

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

DANIELLE SAYURI YOSHIDA NANAMI

**Avaliação da resistência de variedades de laranja doce (*Citrus
sinensis*) à *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

**Maringá
2017**

DANIELLE SAYURI YOSHIDA NANAMI

Avaliação da resistência de variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Área de concentração: Proteção de Plantas

Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes

**Maringá
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

N175a Nanami, Danielle Sayuri Yoshida
Avaliação da resistência de variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Danielle Sayuri Yoshida Nanami. -- Maringá, 2017.
xvi, 116 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.

1. Laranja Pêra - Resistência varietal. 2. Laranja Pêra - Cancro cítrico (*Xanthomonas*). 3. Cancro cítrico - Resistência varietal. 4. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV). I. Nunes, William Mário de Carvalho, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed. 634.304932

AMMA-003475



ATA DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DA PÓS-GRADUANDA DANIELLE SAYURI YOSHIDA NANAMI. Aos vinte e quatro dias do mês de novembro de dois mil e dezessete, às quatorze horas, na sala 102-A do Bloco J-45 do Campus Universitário, reuniu-se a Banca Examinadora da Tese em epígrafe, composta pelos Professores Doutores William Mário de Carvalho Nunes, Dauri José Tessmann, Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski, João Batista Vida e Rúbia de Oliveira Molina, sob a presidência do primeiro. A sessão pública foi aberta pelo professor presidente, que prestou esclarecimentos sobre o transcórpor da defesa de Tese. A seguir, o senhor presidente passou a palavra à candidata para que fizesse uma exposição de seu trabalho, intitulado “**Avaliação da resistência de variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*”**”. Terminada a exposição, houve um pequeno intervalo, sendo posteriormente a candidata arguida pelos membros da Banca Examinadora. Após as arguições, a Banca Examinadora procedeu ao julgamento, sendo que, ao final, a pós-graduanda **Danielle Sayuri Yoshida Nanami**, candidata ao Título de **Doutor em Agronomia**, na Área de Concentração **Proteção de Plantas**, foi considerada **aprovada**. Para a conclusão do curso e obtenção do título de Doutor, a pós-graduanda deverá atender às demais exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia. Este resultado deverá ser homologado pelo Conselho Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente cumprimentou a candidata, seguido pelos demais presentes, e encerrou os trabalhos. Para constar, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora, após lida e achada conforme. Maringá, aos vinte e quatro dias do mês de novembro de dois mil e dezessete.

Prof. Dr. **William Mário de Carvalho Nunes**
Presidente

Prof. Dr. **Dauri José Tessmann**
Membro

Prof^a. Dr^a. **Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski**
Membro

Prof. Dr. **João Batista Vida**
Membro

Prof^a. Dr^a. **Rúbia de Oliveira Molina**
Membro

A meus pais, Sergio Seigi
Nanami e Alice Akemi Yoshida
Nanami, pelo incentivo e apoio em
todos os momentos.

Ao Leonardo Monteiro
Silva, pela paciência e
compreensão.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida.

À Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade concedida à realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e taxa de bancada durante o curso.

Ao Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes, pela dedicação na orientação, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), da Universidade Estadual de Maringá, pela disponibilidade dos laboratórios para execução dos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (PGA) pela oportunidade de inclusão no curso e aos professores pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários Érika Cristina Sato e Reinaldo Bernardo, pelos inúmeros serviços prestados e pela atenção dispensada.

Ao Viveiro de Mudanças Pratinha (VMP) e Agro Pratinha pela disponibilidade e fornecimento de materiais.

Aos Srs. José Gilberto Pratinha, Antônio Pratinha (in memoriam), Waldemar Zanini Junior e Ismael Lopes, da Agro Pratinha pelo auxílio, ensinamentos e incentivo.

Aos professores Osvaldo Ferrarese Filho e Rogério Marchiosi, do Laboratório de Bioquímica de Plantas (BIOPLAN/UEM), por permitir a utilização do Espectrofotômetro, e à Karla Gabriela da Silva pelo auxílio nas análises enzimáticas.

À Central de Microscopia (CMI) do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP/UEM) por permitir a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao Professor Celso Vataru Nakamura e às pós-graduandas Danielle, Rose, Greice e Andressa pelo auxílio nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos amigos Carlos Alexandre Zanutto e José Alcides Remolli, pelo auxílio nos trabalhos laboratoriais e à campo, pela dedicação e companheirismo.

Aos amigos Angélica Albuquerque Tomilhero Frias, Julio Cesar Ferreira Elias, Sandra Aparecida de Lima Castro, pela amizade, companheirismo, conselhos e estímulo ao longo da realização deste trabalho.

Aos amigos, Daniele Mie Tsuzuki, Guilherme Hitoshi Kaneko e Alice Hatsue Massuke pela amizade em todos os momentos.

Aos colegas do NBA, Paula Thais (in memorian), Diego, Bruna, Juliana, Hudson, Camila, Ana, Andressa, Nayara e tantos outros que colaboraram com o trabalho, pela amizade e agradável convivência.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Avaliação da resistência de variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*) à
Xanthomonas citri subsp. *citri*

RESUMO

O cancro cítrico, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é responsável por perdas econômicas significativas, uma vez que está presente em todas as regiões de cultivo e atinge a maioria das variedades comerciais de laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck). Sendo assim, a utilização de variedades resistentes ao cancro cítrico consiste em uma alternativa viável e econômica para o manejo e controle do patógeno. Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram: comparar a resistência de 14 genótipos de citros ao cancro cítrico, em condições de casa de vegetação; verificar as respostas bioquímicas de resistência dos genótipos à *X. citri* subsp. *citri* ao longo do tempo, através de análises enzimáticas de peroxidase, catalase e superóxido dismutase; detectar diferenças morfológicas entre as variedades de laranja doce (*C. sinensis* L.) e; observar o desenvolvimento das lesões ao longo do tempo através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os 14 genótipos utilizados foram Hamlin, Vermelha, Pêra EEL, Pêra IAC, Pêra Bianchi/CC, Pêra Ipiгуá, Pêra IAC 2000/1, Pêra Ovale Siracusa, Pêra Ovale, Pêra IAC 2000/2, Pêra M5, Pêra Araпongas, Pêra 58 e Pêra 59. Estas variedades foram avaliadas em condição de casa de vegetação, através da inoculação com *X. citri* subsp. *citri*, estirpe Xcc 306. Após as inoculações, foram realizadas as medições dos diâmetros das lesões, e análises bioquímicas e de MEV. Foram observadas diferenças significativas na resistência à *X. citri* subsp. *citri* entre as variedades estudadas, de forma que as variedades Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL apresentaram os menores diâmetros médios de lesão. A variedade Pêra IAC se destacou nos experimentos enzimáticos, uma vez que apresentou elevação dos teores de peroxidase, catalase e superóxido dismutase simultaneamente. Ao analisar as imagens de MEV, observou-se que a variedade Pêra Bianchi/CC apresentou os menores valores de densidade estomática, tamanho de estômatos e área total de abertura estomática.

Palavras-chave: Laranja Pêra. Resistência varietal. Cancro cítrico.

Resistance evaluation of sweet orange (*Citrus sinensis*) varieties to
Xanthomonas citri subsp. *citri*

ABSTRACT

Citrus canker disease, caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, is responsible for significant economic losses, since it is present in all regions of commercial production of sweet orange (*C. sinensis* L. Osbeck). Therefore, the use of varieties resistant to citrus canker is a viable and economical alternative for management and pathogen control. Given the above, the objectives of this study were: to compare the resistance to citrus canker of 14 genotypes of citrus; to verify the biochemical resistance responses of citrus genotypes to *X. citri* subsp. *citri* over time, through enzymatic analyzes of peroxidase, catalase, and superoxide dismutase; to detect morphological differences between the varieties of sweet orange (*C. sinensis* L.) and observe the development of lesions over time through Scanning Electron Microscopy (SEM). The 14 genotypes utilized were Hamlin, Vermelha, Pera EEL, Pera IAC, Pera Bianchi/CC, Pera Ipiгуá, Pera IAC 2000/1, Pera Ovale Siracusa, Pera Ovale, Pera IAC 2000/2, Pera M5, Pera Arapongas, Pera 58 and Pera 59. These varieties were evaluated under greenhouse conditions, through inoculation with *X. citri* subsp. *citri*, strain Xcc 306. After the inoculations, measurements of the lesion diameters, biochemical and SEM analyzes were performed. Significant differences in resistance to *X. citri* subsp. *citri* between were observed, Pera IAC, Pera IAC 2000/2 and Pera EEL presented the smallest mean diameters of lesion. Pera IAC variety stood out in the enzymatic experiments, since presented elevation of the levels of peroxidase, catalase and superoxide dismutase simultaneously. Analyzing SEM images, it was observed that the variety Pêra Bianchi / CC presented the lowest values of stomatal density, stomatal size and total stomatal opening area.

Keywords: Pera Orange. Resistance. Citrus canker.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE VARIEDADES DE CITROS À

Xanthomonas citri subsp. *citri*

Tabela 1.	Genótipos de <i>Citrus</i> utilizados no experimento de casa de vegetação.	41
Tabela 2.	Análise de variância do diâmetro da lesão (fevereiro de 2016).....	46
Tabela 3.	Análise de variância do diâmetro da lesão (setembro de 2016).	46
Tabela 4.	Genótipos de citros inoculados com <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> , avaliados em fevereiro de 2016 (diâmetros médios de lesão, em mm)	47
Tabela 5.	Genótipos de citros inoculados com <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> , avaliados em setembro de 2016 (diâmetros médios de lesão, em mm)	48

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE GENÓTIPOS DE CITROS

À *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Tabela 1.	Genótipos de <i>Citrus</i> utilizados no experimento..	62
-----------	---	----

CAPÍTULO III

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA EPIDERME DE GENÓTIPOS CITROS À

Xanthomonas citri subsp. *citri* ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Tabela 1.	Genótipos de <i>Citrus</i> utilizados no experimento de Microscopia Eletrônica de Varredura.	85
-----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inoculada em folha de laranja doce (*Citrus sinensis*), observada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Quanta 250, com aproximação de 56580x. 11
- Figura 2. Sintomas do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) em laranja doce (*Citrus sinensis*) A. Folha face adaxial B. Folha face abaxial C. Fruto D. Ramo..... 14
- Figura 3. Inter conversão de espécies reativas (EROs) derivadas de O₂. (VRANOVÁ; INZÉ; BREUSEGEM, 2002). 19

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE VARIEDADES DE CITROS À *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

- Figura 1. Evolução dos diâmetros de lesão, em milímetros, nos genótipos de citros aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação (DAI) com *X. citri* subsp. *citri* no primeiro período de avaliação (fevereiro de 2016). Barras indicam a média \pm desvio padrão... 45
- Figura 2. Evolução dos diâmetros de lesão, em milímetros, nos genótipos de citros aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação (DAI) com *X. citri* subsp. *citri* no segundo período de avaliação (setembro de 2016). Barras indicam a média \pm desvio padrão... 45
- Figura 3. Diâmetros médios de lesões (mm) causados por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* nos diferentes genótipos de citros, em fevereiro de 2016. a) 4 DAI (dias após a inoculação), b) 12 DAI, c) 16 DAI. As letras indicam o agrupamento das médias pelo teste de Scott-Knott a 5%..... 50
- Figura 4. Diâmetros médios de lesões (mm) causados por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* nos diferentes genótipos de citros, em setembro de 2016. a) 4 DAI (dias após a inoculação), b) 12 DAI, c) 16 DAI. As letras indicam o agrupamento das médias pelo teste de Scott-Knott a 5%..... 51

CAPÍTULO II

AValiação DAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE GENÓTIPOS DE CITROS À *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

- Figura 1. Atividade da peroxidase em genótipos de citros inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em diferentes tempos após a inoculação (H: horas após a inoculação, DSI: Dias sem inocular, DAI: Dias após inocular). ** Nível de significância a 5%. Barras indicam a média \pm desvio padrão. 67
- Figura 2. Atividade da peroxidase nos 14 genótipos de citros. a) 0 H – 0 hora, b) 24 H – 24 horas após a inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. c) 16 DSI- coleta de folhas não inoculadas em plantas inoculadas, 16 dias após a inoculação, d) 16 DAI – 16 dias após inocular. As letras *a*, *b*, *c* e *d* indicam o agrupamento das médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. 68
- Figura 3. Atividade da catalase em genótipos de citros inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em diferentes tempos de coleta (H: horas após a inoculação, DSI: Dias sem inocular, DAI: Dias após inocular). *Nível de significância a 10%. **Nível de significância a 5%. Barras indicam a média \pm desvio padrão. 70
- Figura 4. Atividade da catalase nos 14 genótipos de citros. a) 0 H – 0 hora, b) 24 H – 24 horas após a inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. c) 16 DSI- coleta de folhas não inoculadas em plantas inoculadas, 16 dias após a inoculação, d) 16 DAI – 16 dias após inocular. As letras *a* e *b* indicam o agrupamento das médias pelo teste de Scott-Knott a 10% de significância na “figura a)” e 5% de significância, nas demais imagens. 72
- Figura 5. Atividade da superóxido dismutase em genótipos de citros inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em diferentes tempos de coleta (H: horas após a inoculação, DSI: Dias sem inocular, DAI: Dias após inocular). ** Nível de significância a 5%. Barras indicam a média \pm desvio padrão. 73
- Figura 6. Atividade da superóxido dismutase nos 14 genótipos de citros. a) 0 H – 0 hora, b) 24 H – 24 horas após a inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. c) 16 DSI- coleta de folhas não inoculadas em plantas inoculadas, 16 dias após a inoculação, d) 16 DAI – 16 dias após inocular. As letras *a*, *b*, *c*, *d* e *e* indicam o agrupamento das médias pelo teste de Scott-Knott a 5% 74

CAPÍTULO III

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA EPIDERME DE GENÓTIPOS CITROS À
Xanthomonas citri subsp. *citri* ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA

- Figura 1. A. Comparação das médias da densidade estomática de 14 variedades de *Citrus*, em uma área foliar de 155000 μm^2 . Médias seguidas das mesmas letras não diferiram entre si pelo teste de Scott- Knott a 5%. 88
- Figura 2. Comparação dos tamanhos médios da área de abertura estomática de 14 variedades de *Citrus*. Médias seguidas das mesmas letras não diferiram entre si pelo teste de Scott- Knott a 5. . 89
- Figura 3. Comparação da superfície abaxial foliar da variedade suscetível de laranja doce (*Citrus sinensis*) Hamlin (A) e variedade resistente de tangerina (*C. reticulata*) Vermelha (B). Imagens feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, com magnificação de 7000x..... 90
- Figura 4. Comparação da superfície abaxial foliar das 14 variedades de citros, no tempo 0 hora, com magnificação de 1000x em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250. A. Hamlin. B. Vermelha. C. Pêra EEL. D. Pêra Bianchi/CC. E. Pêra IAC. F. Pêra Ipiгуá. G. Pêra IAC 2000/1. H. Pêra Ovale Siracusa. I. Pêra Ovale. J. Pêra IAC 2000/2. K. Pêra M5. L. Pêra Arapongas. M. Pêra 58. N. Pêra 59. 92
- Figura 5. Médias da área estomática total de 14 variedades de *Citrus*, em uma área foliar de 155000 μm^2 . Médias seguidas das mesmas letras não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%. 94
- Figura 6. Imagens feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250. A. Variedade suscetível Hamlin, inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, 4 dias após a inoculação (DAI), com magnificação de 2000x. B. Imagem de dentro do ponto de inoculação com *X. citri* subsp. *citri*, na variedade suscetível Hamlin, 4 DAI, com magnificação de 10000x..... 95
- Figura 7. . Imagens feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250. A. Variedade suscetível Hamlin, 8 dias após a inoculação (DAI), com magnificação de 10000x. B. Variedade resistente Vermelha, 8 dias após a inoculação (DAI), com magnificação de 10000x. As setas indicam a formação das vilosidades. 96
- Figura 8. Imagem de folha de laranja doce (*Citrus sinensis*), variedade Hamlin, inoculada com *Xanthomonas citri*. subsp. *citri*, aos 8 dias após a inoculação. As setas indicam a formação

- do biofilme bacteriano. Imagem obtida em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250. 97
- Figura 9. Desenvolvimento do cancro. Imagens em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, das superfícies foliares de laranja doce (*Citrus sinensis*) inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A. 4 DAI (Dias após a inoculação), magnificação de 2000x. B. 8 DAI, magnificação de 200x. C. 12 DAI, magnificação de 200x. D. 16 DAI, magnificação de 500x. E e F. Lesão de cancro cítrico, com magnificação de 10000x. 98
- Figura 10. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Hamlin obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Hamlin, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Hamlin inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 99
- Figura 11. . Imagens da variedade de tangerina (*Citrus reticulata*), Vermelha obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Vermelha, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Vermelha inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 100
- Figura 12. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra EEL obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra EEL, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra EEL inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 101
- Figura 13. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Bianchi/CC obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Bianchi/CC, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Bianchi/CC inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 102
- Figura 14. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra IAC obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A.

Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra IAC, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra IAC inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 103

Figura 15. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Ipiguá obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Ipiguá, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Ipiguá inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 104

Figura 16. . Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra IAC 2000/1 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra IAC 2000/1, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra IAC 2000/1 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 105

Figura 17. . Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Ovale Siracusa obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Ovale Siracusa, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Ovale Siracusa inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 106

Figura 18. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Ovale obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Ovale, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Ovale inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 107

Figura 19. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra IAC 2000/2 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra IAC 2000/2,

magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra IAC 2000/2 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente..... 108

Figura 20. . Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra M5 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra M5, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra M5 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 109

Figura 21. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Arapongas obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Arapongas, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Arapongas inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente..... 110

Figura 22. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra 58 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra 58, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra 58 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 111

Figura 23. . Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra 59 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra 59, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra 59 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente. 112

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Origem e distribuição dos citros	3
2. A citricultura	5
2.1 A citricultura mundial	5
2.2 A citricultura brasileira	6
2.3 A citricultura paranaense.....	8
3. O Cancro cítrico	9
3.1. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	11
3.2. Ciclo da doença	12
3.3. Epidemiologia	12
3.4. Sintomas	13
3.5. Controle.....	14
3.6. Resistência ao Cancro cítrico	15
4. Mecanismos de defesa das plantas	17
4.1. Mecanismos de defesa pré-formados	17
4.2. Mecanismos de defesa pós-formados.....	18
4.2.1. Espécies reativas de oxigênio	18
4.2.2. Resposta de hipersensibilidade.....	20
4.2.3. Enzimas relacionadas à defesa de plantas	21
4.2.4. Peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7)	21
4.2.5. Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)	22
4.2.6. Superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)	22
4.2.7. Mecanismos moleculares da Interação planta-patógeno	23
JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO	25
REFERÊNCIAS	26

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE VARIEDADES DE CITROS À

Xanthomonas citri subsp. *citri*

INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
1. Material vegetal.....	41
2. Implantação do experimento	42
3. Cultura bacteriana e preparo do inóculo	42
4. Inoculação e avaliação dos sintomas	42
5. Análise dos dados.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	54

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE GENÓTIPOS DE CITROS

À *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	61
1. Implantação do experimento	61
2. Material vegetal.....	61
3. Cultura bacteriana e preparo do inóculo	62
4. Inoculação e coleta para análises bioquímicas.....	63
5. Extração enzimática	63
6. Proteínas totais	63
7. Determinação da Peroxidase de Guaiacol (EC 1.11.1.7).....	64
8. Determinação da Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6).....	64
9. Determinação da Superóxido Dismutase (SOD) (EC 1.11.1.7).....	65
10. Análises estatísticas	65

RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
1. Atividade de Peroxidase.....	66
2. Atividade da Catalase.....	69
3. Atividade da Superóxido Dismutase.....	72
4. Enzimas relacionadas à defesa	75
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78

CAPÍTULO III

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA EPIDERME DE GENÓTIPOS CITROS À *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

INTRODUÇÃO.....	84
MATERIAL E MÉTODOS.....	85
1. Material vegetal.....	85
2. Implantação do experimento	85
3. Cultura bacteriana, preparo do inóculo e inoculação	86
4. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	86
5. Análise das imagens	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS	114
CONSIDERAÇÕES FINAIS	116

INTRODUÇÃO GERAL

Os citros abrangem um grande grupo de plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins, como *Fortunella* e *Poncirus*. As espécies mais cultivadas são as cidras (*Citrus medica* L.), pomelos [*C. maxima* (Burm.) Merr.], tangerinas (*C. reticulata* Blanco), laranjas doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck], laranjas azedas (*C. aurantium* L.), toranjas (*C. paradisi* Macf.), limões [*C. limon* (L.) Brum f.] e limas [*C. aurantiifolia* (Christm.) Singre] (HAZARIKA et al., 2014; HYNNIEWTA et al., 2014).

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de laranjas e de suco concentrado congelado. Com aproximadamente 19 milhões de toneladas de laranjas produzidas e de 1,1 milhão de toneladas de suco concentrado congelado exportado, a cadeia produtiva dos citros apresenta-se como importante atividade na economia do país (USDA, 2017).

Embora a citricultura gere divisas consideráveis para o Brasil, esta atividade vem sendo prejudicada por vários fatores, entre eles a incidência de doenças, como o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Esta doença está presente em todas as regiões de cultivo e atinge a maioria das variedades comerciais de laranja doce, sendo responsável por perdas econômicas significativas (GONÇALVES-ZULIANI, 2016).

Os sintomas da doença são observados em toda a parte aérea da planta. As lesões nas folhas apresentam-se na forma de lesões profundas, em ambas as faces, geralmente circundadas por um halo amarelo. Nos frutos, as lesões são similares às das folhas e, em situações com ataques severos do patógeno, os frutos podem cair antes de atingir a maturidade, ou caso se mantenham na planta até a maturação, a sua comercialização *in natura* e o seu processamento industrial são prejudicados. Nos ramos, os sintomas são visualizados quando a doença se encontra em estágio avançado (LARANJEIRA et al., 2005).

A identificação e utilização de resistência genética dos hospedeiros pode ser considerada a estratégia mais eficaz e econômica para o controle de doenças, porém, ainda não foram identificadas variedades com níveis elevados de resistência ao cancro cítrico. A suscetibilidade das espécies de citros à *X. citri* subsp. *citri* é amplamente variável e estudos sugerem a existência de diferentes níveis de suscetibilidade à doença (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; PITINO; ARMSTRONG; DUAN, 2015). As toranjas são consideradas altamente suscetíveis, enquanto as tangerinas são consideradas moderadamente resistentes. Outras espécies, como laranjas doce e laranjas azedas apresentam um nível de suscetibilidade moderado (GOTTWALD; GRAHAM; SHUBERT, 2002).

No Brasil, o cultivo de laranja doce (*C. sinensis*) corresponde a aproximadamente 93% de toda a área plantada de citros (FAO, 2015) e no estado do Paraná é predominante o cultivo de laranja doce das variedades Pêra, Folha Murcha, Valência e IAPAR 73. Destas variedades, as laranjas “Pêra” são as que recebem maior destaque, uma vez que apresentam maior aceitação no mercado de frutas *in natura* e suco concentrado congelado (GONÇALVES-ZULIANI et al., 2011; 2016).

Apesar do amplo cultivo desta espécie no país, poucos estudos relacionados à resistência ao cancro cítrico foram realizados. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: 1) Comparar a resistência de genótipos de laranja doce (*C. sinensis* L.), variedade Pêra, em condições de casa de vegetação; 2) Analisar a resistência das variedades de citros à *X. citri* subsp. *citri* por meio de provas bioquímicas; 3) Detectar diferenças morfológicas nas folhas de diferentes variedades de citros e monitorar o desenvolvimento celular de lesões ao longo do tempo, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

REVISÃO DE LITERATURA

1. Origem e distribuição dos citros

As espécies de citros estão entre as plantas frutíferas de maior importância mundial da atualidade (USDA, 2017). Acredita-se que os citros e os grupos proximalmente relacionados, apresentam como centro de origem as regiões sul e sudeste da Ásia, particularmente a área que se estende do norte da Índia, passando pelo Arquipélago Malaio, China e Japão, chegando até a Austrália (SCORA, 1975; MALIK et al., 2013; RAMADUGU et al., 2013).

Pertencente à família Rutaceae e subfamília Aurantioideae, o gênero *Citrus* é composto de aproximadamente 1600 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas de todo o mundo. Apesar de serem amplamente cultivados, os estudos taxonômicos e filogenéticos em *Citrus* acabam sendo dificultados devido à biologia complexa das espécies do gênero e de grupos relacionados, uma vez que apresentam ampla dispersão, frequentes mutações somáticas, produção assexual de sementes e alta compatibilidade entre as espécies cítricas e grupos proximalmente relacionados (GIACOMETTI, 1991; NICOLOSI et al., 2000; PANG; HU; DENG, 2006; AL-MOUEI, CHOUMANE, 2014; CURK et al., 2014).

Inicialmente, na década de 70, os sistemas taxonômicos mais reconhecidos eram os de Swingle e Reece (1967) e Tanaka (1977), os quais baseavam-se em morfologia e dados geográficos. Já nesta época, haviam discordâncias em relação ao número de espécies no gênero *Citrus*. Swingle e Reece (1967) descreveram 16 espécies, enquanto Tanaka (1977) apresentou a existência de 162 espécies.

Posteriormente, através de estudos morfológicos e características bioquímicas, outros pesquisadores descreveram a existência de apenas três espécies verdadeiras dentro do subgrupo *Citrus*: as cidras (*C. medica* L.), tangerinas (*C. reticulata* Blanco) e pomelos (*C. maxima* L. Osbeck) (SCORA, 1975; BARRET; RHODES, 1976). A espécie *C. halimii* foi adicionada em seguida como uma quarta espécie básica (PANG; HU; DENG, 2006). Outros genótipos amplamente cultivados na atualidade, como as laranjas doce (*C. sinensis*), toranjas (*C. paradisi*), limões (*C. limon*) e limas (*C. aurantiifolia*), originaram-se a partir dessas três espécies, das espécies do subgênero *Papeda* ou de outros gêneros relacionados, como *Fortunella* e *Poncirus*. (FEDERICI et al., 1998; BARKLEY et al., 2006, MALIK et al., 2013)

Com o avanço da utilização das técnicas moleculares nos estudos de filogenia, esta última hipótese vem sendo comprovada (GULSEN, ROOSE 2001; ARAÚJO et al., 2003). Apesar de algumas incertezas permanecerem, pesquisas ajudam a comprovar a origem híbrida de muitas espécies, como de laranjas doces, toranjas e limões. (NICOLOSI et al., 2000; PANG; HU; DENG, 2006).

Existem ainda, outros genótipos considerados selvagens ou *landraces* pouco alteradas, como *Citrus maxima* (Burm.) Merr., *C. reticulata* Blanco, *C. halimii* B. C. Stone, *C. cavaleriei* H. Lev. ex Cavalerie e *C. hystrix* DC, que juntamente com *C. medica* L. e algumas espécies já extintas, possivelmente originaram a grande diversidade de cultivares de *Citrus* atualmente conhecidas (HAZARIKA et al., 2014).

De acordo com antigos manuscritos chineses, os primeiros relatos sobre o cultivo de citros datam de aproximadamente 2200 a.C., onde as frutas cítricas, particularmente tangerinas e pomelos eram utilizadas como formas de homenagens, acessíveis apenas para a alta corte imperial chinesa. Já na Europa, um pouco mais tarde, em 350 a.C. registros de Teofrasto apontam os primeiros cultivos de cidras (WEBBER. 1967; LIU; HEYLING; TANUMIHARDJO, 2012; MILIND, DEV, 2012).

Por vários anos, as cidras eram as únicas frutas cítricas conhecidas. No entanto, a dispersão de outras espécies cítricas foi bastante influenciada pelo Império Romano, tanto que, por volta do século II, a laranja azeda e os limões foram levados para a Europa, pelos Romanos, como moeda de troca. Após este período, acredita-se que as casas de vegetação de cultivo de citros acabaram sendo destruídas, gerando um gargalo histórico, sem registros a respeito da cultura (UZUN, YESILOGLU, 2012).

Através das rotas de trocas genovesas, os citros foram reintroduzidos na região por volta de 1400 a 1500 d.C. (WEBBER et al., 1967). A partir dessa época, as espécies cítricas passaram a ser difundidas para todo o mundo através das jornadas de colonização realizadas por portugueses, franceses e espanhóis (MABBERLEY, 2004; LIU; HEYLING; TANUMIHARDJO, 2012).

As primeiras ocorrências de citros nas Américas aconteceram por volta dos séculos XV e XVI. Sendo que na América do Norte, existem registros de pomares na Flórida e Califórnia, no período entre 1655 e 1770, enquanto na América do Sul, mais especificamente, no Brasil, a introdução dos citros ocorreu após 1800 e apenas em 1950, começou a se mencionar a produção de citros de forma comercial (LIU; HEYLING; TANUMIHARDJO. 2012)

2. A CITRICULTURA

2.1. Citricultura mundial

Com uma história de cultivo antiga, as espécies cítricas detêm papel de destaque na economia mundial (LI et al., 2010). Com aroma distinto e sabor agradável, os citros têm sido reconhecidos como um alimento importante na dieta dos seres humanos. Além de possuírem alto valor nutricional, apresentando carboidratos, fibras e vitaminas, estas espécies também conquistaram as indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de madeira (MABBERLEY, 2004; LIU; HEYLING; TANUMIHARDJO, 2012).

Dentre as espécies do gênero *Citrus* mais cultivadas, podemos citar as cidras (*C. medica* L.), pomelos [*C. maxima* (Burm.) Merr.], tangerinas (*C. reticulata* Blanco), laranjas doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck], laranjas azedas (*C. aurantium* L.), toranjas (*C. paradisi* Macf.), limões [*C. limon* (L.) Brum f.] e limas [*C. aurantiifolia* (Christm.) Swingle] (MALIK et al., 2013; XU et al., 2013; HAZARIKA et al., 2014; HYNNIEWTA et al., 2014).

Cultivados principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo todo, os citros estão presentes em mais de 140 países, sendo que as áreas produtivas se concentram nas regiões entre as latitudes 35°N e 35°S, e ultrapassam os 9 milhões de hectares (LIU; HEYLING; TANUMIHARDJO, 2012; FAO, 2015).

A produção anual de citros (laranjas, tangerinas, cidras, pomelos, toranjas, limas e limões) tem aumentando ao longo das décadas, passando de aproximadamente 15 milhões de toneladas em 1960, para cerca de 140 milhões de toneladas em 2014, sendo que os maiores produtores mundiais de citros são a China, Brasil, Índia, Estados Unidos e México (FAO, 2015; USDA 2017).

Considerando apenas a produção de laranjas em 2016/2017, a produção mundial atingiu aproximadamente 50 milhões de toneladas e o Brasil é considerado o maior produtor, com cerca de 19 milhões de toneladas, seguido da China, União Europeia, Estados Unidos e México. Esses mesmos países são também os maiores produtores de suco de laranja concentrado, cuja produção mundial, no mesmo período, totalizou aproximadamente 1,9 milhões de toneladas a 65°Brix (USDA, 2017).

Ao analisar a produção de tangerinas e toranjas, a China encontra-se como maior produtor mundial, com uma produção de 19,3 milhões de toneladas e 4 milhões de toneladas, respectivamente, contribuindo com mais de 50% da produção mundial destas espécies. E ao

considerar a produção de limões e limas, tem-se o México como maior produtor, o qual contribui com 2,4 milhões de toneladas (USDA, 2017).

Por outro lado, os maiores importadores de frutas cítricas *in natura* são os Estados Unidos, a União Europeia, a Rússia, Canadá e China. O suco de laranja concentrado, contudo, apresenta a União Europeia, Estados Unidos, Canadá, Japão e Rússia como maiores importadores, os quais consomem mais de 60% de toda produção mundial (USDA, 2017).

2.2. A citricultura brasileira

A citricultura brasileira teve início no período colonial, com a chegada dos portugueses, por volta de 1540. Transportadas com o objetivo de proteger os navegantes contra o escorbuto, a laranja doce, fonte importante de vitamina C, acabou sendo introduzida primeiramente no estado de São Paulo e na Bahia (SALIBE, 1974). Devido às condições climáticas da região, as espécies cítricas apresentaram adaptação climática satisfatória, e passaram ter lugar de destaque na alimentação da população (COUTO et al., 2010).

Apesar dessa ampla adaptação climática, a citricultura brasileira começou a ser implantada, de fato, a partir de 1920, quando surgiu o primeiro núcleo citrícola, no Rio de Janeiro. Nesta mesma época, iniciaram-se as exportações de frutos para a Argentina, Inglaterra e outros países europeus. Já na década de 1930, a citricultura chegou ao interior de São Paulo, na região do Vale do Paraíba, e com a cafeicultura em baixa, ganhou espaço como uma nova opção de cultivo (NEVES et al., 2011).

Em 1939, a citricultura brasileira atingiu seu auge, quando as exportações de laranja atingiram um recorde de 197 mil toneladas. Porém, com a disseminação da doença denominada Tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e da eclosão da II Guerra Mundial, neste mesmo período, as exportações caíram 77% e só voltaram a aumentar com o término da guerra e o restabelecimento do mercado Europeu (HASSE, 1987).

Nesta época, a Tristeza dos citros passou a ser controlada através da utilização do porta-enxerto Limão Cravo (*C. limonia*), e em 1948 os pomares começaram a se recuperar. Porém, mais tarde, na década de 50, surgiu no Sudoeste do Estado de São Paulo, outra doença, denominada Cancro cítrico, doença quarentenária, causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, que atinge praticamente todas as espécies de citros (RODRIGUES et al., 1991).

Apesar do surgimento de várias doenças, os citricultores passaram a conviver e se adaptar às mais diversas situações, e com o passar dos anos, a citricultura brasileira voltou a expandir e a produção de citros nacional começou a ter melhor atuação no mercado internacional. Alguns fatores contribuíram para que o Brasil se tornasse um dos maiores produtores e exportadores de citros. Como por exemplo, no ano de 1962, uma geada atingiu os pomares de laranja da Flórida - Estados Unidos, dizimando grande parte da área produtiva. Conseqüentemente, no ano seguinte, o Brasil iniciou a exportação de suco de laranja concentrado congelado (RODRIGUES et al., 1991).

O Brasil se consagrou o maior produtor mundial de citros e de suco concentrado de laranja na década de 80. Com mais de 1 milhão de hectares em área plantada, a produção anual é de aproximadamente 20 milhões de toneladas de citros. Atualmente, este setor gera, por ano, mais de 400 mil empregos diretos e indiretos e movimenta mais de 10 bilhões de reais, dos quais um bilhão de dólares corresponde somente às exportações (FAO, 2015; USDA, 2017).

As principais espécies produzidas no Brasil são as laranjas doces, tangerinas e limões. Dentre as laranjas doce, com 37,8%, a mais plantada no país é a Laranja Pêra, seguida de Natal e Valência (DONADIO et al., 2005). Em relação à produção de laranjas, em 2017, o Brasil contribuiu com 19,2 milhões de toneladas, o que corresponde a 38% da produção mundial. Com este montante, o país é considerado o maior produtor de laranjas do mundo (USDA, 2017).

Além disso, analisando os dados de produção e exportação de suco concentrado congelado de laranja, o Brasil produz 1,3 milhões de toneladas, o que corresponde a 64% de toda a produção mundial, consagrando-se o maior produtor do mundo de suco de laranja concentrado congelado, seguido por Estados Unidos, México, União Europeia e China. O Brasil é também o maior exportador de suco, com 90% da produção destinada a países da União Europeia, Estados Unidos, Canadá e Japão (USDA, 2017).

No Brasil, os principais estados produtores são: São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Paraná e Sergipe. São Paulo, é o maior produtor de laranjas do país, responsável por 70% de toda a produção de laranjas do Brasil e o Paraná, colabora com 5% de toda a produção brasileira (IBGE, 2017).

A balança comercial do país, é desta forma, claramente influenciada pela citricultura, a qual tem sido cada vez mais produtiva. Com o passar dos anos, a cultura dos citros, através da implantação de técnicas mais avançadas de cultivo, tem apresentado maior rendimento de colheita, frutos maiores e mais homogêneos, e conseqüentemente, maior produtividade (GRIZOTTO et al., 2012).

2.3. A citricultura paranaense

O Paraná é nacionalmente conhecido por ser um importante polo produtor de grãos, no entanto, este estado também apresenta participação considerável no setor citrícola. Com condições edafoclimáticas favoráveis ao cultivo de citros, a citricultura no Paraná na década de 90 era constituída principalmente pela produção de tangerinas, na região do alto Ribeira, mais especificamente no município de Cerro Azul (MORIMOTO, 1990).

Por um longo período, a citricultura paranaense concentrou-se apenas nesta região, uma vez que as regiões norte e noroeste do estado permaneceram interditadas para o cultivo de citros, em decorrência da entrada do cancro cítrico nestas áreas. Nesta mesma época, foi regulamentada a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC), a qual estabeleceu a adoção de medidas de exclusão e erradicação, como formas de controle da doença (LEITE JR., 1990).

Com o objetivo de expandir a citricultura no estado, em 1978, iniciou-se um programa de pesquisa no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), com a finalidade de estudar o cancro cítrico nas condições paranaenses, desenvolvendo técnicas e medidas de controle e prevenção da doença. (LEITE JR., MOHAN, 1990).

No início da década de 80, as medidas regulatórias de quarentena eram aplicadas ao nível de município. No entanto, com o passar dos anos, os critérios de erradicação adotados pela CANECC foram revisados e passaram a ser aplicados ao nível de propriedade, onde somente plantas doentes e adjacentes, em um raio de 1 quilômetro passaram a ser eliminadas (LEITE JR., 1990; LEITE JR., MOHAN, 1990).

Através da utilização de medidas de controle e erradicação, aliadas aos resultados de pesquisas com a seleção de variedades de citros consideradas resistentes ao cancro cítrico e à utilização de novas tecnologias de condução de pomares, através da utilização de quebra-ventos e medidas protetivas, a partir da década de 90, as regiões norte e noroeste passaram a contribuir com a produção de citros no Paraná (CARVALHO et al., 2015).

Atualmente, a citricultura paranaense encontra-se principalmente nas regiões norte e nordeste do estado, as quais contribuem para que o Paraná seja o quarto maior produtor nacional de laranjas, sendo precedido por São Paulo, Bahia e Minas Gerais. Com uma produção de 750 mil toneladas, o estado é responsável por cerca de 5% da produção nacional, distribuída em uma área de 25 mil hectares (IBGE, 2017).

Apesar de apresentar produtividade elevada comparada aos outros estados produtores, a citricultura paranaense ainda é afetada por alguns fatores relevantes. Entre eles, a utilização de uma estreita base genética, com o predomínio do cultivo de laranjas doces (*C. sinensis*), tangerinas (*C. reticulata*) e limões (*C. aurantifolia*), os altos custos de produção e a continuidade espacial e temporal de pomares, o que facilita a disseminação de pragas e doenças (ANDRADE et al., 2014).

Dentre as doenças mais importantes da cultura, pode-se citar o cancro cítrico (*X.citri* subsp. *citri*), a clorose variegada dos citros (CVC, causada por *Xyllela fastidiosa*), a tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*) e o *huanglongbing* (HLB ou Greening, causada pelas bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus*). Como o controle destas doenças é baseado em medidas preventivas, o estudo da resistência de variedades de citros é de muita importância, uma vez que estas doenças, quando não controladas podem inviabilizar o cultivo de citros (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT; 2002; AMARAL, 2004).

3. O Cancro cítrico

O cancro cítrico é uma das principais doenças que atinge a citricultura mundial. Com ampla disseminação, está presente em todas as regiões de cultivo de citros e é responsável por grandes prejuízos econômicos (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT; 2002; AMARAL, 2004). Originado no Sudeste Asiático, o cancro cítrico, foi primeiramente constatado na Inglaterra, no início do século XIX (BITANCOURT, 1957; KOIZUMI, 1985).

Nas Américas, acredita-se que a doença tenha sido introduzida através de mudas de citros infectadas, provenientes da Ásia. Os primeiros registros da doença, nessas regiões, ocorreram por volta de 1910, primeiramente, nos Estados Unidos e posteriormente, na Argentina, em 1933 e Paraguai, em 1940 (HASSE, 1915; FAWCETT, JENKINS, 1933; SHARMA e SHARMA, 2008).

No Brasil, o cancro cítrico foi observado pela primeira vez, em 1957, na região de Presidente Prudente, no estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957). Após a introdução da doença no país, a bactéria rapidamente se disseminou para outras regiões de cultivo, e no mesmo ano, já foi detectada em outras regiões do estado de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná (AMARAL, 2010).

Com o objetivo de conter os avanços da doença nestas regiões, em 1975, houve a criação da Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC), na qual foram implementadas ações para o controle do patógeno. Mesmo com forte atuação da campanha, novos focos da doença foram encontrados nos anos seguintes. Sendo assim, atualmente, a doença está presente em todas as regiões produtoras de citros do país e no estado do Paraná, o cancro cítrico é considerado endêmico (SANTOS, 1991).

Um aumento na incidência da doença foi observado em 1966, quando houve a entrada da larva minadora (*Phyllocnistis citrella* Stainon) no país. Durante a alimentação, as larvas rompem a cutícula e a epiderme, expondo o mesófilo foliar, levando à formação de galerias nas folhas e facilitando a infecção por cancro cítrico. Devido aos ferimentos causados pela larva minadora, uma menor concentração de inóculo e ventos menos intensos já são suficientes para o estabelecimento da *X. citri* subsp. *citri* nas plantas. (BERGAMIM FILHO; AMORIM; 1999; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT; 2002; GRAHAM et al., 2004).

Pode-se classificar o cancro cítrico em diferentes formas, com base na distribuição geográfica e gama de hospedeiros. Primeiramente, tem-se o Cancro Cítrico Asiático, ou Cancrose A, a forma mais comum e severa da doença. Distribuída mundialmente, e endêmica na Índia, Paquistão, Sudeste da Ásia, China e Japão, é causada por *X. citri* subsp. *citri*. Afeta principalmente limas, laranjas azedas e pomelos, os quais são suscetíveis. Esta bactéria também é responsável por causar sérios danos em pomares na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT; 2002; DAS, 2003; SHARMA, SHARMA, 2008).

Já a bactéria *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* é o agente etiológico das Cancroses B e C, as quais atingem uma limitada gama de hospedeiros e estão restritas à América do Sul. Enquanto a Cancrose B afeta principalmente limões, laranjas azedas e pomelos, a Cancrose C afeta exclusivamente as laranjas azedas (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT; 2002). Existem ainda as Cancroses D e E. A primeira está presente no México e limita-se às plantas de lima ácida Galego (LOPEZ, 2000). A Cancrose E, por sua vez, é conhecida como mancha bacteriana, causada por *X. alfafae* subsp. *citrumelonis* e está presente em viveiros da Flórida, Estados Unidos (LARANJEIRA et al., 2005).

3.1. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, é uma das principais doenças que afeta a citricultura, uma vez que atinge todas as variedades comerciais, causando perdas econômicas significativas (SHARMA, SHARMA, 2008; ABE, BENEDETTI, 2016; GRAHAM, MYERS, 2016). Identificada e isolada por Hasse (1915), a bactéria primeiramente recebeu o nome de *Pseudomonas citri* e, apenas em 2006 foi renomeada, passando a levar o nome *X. citri* subsp *citri* (SCHAAD et al., 2006).

A *X. citri* subsp *citri* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia, monotríquia, não esporogênica e não fixadora de nitrato. Apresenta forma de bastonete, com tamanho aproximado de 1,5-2,0 por 0,5-0,75µm. (Figura 1).

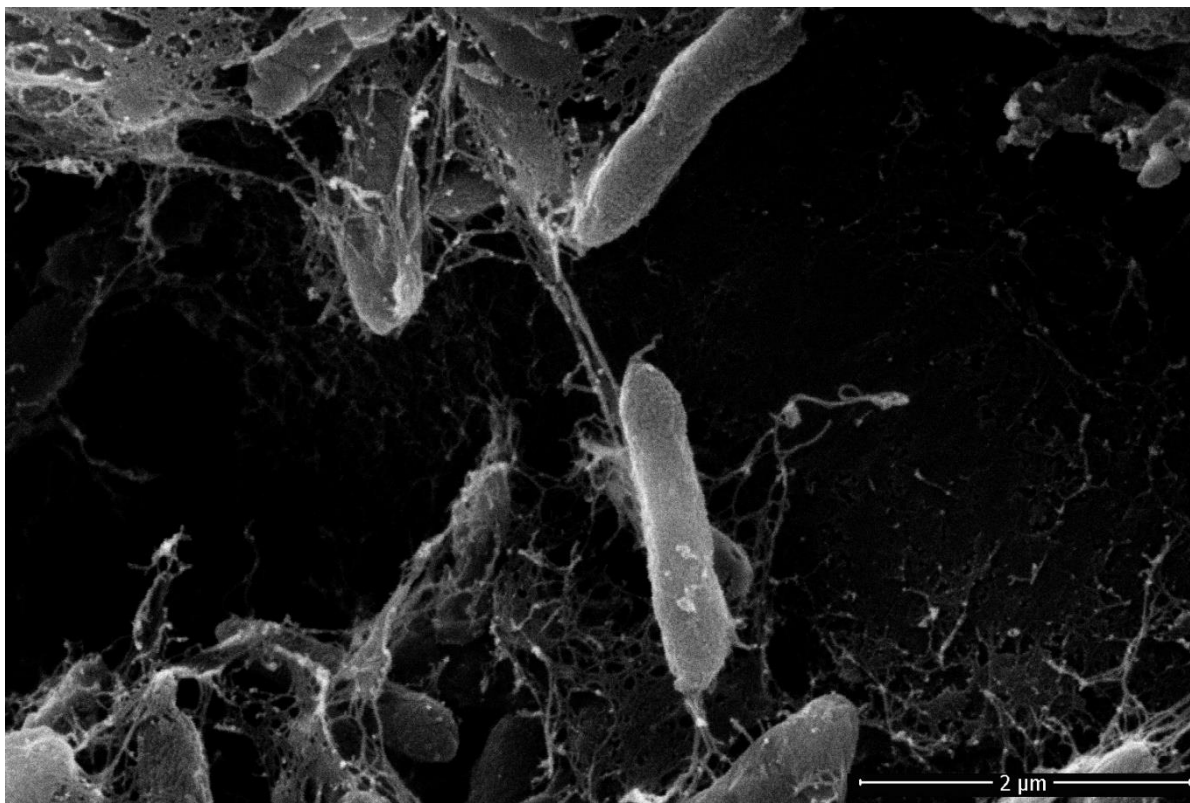


Figura 1: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inoculada em folha de laranja doce (*Citrus sinensis*), observada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Quanta 250, com aproximação de 56580x.

As condições ideais para a sobrevivência desta bactéria são temperaturas entre 28 e 30°C e alta umidade. Por produzir o pigmento xantomadina e a goma xantana, apresenta

coloração amarelada, quando observada em placas de Petri. (KIMATI et al., 1997; ROSSETTI, 2001; DAS, 2003; VERNIÈRE; GOTTWALD; PRUVOST, 2003; DALLA-PRIA et al., 2006).

3.2. Ciclo da doença

A *X. citri* subsp. *citri* é facilmente disseminada através de respingos de chuva, vento, mudas e materiais de trabalho contaminados. A bactéria penetra nas folhas através de estômatos e outras aberturas naturais ou através de ferimentos, causados por ferramentas de poda ou insetos herbívoros, como a larva minadora dos citros (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT; 2002; BELASQUE JR. et al., 2005).

Dentro do tecido vegetal, a colonização da bactéria se restringe ao sítio de infecção. Para sua sobrevivência, as bactérias se multiplicam no parênquima celular e iniciam a produção de polissacarídeos extracelulares, como a goma xantana (BROWN, 2001). O acúmulo de goma e a diminuição dos espaços intercelulares contribuem para o aspecto de encharcamento dos tecidos infectados (PADMANABHAM et al., 1973; DAS, 2003).

O crescimento populacional da *X. citri* subsp. *citri*, é diretamente proporcional à suscetibilidade do hospedeiro. Sob condições favoráveis à doença, o patógeno induz a hipertrofia e a hiperplasia das células hospedeiras, sendo assim, ocorre um aumento no tamanho e na quantidade de células. Conseqüentemente, há a formação do cancro, propriamente dito, o qual apresenta-se na forma de lesões circulares, que com o tempo, se tornam elevadas e eruptivas. Após a intensa proliferação da *X. citri* subsp. *citri* no espaço intercelular, a epiderme é rompida e a bactéria é liberada para a superfície do órgão infectado, iniciando a partir deste local, um novo ciclo de infecção (GOTTIG et al., 2010).

3.3. Epidemiologia

As condições ideais para o desenvolvimento da doença são temperaturas elevadas, normalmente entre 25 e 30°C e alta umidade relativa do ar. Tecidos mais jovens também são mais suscetíveis à infecção pelo patógeno, ou seja, folhas com até seis semanas e frutos com até 90 dias após a queda das pétalas, estão mais propensos à infecção por *X. citri* subsp. *citri* (FILHO; HUGHES, 2000; DAS, 2003).

A infecção pela bactéria torna-se mais eficaz com a presença da larva minadora dos citros. Em folhas intactas, a concentração mínima de inóculo para causar infecção é de 10^4 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), enquanto que com a larva, a concentração mínima cai para 10 UFC/mL (CHRISTIANO et al., 2007).

Em regiões de clima temperado, com invernos úmidos e verões secos, há uma diminuição considerável no potencial de multiplicação das bactérias, sendo assim, é possível a convivência com o cancro cítrico (PRUVOST et al., 2002). Para isso, são necessárias medidas de prevenção da doença, com o manejo integrado da doença, através de pulverizações preventivas com cúpricos, utilização de quebra ventos, controle da larva minadora dos citros, e principalmente, com a utilização de variedades menos suscetíveis.

3.4. Sintomas

Os sintomas do cancro cítrico podem ser observados em toda a parte aérea da planta hospedeira, incluindo folhas, frutos e ramos (Figura 2). A ocorrência das lesões é sazonal, coincidindo com os períodos de maior incidência de chuva, altas temperaturas e emissão de ramos novos (SHARMA; SHARMA, 2008). Variedades com prolongado crescimento vegetativo, com a formação contínua de tecidos jovens, são mais suscetíveis à infecção pela bactéria (GOTTWALD, 1993; AMARAL, 2004).

Todos os tecidos da parte aérea das plantas são afetados pelo cancro cítrico, principalmente os mais jovens. Nas folhas, os sintomas são observados nas duas faces, na forma de lesões eruptivas e salientes, com diâmetros de 2,0 a 10,0 mm. Com a evolução da doença, devido à hiperplasia, as lesões tornam-se esponjosas, adquirem aspecto corticoso e apresentam-se circundadas por um halo amarelo. (ROSSETTI, 2001; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT; 2002; BRUNNING; GABRIEL; 2003; DAS, 2003; BRAIDO et al., 2015).

Nos frutos, as lesões são similares às das folhas, porém podem desenvolver diâmetros maiores, com a formação de crostas escuras e fissuras. Normalmente, observa-se a presença de lesões de diferentes tamanhos, uma vez que os frutos ficam expostos e suscetíveis à infecção por mais tempo, o que favorece a ocorrência de mais de um ciclo de infecção por fruto (SHARMA, SHARMA, 2008).

Nos ramos, os sintomas são irregulares, com a formação de pústulas brancas ou amareladas. As lesões permanecem viáveis por várias estações e com o tempo, estas lesões podem coalescer, causando a morte dos ramos jovens (DAS, 2003).

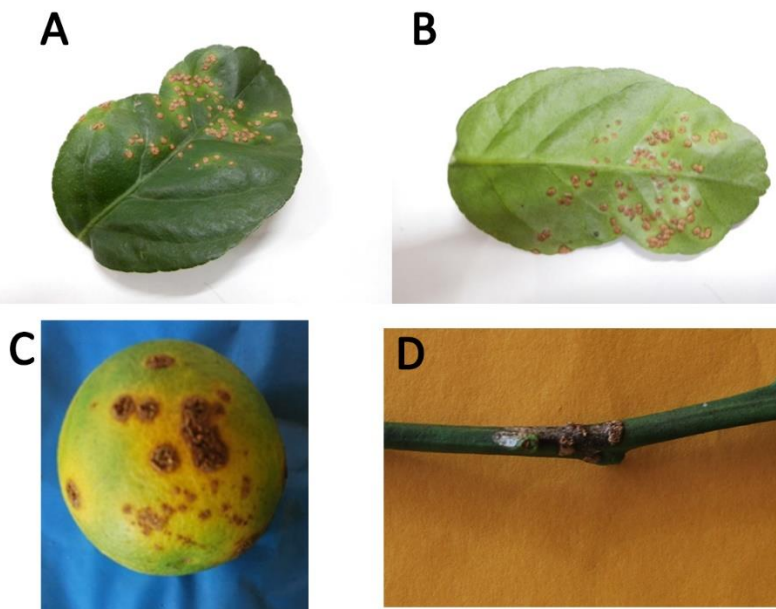


Figura 2. Sintomas do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) em laranja doce (*Citrus sinensis*) A. Folha face adaxial B. Folha face abaxial C. Fruto D. Ramo. Fonte: NBA

Quando a infecção por *X. citri* subsp. *citri* é muito severa, ocorre a redução da capacidade fotossintética em decorrência da desfolha das plantas, queda prematura dos frutos, diminuição da qualidade de frutos remanescentes, seca de ramos novos e, posteriormente, em alguns casos a morte da planta (STALL, SEYMOUR, 1983; BROWN, 2001; CAICEDO et al., 2016; GICHARU et al., 2016).

3.5. Controle

O controle do cancro cítrico é considerado difícil, especialmente sob condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença e em pomares com variedades suscetíveis ao patógeno (BAPTISTA et al., 2010).

Em áreas consideradas quarentenárias, como a região de São Paulo, o controle é realizado através de medidas de exclusão e erradicação (BARBOSA et al., 2001; GOTTWALD et al., 2001; BELASQUE JR. et al., 2008; LOPES et al., 2008). Além destas medidas, outros cuidados são necessários, como a aquisição de mudas e borbulhas de viveiros registrados, realização da desinfestação do material de trabalho, construção de rodolúvio e pedilúvio nas propriedades e inspeções periódicas nos pomares (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

Em áreas consideradas endêmicas, como no estado do Paraná e na Flórida, a erradicação não é obrigatória. Nestas áreas, com o objetivo de reduzir a doença nos pomares, são utilizadas medidas de manejo integrado, através da utilização de quebra-ventos, aplicações preventivas de fungicidas cúpricos e, principalmente, através da utilização de genótipos considerados resistentes ou moderadamente resistentes (LEITE JR., 1990; BELASQUE; BERGAMIM FILHO, 2006; GONÇALVES-ZULIANI et al., 2016; BEHLAU et al., 2017).

3.6. Resistência ao Cancro cítrico

O cancro cítrico afeta diferentes espécies do gênero *Citrus* e a severidade da doença é variável de acordo com o hospedeiro infectado, desta forma, a utilização de cultivares resistentes é fundamental para o manejo eficaz do cancro cítrico, uma vez que é considerado o método mais econômico e eficiente no controle da doença (LEITE JR., 1990; BRUNNING; GABRIEL, 2003; SHARMA; SHARMA, 2008).

A variação na suscetibilidade à *X. citri* subsp. *citri* pode ser influenciada pela espessura da camada de cera, quantidade de estômatos por área foliar, anatomia dos estômatos, das membranas e das células do mesofilo foliar e também por alterações nos espaços extracelulares (GRAHAM et al., 1992; GOTTWALD et al., 1993; SHARMA; SHARMA, 2008; AMARAL et al., 2010). Além disso, a suscetibilidade das variedades ao cancro cítrico pode variar conforme o porta-enxerto utilizado, a intensidade de emissão de brotos novos e as condições climáticas predominantes nas regiões de cultivo (LEITE JR.; SANTOS, 1988; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

A obtenção de variedades resistentes ou moderadamente resistentes ao cancro cítrico pode ser realizada através de seleção de variedades já existentes em bancos de germoplasma, através do melhoramento convencional ou da transgenia. Além da utilização destes métodos,

para a obtenção de novas variedades de citros resistentes à *X. citri* subsp. *citri*, pode-se utilizar a seleção de genótipos em pomares comerciais, com a identificação e seleção de plantas (CARVALHO et al., 2015).

A suscetibilidade ao cancro cítrico é variável nas diferentes espécies cítricas. Pesquisas mostram que toranjas (*C. paradisi* Macf.), limas (*C. aurantifolia* Swingle), e limões (*C. limon* L. Burm. F.) são altamente suscetíveis ao cancro cítrico. A maioria das laranjas doce (*C. sinensis*) são consideradas moderadamente suscetíveis à doença, enquanto as tangerinas (*C. reticulata*), calamondin (*Citrofortunella*) e kumquat (*Fortunella* spp.) são consideradas resistentes (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002; AMARAL et al., 2010; ZHANG et al., 2010; CARVALHO et al., 2015; CHEN et al., 2016).

Diferentes níveis de resistência foram observados dentro do grupo de laranjas doce (*C. sinensis* L.), onde as laranjas Pêra EEL, Bianchi, IAC, Ipiguá, Ovale Siracusa foram consideradas moderadamente resistentes e a variedade Hamlin, considerada suscetível (AMARAL et al., 2010). Em uma outra avaliação, as laranjas Pêra IAC, EEL, Ipiguá e Ovale Siracusa também apresentaram baixa incidência e severidade de cancro cítrico em diferentes locais de avaliação (GONÇALVES-ZULIANI et al., 2011).

Variedades consideradas resistentes, como a Kumquat, têm sido utilizadas nos programas de melhoramento, em cruzamentos com espécies de *Citrus*, produzindo híbridos com maior resistência ao cancro cítrico (VILORIA et al., 2004). Porém, como o melhoramento convencional de citros não é normalmente utilizado, por apresentar alguns empecilhos, tais como período juvenil prolongado e alta taxa de heterozigosidade, atualmente, utiliza-se como alternativa viável, a transgenia, com a produção de plantas resistentes ao cancro cítrico, através da transferência de genes de resistência identificados em plantas consideradas tolerantes ou resistentes (KHALAF et al., 2007; ZHANG et al., 2010).

A diferença na suscetibilidade das espécies de citros também pode estar relacionada a alguns outros fatores, amplamente utilizados na engenharia genética, tais como a presença de efetores de ativação transcricional (TAL), proteínas de resistência, genes de avirulência do patógeno e a presença de genes de resistência ou suscetibilidade em plantas de citros. Estes fatores moleculares atuam principalmente durante as interações patógeno-hospedeiro e suas ações são determinantes para o desenvolvimento da doença ou ausência da mesma (SWARUP et al., 1991; DUAN et al., 1999; HU et al., 2014; ABE; BENEDETTI, 2016; KOBAYASHI et al., 2017).

4. Mecanismos de defesa das plantas

Durante o processo de co-evolução, plantas e patógenos desenvolveram uma série de mecanismos que colaboraram para a sua adaptação e sobrevivência. Enquanto os patógenos utilizam ferramentas moleculares para superar os obstáculos impostos pelos hospedeiros, as plantas apresentam um mecanismo de defesa complexo, divididos em duas categorias, os mecanismos pré-formados e pós-formados (JONES, DANGL, 2006; PASCHOLATI, 2011):

a) Mecanismos pré-formados (passivos, constitutivos): presentes na planta antes do contato com o patógeno. Podem ser estruturais (cutículas, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores) ou bioquímicos (fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos cianogênicos, glicosídeos sulfurados, fototoxinas, proteínas/peptídeos).

b) Mecanismos pós-formados (ativos, induzíveis): ausentes ou presentes em baixas concentrações antes da infecção, sendo ativados ou produzidos em resposta à presença do patógeno. Podem ser estruturais (papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina) ou bioquímicos (espécies reativas de oxigênio - EROs, fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese – PR proteínas).

4.1. Mecanismos de defesa pré-formados

Nas espécies de citros, inúmeras pesquisas mostram a influência da cutícula, do tamanho dos estômatos e da área estomática na suscetibilidade das plantas ao cancro cítrico (MCLEAN, 1921; GRAHAM et al., 1992; WANG et al., 2011; CHEN et al., 2012; FAVARO et al., 2014). Estes mecanismos estruturais podem ser vistos como a primeira linha de defesa das plantas, uma vez que o contato inicial entre a planta e o patógeno ocorre ao nível da epiderme (PASCHOLATI, 2011).

A cutícula é uma superfície lipídica e hidrofóbica, composta de cera e cutina, que recobre a parede celular das células epidérmicas em contato com o meio externo. Devido à sua composição, a cutícula impede a formação de um filme de água, no qual as bactérias (*X. citri* subsp. *citri*) são normalmente depositadas e de onde são transportadas a novos hospedeiros através dos respingos da chuva. Os estômatos, por sua vez, relacionam-se com a resistência de plantas em função da quantidade, morfologia, localização e tamanho da abertura estomática. (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT; 2002; PASCHOLATI, 2011).

McLean, em 1921, analisou a cutícula e os estômatos em duas variedades de *Citrus*, sendo uma resistente e a outra suscetível. Nos seus estudos, observou que ambas variedades possuíam estômatos de tamanhos idênticos, porém com diferenças estruturais na cutícula e nas aberturas estomáticas. Na variedade Szinkum, considerada resistente, a cutícula e as células estomáticas formavam uma abertura mais estreita, o que dificultava a entrada das bactérias através dos estômatos.

Graham et al. (1992) também avaliaram duas variedades de citros em relação ao tamanho e estrutura dos estômatos e observaram que apesar dos estômatos possuírem tamanhos idênticos, ainda haviam diferenças na suscetibilidade das variedades estudadas. Estes autores observaram também diferenças nas áreas e densidades estomáticas entre as variedades, porém não encontraram relação destes dados com a suscetibilidade das variedades ao cancro cítrico.

Wang et al. (2011) compararam estruturalmente e fisiologicamente duas variedades, a Meiwa (*Fortunella crassifolia*) e a Newhall (*C. sinensis*) e observaram que a variedade suscetível Newhall, possuía maiores médias de densidade estomática, assim como estômatos com aberturas maiores do que a variedade resistente Meiwa.

Ao avaliarem a formação de biofilme na tangerina Satsuma Okitsu (*C. unshiu*), Favaro et al. (2014) observaram que o estágio fenológico das plantas, juntamente com as características da superfície foliar desta variedade estavam envolvidos no processo de resistência à *X. citri* subsp. *citri*.

4.2. Mecanismos de defesa pós-formados

4.2.1. Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio são moléculas transitórias, altamente reativas e de rápida produção que surgem da redução do oxigênio molecular (O_2) à água (H_2O). Esta explosão oxidativa é considerada um dos primeiros constituintes da estratégia de defesa das plantas (BAKER; ORLANDI, 1995; WOJTASZEK, 1997). As moléculas de espécies reativas de oxigênio que podem ser formadas são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxigênio singlete (*singlet oxygen*) (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}) (Figura 3).

Inicialmente, com a adição de um elétron, o oxigênio molecular (O_2) é convertido ao radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) através de um *input* energético fornecido por NAD(P)H, peroxidases

ou lipoxigenases. O O_2^- , por sua vez, pode passar por reações de oxirredução ou ser dismutado e regenerar O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que pode ocorrer de forma espontânea em pH neutro ou através da ação da superóxido dismutase. O H_2O_2 pode então, ser reduzido ao radical hidroxil (OH^\bullet), convertido a H_2O e O_2 pela ação da catalase ou convertido a H_2O através da oxidação de moléculas via peroxidases (BAKER, ORLANDI, 1995; PASCHOLATI, 2011).

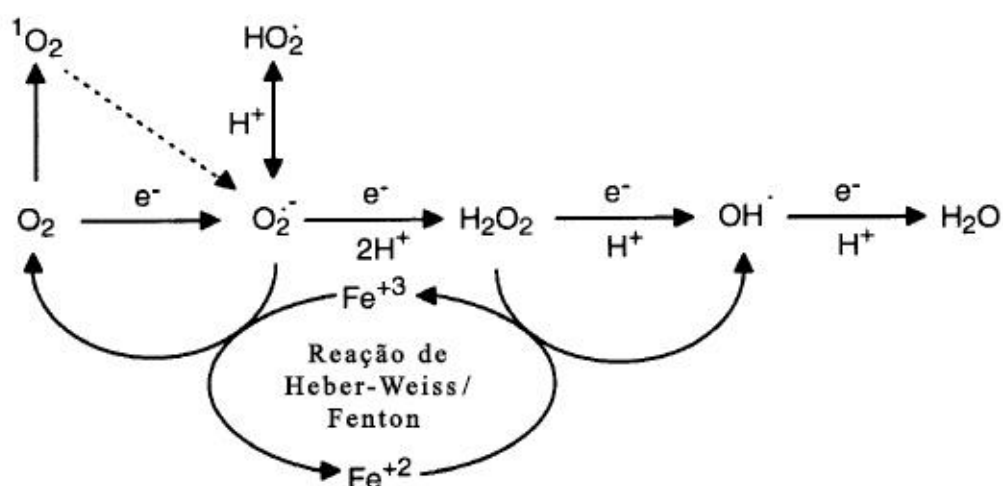


Figura 3. Inter conversão de espécies reativas (EROs) derivadas de O_2 . (VRANOVÁ; INZÉ; BREUSEGEM, 2002).

As espécies reativas de oxigênio podem acumular-se rapidamente nas células, logo no início do processo de interação patógeno-hospedeiro, em um processo denominado explosão oxidativa. Esta reação tem sido amplamente verificada em reações de hipersensibilidade em plantas, em resposta à infecção bacteriana ou fúngica (BAKER et al., 1993; WOJTASZEK, 1997; COHN; SESSA; MARTIN, 2001). Estudos sugerem que o aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio, mais especificamente, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), está relacionado à diminuição da população de patógenos na planta (KUMAR; EBEL; ROBERTS, 2011a, 2011b).

Estas moléculas podem atuar na defesa das plantas em diferentes situações: podem agir diretamente sobre o patógeno, inibindo o seu desenvolvimento nos tecidos vegetais; podem fortalecer a integridade da membrana plasmática, reduzindo a sua fluidez, devido à peroxidação de lipídeos; assim como também podem estar envolvidas na sinalização em respostas de defesa

da planta, com a ativação e expressão de genes de defesa e em reações de resposta de hipersensibilidade (LAMB; DIXON, 1997; COHN; SESSA; MARTIN, 2001; KUMAR, EBEL, ROBERTS, 2011a, 2011b; PASCHOLATI, 2011).

4.2.2. Resposta de hipersensibilidade

Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram uma série de respostas de defesa rápidas e eficientes contra os mais diversos patógenos. Uma das mais importantes é a reação de hipersensibilidade, a qual é caracterizada por uma resposta rápida, que se inicia horas após o contato com o patógeno. Esta reação está associada à morte das células localizadas no sítio de infecção, o que leva à restrição do crescimento e desenvolvimento do patógeno nas plantas (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; MOREL; DANGL, 1997; COHN; SESSA; MARTIN, 2001; AGRIOS, 2005).

A reação de hipersensibilidade, fenotipicamente, apresenta-se na forma de áreas necróticas que limitam a região de colonização do patógeno, podendo estar restrita ou não à célula invadida ou em contato direto com o microrganismo (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996; HEATH, 2000).

Normalmente, a reação de hipersensibilidade é desencadeada quando uma planta que possui um gene de resistência (*R*), reconhece um produto de expressão gênica (proteína elicitora) produzido a partir da ação de um gene de avirulência (*avr*) do patógeno (Teoria gene-a-gene) (FLOR, 1971; MOREL; DANGL, 1997; BÜTTNER; BONAS, 2006; JONES; DANGL; 2006). Pesquisas realizadas em espécies cítricas sugerem, que a presença de um gene *R* é responsável por desencadear respostas de hipersensibilidade em variedades resistentes à *X. citri* subsp. *citri* de forma mais rápida do que em variedades consideradas suscetíveis (KHALAF et al., 2007).

A produção de espécies reativas de oxigênio e a resposta de hipersensibilidade estão intimamente relacionadas, uma vez que a rápida produção e acúmulo de radicais superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células, levam à morte celular local programada. Esta reação, ao limitar o acesso do patógeno às fontes de nutrientes, tem o objetivo de bloquear o estabelecimento e desenvolvimento do patógeno dentro dos tecidos hospedeiros (BAKER, ORLANDI, 1995; LAMB; DIXON, 1997; COHN; SESSA; MARTIN; 2001; OLIVEIRA et al., 2014).

4.2.3. Enzimas relacionadas à defesa de plantas

Em resposta ao ataque por patógenos, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa, o qual abrange diversas reações associadas à morte celular programada, resposta de hipersensibilidade e a ação de enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo. (KUMAR; EBEL; ROBERTS, 2011a).

O sistema enzimático de defesa abrange enzimas responsáveis por remover, neutralizar ou eliminar radicais livres do interior das células. Dentro deste grupo, pode-se destacar a Peroxidase (POD), Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD) (SCANDALIOS, 1993; WOJTASZEK, 1997; KUMAR; EBEL; ROBERTS, 2011b).

4.2.4. Peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7)

A peroxidase é uma glicoproteína com um grupo heme, a qual está presente em células animais e vegetais e em microrganismos. A peroxidase é considerada uma Proteína Relacionada à Patogênese (PRP), pertencente à família PR-9 (VAN LOON et al., 1994). É responsável por catalisar a oxirredução entre o peróxido de hidrogênio e vários redutores.

Nas plantas, algumas peroxidases são induzidas durante o processo de defesa contra patógenos, sugerindo a importância desta enzima nas mais diversas formas de defesa celular (HIRAGA et al., 2001). Estudos indicaram a participação das peroxidases no processo de lignificação, suberização e outras reações metabólicas da parede celular, assim como também foi observada a atuação no catabolismo de auxinas, defesa contra patógenos, tolerância a sais e senescência (WOJTASZEK, 1997; HIRAGA et al., 2001; CHEN et al., 2012).

Em citros, diversos estudos apontaram aumento da atividade das peroxidases a partir do momento em que se inicia a infecção (SHARMA; SHARMA, 2008). Plantas consideradas resistentes à *X. citri* subsp. *citri* apresentaram maior produção desta enzima, em relação a plantas suscetíveis (KUMAR, EBEL; ROBERTS, 2011b; WANG et al., 2011) e um aumento na concentração da peroxidase também foi observado durante o processo de formação do halo (DAS, 2003).

4.2.5. Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

A catalase é uma enzima tetramérica, com um grupo heme, capaz de regular os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) convertendo-o em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2). A catalase está presente em todos os organismos eucariotos e, tem como função principal, regular as concentrações de H_2O_2 nas células, prevenindo os possíveis danos causados por mudanças na homeostase do H_2O_2 (SCANDALIOS, 1993; VAN BREUSEGEM et al., 2001).

As catalases são as principais enzimas responsáveis por remover as moléculas de H_2O_2 em plantas. Estas enzimas podem dismutar o H_2O_2 diretamente ou oxidar substratos, como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico (VAN BREUSEGEM et al., 2001); assim como também atuam nos glioxissomos e mitocôndrias, removendo o H_2O_2 produzido durante a β -oxidação dos ácidos graxos e na cadeia transportadora de elétrons (FRUGOLI et al., 1996).

Em plantas superiores, as catalases apresentam papel importante no mecanismo de defesa, uma vez que podem estar relacionadas ao mecanismo de hipersensibilidade e morte celular programada. Nestas situações, a redução na atividade da catalase e outras enzimas antioxidantes, contribuiria para o acúmulo de H_2O_2 , provocando a morte das células, característica marcante da resposta de hipersensibilidade (VAN BREUSEGEM et al., 2001; VELLOSILO et al., 2010).

Em citros, estudos com variedades contrastantes apontam aumento na atividade da catalase em uma variedade suscetível e a redução na atividade desta enzima em uma variedade resistente, logo após a inoculação das plantas com a bactéria *X. citri* subsp. *citri*, (LAMB; DIXON, 1997; CHEN et al., 2012). Outros autores observaram que após a inoculação com *X. citri* subsp. *citri*, os níveis de catalase aumentaram substancialmente, em relação ao controle não inoculado (KUMAR; EBEL, ROBERTS, 2011b), indicando a importância da ação desta enzima na defesa das plantas contra patógenos.

4.2.6. Superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

A superóxido dismutase ou superóxido oxiredutase, é uma enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (SCANDALIOS, 1993). Devido ao seu papel no metabolismo oxidativo, a

superóxido dismutase tem sido amplamente estudada em plantas, sob diferentes condições de estresse (BOWLER; MONTAGU; INZÉ; 1992).

O metabolismo oxidativo tem sido relacionado com as respostas de defesa contra patógenos em plantas. A superóxido dismutase, juntamente com a peroxidase e catalase, tem sido analisada em plantas de citros inoculadas com *X. citri* subsp. *citri*. Pesquisadores afirmam que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio em plantas inoculadas está diretamente relacionado com as atividades da peroxidase, catalase e superóxido dismutase, porém não foi observada diferenças nas concentrações desta última enzima em variedades de citros contrastantes inoculadas com a bactéria *X. citri* subsp. *citri* (CHEN et al., 2012).

4.2.7. Mecanismos moleculares da Interação planta-patógeno

As plantas são organismos sésseis, portanto, estão constantemente expostas a diversos patógenos. Apesar de não possuírem sistema imunológico, são normalmente resistentes a doenças, uma vez que possuem um complexo sistema de defesa composto por vários níveis e mecanismos de proteção (KHALAF et al., 2007).

Como primeira medida de defesa, as plantas utilizam os mecanismos já descritos anteriormente, denominados de pré-formados ou constitutivos. Caso o patógeno rompa estas barreiras iniciais, as plantas utilizam-se de uma sofisticada gama de mecanismos capazes de reconhecer receptores específicos do patógeno (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT; 2015).

Este sistema de defesa pode ser subdividido em dois ramos. O primeiro nível corresponde à percepção de receptores do patógeno (*pattern recognition receptors* ou PRRs), os quais envolvem o reconhecimento dos padrões moleculares associados à microrganismos ou patógenos (*microbial-* ou *pathogen-associated molecular patterns* ou MAMPs/DAMPs). Já a segunda forma de defesa acontece dentro das células, onde os genes de resistência vegetal (*R*) reconhecem os produtos do gene de avirulência (*avr*), derivados do patógeno e ativam as respostas de defesa das plantas (FLOR, 1971; COHN; SESSA; MARTIN; 2001; JONES, DANGL; 2006; KHALAF et al., 2007; BIGEARD; COLCOMBET; HIRT; 2015;).

Os MAMPs são reconhecidos por elicitores específicos, os quais induzem nas plantas, respostas de defesa específicas, tais como a produção de fitoalexinas, produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, sinalização por hormônios, formação de calose, síntese de compostos antimicrobianos e ativação da transcrição de genes de defesa (ABRAMOVITCH;

MARTIN, 2004; ALTENBACH; ROBATZEK; 2007; HE; SHAN; SHEEN 2007). Estudos também demonstraram a atuação dos MAMPs no fechamento dos estômatos (MELOTTO et al., 2006; SCHULTZE-LEFERT; ROBATZED, 2006).

O segundo sistema de defesa, por sua vez, é descrito pela Teoria gene-a-gene (FLOR, 1971), o qual descreve o reconhecimento de um gene de avirulência do patógeno por um gene *R*. Este reconhecimento implica em uma resposta de defesa específica, onde eliciadores específicos de cada patógeno, como proteínas e peptídeos da parede celular, membranas ou secreções são identificados pelos genes *R* das plantas (BOLLER, 1995).

Na bactéria *X. citri* subsp. *citri* foram relatados alguns genes de patogenicidade, sendo o *pthA*, o mais estudado. Este gene confere às bactérias, a habilidade de produzir as lesões necróticas nas plantas, ou seja, é essencial para o desenvolvimento do cancro cítrico, uma vez que, quando expresso nas células do hospedeiro, é responsável pelo surgimento dos sintomas de hiperplasia, hipertrofia e morte celular (SWARUP et al., 1991; DUAN et al., 1999; BRUNNING; GABRIEL, 2003; FERENGE et al., 2017).

JUSTIFICATIVAS DO TRABALHO

- As laranjas doces (*C. sinensis*) são amplamente cultivadas no Brasil, porém é necessária a busca por genótipos considerados resistentes ou moderadamente resistentes a *X. citri* subsp. *citri*.
- A utilização de variedades resistentes é o método mais eficiente para o controle de doenças, assim como também é a medida mais econômica para os produtores.
- A observação da evolução dos sintomas ao longo do tempo fornece informações a respeito dos diferentes níveis de resistência à *X. citri* subsp. *citri*, ao longo do tempo.
- Os estudos bioquímicos, através da utilização de análises enzimáticas, são importantes para comparar as variedades de laranja Pêra, trazendo uma maior compreensão dos mecanismos de defesa das plantas em diferentes genótipos.
- A visualização dos estômatos e comparação das áreas estomáticas em diferentes variedades pode fornecer informações sobre os mecanismos de defesa estruturais pré-formados em citros.

REFERÊNCIAS

- ABE, V.Y.; BENEDETTI, C.E. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n.8, p.1223-1236, 2016.
- ABRAMOVITCH, R.; MARTIN, G.B. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, p.356-364, 2004.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**, 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press. 922 p, 2005.
- AL-MOUEI, R.; CHOUMANE, W. Assessment of Genetic Variability within the Genus *Citrus* in Syria Using SSR Markers. **American Journal of Experimental Agriculture**, v.4, n.8, p.939-950, 2014.
- ALTENBACH, D.; ROBATZEK, S. Pattern Recognition Receptors: From the Cell Surface to Intracellular Dynamics. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.20, n.9, p.1031-1039, 2007.
- AMARAL, A.M.; CARVALHO, S.A.; SILVA, L.F.C.; MACHADO, M.A. Reaction of genotypes of citrus species and varieties to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under greenhouse conditions. **Journal of Plant Pathology**, v.92, n.2, p-519-524, 2010.
- AMARAL, A. M. O que torna o cancro cítrico uma doença? **Laranja**, v. 25, p. 375–387, 2004.
- ANDRADE, D.J.; FERREIRA, M.C.; MARTINELLI, N.M. **Aspectos da Fitossanidade em Citros**, Jaboticabal: Cultura Acadêmica, 265p., 2014.
- ARAÚJO E.F., QUEIROZ L.P. MACHADO M.A. What is Citrus? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae). **Organisms Diversity & Evolution**, v.3, p.55–62, 2003.
- BAKER, C.J.; MOCK, N.; GLAZENER, J.; ORLANDI, E. Recognition responses in pathogen/non-host and race/cultivar interactions involving soybean (*Glycine max*) and *Pseudomonas syringae* pathovars. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.43, p.81-94, 1993.
- BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p-299-321, 1995.
- BAPTISTA J.C.; MACHADO, M.A.; HOMEM, R.A.; TORRES, P.S.; VOJNOV, A.A.; AMARAL, A.M. Mutation in the xpsD gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.1, p.146-153, 2010.
- BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C.A.; AYRES, A.J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.30-35. 2001.

- BARKLEY N.A.; ROOSE, M.L.; KRUEGER, R.R.; FEDERICI, C.T. Assessing genetic diversity and population structure in a *Citrus* germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.1519–1531, 2006.
- BARRETT H.C. RHODES, A.M. A numerical taxonomy study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, v.1, p.105–136, 1976.
- BEHLAU, F.; SCANDELAI, L.H.M.; SILVA JUNIOR, G.J.; LANZA, F.E. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Protection**, v.94, p.185-191, 2017.
- BELASQUE JR, J.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; RIBEIRO, L.M.; JESUS JUNIOR, W.C.; AMORIM, L. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p.387-393, 2005.
- BELASQUE JR., J.; FACIANI, F.J.; MARIN, D.R.; BARBOSA, J.C. Tamanho da amostra para quantificação do diâmetro de lesões do cancro cítrico. **Tropical Plant Pathology**, v. 33. n.4. p. 317-322, 2008.
- BELASQUE JR., J.; BERGAMIN FILHO, A. Estratégias de controle do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 143-148, 2006.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Mudanças no padrão espacial do cancro cítrico exige novas regras para erradicação. **Revista Fundecitrus**, v. 14, p. 12, 1999.
- BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular Plant**, v.8, p.521-539, 2015.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 101-111, 1957.
- BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.46, p.189-214, 1995.
- BOLLER, C.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.
- BRAIDO, R.; GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; NOCCHI, P.T.R.; BELASQUE JUNIOR, J.; JANEIRO, V.; BOCK, C.H.; NUNES, W.M.C. A standard area diagram set to aid estimation of the severity of Asiatic citrus canker on ripe sweet orange fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v.141, p.327-337, 2015.
- BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker **Science**, v.291, p.2275-2278, 2001.
- BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.141-157, 2003.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.193-200, 2006.

CAICEDO, J.C.; VILLAMIZAR, S.; FERRO, M.I.T.; KUPPER, K.C.; FERRO, J.A. Bacteria from the citrus phylloplane can disrupt cell–cell signalling in *Xanthomonas citri* and reduce citrus canker disease severity. **Plant Pathology**, v.65, p.782-791, 2016.

CARVALHO, S.A.; NUNES, W.M.C.; BELASQUE JR., J.; MACHADO, M.A.; CROCE-FILHO, J.; BOCK, C.H.; ABDO, Z. Comparison of resistance to Asiatic citrus canker among different genotypes of *Citrus* in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. **Plant Disease**, v.99, n.2, p.207-218, 2015.

CHEN, P.; WANG, L.; CHEN, Y.; TZENG, K.; CHANG, S.; CHUNG, K.; LEE, M. Understanding cellular defense in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.79, p.1-12, 2012.

CHEN, M.; HE, Y.; XU, L.; PENG, A.; LEI, T.; YAO, L.; LI, Q.; ZHOU, P.; BAI, X.; DUAN, M.; JIANG, X.; JIA, R.; ZOU, X.; CHEN, S. Cloning and expression analysis of citrus genes *CSGH3.1* and *CSGH3.6* responding to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* infection. **Horticultural Plant Journal**, v.2, n. 4, p. 193–202 2016.

CHRISTIANO, R.S.C.; DALLA PRIA, M.; JESUS JUNIOR, W.C.; PARRA, J.R.P.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A. Effect of citrus leaf-miner damage, mechanical damage and inoculum concentration on severity of symptoms of Asiatic citrus canker in Tahiti lime. **Crop Protection**, v.26, p. 59-65, 2007.

COHN, J.; SESSA, G.; MARTIN, G.B. Innate immunity in plants. **Current Opinion in Immunology**, v.13, p.55-62, 2001.

COUTO, M. A. L., GUIDOLIN, S.; BRAZACA, C. Quantification of vitamin C and antioxidant capacity of citrus varieties. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 15-19, 2010

CURK, F.; ANCILLO, G.; GARCIA-LOR, A.; LURO, F.; PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P.; NAVARRO, L.; OLLITRULT, P. Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in *Citrus* species: analysis of chromosome 2. **BMC Genetics**, v.15, p;152, 2014.

DALLA-PRIA, M.; CHRISTIANO, R.C.S.; FURTADO, E.L.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. **Plant Pathology**, v.55, p.657-663, 2006.

DAS, A.K. Citrus canker – A review. **Journal of Applied Horticulture**, v.5, n.1, p.52-60, 2003.

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**, Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, p.1-18, 2005.

DUAN, Y.P.; CASTAÑEDA, A.; ZHAO, G.; ERDOS, G.; GABRIEL, D.W. Expression of a single, Host-Specific, Bacterial Pathogenicity Gene in Plant Cells Elicits Division, Enlargement, and Cell Death. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v.6, p.225-237, 1999.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 01/08/2017, 8:05.

FAVARO, A.M.; MICHELOUD, N.G.; ROESCHLIN, R.A.; CHIESA, M.A.; CASTAGNARO, A.P.; VOJNOV, A.A.; GMITTER, F.G.; GADEA, J.; RISTA, L.M.; GARIGLIO, N.F.; MARANO, M.R. Surface barriers of mandarin ‘Okitsu’ leaves make a major contribution to canker disease resistance. **Phytopathology**, v.104, p.970-976, 2014.

FAWCETT, H.S.; JENKINS, A.E. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology**, v.23, p.820-824, 1933.

FEDERICI C.T., FANG, D.Q.; SCORA, R.W.; ROOSE, M.L. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (*Rutaceae*) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. **Theoretical Applied Genetics**, v.94, p.812–822, 1998.

FERENCE, C.M.; GOCHEZ, A.M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J.H.; JONES, J.B. Recent advances in understanding *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* pathogenesis and citrus canker disease development. **Molecular Plant Pathology**, accepted article. DOI: 10.1111/mpp.12638.

FILHO, A.B.; HUGHES, G. Citrus canker epidemiology – methodologies and approaches. **Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop**, Florida, p.24-25, 2000.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.

FRUGOLI, J.A.; ZHONG, H.H.; NUCCIO, M.L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; MCCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene Family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, v.112, p.327-336, 1996.

GIACOMETTI, D. C. Taxonomia das espécies cultivadas de citros baseada em filogenética. In: RODRIGUEZ, O; VIÉGAS, F; POMPEU, J.J., AMARO, A.A. (Eds.). *Citricultura Brasileira*. Campinas: Fundação Cargill. p. 99-115, 1991.

GICHARU, G.K.; SUN, D.; HU, X.; XHUO, T.; WU, C.; ZUO, H. The sigma 54 genes rpoN1 and rpoN2 of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* play different roles in virulence, nutrient utilization and cell motility. **Journal of Integrative Agriculture**, v.15, n.9, p.2032-2039, 2016.

GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; BELASQUE JR, J.; ZANUTTO, C.A.; REMOLLI, J.A.; NUNES, W.M.C. Resistance of ‘Pêra’ sweet orange (*Citrus sinensis*) genotypes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in field conditions. **Workshop on Xanthomonas citri/Citrus canker**, p. 78-80, 2011b.

GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; NANAMI, D.S.Y.; BARBIERI, B.B.; GUEDES, T.A.; ZANUTTO, C.A.; BOCK, C.H.; NUNES, W.M.C. Evaluation of resistance to Asiatic citrus canker among selections of Pêra sweet orange (*Citrus sinensis*). **Plant Disease**, v.100 n.10, p. 1994-2000, 2016.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B.S.; ZIMARO, T.; FICARRA, F.A.; DUGNER, G.; DAURÉLIO, L.D.; THOMAS, L.; GERHRING, C.; ORELLANO, E.G.; OTTADO, J. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, A. Mendez-Vilas (Ed). 2010

GOTTWALD, T.R. Differential Host Range of Citrus and Citrus Relatives to Citrus Canker and Citrus Bacterial Spot Determined by Leaf Mesophyll Susceptibility. **Plant Disease**, v. 77, p. 1004-1009, 1993.

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., GRAHAM, J.H. & SCHUBERT, T.S. Citrus canker: the pathogen and its impact. Online. **Plant Health Progress**, DOI:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. 2002. Acesso em 10/08/2017, 13:36.

GRAHAM J. H.; GOTTWALD, H.; RILEY, T.R.; BRUVE, M.A. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. **Phytopathology**, v.82, p.452-457. 1992.

GRAHAM J. H.; GOTTWALD, T.R.; CUBERO, J.; ACHOR, D.S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 1–15, 2004.

GRAHAM, J.H.; MYERS, M.E. Evaluation of soil applied systemic acquired resistance inducers integrated with copper bactericide sprays for control of citrus canker on bearing grapefruit trees. **Crop Protection**, v.90, p.157-162, 2016.

GRIZOTTO, R.K.; SILVA, J.A.A.; MIGUEL, F.B.; MODESTO, R.T.; VIEIRA JR, J.B. Qualidade de frutos de laranja Valencia cultivada sob sistema tecnificado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, p. 784-789, 2012.

GULSEN O.; ROOSE M.L. Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.126, p.210–215, 2001.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v.8, p.1773-1791, 1996.

HASSE, C.H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal of Agricultural Research**, v.4, n.1, p.97-104, 1915.

HAZARIKA, T.K.; HAZARIKA, B.N. SHUKLA, A.C. Genetic variability and phylogenetic relationships studies of genus *Citrus* L. with the application of molecular markers. **Genetics Resources and Crop Evolution**, v.61, p.1441-1454, 2014.

HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. **Cellular Microbiology**, v.9, n.6, p. 1385-1396, 2007.

HEATH, M.C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, v.44, p.321-334, 2000.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, v.42, n.5, p.462-468, 2001.

HU, Y.; ZHANG, J.; SOSSO, D.; FROMER, W.B.; YANG, B.; WHITE, F.F.; WANG, N.; JONES, J.B. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.111, p.521–529, 2014.

HYNNIEWTA, M.; MALIK, S.K.; RAO, S.R. Genetic diversity and phylogenetic analysis of *Citrus* (L) from north-east India as revealed by meiosis, and molecular analysis of internal transcribed spacer region of rDNA. **Meta Gene**, v.2, p.237-251, 2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 07/08/2017, 10:12.

JIA H.; ZHANG, Y.; ORBOVIC, V.; XU, J.; WHITE, F.F.; JONES, J.B.; WANG, N. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant Biotechnology Journal**, DOI: 10.1111/pbi.12677, 2016

JONES, J.; DANGL, J. The plant immune system. **Nature**, v.444, p.323-329, 2006.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Ceres, v.2, 1997.

KHALAF, A.; MOORE, G.A.; JONES, J.B.; GMITTER JR., F.G. New insights in to the resistance of Nagami kumquat to canker disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.71, p.240–250, 2007.

KOBAYASHI, A.K.; VIEIRA, L.G.E.; BESPALHOK FILHO, J.C.; LEITE JR, R.P.; PEREIRA, L.F.P.; MOLINARI, H.B.C.; MARQUES, V.V. Enhanced resistance to citrus canker in transgenic sweet orange expressing the sarcotoxin IA gene. **European Journal of Plant Pathology**, DOI 10.1007/s10658-017-1234-5, 2017.

KOIZUMI, M. Citrus canker: the world situation. In: TIMMER, L.W. (ED). **Citrus canker: An international perspective**, University of Florida. Institute of Food and Agricultural Science. Gainesville: University of Florida Press, 1985. p.2-7.

KUMAR N.; EBEL, R.C.; ROBERTS, P.D. Antioxidant metabolism of grapefruit infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p.41-49, 2011a.

KUMAR N.; EBEL, R.C.; ROBERTS, P.D. H₂O₂ metabolism during sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) ‘Hamlin’ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* interaction **Scientia Horticulturae**, v.128, p.465-472, 2011b.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.241-275, 1997.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA FILHO, H.D Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**, Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG p. 509-566., 2005

LEITE JR., R. P. Cancro cítrico no Estado do Paraná. **Laranja**, v. 10, p. 489-502, 1989.

LEITE JR., R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, v. 9, p. 3-7. 1990.

LEITE JR., R.P.; SANTOS, S.D. Suscetibilidade do limão Siciliano (*Citrus lemon*), enxertado sobre diferentes porta-enxertos, ao cancro cítrico causado por *Xanthomonas campestris* pv *citri*. **Fitopatologia brasileira**, v.13, n.4, p. 353-358, 1988.

LI, X.; XIE, R.; LU, Z.; ZHOU, Z. The origin of cultivated citrus as inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequence and amplified fragment length polymorphism fingerprints. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.135, n.4, p.341-351, 2010.

LIU, Y. HEYLING, E.; TANUMIHARDJO, A. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.11. p.530-545, 2012

LOPES, M.V.; BARRETO, M.; SCALOPPI, E.A.G.; BARBOSA, J.C.; BRUNINI, O. Mapas de zonas de risco de epidemias e zoneamento agroclimático para o Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.34, p.349-353, 2008.

LÓPEZ, M.M. Enfermedades producidas por bacterias. In: DURAN-VILA, N.; MORENO, P. (Ed.). Enfermedades de dos cítricos. Madrid: Sociedad Española de Fitopatología. p. 47-55, 2000.

MABBERLEY, D.J. Citrus (Rutaceae): A review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. **Blume**, v.49, p.481-498, 2004.

MALIK, S.K.; KUMAR, S.; SINGH, I.P.; DHARIWAL, O.P.; CHAUDHURY, R. Socio-economic importance, domestication trends and in situ conservation of wild Citrus species of Northeast India. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Disponível em <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-012-9948-x>, 2013. Acesso em 05/08/2017, 9:25.

MCLEAN, F.T. A study of the structure of the stomata of two species of Citrus in relation to citrus canker. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v.48, n.4., p. 101-106,1921.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S.Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v.126, p.969-980, 2006.

MILIND, P.; DEV, C. Orange: range of benefits. **International Research Journal of Pharmacy**, v.3, n.7, p.59-63, 2012.

MOREL; J.B.; DANGL, J.L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. **Cell Death and Differentiation**, v.4, p.671-683, 1997.

MORIMOTO, F. Situação atual da Citricultura. In: GARCIA JR., J. B.; CROCE FILHO, J.; ANDRADE, J. M. B.; STENZEL, N. M. C.; LEITE JR., R. P.; CARVALHO, S. L. C. eds. Encontro Paranaense de Citricultura, Maringá: Associação dos Engenheiros Agrônomos do Paraná. Anais... p.51-56, 1990.

NEVES, M. F. et al. O retrato da citricultura brasileira, São Paulo: CitrusBR, p. 138, 2011.

NICOLOSI, E.; DENG, Z.N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.100, p.1155–1166, 2000.

OLIVEIRA J.T.A.; BARRETO, A.L.H.; VASCONCELOS, I.M.; ELOY, Y.R.G.; GONDIM, D.M.F.; FERNANDES, C.F.; FREIRE-FILHO, F.R. Role of antioxidant enzymes, hydrogen peroxide and PR-proteins in the compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Plant Physiology & Pathology**, v.2, n.3, 2014. Disponível em <http://dx.doi.org/10.4172/2329-955X.1000131>. Acesso em 19/08/2017, 00:16.

PADMANABHAM, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C. K. S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Journal Phytopathology**, v. 26, p. 215-217, 1973.

PANG, X.M.; HU, C.G.; DENG, X.X. Phylogenetic relationships within *Citrus* and its related genera as inferred from AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.54, p.429-436, 2006.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A., (Editores). Manual de fitopatologia - princípios e conceitos. Vol. I. 4.Ed. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, p. 593-636, 2011.

PITINO, M.; ARMSTRONG, C.M.; DUAN, Y. Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-triggered immunity responses. **Horticulture Research**, DOI:10.1038/hortres.2015.42, 2015.

PRUVOST, O.; BOHER, B.; BROCHERIEUX, C.; NICOLE, M.; CHIROLEU, F. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in canker lesions differing in age submitted to tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. **Phytopathology**, v.92, n.4, p.336-346, 2002.

RAMADUGU, C.; PFEIL, B.E.; KEREMANE, M.L.; LEE, R.F.; MAUREIRA-BUTLER, I.J.; ROOSE, M.L. A six-nuclear gene phylogeny of *Citrus* (Rutaceae) taking into account hybridization and lineage sorting. **PLOS ONE**, v.8, n.7, p.1-15, 2013.

RODRIGUES, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.A. Citricultura brasileira. 2. Ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991 491p.

ROSSETTI, V.V. 2001. Manual ilustrado de doenças dos citros. Piracicaba, SP, FEALQ/FUNDECITRUS. 207p.

SALIBE, A. A. "The Brazilian Citrus Industry" In Proc. First. Int. Citrus Short Course, edited by Jackson, L. K., Krezdorn, A. H., and Soule, J. Gainesville: University of Florida, 44-50, 1974.
SANTOS, C.F. O cancro cítrico: ocorrência no Brasil e seu controle. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. **Citricultura Brasileira**, Fundação Cargill, v.2, p.787-823, 1991.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.

SCHAAD N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.V.; STROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.M. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.690-695, 2006.

SCHULZE-LEFERT, P; ROBATZED, S. Plant pathogens trick guard cells into opening the gates. **Cell**, v.126, p.831-834, 2006.

SCORA, R.W. On the History and Origin of *Citrus*. 1975;102(6):369–375. Source: Bulletin of the Torrey Botanical Club, Published by: Torrey Botanical Society Stable. URL: Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2484763> Acesso em 01/08/2017, 14:49

SHARMA, S.K.; SHARMA R.R. Citrus canker approaching century: A review. In: Tennant P, Benkeblia N (Eds) Citrus III. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v.3, n.2, p.54-65, 2008.

STALL, R.E.; SEYMOUR, C.P. Canker, a threat to citrus in the Gulf coast states. **Plant Disease**, v.67, p.581, 1983.

SWARUP, S.; DE FEUTER, R.; BRIANSKY, R.H.; GABRIEL, D.W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. **Phytopathology**, v.81, p.802-809, 1991.

SWINGLE W.T. AND REECE P.C. The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuther W., Webber H.J. and Batchelor L.D. (eds), **The citrus industry**, v.1, p. 90-430, 1967.

TANAKA, T. Fundamental discussion of *citrus* classification. **Studia Citrologia**, v.14, p1-6, 1977.

USDA, Citrus: World Markets and Trade, Current Report. .2017. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>. Acesso em 02/08/2017, 11:06.

UZUN, A.; YESILOGLU, T. Genetic Diversity in Citrus, Genetic Diversity in Plants, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0185-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/geneticdiversity-in-plants/genetic-diversity-in-citrus>, 2012.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

VAN LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V. Recommendation for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, n.3, p.245-264, 1994.

VELLOSILLO, T.; VICENTE, J.; KULASEKARAN, S.; HAMBERG, M.; CASTRESANA, C. Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. **Plant Physiology**, v.154, p.444-448, 2010.

VERNIÈRE, C.J., GOTTWALD, T.R. AND PRUVOST, O. Disease Development and Symptom Expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Various Citrus Plant Tissues. **Phytopatology**, v.93, p.832-843, 2003.

VILORIA, Z.; DROULLARD, D.L.; GRAHAM, J.H.; GROSSER, J.W. Screening triploid hybrids of 'Lakeland' limequat for resistance to citrus canker. **Plant disease**, v.88, n.10, p.1056-1060, 2004.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1227-1236, 2002.

WANG, Y.; FU, X.; LIU, J.; HONG, N. Differential structure and physiological response to canker challenge between 'Meiwa' kumquat and 'Newhall' navel orange with contrasting resistance. **Scientia Horticulturae**, v.128, p.115-123, 2011.

WEBBER, H.J. History and development of the citrus industry. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD, editors. The citrus industry. Vol. 1. History, world distribution, botany and varieties. Berkeley, Calif.: University of California, Berkeley, Division of Agricultural Sciences. p 1–39, 1967.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v.322, p.681-692, 1997.

XU, Q.; CHEN, L.; RUAN, X.; CHEN, D.; ZHU, A., CHEN, C.; BERTRAND, D.; JIAO, W.; HAO, B.; LYON, M.P.; CHEN, J.; GAO, S.; XING, F.; LAN, H.; CHANG, J.; GE, X.; LEI, Y.; HU, Q.; MIAO, Y.; WANG, L.; XIAO, S.; BISWAS, M.K.; ZENG, W.; GUO, F.; CAO, H.; YANG, X.; XU, X.; CHENG, Y.; XU, J.; LIU, J.; LUO, O.J.; TANG, Z.; GUO, W.; KUANG, K.; ZHANG, H.; ROOSE, M.L.; NAGARAJAN, N.; DENG, X.; RUAN, Y. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature genetics**, v.45, n.1., p.59-68, 2013.

ZHANG, X.D.; FRANCIS, M.I.; DAWSON, W.O.; GRAHAM, J.H.; ORBOVIÉ, V.; TRIPLETT, E.W.; MOU, Z. Over-expression of the *Arabidopsis NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, v.128, p.91–100, 2010.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE VARIEDADES DE CITROS À

Xanthomonas citri subsp. *citri*

RESUMO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, afeta a maioria das variedades comerciais de citros e causa grandes prejuízos para a citricultura no mundo todo. Estudos indicam a presença de diferentes níveis de resistência ao cancro cítrico entre as variedades comerciais. No Brasil, a Laranja Pêra é uma das variedades mais produzidas, devido às suas características organolépticas, moderada resistência ao cancro cítrico e alta produtividade. O uso de genótipos resistentes é uma alternativa viável ao produtor e sustentável ao meio ambiente, consiste em uma ferramenta de grande importância no controle de patógenos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de 14 genótipos de citros à bactéria *X. citri* subsp. *citri*. As plantas foram avaliadas em dois ensaios (fevereiro e setembro de 2016). As inoculações foram realizadas através da perfuração do limbo foliar com agulha (0,55 x 0,20 mm). O inóculo foi ajustado a uma concentração de 10^8 unidades formadoras de colônia/mL (UFC/mL), em espectrofotômetro (600 nm). As avaliações foram feitas aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação (DAI), através da medição dos diâmetros das lesões. Os resultados mostraram que os genótipos Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL se destacaram, apresentando as menores médias de diâmetros de lesões nos dois ensaios, sugerindo que estes genótipos apresentam maiores níveis de resistência ao patógeno em comparação aos demais genótipos avaliados.

Palavras-chave: Diâmetro de lesão. Controle. Resistência. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

ABSTRACT

Citrus canker, caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, affects most of the commercial varieties of citrus and causes great damages to citriculture worldwide. Studies indicate the presence of different levels of resistance to citrus canker among commercial varieties. In Brazil, Pera orange is one of the most produced varieties due to its organoleptic characteristics, moderate resistance to citrus canker and high productivity. The use of resistant genotypes is a viable alternative to the producer and it is sustainable to the environment, besides is a tool of great importance in the control of pathogens. Therefore, the present work had aimed to evaluate the resistance of 14 genotypes of *Citrus* to the bacterium *X. citri* subsp. *citri*. The plants were evaluated in two trials (February and September 2016). The inoculations were performed through needle-wounding, and the inoculum was adjusted to a concentration of 10^8 colony forming units/mL (CFU/mL) in a spectrophotometer (600 nm). The evaluations were performed at 4, 8, 12 and 16 days after inoculation (DAI), by measuring the diameters of the lesions. The results showed that the Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL genotypes had the lowest mean lesion diameters in both trials, suggesting that these genotypes present a higher level of resistance to the pathogen in comparison to the other analyzed genotypes.

Keywords: Lesion diameter. Control. Resistance. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

INTRODUÇÃO

O Brasil contribuiu, em 2017, com uma produção de 19,2 milhões de toneladas de laranjas, o que corresponde a 38% da produção mundial. Dentre as laranjas doce, as mais plantadas no país são as Laranjas Pêra, Natal e Valência (DONADIO et al., 2005; USDA, 2017).

Devido às características organolépticas, moderada resistência ao cancro cítrico (AMARAL et al., 2010; CARVALHO et al., 2015) e alta produtividade, as laranjas doce, da variedade Pêra conquistaram a preferência de consumidores e produtores de citros, sendo amplamente comercializadas tanto para o consumo *in natura* quanto para o preparo de suco concentrado congelado.

Embora o país seja considerado o maior produtor mundial de laranjas, os pomares são afetados por diversas doenças, e dentre elas, destaca-se o cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006) que afeta a maioria das variedades comerciais de citros e causa sérios prejuízos econômicos em pomares comerciais do mundo todo (ABE; BENEDETTI, 2016).

A bactéria penetra na planta através de aberturas naturais ou ferimentos (GRAHAM et al., 1992) e os sintomas da doença podem ser observados em toda a parte aérea da planta, principalmente em folhas, ramos e frutos, os quais podem apresentar lesões necróticas com a posterior formação de um halo amarelo. Em condições mais avançadas da doença, pode-se observar a desfolha das plantas e a queda prematura dos frutos (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

As medidas para o controle da doença utilizadas atualmente, como a aplicação de produtos cúpricos e a implantação de quebra-ventos, não são totalmente eficazes para o controle do cancro cítrico, sendo assim, é necessária a busca por variedades consideradas resistentes, uma vez que a resistência genética é o método mais eficaz e econômico para o controle de doenças (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002; YANG et al., 2011).

As variedades de citros apresentam diferentes níveis de suscetibilidade à *X. citri* subsp. *citri*. (DAS, 2003; YANG et al., 2011). No geral, plantas com maiores períodos de crescimento vegetativo e com maior emissão de folhas jovens são consideradas mais vulneráveis ao patógeno, quando comparadas a variedades cujas folhas amadurecem de forma mais rápida (GOTTWALD, 1993).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de selecionar variedades de citros que apresentem maior produtividade, resistência a doenças e frutos de maior qualidade (KHALAF et al., 2007; GONÇALVES-ZULIANI et al., 2011, 2016, CHEN et al., 2012). Considerando a importância econômica das laranjas doce no país, o presente estudo tem o objetivo de avaliar 14 genótipos de citros, dos quais 12 são de laranja doce (*C. sinensis*), variedade Pêra, com relação à resistência à *X. citri* subsp. *citri*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram avaliados 14 genótipos de *Citrus* (Tabela 1) enxertados sob limão-cravo (*C. limonia*), provenientes do Viveiro de Mudanças Pratinha (VMP), localizado no município de Atalaia-PR.

Dentre os genótipos avaliados no experimento (Tabela 1), 12 genótipos de laranjas Pêra foram comparados com a variedade de laranja doce Hamlin e com a variedade de tangerina Vermelha, utilizados como controles suscetível e resistente, respectivamente (CARVALHO et al., 2015).

Tabela 1. Genótipos de *Citrus* utilizados no experimento de casa de vegetação.

Numeração	Genótipo	Nome Comum	Nome Científico
1	Hamlin	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
2	Vermelha	Tangerina	<i>C. reticulata</i>
3	Pêra EEL	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
4	Pêra Bianchi/CC	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
5	Pêra IAC	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
6	Pêra Ipiriguaçu	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
7	Pêra IAC 2000/1	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
8	Pêra Ovale Siracusa	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
9	Pêra Ovale	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
10	Pêra IAC 2000/2	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
11	Pêra M5	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
12	Pêra Arapongas	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
13	Pêra 58	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
14	Pêra 59	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>

2. Implantação do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) (23°23'57,8"S; 51°57'5,3"O e aproximadamente 500 m de altitude) da Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, em duas épocas distintas, em fevereiro e setembro de 2016.

Em cada período de avaliação, foram utilizadas três plantas por genótipo, as quais foram mantidas em casa de vegetação, com irrigação automática. Foram realizadas adubações periódicas de N, P, K e micronutrientes. Cerca de 50 dias antes da inoculação, as plantas foram podadas para a obtenção de folhas jovens e homogêneas, com 75 a 100% de expansão foliar (VILORIA et al., 2004).

3. Cultura bacteriana e preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir de cultura pura de *X. citri* subsp. *citri* (isolado Xcc 306), obtida junto ao acervo de culturas puras do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e mantida em geladeira, em tampão fosfato (0,075 M, pH 7,0). Posteriormente, a bactéria foi reativada em placas de Petri contendo meio Manitol Glutamato Yeast (10 g manitol, 2 g ácido L-glutâmico, 0,5 g fosfato de potássio, 0,2 g NaCl, 0,2 g MgSO₄·7H₂O, 1 g extrato de levedura, 15 g ágar/L de água destilada), segundo Nocchi (2014).

Para o crescimento das colônias, as placas de Petri foram mantidas em estufa bacteriológica por 48 horas a 28°C. Após este período, as colônias bacterianas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, contendo tampão fosfato (0,075 M, pH 7,0). A concentração do inóculo foi então ajustada para 10⁸ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL), através da leitura a 600 nm em um aparelho espectrofotômetro (BELASQUE JR.; JESUS JR.; 2006) para posterior inoculação.

4. Inoculação e avaliação dos sintomas

O método de inoculação utilizado foi o de ferimento do limbo foliar com agulha. Imediatamente após a imersão de uma agulha de 0,55 x 0,2 mm em suspensão bacteriana, foram

feitas oito perfurações equidistantes na face abaxial das folhas, atravessando o limbo foliar. Para cada perfuração, foi realizada uma imersão da agulha em suspensão bacteriana.

Foram inoculadas 15 folhas por planta, sendo 3 plantas por genótipo, em cada período de avaliação. Durante as primeiras 24 horas após a inoculação, foi realizado o molhamento de toda a casa de vegetação, com o objetivo de elevar a umidade e favorecer o estabelecimento da bactéria nas folhas.

O diâmetro das lesões foi medido com o auxílio de um micrômetro (Micrômetro externo Disma) aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação (DAI). Em cada data de avaliação foram mensurados os diâmetros de 3 lesões por planta, totalizando 126 leituras de diâmetro de lesões por data de avaliação. Para que as medidas fossem realizadas com um padrão, foram feitas as leituras das mesmas lesões aos 4, 8, 12 e 16 DAI, sempre no sentido longitudinal das folhas, na face abaxial, desconsiderando a presença do halo e medindo-se apenas o tecido necrosado.

5. Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 14 tratamentos (genótipos de citros) e 9 repetições. Os diâmetros das lesões foram comparados entre os tratamentos por análise de variância (teste F) e teste de agrupamento de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o auxílio do Programa SISVAR (FERREIRA, 2011)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genótipos estudados apresentaram diferentes níveis de resistência ao cancro cítrico. Sintomas característicos da doença também foram observados em outros experimentos com espécies de citros inoculadas artificialmente com *X. citri* subsp. *citri* (GOTTWALD, 1993; DENG et al., 2010; GONÇALVES-ZULIANI et al., 2016).

Os primeiros sintomas do cancro cítrico surgiram no oitavo dia após a inoculação, em ambos os períodos de avaliação, com a formação de lesões eruptivas, ao redor do ponto de inoculação. Estes resultados corroboram com estudos realizados por Belasque Jr et al. (2008), onde plantas inoculadas através de ferimentos de agulha apresentaram os primeiros sintomas de cancro cítrico após uma a duas semanas após a inoculação.

A Figura 1 mostra o crescimento dos diâmetros das lesões no decorrer do tempo, em relação à cada variedade estudada no primeiro ensaio (fevereiro de 2016). É possível perceber que em todos os genótipos avaliados, houve um crescimento gradual do tamanho das lesões no período do experimento, sendo que as lesões variaram de 0,83 a 1,29 mm aos 4 DAI até 1,21 a 1,64 mm aos 16 DAI (Figura 1). Nociti et al. (2006) estudando linhagens de *Xanthomonas*, observaram a evolução do diâmetro das lesões por um período de 94 dias e constataram uma variação de 1,28 a 5,15 mm no tamanho médio das lesões. Da mesma forma, Gonçalves-Zuliani et al. (2016) também observaram um aumento no tamanho das lesões no decorrer do tempo através de estudos com genótipos de Laranja Pêra inoculadas com a mesma estirpe de *X. citri* subsp. *citri*.

Do mesmo modo, no segundo período de avaliação, em setembro de 2016 (Figura 2), foi possível observar a mesma tendência de crescimento dos diâmetros das lesões no decorrer do tempo. Durante este período, observou-se uma variação nos diâmetros das lesões de 0,68 a 1,4 mm aos 4 DAI até 1,12 a 1,64 mm aos 16 DAI.

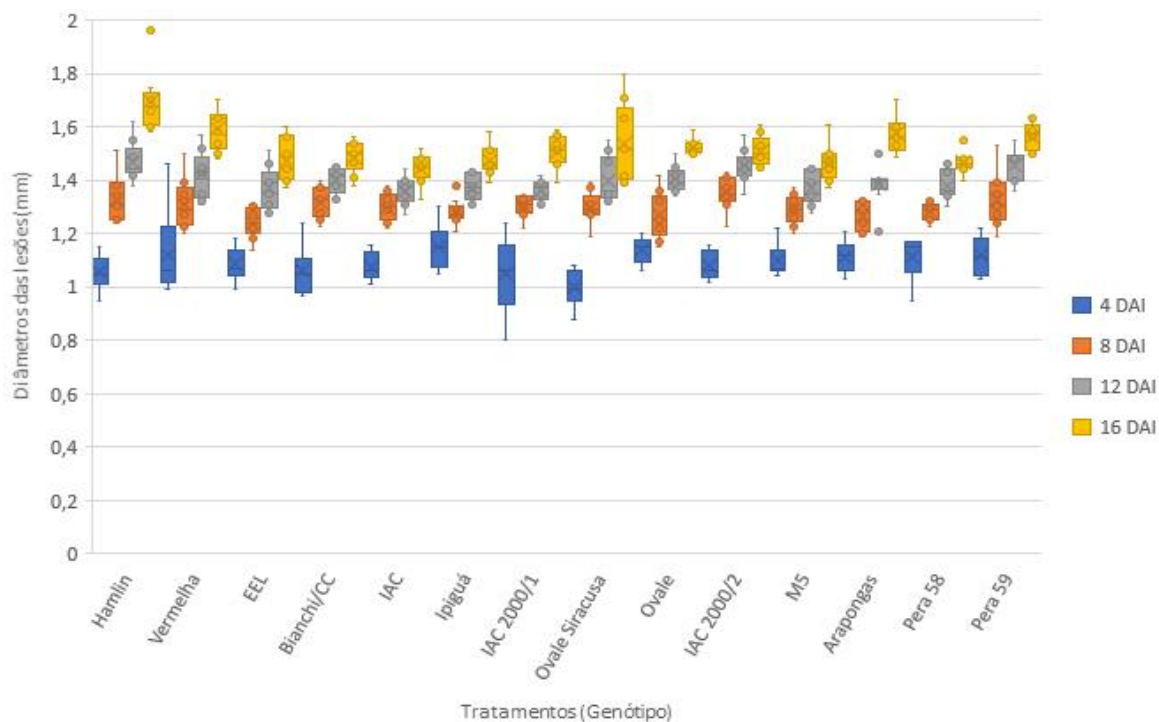


Figura 1. Evolução dos diâmetros de lesão, em mm, nos genótipos de citros aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação (DAI) com *X. citri* subsp. *citri* no primeiro período de avaliação (fevereiro de 2016). Barras indicam a média \pm desvio padrão.

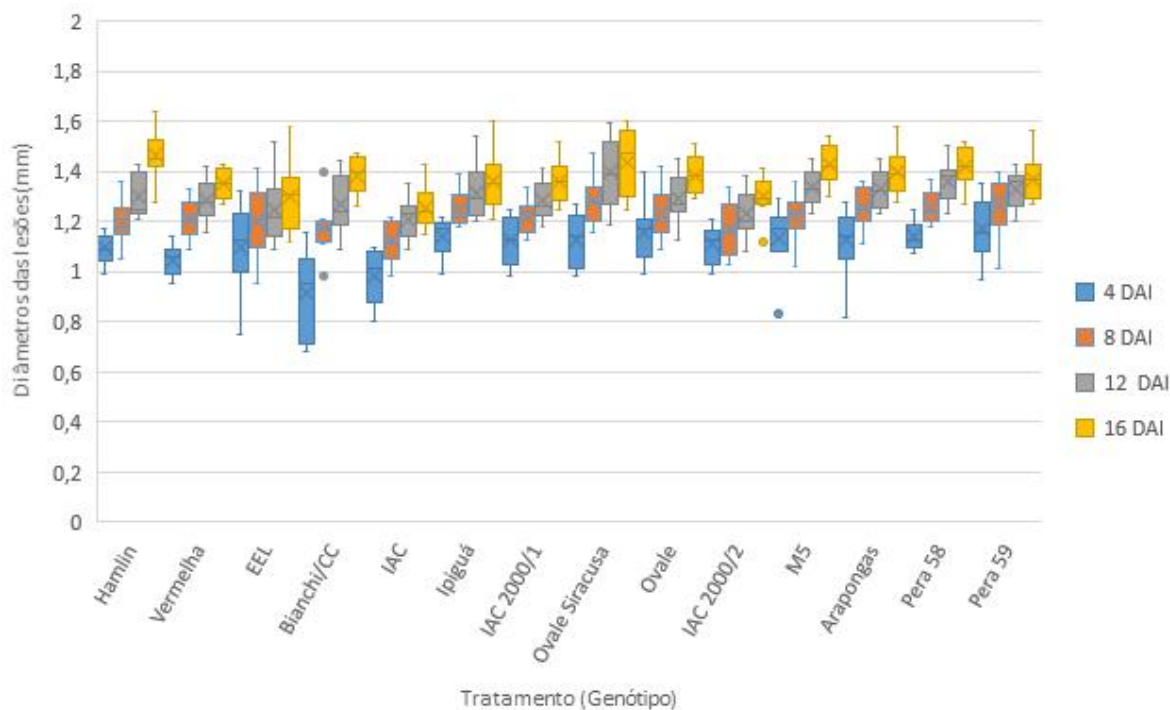


Figura 2. Evolução dos diâmetros de lesão, em mm, nos genótipos de citros aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação (DAI) com *X. citri* subsp. *citri* no segundo período de avaliação (setembro de 2016). Barras indicam a média \pm desvio padrão.

A Tabela 2 mostra a análise de variância do primeiro ensaio, de fevereiro de 2016. Através dos dados obtidos, é possível perceber que aos 4 DAI, houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados, a um nível de significância de 5%, enquanto que nas avaliações 12 e 16 DAI, houve diferenças significativas a um nível de significância de 1%. Da mesma forma, ao observar a Tabela 3, com a análise de variância do segundo ensaio (setembro de 2016), é possível constatar a presença de diferenças significativas nas avaliações de 4, 12 e 16 DAI, a um nível de significância de 1%.

Tabela 2. Análise de variância do diâmetro da lesão (fevereiro de 2016).

FV	GL	QM			
		4 DAI	8 DAI	12 DAI	16 DAI
Tratamento	13	0,014 *	0,007 ^{ns}	0,011 **	0,040 **
Resíduo	112	0,007	0,004	0,004	0,005
Média geral		1,089	1,297	1,400	1,522
CV (%)		7,861	5,166	4,650	4,964

FV: Fonte de variação; GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; DAI: Dias Após a Inoculação; CV: Coeficiente de Variação * Nível de significância a 5%. ** Nível de significância a 1%. ^{ns} Não significativo.

Tabela 3. Análise de variância do diâmetro da lesão (setembro de 2016).

FV	GL	QM			
		4 DAI	8 DAI	12 DAI	16 DAI
Tratamento	13	0,046 **	0,017 ^{ns}	0,023 **	0,030 **
Resíduo	112	0,013	0,010	0,009	0,009
Média geral		1,097	1,217	1,299	1,372
CV (%)		10,420	8,047	7,524	7,030

FV: Fonte de variação; GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; DAI: Dias Após a Inoculação; CV: Coeficiente de Variação ** Nível de significância a 1% ^{ns} Não significativo.

Estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, foi possível comprovar a formação de grupos a 5% de probabilidade entre os diâmetros médios de lesões nos genótipos em ambos os períodos avaliados, aos 4, 12 e 16 DAI (Tabelas 4 e 5, Figuras 3 e 4).

No primeiro período de avaliação (Tabela 4 e Figura 3), aos 4 DAI, observou-se que as variedades de laranja Pêra Ovale Siracusa, Pêra IAC 2000/1, Pêra Bianchi/CC, Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL foram agrupadas juntamente com o controle suscetível Hamlin, enquanto que as demais variedades de laranja Pêra (Pêra M5, Pêra 58, Pêra Arapongas, Pêra 59, Pêra Ovale e Pêra Ipiгуá) foram estatisticamente similares ao controle resistente Vermelha. Nesta mesma data de avaliação, foi possível constatar que a menor média dos diâmetros de

lesão, de 0,997 mm, foi observada na variedade Pêra Ovale Siracusa, enquanto a maior média, de 1,15 mm, foi observada na variedade Pêra Ipirigua.

Na avaliação de 12 DAI, entretanto, o maior diâmetro de lesão, 1,469 mm, foi observado no genótipo Hamlin, o controle suscetível, enquanto que a menor média de diâmetro de lesões foi observada na variedade de Laranja Pêra IAC, a qual apresentou 1,359 mm. Nesta data de avaliação as variedades Pêra 59, Pêra IAC 2000/2 e Vermelha, foram estatisticamente semelhantes ao controle suscetível Hamlin. Por outro lado, um outro grupo foi formado pelas variedades Pêra IAC, Pêra IAC 2000/1, Pêra M5, Pêra EEL, Pêra Ipirigua, Pêra 58, Pêra Arapongas, Pêra Ovale Siracusa, Pêra Ovale e Pêra Bianchi/CC, as quais podem ser consideradas resistentes em relação às demais variedades avaliadas.

Tabela 4: Genótipos de citros inoculados com *X. citri* subsp. *citri*, avaliados em fevereiro de 2016 (diâmetros médios de lesão, em mm).

Genótipos	Médias e grupos de similaridade		
	4 DAI	12 DAI	16 DAI
Hamlin	1,054 a	1,469 b	1,694 c
Vermelha	1,120 b	1,426 b	1,596 b
EEL	1,087 a	1,374 a	1,476 a
Bianchi/CC	1,059 a	1,403 a	1,487 a
IAC	1,077 a	1,359 a	1,441a
Ipirigua	1,150 b	1,376 a	1,474 a
IAC 2000/1	1,050 a	1,362 a	1,506 a
Ovale Siracusa	0,997 a	1,399 a	1,535 a
Ovale	1,135 b	1,402 a	1,527 a
IAC 2000/2	1,081 a	1,452 b	1,509 a
M5	1,099 b	1,371 a	1,468 a
Arapongas	1,114 b	1,383 a	1,573 b
58	1,113 b	1,380 a	1,469 a
59	1,116 b	1,454 b	1,566 a

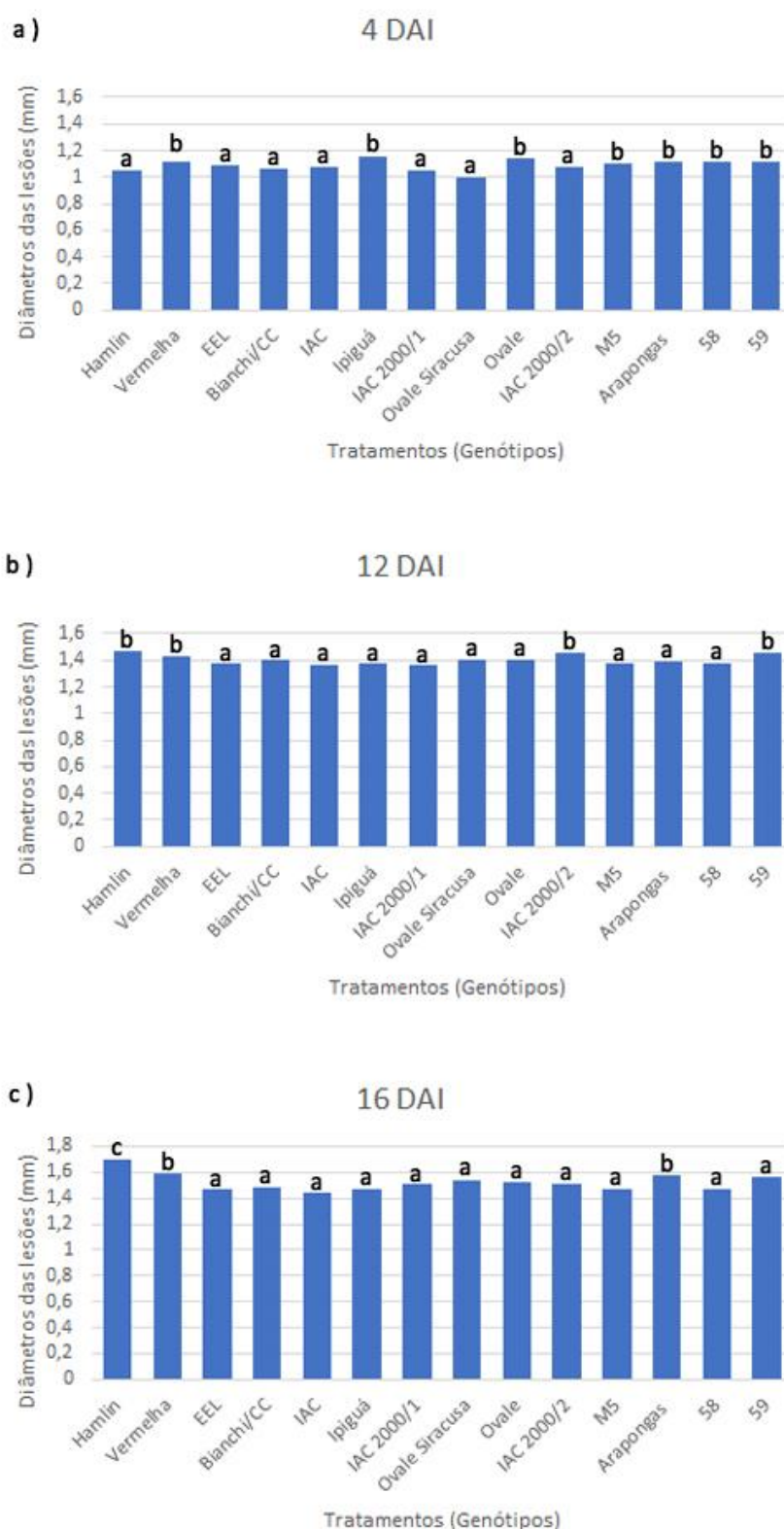


Figura 3. Diâmetros médios de lesões (mm) causados por *X. citri* subsp. *citri* nos diferentes genótipos de citros, em fevereiro de 2016. a) 4 DAI (dias após a inoculação), b) 12 DAI, c) 16 DAI. As letras indicam o agrupamento de médias pelo teste de Scott-Knott a 5%.

A variedade Pêra IAC novamente apresentou a menor média de diâmetro de lesões, com 1,441 mm e ficou agrupada juntamente com as variedades de laranja Pêra M5, 58, Ipirigua, EEL, Bianchi/CC, IAC 2000/1, IAC 2000/2, Ovale, 59 e Ovale Siracusa. Gonçalves-Zuliani et al. (2016), ao analisar 25 genótipos de Laranja Pêra, também identificaram que as variedades EEL, Bianchi/CC, Ipirigua, IAC 2000/1 e Ovale Siracusa apresentaram os menores diâmetros de lesão, implicando em maior resistência em relação às demais variedades analisadas.

No segundo período de avaliação (Tabela 5 e Figura 4), em setembro de 2016, foram observadas diferenças significativas aos 4 DAI, entre as variedades Pêra Bianchi/CC e Pêra IAC em contraste com as demais variedades avaliadas. Aos 12 DAI, entretanto, o maior diâmetro médio de lesão foi observado no genótipo de Laranja Pêra Ovale Siracusa (1,396 mm), a qual se agrupou com as variedades Pêra Ipirigua, Pêra 59, Pêra Araçongas, Pêra M5 e Pêra 58, as quais apresentaram os maiores médias de diâmetros de lesão, enquanto que os menores diâmetros médios foram observados nas Pêras IAC e IAC 2000/2, com 1,211 mm e 1,229 mm, respectivamente, que se agruparam com as demais variedades analisadas.

Tabela 5: Genótipos de citros inoculados com *X. citri* subsp. *citri*, avaliados em setembro de 2016 (diâmetros médios de lesão, em mm).

Genótipos	Médias e grupos de similaridade		
	4 DAI	12 DAI	16 DAI
Hamlin	1,093 b	1,299 a	1,462 b
Vermelha	1,047 b	1,288 a	1,350 b
EEL	1,097 b	1,248 a	1,299 a
Bianchi/CC	0,912 a	1,272 a	1,384 b
IAC	0,983 a	1,211 a	1,256 a
Ipirigua	1,143 b	1,313 b	1,361 b
IAC 2000/1	1,127 b	1,281 a	1,360 b
Ovale Siracusa	1,126 b	1,397 b	1,438 b
Ovale	1,158 b	1,294 a	1,386 b
IAC 2000/2	1,108 b	1,229 a	1,297 a
M5	1,137 b	1,338 b	1,430 b
Araçongas	1,123 b	1,329 b	1,396 b
58	1,141 b	1,361 b	1,418 b
59	1,170 b	1,328 b	1,371 b

No 16º dia após a inoculação, foi observado o mesmo resultado do primeiro período de avaliação, com o genótipo suscetível Hamlin apresentando o maior diâmetro médio de lesão (1,462 mm), em contraste com a Pêra IAC, com o menor diâmetro médio de lesão (1,256 mm). Nesta data de avaliação, os genótipos Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL apresentaram os menores diâmetros de lesão, e conseqüentemente, podem ser consideradas mais resistentes à *X. citri* subsp. *citri*, neste estudo, quando comparadas às demais variedades avaliadas.

Aos comparar os dois períodos de experimento, fevereiro de 2016 e setembro de 2016, tem-se que ao final de ambos os experimentos, a variedade Pêra IAC apresentou os menores diâmetros de lesão, enquanto a variedade Hamlin apresentou as maiores médias de diâmetros de lesão. Sendo assim, estes resultados corroboram com estudos de Amaral et al. (2010), no qual classificam a variedade Hamlin como suscetível.

Dentre as variedades de citros avaliadas, apenas as variedades Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL agruparam-se em ambos os períodos entre aquelas que apresentaram os menores diâmetros médios de lesão, sendo assim, podem ser consideradas as variedades mais resistentes dentre os genótipos analisados. Estes resultados também estão de acordo com as pesquisas de Amaral et al (2010), onde classificam a variedade Pêra EEL como resistente e a Pêra IAC como moderadamente resistente.

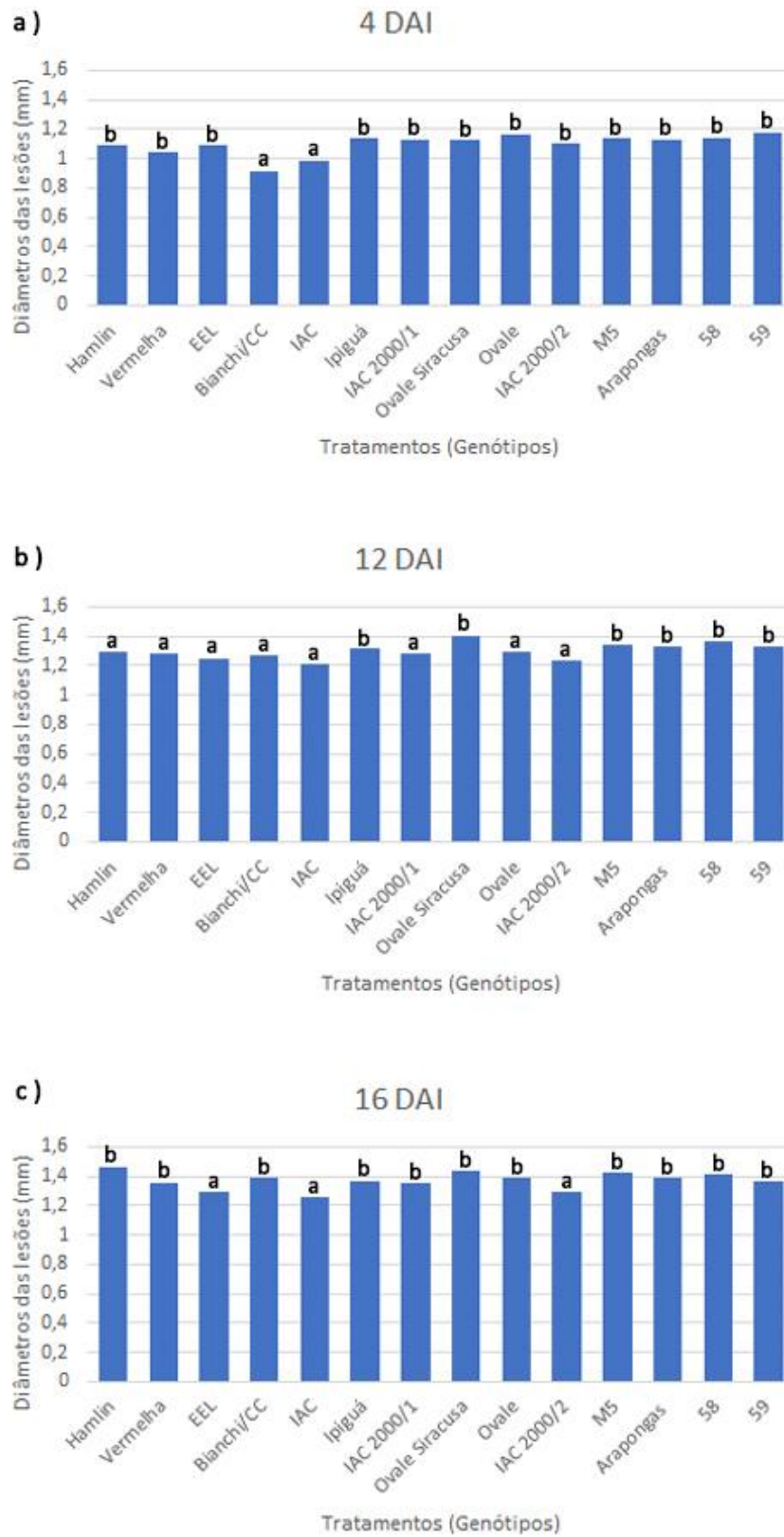


Figura 4. Diâmetros médios de lesões (mm) causados por *X. citri* subsp. *citri* nos diferentes genótipos de citros, em setembro de 2016. a) 4 DAI (dias após a inoculação), b) 12 DAI, c) 16 DAI. As letras indicam o agrupamento de médias pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Possivelmente os menores diâmetros de lesão observados estejam relacionados a características físicas e químicas inerentes aos genótipos estudados, uma vez que os mecanismos de defesa pré e pós-formados atuam nas respostas de defesa da planta contra patógenos (JONES, DANGL, 2006; PASCHOLATI, 2011). Dentre estes mecanismos, acredita-se que os mecanismos pré-formados, como estômatos e cutícula atuem como barreira inicial de defesa da planta, enquanto os mecanismos pós-formados bioquímicos, como a produção de espécies reativas de oxigênio e proteínas relacionadas a patogênese, atuem como barreiras secundárias, após a entrada dos patógenos na planta.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os genótipos Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL apresentam níveis de resistência ao cancro cítrico maiores em relação aos outros genótipos avaliados. Estas informações a respeito da resistência à *X. citri* subsp *citri* em variedades de Laranja doce (*C. sinensis*) é de grande importância, uma vez que a utilização de plantas resistentes é a melhor alternativa para o controle da doença à longo prazo. Além disso, o conhecimento de genótipos considerados resistentes pode auxiliar os programas de melhoramento de citros que utilizam a transformação genética visando a resistência ao cancro cítrico.

CONCLUSÃO

As laranjas doce (*C. sinensis* L.), variedades Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL, inoculadas com *X. citri* subsp. *citri*, apresentaram as menores médias de diâmetros de lesão ao final dos experimentos realizados, mostrando que estas variedades apresentam maiores níveis de resistência ao cancro cítrico, quando comparadas aos demais genótipos avaliados.

REFERÊNCIAS

- ABE, V.Y.; BENEDETTI, C.E. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. **Molecular Plant Pathology**, v.17, n.8, p.1223-1236, 2016.
- AMARAL, A. M.; CARVALHO, S. A.; SILVA, L. F. C.; MACHADO, M. A. Reaction of genotypes of citrus species and varieties to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under Greenhouse conditions. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, p. 519-524, 2010.
- 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.
- BRUNINGS, A. M. & GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.141-157, 2003.
- CARVALHO, S.A.; NUNES, W.M.C.; BELASQUE JR, B.; MACHADO, M.A.; CROCE-FILHO, J.; BOCK, C.H.; ABDO, Z. Comparison of resistance to Asiatic citrus canker among different genotypes of *Citrus* in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. **Plant Disease**, v.99, n.2, p.207-218, 2015.
- CHEN, P.; WANG, L.; CHEN, Y.; TZENG, K.; CHANG, S.; CHUNG, K.; LEE, M. Understanding cellular defense in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.79, p.1-12, 2012.
- DENG, Z. N.; XU, L.; LI, D. Z.; LONG, G. Y.; LIU, L. P.; FANG, F.; SHU, G. P. Screening citrus genotypes for resistance to canker disease (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*). **Plant Breeding**, v. 129, p. 341-345, 2010.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, (UFLA). v. 35, p. 1039-1042, 2011.
- GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; BELASQUE JR, J.; ZANUTTO, C.A.; REMOLLI, J.A.; NUNES, W.M.C. Resistance of 'Pêra' sweet orange (*Citrus sinensis*) genotypes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in field conditions. **Workshop on Xanthomonas citri/Citrus canker**, p. 78-80, 2011b.
- GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; NANAMI, D.S.Y.; BARBIERI, B.B.; GUEDES, T.A.; ZANUTTO, C.A.; BOCK, C.H.; NUNES, W.M.C. Evaluation of resistance to Asiatic citrus canker among selections of Pêra sweet orange (*Citrus sinensis*). **Plant Disease**, v.100 n.10, p. 1994-2000, 2016.
- GOTTWALD, T. R. Differential host range of Citrus and Citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. **Plant Disease**, v. 77, p. 1004-1009, 1993.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. **Plant Health Progress**, DOI:1094/PHP-2002-0812-01-RV. <http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/>. 2002.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v. 82, p. 1319-1325, 1992.

JONES, J.; DANGL, J. The plant immune system. **Nature**, v.444, p.323-329, 2006.

KHALAF, A.; MOORE, G.A.; JONES J.B.; GMITTER JR, F.G. New insights in to the resistance of Nagami kumquat to canker disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.71, p.240–250, 2007.

NOCCHI, P.T.R. Estudo da diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e avaliação de meios de cultivo. 2014. 104f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, 2014. – UEM.

NOCITI, L. A. S.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J.; FRANCISCHINI, F. J. B.; BELASQUE JR., J. Agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* tipo C em lima ácida Galego. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 140-146, 2006.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A., (Editores). Manual de fitopatologia - princípios e conceitos. Vol. I. 4.Ed. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, p. 593-636, 2011.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 690-695, 2006.

VILORIA, Z.; DROUILLARD, D. L.; GRAHAM, J. H.; GROSSER, J. W. Screening triploid hybrids of Lakeland limequat for resistance to citrus canker. **Plant Disease**, v. 88, p. 1056-1060, 2004.

YANG, L.; HU, C.; LI, N.; ZHANG, J.; YAN, J.; DENG, Z. Transformation of sweet Orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA-nls* for acquiring resistance to citrus canker disease. **Plant Molecular Biology**, v. 75, p.11-23, 2011.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE GENÓTIPOS DE CITROS À *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

RESUMO

A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é a bactéria responsável por causar o cancro cítrico, doença que atinge os pomares comerciais do mundo todo. O controle do cancro cítrico é baseado, principalmente, em medidas de proteção e erradicação. Apesar destas estratégias apresentarem resultados satisfatórios, a utilização de cultivares resistentes, consiste em um método mais econômico para os citricultores e sustentável ao meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi investigar as respostas de defesa de 14 genótipos de *Citrus*, através das análises das atividades das enzimas relacionadas à defesa (peroxidase, catalase e superóxido dismutase). O experimento foi conduzido de dezembro de 2016 a janeiro de 2017, em casa de vegetação, do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM). As coletas para as análises foram realizadas a 0h, 24h e 16 dias após a inoculação em folhas inoculadas e sem inoculação. Os resultados mostram que a variedade Pêra IAC foi a única que apresentou elevados níveis de atividade das três enzimas analisadas, após a inoculação com o patógeno, sugerindo que esta variedade é a mais resistente entre os genótipos analisados.

Palavras-chave: Resistência. Enzimas relacionadas à resistência. Cancro cítrico.

ABSTRACT

Xanthomonas citri subsp. *citri* is the bacterium responsible for causing citrus canker, a disease that affects the commercial orchards worldwide. Citrus canker control is primarily based on protection and eradication measures. Although these strategies present satisfactory results, the use of resistant cultivars is a more economical method for citrus growers and is environmentally sustainable. The objective of this work was to investigate the defense responses of 14 *Citrus* genotypes, through analysis of the defense-related enzymes activities (peroxidase, catalase and superoxide dismutase). The experiment was conducted from December 2016 to January 2017, in a greenhouse, from the Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), State University of Maringá (UEM). The collections for the analyzes were carried out at 0h, 24h and 16 days after inoculation in inoculated and non-inoculated leaves. The results showed that the Pêra IAC strain was the only variety that presented high levels of activity of the three enzymes analyzed after inoculation with the pathogen, suggesting that this variety is the most resistant among the analyzed genotypes

Keywords: Resistance. Resistance-related enzymes. Citrus canker.

INTRODUÇÃO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006), está presente em todas as regiões de cultivo e atinge a maioria das variedades comerciais de laranja doce (*C. sinensis* L. Osbeck), sendo responsável por perdas econômicas significativas (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002; BRAIDO et al., 2015; GONÇALVES-ZULIANI et al, 2015).

O patógeno afeta toda a parte aérea da planta. Nas folhas, as lesões apresentam-se em ambas as faces, de forma proeminente, geralmente circundadas por um halo amarelo. As lesões nos frutos são similares às das folhas e em situações com ataques severos da doença, os frutos podem cair antes de atingir a maturidade e, nestes casos, os sintomas podem atingir também os ramos (LARANJEIRA et al., 2005).

As plantas apresentam diversos mecanismos de defesa contra patógenos. Os mecanismos pré-formados, como cutícula e cera, eventualmente, são eficientes para prevenir a infecção, porém sob ataques de patógenos, as plantas também podem desencadear respostas ativas de defesa, como a transcrição de genes e elaboração de subprodutos de defesa, como enzimas ou toxinas, as quais atrasam o desenvolvimento do patógeno ou levam à morte da célula vegetal (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

As espécies reativas de oxigênio são moléculas que se acumulam rapidamente nas células, no início do processo de interação patógeno-hospedeiro, atuando na defesa da planta em diversas situações. Estudos mostram que o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está relacionado à redução na população de patógenos na planta (KUMAR; EBEL; ROBERTS, 2011a 2011b). Peroxidase, catalase e superóxido dismutase são enzimas relacionadas à resistência que atuam no metabolismo oxidativo das plantas, contribuindo para a defesa contra patógenos através da regulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio nas células (CHEN et al., 2012).

Estudos indicam que variedades de citros apresentam diferentes níveis de resistência ao cancro cítrico (GONÇALVES-ZULIANI et al., 2011; CARVALHO et al., 2015), a qual pode estar relacionada com a transcrição de genes, à produção de enzimas relacionadas a resistência e à reação de hipersensibilidade (KUMAR, EBEL, ROBERTS, 2011a, 2011b; WANG et al., 2011; CHEN et al., 2012; PITINO, ARMSTRONG; DUAN, 2015).

O uso de cultivares resistentes constitui a alternativa mais eficiente e segura para o controle da doença, uma vez que reduz os custos de produção e evita danos ao meio ambiente. Desta forma, é extremamente importante conhecer os mecanismos da interação planta-patógeno, buscando esclarecer a natureza da resistência das plantas. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade das enzimas relacionadas à resistência, buscando detectar diferenças no nível de resistência entre 14 genótipos *Citrus*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Implantação do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) (23°23'57,8"S; 51°57'5,3"O e aproximadamente 500 m de altitude) da Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, de dezembro de 2016 a janeiro de 2017.

Para a realização do experimento, foram utilizadas três plantas por genótipo, as quais foram mantidas em casa de vegetação, com irrigação automática. Com o objetivo de se obter folhas jovens e homogêneas, as plantas foram podadas 50 dias antes da inoculação (VILORIA et al., 2004) e foram realizadas adubações periódicas de N, P, K e micronutrientes.

2. Material vegetal

Foram avaliados 14 genótipos de *Citrus* (Tabela 1) enxertados sob limão-cravo (*C. limonia*), provenientes do Viveiro de Mudanças Pratinha (VMP), localizado no município de Atalaia-PR. O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Destes 14 genótipos, utilizou-se a variedade de laranja doce (*C. sinensis*) Hamlin como controle suscetível e a variedade Vermelha (*C. reticulata*) como controle resistente, para a comparação com os 12 genótipos de Laranja Pêra (Pêra EEL, Pêra Bianchi/CC, Pêra IAC, Pêra Ipiгуá, Pêra IAC 2000/1, Pêra Ovale Siracusa, Pêra Ovale, Pêra IAC 2000/2, Pêra M5, Pêra Araпongas, Pêra 58 e Pêra 59).

Tabela 1. Genótipos de *Citrus* utilizados no experimento.

Numeração	Genótipo	Nome Comum	Nome Científico
1	Hamlin	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
2	Vermelha	Tangerina	<i>C. reticulata</i>
3	Pêra EEL	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
4	Pêra Bianchi/CC	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
5	Pêra IAC	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
6	Pêra Ipiguá	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
7	Pêra IAC 2000/1	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
8	Pêra Ovale Siracusa	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
9	Pêra Ovale	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
10	Pêra IAC 2000/2	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
11	Pêra M5	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
12	Pêra Arapongas	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
13	Pêra 58	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
14	Pêra 59	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>

3. Cultura bacteriana e preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado a partir de cultura pura de *X. citri* subsp. *citri* (isolado Xcc 306), obtida junto ao acervo de culturas puras do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) e mantida em geladeira, em tampão fosfato (0,075 M, pH 7,0). A bactéria foi reativada em placas de Petri contendo meio Manitol Glutamato Yeast (10 g manitol, 2 g ácido L-glutâmico, 0,5 g fosfato de potássio, 0,2 g NaCl, 0,2 g MgSO₄7H₂O, 1 g extrato de levedura, 15 g ágar/L de água destilada) (NOCCHI, 2014).

As placas de Petri foram mantidas em estufa bacteriológica por 48 horas a 28°C e posteriormente, transferiu-se as colônias bacterianas para microtubos de 1,5 mL, contendo tampão fosfato (0,075 M, pH 7,0). A concentração do inóculo foi então ajustada para 10⁸ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL), através da leitura a 600 nm em um aparelho espectrofotômetro (BELASQUE JR.; JESUS JR.; 2006).

4. Inoculação e coleta para análises bioquímicas

A inoculação foi realizada na face abaxial das folhas, através de oito perfurações equidistantes no limbo foliar com agulha de 0,55 x 0,2 mm, previamente imersa em suspensão bacteriana. Para cada perfuração, foi realizada uma imersão em suspensão bacteriana. A casa de vegetação foi molhada durante as primeiras 24 horas após a inoculação, com o objetivo de elevar a umidade e favorecer o estabelecimento da bactéria nas folhas.

Para as análises bioquímicas, as coletas foram realizadas em 4 períodos distintos: 0 horas (0 H), 24 horas após a inoculação (24 H), aos 16 dias com a coleta de folhas sem inocular, porém, em plantas inoculadas (16DSI – 16 dias sem inocular) e aos 16 dias após a inoculação (16 DAI), foi realizada a coleta de folhas inoculadas. Em cada tempo, foram coletadas 6 folhas por genótipo, sendo duas folhas por planta, as quais foram imediatamente armazenadas em recipientes de isopor com gelo, para posterior extração enzimática.

5. Extração enzimática

A partir de cada folha coletada, 1,0 g foi macerado individualmente em nitrogênio líquido e homogeneizado em almofariz gelado, com 3 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo EDTA 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 5% (p/v). Após a homogeneização, o extrato obtido foi centrifugado à 10000 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante, considerado o extrato enzimático, foi armazenado em freezer -80°C para a posterior determinação do conteúdo proteico e das atividades da peroxidase, catalase e superóxido dismutase.

6. Proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada através do teste de Bradford (1976). Uma alíquota de 1,0 mL do reagente de Bradford foi adicionada a 20 µL do extrato enzimático obtido anteriormente, diluído em água destilada, na proporção de 1:5. As amostras permaneceram incubadas por 5 minutos e em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Como referência, foi utilizado 20 µL de água destilada com 1,0

mL do reagente de Bradford. Os valores de absorvância foram plotados em uma curva padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB) de 0 a 0,8 mg.ml⁻¹ e a concentração de proteínas expressa em mg proteína.ml⁻¹.

7. Determinação da Peroxidase de Guaiacol (EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase de guaiacol foi determinada a 30°C através do método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol em 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). O meio de reação foi preparado adicionando-se 30 mL de tampão fostato de potássio 25 mM (pH 6,8), 35 µL de H₂O₂ 0,1 mM e 10 µL de guaiacol.

A cubeta de referência continha 2,6 mL de meio de reação. A atividade da peroxidase foi mensurada em comprimento de onda de 470 nm, durante 5 minutos. Cada reação foi iniciada em espectrofotômetro, mediante a adição de 400 µL de extrato enzimático em 2,6 mL de meio de reação. Os resultados foram expressos em µmols de tetraguaiacol.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

8. Determinação da Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pelo método de Góth (1991), modificado por Tomanková et al. (2006). Inicialmente, 50 µL do extrato enzimático foram adicionados a tubos de ensaio contendo 50 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH7,0). A reação foi iniciada com a adição de 0,5 mL de H₂O₂ 60 mM. Esta solução foi incubada em banho-maria a 37°C por 4 minutos. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de molibdato de amônio 32,4 mM. Em seguida, as amostras foram armazenadas no escuro por 5 minutos.

Para cada amostra, foi preparado um branco, através da adição de 0,5 mL de molibdato de amônio 32,4 mM seguida da adição de 0,5 mL de H₂O₂ 60 mM, omitindo o período de reação. A quantidade de H₂O₂ consumido na reação foi monitorada em espectrofotômetro a 405 nm, e a diferença entre a absorvância do branco e da amostra foi utilizada para o cálculo da atividade da catalase, o qual foi realizado utilizando o coeficiente de extinção molar de uma curva padrão de H₂O₂ ($\epsilon = 0,0085 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados expressos em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹.

9. Determinação da Superóxido Dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada através da metodologia descrita por Giannopolitis e Ries (1977). O meio de reação foi composto por 20 µL de extrato enzimático, 1,33 mL de tampão fosfato 50 mM/EDTA 1 mM (pH 7,8), 50 µL de L-metionina 13 mM, 20 µL de nitro blue tetrazolium (NBT) e 100 µL de riboflavina 4 µM. Um branco para cada amostra foi feito seguindo as mesmas dosagens anteriormente citadas, porém sem a adição do extrato enzimático.

Os tubos de ensaio contendo as amostras foram mantidos a 25°C sob luz direta por 10 minutos. A redução do NBT foi acompanhada em espectrofotômetro a 560 nm. A diferença entre o branco e a amostra foi considerada para a determinação da atividade da superóxido dismutase, que consiste na inibição do NBT, pela dismutação enzimática do superóxido. Os resultados foram expressos em unidade de enzima por grama de proteína ($\text{U SOD} \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

10. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 14 tratamentos (genótipos de citros), 4 repetições para a catalase e 6 repetições para a peroxidase e superóxido dismutase. Foram realizadas análises de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, à 5% de probabilidade, utilizando o Programa SAS (Statistical Analysis System, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Atividade da Peroxidase

A atividade da peroxidase foi constatada em todos os tempos avaliados (0 H, 24 H, 16 DSI e 16 DAI) e através da Figura 1, é possível perceber que houveram diferenças significativas entre os genótipos avaliados. Pelo gráfico pode-se visualizar que nas variedades controles, Hamlin e Vermelha, houve aumento da atividade da peroxidase 24 horas após a inoculação com a bactéria e também aos 16 DAI, quando comparado ao período de 0 H e 16 DSI, sendo essa diferença mais significativa no genótipo suscetível Hamlin. Essa mesma característica pôde ser observada de forma significativa na variedade Pêra IAC. A variedade Pêra Ovale também apresentou o mesmo comportamento, com um aumento na atividade da peroxidase, em ambos os períodos, porém de forma menos acentuada.

O aumento significativo da atividade da peroxidase na variedade Pêra IAC aos 16 DAI, pode estar relacionada à resposta de hipersensibilidade, na qual as plantas sob estresse acumulam mais H_2O_2 no espaço intercelular, realizando o processo de apoptose celular, com o objetivo de conter o desenvolvimento do patógeno, impedindo que a doença evolua para outras partes da planta.

Por outro lado, na variedade Hamlin, considerada suscetível, estudos sugerem que o aumento na produção de peróxido, ocorre de forma gradual, quando comparado à outras variedades consideradas resistentes, não sendo suficiente para conter o desenvolvimento da bactéria na planta (KUMAR; EBEL, ROBERTS, 2011a, 2011b). Estes mesmos autores observaram um aumento nas atividades da peroxidase na variedade Hamlin inoculada com *X. axonopodis* pv. *citri*, a partir do 1 DAI, até os 20 DAI, sendo que o pico de produção desta enzima ocorreu 14 dias após a inoculação com a bactéria. Observaram ainda que apesar de um aumento na atividade da peroxidase, esta variedade apresentava sintomas característicos da doença, assim como aos 4 DAI, a população de bactérias permanecia elevada na planta, quando comparada com a variedade resistente.

Ainda observando o gráfico da Figura 1, pode-se constatar que a variedade Pêra Arapongas apresentou um aumento na atividade da peroxidase 24 horas após a inoculação e uma diminuição da atividade aos 16 DAI. Por outro lado, os genótipos Pêra Bianchi/CC e Pêra 58, mostraram uma menor atividade da peroxidase a 24 H e um aumento com 16 DAI, quando

comparados ao mesmo período sem inocular. Os genótipos Pêra Ovale Siracusa, Pêra 59, Pêra EEL, Pêra Ipiгуá, Pêra IAC 2000/1, Pêra IAC 2000/2 e Pêra M5, apresentaram uma diminuição na atividade da peroxidase em ambas as datas inoculadas, quando comparados à mesma data sem inocular.

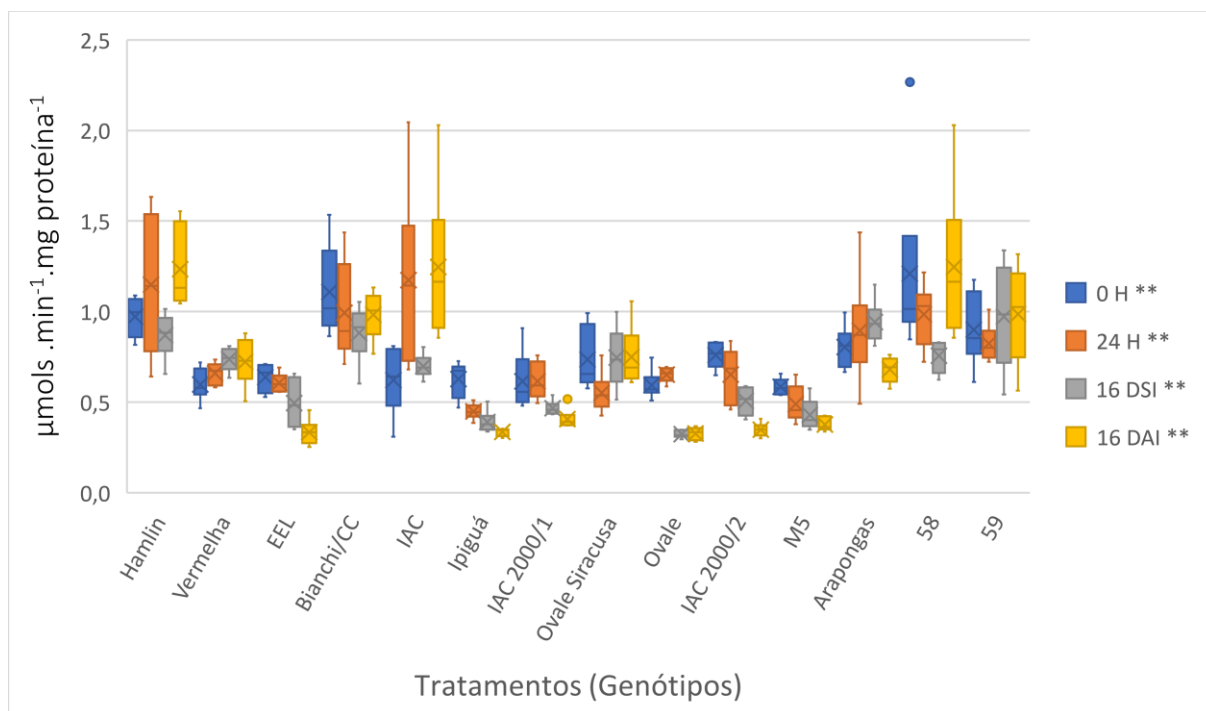


Figura 1. Atividade da peroxidase em genótipos de citros inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em diferentes tempos após a inoculação (H: horas após a inoculação, DSI: Dias sem inocular, DAI: Dias após inocular). ** Nível de significância a 5%. Barras indicam a média \pm desvio padrão.

Ao analisar a atividade da peroxidase em tempos isolados, tem-se que nas folhas sem inocular, a atividade da peroxidase foi maior nas variedades Pêra 58 e Pêra Bianchi/CC. A variedade Pêra 59, apresentou atividade moderada nesta data de avaliação, equiparando-se à variedade controle suscetível Hamlin, enquanto que os genótipos Pêra EEL, Pêra IAC, Pêra Ipiгуá, Pêra IAC 2000/1, Pêra Ovale Siracusa, Pêra Ovale, Pêra M5 e Pêra Arapongas, apresentaram menores taxas de atividade da peroxidase, sendo similares à variedade Vermelha, o controle resistente (Figura 2a).

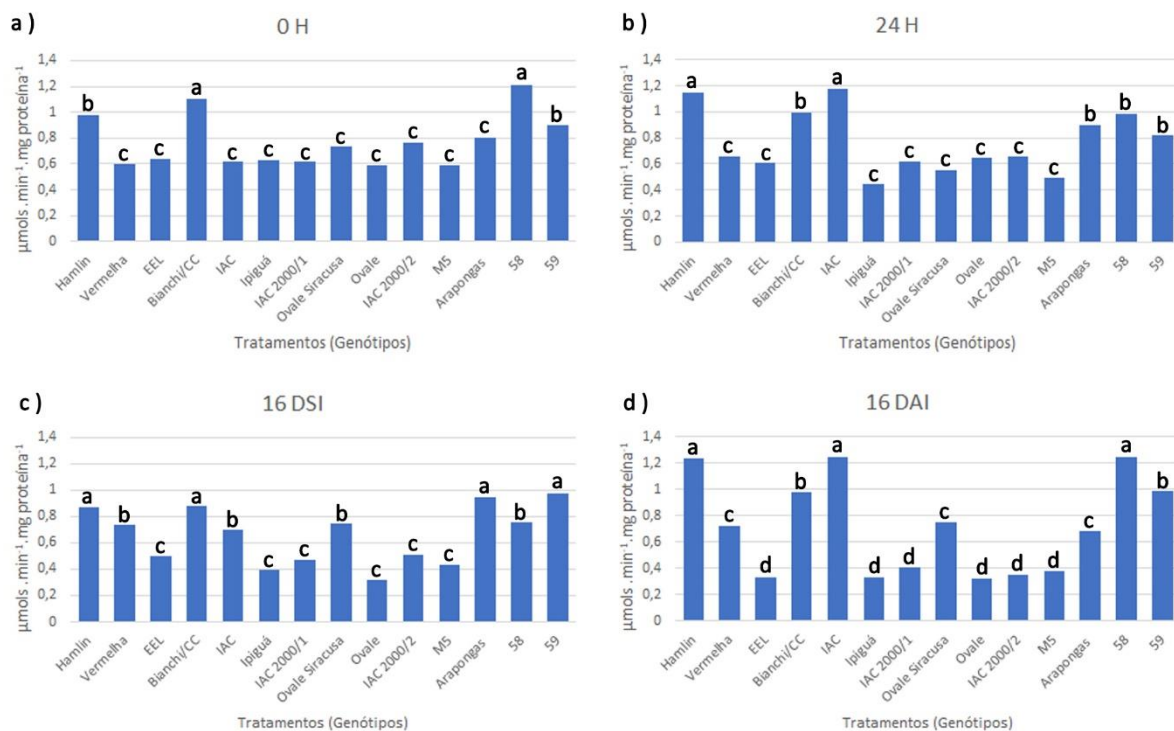


Figura 2: Atividade da peroxidase nos 14 genótipos de citros. a) 0 H – 0 hora, b) 24 H – 24 horas após a inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. c) 16 DSI- coleta de folhas não inoculadas em plantas inoculadas, 16 dias após a inoculação, d) 16 DAI – 16 dias após inocular. As letras *a*, *b*, *c* e *d* indicam o agrupamento das médias pelo teste de Scott Knott a 5 % de significância.

Ao observar a Figura 2b, pode-se perceber que houve uma alteração considerável em relação à atividade da peroxidase nas variedades avaliadas 24 horas após a inoculação com a bactéria *X. citri* subsp. *citri*, uma vez que o genótipo Pêra IAC apresentou um aumento significativo na atividade da peroxidase, igualando-se estatisticamente à variedade suscetível Hamlin, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Um leve aumento na atividade desta mesma enzima também pôde ser observado na variedade Pêra Arapongas.

Nesta mesma data de avaliação, foi possível observar que as variedades Pêra Bianchi/CC e Pêra 58 apresentaram uma redução na atividade da peroxidase, equiparando-se estatisticamente às variedades Pêra Arapongas e Pêra 59. As laranjas doce, variedade Pêra EEL, Ipiгуá, IAC 2000/1, Ovale Siracusa, Ovale, IAC 2000/2 e M5, apresentaram atividade de peroxidase semelhantes ao controle resistente Vermelha, 24 horas após a inoculação.

Considerando as avaliações aos 16 dias, em folhas não inoculadas (Figura 2c), observa-se que os genótipos Pêra 59, Pêra Arapongas e Pêra Bianchi/CC apresentaram os maiores níveis de atividade da peroxidase, sendo estatisticamente semelhantes à variedade

suscetível Hamlin, enquanto as variedades Pêra EEL, Pêra Ipiguá, Pêra IAC 2000/1, Pêra Ovale, Pêra IAC 2000/2 e Pêra M5, permaneceram com as menores taxas de atividade desta enzima.

Analisando o gráfico de médias da atividade da peroxidase aos 16 DAI (Figura 2d), é possível perceber que houve alteração na produção desta enzima, devido à inoculação com a bactéria *X. citri* subsp. *citri*. Os mesmos genótipos Hamlin e Pêra IAC que haviam apresentado as maiores taxas de produção de peroxidase 24 horas após a inoculação, continuaram apresentando níveis elevados aos 16 DAI. A variedade Pêra 58, nesta avaliação também mostrou taxas de produção de peroxidase elevadas, similares à Hamlin e Pêra IAC. Por outro lado, as variedades Pêra EEL, Pêra Ipiguá, Pêra IAC 2000/1, Pêra Ovale, Pêra IAC 2000/2 e Pêra M5 continuaram exibindo os menores níveis de atividade da peroxidase aos 16 DAI.

Wang et al. (2011), ao avaliar duas variedades contrastantes, em relação à resistência ao cancro cítrico, constataram que a variedade resistente apresentou níveis elevados e constantes de atividade da peroxidase após a inoculação com a bactéria *X. citri* subsp. *citri*, enquanto a variedade suscetível apresentou uma redução da atividade desta enzima 7 DAI.

Outros estudos indicam que as peroxidases participam de uma série de processos fisiológicos relacionados à defesa, como ligação cruzada de proteínas da parede celular e oxidação de compostos fenólicos durante a formação da lignina. Sob condições de estresse, em plantas, a atividade da peroxidase aumenta nos espaços intercelulares, estimulando o endurecimento da parede celular (RANIERI et al., 2001).

Desta forma, através deste experimento, foi possível perceber que houve uma ativação dos mecanismos de defesa bioquímicos das plantas, através de um aumento significativo nos níveis de atividade da peroxidase após a inoculação dos genótipos de citros com a bactéria *X. citri* subsp. *citri*. Além disso, após a inoculação, foi possível detectar um aumento da atividade da peroxidase principalmente nos genótipos Hamlin e Pêra IAC 24 horas após a inoculação, e nestes mesmos genótipos e na variedade Pêra 58, aos 16 DAI.

2. Atividade da Catalase

Em todas as avaliações foram observadas diferenças significativas entre os genótipos avaliados, sendo que a 0 horas, foi possível detectar diferenças significativas a um nível de significância de 10%, enquanto que nos outros tempos de avaliação (24 H, 16 DSI e 16 DAI), as diferenças entre os tratamentos foram significativas a um nível de significância de 5%.

Através da Figura 3, pode-se perceber que o genótipo suscetível Hamlin, apresentou teores elevados de catalase a 0 H e também os maiores teores de atividade de catalase aos 16 DAI, quando comparada com as demais variedades.

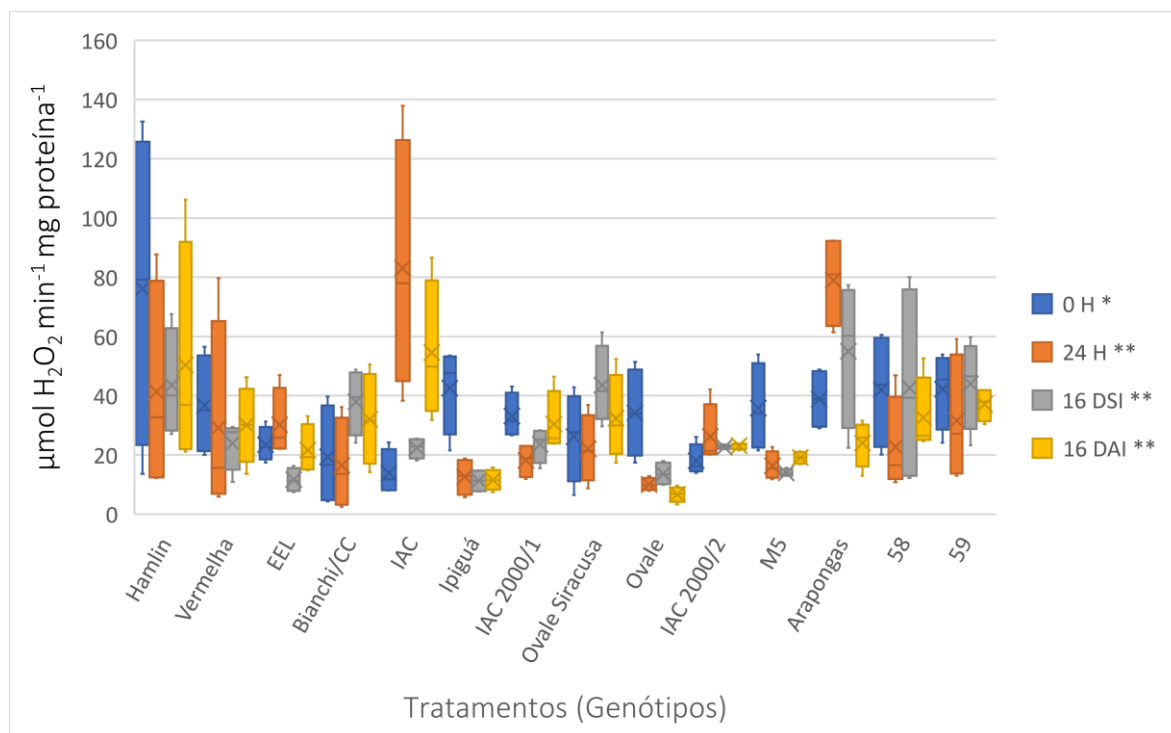


Figura 3.: Atividade da catalase em genótipos de citros inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em diferentes tempos de coleta (H: horas após a inoculação, DSI: Dias sem inocular, DAI: Dias após inocular). *Nível de significância a 10%. **Nível de significância a 5%. Barras indicam a média \pm desvio padrão.

A variedade Pêra IAC, entretanto, mostrou níveis elevados de catalase em plantas inoculadas em ambos os dias de coleta (1 DAI e 16 DAI), em relação às avaliações realizadas em folhas não inoculadas. Wang et al. (2011), estudando duas variedades contrastantes inoculadas com *X. citri* subsp. *citri*, observou que a variedade resistente Meiwa apresentou teores mais elevados de catalase quando comparados com a variedade suscetível Newhall.

As variedades Vermelha, Pêra EEL, Pêra Ovale e Pêra IAC 2000/2, da mesma forma que o genótipo Pêra IAC, também apresentaram maior produção de catalase após a inoculação com a bactéria, em ambos os dias de coleta. Por outro lado, as Pêras Bianchi/CC, Ovale Siracusa e 58, mostraram uma redução nos níveis de catalase após a inoculação com *X. citri* subsp. *citri* tanto no 1 DAI como aos 16 DAI.

Ainda observando a Figura 3, observa-se que os genótipos Hamlin, Pêra Bianchi/CC, Pêra Ovale Siracusa, Pêra 58, Pêra IAC 2000/1 e Pêra M5, apresentaram um aumento da produção de catalase no decorrer do tempo, uma vez que aos 16 DAI, os níveis de catalase apresentaram-se mais elevados do que no 1 DAI.

Ao analisar as médias de produção de catalase em cada dia de coleta, tem-se a 0 H (Figura 4a), a variedade de laranja doce Hamlin, exibiu o maior nível de produção desta enzima, quando comparada às demais variedades, através do teste de Scott-Knott a 10% de significância.

Considerando as análises no primeiro dia após a inoculação (24 H) (Figura 4b) é possível constatar que houve uma diferença considerável nos níveis de produção de catalase, principalmente nas variedades Pêra IAC e Pêra Araçongas, as quais apresentaram maiores taxas de produção de catalase. A variedade suscetível Hamlin exibiu uma redução na atividade desta enzima, equiparando-se à variedade Vermelha e às demais variedades de laranjas Pêra.

Analisando a Figura 4c, tem-se que na coleta de folhas não inoculadas, aos 16 dias (16 DSI), a maior taxa de produção de catalase ocorreu na variedade Pêra Araçongas, a qual teve média semelhante às variedades de laranja doce Hamlin, Pêra Ovale Siracusa, Pêra 58, Pêra 59 e Pêra Bianchi/CC. Por outro lado, as menores médias de produção desta enzima foram visualizadas nos genótipos de Pêra EEL, Pêra IAC, Pêra Ipiguá, Pêra IAC 2000/1, Pêra Ovale, Pêra IAC 2000/2 e Pêra M5, as quais foram semelhantes à variedade resistente Vermelha no teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Observando o gráfico da Figura 4d, tem-se que as variedades Hamlin e Pêra IAC, foram as que mais produziram catalase, juntamente com as variedades Vermelha, Pêra Bianchi/CC, Pêra IAC 2000/1, Pêra Ovale Siracusa, Pêra 58 e Pêra 59.

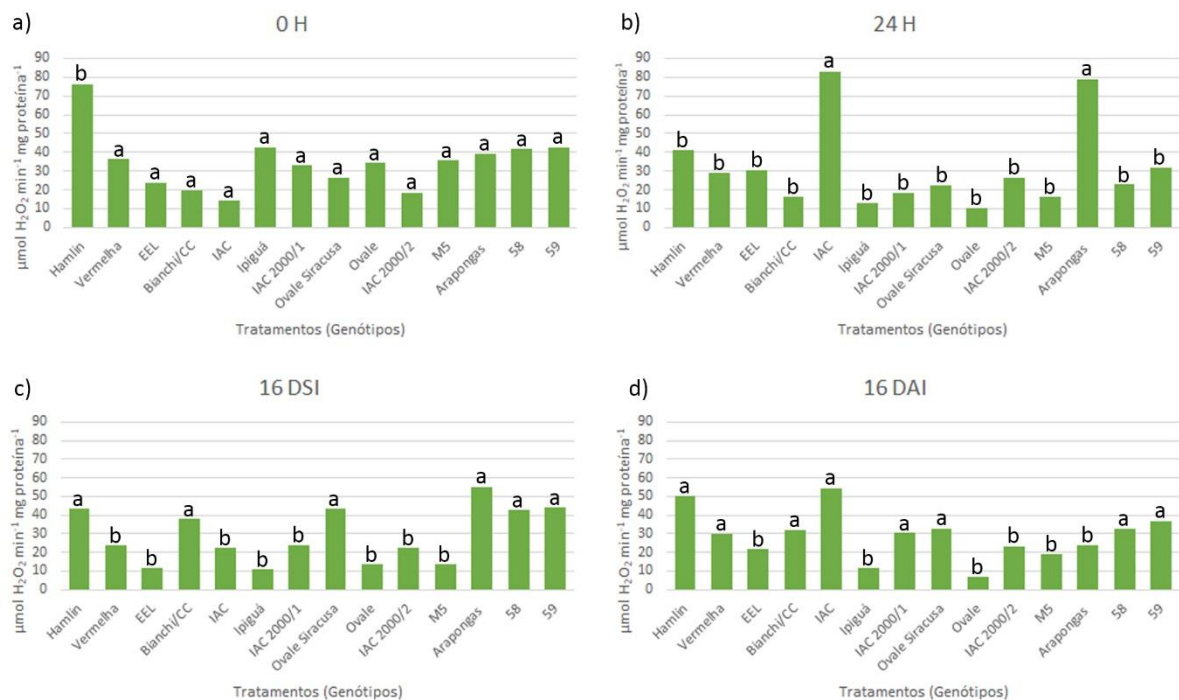


Figura 4: Atividade da catalase nos 14 gen\u00f3tipos de citros. a) 0 H – 0 hora, b) 24 H – 24 horas ap\u00f3s a inocula\u00e7\u00e3o com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. c) 16 DSI- coleta de folhas n\u00e3o inoculadas em plantas inoculadas, 16 dias ap\u00f3s a inocula\u00e7\u00e3o, d) 16 DAI – 16 dias ap\u00f3s inocular. As letras *a* e *b* indicam o agrupamento das m\u00e9dias pelo teste de Scott-Knott, a 10% de signific\u00e2ncia na “figura a)” e 5% de signific\u00e2ncia, nas demais imagens.

3. Atividade da Super\u00f3xido Dismutase

Ao comparar a atividade da super\u00f3xido dismutase nos 14 gen\u00f3tipos de citros inoculados com *X. citri* subsp. *citri* (Figura 5), pode-se perceber que o gen\u00f3tipo suscet\u00edvel Hamlin apresentou as maiores taxas de produ\u00e7\u00e3o de super\u00f3xido dismutase no 1 DAI, por\u00e9m aos 16 DAI, os n\u00edveis ca\u00edram significativamente. Estes resultados corroboram com os estudos de Kumar, Ebel e Roberts (2011b), onde avaliando a variedade Hamlin, observaram picos de produ\u00e7\u00e3o desta mesma enzima com 1 DAI e 8 DAI, com posterior diminui\u00e7\u00e3o da atividade da super\u00f3xido dismutase aos 14 DAI.

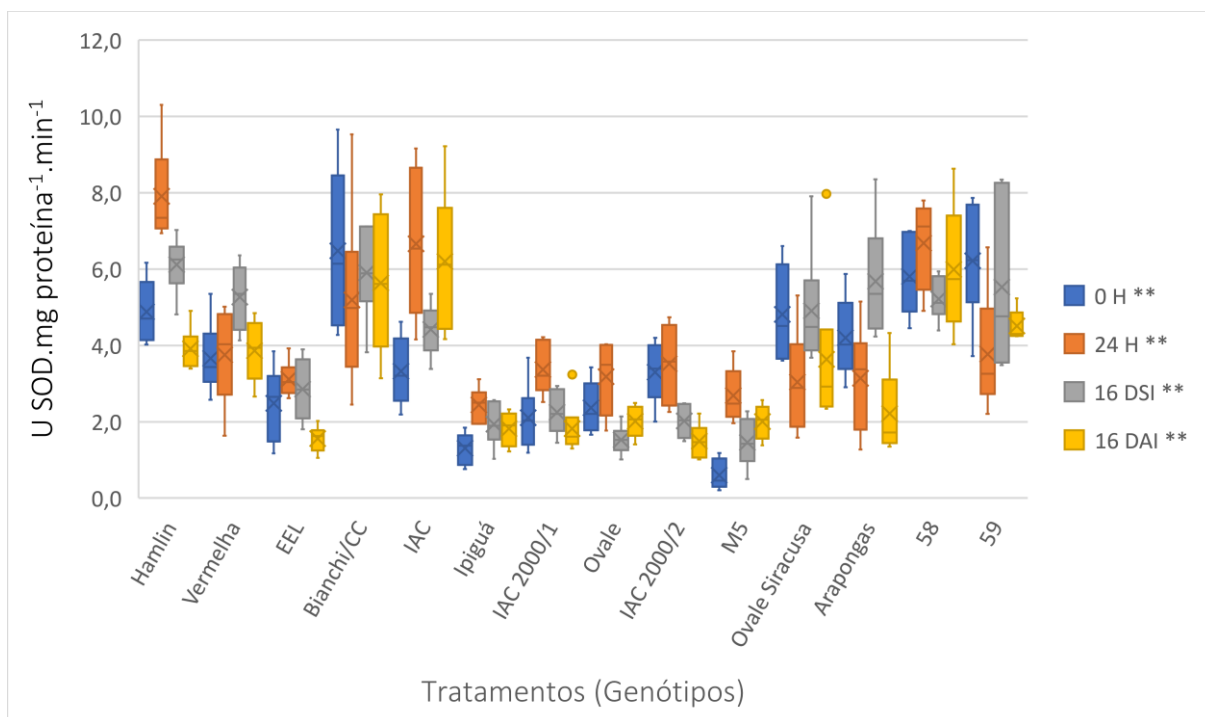


Figura 5. Atividade da superóxido dismutase em genótipos de citros inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em diferentes tempos de coleta (H: horas após a inoculação, DSI: Dias sem inocular, DAI: Dias após inocular). ** Nível de significância a 5%. Barras indicam a média \pm desvio padrão.

As variedades Pêra Bianchi/CC, Pêra IAC, Pêra 58, Pêra Ovale e Pêra M5, apresentaram um aumento da produção de superóxido dismutase nas análises das folhas inoculadas com *X. citri* subsp. *citri*, em ambos os períodos (1 DAI e 16 DAI), enquanto os genótipos Pêra Ovale Siracusa, Pêra Arapongas e Pêra 59, nestes mesmos tempos de avaliação, tiveram uma redução nos teores de produção desta enzima, quando comparados às amostras sem inocular.

Comparando o primeiro dia antes da inoculação com 1 DAI, observa-se que as variedades Pêra EEL, Pêra Ipiguá, Pêra IAC 2000/1, Pêra IAC 2000/2 e Hamlin tiveram uma elevação nos teores de produção de superóxido dismutase, com posterior redução destas concentrações aos 16 DSI e 16 DAI.

Ao analisar as médias de produção de superóxido dismutase separadamente, tem-se que a 0 H (Figura 6a), a variedade Pêra Bianchi/CC apresentou o maior nível de produção de superóxido dismutase, juntamente com as variedades Pêra 58 e Pêra 59. Em contrapartida, as variedades Pêra M5 e Pêra Ipiguá, foram aquelas que apresentaram as menores médias de produção desta enzima.

Ao considerar as 24 horas após a inoculação (24 H – Figura 6b), a variedade suscetível Hamlin apresentou a maior taxa de produção de superóxido dismutase, sendo semelhante às variedades Pêra IAC e Pêra 58. Um leve aumento na atividade da superóxido dismutase também foi percebido nas variedades Vermelha, Pêra EEL, Pêra Ipiquá, Pêra IAC 2000/1, Pêra Ovale e Pêra M5. Este aumento pode estar relacionado com a entrada do patógeno na planta através da inoculação, como foi observado nos estudos de Kumar et al. (2011b).

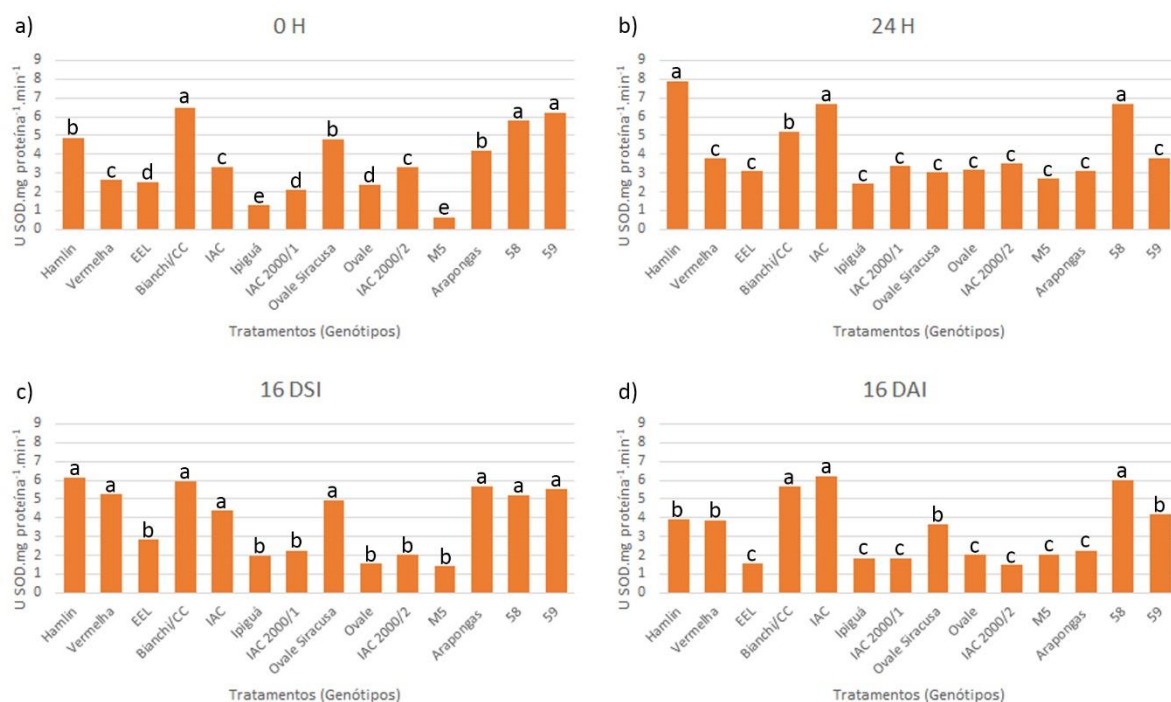


Figura 6. Atividade da superóxido dismutase nos 14 genótipos de citros. a) 0 H – 0 hora, b) 24 H – 24 horas após a inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. c) 16 DSI- coleta de folhas não inoculadas em plantas inoculadas, 16 dias após a inoculação, d) 16 DAI – 16 dias após inocular. As letras *a*, *b*, *c*, *d* e *e* indicam o agrupamento de médias pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 5%.

A variedade Pêra 59, nesta mesma data de avaliação, exibiu uma redução significativa na atividade enzimática da SOD em relação à coleta de 0 H. Outras variedades como Pêra Bianchi/CC, Pêra Ovale Siracusa e Pêra Arapongas também apresentaram uma redução na concentração desta enzima, porém de forma menos acentuada.

Aos 16 dias, com a coleta de folhas não inoculadas (16 DSI - Figura 6c), foi possível observar que houve um aumento nos teores da superóxido dismutase quando os dados são

comparados a 0 H. As variedades Hamlin, Vermelha, Pêra Bianchi/CC, Pêra IAC, Pêra Ovale Siracusa, Pêra Arapongas, Pêra 58 e Pêra 59, apresentaram teores elevados, significativamente diferentes das Pêras EEL, Ipirigua, IAC 2000/1, Ovale, IAC 2000/2 e M5, as quais apresentaram médias de produção de superóxido dismutase, relativamente baixas.

Observando a Figura 6d, observa-se que os genótipos Pêra IAC, Pêra Bianchi/CC e Pêra 58 produziram mais superóxido dismutase que as variedades utilizadas como controle, enquanto as Pêras EEL, Ipirigua, IAC 2000/1, Ovale, IAC 2000/2, M5 e Arapongas exibiram as menores médias de produção desta enzima.

Ao comparar o gráfico de 24 H (Figura 6b) com o de 16 DAI (Figura 6d), pode-se perceber que houve uma leve diminuição na produção de superóxido dismutase nas variedades Pêra EEL, Pêra Ipirigua, Pêra IAC 2000/1, Pêra Ovale, Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2, Pêra M5, Pêra Arapongas e Pêra 58. E uma diminuição mais perceptível nos teores de produção da superóxido dismutase na variedade suscetível Hamlin.

Analisando os resultados obtidos com relação a atividade da superóxido dismutase, pode-se notar que as variedades Pêra IAC, Pêra Bianchi/CC e Pêra 58 apresentaram maiores níveis de produção desta enzima aos 16 DAI, quando comparadas aos demais genótipos avaliados. Este resultado pode estar relacionado com o desenvolvimento da *X. citri* subsp. *citri* no tecido vegetal, uma vez que a presença de atividade bacteriana promove a elevação de atividade da superóxido dismutase, assim como o acúmulo de peróxido nas células (KHALAF et al., 2007; KUMAR; EBEL; ROBERTS, 2011a, 2011b; CHEN et al., 2012).

4. Enzimas relacionadas à defesa

Segundo Wang et al. (2011) a ativação das enzimas envolvidas em várias vias metabólicas tem sido sugerida como um mecanismo crítico para uma planta hospedeira se defender contra um invasor patogênico. Desta forma, ao analisar os resultados das três enzimas (peroxidase, catalase e superóxido dismutase) de forma conjunta, tem-se que aos 16 dias após a inoculação, apenas a variedade Pêra IAC, apresentou uma elevação nos elevados das três enzimas, quando comparada aos demais genótipos.

Este resultado pode estar relacionado à resposta de hipersensibilidade, uma vez que altos níveis de H₂O₂ nas células coincidiram com a resposta de hipersensibilidade em Kumquat,

a qual exibiu morte celular localizada no ponto de infecção pela bactéria *X. citri* subsp. *citri* (KUMAR; EBEL; ROBERTS, 2011a).

CONCLUSÕES

- Houveram diferenças na atividade das enzimas peroxidase, catalase e superóxido dismutase após a inoculação das 14 variedades de citros com *X. citri* subsp. *citri*.

- Dentre os genótipos avaliados, apenas a variedade de laranja doce (*C. sinensis* L.) Pêra IAC apresentou elevação dos teores na atividade das três enzimas analisadas (peroxidase, catalase e superóxido dismutase) aos 16 dias após a inoculação, sendo considerada mais resistente, quando comparada às demais variedades avaliadas.

REFERÊNCIAS

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.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytica Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAIDO, R.; GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; NOCCHI, P.T.R.; JUNIOR, P.T.; JANEIRO, J.B.; BOCK, C.H.; NUNES, W.M.C. A standard area diagram set to aid estimation of the severity of Asiatic citrus canker on ripe sweet orange fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v.141, p.327-337, 2015.

CARVALHO, S.A.; NUNES, W.M.C.; BELASQUE JR, J.; MACHADO, M.A.; CROCE-FILHO, J.; BOCK, C.H.; ABDO, Z. Comparison of resistance to Asiatic citrus canker among different genotypes of *Citrus* in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. **Plant Disease**, v.99, n.2, p.207-218, 2015.

CHEN, P.; WANG, L.; CHEN, Y.; TZENG, K.; CHANG, S.; CHUNG, K.; LEE, M. Understanding cellular defense in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.79, p.1-12, 2012.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; BELASQUE JR, J.; ZANUTTO, C.A.; REMOLLI, J.A.; NUNES, W.M.C. Resistance of 'Pêra' sweet orange (*Citrus sinensis*) genotypes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in field conditions. **Workshop on Xanthomonas citri/Citrus canker**, p. 78-80, 2011b.

GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; NANAMI, D.S.Y.; BARBIERI, B.B.; GUEDES, T.A.; ZANUTTO, C.A.; BOCK, C.H.; NUNES, W.M.C. Evaluation of resistance to Asiatic citrus canker among selections of Pêra sweet orange (*Citrus sinensis*). **Plant Disease**, v.100 n.10, p. 1994-2000, 2016.

GOTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 196, n. 2-3, p. 143-151, 1991.

GOTTWALD, T.R., GRAHAM, J.H. & SCHUBERT, T.S. Citrus canker: the pathogen and its impact. Online. **Plant Health Progress**, DOI:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. 2002. Acesso em 10/08/2017, 13:36.

HAMMOUND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v.8, p.1773-1791, 1996.

KHALAF, A.; MOORE, G.A.; JONES, J.B.; GMITTER JR, F.G. New insights into the resistance of Nagami kumquat to canker disease. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 71, p. 240-250, 2007.

KUMAR N.; EBEL, R.C.; ROBERTS, P.D. H₂O₂ degradation is suppressed in kumquat leaves infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Scientia Horticulturae**, v.130, p.241-247, 2011a.

KUMAR N.; EBEL, R.C.; ROBERTS, P.D. H₂O₂ metabolism during sweet orange (*Citrus sinensis* L.Osb.) 'Hamlin' *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* interaction **Scientia Horticulturae**, v.128, p.465-472, 2011b.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**, Campinas: Instituto Agrônômico; FUNDAG p. 509-566., 2005

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, p. 244-249, 1999.

MOLLER, I.M., JENSEN, P.E., HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review in Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIM FILHO, A., KIMATI, H. & AMORIM, L. (Editores). **Manual de fitopatologia** - princípios e conceitos. Vol. I. São Paulo, Ed. Agrônômica Ceres, 1995. p. 417-454.

PITINO, M.; ARMSTRONG, C.M.; DUAN, Y. Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses. **Horticulture Research**, v.2. doi:10.1038/hortres.2015.42, 2015.

PRASAD, T.K., ANDERSON, M.D.; STEWART, C.R. Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimate maize seedlings. **Plant Physiology**, v.108, p.1597-1605, 1995.

RANIERI, A.; CASTAGNA, A.; BALDAN, B.; SOLDATINI, G.F. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 25-35, 2001.

SAS Institute INC.SAS/STAT™ **SAS user's guide for windows environment**, 6.11 ed. Cary SAS Institute, 1995

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.

SCHAAD N.W.; POSTNIKOWA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.V.; STRONBERG, P.E.; STRONBERG, V.K.; VIDAVER, A.M. Emended classification of

xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.690-695, 2006.

TOMANKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; POTOIVALSKY, M.; PEÈ, P.; LEBEDA, A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, p. 22–32, 2006.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.

VILORIA, Z.; DROUILLARD, D.L.; GRAHAM, J.H.; GROSSER, J.W. Screening triploid hybrids of ‘Lakeland’ limequat for resistance to citrus canker. **Plant disease**, v.88, n.10, p.1056-1060, 2004.

WANG, Y.; FU, X.; LIU, J.; HONG, N. Differential structure and physiological response to canker challenge between ‘Meiwa’ kumquat and ‘Newhall’ navel orange with contrasting resistance. **Scientia Horticulturae**, v.128, p.115-123, 2011.

CAPÍTULO III

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA EPIDERME DE GENÓTIPOS DE CITROS À *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

RESUMO

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de laranjas, entretanto a citricultura brasileira, ainda é afetada por diversos fatores, entre eles o cancro cítrico. Esta doença, causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, afeta a maioria das variedades comerciais de citros e sua severidade varia de acordo com o hospedeiro infectado. Estudos mostram que a resistência ao cancro cítrico é variável, sendo que toranjas (*Citrus paradisi* Macf.), limas (*C. aurantifolia* Swingle), e limões (*C. limon* L. Burm. F.) são consideradas altamente suscetíveis, as laranjas doce (*C. sinensis*) são consideradas moderadamente suscetíveis, enquanto tangerinas (*C. reticulata*), calamondin (*Citrofortunella*) e kumquat (*Fortunella* spp.) são consideradas resistentes. Desta forma, o objetivo do trabalho foi comparar a morfologia de 14 genótipos de citros e observar a reação destes genótipos à infecção pela bactéria aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação com *X. citri* subsp. *citri* através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram realizadas medições da densidade estomática, área média da abertura estomática e área estomática total. A variedade de laranja do (*C. sinensis*) Pêra Bianchi/CC apresentou os menores valores para as três características analisadas, e foi possível comparar o desenvolvimento da população de *X. citri* subsp. *citri* nas diferentes variedades de citros.

Palavras-chave: Resistência. Cancro cítrico. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

ABSTRACT

Brazil is considered the world's largest producer of oranges, but Brazilian citrus industry is still affected by several factors, including citrus canker. This disease, caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, affects most commercial citrus varieties and its severity varies according to the infected host. Studies have shown that resistance to citrus canker is variable, with grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.), limes (*C. aurantifolia* Swingle), and lemons (*C. limon* L. Burm F.) being considered highly susceptible, sweet oranges (*C. sinensis*) are considered moderately susceptible, while mandarins (*C. reticulata*), calamondin (*Citrofortunella*) and kumquat (*Fortunella* spp.) are considered resistant. The objective of this work was to compare the morphology of 14 *Citrus* genotypes and to observe the reaction of these varieties to infection by the bacteria at 4, 8, 12 and 16 days after inoculation with *X. citri* subsp. *citri* through Scanning Electron Microscopy (SEM). Measurements of stomatal density, stomatal aperture mean area and total stomatal area were performed. The sweet orange (*C. sinensis*) Pêra Bianchi/CC variety showed the lowest values for the three characteristics analyzed and it was possible to compare the development of the population of *X. citri* subsp. *citri* in different varieties of citrus.

Keywords: Resistance. Citrus canker. Scanning Electron Microscopy (SEM).

INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de laranjas, com uma produção de aproximadamente 19 milhões de toneladas. A citricultura brasileira, entretanto, ainda é afetada por inúmeras doenças, dentre elas o cancro cítrico merece destaque. Causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006), o cancro cítrico afeta a maioria das variedades comerciais de citros e a severidade da doença é variável de acordo com o hospedeiro infectado (LEITE JR., 1990; BRUNNING; GABRIEL, 2003; SHARMA; SHARMA, 2008).

A variação na suscetibilidade e resistência das plantas de citros à *X. citri* subsp. *citri* pode estar intimamente relacionada com a morfologia das variedades, uma vez que as diferenças nas espessuras da camada de cera, densidade estomática e anatomia dos estômatos podem facilitar ou dificultar a entrada do patógeno na planta (GRAHAM et al., 1992; GOTTWALD et al., 1993; AMARAL et al., 2010).

Outros fatores moleculares, como a presença de proteínas de resistência, genes de avirulência do patógeno e presença de genes de resistência e suscetibilidade nas plantas também são fatores determinantes para as diferenças na suscetibilidade entre os genótipos de citros (HU et al., 2014; ABE; BENEDETTI, 2016; KOBAYASHI et al., 2017).

Estudos mostram que a resistência ao cancro cítrico é variável nas diferentes espécies cítricas. No geral, toranjas (*Citrus paradisi* Macf.), limas (*C. aurantifolia* Swingle), e limões (*C. limon* L. Burm. F.) são consideradas altamente suscetíveis ao cancro cítrico, as laranjas doce (*C. sinensis*) são consideradas moderadamente suscetíveis à doença, enquanto tangerinas (*C. reticulata*), calamondin (*Citrofortunella*) e kumquat (*Fortunella* spp.) são consideradas resistentes (AMARAL et al., 2010; ZHANG et al., 2010; CARVALHO et al., 2015; PITINO et al., 2015; CHEN et al., 2016).

Dentro do grupo de laranjas doce (*C. sinensis* L.), as laranjas Pêra EEL, Bianchi, IAC, Ipiгуá, Ovale Siracusa foram consideradas moderadamente resistentes e a variedade Hamlin, considerada suscetível (AMARAL et al., 2010; GONÇALVES-ZULIANI et al., 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos observar as diferenças morfológicas entre 14 genótipos de citros através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e observar a reação destes genótipos à infecção pela bactéria aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação com *X. citri* subsp. *citri*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Foram utilizados 14 genótipos de *Citrus* (Tabela 1) enxertados sob limão-cravo (*C. limonia*), provenientes do Viveiro de Mudanças Pratinha (VMP), Atalaia-PR.

Tabela 1. Genótipos de *Citrus* utilizados no experimento de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Numeração	Genótipo	Nome Comum	Nome Científico
1	Hamlin	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
2	Vermelha	Tangerina	<i>C. reticulata</i>
3	Pêra EEL	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
4	Pêra Bianchi/CC	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
5	Pêra IAC	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
6	Pêra Ipiguá	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
7	Pêra IAC 2000/1	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
8	Pêra Ovale Siracusa	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
9	Pêra Ovale	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
10	Pêra IAC 2000/2	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
11	Pêra M5	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
12	Pêra Arapongas	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
13	Pêra 58	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
14	Pêra 59	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>

2. Implantação do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) (23°23'57,8" S; 51°57'5,3" O) e aproximadamente 500 m de altitude) e na Central de Microscopia (CMI-COMCAP), ambos da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram utilizadas duas plantas por genótipo, as quais foram mantidas em casa

de vegetação, com irrigação automática. Os 14 genótipos receberam adubações periódicas de N, P, K e micronutrientes. Aproximadamente 50 dias antes da inoculação, as plantas foram podadas, para a obtenção de folhas jovens e homogêneas, com 75 a 100% de expansão foliar (VILORIA et al., 2004).

3. Cultura bacteriana, preparo do inóculo e inoculação

O inóculo foi preparado a partir de cultura pura de *X. citri* subsp. *citri* (isolado Xcc 306) fornecida pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e mantida em geladeira em tampão fosfato (0,075M, pH 7,0). Para a reativação da bactéria, a mesma foi semeada em placas de Petri contendo meio Manitol Glutamato Yeast (10 g manitol, 2 g ácido L-glutâmico, 0,5 g fosfato de potássio, 0,2 g NaCl, 0,2 g MgSO₄7H₂O, 1 g extrato de levedura, 15 g ágar/L de água destilada), segundo Nocchi (2014).

As placas de Petri foram acondicionadas em estufa bacteriológica por 48 horas a 28°C. Após este período, as colônias bacterianas foram recolhidas e alocadas em microtubos de 1,5 mL, contendo tampão fosfato (0,075 M, pH 7,0). A concentração do inóculo foi ajustada para 10⁸ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL), através da leitura a 600 nm em um aparelho espectrofotômetro (BELASQUE JR.; JESUS JR.; 2006).

A inoculação foi realizada através de seis perfurações equidistantes na face abaxial das folhas com agulha de 0,55 x 0,2 mm previamente imersa em suspensão bacteriana. Para cada perfuração, foi realizada uma imersão da agulha em na suspensão. Foram inoculadas 2 plantas por genótipo e 10 folhas por planta. A casa de vegetação foi mantida úmida, através de molhamento com mangueira, sem que a água atingisse as folhas inoculadas, durante as primeiras 24 horas após a inoculação, para elevar a umidade e favorecer o estabelecimento da bactéria nas plantas.

4. Avaliação por Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foram coletadas em 5 tempos distintos: antes da inoculação com a bactéria *X. citri* subsp. *citri* (0 H), e aos 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação (DAI). Em cada tempo de

avaliação, foram coletadas 2 folhas por planta de cada genótipo e nestas folhas, foram feitos cortes de 5x5mm com o auxílio de um bisturi esterilizado.

Para melhor visualização, nas amostras sem inocular (0 H), os cortes foram feitos próximos às nervuras secundárias, para distinguir as faces abaxial e adaxial. Nas amostras inoculadas, os cortes foram feitos ao redor das lesões.

Posteriormente, o material vegetal cortado, foi armazenado em microtubos contendo solução tampão fixadora, composta por Cacodilato de sódio 0,1M (pH7,2 - 7,4) e Glutaraldeído 2,5%. Nesta fase, as amostras foram mantidas em geladeira até o término das coletas. Após esta etapa, procedeu-se à tríplex lavagem das amostras em Cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2 – 7,4) e à desidratação das mesmas em gradiente crescente de etanol (30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%). As amostras permaneciam em cada etapa de desidratação por aproximadamente 10 minutos. No etanol 100%, a desidratação foi repetida três vezes (GONÇALVES-ZULIANI et al., 2016).

Após a desidratação das amostras em gradiente de etanol, as amostras foram levadas para o laboratório da Central de Microscopia (CMI-COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá, onde foram realizadas as etapas seguintes. Para a visualização das amostras, foi realizado previamente o Ponto crítico, que consiste na total desidratação das amostras, pela substituição do etanol por CO₂. Esta etapa foi realizada no aparelho Baltec CPD 030. As amostras foram então, metalizadas em ouro, através de três ciclos de 5 minutos com corrente de 6mA, em aparelho metalizador Baltec SCD 050 e em seguida, as amostras foram levadas para a observação no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Quanta 250.

5. Análise das imagens

Após a visualização das imagens, foram utilizadas 5 imagens de cada variedade no tempo 0 H (antes da inoculação), com magnificação de 1000x, para a mensuração da densidade estomática (quantidade de estômatos por unidade de área foliar), tamanho médio de estômatos e medição da área total da abertura estomática. Para a obtenção das medidas, foi utilizado o programa Image J e, posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) e as médias comparadas, através do teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias não possuem a capacidade de penetrar na epiderme vegetal, sendo assim, estes microrganismos dependem da presença de aberturas naturais ou ferimentos, para penetrar nas plantas (MELOTTO et al., 2006). Devido à importância dos estômatos como portas de entrada para a *X. citri* subsp. *citri* em plantas de citros, foi realizada a comparação da quantidade média de estômatos por área de superfície foliar, o tamanho médio dos estômatos e da área total da abertura estomática nos 14 genótipos de citros.

Na Figura 1, tem-se as médias das densidades estomáticas, das 14 variedades de citros analisadas, ou seja, foram feitas as médias das quantidades de estômatos observadas em uma superfície foliar de 115000 μm^2 . A variedade resistente Vermelha foi a que apresentou a maior densidade estomática (73,6 estômatos), enquanto as variedades Hamlin, Pêra Bianchi/CC, Pêra IAC 2000/1, Pêra IAC 2000/2 e Pêra 58 apresentaram os menores valores médios de quantidade de estômatos por área foliar analisada.

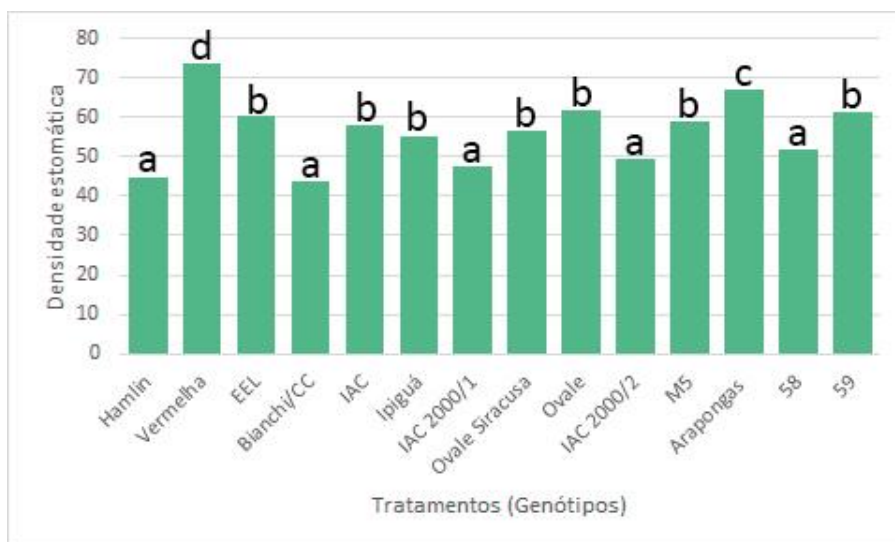


Figura 1. Comparação das médias da densidade estomática de 14 variedades de *Citrus*, em uma área foliar de 155000 μm^2 . Médias seguidas das mesmas letras não difeririam entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Na Figura 2 é possível comparar os tamanhos médios da área da abertura estomática dos 14 genótipos de citros analisados. Pela imagem, é possível perceber que a variedade controle Vermelha apresentou a maior média de tamanho de estômato (26,7 μm^2), seguida pela

variedade suscetível Hamlin (23,4 μm^2). Os menores tamanhos da abertura estomática foram obtidos pelas variedades Pêra Arapongas e Pêra Bianchi/CC, as quais apresentaram 11,8 μm^2 e 12,7 μm^2 , respectivamente. As variedades Pêra Ovale Siracusa, Pêra EEL, Pêra IAC, Pêra Ipiгуá e Pêra 59 tiveram valores médios de abertura estomática que variaram de 14 μm^2 a 15,2 μm^2 .

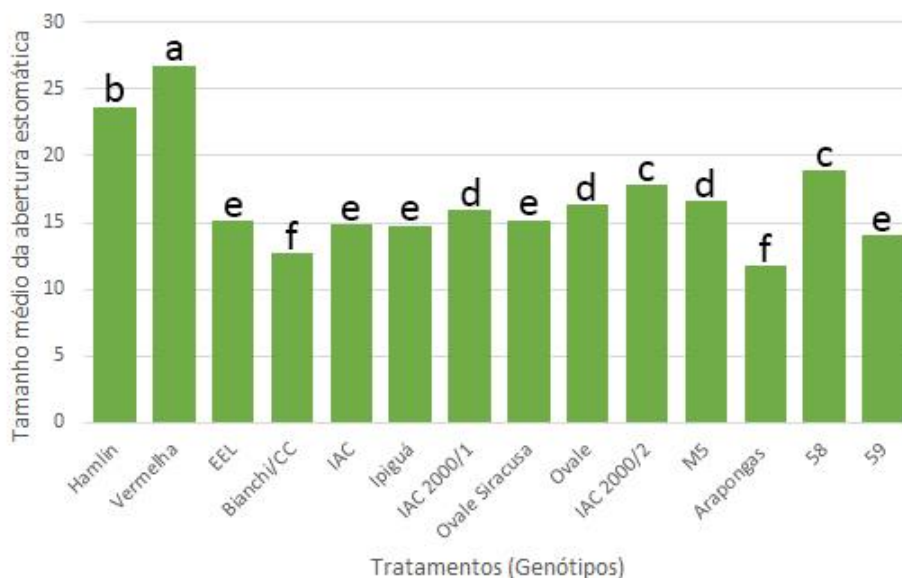


Figura 2. Comparação dos tamanhos médios da área de abertura estomática de 14 variedades de *Citrus*. Médias seguidas das mesmas letras não difeririam entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Wang et al (2011) avaliou duas variedades contrastantes com relação à resistência ao cancro cítrico e verificou, através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) que a variedade Meiwa (*Fortunella crassifolia*), considerada resistente, apresentou menor densidade estomática e estômatos menores, quando comparados à variedade suscetível Newhall (*C. sinensis*).

Embora neste experimento, a variedade resistente Vermelha tenha apresentado áreas de abertura estomática, quantidade de estômatos e tamanho de estômatos maiores, quando comparada às demais variedades, neste caso, sua resistência pode ser justificada por outros fatores, como a presença de uma camada de cera mais resistente, e a presença de menos estruturas rugosas na superfície foliar que possam facilitar a aderência da bactéria na folha, quando comparada com a variedade suscetível Hamlin, por exemplo, como pode ser observado na Figura 3.

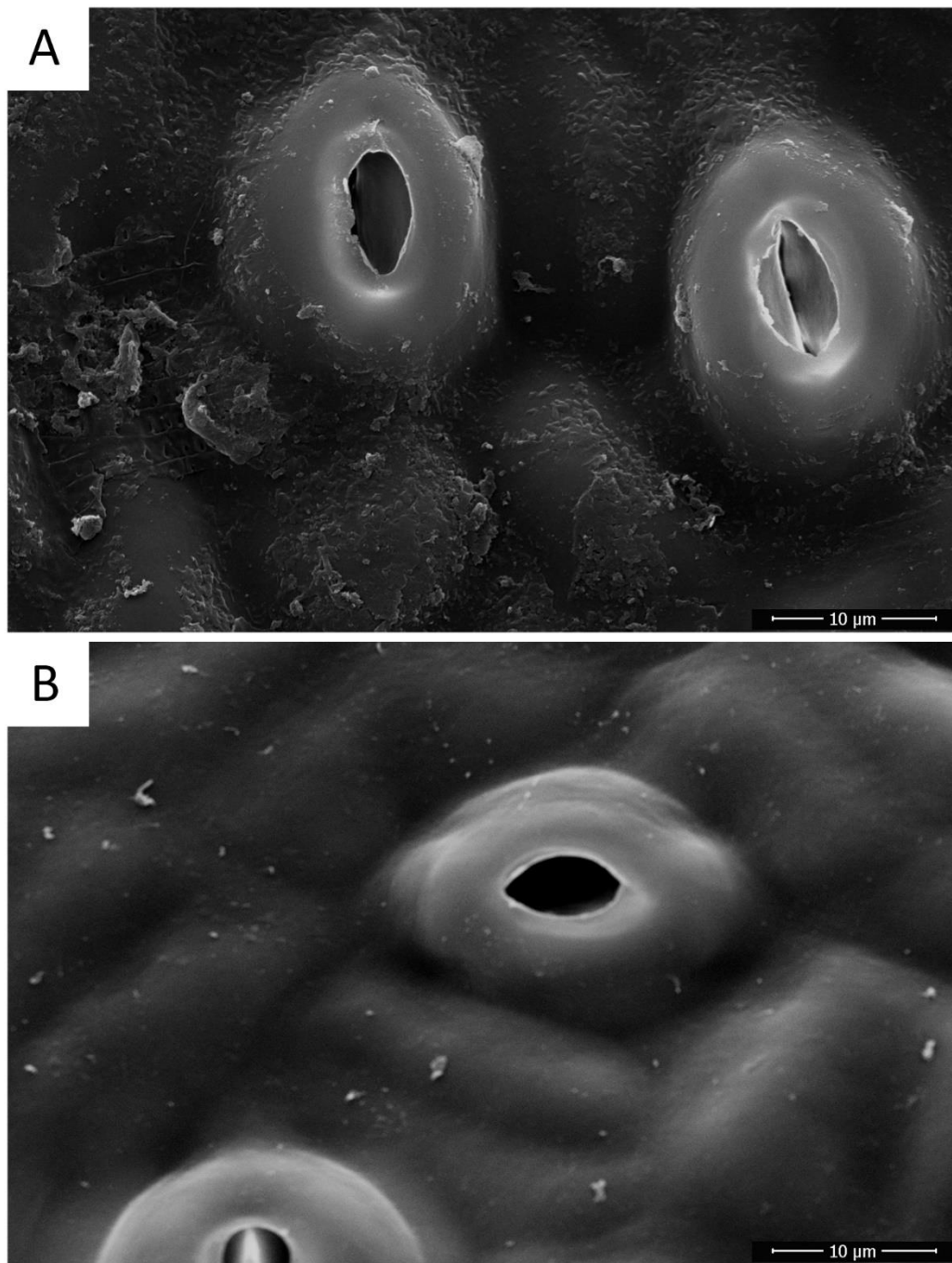


Figura 3. Comparação da superfície abaxial foliar da variedade suscetível de laranja doce (*Citrus sinensis*) Hamlin (A) e variedade resistente de tangerina (*C. reticulata*) Vermelha (B). Imagens feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, com magnificação de 7000x.

Na Figura 4, tem-se as imagens da face abaxial das folhas de cada variedade visualizadas em Microscopia Eletrônica de Varredura, no tempo 0 H, com magnitude de 1000x. Através do programa Image J, foi possível medir a área total de cada imagem analisada, a qual foi de 115000 μm^2 . Sendo assim, considerando 5 imagens de cada variedade, foram obtidos os

valores médios da área total da abertura estomática em uma área foliar de 115000 μm^2 (Figura 2).

Através da Figura 5, é possível observar que a variedade controle resistente Vermelha, foi a que apresentou a maior média da área estomática total (1963,2 μm^2), enquanto a variedade de laranja Pêra Bianchi/CC obteve o menor valor (555,5 μm^2). As variedades Pêra Ovale, Pêra M5 e Pêra 58 apresentaram médias semelhantes estatisticamente ao controle suscetível Hamlin, através do teste de Scott-Knott a 5% de significância.

As laranjas Pêra EEL, IAC 2000/2, 59, IAC e Ovale Siracusa, ficaram em um grupo intermediário, com valores médios de área de abertura estomática total que variaram de 853,5 μm^2 a 901,7 μm^2 . E as variedades Pêra Ipiguá, Pêra Arapongas e Pêra IAC 2000/1, apresentaram médias de áreas de abertura estomática relativamente menores, de 751,8 μm^2 a 810,1 μm^2 .

Gonçalves-Zuliani et al. (2016) também avaliaram através da Microscopia Eletrônica de Varredura, duas variedades, a Pêra IAC e a Washington Navel, e observaram que a variedade resistente Pêra IAC apresentou menores áreas de abertura estomática, quando comparada com a variedade suscetível. Estes autores constataram ainda, que na variedade suscetível Washington Navel, havia uma maior densidade populacional de bactérias quando comparada à variedade Pêra IAC.

Ao analisar as 12 variedades de laranja doce (*C. sinensis*), variedade Pêra, tem-se que todas as variedades apresentaram menores médias de densidade estomática, tamanho de estômatos e área estomática (Figuras 1, 2 e 5) do que os controles Hamlin e Vermelha. E dentre as variedades analisadas, a Pêra Bianchi/CC foi a que apresentou os menores valores para as três características.

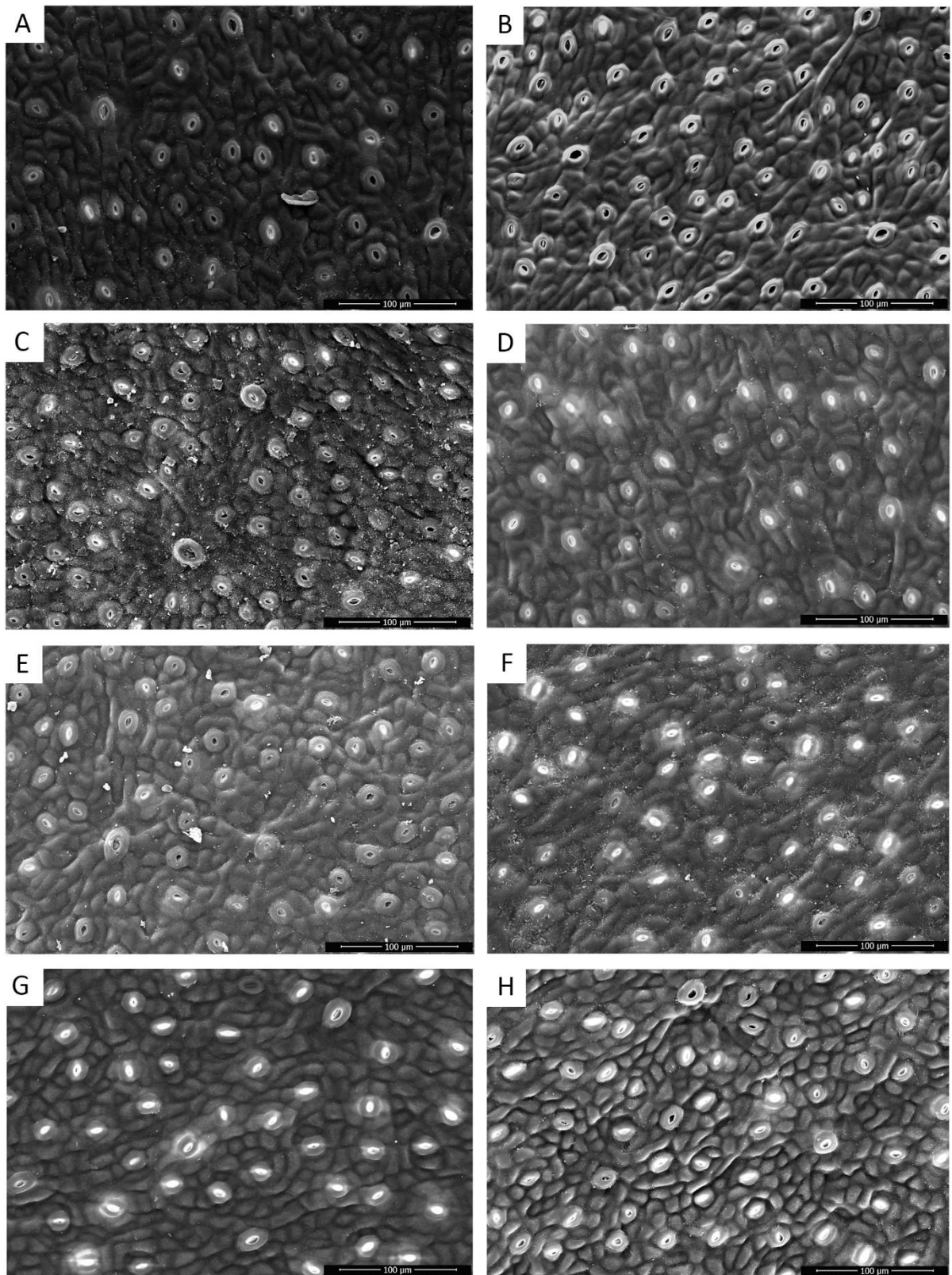
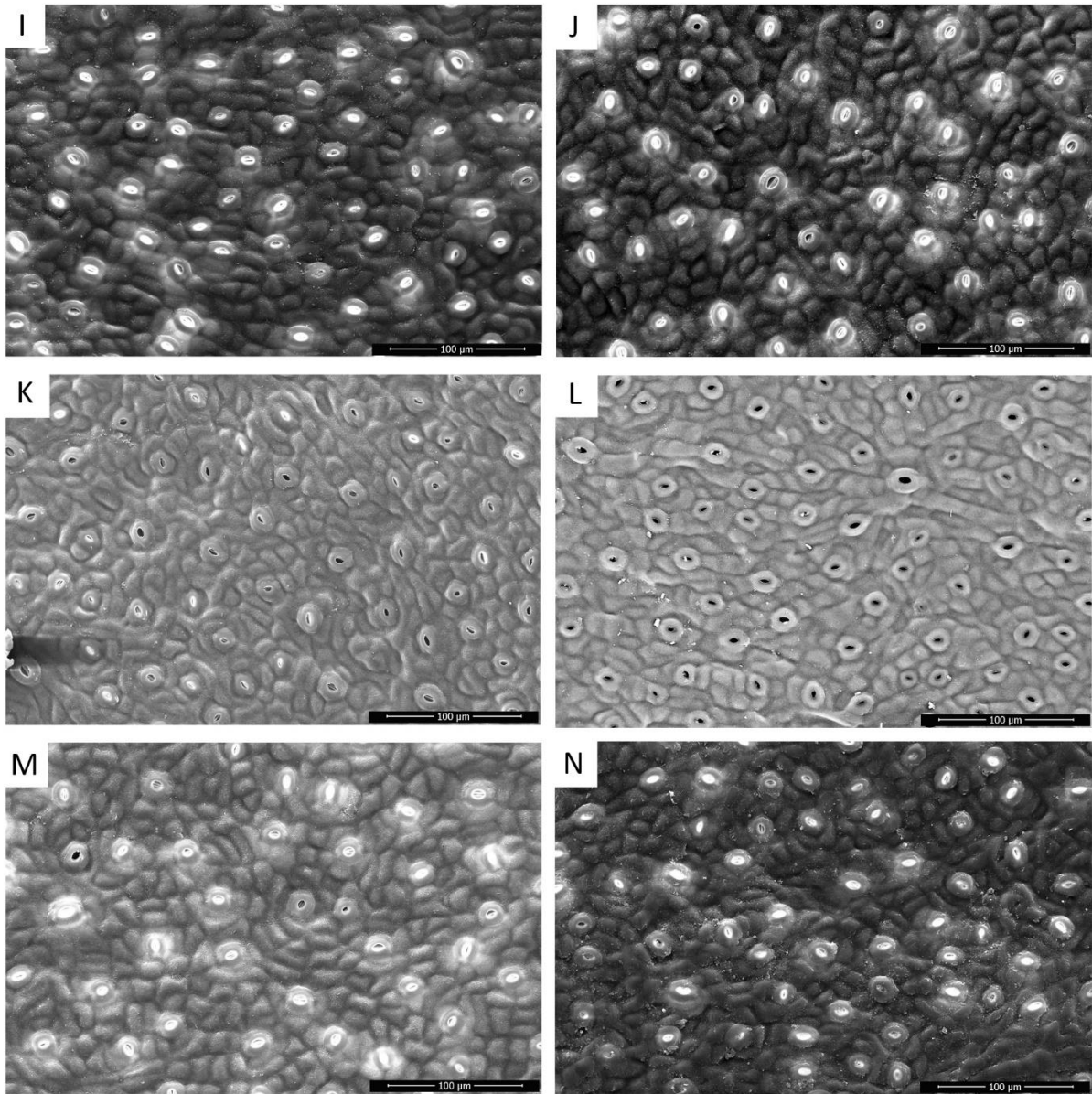


Figura 4. Comparação da superfície abaxial foliar das 14 variedades de citros, no tempo 0 hora, com magnificação de 1000x em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250. A. Hamlin. B. Vermelha. C. Pêra EEL. D. Pêra Bianchi/CC. E. Pêra IAC. F. Pêra Ipiguá. G. Pêra IAC 2000/1. H. Pêra Ovale Siracusa. I. Pêra Ovale. J. Pêra IAC 2000/2. K. Pêra M5. L. Pêra Arapongas. M. Pêra 58. N. Pêra 59 (Continua...)



Continuação Figura 4. Comparação da superfície abaxial foliar das 14 variedades de citros, no tempo 0 hora, com magnificação de 1000x em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250. A. Hamlin. B. Vermelha. C. Pêra EEL. D. Pêra Bianchi/CC. E. Pêra IAC. F. Pêra Ipiгуá. G. Pêra IAC 2000/1. H. Pêra Ovale Siracusa. I. Pêra Ovale. J. Pêra IAC 2000/2. K. Pêra M5. L. Pêra Arapongas. M. Pêra 58. N. Pêra 59.

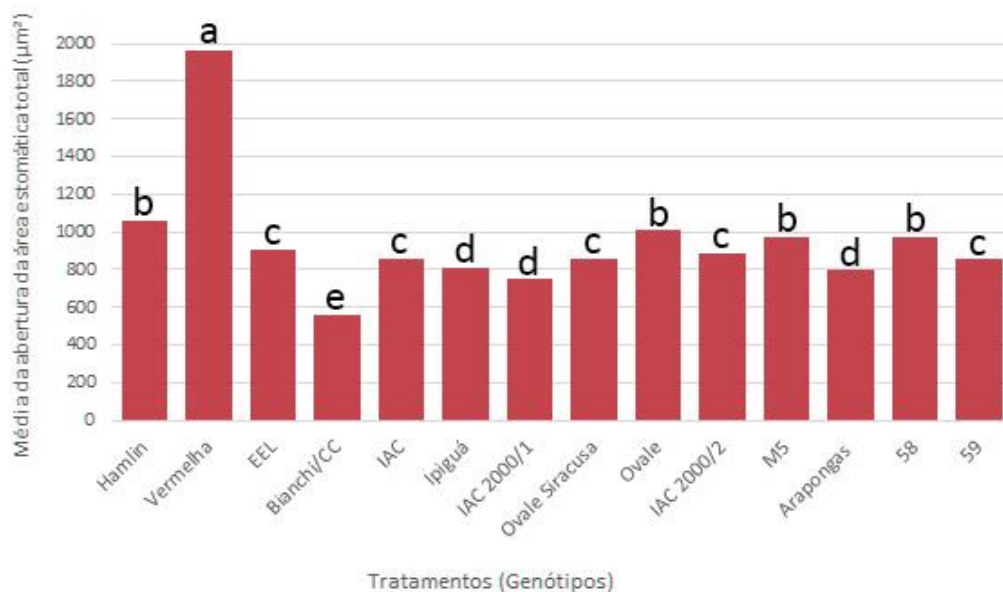


Figura 5. Médias da área estomática total de 14 variedades de *Citrus*, em uma área foliar de 155000 μm^2 . Médias seguidas das mesmas letras não difeririam entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Através dos experimentos com Microscopia Eletrônica de Varredura, também foi possível observar as diferentes variedades de *Citrus* inoculadas com *X. citri* subsp. *citri* ao longo do tempo. Na Figura 6A, é possível observar o ponto de inoculação, com a cavidade do ferimento causado pela agulha, no momento da inoculação, aos 4 dias após a inoculação da variedade suscetível Hamlin com a *X. citri* subsp. *citri*. Com uma magnificação maior (Figura 6B), é possível observar uma alta quantidade de bactérias, rodeadas por uma camada de biofilme.

Na Figura 7A, ainda observando a variedade suscetível Hamlin, aos 8 DAI, com magnificação de 10000x, é possível notar que o biofilme persiste, da mesma forma que a população de *X. citri* subsp. *citri*. Por outro lado, na Figura 7B, observa-se a variedade controle resistente Vermelha, com a mesma magnificação de 10000x, no mesmo tempo de coleta (8 DAI), nota-se a ausência de bactérias e a presença de vilosidades, possivelmente, um exsudado proveniente da planta.

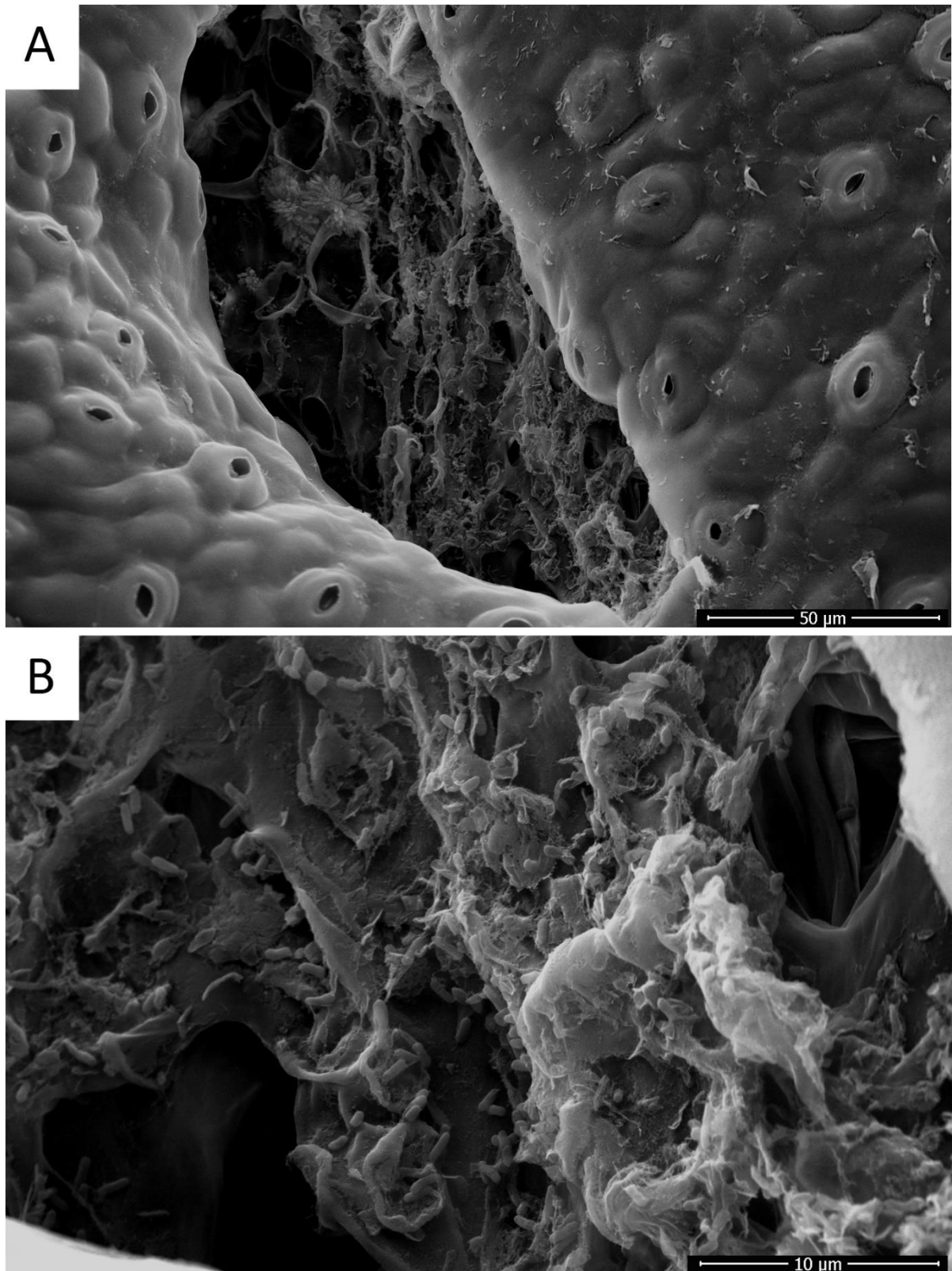


Figura 6. Imagens feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250. A. Variedade suscetível Hamlin, inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, 4 dias após a inoculação (DAI), com magnificação de 2000x. B. Imagem de dentro do ponto de inoculação com *X. citri* subsp. *citri*, na variedade suscetível Hamlin, 4 DAI, com magnificação de 10000x.

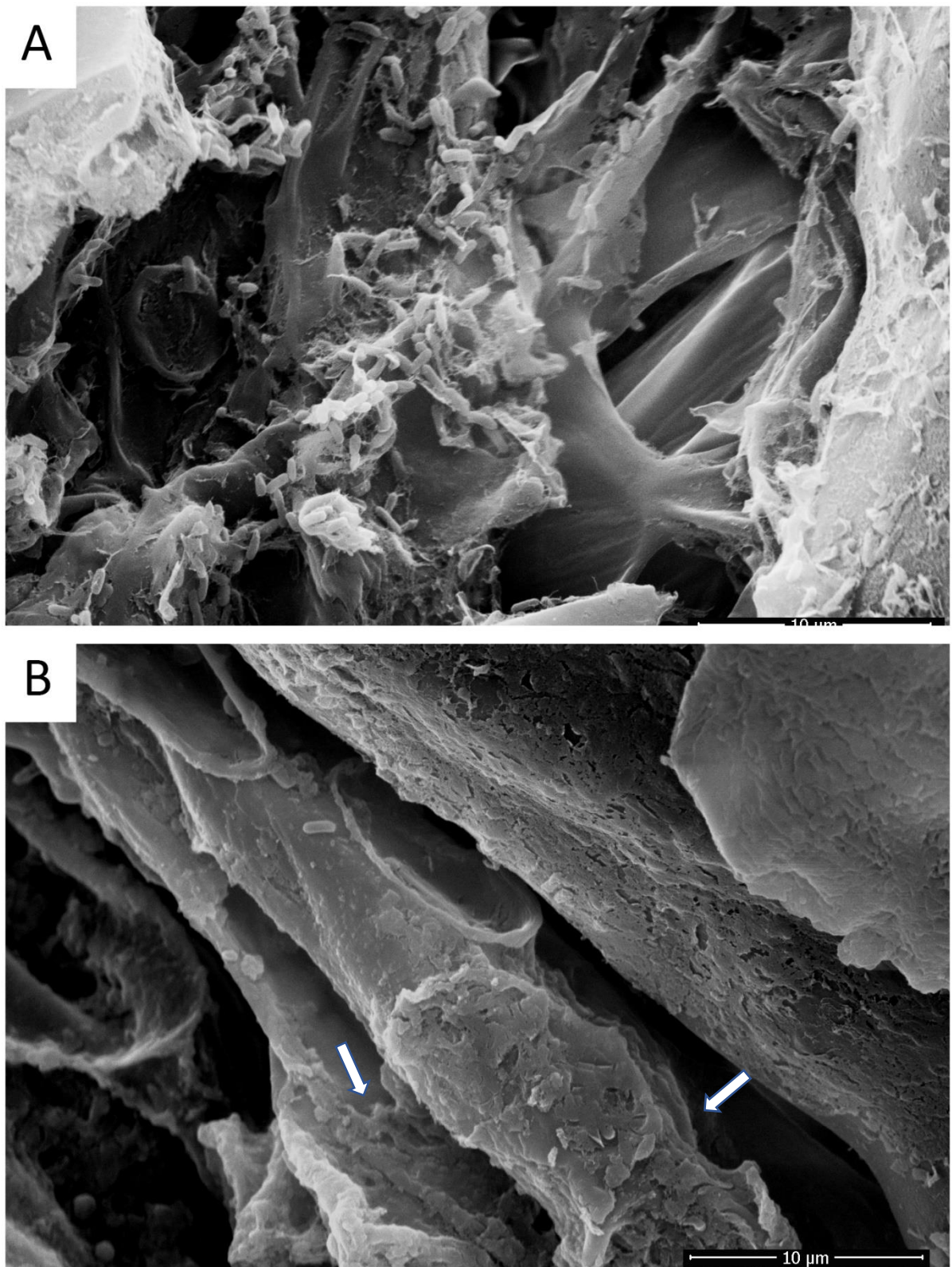


Figura 7. Imagens feitas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250. A. Variedade suscetível Hamlin, 8 dias após a inoculação (DAI), com magnificação de 10000x. B. Variedade resistente Vermelha, 8 dias após a inoculação (DAI), com magnificação de 10000x. As setas indicam a formação das vilosidades.

Na Figura 8, é possível observar com maior clareza a formação do biofilme bacteriano pela *X. citri* subsp. *citri*, aos 8 DAI, na variedade suscetível Hamlin. Segundo Li e Wang (2010), a formação de biofilme é essencial para que as bactérias sobrevivam de forma epifítica na planta, isto é, na superfície das folhas, antes do processo de infecção e do desenvolvimento dos sintomas.

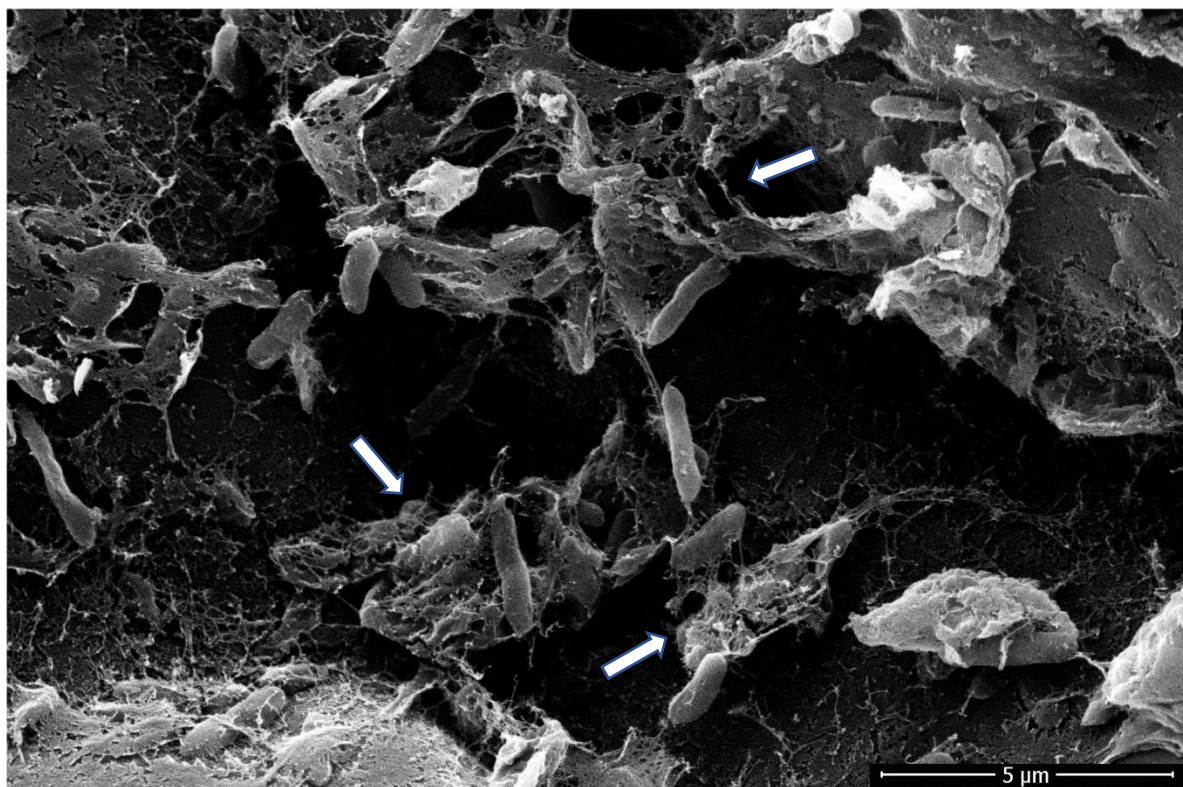


Figura 8. Folha de laranja doce (*Citrus sinensis*), variedade Hamlin, inoculada com *Xanthomonas citri*. subsp. *citri*, aos 8 dias após a inoculação. As setas indicam a formação do biofilme bacteriano. Imagem obtida em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250.

Na Figura 9, pode-se observar a evolução da formação do sintoma de cancro cítrico em Microscopia Eletrônica de Varredura. Nas imagens 9E e 9F, pode-se observar os detalhes do cancro com uma magnificação de 10000x, onde é possível notar a presença de algumas bactérias no local da lesão e a formação de vários relevos, que pressupõem a ocorrência de hipertrofia e hiperplasia, com a elevação do tamanho e do número de células vegetais.

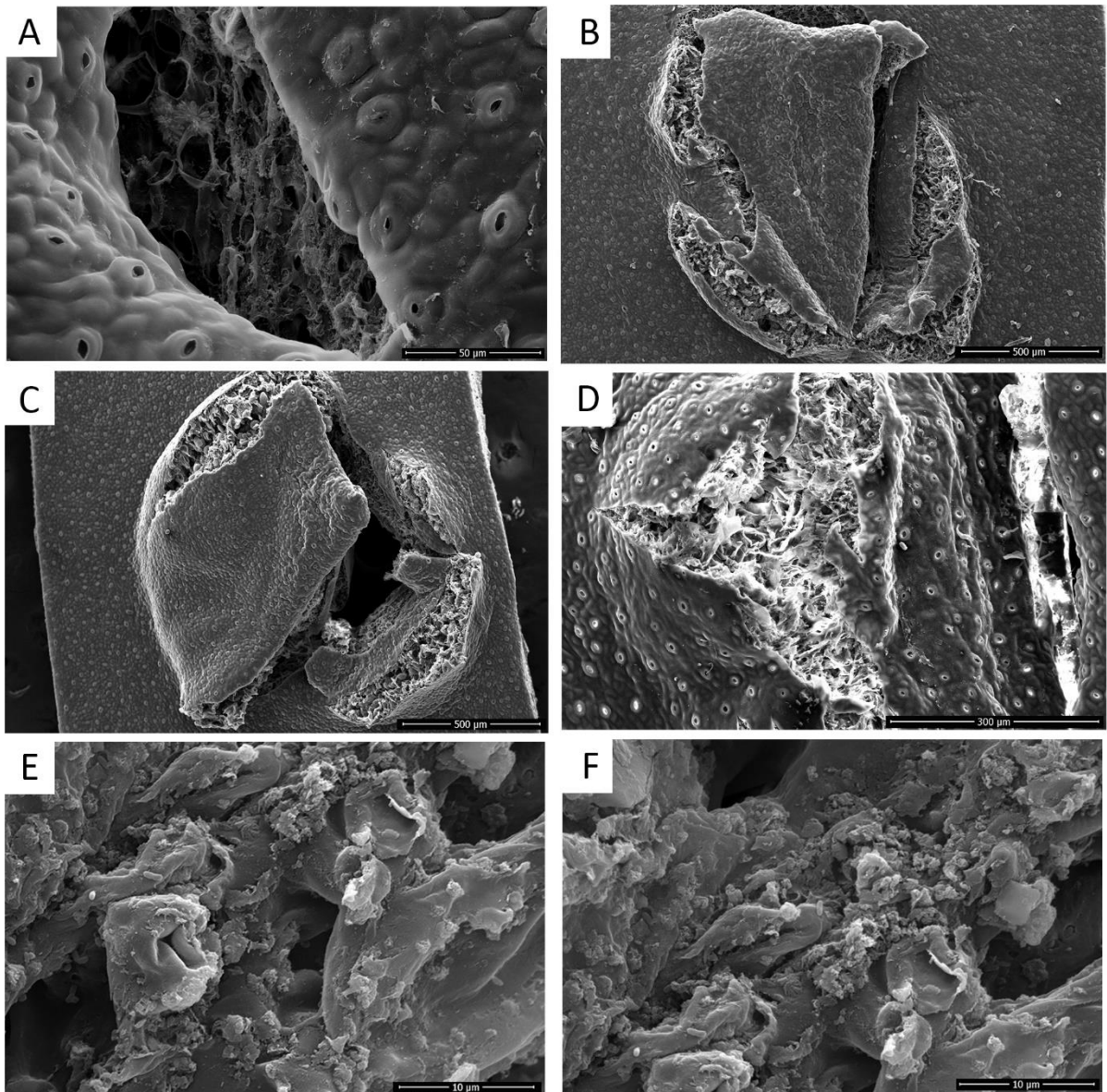


Figura 9: Desenvolvimento do cancro. Imagens em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, das superfícies foliares de laranja doce (*Citrus sinensis*) inoculadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A. 4 DAI (Dias após a inoculação), magnificação de 2000x. B. 8 DAI, magnificação de 200x. C. 12 DAI, magnificação de 200x. D. 16 DAI, magnificação de 500x. E e F. Lesão de cancro cítrico, com magnificação de 10000x.

Durante a execução do experimento, foram obtidas imagens das 14 variedades de citros nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação com a bactéria *X. citri* subsp. *citri* (Figuras 10 a 23). Na Figura 10, é possível observar que na variedade suscetível de laranja doce Hamlin, há um intenso desenvolvimento da população bacteriana, aos 4, 8 e 12 DAI. Já aos 16 DAI, observa-se uma menor população de bactérias na superfície da folha observada, porém através da visualização dos sintomas a olho nu, foi possível visualizar a formação do cancro, com o crescimento do diâmetro médio das lesões, o que pode indicar que as bactérias

penetraram no tecido foliar, nesta data de avaliação. Ao comparar as imagens da variedade suscetível Hamlin (Figura 10) com as outras variedades de *Citrus*, pode-se perceber que na variedade suscetível há uma quantidade maior de bactérias aos 4, 8, 12 e 16 DAI, em relação às demais variedades analisadas.

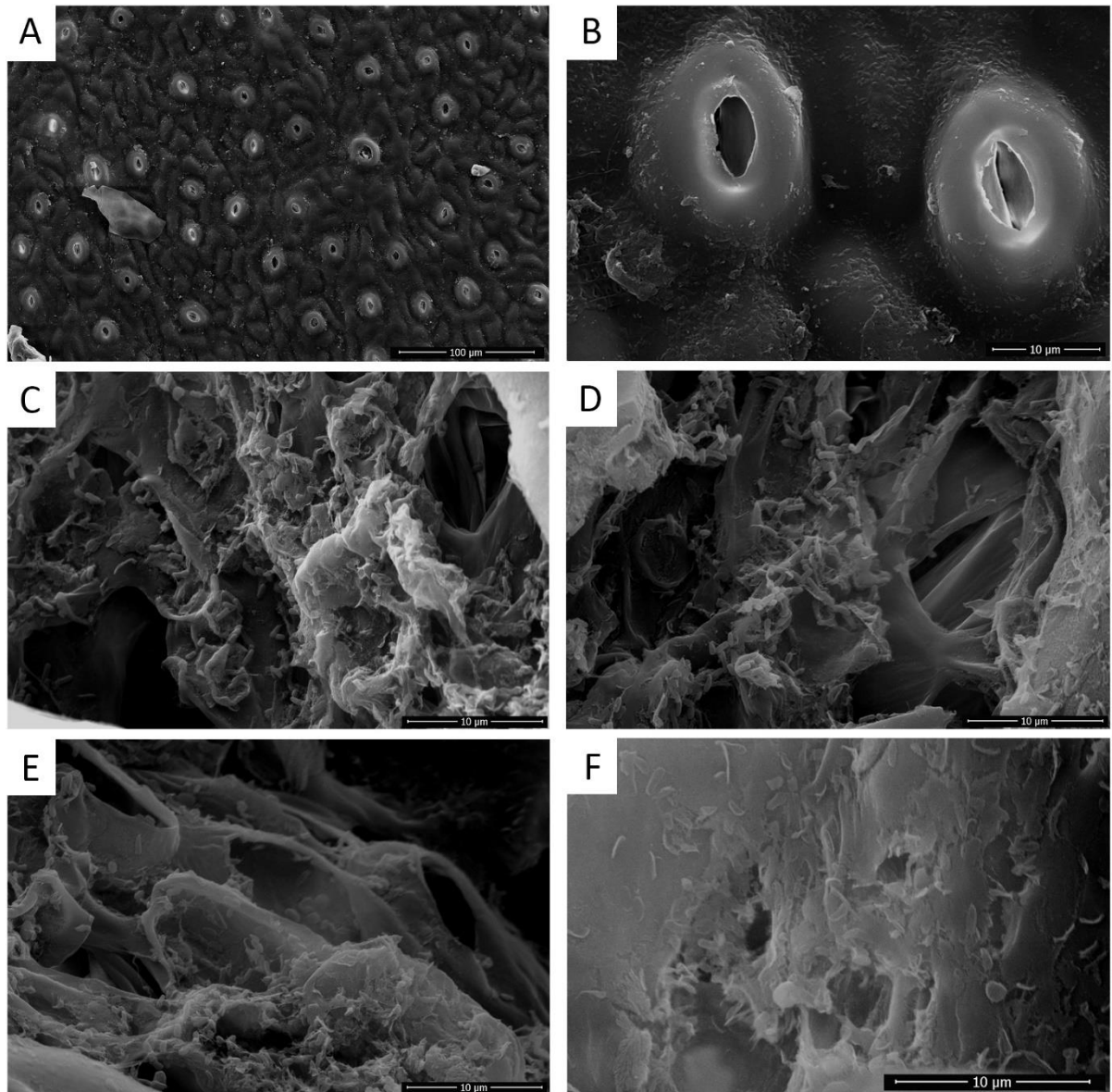


Figura 10. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Hamlin obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Hamlin, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Hamlin inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Na Figura 11 estão as imagens da variedade resistente Vermelha e observa-se que a população de *X. citri* subsp. *citri* encontra-se reduzida em relação à variedade suscetível Hamlin, limitando-se a apenas algumas bactérias isoladas, em todos os tempos de avaliação (Figuras 11 C, D, E e F).

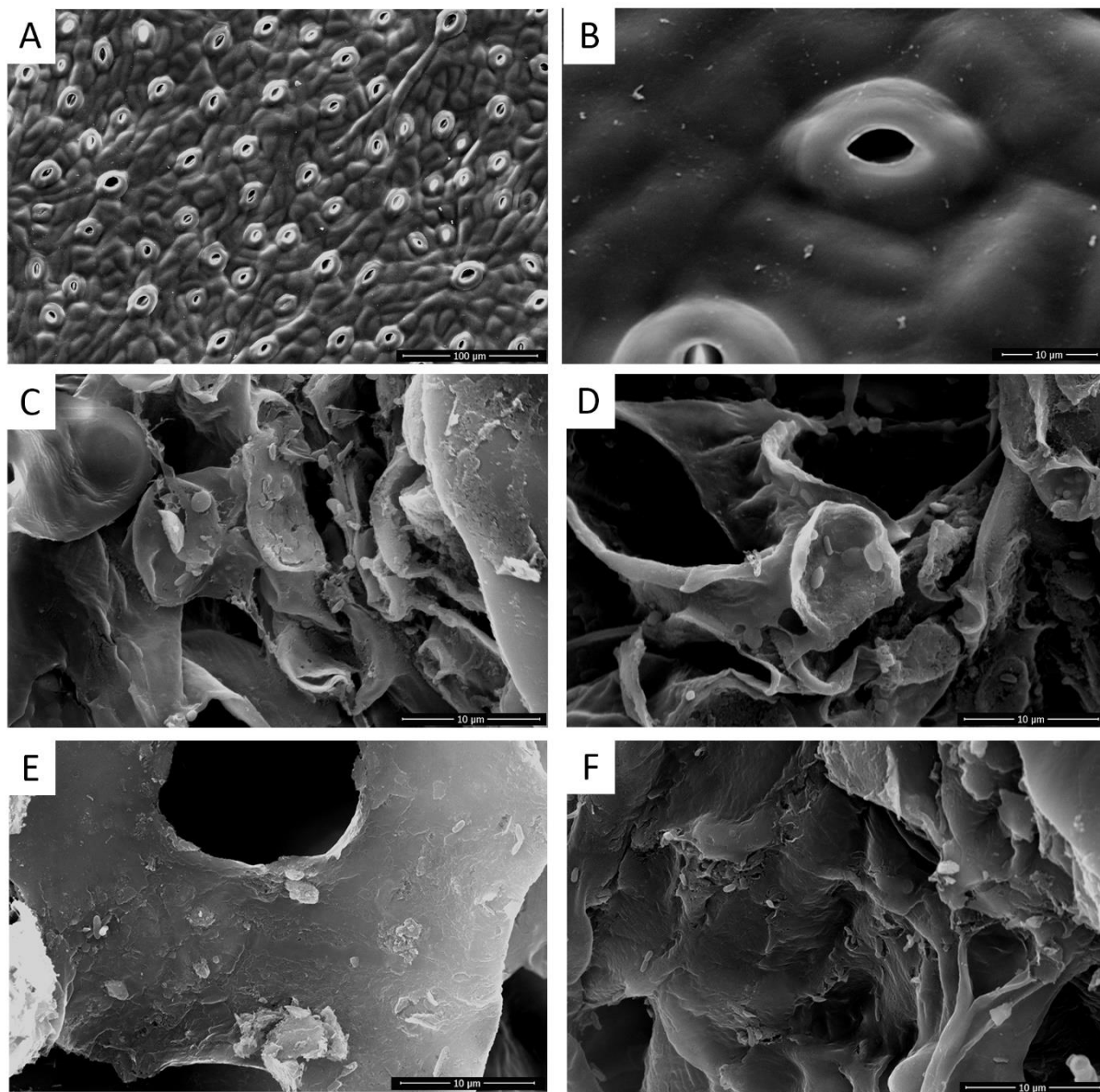


Figura 11. Imagens da variedade de tangerina (*Citrus reticulata*), Vermelha obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Vermelha, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Vermelha inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Considerando a variedade Pêra EEL, foi possível encontrar populações de bactérias na superfície da folha, ao lado do ponto de inoculação, principalmente na coleta do 8 DAI. Aos 12 e 16 DAI, observa-se uma redução na quantidade de *X. citri* subsp. *citri* na superfície foliar.

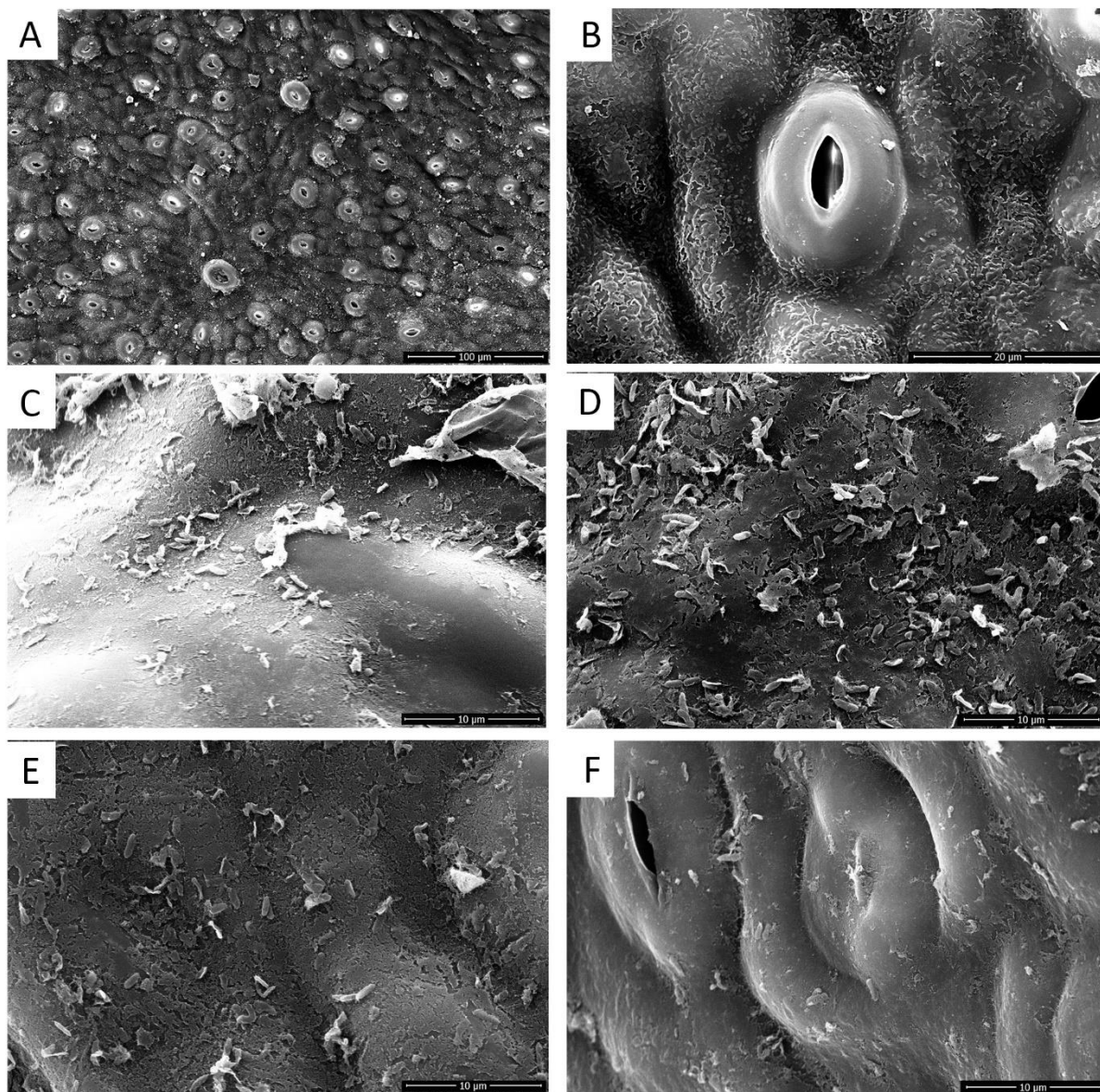


Figura 12. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra EEL obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra EEL, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra EEL inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Na Figura 13 observa-se as imagens da Pêra Bianchi/CC, nas quais é possível observar a presença das bactérias tanto na superfície foliar (Figuras 13 C e E), quanto na região interna

da folha (Figura 13 D). No 16 DAI foi possível observar a formação da lesão do cancro, na qual foram observadas bactérias saindo do tecido foliar (Figura 13 F).

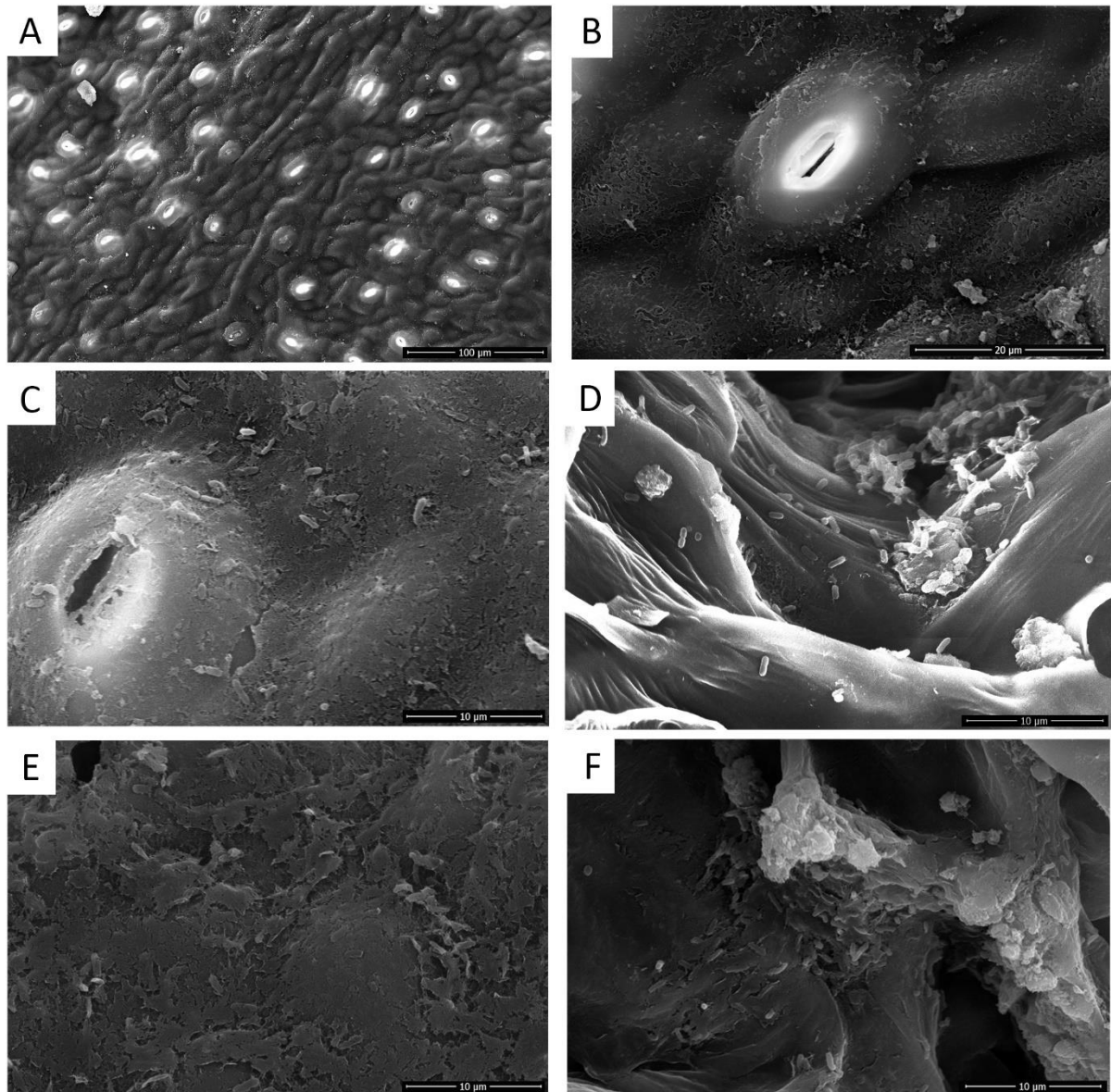


Figura 13. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Bianchi/CC obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Bianchi/CC, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Bianchi/CC inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

As imagens da variedade Pêra IAC mostraram que aos 4 DAI (Figura 14C), havia uma quantidade reduzida de bactérias ao redor do ponto de inoculação, com um aumento da população bacteriana aos 8 DAI (Figura 14 D), na superfície foliar. No 12º dia após a inoculação

(Figura 14 E), houve a formação da lesão de cancro, com bactérias sendo observadas saindo do tecido foliar. No 16º dia após a inoculação (Figura 14 F) não foram encontradas bactérias nas lesões do cancro nas amostras observadas em Microscopia Eletrônica de Varredura e, foi possível notar também, que mesmo na superfície da folha havia uma quantidade reduzida de *X. citri* subsp. *citri*.

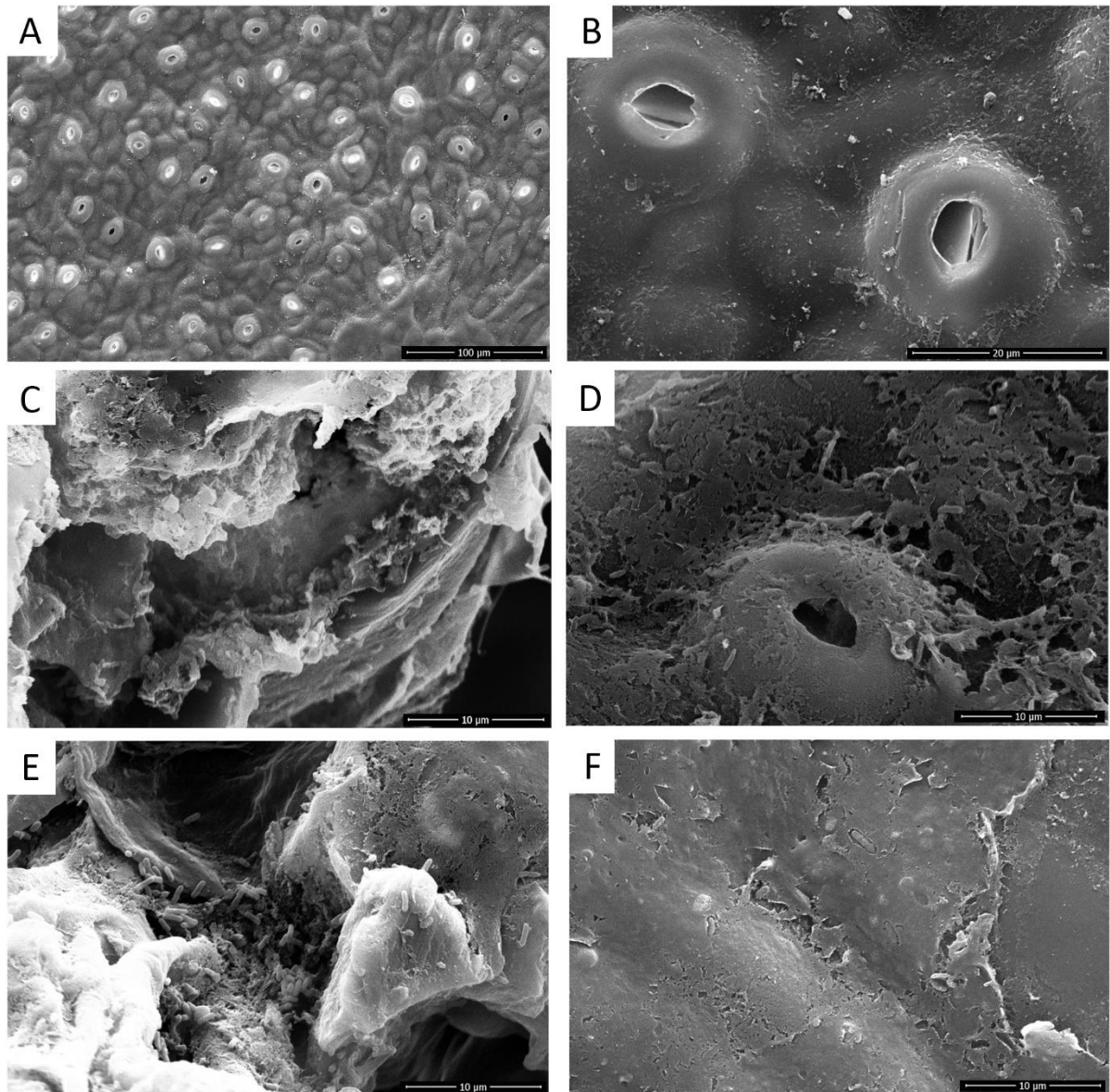


Figura 14. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra IAC obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra IAC, magnificação de 7000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra IAC inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Com relação à variedade Pêra Ipiгуá, em todos os períodos de avaliação só foram encontradas bactérias na região superficial das amostras (Figuras 15 C, D, E e F). Sendo que aos 16 DAI, é possível observar uma quantidade maior de bactérias na superfície, já envoltas pela camada de biofilme e, possivelmente por um exsudato foliar.

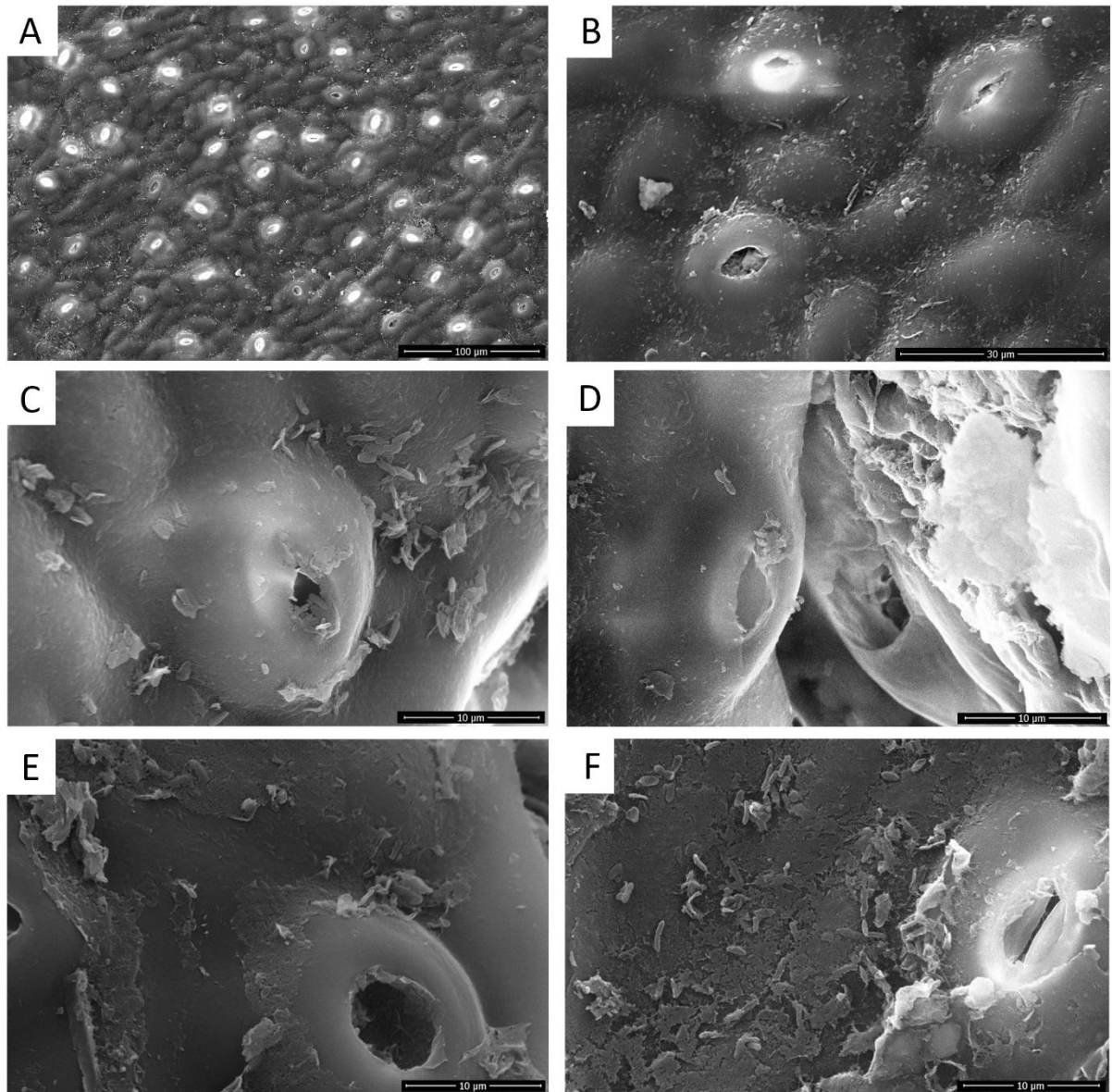


Figura 15. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Ipiгуá obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Ipiгуá, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Ipiгуá inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Na variedade de laranja doce (*C. sinensis*) Pêra IAC 2000/1, observou-se a presença de *X. citri* subsp. *citri* principalmente, aos 4 DAI (Figura 16 C). Nas avaliações posteriores, apenas algumas bactérias foram observadas na superfície foliar. A partir do 8 DAI já foi possível visualizar o início da ruptura da lesão de cancro.

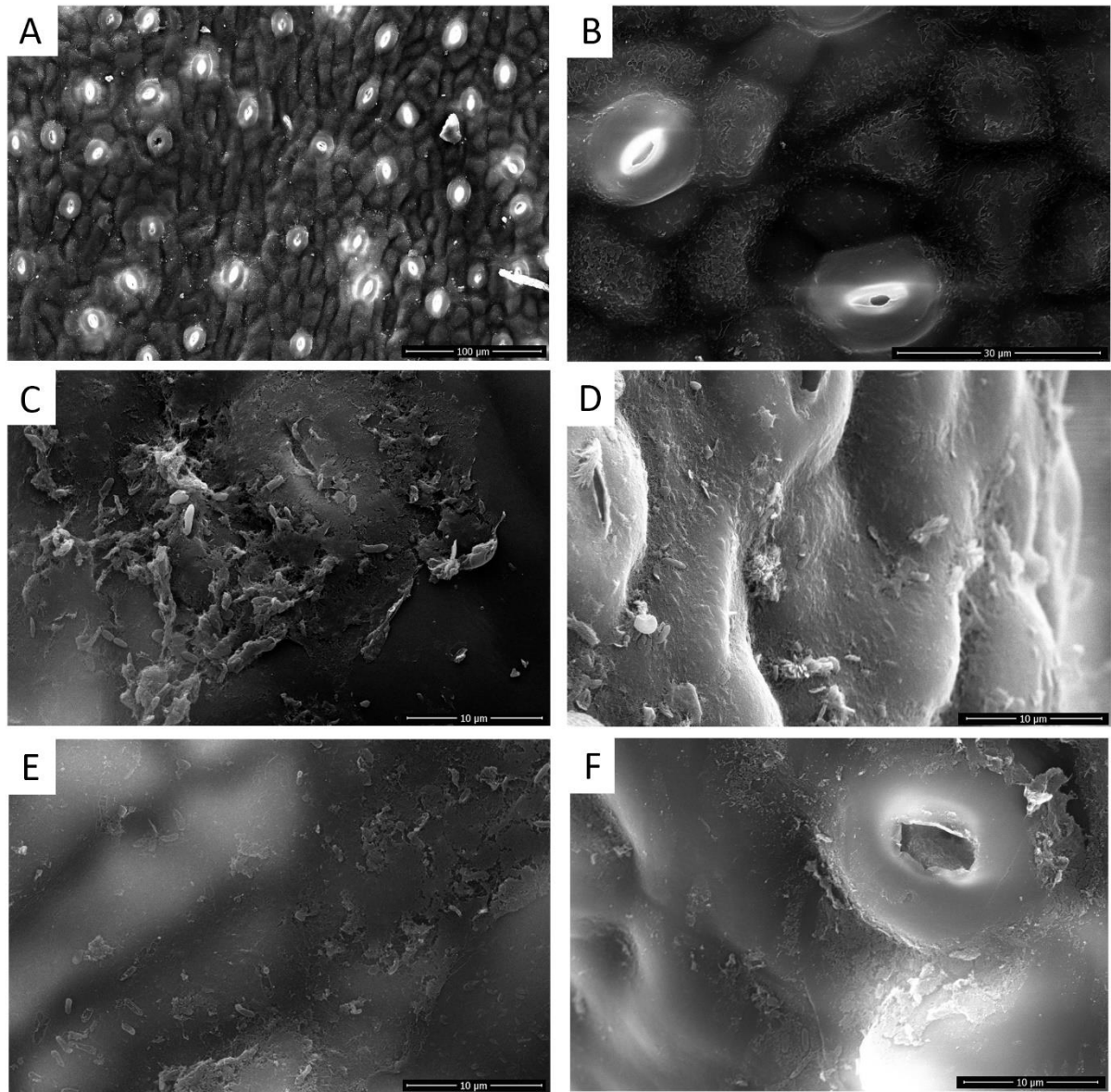


Figura 16. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra IAC 2000/1 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra IAC 2000/1, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra IAC 2000/1 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

A variedade Pêra Ovale Siracusa apresentou maiores quantidades de bactérias a partir do 8º dia após a inoculação, na região ao redor do ponto de inoculação. No 12º dia após a inoculação foi possível observar o pleno desenvolvimento da população de *X. citri* subsp. *citri*, juntamente com a formação do biofilme. Aos 16 dias após a inoculação, a população bacteriana encontrada na superfície das amostras foi menor, possivelmente, devido à colonização interna da folha pelas bactérias.

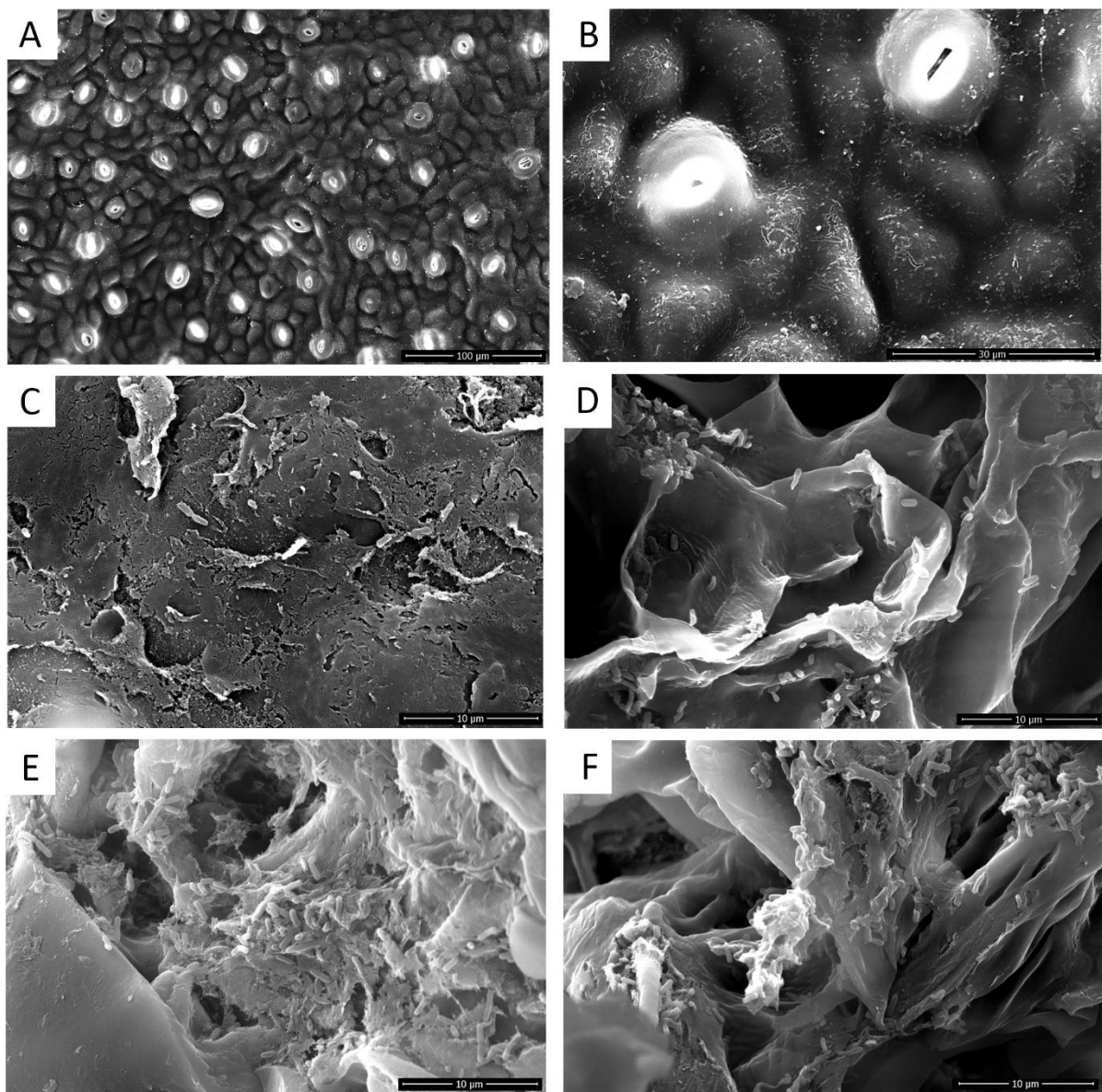


Figura 17. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Ovale Siracusa obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Ovale Siracusa, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Ovale Siracusa inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Na variedade Pêra Ovale, a maior concentração de bactérias na superfície foliar foi observada aos 4 DAI (Figura 18 C). Aos 12 dias após a inoculação (Figura 18 E), foram encontradas bactérias isoladas ao redor do ponto de inoculação e aos 16 DAI (Figura 18 F) foi possível notar a formação de biofilme na superfície das folhas, ao redor dos estômatos.

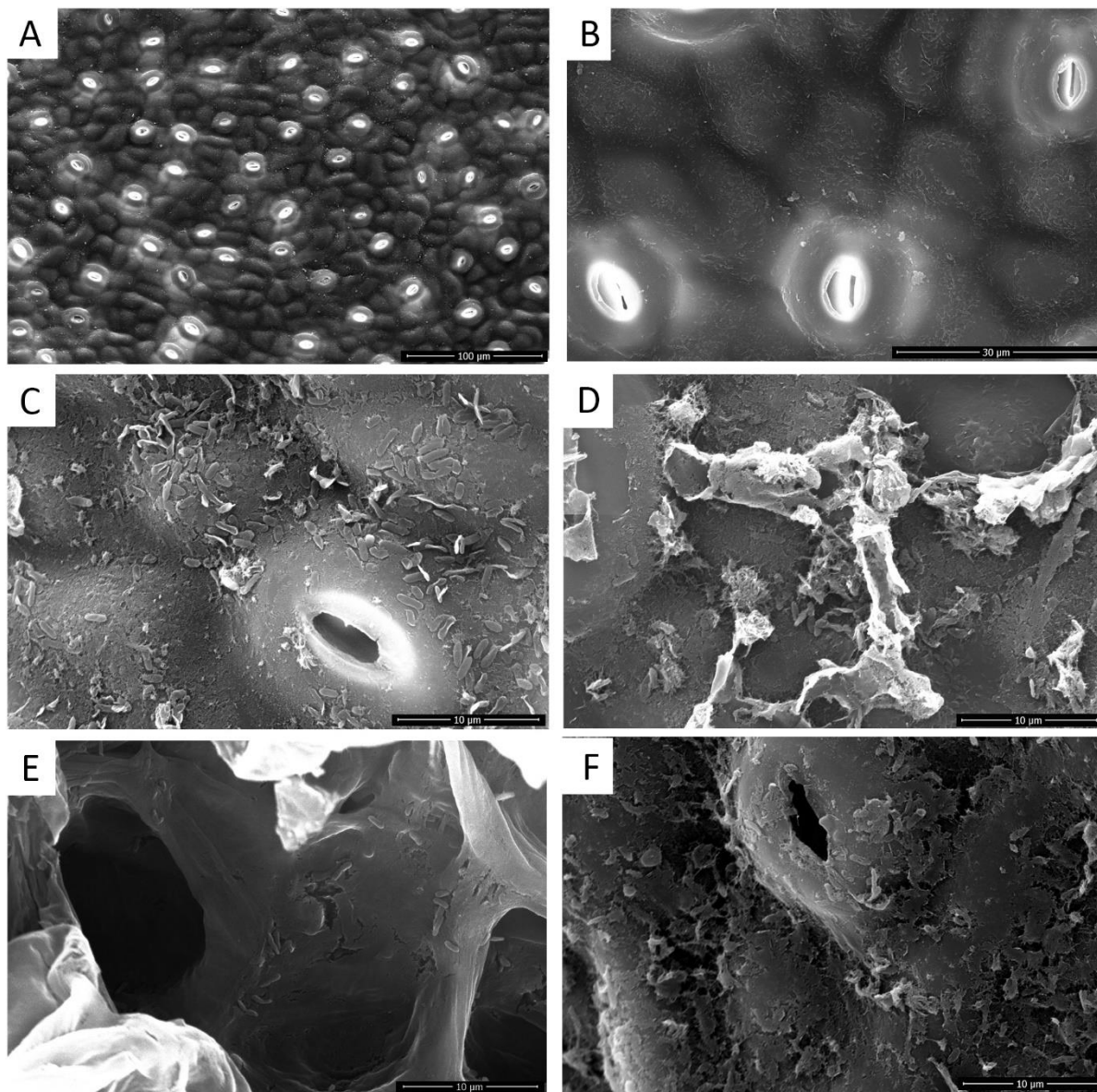


Figura 18. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Ovale obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Ovale, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Ovale inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Com relação à variedade Pêra IAC 2000/2, apenas foram encontradas bactérias na superfície foliar, próxima aos estômatos. Através das imagens, é possível perceber que houve um crescimento da população de *X. citri* subsp. *citri* no decorrer do tempo, sendo que aos 16 dias após a inoculação, pode-se observar a formação de biofilme bacteriano, com a provável liberação de exsudatos pela planta.

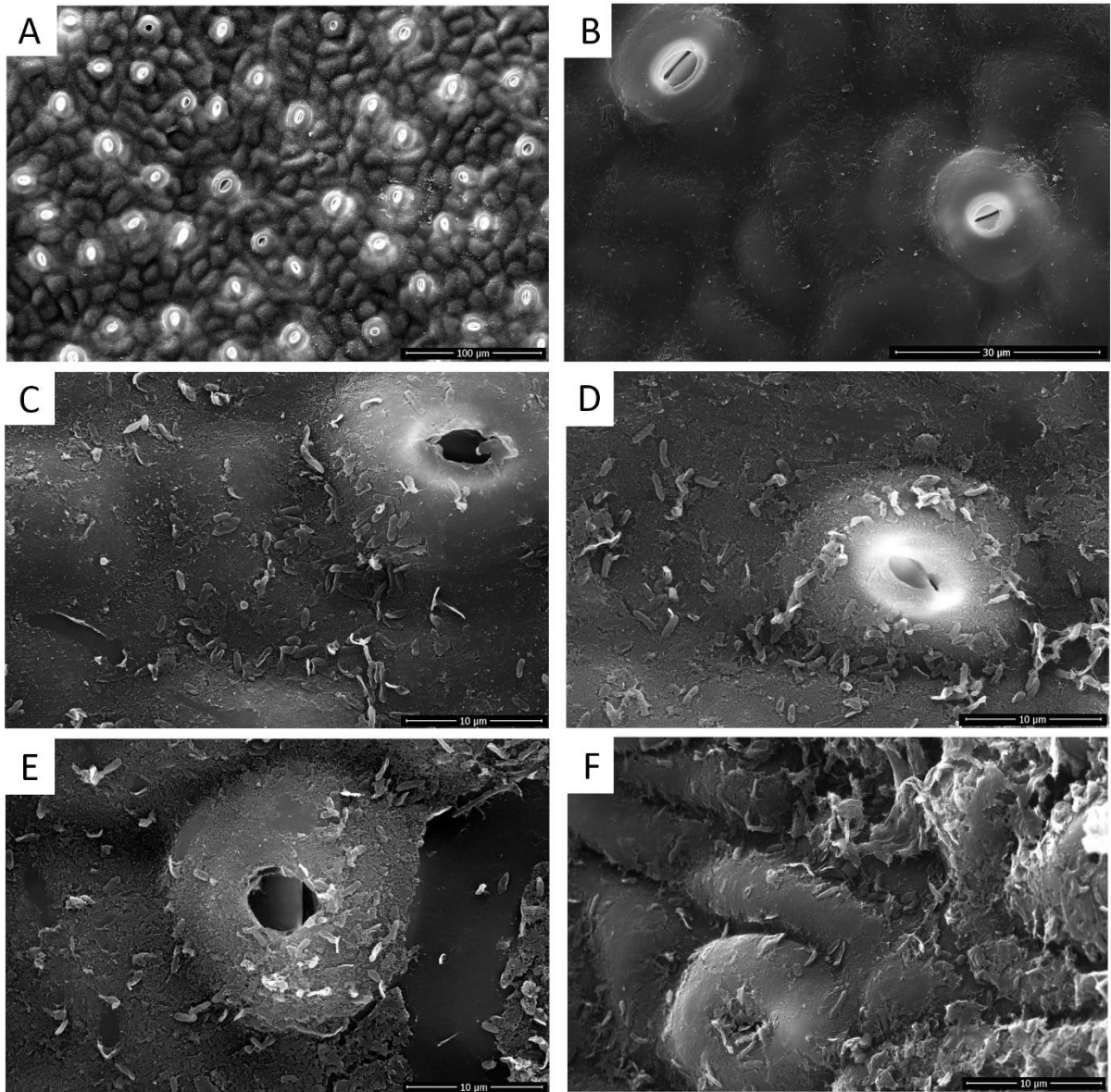


Figura 19. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra IAC 2000/2 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra IAC 2000/2, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra IAC 2000/2 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Na variedade Pêra M5, poucos indivíduos de *X. citri* subsp. *citri* foram encontrados nas amostras. A maior concentração de bactérias foi observada aos 4 DAI na superfície foliar (Figura 20C). Como houve a ruptura da epiderme foliar com a formação do cancro, possivelmente, essas bactérias foram capazes de penetrar no tecido foliar e colonizar a parte interna das folhas analisadas.

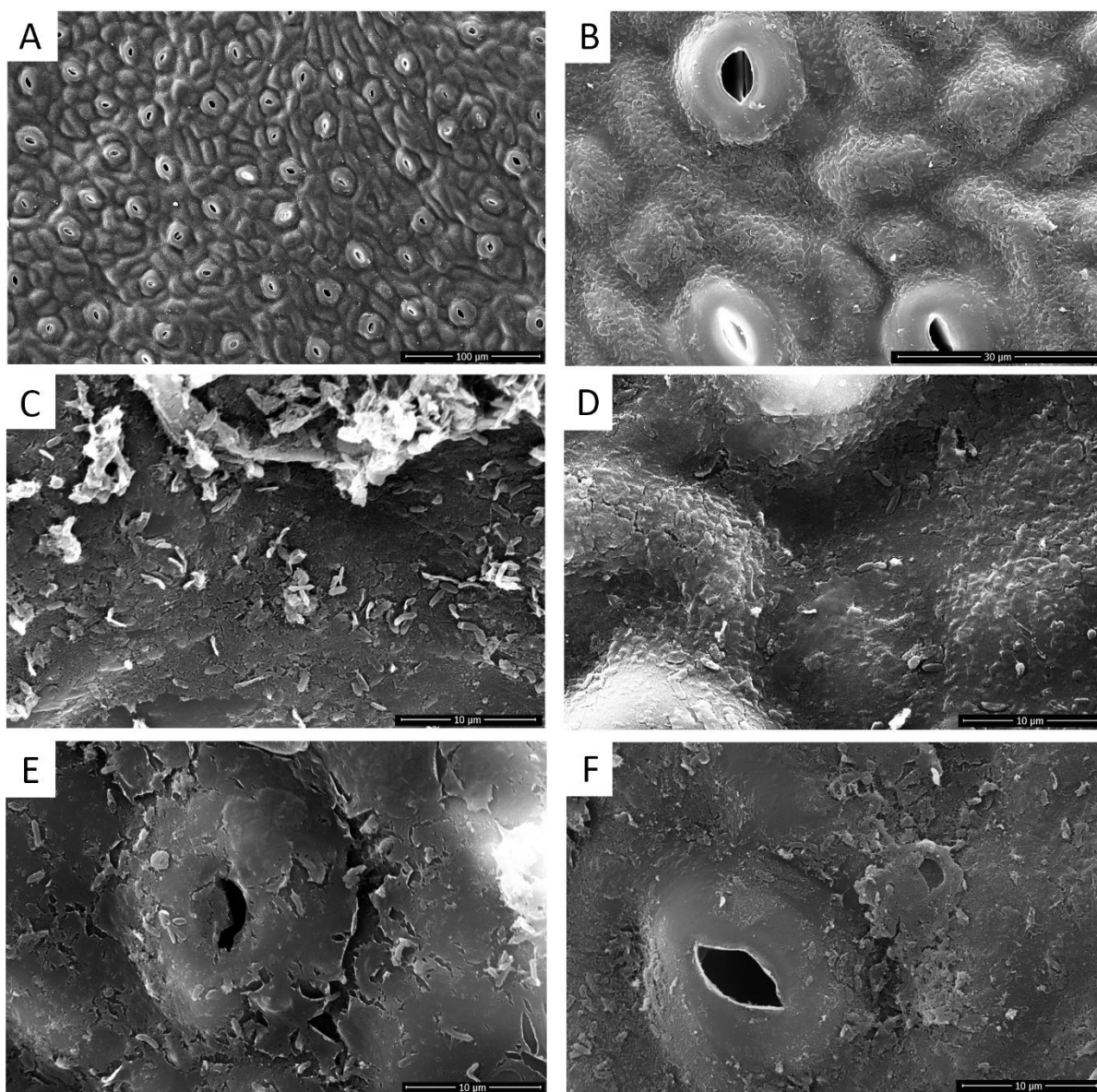


Figura 20. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra M5 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra M5, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra M5 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Ao analisar a variedade Pêra Arapongas, foi possível observar que houve um crescimento da população de *X. citri* subsp. *citri* ao longo do tempo de avaliação. Sendo que a partir do 8 DAI houve a formação da lesão do cancro, e aos 12 DAI, foram observadas bactérias saindo do tecido lesionado, o que persistiu até o 16° dia após a inoculação, quando também foram observadas bactérias na superfície foliar, próximas aos estômatos (Figura 21).

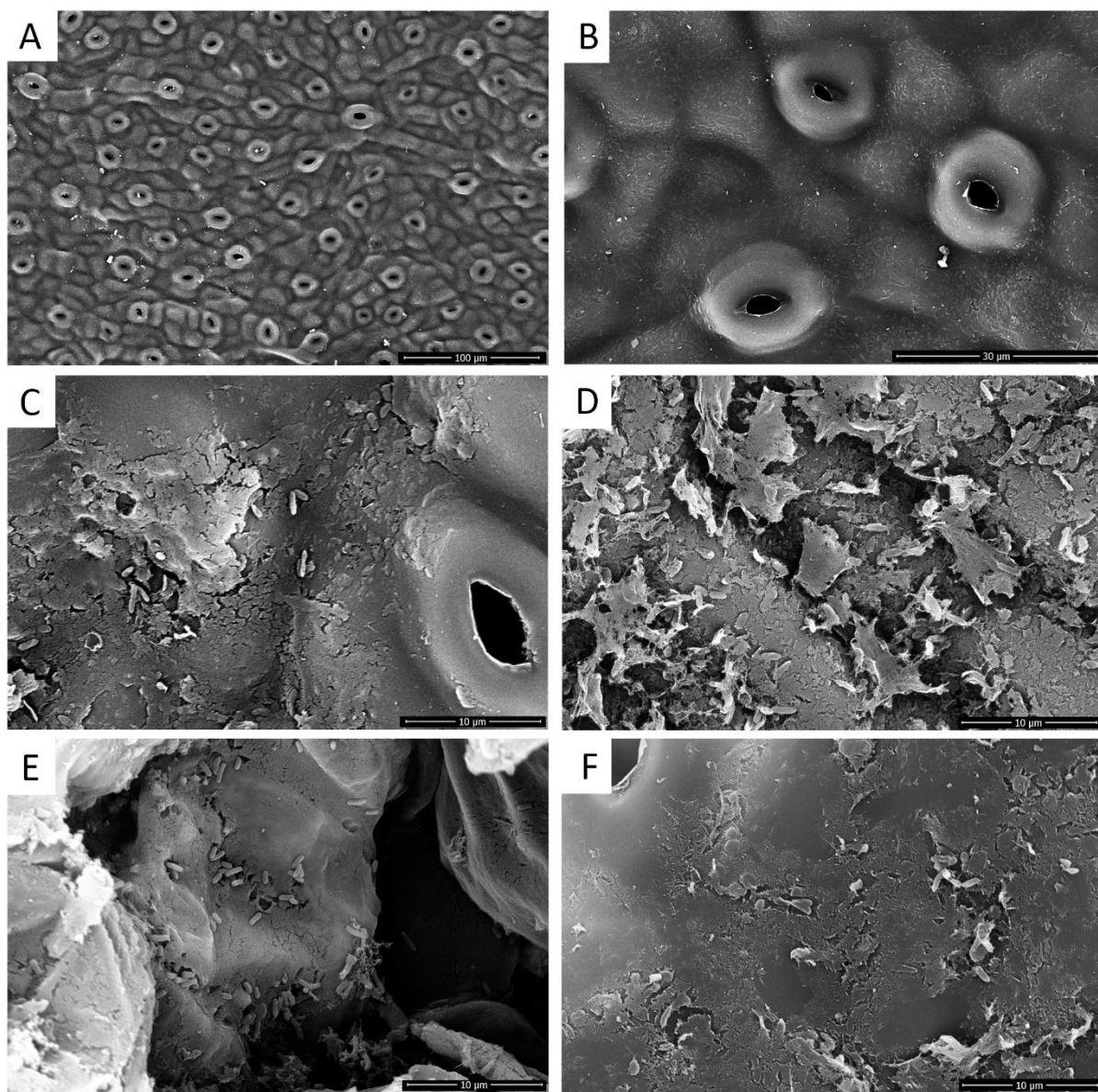


Figura 21. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra Arapongas obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra Arapongas, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra Arapongas inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Na variedade Pêra 58, aos 4 e 8 DAI (Figuras 22 C e D, respectivamente), foram observadas bactérias apenas na superfície foliar, e aos 12 DAI (Figura 22 E), com a ruptura da epiderme foliar, foi possível observar a presença de uma grande população de *X. citri* subsp. *citri* na região da lesão do cancro, com uma população ainda maior, sendo encontrada aos 16 DAI (Figura 22 F).

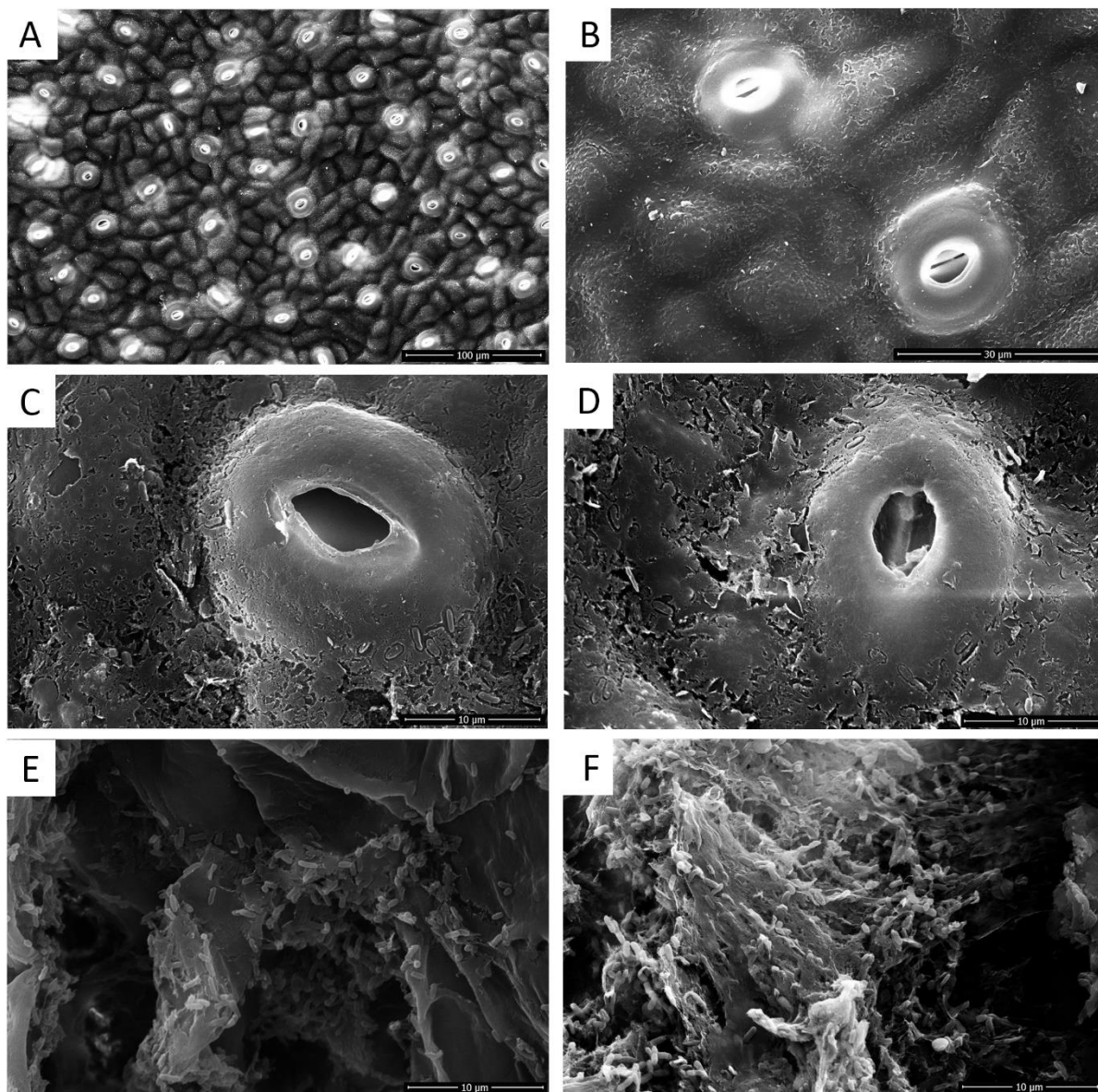


Figura 22. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra 58 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra 58, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra 58 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

Na Figura 23, é possível observar as imagens obtidas na variedade Pêra 59. Aos 4 DAI, foram observadas colônias de bactérias ao redor do ponto de inoculação (Figura 23 C). No 8º dia após a inoculação (Figura 23 D), poucos indivíduos de *X. citri* subsp. *citri* foram observados, mas foi encontrada uma região com alta formação de vilosidades, que podem ser decorrentes da infecção bacteriana, resultando em hipertrofia e hiperplasia, e liberação de exsudatos pela planta. Aos 12 e 16 DAI, foram observadas bactérias na lesão do cancro (Figuras 23 E e F).

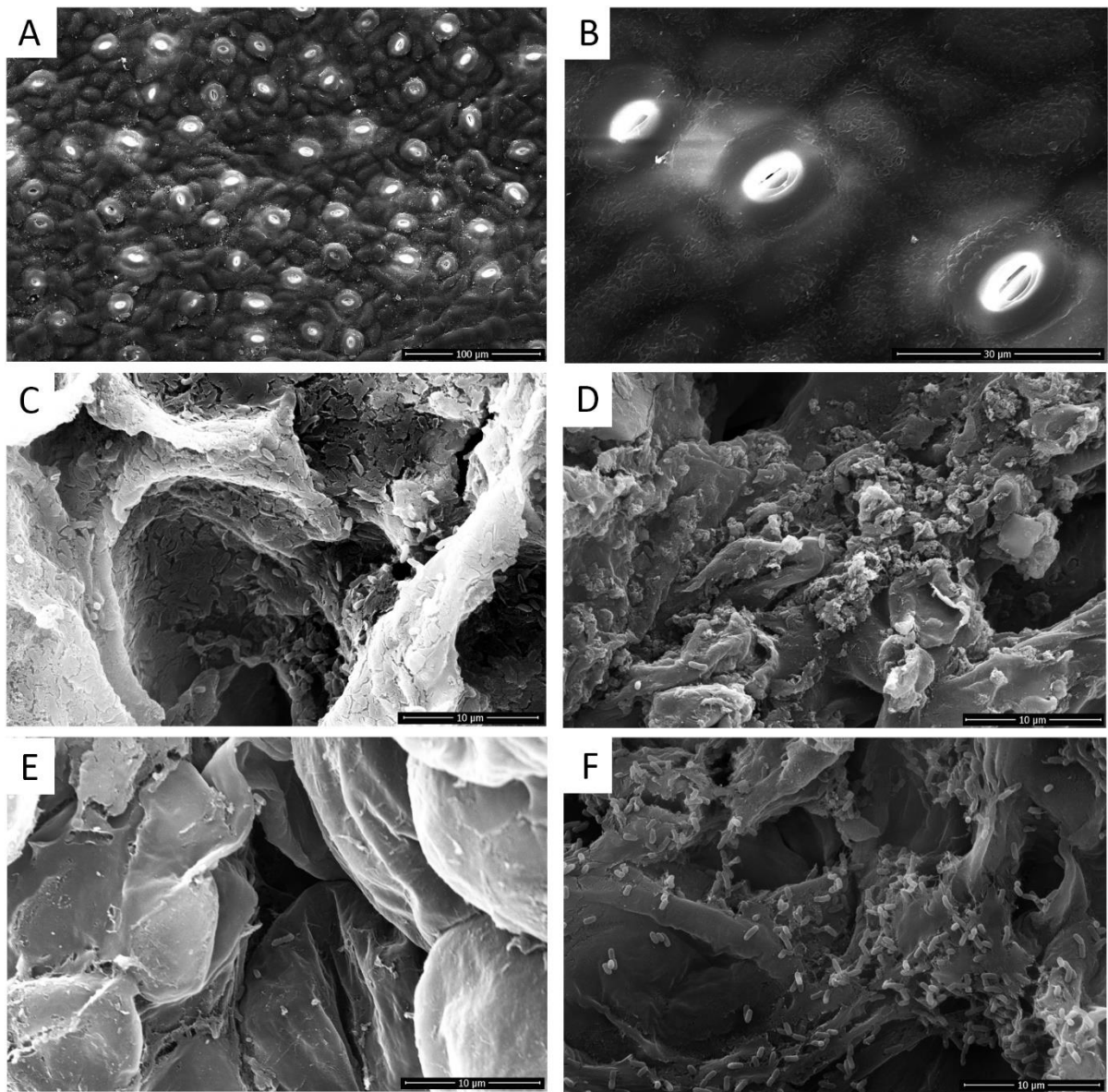


Figura 23. Imagens da variedade de laranja doce (*Citrus sinensis*), Pêra 59 obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250, aos 0, 4, 8, 12 e 16 DAI (Dias após a inoculação). A. Superfície abaxial da folha, com magnificação de 1000x, em folha não inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. B. Estômatos da variedade Pêra 59, magnificação de 5000x. C, D, E e F correspondem a imagens com magnificação de 10000x, de folha da variedade Pêra 59 inoculada com *X. citri* subsp. *citri* aos 4, 8, 12 e 16 DAI, respectivamente.

CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou a detecção de diferenças na morfologia dos genótipos de citros avaliados através da Microscopia Eletrônica de Varredura, uma vez que foram observadas diferenças na quantidade de estômatos por área foliar, assim como no tamanho dos estômatos e na área total de abertura estomática. Nesta avaliação, a variedade de laranja doce Pêra Bianchi/CC, foi a que apresentou as menores médias para as três características analisadas.

Neste experimento, também foi possível encontrar diferenças nas respostas de à *X. citri* subsp. *citri*, através da observação dos sintomas no decorrer do tempo, nas diferentes variedades avaliadas. Embora o campo de captura de imagens seja limitado, na Microscopia Eletrônica de Varredura, para as variedades Pêra EEL, Pêra Ipiguá e Pêra IAC 2000/1 foram encontradas as menores populações de bactérias nas 5 amostras analisadas aos 4, 8, 12 e 16 DAI.

Nas variedades Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL, observou-se que o tamanho da lesão foi menor quando comparado às demais variedades analisadas e nestes genótipos, a ruptura da epiderme foliar ocorreu de forma menos agressiva no 12º dia após a inoculação, se comparada às demais variedades observadas.

Desta forma, os estudos com Microscopia Eletrônica de Varredura servem como importante ferramenta para complementar os estudos de resistência genética, contribuindo para uma maior compreensão dos mecanismos de interação planta-patógeno.

REFERÊNCIAS

- ABE, V.Y.; BENEDETTI, C.E. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n.8, p.1223-1236, 2016.
- AMARAL, A.M. et al. Reaction of genotypes of citrus species and varieties to *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* under greenhouse conditions. **Journal of Plant Pathology**, v.92, n.2, p-519-524, 2010.
- 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.
- BRUNNING, A.M.; GABRIEL, D.W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.141-157, 2003.
- CARVALHO, S.A. et al. Comparison of resistance to Asiatic citrus canker among different genotypes of *Citrus* in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. **Plant Disease**, v.99, n.2, p.207-218, 2015.
- CHEN, P. et al. Understanding cellular defense in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.79, p.1-12, 2012.
- GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O. et al. Resistance of 'Pêra' sweet orange (*Citrus sinensis*) genotypes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in field conditions. **Workshop on Xanthomonas citri/Citrus canker**, p. 78-80, 2011.
- GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O. et al. Reaction of detached leaves from different varieties of sweet orange to inoculation with *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.2, p.125-133, 2016.
- GOTTWALD, T.R. Differential Host Range of Citrus and Citrus Relatives to Citrus Canker and Citrus Bacterial Spot Determined by Leaf Mesophyll Susceptibility. **Plant Disease**, v. 77, p. 1004-1009, 1993.
- GRAHAM J. H. et al. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. **Phytopathology**, v.82, p.452-457. 1992.
- HU, Y. et al. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.111, p.521-529, 2014.
- KOBAYASHI, A.K. et al. Enhanced resistance to citrus canker in transgenic sweet orange expressing the sarcotoxin IA gene. **European Journal of Plant Pathology**, DOI 10.1007/s10658-017-1234-5, 2017.

LEITE JR., R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop Protection**, v. 9, p. 3-7. 1990.

LI, J.; WANG, N. The *wxacO* gene of *Xanthomonas citri* ssp. *Citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p.381-396, 2011.

MELOTTO, M. et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v.126, p.969-980, 2006.

NOCCHI, P.T.R. Estudo da diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e avaliação de meios de cultivo. 2014. 104f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, 2014. – UEM.

PITINO, M.; ARMSTRONG, C.M.; DUAN, Y. Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses. **Horticulture Research**, v.2. doi:10.1038/hortres.2015.42, 2015.

SAS Institute INC.SAS/STAT™ **SAS user's guide for windows environment**, 6.11 ed. Cary SAS Institute, 1995

SCHAAD N.W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.690-695, 2006.

SHARMA, S.K.; SHARMA R.R. Citrus canker approaching century: A review. In: Tennant P, Benkeblia N (Eds) Citrus III. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v.3, n.2, p.54-65, 2008.

VILORIA, Z. et al. Screening triploid hybrids of ‘Lakeland’ limequat for resistance to citrus canker. **Plant disease**, v.88, n.10, p.1056-1060, 2004.

WANG, Y. et al. Differential structure and physiological response to canker challenge between ‘Meiwa’ kumquat and ‘Newhall’ navel orange with contrasting resistance. **Scientia Horticulturae**, v.128, p.115-123, 2011.

ZHANG, X.D. et al. Over-expression of the *Arabidopsis NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal of Plant Pathology**, v.128, p.91–100, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do presente estudo, foi possível concluir que dentre os genótipos de laranja doce (*C. sinensis*) analisados, os menores diâmetros de lesão foram obtidos pelas variedades Pêra IAC, Pêra IAC 2000/2 e Pêra EEL.

Com relação às enzimas relacionadas à resistência, peroxidase, catalase e superóxido dismutase, apenas o genótipo Pêra IAC apresentou elevação dos teores das três enzimas simultaneamente.

Nas análises através da Microscopia Eletrônica de Varredura, a variedade Pêra Bianchi/CC apresentou as menores médias para quantidade de estômatos por área foliar, tamanho dos estômatos e área total de abertura estomática.