



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri*

Samuel dos Anjos Souza

Pedro Bonato

Regina Lúcia Baldini

Universidade de São Paulo

samuel.dos.anjos@usp.br

Objetivos

Este projeto visa caracterizar fenótipos relacionados à patogenicidade de isolados de *Xanthomonas citri* (XAC) provenientes de diferentes lugares do Brasil, utilizando ensaios microbiológicos e bioquímicos de isolados recentes e virulentos desta bactéria¹. Assim, foram realizados ensaios para a detecção de motilidade, formação de biofilme, capacidade de crescimento em diferentes meios e a possibilidade de transformação por vetores plasmidiais comumente usados no laboratório, a fim de selecionar novos modelos, diferentes de XAC 306.

Métodos e Procedimentos

Para as análises fenotípicas dos diferentes isolados as culturas de *Xanthomonas citri* foram cultivadas em meio NYG a 30°C e mantidas em estoques com 20% glicerol em ultrafreezer. Primeiro, o crescimento destes isolados foi analisado em três diferentes meios, NYG (5 g/L peptona, 3 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicerol), 2xTY (16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura, 5 g/L cloreto de sódio) e LB sem a adição de cloreto de sódio (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 30 g/L ágar, pH 7,5), sob agitação constante e temperatura ideal de crescimento da bactéria em 30°C.

Posteriormente, realizou-se ensaios de motilidade tipo *sliding* e tipo *twitching*, este, dependente de pilus tipo IV², os quais foram analisados pela medida da área ocupada na placa.

Também foram realizados ensaios de transformação plasmidial por eletroporação, na qual se inseriu o plasmídeo pBBR-GFP³. Este confere à XAC resistência ao antibiótico gentamicina e possui gene que codifica GFP (*Green Fluorescent Protein*).

O ensaio de formação de biofilme foi realizado em meio NYG e ambiente úmido, deixando placas de 24 poços estáticas a uma temperatura constante por 5 dias. Por fim, os isolados foram analisados por microscopia de transmissão eletrônica (TEM).

Resultados

Foi possível observar diferenças significativas entre os isolados analisados em determinados ensaios.

Na curva de crescimento em meio NYG, foi observada que em uma temperatura de 32,6°C e 32,8°C, no período de 24 horas apenas MAN4 não entra na fase de morte.

Na motilidade tipo *twitching*, observou-se que quatro dos isolados, GAP4, MOG24, ITA76 e CAJ59, apresentam halo menor, indicando menor motilidade. Na motilidade *sliding*, AM30 possui uma maior motilidade, o que pode indicar uma maior produção de goma xantana

ou diferenças no LPS (lipopolissacarídeos)⁴, observada pela área de espalhamento, em relação ao modelo 306. GAP4, CAS74 e ITA76 possuem menor motilidade.

A transformação foi bem sucedida em sua maioria, porém não foi possível inserir o plasmídeo em um dos isolados, NA28, mesmo alterando as condições da transformação, tal como concentração do plasmídeo.

Finalmente, o ensaio de formação de biofilme demonstrou GAP4 e MAN6 com uma maior formação do que 306, porém MAN4 apresentou menor formação.

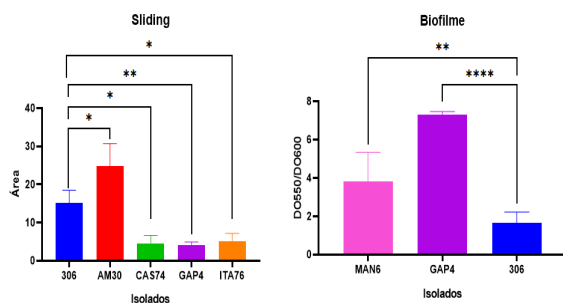


Figura 1: Gráficos motilidade *Sliding* e formação de biofilme

Conclusões

Até o momento, pode-se destacar que parte dos isolados podem não ser bons candidatos a organismo modelo, uma vez que apresentaram motilidade e produção de biofilme baixas em relação ao atual modelo, XAC 306.

Enquanto isso, isolados como AM30 e MAN6, possuíram apenas destaques positivos, o que pode indicar uma maior virulência, podendo-se realizar mais estudos para que estes ocupem a posição como novo modelo a ser estudado em laboratório.

Porém, GAP4 se destacou de ambas as formas, com menores motilidades, mas maior formação de biofilme, o que o torna um objeto de estudo interessante, porém não necessariamente mais virulento.

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Samuel dos Anjos foi responsável por todos os ensaios e planejamentos

realizados até então, sob supervisão dos demais colaboradores. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Agradecimentos

Agradeço o apoio financeiro da USP pelo Processo Unificado de Bolsas (PUB), ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) e ao Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão em Biologia de Bactérias e Bacteriófagos (CEPID B3).

Referências

1. Zamunér et al. Microb Genomics. janeiro de 2025.
2. Dunger, et al Mol. Plant-Microbe Interactions 27, 1132–1147 (2014).
3. Oka GU. Universidade de São Paulo; 2017 [citado 14 de março de 2025]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-14122017-111951/>
4. Harshey RM. Annu Rev Microbiol. 2003;57:249–73.