

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRO-REITORIA DE GRADUAÇÃO
ESCOLA POLITÉCNICA E DE ARTES
CURSO DE AGRONOMIA**

**TESTE DE VIABILIDADE DE ACESSO PARA *Xanthomonas spp.*
e *Colletotrichum lindemuthianum* SUBMETIDOS AO
PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO**

YARA JESSIE ALVES FERREIRA

Goiânia

2023

YARA JESSIE ALVES FERREIRA

**TESTE DE VIABILIDADE DE ACESSO PARA *Xanthomonas spp.*
e *Colletotrichum lindemuthianum* SUBMETIDOS AO
PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO**

Artigo apresentado como requisito parcial para composição de média final na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do curso de graduação em Agronomia, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, PUC-Goiás.

Orientador: Profa. MSc. Ana Maria da Silva Curado Lins.

Co-Orientadora: Dra Adriane Wendland Ferreira.

Goiânia

2023

YARA JESSIE ALVES FERREIRA

**TESTE DE VIABILIDADE DE ACESSO PARA *Xanthomonas spp.*
e *Colletotrichum lindemuthianum* SUBMETIDOS AO
PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO**

BANCA EXAMINADORA

MSc. Ana Maria da Silva Curado Lins
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

MSc Flávio Gonçalves de Oliveira Filho
Universidade Federal de Goiás

Dra. Roberta Paula de Jesus
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Aprovada em ___/___/___.

Dedico:

A Deus, a sublime fonte da sabedoria.

À memória amorosa de minha mãe, que com zelo e carinho eterno iluminou meu caminho.

Ao Brenno, Simon e Ricardo, meus irmãos, cujo apoio e motivação singular sempre foram faróis a guiarme na jornada da vida.

AGRADECIMENTOS

À dedicada professora MSc. Ana Maria Curado Lins, pela orientação, sabedoria, dedicação e incentivo, sendo compreensiva em todas as etapas deste percurso.

Expresso minha profunda gratidão à Dra. Adriane Wendland por sua orientação notável, além de providenciar integralmente o material de trabalho essencial e ceder os agentes fitopatogênicos, contribuindo de maneira substancial para a condução deste estudo. Agradeço também pela valiosa oportunidade concedida para desenvolver minhas atividades no laboratório de fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão.

À professora Dra. Roberta Paula de Jesus e ao Msc. Flávio Gonçalves de Oliveira Filho, agradeço pela colaboração valiosa e por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, pelo espírito colaborativo, amizade e convivência excepcional, em especial a Kamilla Rasmussem, Rodrigo Fernandes e Andressa Almeida pela prestatividade.

Aos professores da PUC Goiás, expresso minha gratidão pela paciência e dedicação, proporcionando o melhor de si na nossa formação.

À minha avó, cujas orações, amor e carinho foram alicerces essenciais. Sem sua presença, nada disso seria possível.

Aos tios Flavio Machado e Wanessa Lorena, meu reconhecimento pelo constante estímulo a buscar o melhor e por acreditarem que era possível.

Com carinho, agradeço aos professores Dr. Luiz Carlos Barcelos, Dra. Martha Nascimento Castro e Dra. Luciana Casaletti, que se doaram dentro e fora

de sala de aula, buscando extrair o melhor de mim. Até breve, agora como colegas de profissão.

Aos amigos e colegas que tornaram estes últimos cinco anos mais leves, meu sincero agradecimento pelo apoio e companheirismo.

E finalmente a mim mesma, por encarar esse desafio acadêmico com ousadia e acreditar na possibilidade de sair ilesa e enriquecida desta jornada.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1 - Sintomas de cretamento-bacteriano-comum nas folhas (1A), vagens (1B) e sementes (1C) Fonte: Adriane Wendland 10
- Figura 2 - Sintomas de antracnose em feijão presente nas folhas (2A), vagens (2B) e sementes (2C). Fonte: Embrapa, 2019..... 11
- Figura 3 - Esquema de liofilização *Xanthomonas spp.*: (A) Cultivo em meio de cultura; (B) crescimento de colônias após incubação em B.O.D; (C) Transferência a fim de purificação da amostra; (D). Adição da amostra do isolado em 150 µl de solução crioprotetora; (E) Criopreservação; (F) Liofilização; (G) reidratação da amostra; (H). Teste de integridade das células; (I) Fitopatógeno recuperado em meio de cultura. Fonte: Autor..... 17
- Figura 4 - Esquema de liofilização para *C. lindemuthianum*: (A) Cultivo em meio de cultura; (B) Crescimento de colônias após incubação; (C) Transferência de bloco de meio de cultura com micélio; (D) Colônias cultivadas sobre filtro; (E) Adição da amostra em solução crioprotetora; (F) Criopreservação; (G) Liofilização; (H) Reidratação da amostra; (I) Teste de integridade das células; (J) Fitopatógeno recuperado em meio de cultura. Fonte: Autor 20

TABELAS

- Tabela 1 - Isolados de *Xanthomonas spp.* utilizados para o cultivo e posteriormente submetidos ao processo de liofilização..... 14

Tabela 2 -	Tabela 2 – Agentes crioprotetores empregados na condução do experimento.....	15
Tabela 3 -	Variação dos intervalos de recuperação dos isolados pós liofilização. (T1 - 0 dias, T2– 20 dias, T3 - 40 dias).....	16
Tabela 4 -	Isolados de <i>C. lindemuthianum</i> empregadas no cultivo para posterior liofilização.....	18
Tabela 5 -	Variação dos intervalos de recuperação dos isolados pós liofilização (T1 - 0 dias, T2– 20 dias, T3 - 40 dias).....	19
QUADROS		
Quadro 1 -	Cultivo de <i>Xanthomonas spp.</i> em meio Agar Nutriente, posterior ao processo de preservação e reidratação em solução crioprotetora, nos tempos de avaliação previamente estipulados em T1, T2 e T3.....	21
Quadro 2 -	Cultivo de <i>C. lindemuthianum</i> em meio BDA, posterior ao processo de preservação e reidratação em solução crioprotetora, nos tempos de avaliação previamente estipulados em T1, T2 e T3.....	23

Sumário

RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 <i>Xanthomonas spp</i>	9
3.2 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	10
3.3 Processo de liofilização como método de preservação celular.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Cultivo de <i>Xanthomonas spp</i>	14
4.1.1 Formulação e adição das soluções crioprotetoras.....	15
4.1.2 Criopreservação e liofilização de <i>Xanthomonas spp</i>	15
4.1.3 Recuperação dos isolados de <i>Xanthomonas spp</i>	16
4.2 Cultivo de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	18
4.2.1 Criopreservação e liofilização de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	18
4.2.2 Recuperação dos isolados de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1 Avaliação dos tratamentos para <i>Xanthomonas spp</i>	21
5.2 Avaliação dos tratamentos para <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	22
6. CONCLUSÃO	25
REFERENCIAS	26

TESTE DE VIABILIDADE DE ACESSO PARA *Xanthomonas spp.* e *Colletotrichum lindemuthianum* SUBMETIDOS AO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO

VIABILITY TESTING OF *Xanthomonas spp.* and *Colletotrichum lindemuthianum* SUBMITTED TO THE FREEZE-DRYING PROCESS

Yara Jessie Alves Ferreira

Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Escola Politécnica e de Artes, Goiânia, Go, Brasil.

RESUMO

Xanthomonas spp. e *Colletotrichum lindemuthianum*, destaca a urgência de métodos eficazes de conservação a longo prazo diante de ameaças fitopatogênicas em constante evolução. Tais estratégias são essenciais para preservar a viabilidade e integridade desses microrganismos, promovendo avanços na pesquisa agrícola para o enfrentamento de desafios em culturas de grande importância econômica. Este estudo investiga a viabilidade pós-liofilização de *Xanthomonas spp.* e *C. lindemuthianum*, concentrando-se na sobrevivência e manutenção de características celulares originais. Seis crioprotetores (cloreto de sódio, sacarose, frutose, lactose, maltodextrina e manitol a 59 mol) foram testados. Vinte e quatro isolados (doze de cada espécie) foram estudados com diferentes períodos de armazenamento (tempo I - 0 dias, tempo II - 15 dias, tempo III - 40 dias). Resultados indicaram manutenção da viabilidade para *Xanthomonas spp.*, com ligeiro atraso no crescimento usando frutose como crioprotetor. *C. lindemuthianum* apresentou resultados satisfatórios na liofilização, exceto com cloreto de sódio como crioprotetor, causando disparidade no crescimento possivelmente devido à alta salinidade.

Palavras-chave: Fungo, Bactéria, Liofilização.

ABSTRACT

Xanthomonas spp. and Colletotrichum lindemuthianum highlight the urgent need for effective long-term conservation methods in the face of constantly evolving phytopathogenic threats. Such strategies are crucial to preserve the viability and integrity of these microorganisms, fostering advancements in agricultural research to address challenges in economically significant crops. This study investigates the post-lyophilization viability of Xanthomonas spp. and C. lindemuthianum, focusing on the survival and maintenance of original cellular characteristics. Six cryoprotectors (sodium chloride, sucrose, fructose, lactose, maltodextrin, and mannitol 59 mol) were tested. Twenty-four isolates (twelve of each species) underwent examination with different storage periods (Time I - 0 days, Time II - 15 days, Time III - 40 days). Results indicated maintained viability for Xanthomonas spp., with a slight growth delay using fructose as a cryoprotector. C. lindemuthianum exhibited satisfactory lyophilization results, except with sodium chloride as a cryoprotector, causing growth disparities, possibly due to high salinity.

Keywords: Fungus, Bacteria, Freeze-drying.

1. INTRODUÇÃO

As doenças do feijoeiro apresentam desafios significativos para a produção agrícola, com *Colletotrichum lindemuthianum* (*C. lindemuthianum*) e *Xanthomonas spp.* surgindo como patógenos de destaque. *C. lindemuthianum* é o agente causal da antracnose do feijoeiro, uma doença que afeta folhas, vagens e sementes, resultando em manchas necróticas e deformações, comprometendo a qualidade e o rendimento das safras. *Xanthomonas spp.* é responsável pelo crestamento-bacteriano do feijoeiro, doença que afeta as partes aéreas da planta, iniciando-se nas folhas com manchas úmidas na face inferior, formando extensas áreas necrosadas com lesões avermelhadas e alongadas, nas vagens surgem manchas encharcadas que podem se estender ao sistema vascular, indicando a progressão da bactéria para as sementes (WENDLAND, A et al., 2014)

Ambas as doenças têm o potencial de causar consideráveis prejuízos econômicos e desafios na produção de feijão, tornando imperativa a investigação de estratégias de preservação e conservação de microrganismos relacionados a esses patógenos, para o desenvolvimento de métodos eficazes de controle e manejo fitossanitário (FORTI et al., 2016).

Nesse cenário, a conservação e pesquisa de recursos genéticos microbianos emergem como importantes elementos para o avanço científico na agricultura. Microrganismos desempenham um papel essencial na sustentabilidade agrícola, especialmente em regiões tropicais. A preservação desses microrganismos em coleções especializadas, como os bancos de germoplasma, não apenas contribui para a diversidade genética essencial à agricultura, mas também assume uma importância estratégica na compreensão e enfrentamento das doenças do feijão. Ao investigar e conservar microrganismos relacionados a *C. lindemuthianum* e *Xanthomonas spp.*, estaremos fortalecendo não apenas a base científica, mas também as estratégias de manejo e controle fitossanitário para promover a resiliência das culturas de feijão diante dessas ameaças fitopatogênicas (COSTA et al., 2009)

A preservação dos membros da diversidade microbiológica é essencial para a conservação, identificação, disponibilização e produção de conhecimento (SMITH et al., 2012). Assegurar a preservação desses membros é fundamental

para manter a pureza, estabilidade e características originais, desempenhando um papel crucial na sustentabilidade agrícola. Esse cuidado não apenas favorece o desenvolvimento de bioinsumos, controle de pragas e doenças, promoção do crescimento de plantas e saúde do solo, mas também destaca a importância da pesquisa científica na busca por métodos eficazes de preservação e conservação de microrganismos (CANHO et al., 2004).

A liofilização, apontada como um processo de secagem amplamente utilizado, transcende a simples manutenção da viabilidade, contribuindo para a estabilidade e pureza ao longo do tempo. Este método consiste na retirada de água das células por meio do congelamento da amostra seguido da sublimação do gelo sob pressão reduzida (CORRÊA, 2013). A eficácia da liofilização não apenas garante a longevidade dos isolados microbianos, mas também assegura a manutenção de coleções e bancos de germoplasma, promovendo a preservação a longo prazo de microrganismos essenciais para a pesquisa e a sustentabilidade agrícola (CANHO et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar a viabilidade das células de *Xanthomonas spp.* (*Xanthomonas spp.*) e *Colletotrichum lindemuthianum* (*C. lindemuthianum*) submetidos ao processo de liofilização.

2.2 Específicos

Testar as soluções Cloreto de sódio 59 mol, sacarose 59 mol, frutose 59 mol, lactose 59 mol, maltodextrina 59 mol e manitol 59 mol, como método crioprotetor.

Avaliar a viabilidade celular em resposta a diferentes intervalos de ressuspensão do isolado.

Analisar a integridade morfológica e estrutural após a liofilização.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Do ponto de vista socioeconômico, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) assume um papel de destaque na composição alimentar de praticamente todas as esferas sociais no Brasil. Devido a sua densidade proteica, aliada ao custo relativamente acessível, conferem-lhe relevância como alimento primordial para as camadas sociais de menor poder aquisitivo (DA SILVA et al., 2018).

Ao longo da história, a leguminosa emerge como um elemento central na alimentação e também da produção agrícola brasileira, destacando papel cultural significativo em diversas cozinhas do país e ao redor do mundo (SILOCHI et al., 2021). Conforme dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (IBGE, 2023), a produção nacional de feijão atinge a marca de 3,1 milhões de toneladas, distribuídas entre suas três safras, sendo a 1ª safra responsável por 35,9% do total, a 2ª safra contribuindo com 42,8%, e a 3ª safra representando 21,3%. Este cenário atesta a significativa relevância do feijão no contexto agrícola e alimentar do país.

A cultura do feijoeiro é suscetível a diversos patógenos que desencadeiam doenças, resultando em perdas significativas na produção (CANALE et al., 2020). Mesmo com a implementação de práticas de manejo apropriadas, estima-se que as perdas no rendimento do feijão cheguem a 15%, sendo causadas por doenças de natureza fúngica, bacteriana e viral (MENTEN, 2006). As doenças bacterianas, em particular, provocam danos fitopatológicos e agrônômicos de magnitude, afetando de forma mais acentuada países tropicais, como é o caso do Brasil, onde fatores técnicos, climáticos, históricos, políticos e econômicos convergem para tal cenário (MOUSINHO et al., 2008).

Dentre os principais agentes patogênicos que afetam a cultura do feijoeiro comum em regiões produtoras de importância incluem *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (*Xap*) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *Fuscans* (*Xff*), responsáveis pelo Crestamento Bacteriano Comum, causando elevados prejuízos na produção, especialmente durante a safra das "águas", período em que as condições ambientais propiciam o florescimento da doença e a disseminação dos patógenos (TORRES et al., 2009). Também se destaca o *Colletotrichum*

lindemuthianum causador de antracnose no feijão, uma doença cosmopolita, ocorrendo em locais de temperatura baixa a moderada e alto índice de umidade, sendo muito problemática em regiões de clima temperado e subtropical (WENDLAND, A et al.,2018).

3.1 *Xanthomonas spp.*

Vários são os microrganismos que interferem na produção agrícola. Entre esses a *Xanthomonas spp.* uma bactéria gram-negativa, amplamente conhecida por seu papel fitopatogênico, é responsável por causar doenças em diversas culturas agrícolas, sendo a de maior importância na cultura do feijoeiro causando o crestamento bacteriano (SARTORATO et al.,1996)

O mecanismo de infecção de *Xanthomonas spp.* é complexo e envolve a produção de enzimas e toxinas que permitem a colonização bem-sucedida das plantas hospedeiras. Além disso, a bactéria utiliza estratégias para evitar a resposta de defesa das plantas, o que torna seu controle desafiador (RIBEIRO, 2018).

Manifesta seus efeitos principalmente nas partes aéreas das plantas (Figura 1A), a infecção tem início nas folhas, manifestando-se por pequenas manchas úmidas na face inferior. Estas manchas aumentam em tamanho, agregando-se para formar extensas áreas pardas e necrosadas. De maneira que na interseção entre as áreas necrosadas e os tecidos saudáveis, surge um halo amarelado (WENDLAND, 2021).

As manchas, caracterizadas por uma tonalidade avermelhada e uma forma alongada, estendem-se ao longo das hastes. Em ambientes de alta umidade, o patógeno pode liberar, nas lesões, um exsudato de coloração amarelada. Nas vagens (Figura 1B), desenvolvem-se manchas encharcadas que, posteriormente, adquirem uma coloração avermelhada, frequentemente expandindo-se pelo sistema vascular, indicando a disseminação da bactéria em direção às sementes. As sementes infectadas (1C) podem apresentar coloração desbotada, rugosidades ou, em alguns casos, não manifestar sintomas visíveis (WENDLAND, 2021).

Figura 1- Sintomas de crestamento-bacteriano-comum nas folhas (1A), vagens (1B) e sementes (1C).



Fonte: Adriane Wendland.

Segundo WENDLAND (2021), a disseminação do agente causal ocorre em escalas diversas. A longas distâncias, ela se dá por meio de sementes contaminadas. Em distâncias mais próximas, o patógeno se propaga de planta para planta ou de uma cultura para outra, sendo viabilizado por sementes, dispersão pelo vento, influência da chuva, interação com animais e movimentação humana.

3.2 *Colletotrichum lindemuthianum*

O *Colletotrichum lindemuthianum*, é um fungo conhecido por ser agente causal de antracnose em feijão-comum e se mostra uma ameaça significativa para a produção agrícola, sendo uma das doenças mais destrutivas da cultura (WENDLAND, 2021). Esta doença fúngica é responsável por causar lesões em folhas, hastes e vagens de feijão (figura 2) resultando em perdas substanciais na qualidade e quantidade da colheita (FERREIRA, 2019).

Figura 2 – Sintomas de antracnose em feijão presente nas folhas (2A), vagens (2B) e sementes (2C).



Fonte: Embrapa, 2019.

A infecção em plantas de feijão geralmente começa com a penetração dos conídios de *C. lindemuthianum* nas células do hospedeiro através de lesões naturais, pequenas aberturas como estômatos. Além disso, a capacidade do patógeno de promover a infecção direta ocorre através do apressório. Uma vez dentro da planta, o fungo se desenvolve e coloniza os tecidos, resultando em lesões necróticas nas folhas, hastes, vagens e sementes. Essas lesões podem variar em tamanho e forma, dependendo das condições ambientais e da suscetibilidade da planta (VECHIATO et al., 2001; MIKANI et al., 2018).

Nos períodos caracterizados por temperaturas reduzidas e elevada umidade, as lesões em questão manifestam-se mediante a presença de uma massa gelatinosa contendo esporos de coloração rosada. Em relação aos cancrios, observa-se o acometimento das sementes, evidenciando lesões de tonalidade marrom ou avermelhada. As plântulas provenientes dessas sementes comumente exibem cancrios de tonalidade escura nos cotilédones (WENDLAND, 2021).

A relevância econômica de *C. lindemuthianum* é amplamente reconhecida, uma vez que o feijão é uma das culturas mais consumidas em todo o mundo. O impacto financeiro da antracnose em feijões é evidenciado pela redução da produção e pela necessidade de implementar medidas de controle para minimizar as perdas econômicas (PEREIRA, 2020).

Além de causar perdas diretas na produção, a antracnose do feijoeiro também aumenta os custos de produção devido à necessidade de tratamentos com fungicidas e outras medidas de manejo. Esses gastos adicionais afetam diretamente a rentabilidade dos agricultores que dependem do cultivo de feijão como parte de sua subsistência e renda (PEREIRA, 2020).

A pesquisa contínua sobre *C. lindemuthianum* é primordial para desenvolver novas estratégias de manejo que reduzam as perdas econômicas na produção de feijão. Isso inclui o desenvolvimento de novas variedades resistentes, tratamentos sustentáveis e a compreensão aprofundada dos mecanismos de patogenicidade desse fungo (PADDER et al., 2017).

3.3 O processo de liofilização como método de preservação celular

A liofilização é uma técnica amplamente empregada para a conservação de microrganismos, comumente utilizada em laboratórios de pesquisa e instituições de conservação biológica (MEYER et al., 2022). O objetivo central da liofilização de microrganismos é a preservação a longo prazo da viabilidade desses organismos, garantindo que mantenham suas características originais. Esse processo envolve a remoção da água dos microrganismos por meio da sublimação, interrompendo as reações químicas e atividades biológicas, permitindo o armazenamento seguro e prolongado, com a possibilidade de reativação futura (SOLA, et al 2012)

A liofilização de cepas patogênicas é essencial para a preservação de isolados e estudos de patogenicidade. Pesquisas como estas, auxiliam na identificação de cepas, permitindo o desenvolvimento de estratégias de controle, o que é fundamental para a indústria agrícola, que busca reduzir perdas de produção e economizar recursos (MYAMOTOSHINOHARA et al., 2000; DE PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009). Diversas coleções de culturas dependem deste método para assegurar e conservar a diversidade de seus espécimes. Desta maneira, a técnica tem sido adotada como um padrão de referência para a preservação da viabilidade a longo prazo, desde que sejam considerados os procedimentos adequados (ABREU & TUNTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009).

Apesar de ser amplamente utilizada para a manutenção de microrganismos e ser reconhecida como uma técnica eficaz de conservação a

longo prazo, a liofilização apresenta etapas que compõem o processo como o congelamento e a alta pressão negativa, que podem causar injúrias ou danos celulares. Estes danos incluem alterações na permeabilidade da membrana celular, aumentando a sensibilidade a alguns agentes seletivos, prolongando a fase lag da multiplicação celular e exigindo um reforço nutricional (CANHOS et al., 2004; MORGAN et al., 2006). Na busca por mitigar tais danos, substâncias protetoras podem ser incorporadas antes do processo de congelamento ou secagem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e feijão, Santo Antônio de Goiás – GO, no período de junho a outubro de 2023.

4.1 Cultivo *Xanthomonas spp.*

Para a realização do experimento foram empregados um total de doze isolados, que se encontram relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Isolados de *Xanthomonas spp.* utilizados para o cultivo e posteriormente submetidos ao processo de liofilização.

Código	Ano de armazenamento (papel filtro)
Xap 245	2018
Xap 250	2018
Xap 252	2018
Xap 253	2019
Xff 273	2018
Xff 278	2018
Xff 282	2019
Xap 302	2019
Xap 306	2019
Xap 307	2019
Xap 308	2018
Xap 309	2019

Em ambiente asséptico, quatro segmentos de papel filtro do isolado bacteriano, foram dispostos em placas de Petri com 60 mm de diâmetro contendo meio de cultura ágar-nutriente (AN), que consiste em 15g de ágar bacteriológico, 5g de cloreto de sódio ACS, 1,50g de extrato de levedura, 1,50g de extrato de carne e 5g de peptona bacteriológica em 1000 ml de água destilada. Subsequentemente, as placas foram invertidas e submetidas à incubação em condições de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D) a 28 °C por um período de 48 horas.

Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça de inoculação, uma amostra da colônia foi coletada e transferida para uma

nova placa de AN, a fim de, purificar as amostras dos isolados, e levadas para a incubadora novamente por 48 horas.

4.1.1 Formulação e adição das soluções crioprotetoras

Com a finalidade de manter a integridades das células, utilizou-se seis diferentes soluções crioprotetoras. Os reagentes para o preparo de 25 mL das soluções estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Agentes crioprotetores empregados na condução do experimento.

Reagente	Fórmula molecular	Concentração
Manitol	$C_6H_{14}O_6$	59 mol
Maltodextrina	$(C_6H_{10}O_5)_n$	59 mol
Cloreto de sódio	NaCl	59 mol
Frutose	$C_6H_{12}O_6$	59 mol
Lactose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	59 mol
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	59 mol

Após o preparo, foram adicionados 150 µl de cada solução, em seis microtubos eppendorf de 2 mL contendo um segmento de papel filtro estéril – este possui a finalidade de assegurar que o material microbiológico posteriormente adicionado, não seja retirado do microtubo devido a ação negativa do vácuo empregado no processo de liofilização – e em seguida utilizado tampões de algodão para vedá-los contra o ambiente externo. Ao todo, trinta e seis microtubos foram apropriadamente armazenadas em uma criobox e encaminhada para esterilização em autoclave vertical a 120 °C por 20 minutos.

4.1.2 Criopreservação e liofilização de *Xanthomonas spp.*

Finalizado o período de incubação, as amostras foram coletadas com uma alça de inoculação e adicionadas em triplicata aos criotubos, identificados com o código do isolado e a solução crioprotetora empregada.

Após a etapa precedente, as amostras acomodadas em criobox foram acondicionadas em freezer, mantido a -14 °C por um período de 24 horas.

Após o procedimento de criopreservação dos fitopatógenos, a criobox contendo os microtubos, foi desprovida de tampa e submetida ao processo de liofilização utilizando um liofilizador (JJCientífica®), sendo mantida numa temperatura constante aproximada de - 45 °C ao longo de um período de 08 horas.

4.1.3 Recuperação dos isolados *Xanthomonas spp.*

Com o propósito de avaliar de maneira mais eficaz a integridade das células, as amostras liofilizadas foram divididas em três diferentes tratamentos. A reidratação e recuperação dos isolados foram realizadas em três momentos temporais distintos, designados como: T1 – 0 dias, T2 – 20 dias e T3 – 40 dias. Estas condições experimentais estão descritas detalhadamente na Tabela 3.

Tabela 3 – Variação dos intervalos de recuperação dos isolados pós liofilização. (T1 - 0 dias, T2– 20 dias, T3 - 40 dias)

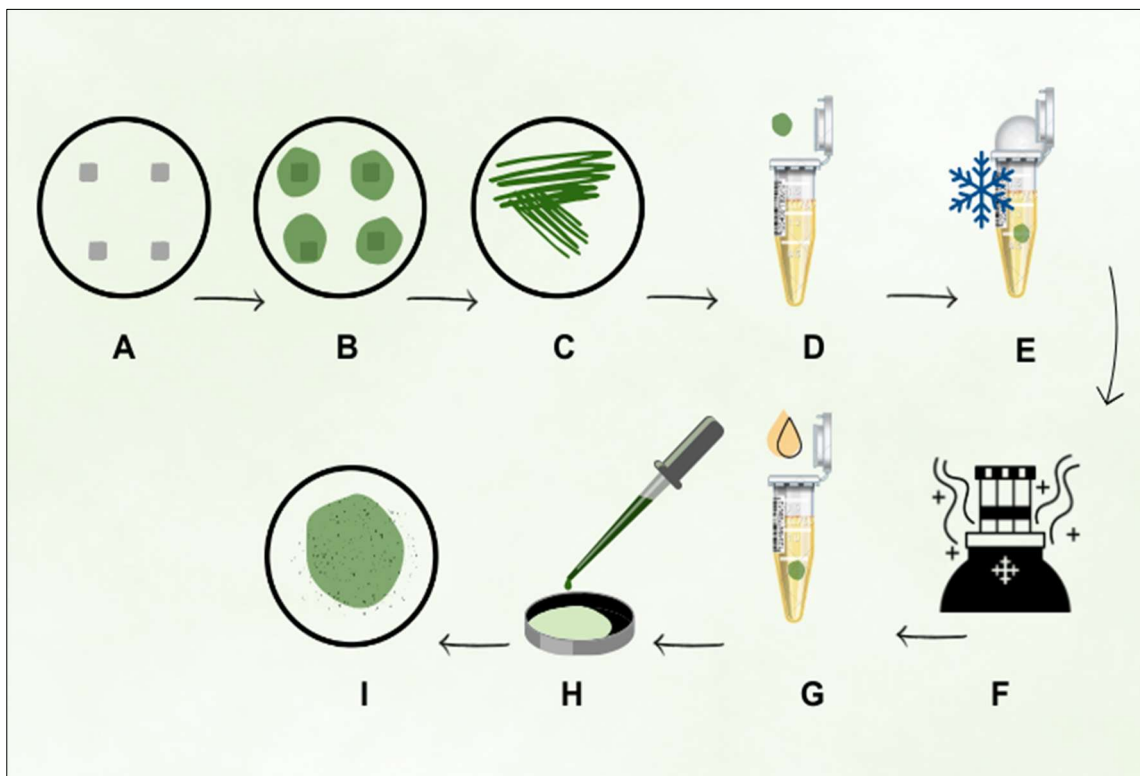
Tempo	Solução empregada					
	Sacarose	Maltose	Maltodextrna	Cloreto de sódio	Frutose	Lactose
T1	Xap 245	Xff 278	Xap 307	Xap 250	Xff 273	Xff 282
	Xap 252	Xap 306	Xao 309	Xap 253	Xap 308	Xap 302
T2	Xap 250	Xap 245	Xff 278	Xff 282	Xap 252	Xff 273
	Xao 306	Xap 25	Xap 308	Xap 307	Xap 302	Xap 309
T3	Xff 282	Xap 250	Xff 273	Xap 245	Xff 278	Xap 252
	Xap 302	Xap 307	Xap 253	Xap 308	Xap 309	Xap 306

Para realizar a reidratação dos isolados, foram utilizadas as mesmas soluções crioprotetoras, mantendo a proporção original de solução e inóculo. Esse processo consistiu em adicionar as soluções crioprotetoras aos isolados, permitindo a absorção gradual dessas substâncias pelos microrganismos previamente liofilizados. Após a adição das soluções

crioprotetoras, as amostras foram deixadas em repouso por aproximadamente 2 minutos para permitir a completa reidratação dos microrganismos. Em seguida, o processo de homogeneização foi realizado com o auxílio de uma micropipeta, garantindo uma distribuição uniforme.

Posteriormente, foram transferidos 50µl das amostras reidratadas para placas de Petri previamente identificadas e preparadas com meio de cultura AN. Após a transferência, as placas foram incubadas em ambiente B.O.D. pelo período de 48 horas. Essa fase de incubação proporcionou as condições ideais para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos reidratados, permitindo a avaliação de sua viabilidade e características fenotípicas.

Figura 3 – Esquema de liofilização *Xanthomonas spp.*: (A) Cultivo em meio de cultura; (B) crescimento de colônias após incubação em B.O.D; (C) Transferência a fim de purificação da amostra; (D). Adição da amostra do isolado em 150 µl de solução crioprotetora; (E) Criopreservação; (F) Liofilização; (G) reidratação da amostra; (H). Teste de integridade das células; (I) Fitopatógeno recuperado em meio de cultura.



Fonte: Autor.

4.2 Cultivo *Colletotrichum lindemuthianum*

Para a condução do experimento, foram utilizados 12 isolados de CI, cujas identificações estão apresentadas de forma detalhada na Tabela 4.

Tabela 4 – Isolados de *C. lindemuthianum* empregadas no cultivo para posterior liofilização.

Código	Ano de armazenamento (papel filtro)
CI 1812	2016
CI 1813	2016
CI 1836	2016
CI 1838	2017
CI 1839	2016
CI 1880	2016
CI 1885	2016
CI 1887	2018
CI 1888	2016
CI 1889	2016
CI 1890	2019
CI 1891	2016

Em condições assépticas, porções de papel filtro do isolado foram dispostas em placas de Petri de 60 mm contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). Este meio consiste em 100 ml de caldo de batata, 15g de ágar-ágar e 20g de dextrose dissolvidos em 1000 ml de água destilada. Posteriormente, as placas foram incubadas em câmara B.O.D a uma temperatura de 25 °C ao longo de um período de 10 dias.

Ao término da incubação, utilizando um bisturi previamente esterilizado, um bloco de meio de cultura contendo micélio de *C. lindemuthianum* foi removido e transferido para uma nova placa contendo meio BDA. Nesta placa foram dispostas três fitas de papel filtro estéril ao redor do bloco para promover o isolamento e a obtenção de culturas puras do patógeno. Nesta fase, as placas foram novamente incubadas por mais 10 dias a 25°C em câmara B.O.D.

4.2.1 Criopreservação e liofilização dos isolados de *Coletotrichum indemuthianum*

Após a conclusão da etapa de incubação, os segmentos de fita foram delicadamente removidos por meio de uma pinça e transferidos em triplicata para criotubos Eppendorf previamente autoclavados. Esses criotubos continham soluções crioprotetoras e estavam devidamente identificados com o código do isolado e a solução crioprotetora utilizada.

Subsequentemente, as amostras alojadas em uma criobox, foram colocadas em um freezer a -14 °C durante 24 horas. Após o processo de criopreservação dos fitopatógenos, a criobox contendo os microtubos foi destampada e submetida ao procedimento de liofilização utilizando um liofilizador da marca JJCientífica®, mantendo uma temperatura constante de aproximadamente -45 °C ao longo de 8 horas.

4.2.2 Recuperação dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*

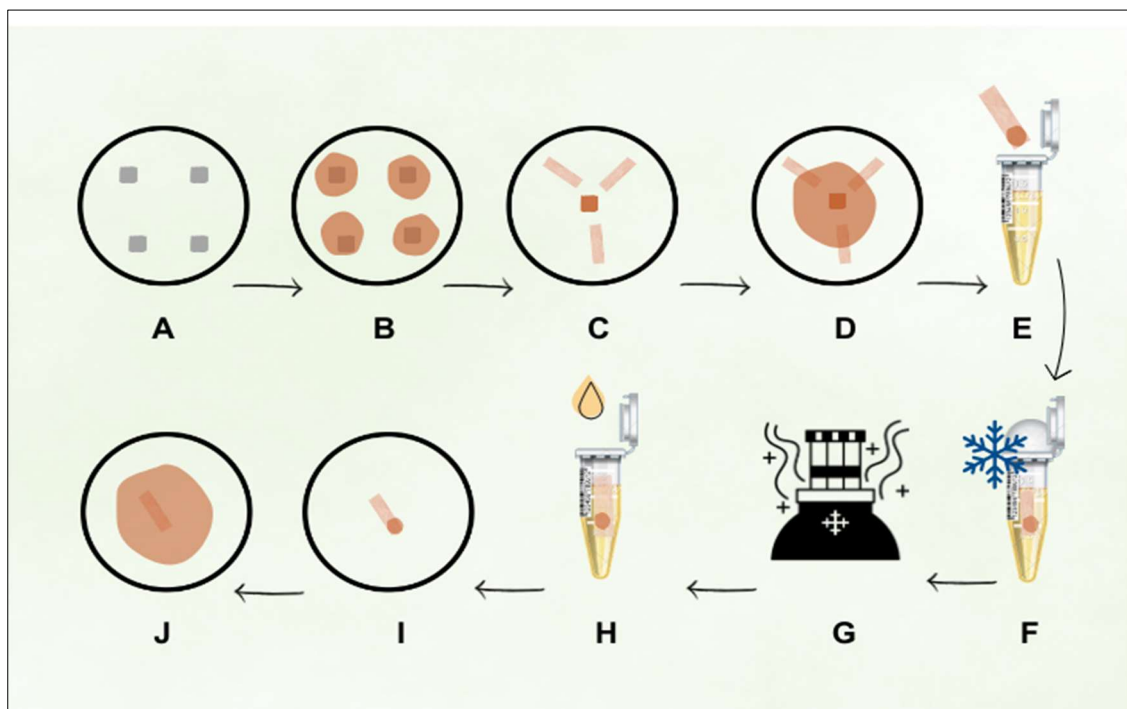
Com o objetivo de aprimorar a avaliação da integridade celular, as amostras liofilizadas foram distribuídas em três grupos distintos. A reidratação e a recuperação dos isolados foram conduzidas em três momentos temporais específicos, denominados como: T1 - 0 dias, T2 - 20 dias e T3 - 40 dias. Os detalhes dessas condições experimentais encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Variação dos intervalos de recuperação dos isolados pós liofilização. (T1 - 0 dias, T2– 20 dias, T3 - 40 dias)

Tempo	Solução empregada					
	Sacarose	Maltose	Maltodextrina	Cloreto de sódio	Frutose	Lactose
T1	CI 1891	CI 1888	CI 1887	CI 1889	CI 1839	CI 1838
	CI 1880	CI 1812	CI 1813	CI 1890	CI 1836	CI 1885
T2	CI 1890	CI 1885	CI 1838	CI 1836	CI 1812	CI 1889
	CI 1880	CI 1888	CI 1813	CI 1891	CI 1839	CI 1887
T3	CI 1838	CI 1836	CI 1812	CI 1890	CI 1839	CI 1888
	CI 1880	CI 1813	CI 1887	CI 1889	CI 1885	CI 1891

Para realizar a reidratação dos isolados, foram utilizadas as mesmas soluções crioprotetoras empregadas no processo anterior, mantendo a proporção original entre solução e inóculo. Subsequentemente, as amostras foram deixadas em repouso por aproximadamente 2 minutos, homogêneas e transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA com o auxílio de uma pinça apropriada. Estas placas foram devidamente identificadas e incubadas em ambiente B.O.D. por um período de 10 dias.

Figura 4 – Esquema de liofilização para *C. lindemuthianum*: (A). Cultivo em meio de cultura; (B). Crescimento de colônias após incubação; (C). Transferência de bloco de meio de cultura com micélio; (D) Colônias cultivadas sobre papel filtro; (E) Adição da amostra em solução crioprotetora; (F) Criopreservação; (G). Liofilização; (H) Reidratação da amostra; (I) Teste de integridade das células; (J). Fitopatógeno recuperado em meio de cultura.



Fonte: Autor

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos tratamentos para *Xanthomonas spp.*

O quadro 1 delinea os desfechos relativos ao crescimento de colônias resultante da inoculação de *Xanthomonas spp.* sujeitas ao procedimento de liofilização. Observa-se êxito integral em todos os tratamentos implementados, conforme verificação visual. No entanto é importante observar sobre o desenvolvimento utilizando Frutose como agente crioprotetor.

Quadro 1 - Cultivo de *Xanthomonas spp.* em meio Agar Nutriente, posterior ao processo de preservação e reidratação em solução crioprotetora, nos tempos de avaliação previamente estipulados em T1, T2 e T3.

	Sacarose	Manitol	Maltodextrina	Cloreto de sódio	Frutose	Lactose
T1						
	Xap 245	Xff 278	Xap 307	Xap 250	Xff 273	Xff 282
	Xap 252	Xap 306	Xap 309	Xap 253	Xap 308	Xap 302
T2						
	Xap 250	Xap 245	Xff 278	Xff 282	Xap 252	Xff 273
	Xap 306	Xap 253	Xap 308	Xap 307	Xap 302	Xap 309
T3						
	Xff 282	Xap 250	Xff 273	Xap 245	Xff 278	Xap 252
	Xap 302	Xap 307	Xap 253	Xap 308	Xap 309	Xap 306

Por meio de uma análise qualitativa, foi possível observar que os isolados de *Xanthomonas spp.* demonstraram uma resposta positiva ao processo de liofilização, preservando a viabilidade e integridade celular, bem como a morfologia e coloração originais dos espécimes.

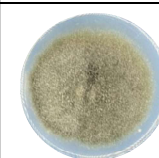
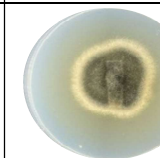
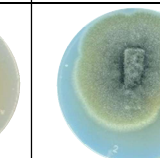
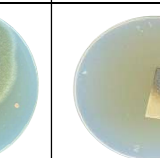
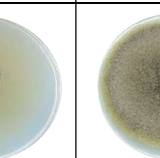
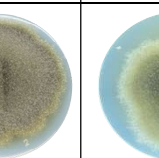


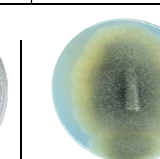
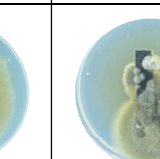
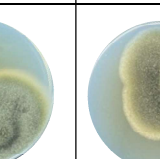
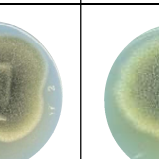
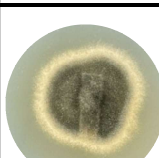
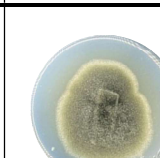
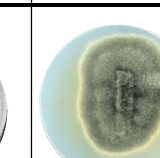
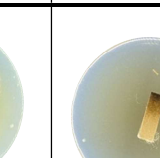
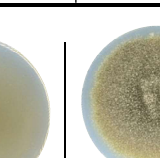
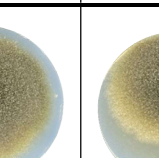
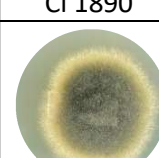
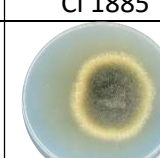
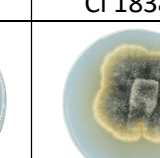
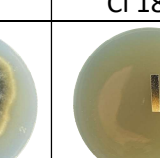
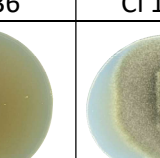
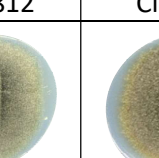
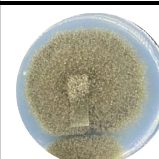
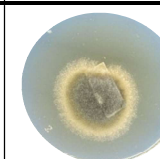
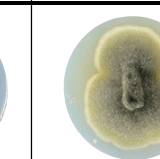
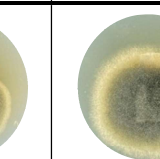
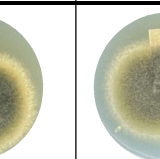
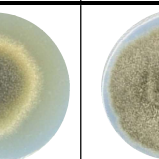
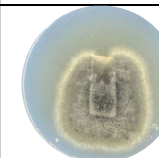

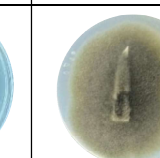
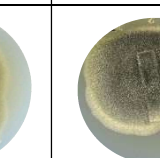
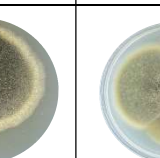
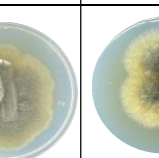
A coloração marrom observada no meio de cultura contendo os isolados de *Xanthomonas fuscans sbp. fuscans* (Xff) não está associada ao processo de liofilização, mas sim à capacidade intrínseca da bactéria em liberar uma proteína denominada melanina, que influencia diretamente na cor do meio de cultura durante o período de incubação. Desta maneira, vale ressaltar a importância de compreensão dos mecanismos fisiológicos dos microrganismos estudados a fim de obtermos uma interpretação precisa dos resultados.

No que diz respeito aos crioprotetores, a avaliação qualitativa revelou uma diferença notável ao empregar a Frutose como agente crioprotetor. Observou-se um retardamento no crescimento dos isolados em todos os intervalos estudados em comparação com os demais tratamentos aplicados. Essa constatação sugere a necessidade de considerações cuidadosas ao escolher crioprotetores, uma vez que diferentes agentes podem influenciar de maneira distinta o comportamento dos microrganismos durante o processo de liofilização.

5.2 Avaliação dos tratamentos para *Colletotrichum Lindemuthianum*

Durante a avaliação qualitativa dos resultados de *C. lindemuthianum*, como descritos no quadro 2, constatou-se que os diferentes tratamentos aplicados obtiveram êxito. Contudo, é relevante destacar sobre o uso do cloreto de sódio e Manitol como agente crioprotetor para a cultura de *C. lindemuthianum*.

Quadro 2 - Cultivo de *C. lindemuthianum* em meio BDA, posterior ao processo de preservação e reidratação em solução crioprotetora, nos tempos de avaliação previamente estipulados em T1, T2 e T3.

	Sacarose	Manitol	Maltodextrina	Cloreto de sódio	Frutose	Lactose
T1						
	CI 1891	CI 1888	CI 1887	CI 1889	CI 1839	CI 1838
						
	CI 1880	CI 1812	CI 1813	CI 1890	CI 1836	CI 1885
T2						
	CI 1890	CI 1885	CI 1838	CI 1836	CI 1812	CI 1889
						
	CI 1890	CI 1888	CI 1813	CI 1891	CI 1839	CI 1887
T3						
	CI 1838	CI 1836	CI 1812	CI 1890	CI 1839	CI 1888
						
	CI 1880	CI 1813	CI 1887	CI 1889	CI 1885	CI 1891

Por meio de uma análise qualitativa inicial realizada após 7 dias para monitorar o desenvolvimento dos isolados, constatou-se que, até o 7º dia de incubação, o tratamento com manitol revelou um crescimento mais lento em comparação com os demais tratamentos. Ao final dos 10 dias programados de

incubação, verificou-se que os isolados submetidos ao tratamento com manitol apresentaram disparidade, sendo observadas colônias de menor tamanho em comparação com os demais tratamentos como pode ser observado principalmente nos isolados CI 1888, CI 1885, CI 1836 e CI 1813. Contudo, não houve ineficácia total do método, apenas um atraso no crescimento. Nesta condição, é importante considerar que o atraso no crescimento pode implicar uma maior demanda nutricional por parte dos isolados, possivelmente exigindo um maior uso do meio de cultura para garantir seu desenvolvimento.

Da mesma forma, o cloreto de sódio utilizado para os isolados de *C. Lindemutianum* resultou em uma taxa de crescimento significativamente inferior em relação às outras soluções adotadas, onde os isolados CI 1889, CI 1836 e CI 1891 não apresentaram crescimento de colônias. O resultado obtido com o cloreto de sódio pode ser atribuído à elevada salinidade da solução, indicando que esta não foi eficaz em proteger as células contra potenciais danos durante a fase de desidratação no processo de liofilização.

A ineficácia do Cloreto de sódio em fornecer uma proteção adequada pode ter impactado negativamente no desempenho da cultura, ressaltando a importância de escolher crioprotetores apropriados para garantir a preservação efetiva das características celulares durante o processo de liofilização.

Essa constatação sugere que a técnica de liofilização pode ser eficaz na preservação de microrganismos para fins de pesquisa, especialmente aqueles de grande relevância para o desenvolvimento agrícola. Essa abordagem não apenas promove a manutenção da viabilidade dos microrganismos, mas também resguarda suas propriedades distintivas, tornando-se, assim, uma ferramenta valiosa para investigações científicas essenciais no contexto do avanço agrícola.

Com relação às características morfológicas, não houve disparidade significativa e mantiveram estabilidade em todos os tratamentos e intervalos aplicados.

6. CONCLUSÃO

- A liofilização, em conjunto com a utilização de crioprotetores, mostrou-se eficaz na preservação de ambos os microrganismos sendo capazes de restabelecer sua integridade celular, mantendo suas características iniciais após a reidratação.
- Frutose como crioprotetor para *Xanthomonas* spp. resultou em atraso no crescimento, mas sem ineficácia total; resultando em maior demanda nutricional e possível aumento no uso do meio de cultura para a promoção do crescimento.
- Os isolados de *C. lindemuthianum* tratados com manitol apresentaram disparidade, manifestando colônias menores em comparação com outros tratamentos.
- Parte dos isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* tratados com cloreto de sódio apresentaram inviabilidade e morte celular, impossibilitando o crescimento das colônias. Possivelmente pelo alto teor de salinidade da solução.

REFERÊNCIAS

BLAUSTEIN, et al. Economic impact of citrus canker in Florida. *Journal of Agricultural and Resource Economics*, 42(1), 111-126. 2017.

CANHOS, et al., Coleções de culturas de microrganismos. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento no final do século XX, v. 7, p. 81-101, 1999.

CARVALHO, A., et al. *Xanthomonas axonopodis* and its impact on citrus canker: a review. *Tropical Plant Pathology*, 45(2), 99-108. 2020.

CORRÊA, Natalia Guardia. Efeito da velocidade de congelamento sobre a liofilização, reidratação e atributos de qualidade de fatias de maçã. 2013..

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal*, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

DA SILVA, Abraão Cícero et al. Diagnóstico da produção de feijão-caupi no nordeste brasileiro. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 16, n. 2, 2018.

DE OLIVEIRA, Roberto Pedroso et al. Cancro cítrico: epidemiologia e controle. 2008.

FERREIRA, J. "Economic impact of *Colletotrichum lindemutianum* on bean production: Challenges and opportunities." *Crop Protection*, 35(3), 62-70. 2019.

FORTI, Tatiana et al. Evaluation of a fungal collection as certified reference material producer and as a biological resource center. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 403-409, 2016.

GARCIA, C. et al. Influência dos Parâmetros de Liofilização na Viabilidade de Microrganismos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 42(3), 287-302. 2014.

CANALE, Maria Cristina et al. Pragas e doenças do feijão: diagnose, danos e estratégias de manejo. *Boletim Técnico*, n. 197, 2020.

COSTA, Carmen Paiva; FERREIRA, Maria Candida. Preservação de microrganismos: revisão. *Rev. microbiol*, p. 263-8, 1991.

DE PAOLI, Paulo. Biobancos em microbiologia: da coleta de amostras à epidemiologia, diagnóstico e pesquisa. *Revisões de microbiologia FEMS*, v. 5, pág. 897-910, 2005.

GOTTWALD, Tim R.; GRAHAM, James H.; SCHUBERT, Tim S. Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant health progress*, v. 3, n. 1, p. 15, 2002.

IBGE – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - LSPA. IBGE, 2023

ISHIZUKA, Mariane Sayuri. Compatibilidade entre tratamentos químico e biológico de sementes de feijão para controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.

MENTEN, José Otávio Machado et al. Qualidade das sementes de feijão no Brasil. *Pesquisa & Tecnologia*, v. 3, n. 2, p. 7, 2006.

MEYER, Maurício Conrado et al. Bioinsumos na cultura da soja. Embrapa Soja, 2022.

MIKANI, et al. An update of the genus *Colletotrichum* in Iran. *Mycologia Iranica*, 5(2), 161-176. 2018.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Yukie et al. Taxa de sobrevivência de micróbios após liofilização e armazenamento a longo prazo. *Criobiologia*, v. 41, n. 3, pág. 251-255, 2000.

MORGAN, Charlotte A. et al. Preservação de microrganismos por secagem; Uma revisão. *Revista de métodos microbiológicos*, v. 66, n. 2, pág. 183-193, 2006.

MOUSINHO, Francisco Edinaldo Pinto; ANDRADE JÚNIOR, Aderson Soares de; FRIZZONE, José Antonio. Viabilidade econômica do cultivo irrigado do feijão-caupi no Estado do Piauí. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 30, p. 139-145, 2008.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. Manual de Gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF). 2013.).

PADDER, B. A. et al. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, p. 317-330, 2017.

PEREIRA. Challenges in managing anthracnose in beans: Economic considerations and sustainable solutions. *Journal of Agriculture and Rural Development*, 18(1), 47-56. 2020.

RIBEIRO. Understanding the pathogenicity mechanisms of *Xanthomonas axonopodis*: Implications for disease management. *Agricultural Science and Technology*, 10(3), 113-120. 2018.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. ARAUJO, R.; RAVA, CA; STONE, LF et al. Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba, POTAFOS, p. 296, 1996.

SILOCHI, Rose Mary Helena Quint et al. Aspectos que influenciam a aquisição e preparo do feijão comum por consumidores domésticos. Revista Faz Ciência, v. 23, n. 37, p. 147-164, 2021..

SILVA, et al. Liofilização de *Colletotrichum lindemutianum*: Impacto na Viabilidade e Patogenicidade. Revista de Fitopatologia, 28(2), 123-135.2020.

SILVA, et al.. Aspectos gerais da antracnose do feijoeiro. Summa Phytopathologica, 39(2), 141-148. 2013.

SMITH, et al. Implementação de melhores práticas e validação de técnicas de criopreservação de microrganismos. ↑ The Scientific World Journal .2012.

SOLA, Marília Cristina et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. 2012.

TORRES, et al., Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. Summa Phytopathologica, v. 35, p. 136-139, 2009.

VECHIATO, M. H. et al. Antracnose do feijoeiro: tratamento de sementes e correlação entre incidência em plantas e infecção de sementes. Arquivos do Instituto Biológico, v. 68, n. 1, p. 83-87, 2001.

Wendland, A. Doenças bacterianas em cultivo de feijão, Embrapa Arroz e Feijão. 2021.

WENDLAND, A. et al. Doenças da parte aérea. 2014

