

ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *XANTHOMONAS* UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.

Gabriela Bissoli Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), William Mário de Carvalho Nunes (Orientador), e-mail: ra105298@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Agrárias/Maringá, PR.

5.01.00.00-9 Agronomia/5.01.02.00-1 Fitossanidade

Palavras-chave: Estudo in vitro, cancro cítrico, estria bacteriana.

Resumo:

As bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* estão cada vez mais nocivos na agricultura, os países tropicais tendem a ter o avanço das doenças que possuem patógenos desse gênero. O cancro cítrico, causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* vem deixando produtores citrícolas de quaisquer regiões do Brasil preocupados. Outra cultura relevante para o setor agropecuário é o milho, recentemente foi identificado um aumento da incidência da estria bacteriana nas regiões Oeste e Centro-Oeste do Paraná, doença que é causada pelo patógeno *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Pelo fato da fácil disseminação dessas bactérias e de não apresentarem métodos eficazes de controle, a estria bacteriana e o cancro cítrico necessitam de maiores conhecimentos do seu agente causal. Para evitar prejuízos, o conhecimento da exigência nutricional e escolha de um meio de cultura eficiente para o desenvolvimento das bactérias, é imprescindível para estudos in vitro, por isso o objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho de três diferentes meios de cultura, o meio Nutriente-Ágar (NA), o meio de cultura Manitol Glutamato Yeast (MGY), e o meio Yeast Dextrose Carbonate (YDC). Foi feito a contagem do número total de colônias e mensurado o diâmetro delas em cada placa durante 6 dias, os dados foram analisados através do programa estatístico Sisvar 5.6. Apenas o meio YDC não se mostrou eficiente no cultivo da estirpe Xcc 306 e do isolado RL1. Os demais meios permitiram um desenvolvimento bacteriano satisfatório, sendo o meio MGY, o que apresentou maior diâmetro de colônias do isolado RL1 em sua superfície.

Introdução

Atualmente as mudanças climáticas têm causado uma séria ameaça para a agricultura, não há dúvidas que o ambiente influencia diretamente no crescimento, severidade das doenças e suscetibilidade das plantas hospedeiras. Entretanto, outro fator também tem prejudicado cada vez mais as áreas agrícolas do país em diversas culturas, a disseminação de patógenos do gênero *Xanthomonas*. Uma das doenças mais severas no é o

Cancro Cítrico, causado pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, afetando drasticamente a citricultura. Da mesma maneira que outras bactérias, a do cancro cítrico penetra no hospedeiro por aberturas naturais, com temperatura ótima de crescimento de 25°C a 30°C, apresentam colônias lisas, viscosas e geralmente, amarelas. Na cultura do milho, a estria bacteriana do milho causada pela *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, gera preocupação nos produtores devido a sua disseminação que é feita através do vento, água da chuva e provavelmente por água de irrigação (BRODERS, 2017). Devido a inexistência de métodos eficazes de controle, as doenças requerem maiores conhecimentos sobre o seu agente causal. Por isso o objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho de diferentes meios de cultura, o meio Yeast Dextrose Carbonate (YDC), o meio Nutriente-Ágar (NA) e o meio de cultura Manitol Glutamato Yeast (MGY), no crescimento de duas bactérias, a estirpe Xcc 306 e o isolado RL1 a fim de facilitar os estudos in vitro e aumentar o conhecimento das características de cada patógeno.

Materiais e métodos

O experimento foi conduzido em laboratório no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), pertencente a Universidade Estadual de Maringá (UEM). A estirpe da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizada para avaliação, foi a Xcc 306, causadora do cancro cítrico em citros e para a *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causadora da estria bacteriana na cultura do milho, foi o isolado RL1, ambas preparadas em tampão fosfato (0,075M, pH 7,0), ajustado a 10^8 unidades formadoras de colônia/mL com o auxílio de um espectrofotômetro ajustado para leitura a 630 nm (BELASQUE JR.; JESUS JR. et al. 2006). Foi utilizado três diferentes meios de cultura para avaliar o crescimento das espécies bacterianas, o meio de cultura Nutriente-Ágar (NA), o meio de cultura Manitol Glutamato Yeast (MGY), e o meio Yeast Dextrose Carbonate (YDC). Todos foram autoclavado à 121°C e 1 atm por 20 minutos e vertidas em placas de Petri. A partir da suspensão bacteriana já ajustada, uma alíquota de 25µL foi transferida para micro tubos contendo 250µL de solução salina, sendo repetido por sete vezes. Com as diluições realizadas, a partir do sétimo micro tubo uma alíquota de 25 µL da suspensão bacteriana foi transferida para as placas de Petri contendo os meios de cultura selecionados. Essas placas foram incubadas em estufa à 28°C e as avaliações foram conduzidas, baseadas e adaptadas a partir dos estudos de Nocchi (2014), onde tivemos as avaliações nos tempos 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após semeadura (HAS) da bactéria nas placas. Para cada tratamento são realizadas 3 repetições. Os parâmetros analisados quanto à cor, viscosidade e formato são feitos a olho nu. Além disso é mensurado o diâmetro de 10 colônias por placa, com o auxílio de um paquímetro e feito a contagem do número total de colônias em cada placa. A mensuração dos diâmetros das colônias e a quantidade foi comparada por análise de variância (teste F) e teste de médias Scott-Knott a 5% de

significância. Os outros parâmetros de cor, formato e viscosidade diluída em 1,5µL de água destilada, foram visualmente avaliados.

Resultados e Discussão

Os números e os diâmetros de colônias por placa mensurados foram inseridos no programa estatístico SISVAR 5.6, que geraram resultados satisfatórios e condizentes com a literatura. O meio de cultura MGY teve os números de colônias igualados estatisticamente com o meio Nutriente-Ágar (NA), no entanto o número de colônias para as duas bactérias foi o menor em meio YDC (tabela 1 e tabela 2).

Tabela 1: Média dos diâmetros e colônias mensurados do isolado RL1 em cada meio cultura.

Tratamentos	Médias dos diâmetros Isolado RL1	Médias de colônias Isolado RL1
YDC	0,429167 a1	2,166667 a1
NA	0,855333 a2	52,194444 a2
MGY	1,309833 a3	253,027778 a3

*médias seguidas pelo mesmo número não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Tabela 2: Média dos diâmetros e colônias mensurados da estirpe Xcc 306 em cada meio cultura.

Tratamentos	Média de diâmetro XCC	Análise de contagem XCC
YDC	0,972500 a1	0,722222 a1
NA	1,845833 a2	56,916667 a2
MGY	2,044667 a2	68,055556 a2

*médias seguidas pelo mesmo número não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

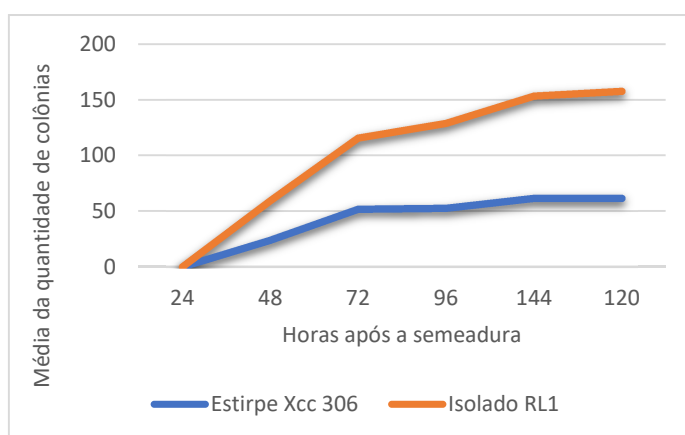


Gráfico 1: Média da quantidade de colônias em relação ao tempo de semeadura.

Quanto ao diâmetro das colônias, em todos os períodos de avaliação, pode-se observar diferenças significativas em seus tamanhos, porém a estirpe Xcc 306 diferiu-se apenas no meio YDC, com valores abaixo da média. Já as médias dos diâmetros do isolado RL1, foram diferentes nos 3 meios de

cultura, se destacando apenas no meio de cultura MGY com a maior média de diâmetro (1,30 cm). O tempo ótimo para avaliação das colônias das duas bactérias, foram em 72 horas, o que corresponde ao período em que as células iniciam seu processo de divisão atingindo um tempo de geração constante e de maior atividade metabólica da célula (gráfico 1). As características qualitativas quanto a cor diferenciou apenas no meio YDC, que por ser um meio opaco e de cor creme, destaca o amarelo das colônias bacterianas, sendo este o meio em que as colônias foram mais facilmente observadas quanto às suas características, entretanto não tiveram crescimento na maioria das repetições. Já nos demais meios de cultura, as colônias seguiram o padrão, cor amarela pálida. A coloração amarelada é derivada da xantomonadina, um pigmento amarelo que é ligado a membrana do patógeno (BÜTTNER; BONAS, 2010). Todas as colônias do isolado RL1 e da estirpe Xcc 306 se mantiveram com aspecto mucoide e forma circular com superfície convexa por todo o período de avaliação.

Conclusões

Considerando todos os aspectos de eficiência para um meio de cultura, o meio NA é o mais indicado para ser utilizado para isolamento e manutenção da *Xanthomonas citri subsp. citri* e da *Xanthomonas vasicola pv. vasculorum*, devido ao alto desenvolvimento em grande número de colônias. Contudo, o meio MGY também se fez eficiente permitindo que a estirpe Xcc 306 e o isolado RL1 tivesse um progresso quanto ao tamanho das colônias.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa contemplada e aos integrantes do NBA por todos os ensinamentos.

Referências

- BELASQUE, JR., J.; JESUS JR., W. C. Concentração de inóculo de métodos de inoculação de *Xanthomonas axonopodis pv. citri*. **Laranja**, v. 27, p. 263-272, 2006.
- BRODERS, K. Status of bacterial leaf streak of corn in the United States. In: INTEGRATED CROP MANAGEMENT CONFERENCE. **Proceedings**, Iowa: ICM, 2017.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 34, p. 107-133, 2010.
- LEITE JUNIOR, R. P. et al. Estría Bacteriana do Milho no Paraná. **INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ**, v. 160, p. 9, 2018.
- NOCCHI, P.T.R. Estudo da diversidade genética de *Xanthomonas citri subsp. citri* e avaliação de meios de cultivo. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Estadual de Maringá, UEM, p.104, 2014.