

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

BRUNA RAFAELA BARBIERI

Estudo da resistência de genótipos de citros à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Maringá

2017

BRUNA RAFAELA BARBIERI

Estudo da resistência de genótipos de citros à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Dissertação 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 Mestre 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)

B236e Barbieri, Bruna Rafaela
Estudo da resistência de genótipos de citros à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Bruna Rafaela Barbieri. -- Maringá, 2017.
47 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.

1. Cancro cítrico. 2. Citrus sinensis. 3. Diâmetro da lesão. 4. Bactéria. 5. Citricultura. 6. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* I. Nunes, William Mário de Carvalho Nunes. orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 23.ed.634.3

ECSL

BRUNA RAFAELA BARBIERI

ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS À *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes
Presidente



Profª. Drª. Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski
Membro



Pesq. Dr. Marcos Antonio Machado
Membro



DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Ângelo e Ivanete por todo amor, carinho, compreensão, ajuda e incentivo para o início, execução e finalização deste curso de mestrado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por sua intercessão.

A minha irmã Brenda Raiane Barbieri pela companhia diária e presença durante todo o mestrado.

A todos os outros familiares que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho.

Ao meu noivo Diego Correa Galbiate por todo amor, carinho, compreensão, paciência e auxílio.

Ao meu orientador Professor Doutor William Mário de Carvalho Nunes que desde a graduação me acolheu em sua equipe e acreditou em meu potencial para a execução deste e tantos outros trabalhos.

A amiga Aline Maria Orbolato Gonçalves-Zuliani pelos conselhos e auxílio na execução dos experimentos.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em especial ao funcionário Carlos Alexandre Zanutto pelo auxílio na execução dos trabalhos laboratoriais e ao ex-funcionário José Alcides Remolli pelos ensinamentos sobre a condução do experimento em casa de vegetação.

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia (PGA-UEM) pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros do NBA e amigos Aline Vanessa Sauer, Andressa Cazetta, Angélica Albuquerque Tomilheiro Frias, Camila de Cássia Silva, Danielle Sayuri Yoshida Nanami, Diego Henrique Pereira Catani, Hudson Sérgio Souza, Juliana Glória Franco e Larissa Siqueira Soares pela amizade e apoio para execução deste trabalho.

A eterna amiga Paula Thaís Requena Nocchi (*In memoriam*) pelos conselhos, ensinamentos e exemplo de pessoa.

Aos amigos do Centro Técnico de Irrigação (CTI-UEM), em especial ao Fernando, Jonathan, Takashi e Takao pelo auxílio na montagem do sistema de irrigação.

Ao Viveiro de Mudas Pratinha (VMP) pelo fornecimento de materiais.

A empresa Barbieri pelo fornecimento de produtos químicos para manutenção dos genótipos em casa de vegetação.

A professora Terezinha Aparecida Guedes pelo auxílio nas análises estatísticas.
A todos os outros que contribuíram de alguma forma para este trabalho,

Obrigada!

Estudo da resistência de genótipos de citros à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

RESUMO

O cancro cítrico é uma doença de extrema importância para a citricultura brasileira e todas as regiões citrícolas do mundo. Visto sua importância o objetivo deste trabalho foi estudar genótipos de citros em relação à resistência a esta doença. O experimento foi conduzido utilizando a metodologia de inoculação com agulha imersa em suspensão bacteriana de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em duas condições distintas, em casa de vegetação e em folha destacada. Em casa de vegetação analisou-se 16 genótipos de citros, foram mensurados os diâmetros da lesão dos genótipos em estudo aos 19, 25, 33, 39, 46, 61, 68 e 76 dias após a inoculação (DAI) com o auxílio de um paquímetro digital. O experimento foi conduzido em duas épocas distintas, sendo o primeiro realizado de março a maio e o segundo de outubro a dezembro, ambos em 2016. No experimento utilizando a metodologia de folha destacada avaliou-se os mesmos 16 genótipos anteriormente estudados em casa de vegetação. As folhas foram coletadas, inoculadas e acondicionadas em tubo tipo Falcon® contendo água de torneira. Os tubos foram armazenados em condição ambiente e foram mensurados os diâmetros da lesão aos 3, 7 e 14 DAI com o auxílio de um paquímetro digital. Os dados do experimento em casa de vegetação e de folha destacada foram submetidos à análise de variância e teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os resultados dos dois experimentos mostraram distinção entre os genótipos em estudo, formando grupos distintos em relação ao grau de resistência à doença cancro cítrico. ‘Natal 261’ e ‘Westin 16-319’ se mostraram como o mais resistente e o mais suscetível, respectivamente, no experimento em casa de vegetação e ‘Pêra 436’ e ‘Westin 340’ o mais resistente e o mais suscetível, respectivamente, no experimento de folha destacada. Os genótipos que se comportaram como mais resistente apresentaram os menores diâmetros de lesão, enquanto que os mais suscetíveis apresentaram os maiores diâmetros, em ambos os experimentos. Com esses resultados analisamos que é possível verificar resistência entre genótipos utilizando as duas metodologias, porém estudos a campo não devem ser excluídos.

Palavras-chave: Cancro cítrico. *Citrus sinensis*. Diâmetro da lesão. Bactéria.

Study of the resistance of citrus genotypes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

ABSTRACT

Citrus canker is a disease of extreme importance for the Brazilian citriculture and all the citrus regions of the world. Considering its importance, the objective of this work was to study citrus genotypes in relation to resistance to this disease. The experiment was conducted using the needle-prick inoculation method, by pricking the leaves with a needle previously immersed in bacterial suspension of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in two distinct conditions, in greenhouse and in detached leaf. Sixteen citrus genotypes were analyzed in the greenhouse, the lesion diameters of the genotypes under study were measured at 19, 25, 33, 39, 46, 61, 68 and 76 days after inoculation (DAI) with the aid of a digital caliper. The experiment was conducted in two distinct seasons, the first being from March to May and the second from October to December, both in 2016. In the experiment using the detached leaf methodology, the same 16 genotypes previously studied were evaluated in greenhouse. The leaves were collected, inoculated and conditioned in Falcon® tube containing tap water. The tubes were stored under ambient conditions and the lesion diameters were measured at 3, 7 and 14 DAI with the aid of a digital caliper. Greenhouse experiment and detached leaf were submitted to analysis of variance and Scott-Knott's test at 5% probability. The results of the two experiments showed a distinction between the genotypes under study, forming distinct groups in relation to the degree of resistance to citrus canker disease. 'Natal 261' and 'Westin 16-319' proved to be the most resistant and most susceptible, respectively, in the greenhouse experiment and 'Pera 436' and 'Westin 340' the most resistant and most susceptible respectively, in the detached leaf experiment. Genotypes that behaved as resistant showed the smallest diameters of lesion, while the most susceptible presented larger diameters, in both experiments. With these results we analyzed that it is possible to verify resistance between genotypes using both methodologies, but field studies should not be excluded.

Keywords: Citrus canker. *Citrus sinensis*. Diameter of lesion. Bacterium.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS à *X. citri* subsp. *citri* EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

- Tabela 1. Genótipos de citros utilizados no experimento em casa de vegetação, com seus respectivos nomes comum e científico.....23
- Tabela 2. Reação dos genótipos de citros ao cancro cítrico em relação a AACPD distinguindo os grupos de similaridade. Maringá – PR, 2016..... 30

CAPÍTULO II

ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS à *X. citri* subsp. *citri* EM FOLHAS DESTACADAS

- Tabela 1. Genótipos de citros utilizados no experimento de folhas destacadas. 38
- Tabela 2. Reação dos genótipos de citros ao cancro cítrico em relação à AACPD distinguindo os grupos de similaridade. Maringá – PR, 2016..... 45

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS à *X. citri* subsp. *citri* EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

- Figura 1. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) obtida através do diâmetro médio das lesões de acordo com a resposta dos genótipos à inoculação com *X. citri* subsp. *citri*.....27
- Figura 2. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) por variedade em função dos dias de avaliação.28
- Figura 3. Perfis por variedade em função do diâmetro da infecção e dos dias transcorridos...28
- Figura 4. Folha de citros inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* aos 76 dias após a inoculação (DAI) dos genótipos ‘Natal 261’ (à esquerda) e ‘Westin 16-319’(à direita).29

CAPÍTULO II

ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS à *X. citri* subsp. *citri* EM FOLHAS DESTACADAS

- Figura 1. Folha de citros acondicionada em tubo Falcon® e com água suficiente.40
- Figura 2. Médias para Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) agrupando os genótipos em estudo por cor.42
- Figura 3. Amostra de folha destacada de ‘Pera 436’ (à esquerda) e ‘Westin 340’ (à direita) aos 14 dias após a inoculação (DAI).....42
- Figura 4. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) por variedade, em função dos dias de avaliação.43
- Figura 5. Perfis por variedade em função do diâmetro da infecção e dos dias de avaliação....44

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Citricultura Brasileira e Paranaense	3
2. O Cancro Cítrico.....	4
3. Etiologia.....	6
4. Resistência ao cancro cítrico	7
5. Folhas destacadas	8
REFERÊNCIAS	10

CAPÍTULO I

ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS à *X. citri* subsp. *citri* EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1. Material Biológico	22
2. Implantação do experimento	23
3. Preparo do inóculo.....	24
4. Confirmação do inóculo	24
5. Inoculação e avaliação dos sintomas	24
6. Análise dos dados	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	31

CAPÍTULO II

ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS à *X. citri* subsp. *citri* EM FOLHAS DESTACADAS

INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
1. Material vegetal e biológico	38
2. Implantação do experimento	39
3. Inoculação, Acondicionamento e Avaliação dos sintomas	39
4. Análise dos dados	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	46

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor de citros e o segundo maior exportador citrícola a nível mundial, também é o maior fornecedor de Suco Concentrado de Laranja Congelado (do inglês FCOJ). A produção brasileira de laranja é direcionada ao processamento para exportação, o mercado interno de fruta processada é pequeno, o maior alvo nacional é o mercado de frutas frescas (FAO, 2015). O Paraná é o quarto estado brasileiro com maior produção de laranja (toneladas), perdendo apenas para São Paulo, Minas Gerais e Bahia (IBGE, 2016).

O cancro cítrico, cujo agente causal é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006), é uma doença de significativa importância econômica em todo o mundo (ALEGRIA et al., 2005). Seus sintomas são expressos em folhas, frutos e caules. Nas folhas, se caracterizam inicialmente por manchas oleosas e circulares na face abaxial. Com o avanço da doença, as lesões tornam-se salientes e necróticas apresentando pústulas de coloração amarela que pode evoluir para marrom e pode haver o coalescimento das lesões. Lesões antigas são geralmente circundadas por um halo amarelo. Nos frutos os sintomas são mais visíveis, apresentando lesões com necrose mais elevadas (BRUNINGS e GABRIEL, 2003). Os sintomas nos ramos podem aparecer com o avanço da doença em algumas variedades (LARANJEIRA et al., 2005).

A bactéria *X. citri* subsp. *citri* coloniza a planta através de penetração em tecidos vegetais de folhas, ramos e frutos jovens por meio de aberturas naturais ou ferimentos (GRAHAM et al., 1992). Essa bactéria é favorecida por umidade e temperatura oscilando de 28 a 30°C (DAS, 2003), e o hospedeiro se torna mais suscetível no início do verão, quando se conjuga vento, chuvas e temperaturas elevadas (LARANJEIRA et al., 2005).

Atualmente ainda inexistem medidas de controle para *X. citri* subsp. *citri*. Em São Paulo é obrigatória a adoção de medidas de exclusão e erradicação (São Paulo, 1999 *apud* BEHLAU et al., 2007), no Paraná utiliza-se o manejo integrado da doença que consiste na utilização de cultivares menos suscetíveis à doença, mudas sadias, poda de ramos infectados e aplicação de produtos cúpricos (LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990).

Para estudar a resistência de variedades de citros à *X. citri* subsp. *citri* podem ser utilizados diversos métodos de inoculação, dentre eles a inoculação com spray (BOCK et al., 2010), com seringa automatizada sem agulha (FRANCIS et al., 2010a) e somente com agulha (GONÇALVES-ZULIANI et al., 2016a). O estudo com folhas destacadas também é uma

metodologia que pode ser utilizada, pois fornece resultados que equivalem aos obtidos em casa de vegetação (GONÇALVES-ZULIANI et al., 2016b; FRANCIS et al., 2010b).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a resistência de 16 genótipos de citros à bactéria *X. citri* subsp. *citri* em condições de casa de vegetação e em condições de folha destacada.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Citricultura Brasileira e Paranaense

A história entre Brasil e citricultura é algo que acontece há vários anos. Já safra 1981/82 o Brasil foi líder mundial na produção de laranja cultivando 800 mil hectares da fruta. A média nacional passou de 380 caixas por hectare em 1990 para 475 em 2010. Cerca de 70% da produção vai para processamento, obtendo-se uma tonelada de suco concentrado congelado (FCOJ) a cada 257 caixas (40,8Kg) de laranja. Com relação ao cinturão citrícola brasileiro, cerca de 90% da produção é processada (NEVES et al., 2010).

A estabilidade do mercado citrícola permaneceu até a década passada que provocou um crescimento rápido do setor. Na última década, alguns produtores abandonaram a atividade devido a excessivas perdas no mercado de fruta *in natura*, provocando aproximadamente 13% de redução na área plantada. A perspectiva é de que a produção aumente na próxima década, porém a um ritmo lento. Pesquisas apontam que até 2023/24 a produção pode chegar a 17.5 Mt, valor que corresponde a um aumento de 7% em relação à safra 2013/14 (FAO, 2015).

A produção de laranja no Brasil corresponde a 16.739.720 toneladas, sendo que a região sudeste responde por 79% do total, tendo o estado de São Paulo como principal produtor contribuindo com 73% deste total. O Paraná ocupa a quarta posição em área plantada, respondendo por 5% do total, porém sua produtividade ($t\cdot ha^{-1}$) é tão alta que ultrapassa São Paulo, apresentando $36t\cdot ha^{-1}$ contra $30t\cdot ha^{-1}$ (IBGE, 2016). A produção voltada ao comércio se concentra nas regiões Norte e Noroeste do estado, representada pelas variedades de laranja doce “Pêra”, “Folha Murcha” e “Valência” (STENZEL et al., 2005). Essas duas regiões apresentam as condições ideais de solo e clima para o cultivo de citros, com temperaturas médias anuais oscilando de 18 a 23 °C e precipitação média anual de 1400 a 1800 mm. O relevo variando de suave ondulado a ondulado e os solos derivados do Arenito também são pontos favoráveis à cultura (CAVIGLIONE et al., 2000), além dessas regiões apresentarem as principais indústrias de suco de laranja concentrado (SABES e ROCHA, 2006).

Embora o Brasil e seus estados produtores de citros apresentem um alto potencial de produção, a citricultura, assim como qualquer outra cultura, é ameaçada por inúmeras doenças

que acarretam a redução na produtividade e qualidade dos frutos (ALEGRIA et al., 2005). Algumas dessas doenças já foram estudadas por alguns pesquisadores em condições paranaenses, dentre elas temos a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada por *Xylella fastidiosa* (NUNES et al., 2007) e transmitida por vetores (GONÇALVES et al., 2008; MOLINA et al., 2010; MOLINA et al., 2016); *Citrus Tristeza Virus* (CTV) (CARRARO et al., 2003; COSTA et al., 2010); Mancha preta dos citros causada por *Guignardia citricarpa* (CAIXETA et al., 2008; NUNES et al., 2006); Gomose causada por *Phytophthora* spp (CAIXETA et al., 2013); Huanglongbing causado por espécies de *Candidatus Liberibacter* (SAUER et al., 2015; MULATI et al., 2013) e o Cancro Cítrico causado pela bactéria *X. citri* subsp. *citri* (VARGAS et al., 2013; GONÇALVES-ZULIANI et al., 2016a).

2. O Cancro Cítrico

O cancro cítrico, causado pela bactéria *X. citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006), é uma doença presente na maioria das áreas comerciais de citros do mundo, e por ser uma doença quarentenária, dificulta e restringe o comércio de fruta fresca (GOTTWALD et al., 2002). Acredita-se que a origem do cancro cítrico seja a mesma que o centro de origem do citros, o Sudoeste da Ásia (KOIZUMI, 1985). Nas Américas, a primeira constatação foi nos Estados Unidos, em 1910, através de mudas de citros introduzidas do Japão (STALL; SEYMOUR, 1983). A primeira ocorrência de cancro cítrico no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo (BITANCOURT, 1957). Logo após, a doença se espalhou pelos estados de Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e Roraima (BARBOSA et al., 2001; FEICHTENBERGER et al., 1997; MACIEL et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2003), sendo endêmica no estado do Paraná (GONÇALVES-ZULIANI, 2014).

Existem dois tipos de cancro cítrico que ocorrem no Brasil, o que os diferenciam são os sintomas e a patogenicidade em diferentes hospedeiros (GABRIEL et al., 1989; FEICHTENBERGER et al., 1997). O “cancro cítrico asiático” ou “cancrose A” é causado por *X. citri* subsp. *citri*, é o principal tipo, e ocorre endemicamente em diversas regiões infectando espécies da família Rutaceae. A “cancrose do limoeiro Galego” ou “cancrose C” está presente em limão Galego, está restrita ao Brasil e é causada pela estirpe C de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (AMARAL, 2003; LARANJEIRA et al., 2005).

A larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* Staiton) é um grande potencializador da doença no pomar. A larva deste inseto forma galerias nas folhas e ramos que vão servir de porta de entrada para a bactéria do cancro (GOTTWALD et al., 2002; GRAHAM et al., 2004).

A doença se torna mais severa, com sintomas mais acentuados, em regiões onde se conjuga alta temperatura, chuva intensa e vento. A presença de ferimento não é obrigatória para a penetração da bactéria na planta, visto que a mesma pode penetrar via estômato, porém quando presente, a severidade aumenta na área (LARANJEIRA et al., 2005).

Os sintomas da doença podem ser visualizados em toda parte aérea da planta, em folhas, frutos e ramos. Nas folhas, as lesões se caracterizam por lesões corticosas em ambas as faces com coloração creme a parda e geralmente circundadas por um halo amarelo (LARANJEIRA et al., 2005). O tamanho pode chegar até 10 mm de diâmetro em variedades consideradas suscetíveis e lesões mais velhas apresentam o centro corticoso e lignificado (LEITE JUNIOR, 1990).

Nos frutos os sintomas são semelhantes aos da folha, porém as lesões se apresentam com maiores diâmetros e com o centro quebradiço. Os frutos tendem a cair antes de atingir a maturação. Nos ramos, os sintomas aparecem em variedades mais suscetíveis e se caracterizam por lesões corticosas, salientes, com coloração creme, e em casos mais severos ocorre morte do ramo (LARANJEIRA et al., 2005).

As medidas de controle do cancro cítrico variam de acordo com as leis vigentes em cada estado brasileiro. Em São Paulo, até pouco tempo atrás se adotava a prática de erradicação de plantas doentes e aplicação de produtos cúpricos nas demais plantas presentes em um raio de 30 metros a partir da planta infectada, de acordo com a Resolução SAA – 147 de 31/10/2013. Porém a Instrução Normativa – IN – nº 17 de 06/09/2016 orienta os produtores a abandonar a prática de erradicação e começar a conviver com esta doença em seus pomares. No estado do Paraná, a adoção de práticas de manejo visa a prevenção da entrada da doença e o convívio com a mesma no pomar. Essas práticas envolvem a utilização de variedades menos suscetíveis, mudas sadias, poda de ramos infectados e pulverização de produtos a base de cobre (LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990).

3. Etiologia

X. citri subsp. *citri* é uma Proteobactéria (GARRIT e HOLT, 2000) e foi identificada e classificada pela primeira vez por Hasse em 1915 como *Pseudomonas citri* e em 1949 reclassificada como *X. citri* (KHAN e HINGORANI, 1970). Em 1978 houve outra alteração em sua nomenclatura e incluído o termo patovar, que designa o hospedeiro de determinado agente etiológico, e a bactéria passou a *X. campestris* pv. *citri* (YOUNG et al., 1978). *X. axonopodis* pv. *citri* foi a nomenclatura que a bactéria recebeu anos mais tarde depois de serem realizados testes bioquímicos e moleculares (VAUTERIN et al., 1995). O atual nome da bactéria causadora do cancro cítrico é *X. citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006), porém ainda se encontra na literatura a descrição da bactéria como *X. axonopodis* pv. *citri* devido a utilização deste nome quando o genoma da bactéria foi totalmente sequenciado em 2002 (DA SILVA et al., 2002).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são vistas ao microscópio ótico e possuem forma de bastonete reto medindo 1,5 a 2,0 μ M de comprimento e 0,5 a 0,7 μ M de largura. São monotríquias, Gram-negativas, aeróbias estritas, não formam esporos e não fixam nitrogênio. Quando cultivadas em meio de cultura são visíveis após 2 a 3 dias de incubação a 28°C e as colônias são amareladas, devido a presença de xanthomonadina, lisas e mucoides (GALLI, 1980; KRIEG e HOLT, 1984; VAUTERIN et al., 1996). As condições ótimas para a sobrevivência da bactéria incluem alta umidade e temperatura variando de 20 a 39°C. Temperaturas acima de 50°C e abaixo de 12°C fazem com que a bactéria sobreviva em restos culturais de citros, como folhas caídas ou ramos secos, ficando inativa e podendo sobreviver até nove meses (ROSSETTI, 2001).

A disseminação a curta distância ocorre através de chuvas associada a ventos, influenciando também na intensidade da doença. A longa distância ocorre através de implementos agrícolas, mudas contaminadas, veículos e pessoas (MASSARI e BELASQUE, 2006).

A penetração ocorre através de aberturas naturais como estômatos, hidatódios e lenticelas ou por ferimentos (GRAHAM et al., 1992). Pode ocorrer também a penetração através de ferimentos causados pela larva minadora, que contribui para o aumento da incidência da doença no pomar, visto que a presença da larva expõe os tecidos vegetais das folhas (BRASIL, 1996; PRATES et al., 1996). Quando presente, a bactéria se multiplica nos espaços intercelulares produzindo a goma xantana, um polissacarídeo extracelular. Ocorre a

redução dos espaços intercelulares provocando o encharcamento do tecido infectado pela absorção de água do xilema pela goma xantana, por possuir alto potencial higroscópico. As lesões se formam devido à hiperplasia induzida no tecido vegetal (PADMANABHAM et al., 1973).

4. Resistência ao cancro cítrico

A utilização de cultivares menos suscetíveis às doenças, em especial ao cancro cítrico, tem sido uma das ferramentas mais importantes no manejo desta doença, pois há uma redução do risco de contaminação em áreas ainda sadias, como também em novos plantios (LEITE JR. e SANTOS, 1988; LEITE JR., 1990).

A variabilidade na suscetibilidade de cultivares de citros não somente é influenciada pelas diferenças na facilidade ou não da bactéria penetrar na planta através dos estômatos (GRAHAM et al., 1992), como também pelas diferenças na estrutura da membrana e dos espaços extracelulares do hospedeiro (CHEN et al., 2012). Mesmo essas barreiras sendo quebradas, tem outro fator de grande importância é o mesófilo foliar, que vai determinar o desenvolvimento ou não da bactéria (GOTTWALD et al., 1993).

Leite Jr. (1990) em seus estudos determinou algumas cultivares como mais suscetíveis e menos suscetíveis ao cancro cítrico. De modo geral, limão galego foi considerado altamente suscetível; laranjas doces Bahia e Hamlin suscetíveis; Tangor Murcott e Laranja Natal, como moderadamente suscetíveis; Valência, Navelina, Pera e Sanguínea de Mombuca como moderadamente resistentes; laranjas doces Folha Murcha e Moro e lima ácida Tahiti como resistentes; e Calamondin altamente resistente. No estado do Paraná as cultivares de laranja doce mais plantadas são Pera, IAPAR 73, Folha Murcha e Valência (MAPA, 2016).

A reação das cultivares à bactéria também está ligada com as condições climáticas da região. Em regiões asiáticas, por exemplo, a ordem de suscetibilidade decresce para limas ácidas, algumas variedades de limão, pomelos e laranjas doces. Em outras regiões laranja doce Bahia é severamente afetada, enquanto que a Valência se comporta como resistente (REEDY e MURTY, 1990).

Carvalho et al. (2015) avaliaram a resistência ao cancro cítrico em 186 genótipos de citros em condições de campo no estado do Paraná incluindo espécies de laranja doce (*Citrus*

sinensis), tangerina (*C. reticulata*), tangerina do Mediterrâneo (*C. deliciosa*), tangerina Clementina (*C. clementina*), tangerina Satsuma (*C. unshui*), laranja azeda (*C. aurantium*), limão (*C. limon*), lima ácida (*C. aurantifolia*), toranja (*C. grandis*) e quatro híbridos (*C. reticulata* x *Citrus* sp., *C. reticulata* x *C. paradisi*, *C. reticulata* x *C. sinensis*, e *C. unshui* x *C. sinensis*). Os autores observaram que nenhum genótipo foi totalmente imune à bactéria, porém alguns apresentaram alto grau de resistência, como o genótipo Muscia (*C. reticulata*), enquanto outros se comportaram como altamente suscetíveis, como é o caso da Valencia Frost (*C. sinensis*).

5. Folhas destacadas

A metodologia de folha destacada é definida como a manutenção de folhas em condições favoráveis à sua existência por vários períodos após o destacamento da planta mãe, com ou sem algum parasita (YARWOOD, 1946). A avaliação de doenças através deste método permite inocular e mantê-las em condições favoráveis para o desenvolvimento dos sintomas (CLINTON e McCORMICK, 1924; RANDHAWA e CIVEROLO, 1985; HAMMERSCHLAG, 1988).

Esta metodologia permite uma economia de espaço, material biológico, inóculo, facilidade de observação, controle e manipulação, menor custo e consegue-se trabalhar com um número maior de genótipos ou repetições. Quando bem acondicionadas, as folhas destacadas mantem suas funções vitais ativas, como transpiração, respiração, fotossíntese etc. Um dos fatores limitantes para esta técnica é a rápida senescência e degeneração dos tecidos foliares (CLINTON e McCORMICK, 1924; YARWOOD, 1946; GONÇALVES-ZULIANI, 2014).

Estudos demonstram a eficiência do método de folhas destacadas para avaliação de doenças. Medeiros et al. (2011) avaliaram a sensibilidade de 8 genótipos de pessegueiro à bactéria *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* e os resultados em folhas destacadas confirmaram os obtidos em casa de vegetação. Francis et al. (2010b) realizaram bioensaios de resistência de cultivares de citros à bactéria *X. citri* subsp. *citri* e concluíram que esta metodologia é útil para caracterizar e diferenciar fenotipicamente a reação da bactéria nas cultivares em estudo. Gonçalves-Zuliani et al. (2016b) também avaliaram a resistência de genótipos de citros à *X. citri* subsp. *citri* pela metodologia de folhas destacadas e concluíram que é possível comparar

os genótipos utilizados quanto ao grau de suscetibilidade da bactéria observando e medindo o diâmetro das lesões.

REFERÊNCIAS

- ALEGRIA, M. C.; SOUZA, D. P.; ANDRADE, M. O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.; DA SILVA, A. C. R.; FARAH, C. S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.2315-2325, 2005.
- AMARAL, A. M. Comunicado Técnico 86. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **EMBRAPA**, Brasília, DF, p.1-5, nov.2003.
- 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.
- BEHLAU, F.; BELASQUE JR., J.; BERGAMIM FILHO, A.; LEITE JR., R.P. Incidência e Severidade de Cancro Cítrico em Laranja ‘Pêra Rio’ sob Condições de Controle Químico e Proteção com Quebra-Vento. **Fitopatologia Brasileira**. v.32, p.311-317, 2007.
- BITANCOURT, A. A. O Cancro Cítrico. **O Biológico**. v.23, p.101-111, 1957.
- BOCK, C. H.; GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; COOK, A. Z.; PARKER, P. E. Wind speed and wind-associated leaf injury affect severity of citrus canker on Swingle citrumelo. **European Journal of Plant Pathology**, v.128, p.21-38, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária – Secretaria de Defesa Agropecuária. Alerta Quarentenário 4. Brasília, 1996, 2p.
- BRUNINGS, A. M. & GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.141-157, 2003.
- CAIXETA, M. P.; CORAZZA, M. J.; OLIVEIRA, R. R.; ZANUTTO, C. A.; NUNES, W. M. C.; VIDA, J. B. Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de isolados de *Guignardia citricarpa*, agente patogênico da mancha preta dos citros. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.30, n.5, p.625-630, 2008.

CAIXETA, M. P.; NUNES, W. M. C.; SANTOS, A. F.; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. Espécies de *Phytophthora* associadas à gomose em pomares de citros no Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, n.4, p.242-247, 2013.

CARRARO, B. P.; NUNES, W. M. C.; CORAZZA-NUNES, M. J.; MACHADO, M. A.; STACH-MACHADO, D. R. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Estado do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa proteica. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.25, n.2, p.269-273, 2003.

CARVALHO, S. A.; NUNES, W. M. C.; BELASQUE-JUNIOR, J.; MACHADO, M. A.; CROCE-FILHO, J.; BOCK, C. H.; ABDON, 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.

CAVIGLIONE, J. H.; KIIHL, L. R. B.; CARAMORI, P. H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná – IAPAR**, 2000. Disponível em: <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=677>>. Acessado em 12 de novembro de 2016.

CDA-SP, Defesa Agropecuária Estado de São Paulo. **Resolução SAA - 147, de 31/10/2013**. 2013. Disponível em: <<http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=981>>. Acessado 12 de novembro de 2016.

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

CLINTON, G. P.; McCORMICK, F. A. Rust infection of leaves in Petri dishes. **Connecticut Agricultural Experiment Station**, New Haven, Conn., n.260, p.475 - 501. 1924.

COSTA, A. T.; NUNES, W. M. C.; ZANUTTO, C. A. and MULLER, G. W. Stability of *Citrus tristeza virus* protective isolates in field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.45, n.7, p. 693-700. 2010.

DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, R. C.; FERRO, M. I.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v.417, p.459-463, 2002.

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

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nation, **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015**. OECD: Paris, 2015, 148p.

FEICHTENBERGER, E.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.) In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.261-296, 1997.

FRANCIS, M. I.; KOSTENYUK, I.; ORBOVIC, V.; LOSKUTOV, A.; ZOLOTUKHIN, M.; GRAHAM, J. H. Automated Needle-free Injection Method for Delivery of Bacterial Suspensions into Citrus Leaf Tissues. **Journal of Phytopathology**, v.159, n.5, p.347-351, 2010a.

FRANCIS, M. I.; PEÑA, A.; GRAHAM, J. H. Detached leaf inoculation of germplasm for rapid screening of resistance to citrus canker and citrus bacterial spot. **European journal of plant pathology**, v.127, n.4, p.571-578, 2010b.

GABRIEL, D. W.; KINGSLEY, M. T.; HUNTER, J. E.; GOTTWALD, T. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains†. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.39, n.1, p.14-22, 1989.

GALLI, F. **Manual de fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, 587p.

GARRIT, G. M.; HOLT, J. G. An overview of the road map to the manual. **Systematic Bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, p.20, 2000.

GONÇALVES, A. M. O.; MOLINA, R. O.; NUNES, W. M. C.; ZANUTTO, C. A. Incidência de *Dilobopterus costalimai* Young e *Acrogonia citrina* Marucci & Cavichioli, em pomares cítricos no noroeste paranaense. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.30, n.3, p.321-324, 2008.

GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O. **Avaliação da resistência de genótipos de laranja doce (Citrus sinensis) ao cancro cítrico e estudo da diversidade genética de Xanthomonas citri subsp. citri**. 2014. 151f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UEM, Maringá, 2014.

GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; CARDOSO, K. A. K.; BELASQUE-JUNIOR, J.; ZANUTTO, C. A.; HASHIGUTI, H. T.; BOCK, C. H.; NAKAMURA, C. V.; NUNES, W. M. C. Reaction os detached leavres from diferente varieties of sweet Orange to inoculation with *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.2, p.125-133, 2016b.

GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; NANAMI, D. S. Y.; BARBIERI, B. R.; 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, 2016a.

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

GOTTWALD, T. R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J. H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E. L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, v.92, p.361-377, 2002.

GRAHAM J. H.; GOTTWALD T. R.; CUBERO J.; ANCHOR 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.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ANCHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v.82, n.11, p.1319-1325, 1992.

HAMMERSCHLAG, F.A. Selection of peach cells for insensitivity to culture filtrates of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* and regeneration of resistant plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.16, p.865-869, 1988.

HASSE, C.H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal of Agricultural Research**, v.4, p.97-100, 1915.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE – Estatísticas da produção agrícola**. 2016, 76p.

KHAN, L. D.; HINGORANI, M. K. Strain studies on *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. **Journal Horticulturae Science**, v.45, p.15-17, 1970.

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, 1985, p. 2-7.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLETTA-FILHO, H. D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JR., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p.509 – 566, 2005.

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.

LEITE JUNIOR, 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 JUNIOR, R.P. Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná. Londrina: IAPAR. Circular, 61, 1990, 51p.

MACIEL, J. L. N.; DUARTE, V.; AYUB, M. A. Z. Plasmid DNA restriction profile and copper sensitivity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.116-120, 1998.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/>>. Acesso em 07 de novembro de 2016.

MASSARI, C. A.; BELASQUE JR., J. A campanha de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo – Situação atual e contaminação em viveiros. **Laranja**, v.27, p.41-55, 2006.

MEDEIROS, J. G. S.; CITADIN, I.; SANTOS, I. D.; ASSMANN, A. P. Reaction of peach tree genotypes to bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *prunis*. **Scientia Agricola**, v.68, n.1, p.57-61, 2011.

MOLINA, R. O.; GONÇALVES, A. M. O.; ZANUTTO, C. A. and NUNES, W. M. C. Populational fluctuation of vectors of *Xylella fastidiosa*, wells in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] varieties of northwest Paraná State, Brazil. **Brazilian archives of biology technology**, v.53, n.3, p.549-554, 2010.

MOLINA, R. O.; SANTOS, K. S.; GONÇALVES, A. C. A.; NUNES, W. M. C. Distribuição espaço-temporal de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) vetores da *Xylella fastidiosa* em pomares cítricos. **Revista Agroambiente Online**, v.10, n.2, p.145-152, 2016.

MULATI, F.; NOCCHI, P. T. R.; ZANUTTO, C. A.; BELASQUE JR., J.; NUNES, W. M. C. Incidence of Huanglongbing in commercial orchards in northwest Paraná, Brazil. In: 3rd International Research Conference on Huanglongbing – IRCHLB III, 3., 2013. Orlando. *Anais...* Orlando: University of Florida, 2013.

NASCIMENTO, J. F.; RODRIGUES-NETO, J.; ALVES, J. M. A.; RÊGO, M. M.; ARAÚJO, A. E. S. Ocorrência de cancro cítrico no estado de Roraima. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.1, p.81-82, 2003.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR, 2010, 138p.

NUNES, W. M. C.; CROCE FILHO, J.; SEVERINO, J. J.; ZANUTTO, C. A.; TESSMANN, D. J.; MAFICOLI, R.; CORAZZA-NUNES, M. J., VIDA, J. B. Ocorrência de pinta preta, causada por *Guignardia citricarpa*, em tangerineiras 'Montenegrina' no sul do Paraná. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.3, p.295-295, 2006.

NUNES, W. M. C.; MOLINA, R. O.; ALBUQUERQUE, F. A.; CORAZZA-NUNES, M. J.; ZANUTTO, C. A.; MACHADO, M. A. Flutuação populacional de cigarrinhas vetoras de *Xylella fastidiosa* Wells et al. em pomares comerciais de citros no Noroeste do Paraná. **Neotropical Entomology**. Vacaria, v.36, n.2, p.254-260, 2007.

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.

PRATES, H. S.; NAKAMO, O.; GRAVENA, S. A. “Minadora das folhas dos citros *Phyllocnistis citrella* Station”, 1856. CATI, **Comunicado Técnico** 129, Campinas, SP, 1996.

RANDHAWA, P.S.; CIVEROLO, E.L. A detached leaf bioassay for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. **Phytopathology**, Alexandria, v.15, p.1060-1063, 1985.

REEDY, G. S.; MURTI, V. D. Bacterial disease: Citrus Canker *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. In REEDY, G.S. & MURTI, V.D. (eds) *Citrus Diseases and their control* Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, 1990. 2ª ed. Cap.2, p. 24-30.

ROSSETTI, V.V. Manual ilustrado de doenças dos citros. Piracicaba, SP, FEALQ/FUNDECITRUS. 2001, 201p.

SABES, J. J. S. & ROCHA, E. E. R. B. O agronegócio do suco de laranja concentrado congelado do estado do Paraná. In: Medeiros, N. H.; Parré, J. L. **Economia paranaense contemporânea: estrutura e desempenho**. 1 ed. Maringá: PME/UEM, v.1, 2006, 482p.

SAUER, A. V.; NOCCHI, P. T. R.; ZANUTTO, C. A.; RINALDI, D. A. M. F.; NUNES, W. M. C. Monitoring '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in a comercial orchard of sweet Orange and Tahiti lime in the northwest of Paraná State, Brazil. **Acta Horticulturae**, 2015.

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.

STALL, R. E.; SEYMOUR C. P. Canker: a threat to citrus in the gulfcoast states. **Plant Disease**, v.67, p.581-585, 1983.

STENZEL, N.M.C.; NEVES, C.S.V.J.; SCHOLZ, M.B.S.; GOMES, J.C. Comportamento da laranjeira 'Folha Murcha' em sete porta-enxertos no noroeste do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.408-411, 2005.

VARGAS, R. G.; GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; FILHO, J. C.; CARVALHO, S. A.; NOCCHI, P. T. R. N.; NUNES, W. M. C. Avaliação da resistência de variedades de Citrus spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Na região Noroeste Paranaense, em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, n.4, p.235-241, 2013.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K; SWINGS, J. Reclassification of Xanthomonas. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.45, p.472-489, 1995.

VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Grouping of Xanthomonas campestris pathovars by SDS-PAGE of proteins. **Journal of Genetic Microbiology**, v.137, p.1307-1316, 1996.

YARWOOD, C.E. Detached leaf culture. **The Botanical Review**, Lancaster, n.12, p.1-56. 1946.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **Journal of Agricultural Research**, v.21, p.153-177, 1978.

CAPÍTULO I

ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS à *Xanthomonas citri* subsp.
citri EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

RESUMO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é uma das doenças mais prejudiciais a cultura dos citros atualmente devido à inviabilidade dos frutos tanto para consumo *in natura* quanto para o processamento industrial. Devido a ausência de medidas eficazes de controle desta doença, a utilização de variedades menos suscetíveis tem sido uma das alternativas estudadas para um possível controle da doença. Desta forma, o objetivo deste capítulo foi avaliar diferentes genótipos de citros quanto a resistência ao cancro cítrico em condições de casa de vegetação. Um total de 16 genótipos foi utilizado no estudo, os mesmos foram mantidos em casa de vegetação durante todo o experimento. Foram realizados dois ensaios, um de março a maio de 2016 e o outro de outubro a dezembro do mesmo ano. As plantas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana de 10^8 UFC/mL que foi previamente ajustada em aparelho espectrofotômetro e inoculada na planta através de ferimentos com uma agulha de 0,55 x 0,20 mm com constante molhamento. A medida foi realizada através do diâmetro da lesão das folhas inoculadas com o auxílio de um paquímetro digital. Nos dois ensaios foi possível observar sintomas característicos da doença e o avanço da mesma ao longo do tempo. Os resultados mostraram que os genótipos foram agrupados em três grupos distintos de similaridade e classificados como resistentes, intermediários e suscetíveis a doença cancro cítrico. O genótipo ‘Natal 261’ se destacou apresentando o menor diâmetro de lesão e foi classificado como o mais resistente, enquanto que o genótipo ‘Westin 16-319’ apresentou maior diâmetro de lesão sendo classificado como o mais suscetível. Estudos futuros são necessários para estudar o comportamento desses mesmos genótipos a campo.

Palavras-chave: Diâmetro da lesão. Cancro cítrico. Suscetibilidade.

ABSTRACT

Citrus canker, caused by the bacterium *X. citri* subsp. *citri* is one of the most damaging diseases for the industrial citrus crop due to fruit unfeasibility for both *in natura* and industrial consumption. Due to the absence of effective measures to control this disease, the use of less susceptible varieties has been one of the alternatives studied for a possible control of the disease. Thus, the objective of this chapter was to evaluate different citrus genotypes for resistance to citrus canker under greenhouse conditions. A total of 16 genotypes were used in the study, they were kept in the greenhouse during the whole experiment. Two trials were carried out, one from March to May 2016 and the other from October to December of the same year. The plants were inoculated with a bacterial suspension of 10^8 UFC/mL that was previously adjusted in a spectrophotometer and inoculated in the plant with a 0.55 x 0.20 mm needle with constant wetting. The measurement was made through the lesion diameter of the inoculated leaves with the aid of a digital caliper. In both trials, it was possible to observe the characteristic symptoms of the disease and its progression over time. The results showed that the genotypes are grouped into three distinct groups of similarity and classified as resistant, intermediate and susceptible to citrus canker disease. The 'Natal 261' genotype showed the smallest diameter of the lesion and was classified as the most resistant, while the 'Westin 16-319' genotype had the highest lesion diameter being classified as the most susceptible. Future studies are needed to study the behavior of same genotypes in the field.

Keywords: Diameter of lesion. Citrus canker. Susceptibility.

INTRODUÇÃO

O cancro cítrico causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006), é uma doença de significativa importância econômica em todo o mundo (ALEGRIA et al., 2005). Os sintomas são presentes em folhas, frutos e ramos e se baseiam em lesões salientes e eruptivas apresentando coloração amarela a marrom e circundada por um halo amarelo (BRUNINGS & GABRIEL, 2003; LARANJEIRA et al., 2005).

A bactéria penetra na planta através de aberturas naturais como estômatos e lenticelas ou por ferimentos (GRAHAM et al., 1992). Inoculações artificiais são utilizadas para estudos de resistência a doença (BOCK et al., 2010; FRANCIS et al., 2010; GONÇALVES-ZULIANI et al., 2016a; 2016b). O estudo a campo permite analisar de forma mais natural possível o comportamento e avanço da doença (CARVALHO et al., 2015).

As medidas de controle para esta doença são inexistentes ou ineficazes quando utilizadas. O manejo mais adequado desta doença é a utilização de variedades menos suscetíveis a doença e aplicação de produtos cúpricos que tem a função de proteção dos tecidos mais suscetíveis ao ataque do patógeno (LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990; KOLLER et al., 2006).

O estudo da resistência ao cancro com inoculação da bactéria com agulha e a avaliação dos sintomas através da medida do diâmetro da lesão é uma opção rápida, de baixo custo e que permite trabalhar com um número elevado de genótipos e repetições (VILORIA et al., 2004). Estudos relatam que a relação entre experimentos conduzidos a campo e em casa de vegetação fornecem resultados similares quanto a comparação entre genótipos (GRAHAM; GOTTWALD, 1990).

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo foi comparar à nível de casa de vegetação 16 genótipos de citros quanto a resistência à bactéria *X. citri* subsp. *citri*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material Biológico

Um total de 16 genótipos de citros (Tabela 1) foram utilizados no estudo, todos provenientes do Viveiro de Mudanças Pratinha (VMP), localizado na cidade de Atalaia-PR e enxertados sob limão-cravo (*C. limonia*). A estirpe bacteriana *X. citri* subsp. *citri* 306 (Xcc 306), obtida do acervo de culturas puras do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), foi utilizada para inoculação nas plantas. A utilização desta estirpe é recomendada, pois é a estirpe de *Xanthomonas* que teve o seu genoma totalmente sequenciado. A bactéria foi mantida refrigerada em tampão fosfato salino (PBS) [Composição: A: [Solução salina 3M: 175,32 g de Cloreto de sódio e 100 0mL de água destilada], B: [Tampão fosfato 0,2M: 27,598 g de fosfato de sódio monobásico 0,2M e 1000 mL de água destilada + 28,392 g de fosfato de sódio dibásico 0,2M e 1000 mL de água destilada], ajustar o pH da solução B com a solução A para 7,2] no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-Pr.

Tabela 1. Genótipos de citros utilizados no experimento em casa de vegetação.

Sequência	Genótipo	Nome comum	Nome científico
1	Pêra 460	Laranja doce	<i>C. sinensis</i>
2	Pêra 331		
3	Pêra 329		
4	Pêra 436		
5	Valência 326		
6	Natal M9-324		
7	Natal M9-350		
8	Natal 245		
9	Natal 261		
10	Natal 308		
11	Westin 16-319		
12	Westin 340		
13	Rubi 353		
14	Rubi 251		
15	Bahia 25-462		
16	Murcott 280	Tangor	<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>

2. Implantação do experimento

O experimento foi implantado em casa de vegetação pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. O experimento foi conduzido em duas épocas distintas, sendo que o primeiro ocorreu de março a maio e o segundo de outubro a dezembro, ambos em 2016.

Os genótipos foram alocados na casa de vegetação em bancada a aproximadamente 0,70 m do chão, foi utilizada irrigação automática na qual todas as plantas recebiam a mesma vazão. Foram realizadas adubações periódicas de NPK e micronutrientes via solo e via foliar baseados na necessidade da cultura e também aplicações de produtos químicos para o controle de ácaro, mosca-branca e larva-minadora-do-citros. A aplicação de fosfito na base do caule foi utilizada para prevenção de gomose devido às condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento do fungo. Aproximadamente 50 dias antes do início do experimento, as plantas foram podadas com o auxílio de uma tesoura de poda para que pudesse obter folhas

jovens, homogêneas e com expansão foliar entre 75 a 100% (VILORIA et al., 2004). A poda foi realizada acima da primeira gema de crescimento.

3. Preparo do inóculo

A preparação do inóculo ocorreu a partir de culturas puras da estirpe bacteriana Xcc 306. Para a reativação da bactéria, que estava mantida refrigerada em tampão PBS, houve o semeio da mesma em placas de Petri contendo meio Manitol Glutamate Yeast [MGY] (10 g de manitol, 2 g de ácido L-glutâmico, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de NaCl, 0,2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de extrato de levedura, 15 g de ágar e 1000mL de água destilada) e acondicionamento em estufa bacteriológica por 48 horas a 28 °C. Após esse período, a bactéria foi recolhida em microtubos de 1,5 mL contendo tampão PBS, tornando-se assim uma suspensão bacteriana, para ajuste de concentração. O ajuste procedeu-se através do aparelho espectrofotômetro, no qual a concentração foi ajustada para 10^8 unidades formadoras de colônias. mL^{-1} (UFC) referindo-se a uma leitura de 600 nm no aparelho (BELASQUE JR.; JESUS JR., 2006).

4. Confirmação do inóculo

Para confirmação de que o inóculo correspondia a estirpe Xcc 306, foi realizada a extração de DNA total e amplificação por PCR convencional utilizando um par de iniciadores específicos [Xac 01 e Xac 02] (COLETTA-FILHO et al., 2005) e posteriormente corrida em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. O produto foi visualizado em aparelho fotodocumentador equipado com luz ultravioleta.

5. Inoculação e avaliação dos sintomas

Para inoculação da bactéria nas plantas, foi utilizada a metodologia de ferimento com agulha de 0,55 x 0,20 mm desinfestada logo após imersão da mesma na suspensão bacteriana com concentração previamente ajustada. Foram realizadas 6 perfurações subepidérmicas (atravessando o limbo foliar) em cada folha, sendo 3 em cada lado do limbo e equidistantes. A

inoculação ocorreu em 5 plantas por genótipo e 6 folhas por planta, totalizando 30 folhas de um mesmo genótipo. Durante todo o experimento, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação e temperatura adequadas para favorecer o desenvolvimento da doença.

A avaliação dos sintomas se deu através da medição do diâmetro da lesão com um paquímetro digital de cada folha inoculada. Procurou-se medir a mesma lesão da folha para que não ocorresse divergência entre a medida das lesões no decorrer do experimento. As avaliações no primeiro e segundo ensaio ocorreram aos 19, 25, 33, 39, 46, 61, 68 e 76 dias após a inoculação [DAI] (GONÇALVES-ZULIANI et al. 2016a). Para cada dia de avaliação foram medidos 30 diâmetros de cada genótipo, ou seja, uma lesão por folha inoculada. A avaliação do diâmetro ocorreu na face abaxial da folha, pois é onde o sintoma em folhas inoculadas são mais evidentes, e desconsiderou-se o halo amarelo quando presente.

6. Análise dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos a comparação entre os tratamentos através de análise de variância e Scott-Knott a 5% de probabilidade por meio do software R (R Core Team, 2016). A partir das médias dos diâmetros das lesões foi possível determinar a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). A utilização da AACPD é altamente recomendada, pois além de fazer uso de todos os dados levantados nas avaliações, ela não é afetada por fatores que podem influenciar no desenvolvimento da doença (VARGAS, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois ensaios realizados todos os genótipos apresentaram sintomas característico da doença cancro cítrico. No primeiro ensaio os sintomas iniciaram aos 15 DAI, no segundo aos 13 DAI e foi possível observar visualmente uma evolução dos sintomas ao longo do tempo em ambos os ensaios. Esses dados estão de acordo com Nociti et al. (2006) que inoculando Xcc em plantas cítricas, em condições de casa de vegetação, através de ferimentos com agulha, observaram que os sintomas da doença foram possíveis de serem observados entre 9,1 a 17,3 DAI.

A Figura 1 apresenta as médias para a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e é possível visualizar a formação de três grupos distintos, sendo possível classificar os genótipos em estudo como menos suscetíveis, moderadamente suscetíveis e mais suscetíveis de acordo com o diâmetro da lesão. Os genótipos que se comportaram como menos suscetíveis foram ‘Natal 261’, ‘Pera 436’, ‘Natal M9-350’ e ‘Natal 245’; como moderadamente suscetíveis foram ‘Valência 326’, ‘Natal M9-324’, ‘Rubi 251’, ‘Pera 329’, ‘Morcott 280’, ‘Pera 331’, ‘Natal 308’ e; como mais suscetíveis ‘Westin 340’, ‘Pera 460’, ‘Bahia 25-462’, ‘Rubi 353’ e ‘Westin 16-319’. Dentre esses genótipos, ‘Natal 261’ se comportou como o mais resistente e ‘Westin 16-319’ como o mais suscetível. Esses genótipos foram selecionados em pomares comerciais de diferentes regiões do estado de São Paulo e do Paraná, que se destacaram em relação aos demais, quanto a doença cancro cítrico, um dos motivos do genótipo ‘Natal 261’ ter se comportado como resistente neste estudo, visto que de maneira geral laranja ‘Natal’ se comporta como suscetível. A metodologia de classificação dos genótipos já foi utilizada por outros autores, Vargas et al. (2013) avaliando 80 genótipos de citros em condições de campo, classificou-os em cinco grupos distintos: resistentes, moderadamente resistentes, moderadamente suscetíveis, suscetíveis e muito suscetível.

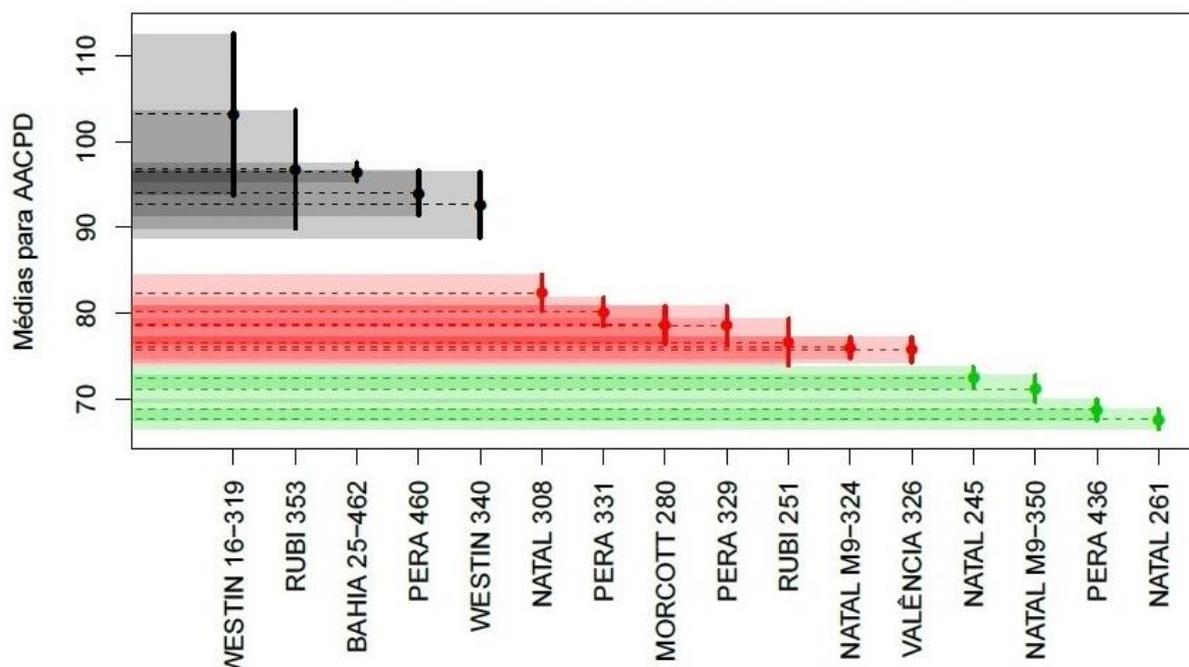


Figura 1. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) obtida através do diâmetro médio das lesões de acordo com a resposta dos genótipos à inoculação com *X. citri* subsp. *citri*.

A Figura 2 apresenta a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) por variedade e a Figura 3 representa os perfis por variedade em função do diâmetro da infecção e dos dias de avaliação. É possível observar que, de maneira geral, todos os genótipos apresentaram um aumento no diâmetro da infecção ao longo do tempo. Tomando como base o genótipo ‘Westin 16-319’ observa-se o contínuo aumento da lesão nos dias avaliados com médias de AACPD superiores e valores de diâmetro da infecção elevados. Comparando com o genótipo ‘Natal 261’ observamos que o aumento do diâmetro da lesão também foi contínuo, porém suave, apresentando valores máximos de AACPD de aproximadamente 75. A Figura 4 representa folha inoculada do genótipo ‘Westin 16-319’ e do genótipo ‘Natal 261’. Visualmente é possível verificar que existem diferenças significativas entre o tamanho das lesões dos dois genótipos analisados. Carvalho et al. (2015) avaliando um grande número de genótipos de citros, também constataram uma significativa diferença de diâmetro da lesão entre os genótipos ‘Westin’ e ‘Natal’.

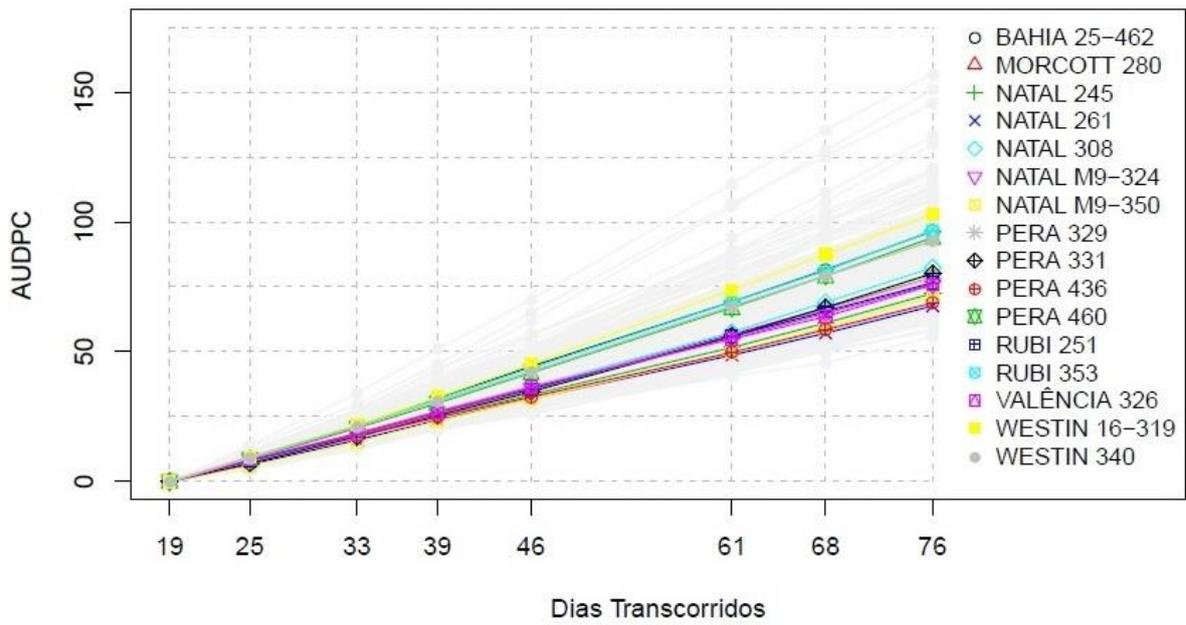


Figura 2. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) por variedade em função dos dias de avaliação.

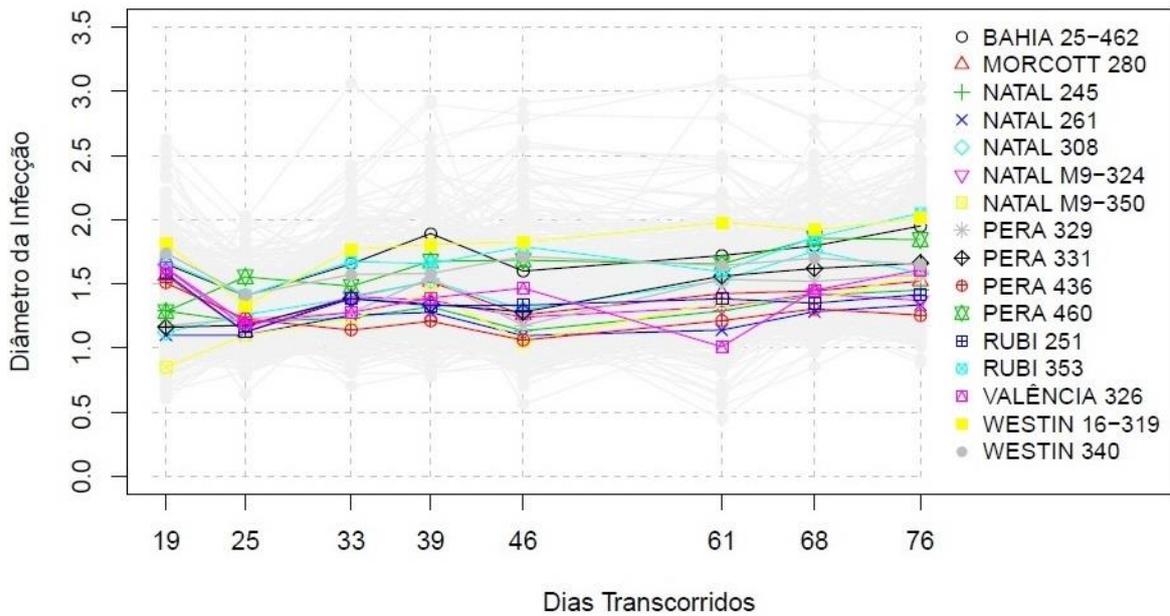


Figura 3. Perfis por variedade em função do diâmetro da infecção e dos dias transcorridos.



Figura 4. Folha de citros inoculada com *Xanthomonas citri* subsp. *citri* aos 76 dias após a inoculação (DAI) dos genótipos ‘Natal 261’ (à esquerda) e ‘Westin 16-319’(à direita).

Analisando a Tabela 2 observamos que os valores da AACPD variaram de 67,64 a 103,18. Isso indica que há uma variação do grau de suscetibilidade entre os genótipos estudados. Os menores valores foram apresentados pelos genótipos ‘Natal 261’, ‘Pera 436’, ‘Natal M9-350’ e ‘Natal 245’ formando o grupo de similaridade C. Os genótipos ‘Valência 326’, ‘Natal M9-324’, ‘Rubi 251’, ‘Pera 329’, ‘Morcott 280’, ‘Pera 331’, ‘Natal 308’ formaram o grupo B. E os genótipos ‘Westin 340’, ‘Pera 460’, ‘Bahia 25-462’, ‘Rubi 353’ e ‘Westin 16-319’ o grupo A. O grupo C foi representado pelo genótipo ‘Natal 261’, o grupo B por ‘Pera 329’ e o C por ‘Westin 16-319’.

Amaral et al. (2010) estudaram 582 acessos de citros, dentre eles laranjas doce, tangerinas e híbridos, em condições de casa de vegetação com inoculação artificial com spray de Xcc, observaram que 13% são resistentes, 42% moderadamente resistentes, 20% suscetível e 25% altamente suscetível em relação a bactéria.

Tabela 2. Reação dos genótipos de citros ao cancro cítrico em relação a AACPD distinguindo os grupos de similaridade. Maringá - PR, 2016.

Genótipo	AACPD	Grupo de similaridade*	Suscetibilidade
Westin 16-319	103,18333	A	Mais suscetível
Rubi 353	96,78217	A	
Bahia 25-462	96,48333	A	
Pera 460	94,00750	A	
Westin 340	92,66367	A	Moderadamente suscetível
Natal 308	82,39733	B	
Pera 331	80,16967	B	
Morcott 280	78,63067	B	
Pera 329	78,58550	B	
Rubi 251	76,60983	B	
Natal M9-324	76,01650	B	
Valencia 326	75,75217	B	
Natal 245	72,51767	C	Menos suscetível
Natal M9-350	71,18400	C	
Pera 436	68,74700	C	
Natal 261	67,64000	C	

*Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Esses dados estão de acordo com Deng et al. (2010) que estudando 14 acessos de citros inoculados artificialmente com *X. citri* subsp. *citri* e mantidos em casa de vegetação constataram que oito acessos de *C. michangensis* e cinco de *C. junos* apresentaram diferentes respostas quando inoculados com a bactéria, indicando diversidade na suscetibilidade da espécie. Gonçalves-Zuliani et al. (2016a) avaliaram 25 genótipos de ‘Pera’ inoculados com *X. citri* subsp. *citri* através de agulha em condições de casa de vegetação e constataram que há diferenças significativas entre os diâmetros médios das lesões avaliadas indicando diferença na suscetibilidade. Carvalho et al. (2015) avaliaram a resistência ao cancro cítrico em 186 genótipos de citros em condições de campo incluindo espécies de laranjas doce, tangerinas, limões, limas ácidas, toranjas, e híbridos e observaram diferenças significativas entre os genótipos em estudo demonstrando que nenhum deles foi totalmente imune à bactéria.

Com o presente estudo concluímos que nenhum genótipo foi totalmente imune a bactéria, visto que todos eles apresentaram sintomas característicos da doença e evolução dos mesmos ao longo do tempo. Estudos futuros são necessários para verificar o comportamento desses mesmos genótipos em condições de campo e, em especial, se o genótipo ‘Natal 261’ se comportará como o mais resistente, podendo ser utilizado para trabalhos de melhoramento genético visando um possível controle da doença cancro cítrico.

REFERÊNCIAS

- ALEGRIA, M. C.; SOUZA, D. P.; ANDRADE, M. O.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.; DA SILVA, A. C. R.; FARAH, C. S. Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.2315-2325, 2005.
- 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.
- BOCK, C. H.; GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; COOK, A. Z.; PARKER, P. E. Wind speed and wind-associated leaf injury affect severity of citrus canker on Swingle citrumelo. **European Journal of Plant Pathology**, v.128, p.21-38, 2010.
- 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-JUNIOR, J.; MACHADO, M. A.; CROCE-FILHO, J.; BOCK, C. H.; ABDU, 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.
- COLETTA-FILHO, H.D.; TAKITA, M.A.; SOUZA, A.A.; NETO, J.R.; DESTÉFANO, S.A.L.; HARTUNG, J.S.; MACHADO, M.A. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.279-285, 2005.
- 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.

FRANCIS, M. I.; KOSTENYUK, I.; ORBOVIC, V.; LOSKUTOV, A.; ZOLOTUKHIN, M.; GRAHAM, J. H. Automated Needle-free Injection Method for Delivery of Bacterial Suspensions into Citrus Leaf Tissues. **Journal of Phytopathology**, v.159, n.5, p.347-351, 2010.

GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; CARDOSO, K. A. K.; BELASQUE-JUNIOR, J.; ZANUTTO, C. A.; HASHIGUTI, H. T.; BOCK, C. H.; NAKAMURA, C. V.; NUNES, W. M. C. 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, 2016b.

GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; NANAMI, D. S. Y.; BARBIERI, B. R.; 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, 2016a.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R. Variation in aggressiveness of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* associated with citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries. **Phytopathology**, v.80, p.190–196, 1990.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ANCHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v.82, n.11, p.1319-1325, 1992.

KOLLER, O.C.; OLIVEIRA, R.B.L.; NUNES, D.S.; SOGLIO, F.D.; PANZENHAGEN, N.V.; SARTORI, I.A.; MANTEZI, F. Controle químico do cancro cítrico em plantas jovens sob manejo convencional e orgânico. **Ciência Rural**. v.36, p.1043-1048, 2006.

LARANJEIRA, F. F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; COLETTA-FILHO, H. D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JR., J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p.509 – 566, 2005.

LEITE JUNIOR, 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.

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 acida Galego. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.140-146, 2006.

R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

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.

VARGAS, R.G. **Resistencia de variedades de *Citrus* sp à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em condições de campo na região Noroeste do Estado do Paraná.** 2008. 60f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UEM, Maringá, 2008.

VARGAS, R.G; GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; CROCE FILHO, J.; CARVALHO, S. A.; NOCCHI, P.T.R.; NUNES, W.M.C. Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na região Noroeste Paranaense, em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, v.39, p.235-241, 2013.

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

CAPÍTULO II

ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE CITROS à *Xanthomonas citri* subsp.
citri EM FOLHAS DESTACADAS

RESUMO

Na cultura do citros, diversas doenças prejudicam a comercialização e industrialização de seus frutos. Uma delas é o cancro cítrico, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), uma doença que, após a entrada na planta, ocasiona sintomas que prejudicam as folhas, frutos e em casos mais severos os ramos. O objetivo deste capítulo foi estudar, utilizando a metodologia de folha destacada, a resistência de 16 genótipos de citros. Foram coletadas folhas dos genótipos em estudo e as mesmas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana de Xcc previamente ajustada em aparelho espectrofotômetro. As folhas inoculadas foram acondicionadas em tubos do tipo Falcon® contendo água de torneira suficiente para cobrir parte do ramo e metade do pecíolo. Os tubos foram mantidos em condição ambiente. O diâmetro da lesão foi mensurado aos 3, 7 e 14 dias após a inoculação (DAI), utilizando um paquímetro digital. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Aos 3 DAI foi possível verificar o início dos sintomas característicos da doença em todas os genótipos em estudo. ‘Pera 436’ se mostrou como o genótipo mais resistente apresentando o menor diâmetro de lesão, enquanto que ‘Westin 340’ foi o mais suscetível apresentando maior diâmetro de lesão. Além disso, todos os genótipos apresentaram evolução dos sintomas ao longo do tempo. Folha destacada é uma técnica que permite resultados prévios, porém consistentes e rápidos, devido a simplicidade da metodologia empregada.

Palavras-chave: Bactéria. Genótipos. Suscetibilidade.

ABSTRACT

In the citrus crop, several diseases affect the commercialization and industrialization of its fruits. One of these is citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), a disease that, after entering the plant, causes symptoms that damage the leaves, fruits and in more severe cases the branches. The objective of this chapter was to study the resistance of 16 citrus genotypes using the detached leaf methodology. Leaves of the genotypes under study were collected and inoculated with a bacterial suspension of Xcc previously adjusted in a spectrophotometer apparatus. The inoculated leaves were packaged in Falcon® tubes containing enough tap water to cover part of the branch and half of the petiole. The tubes were maintained at ambient conditions. The diameter of the lesion was measured at 3, 7 and 14 days after inoculation (DAI), using a digital caliper. Data were submitted to analysis of variance and Scott-Knott test at 5% probability. At 3 DAI, it was possible to verify the onset of the characteristic symptoms of the disease in all genotypes under study. 'Pera 436' was shown to be the most resistant genotype presenting the smallest lesion diameter, while 'Westin 340' was the most susceptible presenting larger lesion diameter. In addition, all genotypes showed evolution of symptoms over time. Detached leaf is a technique that allows previous results, consistent and fast, due to the simplicity of the methodology used.

Keywords: Bacterium. Genotypes. Susceptibility.

INTRODUÇÃO

A citricultura é vulnerável a diversas doenças, dentre elas temos o cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006). Considerado uma grave doença para esta cultura (GOTTWALD, 2002), a entrada da bactéria na planta depende de aberturas naturais como estômatos, hidatódios e lenticelas e também ferimentos, sempre seguidos da presença de água (GOTTWALD; GRAHAM, 1992; GRAHAM et al., 1992; BOCK et al., 2009). A bactéria coloniza os tecidos da planta provocando os sintomas característicos da doença e em casos mais severos ocorre desfolha da planta e queda dos frutos (GOTTWALD; GRAHAM, 1992; GOTTWALD et al., 1993). No Brasil, as plantas cítricas se tornam mais vulneráveis ao ataque da bactéria no verão, onde o clima apresenta ventos, chuva e temperatura elevada (LARANJEIRA et al., 2005).

Os sintomas estão presentes em folhas e frutos e em casos mais severos, nos ramos. Nas folhas são caracterizados por lesões circulares, eruptivas, corticosas, com coloração variando de amarelo a marrom, e circundadas por um halo amarelo. A presença do halo amarelo reduz a área fotossinteticamente ativa da folha causando senescência prematura da mesma (LARANJEIRA et al., 2005; BOCK et al., 2011).

A utilização de produtos à base de cobre visa reduzir a severidade da doença na planta, visto seu efeito de proteção do tecido, porém não possui efeito curativo e não elimina a utilização de práticas de manejo como utilização de variedades menos suscetíveis à doença (LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990; BEHLAU et al., 2007).

A metodologia de folha destacada é um bioensaio que permite manter a folha viva quando retirada da planta mãe. Apresenta vantagens em relação ao espaço, material vegetal e inóculo. Foi inicialmente desenvolvida e utilizada para estudos de fisiologia vegetal, sendo posteriormente utilizada por fitopatologistas em estudos de inoculação e fisiologia do parasitismo (YARWOOD, 1946).

O objetivo deste capítulo foi avaliar através da metodologia de folha destacada a reação de 16 genótipos de citros quando inoculados com a bactéria *X. citri* subsp. *citri*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal e biológico

Foram avaliados 16 genótipos de citros (Tabela 1), provenientes do Viveiro de Mudanças Pratinha (VMP) e enxertados sob limão-cravo (*C. limonia*). Os genótipos incluíam variedades de laranja doce ‘Pêra’, ‘Valência’, ‘Natal’, ‘Westin’, ‘Rubi’, ‘Bahia’, e o híbrido ‘Morcott’. A estirpe bacteriana de *X. citri* subsp. *citri* utilizada para inoculação nas folhas foi a Xcc 306, pois possui seu genoma completamente sequenciado. A bactéria era proveniente do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e estava armazenada em condições adequadas no laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Tabela 1. Genótipos de citros utilizados no experimento de folhas destacadas. Maringá – PR, 2016.

Sequência	Genótipo	Nome comum	Nome científico
1	Pêra 460	Laranja doce	<i>Citrus sinensis</i>
2	Pêra 331		
3	Pêra 329		
4	Pêra 436		
5	Valência 326		
6	Natal M9-324		
7	Natal M9-350		
8	Natal 245		
9	Natal 261		
10	Natal 308		
11	Westin 16-319		
12	Westin 340		
13	Rubi 353		
14	Rubi 251		
15	Bahia 25-462		
16	Morcott 280	Tangerina	<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>

2. Implantação do experimento

As folhas utilizadas no experimento foram coletadas das mudas de citros que estavam alocadas em casa de vegetação pertencente ao NBA-UEM. Foram selecionados ramos sadios e com o mesmo estágio de maturação. Os ramos passaram por uma sanitização que compreendia mergulhá-los em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, água destilada e solução com fungicida Comet® na concentração de 500 µL do produto comercial em 3 litros de água destilada. A solução com fungicida se fez necessária devido a presença de fungos oportunistas que diminuía a longevidade das folhas utilizadas no experimento. Após a sanitização, os ramos foram cortados com o auxílio de uma tesoura de poda de modo que junto à folha e ao pecíolo permanecesse parte do ramo.

3. Inoculação, Acondicionamento e Avaliação dos sintomas

A inoculação se deu por meio de perfuração do limbo foliar com agulha desinfestada (0,55 x 0,20mm) logo após a imersão da mesma em suspensão bacteriana previamente ajustada a 10^8 UFC.mL⁻¹. Realizou-se 4 furos em cada lado do limbo foliar, totalizando 8 furos por folha e 60 folhas por genótipo. A necessidade de grande quantidade de folhas inoculadas é de que as mesmas, após um período de incubação, começam a senescer.

Após a inoculação, as folhas foram acondicionadas em tubos de 50 mL do tipo Falcon® que continha água de torneira suficiente para cobrir parte do ramo e metade do pecíolo, sem atingir o limbo foliar (Figura 1). O tubo permaneceu durante todo o experimento com a tampa fechada pela metade para que ocorresse a transpiração da folha e a água foi resposta para que a umidade se mantivesse.

A avaliação do diâmetro da lesão com o auxílio de um paquímetro digital ocorreu juntamente com o início dos sintomas, aos 3 dias após a inoculação (DAI). Outras duas medidas foram realizadas ao longo do experimento, uma aos 7 e outra aos 14 DAI. Nos três dias avaliados foram medidas 5 lesões por folha em 8 folhas por genótipo, totalizando 40 medidas de diâmetro por genótipo.



Figura 1. Folha de citros acondicionada em tubo Falcon® e com água suficiente.

4. Análise dos dados

Os tratamentos foram comparados através de análise de variância e teste estatístico Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o software R (R Core Team, 2016). A partir das médias dos diâmetros das lesões foi possível determinar a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 16 genótipos utilizados no estudo apresentaram os sintomas da doença cancro cítrico quando foram inoculados com a bactéria *X. citri* subsp. *citri* e mantidos em condições de folha destacada. Os sintomas se iniciaram aos 3 dias após a inoculação (DAI) e evoluíram ao longo do tempo. Gottwald e Graham (2000) observaram em seus estudos de folha destacada inoculadas com a bactéria do cancro cítrico que os sintomas são possíveis de serem observados entre dois a quatro dias após a inoculação. Wang et al. (2011) estudaram a resposta de espécies cítricas a inoculação de *X. citri* subsp. *citri* e observaram que os sintomas iniciaram aos 3 dias após a inoculação. As lesões foram observadas na face abaxial da folha com características esponjosas, salientes e coloração branca. Esses dados também estão de acordo com Wang et al. (2011) que observaram os mesmos sintomas característicos.

Observando a Tabela 2 e a Figura 2 é possível observar que os genótipos diferiram entre si e os mesmos foram agrupados de acordo com o diâmetro médio das lesões. O genótipo ‘Pera 436’ se mostrou como o mais resistente, enquanto que ‘Westin 340’ como o mais suscetível. Foi possível o agrupamento das variedades em estudo em 7 grupos distintos. O genótipo ‘Pera 436’ foi o que mais se destacou em relação ao demais, ocupando a posição de genótipo mais resistente à doença. ‘Morcott 280’ e ‘Valência 326’ ocuparam o segundo grupo; ‘Natal M9-324’, ‘Pera 329’, ‘Pera 460’, ‘Natal 308’, ‘Natal 261’ e ‘Westin 16-319’ o terceiro grupo; ‘Bahia 25-462’. ‘Rubi 353’ o quarto grupo; ‘Natal M9-350’, ‘Pera 331’ e ‘Natal 245’ o quinto grupo; ‘Rubi 251’ e ‘Westin 340’ representaram de forma solitária os grupos seis e sete, respectivamente, sendo que o genótipo ‘Westin 340’ foi o que se comportou como mais suscetível à doença.

Amaral et al. (2010) em seus estudos avaliaram 582 acessos de citros quanto à resistência ao cancro cítrico e observaram que, de maneira geral, a variedade ‘Pera’ se enquadra no grupo das variedades mais resistentes e ‘Westin’ no mais suscetível. As demais variedades também estão de acordo com os resultados obtidos pelos autores.

Gonçalves-Zuliani et al. (2016) estudaram nove genótipos de citros em condições de folha destacada inoculadas com *X. citri* subsp. *citri* e observaram que há diferenças na resistência desses genótipos e também constataram que um genótipo ‘Pera’ se mostrou como o mais resistente.

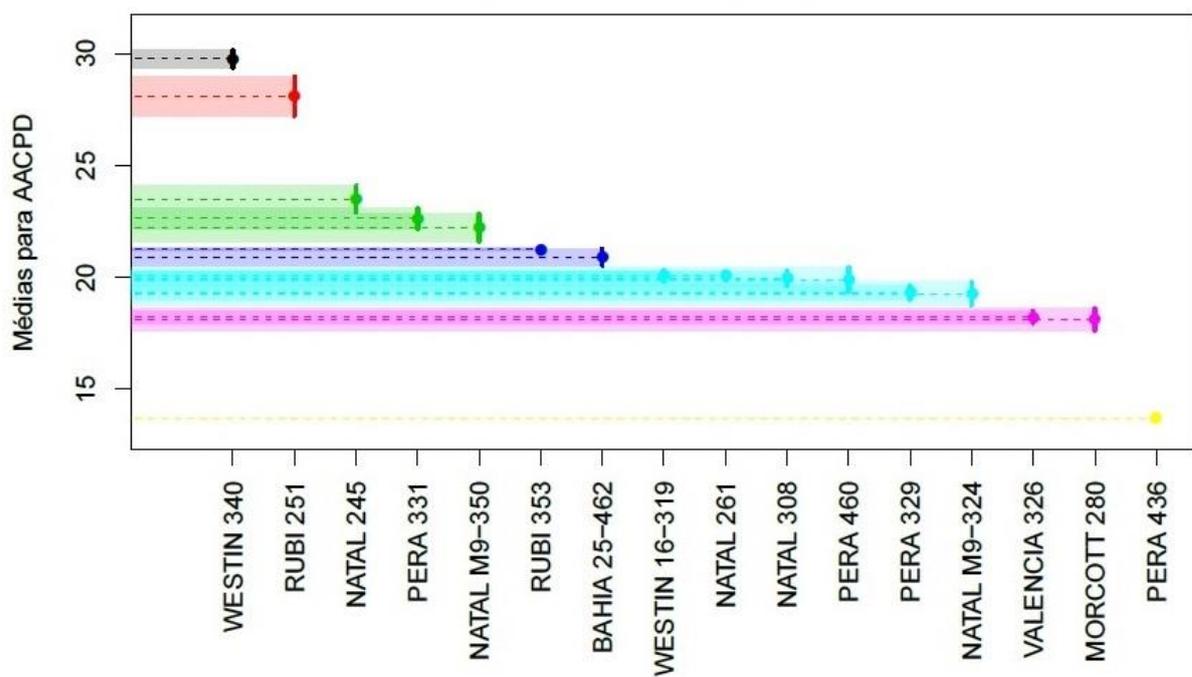


Figura 2. Médias para Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) agrupando os genótipos em estudo por cor.



Figura 3. Amostra de folha destacada de 'Pera 436' (à esquerda) e 'Westin 340' (à direita) aos 14 dias após a inoculação (DAI).

A figura 4 mostra a AACPD por variedade isolada ao longo dos dias de avaliação (3, 7 e 14 DAI) e a figura 5 os perfis por variedade em função do diâmetro da infecção e dos dias de avaliação. É possível observar um aumento crescente ao longo do tempo e claramente distinguimos a variedade mais resistente da mais suscetível. Consta-se que o genótipo ‘Westin 340’ apresenta valores de AACPD de 30 e diâmetro da infecção superior a 3 mm aos 14 DAI, enquanto que ‘Pera 436’ apresenta valores de AACPD de aproximadamente 15 e diâmetro da infecção inferior a 1,5 mm aos DAI.

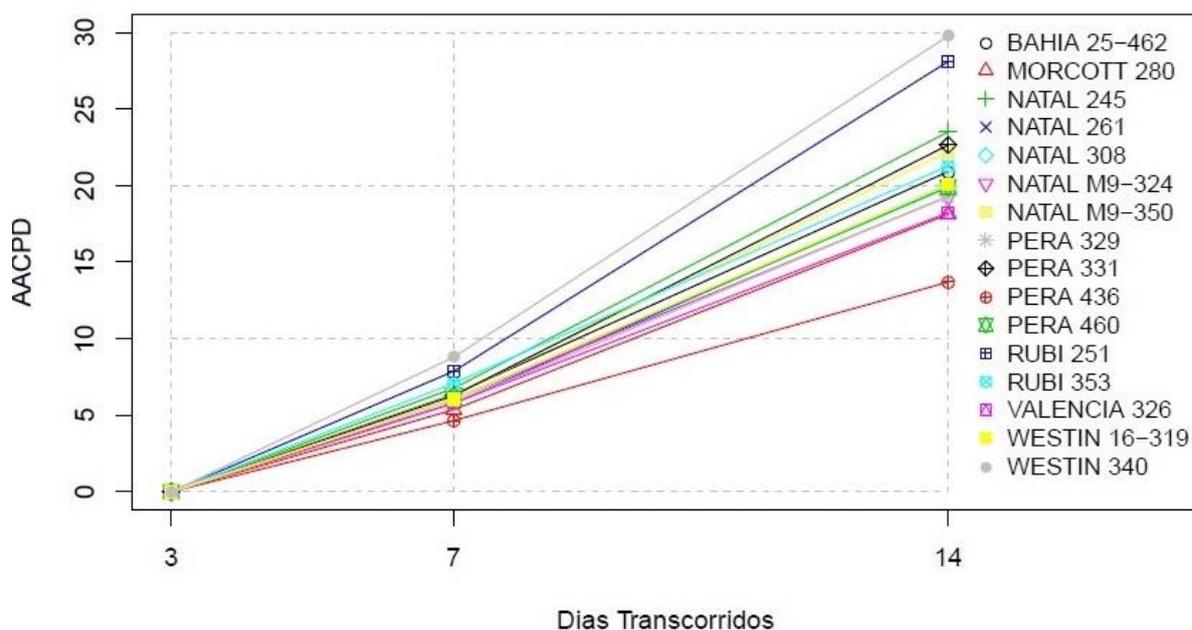


Figura 4. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) por variedade, em função dos dias de avaliação.

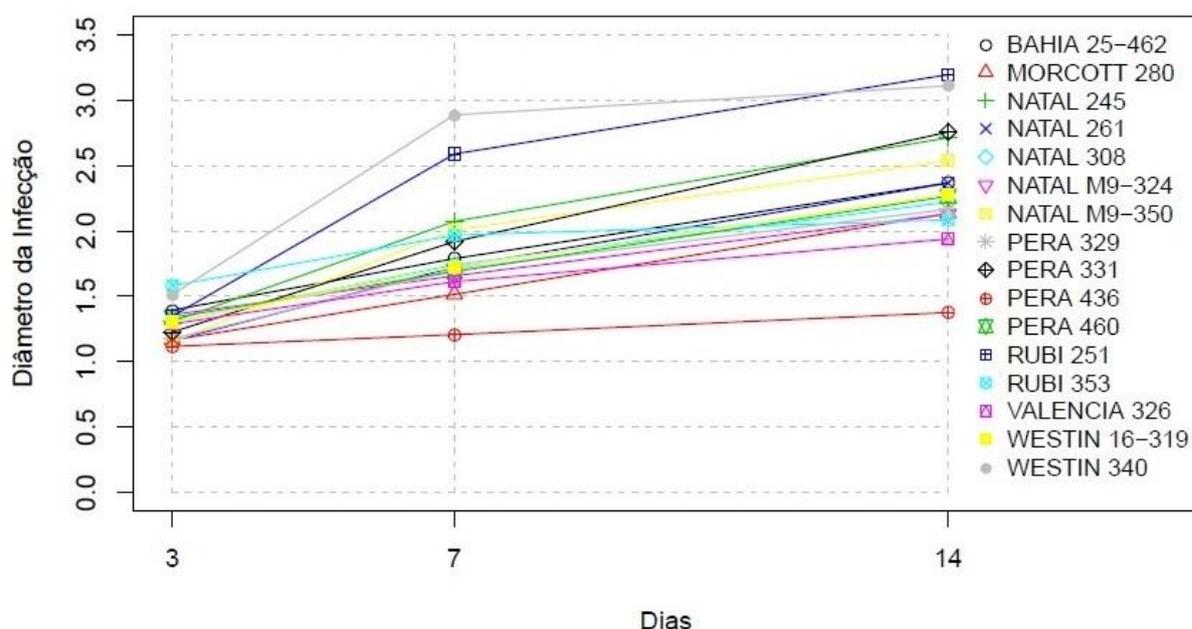


Figura 5. Perfis por variedade em função do diâmetro da infecção e dos dias de avaliação.

Analisando-se a Tabela 2 verificamos que houve a formação de 7 grupos de similaridade. Levando em consideração variedades mais resistentes, o genótipo ‘Pera 436’ apresentou menor valor de AACPD, o genótipo ‘Morcott 280’ representou o grupo f, ‘Natal M9-324’ o grupo e, ‘Bahia 25-462’ grupo d, ‘Natal M9-350’ grupo c, ‘Rubi 251’ e ‘Westin 340’ os grupos b e a, respectivamente. Gonçalves-Zuliani et al. (2016) também agruparam os genótipos em avaliação em grupos de similaridade. Vargas et al. (2013) estudando genótipos a campo também verificaram que houve diferenças significativas entre os mesmos.

Tabela 2. Reação dos genótipos de citros ao cancro cítrico em relação à AACPD distinguindo os grupos de similaridade em função dos diâmetros da lesão. Maringá – PR, 2016.

Genótipo	AACPD	Grupo de similaridade*	Suscetibilidade
Westin 340	29,77063	a	+
Rubi 251	28,09950	b	++
Natal 245	23,50575	c	+++
Pera 331	22,64650	c	+++
Natal M9-350	22,22263	c	+++
Rubi 353	21,27112	d	++++
Bahia 25-462	20,91225	d	++++
Westin 16-319	20,07500	e	+++++
Natal 261	20,07488	e	+++++
Natal 308	19,95113	e	+++++
Pera 460	19,88850	e	+++++
Pera 329	19,31663	e	+++++
Natal M9-324	19,28200	e	+++++
Valência 326	18,23300	f	++++++
Morcott 280	18,13162	f	++++++
Pera 436	13,70012	g	+++++++

*Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott.

Conclui-se que estudos utilizando a metodologia de folha destacada são eficientes para separar variedades de acordo com a resistência ao cancro cítrico. Esses ensaios permitem resultados rápidos, precisos, com economia de tempo e espaço e abrange um elevado número de amostras e repetições, porém não descarta a necessidade de estudos em casa de vegetação e principalmente a campo para confirmação dos resultados. As diferenças de suscetibilidade entre os genótipos são importantes, devido o fornecimento de resultados que podem ser utilizados em programas de melhoramento genético a fim de buscar o controle da doença cancro cítrico.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BEHLAU, F.; BELASQUE JR., J.; BERGAMIM FILHO, A.; LEITE JR., R. P. Incidência e Severidade de cancro cítrico em laranja Pêra Rio sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 311-317, 2007.
- BOCK, C.H.; PARKER, P.E.; COOK, A.Z.; RILEY, T.; GOTTWALD, T.R. Comparison of assessment of citrus canker foliar symptoms by experienced and inexperienced raters. **Plant Disease**, n.93, p. 412-24, 2009.
- GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; CARDOSO, K. A. K.; BELASQUE-JUNIOR, J.; ZANUTTO, C. A.; HASHIGUTI, H. T.; BOCK, C. H.; NAKAMURA, C. V.; NUNES, W. M. C. 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.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology**, n.82, p.930-35, 1992.
- GOTTWALD, T.R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J.H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E.L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, v.92, p.361-77, 2002.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J. H. Citrus canker. **The Plant Health Instructor**, 2000.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ANCHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v.82, n.11, p.1319-1325, 1992.

LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA-FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Mattos Junior, D., et al. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 509 -566, 2005.

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.

R Core Team. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

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

VARGAS, R.G; GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; CROCE FILHO, J.; CARVALHO, S. A.; NOCCHI, P.T.R.; NUNES, W.M.C. Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na região Noroeste Paranaense, em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, v.39, p.235-241, 2013.

WANG, Y.; FU, X. Z.; LIU, J. H.; 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.

YARWOOD, C.E. Detached leaf culture. **The Botanical Review**, Lancaster, n.12, p.1-56. 1946.