

Diagnóstico de cancro cítrico por PCR

Júlio Rodrigues Neto

julio@biologico.sp.gov.br

Suzete A.L. Destéfano

suzete@biologico.sp.gov.br

Centro Experimental Central

Número 45 - 30/06/2006

O diagnóstico de cancro cítrico agora também pode ser efetuado por meio da técnica de PCR – sigla que em português significa Reação em Cadeia da Polimerase, a qual amplifica uma seqüência específica do DNA do patógeno. O Fundecitrus fez uma parceria com o Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LBV) do Instituto Biológico para que as análises de material suspeito de pomares comerciais e viveiros sejam realizadas por esse método. O método utilizado por esse laboratório é recente e foi desenvolvido dentro do Projeto Temático de cancro cítrico, financiado pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, realizado entre os anos de 2001 e 2005, e coordenado pelo pesquisador Júlio Rodrigues Neto.

A pesquisadora Suzete A. Lanza Destéfano encontrou uma parte do DNA da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* correspondente ao gene *groEL* (gene essencial para o funcionamento da célula), que tornou possível detectar a bactéria responsável pelo cancro cítrico. Essa seqüência do DNA possibilita também diferenciar uma contaminação de cancro cítrico da cancrose do limão galego, que é provocada por uma outra *Xanthomonas*. “É muito bom ver o nosso trabalho convertido em algo prático”, afirma Suzete. Outros fragmentos de DNA já foram utilizados para detectar a bactéria do cancro, entretanto, essa nova metodologia desenvolvida pela pesquisadora eliminou a etapa de extração do DNA do material contaminado, procedimento normal no processo convencional de PCR utilizado para o diagnóstico de outras doenças.

A análise por PCR é feita por meio da retirada de uma parte da lesão que é colocada em um meio semi-seletivo também desenvolvido pela equipe do LBV, e posteriormente adicionada na solução de PCR. Isto gerou ganho de tempo e custo no processo. Essa solução é colocada em uma máquina que faz a amplificação do DNA da bactéria se a mesma estiver presente no material, e os resultados podem ser obtidos em 24 horas. No caso de resultados negativos, o exame é repetido para confirmação. Além de ser mais rápido, não é subjetivo e não necessita da confirmação de outros tipos de análises. Ele permite maior segurança nos exames, principalmente em casos em que a amostra está em más condições, ou porque é muito velha, foi mal conservada ou tem lesão pequena. “Desenvolver novas metodologias de diagnóstico no Brasil é necessário, e o apoio do Projeto Temático FAPESP possibilitou avanços nesse campo”, afirma Júlio Rodrigues Neto, coordenador do projeto.

O diagnóstico do cancro cítrico pode ser realizado por meio de diferentes técnicas, inclusive inoculação em plantas sadias para resolver possíveis dúvidas na identificação do patógeno, o que torna o processo demorado (saiba sobre os diversos tipos de diagnóstico no quadro). Os exames para diagnóstico de cancro cítrico são realizados em seis laboratórios (Instituto Biológico e Pólos Regionais da APTA) espalhados pelo Estado. Com a utilização do PCR, o processo de identificação tornou-se mais rápido e preciso, embora seu custo seja maior que os outros tipos de análises. Atualmente, esta metodologia de diagnóstico tem sido aplicada somente pelo Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico, em Campinas, onde são realizados cerca de 700 exames por mês. As amostras ficam armazenadas até que o resultado final seja definido.

Conheça os diversos métodos de diagnosticar o cancro cítrico

Visual – por meio de características típicas dos sintomas. É um diagnóstico presuntivo. Não é utilizado como base para laudos.

Fluxo Bacteriano – é realizado pela análise de parte de tecido vegetal de 1-2 milímetros, retirada do limite entre a necrose (tecido morto) e a parte aparentemente sadia da folha com coloração verde ou com halos amarelados, que é o local com

maior concentração de bactérias. O material é cortado, macerado e colocado sobre uma lâmina com água; e por meio de um microscópio óptico é possível observar o fluxo bacteriano que sai do tecido. Como a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* tem características próprias, é possível associá-la aos sintomas do cancro.

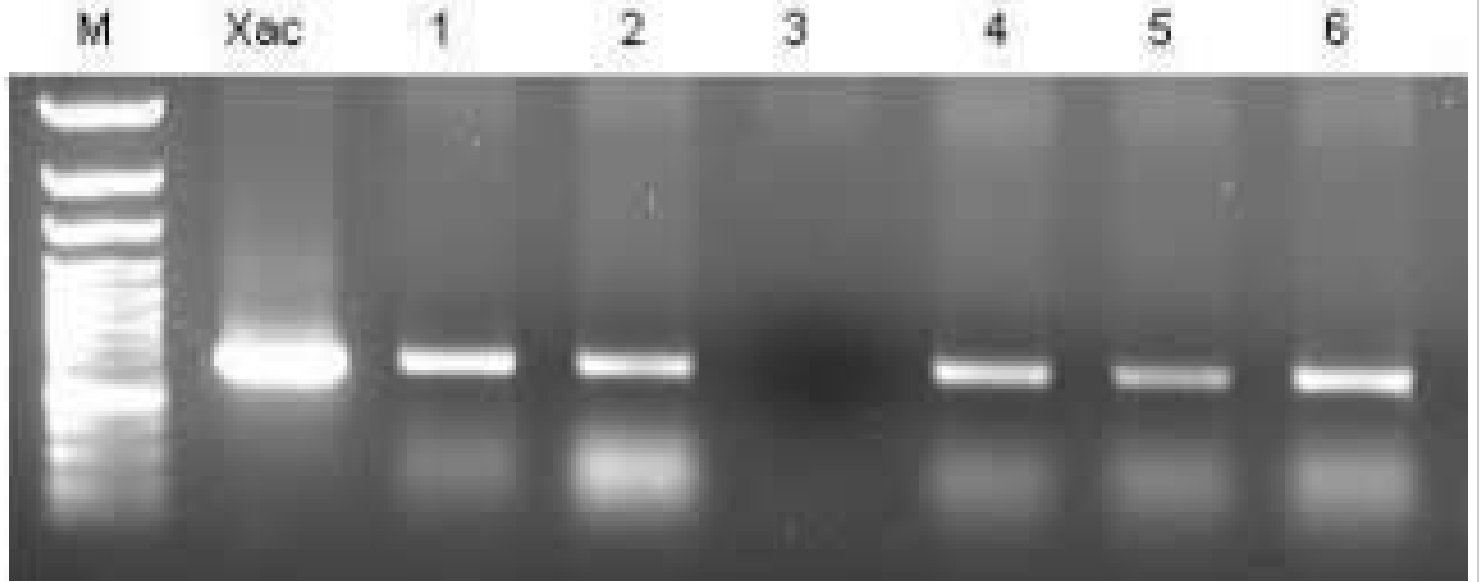
Isolamento – após a observação do fluxo bacteriano, o material analisado é coletado e colocado em placas contendo meio de cultura artificial. Ao final de três a quatro dias os organismos (células bacterianas) presentes se proliferam, dando origem a colônias amareladas, características da bactéria do cancro cítrico. Outras colônias de coloração amarelada também podem aparecer no meio de cultura, que são as bactérias saprofíticas (não patogênicas), porém, o seu crescimento é muito mais rápido, cerca de 24 horas. É o método mais utilizado em diagnósticos dessa doença.

Inoculação – o material coletado de uma amostra é injetado em uma planta sadia de Citros para ver se ela manifesta sintomas de cancro cítrico. O processo é seguro, mas demorado. A planta leva de duas a três semanas para apresentar os sintomas. É bastante utilizado em amostras de limão galego para diferenciar cancrose de cancro cítrico.



Os Pesquisadores Júlio Rodrigues Neto e Suzete Destéfano desenvolveram o PCR para diagnóstico do cancro cítrico durante o projeto temático sobre a doença

(uploads/artigos/45/1.jpg)



Teste de PCR com amostras de citros. (M) Marcador de tamanho de fragmento, (Xac) *X.a. pv. citri*/ controle positivo, (1, 2, 4, 5 e 6) resultado positivo para cancro cítrico, (3) resultado negativo

(uploads/artigos/45/2.jpg)