



## AVALIAÇÃO DE DOIS MEIOS DE CULTIVO PARA *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

*Bruna Rafaela Barbieri*<sup>1</sup>, *Paula Thaís Requena Nocchi*<sup>2</sup>, *Larissa Siqueira Soares*<sup>1</sup>, *Diego Henrique Pereira Cataní*<sup>2</sup>,  
*Mariana Gomes Brescansin*<sup>2</sup>, *William Mário de Carvalho Nunes*<sup>3</sup>

**RESUMO:** O cancro cítrico é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, que coloniza tecidos das plantas causando necrose e danos nas folhas e frutos. No presente trabalho objetivou-se o isolamento da bactéria de variedades de laranja doce provenientes de pomar experimental e avaliar meios de cultura para manutenção desses isolados. Foram coletadas folhas com lesões da doença e as necroses recortadas e trituradas em solução salina. O isolamento se deu por meio da transferência de solução bacteriana para placas com meio nutriente Agar para obtenção de colônias “puras”. As colônias puras foram transferidas para as placas com os respectivos meios a serem avaliados. Constatou-se que a bactéria se expressou consideravelmente no meio nutriente Agar, que é considerado um meio padrão para isolamento e cultivo da mesma. Já no meio Kado não houve a presença da bactéria, fato este que pode estar associado à um erro experimental. Com relação aos custos de preparo de cada meio, o meio NA tem um custo de R\$ 3,35 enquanto o meio Kado R\$ 50,90, fortalecendo ainda mais a escolha do meio NA para cultivo de *Xanthomonas*.

**PALAVRAS-CHAVE:** cancro cítrico; isolamento; bactéria; citros.

### 1 INTRODUÇÃO

O cancro cítrico é uma das principais doenças no parque citrícola mundial. Sua primeira constatação ocorreu em Presidente Prudente, SP, no ano de 1957 (BITANCOURT, 1957). O agente etiológico é uma bactéria denominada *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e é considerada uma ameaça potencialmente grave para a citricultura. Afeta grande parte das variedades comerciais de laranja e possui ocorrência mais severa em regiões de clima quente e úmido no verão (TIMMER et al., 2000).

Os sintomas se caracterizam por lesões circulares, salientes, de coloração amarronzada e com aspecto eruptivo. Os sintomas se expressam em folhas, frutos e ramos ocasionando a perda da qualidade da comercialização do fruto in natura e o seu processamento industrial (LARANJEIRA et al., 2005). Nas folhas as lesões são observadas em ambos os lados, sendo comum a presença de um halo amarelo circundando a lesão. Quando a doença ocorre mais agressivamente, pode-se observar a ocorrência de desfolha, queda de frutos e seca de ramos (GOTTWALD et al., 2001; LARANJEIRA et al., 2005).

Os objetivos deste trabalho foram isolar *Xanthomonas citri* subsp. *citri* de variedades de laranja doce de pomar da FEI e avaliar dois meios de cultura para manutenção desses isolados, visto que há um meio específico para a bactéria que é o meio Kado e o mais comumente utilizado que é o meio Nutriente Agar (NA) não específico para bactéria.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas folhas de laranja doce com sintomas da doença do pomar da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), sendo de 11 variedades mais suscetíveis e de 9 variedades menos suscetíveis. O isolado Xcc 306 foi utilizado como testemunha obtido do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). As amostras coletadas foram encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA). As lesões foram recortadas e removida as impurezas e microrganismos indesejáveis. Cada lesão foi triturada em almofariz com 1000µL de solução salina até obter uma suspensão bacteriana. Da suspensão foi retirada uma alíquota de 50µL e transferida para microtubo com 450µL de solução salina para obter-se 4 diluições. Da quarta diluição foi retirada uma alíquota de 50µL para ser transferida para placa de Petri contendo meio de cultura Nutriente Agar (NA) para

<sup>1</sup> Mestrandas do Curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM, Maringá - PR. Bolsista CNPq. brunarbarbieri91@hotmail.com

<sup>2</sup> Doutorandos do Curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM, Maringá - PR. Bolsistas CNPq/CAPEs. thaisnocchi@hotmail.com

<sup>3</sup> Orientador, Professor Doutor do Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada NBA/UEM. Bolsista Produtividade CNPq. wmcnunes@uem.br



obtenção de colônias individualizadas. As colônias individualizadas foram repicadas e novamente incubadas. Essas bactérias foram transferidas para microtubos com solução salina em tampão fosfato (PBS) e armazenadas no refrigerador. Houve a necessidade de ajustar a concentração da suspensão bacteriana em PBS com o auxílio do espectrofotômetro para  $10^8$  UFC/mL, correspondendo à leitura de 0,3 a 600nm (Belasque Junior et al., 2008). Dessa concentração ajustada foi pipetada uma alíquota de 25 $\mu$ L e transferida para microtubo com 250 $\mu$ L de solução salina. O procedimento foi repetido 6 vezes para se obter uma suspensão menos concentrada. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 15 $\mu$ L da suspensão e transferida para as placas de Petri contendo os meios de culturas a serem testados.

Os meios de cultura utilizados foram Kado e Nutriente Ágar. O meio Kado era composto por 10g de celobiose; 3g de  $K_2PO_4$ ; 1g de  $NaH_2PO_4$ ; 1g de  $NH_4Cl$ ; 0,3g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 15g de Ágar e 1000mL de água destilada. A composição do meio Nutriente Ágar (NA) foi 3g de extrato de carne; 5g de peptona; 5g de NaCl; 15g de Ágar e 1000mL de água destilada. Estes meios foram preparados, autoclavados e vertidos em placas de Petri. Para cada variedade houve três repetições. As placas foram incubadas à 28°C e as avaliações foram realizadas em um período de 7 dias de 12 em 12 horas. As avaliações se basearam na contagem do número de UFC e mensuração do diâmetro de cada UFC utilizando-se um paquímetro digital. Os dados foram submetidos ao teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Também foi avaliado o custo total dos dois meios utilizados no estudo. Os valores médios foram obtidos após pesquisas em empresas que fornecem os produtos utilizados no preparo dos meios no estado do Paraná. O custo é importante para informar o custo-benefício de cada meio e possível escolha entre os meios analisados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Houve diferença estatística em todos os tempos avaliados (Tabela 1) com base no teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para o tempo de 72 horas os isolados das variedades 298 e 85 apresentaram menores diâmetros comparando com os isolados das variedades 142, 300, 13, 05, 201, 81, 15, 35, 318, 133 e 27. Para o tempo de 96 e 120 horas os mesmos dois isolados diferenciaram dos isolados da variedade 142. Por fim, para o tempo de 144 horas, os mesmo dois isolados diferenciaram dos isolados das variedades 300, 142, 15 e 27. Assim, para os quatro tempos, os isolados 298 e 85 diferenciaram principalmente do isolado 142.

Os resultados obtidos são referente apenas ao meio Nutriente Ágar (NA). Para o meio Kado não houve nenhum resultado em nenhum tempo observado, mesmo sendo considerado um meio de cultura seletivo para *Xanthomonas*. O fato pode estar associado à um erro experimental, pois não há evidências na literatura de como preparar e manusear este meio.

Com relação aos custos, tem-se que o custo total de um litro do meio NA é de R\$ 3,35 enquanto que um litro do meio Kado equivale a R\$ 50,90. Assim, observa-se que além do meio NA ser um meio rotineiramente utilizado em laboratórios de fitopatologia, o custo de preparo é significativamente inferior ao meio Kado.

**Tabela 1.** Análise do diâmetro de UFCs dos isolados de *X. citri* subsp. *citri*. Provenientes de diferentes variedades de laranja Pêra da FEI.

Variedades	Resistência	72h	96h	120h	144h
142	Suscetível	1,47433 a	3,13533 a	4,17033 a	4,78133 a
300	Suscetível	1,49567 a	2,371 c	3,217 c	4,46067 a
13	Suscetível	1,491 a	2,23 d	2,893 c	3,92867 c
298	Suscetível	0,866 c	1,08333 g	1,72967 e	2,45033 e
85	Suscetível	1,01967 c	1,56133 f	1,88433 e	2,18967 e
327	Suscetível	1,25833 b	2,032 e	2,90733 c	4,08233 b
05	Suscetível	1,45667 a	2,17267 d	2,85233 c	3,75433 c
201	Suscetível	1,41567 a	1,945 e	2,538 d	3,58067 c
84	Suscetível	1,15967 b	1,87133 e	2,217 d	3,062 d
81	Suscetível	1,39367 a	2,622 b	3,42533 b	4,13933 b
65	Suscetível	1,15267 b	1,75033 e	2,26433 d	3,12367 d
15	Resistente	1,53933 a	2,392 c	3,65667 b	4,40167 a
35	Resistente	1,60433 a	2,54167 c	3,436 b	3,84267 c
318	Resistente	1,45767 a	2,748 b	3,67767 b	4,18333 b
78	Resistente	1,12933 b	2,11733 e	2,784 c	3,514 c
76	Resistente	1,10667 b	1,87867 e	2,77533 c	3,64867 c
133	Resistente	1,18 b	1,59667 f	2,87467 c	3,44467 c
27	Resistente	1,311 a	2,18433 d	3,26767 c	4,542 a
<b>CV(%)</b>		8,98	7,27	9,44	6,80

Médias seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott.



## 4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o meio NA é um excelente meio para isolar e manter a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, devido este possuir componentes que auxiliam e intensificam o crescimento da bactéria, e o seu custo de preparo é irrisório quando comparado ao meio Kado utilizado no estudo.

## REFERÊNCIAS

BELASQUE JR., J.; JACIANI, F. J.; MARIN, R. D.; BARBOSA, J. C. Tamanho da amostra para quantificação do diâmetro de lesões de cancro cítrico. **Tropical Plant Pathology**. v.33, n.4, p.317-322, 2008.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**. v.23, p.101-111, 1957.

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.

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

TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. Compendium of citrus diseases. **The American Phytopathological Society Press**. 2 ed. 2000.