Citrus limonia* (L.) Osbeck] com, 20 a 25 cm de altura, cultivadas em tubetes plásticos de 20 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro, contendo substrato de vermiculita e composto vegetal (1:1) foram podadas a 1/3 do ápice e mantidas em casa de vegetação por, aproximadamente, 15 dias para obtenção de folhas uniformes e imaturas (75% do crescimento total) para inoculação (GOTTWALD & GRAHAM, 1992).

No delineamento experimental inteiramente casualizado, avaliaram-se nove tratamentos, constituídos pela combinação das concentrações de inóculo 10^6 , 10^7 e 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por milili-

tro de suspensão bacteriana (UFC.mL^{-1}) e três métodos de inoculação de Xac (isolado IBSBF 1421): a) molhamento das folhas, nas faces abaxial e adaxial, com algodão embebido na suspensão bacteriana; b) ferimento das folhas com agulhas e, imediatamente após, o contato da face abaxial das folhas feridas com algodão embebido na suspensão bacteriana; e c) aspersão das folhas com a suspensão bacteriana até o ponto de escorrimento. Em cada planta de cada tratamento inocularam-se quatro a seis folhas, independentemente da concentração ou do método de inoculação. Utilizaram-se 10 plantas por tratamento. Os três métodos de inoculação serão referidos como “algodão”, “ferimento” e “aspersão” respectivamente. Para efetuar a inoculação por meio de ferimento mecânico, empregaram-se seis agulhas histológicas, equidistantes entre si e fixadas em base de borracha. O experimento foi repetido duas vezes.

As plantas inoculadas, após permanecerem em câmara úmida por 96 horas foram mantidas em caixas de poliestireno (comprimento x largura x altura = $60 \times 40 \times 50$ cm) em condições de laboratório com temperatura a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $90 \pm 10\%$ de umidade relativa e 14 horas de fotofase. Após retirada da câmara úmida, avaliaram-se as plantas, diariamente, quanto à presença de sintomas de cancro cítrico para determinação do tempo de incubação e incidência de plantas doentes. O período médio de incubação foi considerado como o número de dias após inoculação para o aparecimento de, ao menos, uma lesão de cancro cítrico, visível a olho nu, em, pelo menos, 50% das plantas inoculadas de cada tratamento. A partir dos dados de incidência de plantas doentes, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença por integração trapezoidal da incidência no tempo, considerando todo o período avaliado, da seguinte forma:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{X_i + X_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

sendo X a incidência da doença (porcentagem de plantas doentes); n , o número de avaliações, e $(t_{i+1} - t_i)$, o intervalo de tempo (dias) entre duas avaliações consecutivas (CAMPBELL & MADDEN, 1990). Nos cálculos,

consideraram-se os dados de incidência coletados até o décimo dia após a inoculação. Na mesma data, coletaram-se 10 folhas sintomáticas de cada tratamento, aleatoriamente, para avaliação da severidade da doença. Cada folha foi digitalizada em *scanner* e, a severidade, determinada pelo programa Quant (VALE et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observaram-se os primeiros sintomas de cancro cítrico a partir do quarto dia da inoculação. Os tratamentos que consistiram na inoculação por ferimentos, nas três concentrações de inóculo, assim como na inoculação de 10^8 UFC.mL⁻¹ por aspersão, resultaram em incidências máximas de plantas doentes (Figura 1). Incidências superiores a 90% também foram observadas com a inoculação de 10^7 UFC.mL⁻¹ por aspersão e 10^8 UFC.mL⁻¹ com algodão. As menores incidências observadas, entre 40 e 65%, ocorreram para as inoculações de 10^6 UFC.mL⁻¹ com algodão e aspersão e 10^7 UFC.mL⁻¹ com algodão. Em dois dos três experimentos, menos que 50% das plantas inoculadas com 10^6 UFC.mL⁻¹ por algodão apresentaram sintomas, até o décimo dia após a inoculação. O mesmo se observou para as plantas inoculadas com 10^6 UFC.mL⁻¹ por aspersão, em um dos experimentos. Os valores da AUDPC foram máximos nas concentrações de 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹ quando inoculadas por ferimento (Figura 2). Verificaram-se os menores valores nos tratamentos correspondentes à inoculação com 10^6 UFC.mL⁻¹ com algodão ou aspersão e 10^7 UFC.mL⁻¹ com algodão.

O aumento da concentração de inóculo resultou no decréscimo do período de incubação, independentemente do método de inoculação (Tabela 1). As plantas inoculadas por ferimento apresentaram sintomas entre 4,7 e 6 dias após a inoculação, enquanto as plantas inoculadas por aspersão ou algodão, somente a partir do sexto dia. As plantas inoculadas com 10^6 UFC.mL⁻¹ por algodão apresentaram-se sintomáticas a partir do oitavo dia, enquanto aquelas inoculadas com 10^6 UFC.mL⁻¹ por aspersão apresentaram-se sintomáticas após 8,5 dias. Como os experimentos foram avaliados até os 10 dias da inoculação, não foi possível determinar o número de dias para o aparecimento dos sintomas nesses dois tratamentos. Por essa razão, na Tabela 1, os dados referentes ao período de incubação aparecem como >8 e >8,5

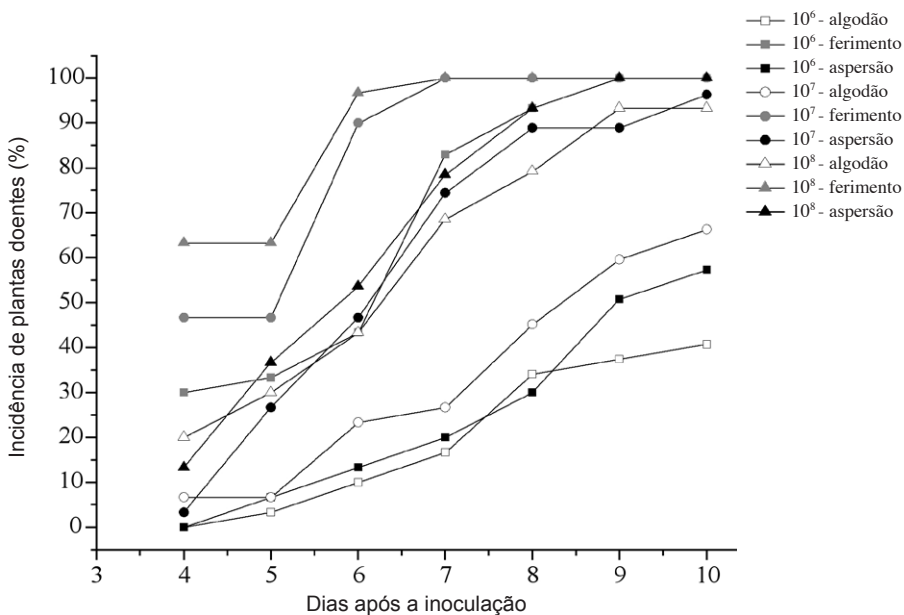


Figura 1. Incidência de plantas de limão Cravo com cancro cítrico quando inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. citri nas concentrações de 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC. mL^{-1} através dos métodos de inoculação via algodão, fermento e aspersão.

Tabela 1. Período de incubação de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri em plantas de limão Cravo inoculadas com três concentrações de inóculo (10^6 , 10^7 e 10^8 UFC. mL^{-1}) e três métodos de inoculação (algodão, fermento e aspersão), combinados entre si.

Método de inoculação	Concentração de inóculo (UFC. mL^{-1})			Média
	10^6	10^7	10^8	
Algodão	>8,0	8,3	6,0	>7,4
Ferimento	6,0	5,3	4,7	5,3
Aspersão	>8,5	6,7	6,0	>7,1
Média	>7,5	6,8	5,6	-

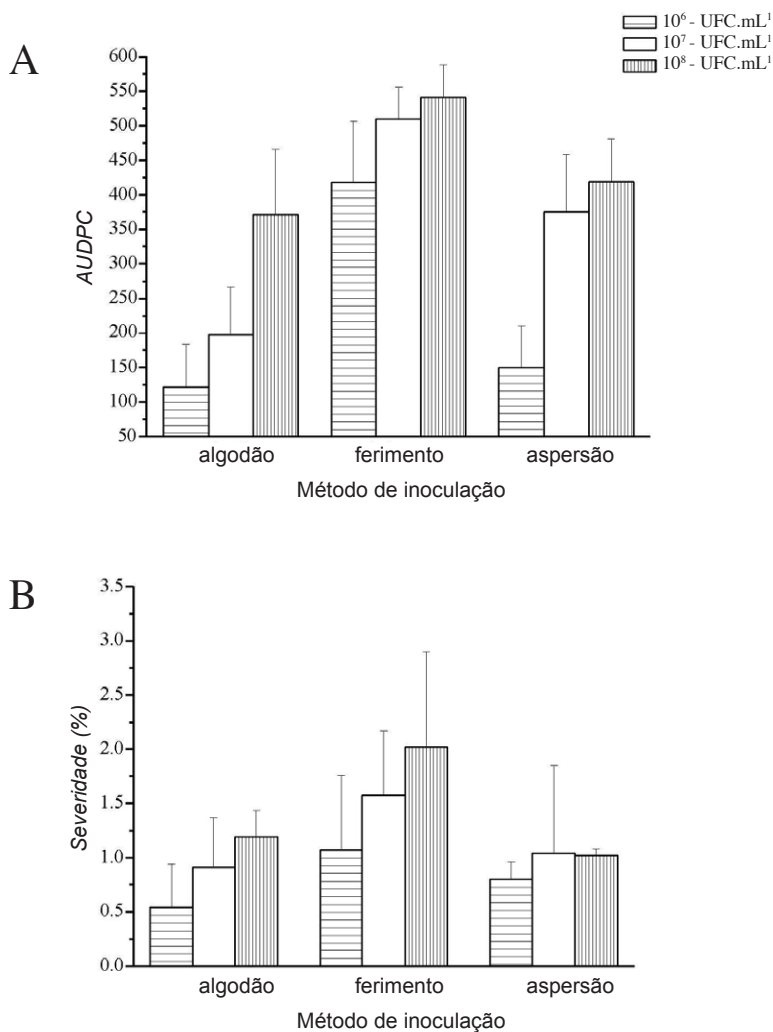


Figura 2. Respostas das plantas de limão Cravo quando inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv citri nas concentrações de 10⁶, 10⁷ e 10⁸ UFC.mL⁻¹ através dos métodos de inoculação via algodão, ferimento e aspersão. **A:** Área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC), calculada com base nos valores de incidência de plantas com cancro cítrico. **B:** Severidade da doença (porcentagem) em folhas após inoculação.

dias respectivamente. Como exemplo, o valor de 8,5 dias refere-se, de fato, à média de oito e nove dias observada em dois dos três experimentos conduzidos na avaliação de 10^6 UFC.mL⁻¹ por aspersão. O terceiro experimento não atingiu o período de incubação, sendo desconsiderado no cálculo. As severidades médias variaram de 0,54 a 2,02% e foram máximas nas plantas inoculadas com 10^8 UFC.mL⁻¹ por ferimento (Figura 2). As inoculações com algodão ou aspersão apresentaram-se semelhantes quanto às severidades do cancro cítrico e ocorreu um aumento gradativo da severidade com o aumento da concentração de inóculo, principalmente para as inoculações com algodão e por ferimento.

A inoculação por ferimento nas concentrações 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹ induziram os sintomas mais rapidamente (entre 4 e 7 dias), observando-se as máximas incidências logo aos sete dias após a inoculação, o que se refletiu na *AUDPC*, e os tecidos inoculados apresentaram as maiores proporções da doença. As inoculações por aspersão com 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹, 10^6 UFC.mL⁻¹ por ferimento e 10^8 UFC.mL⁻¹ com algodão resultaram em valores intermediários, como se pode ver na Figura 1. Nesses tratamentos, as plantas apresentaram-se sintomáticas entre 4 e 8 dias e as severidades variaram de 1,02 a 1,19%. Por último, de modo comparativo, as inoculações por algodão com 10^6 e 10^7 UFC.mL⁻¹ e por aspersão com 10^6 UFC.mL⁻¹ promoveram os menores valores de *AUDPCs* e severidades, incidências máximas entre 40 e 60% e a indução dos sintomas somente a partir do sexto dia.

Geralmente, a concentração mínima de inóculo bacteriano para indução de sintomas em plantas com ferimentos é de 10^2 a 10^3 UFC.mL⁻¹, sendo requeridas concentrações 100 a 1.000 vezes maiores para infecção após penetração da bactéria por aberturas naturais (GOTO, 1990). Já infecções que envolvem a penetração por estômatos ocorrem quando há água livre sobre as folhas. Nos experimentos aqui apresentados, as concentrações de inóculo de 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹ foram semelhantes entre si e resultaram em infecções mais rápidas e severas que a concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. Da mesma forma, a inoculação com 10^6 UFC.mL⁻¹ de *Xac* com auxílio de ferimentos mecânicos revelou-se semelhante àquela por aspersão com 10^8 UFC.mL⁻¹, enquanto a inoculação apenas com algodão embebido na suspensão bacteriana resultou em menor incidência de plantas doentes, *AUDPC* e severidade. A concentração de células bacterianas pode alterar o período de incubação e

a expressão mais rápida dos sintomas é induzida por maiores concentrações de inóculo (BEATTIE & LINDOW, 1995). Apesar de as inoculações por algodão e aspersão não envolverem ferimentos dos tecidos, esses dois métodos diferem na quantidade de suspensão bacteriana que é colocada em contato com o hospedeiro. No método de inoculação por aspersão, as folhas foram molhadas até o ponto de escorrimento, permitindo que maior número de células bacterianas fosse depositado sobre a superfície do hospedeiro. Outro fator que pode estar envolvido é a possibilidade de células bacterianas terem sido colocadas diretamente no interior dos tecidos, pelos estômatos, em função da aspersão direta da suspensão bacteriana sobre as folhas.

Em avaliações de patogenicidade de Xac (testes diagnósticos, por exemplo) ou qualquer outro procedimento que tenha como objetivo a rápida obtenção de sintomas de cancro cítrico, sugere-se a inoculação do hospedeiro por ferimentos, independentemente da concentração de inóculo utilizada (10^6 a 10^8 UFC.mL⁻¹). Como demonstrado experimentalmente, na presença de ferimentos, a expressão dos sintomas de cancro cítrico em tecidos de diferentes idades é mais rápida e uniforme, em comparação com a inoculação em tecidos intactos (VERNIÈRE et al., 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.145-172, 1995.
- CAMPBELL, C.L. & MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532p.
- CROSSE, J.E.; GORDIAN, R.N. & SHAFFER, W.H. Leaf damage as a predisposing factor in the infection of apple shoots by *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, v.62, p.176-182, 1972.
- DAFT, G.C. & LEBEN, C. Bacterial blight of soybeans: epidemiology of blight outbreaks. **Phytopathology**, v.62, p.57-62, 1972.
- DANÓS, E.; BERGER, R.D. & STALL, R.E. Temporal and spatial spread of citrus canker within groves. **Phytopathology**, v.74, p.904-908, 1984.
- GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1990. 342p.

- GOTTWALD, T.R. & GRAHAM, J.H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology**, v.82, p.930-935, 1992.
- GOTTWALD, T.R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J.H.; SUN, X. & RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, v.91, p.30-34, 2001.
- GOTTWALD, T.R.; MCGUIRE, R.G. & GARRAN, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situations in Argentina. **Phytopathology**, v.78, p.739-745, 1988.
- JESUS JUNIOR, W.C.; BELASQUE JÚNIOR, J.; AMORIM, L.; CHRISTIANO R.S.C.; PARRA, J.R.P. & BERGAMIN FILHO, A. Injuries caused by citrus leaf-miner (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. citri) infection. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.277-283, 2006.
- SCHOULTIES, C.L.; CIVEROLO, E.L.; MILLER, J.W.; STALL, R.E.; KRASS, C.J.; POE, S.R. & DUCHARME, E.P. Citrus canker in Florida. **Plant Disease**, v.71, p.388-395, 1987.
- STALL, R.E. & SEYMOUR, C.P. Canker, a threat to citrus in the gulf-coast states. **Plant Disease**, v.67, p.581-585, 1983.
- VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. & ZAMBOLIM, L. Quant - a software to quantify plant disease severity. In: International Workshop on Plant Disease Epidemiology, 8, 2001. Ouro Preto. **Proceedings...** Ouro Preto, 2001. p.160.
- VERNIÈRE, C.J.; GOTTWALD, T.R.; PRUVOST, O. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in various citrus plant tissues. **Phytopathology**, v.93, p.832-843, 2003.