



## DESENVOLVIMENTO DA BACTÉRIA *XANTHOMONAS CITRI* SUBSP. *CITRI* NA PRESENÇA DE BIOTERÁPICOS

Juliana Glória Franco<sup>1</sup>, Paula Thaís Requena Nocchi<sup>2</sup>, Diego Henrique Pereira Cataní<sup>2</sup>, Hudson Sérgio de Souza<sup>2</sup>, Mariana Gomes Brescansin<sup>2</sup>, William Mário de Carvalho Nunes<sup>3</sup>

**RESUMO:** Bioterápicos são medicamentos obtidos a partir de produtos de origem quimicamente não definida tais como secreções, excreções patológicas ou não, tecidos de animais ou vegetais, alergenicos, e produtos de origem microbiana. Neste trabalho foram utilizados bioterápicos extraídos a partir de folhas coletadas das variedades de laranja doce Empres (resistente), Navelina spa (resistente), Castellana Ivia- 64(S) (susceptível) e Bahia (susceptível) infectadas com a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causadora da doença do Cancro Cítrico. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e enviadas imediatamente ao Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá onde foram processadas e encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) onde a técnica do isolamento foi empregada. Este trabalho teve por objetivo realizar isolamentos de *X. citri*, e avaliar o crescimento e desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFCs) em meio Nutriente Ágar com a presença dos produtos bioterápicos 56CH, 106CH, 156CH e Bahia 6CH extraídos das variedades cítricas citadas.

**Palavras-chaves:** Cancro Cítrico, Medicamento, Nutriente Ágar.

### 1 INTRODUÇÃO

O cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006) é uma importante doença em regiões produtoras de citros (GOTTWALD et al., 2002a). Os sintomas da doença podem ser vistos em toda a parte aérea da planta. As lesões nas folhas são normalmente lesões circulares, salientes, de coloração amarronzada e com aspecto eruptivo. Nos frutos, as lesões são semelhantes as das folhas e, em caso de sintomas muito severos, os frutos podem cair antes de atingir a maturidade (LARANJEIRA et al., 2005).

<sup>1</sup>Mestrandos do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. juh\_gfranco@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutorandos do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES, CNPq. 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 de produtividade, CNPq. william.nunes@pq.cnpq.br

Bioterápicos são medicamentos obtidos a partir de produtos de origem quimicamente não definida tais como secreções, excreções patológicas ou não, tecidos de animais ou vegetais, alergenicos, produtos de origem microbiana. Potencialmente os bioterápicos contêm o agente etiológico da doença e também os compostos relacionados com a enfermidade (Nassif, 1997).

Em seguida os produtos bioterápicos e algumas folhas das variedades infectadas foram encaminhados ao Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada da Universidade Estadual de Maringá, onde foram realizados o isolamento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e o teste do desenvolvimento da bactéria isolada na presença do produto.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento teve início com a coleta de folhas de variedades de laranja doce contaminadas com a doença do Cancro Cítrico no pomar da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá, estas foram coletadas das variedades Empres, Navelina spa, Castellana Ivia- 64(S) e Bahia. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e enviadas imediatamente ao Laboratório de Parasitologia/Departamento de Ciências Básicas da Saúde/UEM onde foram processadas para o preparo do Bioterápico. Foram inicialmente lavadas em água estéril e secadas. A seguir picadas em pequenos pedaços de cerca de 5mm com tesoura esterilizada. Para o preparo do Bioterápico foi utilizado 0,01g das folhas picadas e trituradas com 9,99g de lactose P.A. proveniente da Labmaster Ltda Indústria Brasileira. Esse triturado foi diluído em álcool/água 8% até atingir a concentração  $1 \times 10^{12}$ .

Para o isolamento da bactéria as folhas foram lavadas em água corrente e as lesões foram recortadas das folhas e mergulhadas em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 1% também por 1 minuto e enxaguadas 3 vezes em água destilada. Cada lesão foi então triturada em almofariz, contendo 1000 µL de solução salina,



tornando-se uma suspensão bacteriana. De cada suspensão foi pipetada uma alíquota de 50µL e transferida para microtubo contendo 450 µL de solução salina. Em seguida foram realizadas diluições seriadas de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ .

Uma alíquota de 50µL da suspensão bacteriana mais diluída ( $10^{-4}$ ) foi transferida para a superfície do meio de cultura Nutriente-Ágar (NA) (extrato de carne (3g); Peptona (5g); NaCl (5g); ágar (15g) e água destilada para completar o volume para 1 litro) contido em placas de Petri. A incubação das culturas se deu a 28°C por 48 horas.

As colônias individualizadas foram novamente repicadas em meio NA contido em placas de Petri e incubadas nas mesmas condições por 24 horas. Foi realizado o ajuste de concentração da suspensão bacteriana em tampão fosfato (PBS) com auxílio de aparelho de espectrofotômetro para  $10^8$  UFC/mL, correspondente a uma leitura de 0,3 à 630nm de comprimento de onda (BELASQUE JUNIOR; JESUS JUNIOR, 2006). Da suspensão com concentração de  $10^8$  UFC/mL, uma alíquota de 25µL foi transferida para microtubo contendo 225µL de solução salina. Foram realizadas 3 diluições em série, visando a possível visualização, contagem e mensuração dos diâmetros das colônias bacterianas. Posteriormente ao ajuste da concentração e diluições, uma alíquota de 25 µL da suspensão bacteriana foi transferida para as placas de Petri contendo o meio de cultura.

Os produtos bioterápicos 56CH, 106CH, 156CH e Bahia6CH também foram transferidos para placa de Petri contendo somente o meio de cultura e em placas contendo o meio e a presença da bactéria *X. citri*. Ao todo foram 9 tratamentos: somente a bactéria *X. citri* (XCC Test), somente os produtos (56CH, 106CH, 156CH e Bahia6CH), e os mesmos na presença da bactéria (XCC56CH, XCC106CH, XCC156CH e XCCBahia6CH), sendo que cada tratamento teve 3 repetições. As culturas foram incubadas a 28°C. Para avaliação contou-se o número de UFCs em cada placa, e os diâmetros de 10 UFCs foram mensurados, com o auxílio de um paquímetro digital às 48,72, 96, 120 e 144 horas após a repicagem. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao desenvolvimento das UFCs em contato com os produtos bioterápicos não houve interação entre o tamanho da UFC e o tempo de incubação das culturas. O tratamento Bahia6CH não apresentou diferença de tamanhos de UFCs em relação à testemunha e ao XCCBahia6CH. Não houve diferença entre o tratamento 156CH e o XCC156CH, e o tratamento 56CH também não apresentou diferença em relação ao XCC56CH. Os tratamentos 56CH, XCC56CH, 156CH, XCC156CH não diferiram entre si, mas diferiram em relação à testemunha. Os tratamentos que apresentaram os menores tamanhos de diâmetros das UFCs foram os tratamento 106CH e o XCC106CH que diferiram de todos os outros, mas não diferiram entre si (Tabela 1).

### 4 CONCLUSÃO

Pode-se observar que os produtos bioterápicos foram capazes de influenciar significativamente no diâmetro das UFCs da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, e que os produtos provenientes de variedades resistentes apresentaram melhores resultados quanto à **Tabela 1** – Análise do diâmetro de UFCs da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em contato com produtos bioterápicos.

Tabela 1: Análise do diâmetro de UFCs da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em contato com produtos bioterápicos.

Tratamentos	Variedade Referente	Susceptibilidade à <i>X. Citri</i>	Diâmetro médio da bactéria (cm)
106CH	Navelina	Resistente	0,97 a
XCC106CH	Navelina	Resistente	1,02 a
56CH	Empres	Resistente	1,29 b
156CH	Castellana Ivia	Susceptível	1,41 b
XCC 56CH	Empres	Resistente	1,48 b
XCC 156CH	Castellana Ivia	Susceptível	1,51 b
XCC Test	---	---	1,75 c
Bahia 6CH	Bahia	Susceptível	1,83 c
XCCBahia 6CH	Bahia	Susceptível	1,96 c

\*Médias nas colunas seguidas por letras diferentes diferem pelo teste Scott-Knott ( $P < 0,05$ )

### REFERÊNCIAS



Bui Thi Ngoc, L.; Vernière, C.; Vital, K.; Guerin, F.; Gagnevin, L.; Brisse, S.; Ah-You, N.; Pruvost, O. Development of 14 minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri*. **Mol. Ecology Resources**, 9, p. 125-127, 2009.

Da Silva, A. C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, 417, p. 459-463, 2002.

Gottwald, T.R.; Graham, J.H.; Schubert, T.S. Citrus Canker: The pathogen and its impact. Online. **Plant Health Progress**. doi:1094/PHP-2002-0812-01-RV. <http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/>. 2002.

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.

Restrepo, S.; Vélez, C.M.; Verdier, V. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, v. 90, p. 683-690, 2000.