

AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Xanthomonas* SOB ESTRESSE SALINO E OXIDATIVO.

Gabriela Bissoli Silva (PIBIC/CNPq/UEM), Priscila Rosseto (Doutoranda), 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: Bactérias fitopatogênicas, Defesa vegetal, *Xanthomonas*.

Resumo:

Um dos fatores que interfere diretamente a produção agrícola é a ocorrência de doenças, limitando a produtividade e consequentemente causando prejuízos à economia. Entre as culturas, destaca-se a cultura dos citros e do milho, na qual ambas detêm valores econômicos exponenciais para o Brasil. As bactérias são um grupo importante de fitopatógenos que causam prejuízo a culturas importantes no país. Na citricultura resalta-se o cancro cítrico, cujo agente causal é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Para a cultura do milho, a preocupação recente é com a bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, que causa a estria bacteriana do milho. Diante disso, o objetivo foi avaliar o crescimento destas duas espécies do gênero *Xanthomonas* sob estresse salino, induzindo por NaCl e a sobrevivência sob estresse oxidativo, induzido por H₂O₂. Para crescimento em estresse salino, utilizou-se as concentrações de 0, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,75 e 1M de NaCl. Para sobrevivência sob estresse oxidativo as concentrações foram: 5, 10, 20 e 30 mM de H₂O₂. Os resultados mostraram que, para ambas as bactérias, houve crescimento sob estresse salino até a concentração de 0,35M, com diferença estatística entre as concentrações. Para avaliação do agente oxidante houve sobrevivência apenas nas concentrações de 5 e 10 mM, com disparidade estatística entre as duas concentrações. Ambas as bactérias se mostraram sensíveis sob estresse, reduzindo drasticamente o seu crescimento e sobrevivência.

Introdução

O gênero *Xanthomonas* é um dos grupos mais importantes de bactérias fitopatogênicas, causando doenças em culturas economicamente relevantes. Tal como a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causadora do cancro cítrico, que afeta os pomares comerciais de citros, e a *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causadora da estria bacteriana do milho, doença recente alvo de preocupação pelos produtores. As bactérias contam com a formação do biofilme nas superfícies das folhas o qual aumenta a resistência da bactéria sob diferentes estresses ambientais e desempenha um papel importante nas fases iniciais da infecção do hospedeiro. De acordo com Barcarolo et al., 2019, o estresse salino induz um complexo de mudanças no proteoma de *Xanthomonas*, capaz de alterar a abundância de componentes T3SS, sistema responsável pela patogenicidade da bactéria.

Já a planta detém um mecanismo de defesa conhecido como estresse oxidativo, na qual se inicia a produção de espécies ativas de oxigênio (EROs) (AMORIM et al., 2018). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é a principal espécie ativa de oxigênio que pode funcionar diretamente como moléculas na indução de genes de defesa e inibir o desenvolvimento da doença (LUKASIK et al., 2012). Com o intuito de reduzir os ambientes propícios para o desenvolvimento das bactérias, melhorar as medidas preventivas e desenvolver estratégias de controle, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento das bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* sob estresse salino, induzido por cloreto de sódio (NaCl) e comparar a capacidade de sobrevivência destas bactérias ao estresse oxidativo, induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Materiais e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), na Universidade Estadual de Maringá. Para as avaliações foram utilizadas duas espécies do gênero *Xanthomonas*: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (isolado Xcc 306) e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (isolado RL1). As bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura nutriente-ágar e acondicionadas por 72 horas a 28°C em estufa bacteriológica. Após esse período o inóculo foi preparado em tampão fosfato salino (pH 7,0) e ajustado a 10^8 unidades formadoras de colônia/mL (BELASQUE JR.; JESUS JR., 2006) com auxílio de um espectrofotômetro ajustado para leitura a 600 nm. A diluição seriada foi realizada e a partir do sétimo micro tubo uma alíquota de 25 μ L da suspensão bacteriana foi transferida para as placas de Petri contendo os meios de cultura suplementados com cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações de 0, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,5, 0,75 e 1 M, e acondicionadas na estufa bacteriológica de acordo com Bacarolo et al. (2019). O crescimento foi avaliado pela contagem do número total de colônias em cada placa e média do diâmetro das colônias, após 72 horas de semeadura.

A avaliação da taxa de sobrevivência das bactérias ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi realizada de acordo com Tondo et al. (2010). Transferiu-se uma alíquota de 25 μ L para o meio de cultura Nutriente-Ágar (NA) e armazenadas em estufa bacteriológica por 72 horas. Após este período, as colônias foram contadas e, posteriormente, foi adicionado H_2O_2 às culturas nas concentrações de 5, 10, 20 e 30mM por 15 minutos. Após a exposição ao oxidante, as amostras foram lavadas uma vez com tampão PBS. As colônias foram retiradas dos meios de cultura, diluídas 7 vezes e uma alíquota de 25 μ L foi transferida para meio NA e novamente incubadas por 72 horas. Para cada avaliação foram realizadas 12 repetições. Para a avaliação de crescimento sob estresse salino, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Nemenyi para comparação múltipla dos tratamentos, usando nível de significância de 5%. Já a avaliação da porcentagem de sobrevivência ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi definida como o número de unidade formadoras de colônia (UFC) após os tratamentos dividido pelo número de UFC antes do tratamento x100.

Resultados e Discussão

As bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* apresentaram um declínio na média de quantidade das colônias e diâmetro como demonstra a tabela 1. Para Barcarolo et al., (2019), alguns dos processos bacterianos associados à aptidão bacteriana e virulência foram modificados sob condições de estresse salino, reduzindo em 17% do diâmetro da Xcc quando expostos a 0,25M de NaCl. Entretanto, as médias de diâmetro e crescimento da Xcc, se diferenciaram, do controle a partir da concentração de 0,20M. Já para a Xvv, houve diferença estatística significativa nos diâmetros a partir de 0,25M e para a quantidade de colônias a partir de 0,20M. Ambas as bactérias não tiveram crescimento nas concentrações de 0,40, 0,45, 0,5, 0,75 e 1 M.

Tabela 1 – Média dos diâmetros e colônias mensurados da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) nos tratamentos com suplementação de 0, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,75 e 1M.

Tratamento	Média dos diâmetros XCC	Média dos diâmetros XVV	Médias de colônias XCC	Médias de colônias XVV
0,00	1,5283 ^a	1,2338 ^a	275,7500 ^a	299,0833 ^a
0,20	1,3067 ^{ab}	1,1568 ^a	239,0833 ^{ab}	110,2500 ^{ab}
0,25	1,2267 ^{ab}	1,0297 ^{ab}	116,1667 ^{ab}	67,0000 ^{abc}
0,30	0,9608 ^{bc}	0,5565 ^{abc}	95,3333 ^{ab}	24,1667 ^{bc}
0,35	0,5350 ^c	0,2887 ^{bc}	66,7500 ^{bc}	8,6667 ^c
0,40	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c
0,45	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c
0,50	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c
0,75	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c
1,00	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c	0,0000 ^c

*Os números seguidos de letras distintas diferem entre si, usando nível de significância de 5% pelo teste de Nemenyi.

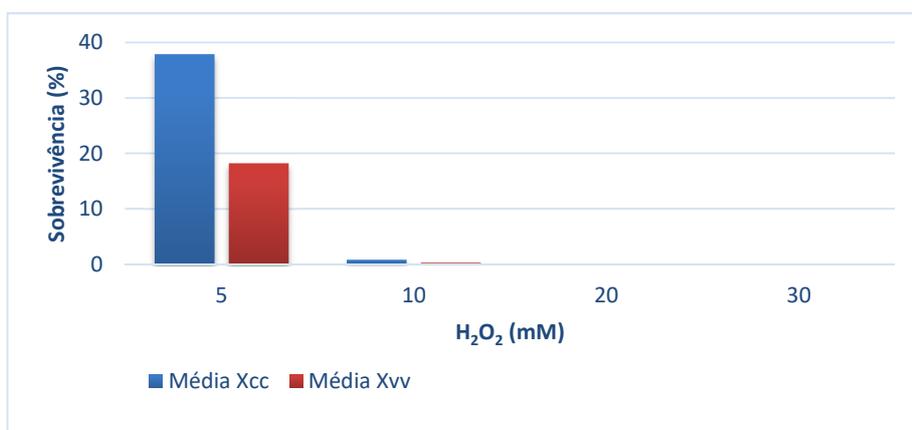


Figura 1- Taxa de sobrevivência da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

A exposição das bactérias ao peróxido de hidrogênio levou a uma baixa sobrevivência nas concentrações de 5 e 10mM, e nenhum crescimento em concentrações acima de 20mM, como mostra a figura 1. O que difere dos resultados de Tondo et al., (2010), o qual houve uma resistência ao estresse oxidativo, com 95% de sobrevivência após a adição de 5 mM de H₂O₂ e 40% de sobrevivência após tratamento com 30 mM de H₂O₂. Os índices de sobrevivência da Xcc na concentração de 5mM foram de 37,87% e de 0,83% para 10mM, também sendo contraditório aos resultados de Barcarolo et al., (2019), que obteve apenas 11% de sobrevivência concentração de 5mM. A taxa média de sobrevivência ao H₂O₂ para a Xvv foi de 18,24% na concentração de 5mM e para a concentração de 10mM a taxa média foi de 0,83%, como mostra a figura 1.

Conclusões

Os dados mostraram que o crescimento das bactérias em estudo é afetado concomitante ao aumento nas concentrações de NaCl. Há redução na quantidade e tamanho das colônias. As bactérias apresentaram crescimento até a concentração de 0,35M. Quando expostas ao agente oxidante H₂O₂ as bactérias apresentaram baixas taxas de sobrevivência, sendo *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* mais sensível ao agente, com taxa de sobrevivência ainda mais baixa que *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa contemplada e aos integrantes do NBA pelos ensinamentos.

Referências

- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. Volume 1 - Princípios e Conceitos. 5ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. Ouro Fino - MG. 2018.
- BARCAROLO, M. V. GARAVAGLIA, B. S. THOMAS, L. MARONDEDZE, C. GEHRING, C. GOTTIG, N. OTTADO, J. Proteome changes and physiological adaptations of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under salt stress and their implications for virulence. **FEMS Microbiology Ecology**, 95, 2019. doi: 10.1093/femsec/fiz081
- 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.
- ŁUKASIK, I.; GOŁAWSKA, S.; WÓJCICKA, A. Effect of cereal aphid infestation on ascorbate content and ascorbate peroxidase activity in triticale. **Polish Journal of Environmental Studies**, v.21, p.1937-1941, 2012.
- TONDO, María Laura et al. The monofunctional catalase KatE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is required for full virulence in citrus plants. **PLoS one**, v. 5, n. 5, p. e10803, 2010.