

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO E SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis*  
PV. *citri* A BACTERIOCINAS**

**MARCEL BONINI**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP  
Maio 2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**PRODUÇÃO E SENSIBILIDADE DE ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis* PV.  
*citri* A BACTERIOCINAS**

**MARCEL BONINI**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,  
para obtenção do título de Mestre em Agronomia  
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU – SP

Maio - 2005

## OFEREÇO

Aos meus pais **Sérgio Augusto Bonini** e **Catarina Foloni Bonini** (*in memoriam*) pela educação, amor, paciência, dedicação e grande exemplo de vida.

Ao meu irmão **Helder Bonini**, minha cunhada **Andreza Luiza Pioto Bonini** e meu sobrinho **Helder Bonini Jr.** e aos meus avós **Elvira Bolini** e **Luiz Bonini** (*in memoriam*) por tudo que representam para mim.

## AGRADECIMENTO

A **Deus** todo poderoso pela minha saúde, pela minha família abençoada, amor e a graça de viver cada dia com Sua presença.

A **Faculdade de Ciência Agrônômicas** pela minha formação profissional.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni** pela orientação, ensinamentos, dedicação e amizade.

Ao **Professores e Funcionários** do Departamento de Produção Vegetal/ Defesa Fitossanitária pelo ensino, apoio e colaboração.

Ao **Dr. Julio Rodrigues Neto** pelo auxílio na pesquisa e amizade.

Ao **FUNDECITRUS** pelo auxílio na pesquisa e pelo estágio por mim realizado.

À **FAPESP** pelo auxílio financeiro.

Ao **Dr. José Belasque Jr.** pelo auxílio nos trabalhos e oportunidade.

Aos amigos **Fabricio Francischini, Marco Cotrin e Fabio Scudeler** pela companhia e incentivo.

À **CAPES e CNPq** pela bolsa de estudo concebida.

Aos **Funcionários** da seção de pós graduação pela colaboração e gentileza

Aos amigos da Republica **Claudinei de Lima, Glauber Pereira Leite, Pedro Ferreira Filho, Eridan Pereira, Everton Alonso, Rafael Marcelino, Romulo Ramos, Tarcisio Hulshof, Rodrigo Morgado e Dona Aide** por tudo que passamos juntos.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 RESUMO</b> .....	1
<b>2 SUMMARY</b> .....	2
<b>3 INTRODUÇÃO</b> .....	3
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
<b>4.1 Cancro cítrico</b> .....	5
<b>4.2 Bacteriocina</b> .....	9
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
<b>5.1 Obtenção e preservação dos isolados bacterianos</b> .....	14
<b>5.2 Produção de bacteriocina</b> .....	17
5.2.1 Avaliação da produção de bacteriocina.....	17
5.2.2 Influência do meio de cultura, temperatura e tempo de incubação.....	17
5.2.3 Avaliação da produção de bacteriocina por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> contra isolados de <i>Xanthomonas</i> spp .....	18
<b>5.3 Caracterização de bacteriocinas produzidas por isolados bacteriocinogênicos</b> .....	18
5.3.1 Produção de bacteriocina bruta em meio líquido.....	18
5.3.2 Sensibilidade térmica.....	19
5.3.3 Sensibilidade enzimática.....	19
5.3.4 Atividade bacteriofágica.....	20

<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
--------------------------------------	-----------

**Página**

<b>6.1 Produção e sensibilidade de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i></b>	
<b>a bacteriocina.....</b>	<b>21</b>
<b>6.2 Caracterização de bacteriocinas produzidas por <i>Xanthomonas axonopodis</i></b>	
<b>pv. <i>citri</i> e <i>Xanthomona axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabelas</b>	<b>Página</b>
Tabela 1. Relação de isolados bacterianos utilizados e sua referência.....	15
Tabela 2. Efeito da temperatura de incubação do meio de cultura na sensibilidade à de bacteriocina no tempo de incubação de 24 horas, por isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .....	23
Tabela 3. Efeito do tempo de incubação na sensibilidade à bacteriocina por isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> na temperatura de incubação de 30°C .....	23
Tabela 4. Produção de bacteriocinas por vinte e cinco isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> e sensibilidade de isolados de <i>Xanthomonas</i> spp.....	25
Tabela 5. Produção de bacteriocina por isolados de <i>Xanthomonas</i> spp e sensibilidade de vinte e cinco isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .....	26
Tabela 6. Efeito do tratamento térmico, em diferentes temperaturas e tempo de exposição, sobre bacteriocinas produzidas por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (FDC-806) e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (Mar 2850-A)....	28
Tabela 7. Atividade das amostras de bacteriocina após o tratamento com as enzimas proteinase, tripsina, lisozima, RNase e DNase, com tempo de incubação de 2 horas a 37°C.....	29

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Insensibilidade do isolado de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (FDC-585) à bacteriocina produzidas por nove isolados da mesma patovar (1- FDC-002, 2- FDC-039, 3- FDC-021, 4- FDC-561, 5- FDC-501, 6- FDC-714, 7- FDC-769, 8- FDC-118 e 9- FDC-213).....	22
Figura 2. Ação inibitória da bacteriocina produzidas por nove isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (1- FDC-806, 2- FDC-213, 3- FDC-022, 4- FDC-616, 5- FDC-121, 6- FDC-609, 7- FDC-075, 8- FDC-106 e 9- FDC-767) contra um isolado de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (Mar 2850-A).....	27
Figura 3. Ação inibitória de bacteriocinas produzida de dois isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i> (1-Mar 2550-A e 2- Mar 2850-B) Contra um isolado de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (FDC-806).....	27



## 1 RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção e a sensibilidade de 48 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e de 14 isolados de *Xanthomonas* spp. à bacteriocinas. Estudos foram realizados para verificar o efeito da temperatura, tempo de incubação e do tipo do meio de cultura sobre a produção de bacteriocina por isolados de *X. axonopodis* pv. *citri*. Todos isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* não foram sensíveis às bacteriocinas produzidas por eles, não sendo essas afetadas pelo meio BDA, nutriente ágar + NaCl e YPDA, nos diferentes tempos e temperaturas de incubação. Porém, isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foram sensíveis às bacteriocinas produzidas por 25 isolados de avaliados e o isolado de *X. campestris* pv. *campestris* e o de *X. axonopodis* pv. *manihotis* apresentaram sensibilidade variável. Dos 25 isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* apenas cinco não foram inibidos pelas bacteriocinas produzidas por dois isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. As bacteriocinas produzidas pelos isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* (FDC-806) e de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Mar 2850-A) foram termolábeis e resistentes à lisozima e sensíveis a DNase. A bacteriocina produzida pelo isolado de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* foi resistente à ação de proteinase K, tripsina e RNase enquanto que a produzida pelo isolado de *X. axonopodis* pv. *citri* foi sensível a essas enzimas.

## 2 SUMMARY

### **Production and sensibility of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strains with bacteriocins.**

Author: Marcel Bonini

Adviser: Dr. Prof. Antonio Carlos Maringoni

The objective of this work was to evaluate the production and sensitivity of 48 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strains and 14 *Xanthomonas* spp. strains to bacteriocins. A number of studies were carried out to verify the effect of temperature, incubation time, and type of culture medium on bacteriocine yield by *X. axonopodis* pv. *citri* strains. None of the *X. axonopodis* pv. *citri* strains were sensitive to the bacteriocins produced by themselves, and were not affected by the PDA, nutrient agar + NaCl, and YPDA media, at the different incubation times and temperatures studied. However, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* and strains were sensitive to the bacteriocins produced by the 25 *Xac* strains evaluated, while a *X. campestris* pv. *campestris* and *X. axonopodis* pv. *manihotis* strains showed variable sensitivity. Of the 25 *X. axonopodis* pv. *citri* strains, only five were not inhibited by the bacteriocins produced by the two *X. axonopodis* pv. *passiflorae* strains. The bacteriocins produced by *X. axonopodis* pv. *citri* (FDC-806) and *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Mar 2850-A) were thermolabile and resistant to lysozyme and sensitive to DNase. The bacteriocin produced by the *X. axonopodis* pv. *passiflorae* was resistant to the action of proteinase K, trypsin and RNase, while the bacteriocin produced by the *X. axonopodis* pv. *citri* isolate was sensitive to those enzymes.

Keywords: bacteria, bacteriocin, citrus canker, *Xanthomonas* spp., *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Citrus* spp.

### 3 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, na safra 2003/2004 produção foi de 422 milhões de caixas, a citricultura paulista responde por 85% da produção brasileira (Agrianual, 2004).

A citricultura é a principal fonte econômica de 330 municípios paulistas e do triângulo mineiro, propicia aproximadamente 400 mil empregos diretos e indiretos e movimentam US\$ 7 bilhões anualmente, além de gerar ao país US\$ 1,2 bilhões ao ano em exportações de suco de laranja, que representa 80% do mercado mundial (Toledo, 2005).

A soberania da citricultura paulista é constantemente ameaçada por graves problemas fitossanitários, como é o caso do cancro cítrico.

O cancro cítrico é uma doença que ataca praticamente todas as espécies e variedades comerciais de citros, produzindo lesões em todos os órgãos verdes. O agente causal é a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Vauterin et al. (1995), originária do sudoeste asiático, pertencente ao grupo de doenças que não possibilita sua eliminação por meio de tratamentos curativos. Essa doença é de ocorrência mundial, incluindo os maiores produtores; Brasil, E.U.A. e México. Em muitos países ocorre de forma endêmica, e na América do Sul ocorre na Argentina, Uruguai, Bolívia, Paraguai e no Brasil. No Estado de São Paulo a doença está satisfatoriamente controlada, devido ao programa de erradicação

de plantas e mudas doentes, e barreiras fitossanitárias impostas a outros Estados onde a doença é endêmica.

Essa doença causa prejuízos tais como, enfezamento da planta pela diminuição da área fotossintética por causa das lesões, queda prematura de frutos, diminuição da produção, altos gastos com erradicação e impossibilidade de exportação de frutas frescas para países onde são adotadas barreiras fitossanitárias à doença.

Bacteriocinas são substâncias produzidas por bactérias, as quais são capazes de matar ou inibir o crescimento de outras bactérias afins. Geralmente são de origem proteica e os genes responsáveis pela síntese estão localizados em plasmídeos ou no genoma. Originalmente eram denominadas “colicinas”, devido a maioria dos isolamentos terem sido de *Echerichia coli*, porém, após serem detectadas em isolados de outras espécies de bactérias foi adotado o termo genérico bacteriocina.

Na fitopatologia, bacteriocinas têm importantes aplicações: podem ser usadas para estudos epidemiológicos; para tipificação de isolados de fitobactérias; auxiliar nos métodos de identificação e classificação de bactérias; e potencial opção de controle de patógenos.

Vários gêneros de bactérias fitopatogênicas tem sido caracterizados quanto à produção de bacteriocinas, dentre estes: *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Curtobacterium* e *Xanthomonas*. Para *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) existem estudos desenvolvidos no exterior, que indicaram a presença de isolados produtores e também sensíveis a essa toxina bacteriana. No Brasil, até o momento, nenhum trabalho foi desenvolvido nesse sentido, sendo o presente trabalho pioneiro sobre o assunto.

O presente trabalho teve por objetivo :

- a) Avaliar a produção e a sensibilidade das bacteriocinas produzidas por 48 isolados de *Xac*, estirpe “A”, proveniente de várias localidades do país;
- b) Avaliar a produção e a sensibilidade das bacteriocinas produzidas por isolados de *Xanthomonas* spp. de várias hospedeiras;
- c) Sensibilidade de *Xanthomonas* spp a bacteriocina de *Xac*;
- d) Caracterizar bacteriocinas produzidas por um isolado de *Xac* e por um isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Cancro cítrico

O cancro cítrico causada pela bactéria *Xac* é uma das principais doenças bacterianas que afetam a produção de citros no mundo. A importância econômica da doença é devida a fatores como: diminuição da área fotossintética nas folhas atacadas, causando o enfezamento da planta; queda de frutas, ainda que pequenas e as que permanecem no pé tem seu tamanho diminuído; as frutas infectadas proporcionam a entrada de vários fungos e agentes de podridão e a depreciação comercial do fruto. A importação de frutos provenientes de países onde ocorre o cancro cítrico é proibida por muitos países consumidores; a planta doente pode se constituir em fonte de inóculo; altos gastos com erradicação (Bitancourt, 1957).

Segundo Sun et al. (2004), os diferentes tipos de cancro cítrico são:

- Cancro cítrico asiático ou cancrose A, causada pela estirpe A de *Xac*. O cancro cítrico asiático é originário provavelmente do Sudoeste Asiático (Goto,1992) e o patógeno causador dessa doença encontra-se disseminado por todo o mundo, sendo endêmico em alguns países.
- Cancrose “B”, ou falso cancro causado por *X. axonopodis* pv. *aurantiifolia* tipo B, foi descoberto em limões verdadeiros (*Citrus limon*) na Argentina, em 1923. Possui uma faixa

restrita de hospedeiros além dos limões verdadeiros, pode infectar *C. aurantiifolia* e *C. aurantium* (Civerolo, 1984).

- Cancrose do limão galego ou cancrose C. Atribuída à estirpe C da bactéria *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* tipo C, os sintomas são muito parecidos com o da cancrose A, mas ocorre somente em limão galego e também possui diferenças genéticas (Gabriel et al., 1989);
- Mancha bacteriana do citrus ou cancrose E, atribuída a *X. axonopodis* pv. *citrumelo*, que ocorre em viveiros de citros da Flórida, afetando principalmente os citromelos Swingle e o clone 80-3 (Gabriel et al., 1989; Graham & Gottwald, 1991)
- *Xac* A\*: *X. axonopodis* pv. *citri* “star”, pode ser considerada o quinto tipo da bactéria . Estas linhagens atípicas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, estão relacionadas ao tipo A, adaptada a temperatura elevadas, ocorrendo no Sudoeste da Ásia e isoladas de plantas de limão galego (Vernière et al., 1998).
- *Xac* A<sup>w</sup>: *X. axonopodis* pv. *citri* “Wellington group”, Encontrada no Sul da Florida em 2000, infectando somente plantas de limão galego e *Citrus macrophylla* (Sun et al., 2004). Diferenciando da cancrose A através de teste de patogenicidade e ELISA.

No Brasil tem sido relatados Cancro Cítrico Asiático e a cancrose “C” (Namekata, 1991; Goto, 1992).

Principais fontes de inóculo primário da *Xac* são considerados as lesões nos ramos e folhas das plantas hospedeiras que sobreviveram de uma estação para outra. A viabilidade das lesões dependerá da longevidade das células hospedeiras. Lesões de cancro em ramos podem ser fontes de inóculo durante vários anos (Rossetti, 2001).

Na ausência de citros a *Xac* possui um período relativamente curto de sobrevivência. Em material de metal, plástico, tecido ou madeira, a bactéria sobrevive no máximo por 72 horas (Graham et al., 2001). Pode persistir por meses na rizosfera de gramíneas no solo (Goto et al., 1975) e de um a dois meses em folhas e frutos em decomposição (Graham et al., 1989). A bactéria tem poucas possibilidades de sobreviver de forma livre devido ao antagonismo e competição dos microorganismos saprófitas.

A disseminação ocorre a curtas distâncias por gotas de água que ao se chocarem com as lesões dispersam as células bacterianas, suspensas em gotículas, para ramos, folhas na mesma planta e as plantas ao redor. Na presença de vento, as gotículas podem alcançar maiores distâncias, de até 15 metros da fonte de inóculo (Gottward et al., 1998). A

longa distância a disseminação de células bacterianas ocorre pela ação simultânea de chuva e vento, onde aerossóis vão ser formados e também por material propagativo de plantas infectadas, frutos doente e material de colheita infestado (Rossetti, 2001).

As vias de penetração de *Xac* se dá por abertura naturais, principalmente estômatos, e por ferimentos causados por espinhos, grãos de areia, pelo homem ou insetos. A face abaxial da folha de citros é muito mais suscetível à penetração via estômato. A diferença na suscetibilidade entre as faces adaxial e abaxial está em razão da maior densidade de estômatos na face abaxial (Graham et al., 1992).

A larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) causa grandes injurias nas folhas jovens da planta cítrica, podendo cobrir toda a área foliar (Rodrigues et al. 1998). Os ferimentos mais severos, como aqueles produzidos por espinhos ou vento, cicatrizam em um ou dois dias (Goto, 1990), enquanto os provocados pela larva minadora mantém os tecidos do mesófilo expostos durante um período de 10 a 14 dias favorecendo a infecção. Além disso, as injurias da larva minadora transformam os aerossóis em mecanismos eficientes de disseminação do patógeno. Na coincidência do fluxo de brotação do citros com a presença da larva minadora e de aerossóis, células bacterianas são capazes de causar infecção a distâncias superiores a um quilometro (Koizumi et al., 1996).

A concentração de inóculo suficiente para causar infecção varia de  $10^4$  a  $10^5$  UFC/mL e  $10^2$  UFC/mL para infecções via estômato e ferimento respectivamente (Goodman, 1982)

Tecidos foliares em expansão, folhas jovens, são mais suscetíveis que folhas maduras. O período maior de suscetibilidade dos frutos é entre 60 a 90 dias após a sua emissão (Gottward & Graham, 1992).

*Xac* é um dos poucos patógenos cuja erradicação se mostra eficiente. Conforme Schubert et al. (2001), essa eficiência está relacionada com suas características patogênicas, como diagnose fácil e rápida (sintomas típicos), disseminação relativamente lenta, ausência de vetores, hospedeiros restritos, alto valor econômico da cultura e não capacidade do patógeno em sobreviver por longo período na ausência do hospedeiro.

Distribuição do cancro cítrico, dentro de um pomar ocorre entre folhas, frutos e ramos de uma mesma planta doente e também entre plantas vizinhas ou não. Geralmente, quando em baixas incidência, as plantas com sintomas encontram-se próximas

umas das outras. Com o passar do tempo a doença atinge novas plantas, mais distantes das plantas inicialmente infectada, e pode se disseminar por todo o pomar. O tempo necessário para o avanço da doença no pomar e a contaminação de várias plantas, distantes das inicialmente infectadas, depende da variedade/espécie cítrica, idade e condição do pomar, ocorrência de chuvas com ventos, trânsito de pessoas, da adoção de medidas de controle (prevenção) da doença, entre outros fatores. Quando as condições são favoráveis para a disseminação do patógeno o número de plantas doentes pode ser altíssimo em poucos meses (numa mesma estação de chuvas, por exemplo), mesmo quando inicialmente existia apenas uma planta doente (FUNDECITRUS, 2005).

No Brasil o cancro cítrico foi relatado a primeira vez em 1957, em pomar na região de Presidente Prudente-SP (Bitancourt,1957). Logo após a sua constatação iniciou-se uma campanha de erradicação da doença nessa área, através da eliminação das plantas cítricas contaminadas ou não. Mesmo assim a doença foi observada posteriormente nos Estados do Paraná e Mato Grosso do Sul. Em 1979, na região conhecida como “zona de exportação”, noroeste de São Paulo, foram descobertos focos de cancro cítrico (Feichtenberger,1984) em 1980, foi relatada a ocorrência de *Xac* no Estado do Rio Grande do Sul (Porto, 1981), Santa Catarina em 1985 (Namekata, 1988) e em Roraima (Nascimento, 2003).

Mesmo que o número de focos tenha aumentado gradativamente no Estado de São Paulo, o patógeno não foi amplamente disseminado no início devido ao programa de erradicação das plantas doentes. Entretanto, essa situação mudou a partir de 1997 devido à introdução da larva minadora dos citros no Brasil, em 1996 (Prates et al.,1996; Gimenes-Fernandes et al., 2000). Padrões espaciais menos agregados ou ao acaso, normais para região de origem do cancro cítrico (Sudoeste Asiático), onde os três componentes do sistema, citrus-*Xac*-larva minadora, sempre se influenciaram mutuamente passaram a ocorrer no Brasil, tendo assim características epidemiológicas diferentes daquelas do patossistema que existiu no país entre 1957 a 1996, citrus-*Xac* (Bergamim et al., 2001)..

Apesar de existirem ainda áreas contaminadas no Estado de São Paulo, Barbosa et al. (2001) afirmam que a baixa incidência da doença se deve a campanha de erradicação do cancro.



No Estado de São Paulo, o método de controle utilizado é a erradicação, que se dá pelo corte e incineração de todas as plantas doentes e as aparentemente saudáveis, num raio de 30 m, em torno de uma planta em que foi observado os sintomas no pomar (Gimenes-Fernandes et al., 2000); caso ocorra em um talhão mais de 0,5% de plantas doentes, a erradicação das plantas é feita na área total do talhão. O cancro cítrico foi erradicado nos E.U.A., México, África do Sul, Norte da Austrália, Nova Zelândia e Moçambique. Houve reintrodução na Austrália e nos E.U.A. Nos outros estados do Brasil onde o patógeno é endêmico e a erradicação não representa uma operação econômica, e principalmente nos estados do Sul este é combatido pela poda drástica dos órgãos afetados e pulverização com calda bordaleza e sulfocálcica (Malavolta Jr., 1984).

## 4.2 Bacteriocinas

Historicamente o termo “bacteriocina” era aplicado para compostos antibióticos produzidos por isolados de bactérias com especificidade primária e ação restrita contra isolados do mesmo gênero. As bacteriocinas são constituídas de proteínas e suas especificidades e composição química as distinguem dos antibióticos (Vidaver, 1983).

A produção de bacteriocinas já foi observada para mais de 30 gêneros de bactérias, incluindo muitos patógenos de plantas (Vidaver, 1976). Após muitos estudos e caracterização de centenas de bacteriocinas, pode-se dizer que elas são muito heterogêneas quimicamente e possuem uma propriedade primária de restrição biológica específica (Vidaver 1983).

Do ponto de vista ecológico, as bacteriocinas servem como anti-competidores facilitando a colonização de um isolado de bactéria dentro da comunidade microbiana. Elas podem também ter papel de defesa e inibir a ocupação de outros isolados ou espécies bacterianas dentro de um nicho ocupado ou limitar o avanço de células bacterianas vizinhas (Riley & Wertz, 2002).

Na área de preservação de alimentos as bacteriocinas são muito utilizadas como a nisina utilizada para inibir a germinação de endosporos de *Clostridium botulinum* em queijos, na Inglaterra (Chung et al. 1989) e em produtos pasteurizados que utilizam ovos como matéria-prima nos EUA e em outros 45 países. A piscicolina é usada em

carnes de frango e em hortaliças folhosas visando inibir *Listeria monocytogenes* (Raloff, 1998).

Geralmente o DNA plasmidial está implicado na produção de bacteriocinas (Gross & Vidaver, 1978; Biagi & Azevedo, 1992; Heu et. al., 2001, Mohammad et. al., 2001). Entretanto, os plasmídios bacteriocinogênicos podem determinar não apenas a composição química das bacteriocinas, mas também a regulação de sua biossíntese, sua liberação da célula, e a imunidade da bactéria produtora, assim como, em alguns casos, a sua própria transferência para outros isolados por conjugação (Tagg et al., 1976). Porém, em algumas bactérias, são os genes cromossomais que codificam a produção da bacteriocina, como observado em *X. axonopodis* pv. *glycines* (Fett et al., 1987; Oliveira & Rosato, 1996) e *X. axonopodis* pv. *oryzae* (Xu & Gonzales, 1991).

A produção de bacteriocinas é afetada por alguns fatores: composição do meio de cultura para crescimento, concentração de ágar e tempo de incubação (Gross & Vidaver 1978). As condições ótimas de produção para cada caso devem ser determinadas empiricamente (Vidaver, 1983). Para os gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, Biagi & Azevedo (1992) sugerem a utilização de meio sólido 523 com 1,5% de ágar, tempo de incubação de 72 horas e curto período de exposição à luz ultravioleta (podendo variar de acordo com a linhagem ou espécie bacteriana).

Para estudos de produção de bacteriocina e sua utilização prática, como subsídio na diferenciação de espécies, patótipos ou raças de bactérias, necessita-se de uma boa caracterização dos isolados bacteriocinogênicos (Kurozawa, 1980) e a seleção de isolados indicadores com suficiente sensibilidade para não ocorrer equívoco na detecção (Gross & Vidaver, 1978).

O primeiro registro de tipagem por bacteriocinas de espécies de bactérias corineformes foi feito por Echandi (1976), que diferenciou 96% dos isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas com base na sensibilidade a bacteriocinas. Bacteriocinas de espécies de corinebactérias fitopatogênicas também foram caracterizadas por Gross & Vidaver (1978) e um esquema foi proposto de tipagem para diferenciarem isolados e espécies, baseado em padrões de produção e sensibilidade a estas substâncias.

Para diferenciar isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pela produção de bacteriocina, Kurozawa (1980) testou 36 isolados, sendo 23 bacteriocinogênicos, e todos os isolados foram sensíveis a pelo menos uma bacteriocina. Nas condições daquele trabalho separou-se os isolados dessa patovar em nove grupos, de acordo com a produção e sensibilidade à bacteriocina.

Maringoni & Kurozawa (2002) separaram isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), em 12 grupos, conforme à sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelos isolados bacteriocinogênicos, encontrando portanto variabilidade entre isolados de Cff quanto à produção de bacteriocinas.

Dentro do gênero *Agrobacterium*, a produção de bacteriocina foi verificada para a espécie *A. radiobacter* linhagem 84 (Kerr & Htay, 1974), o qual produz a bacteriocina denominada “agrocina 84” utilizada no controle biológico da galha da coroa.

No gênero *Erwinia*, isolados produtores de bacteriocinas foram observados para espécies de *E. chrysanthemi*, *E. herbicola*, *E. salicicis*, *E. uredovora*, *E. quercina* (Vidaver, 1976). Echandi & Moyer (1979) analisaram a produção, propriedades e morfologia de bacteriocinas de *E. chrysanthemi*, sendo os 18 isolados estudados divididos em cinco grupos com base na sensibilidade às bacteriocinas de três isolados produtores.

Vidaver & Buckner (1977), analisando vários isolados de *Pseudomonas syringae* de diversas patovares e hospedeiros, verificaram que 86% dos isolados foram bacteriocinogênicos e não encontrando correlação entre a origem do hospedeiro e a produção de bacteriocina.

Para *P. syringae* pv. *garcae* ocorrem diferenças na produção e sensibilidade à bacteriocina entre isolados do Brasil e do Quênia. Isolados brasileiros produziram bacteriocina com ação específica contra isolados do Quênia, os quais não produziram bacteriocina (Kairu, 1997).

Frey et al. (1996) relataram que todos os isolados de *Ralstonia solanacearum* testados exibiram atividade bacteriocinogênica contra isolados da mesma espécie, mas não contra isolados de outras espécies. Esses isolados testados foram separados em nove grupos com base no perfil de produção e sensibilidade à bacteriocina.

Avaliando a atividade bacteriocinogênica entre vinte e quatro isolados de *X. campestris* pv. *arracaciae*, Siqueira & Romeiro (1999) encontraram cinco isolados

produtores e duas indicadoras, utilizando bioensaios de forma padronizada, sem realizar testes de variáveis passíveis de influir de alguma forma no processo de síntese e sensibilidade.

Dezenove isolados de *X. vesicatoria* e um de *X. campestris* pv. *glycines* foram testados entre si a fim de se verificar a produção de bacteriocinas (Oliveira & Rosato, 1996). O isolado 333 de *X. campestris* pv. *glycines* produziu bacteriocina contra dez isolados de *X. vesicatoria* e exibiu um espectro de ação inibitório restrito quando testada contra 18 patovares de *X. campestris* e outras espécies bacterianas (*Echerichia coli*, *P. elodea*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bacillus subtilis* e *B. thuringiensis*). Esses autores também constataram que pode ocorrer competição e/ou antagonismo independente do efeito bacteriocinogênico, entre isolados de *X. vesicatoria*, quando cultivados juntos *in vitro*, ocorrendo decréscimo da população de células viáveis desses isolados.

Tudor-Nelson et al. (2003), estudando o antagonismo por bacteriocina de três raças de *X. vesicatoria* encontradas na Florida (raça 1, 2 e 3), detectaram que as bacteriocinas dos isolados da raça 3 inibiram o crescimento de todos os isolados da raça 1 e 11 isolados de outros gêneros de *Xanthomonas*, sendo a sensibilidade da raça 2 variável. Nenhum outro gênero de bactéria testado foi inibido pela raça 3.

Matsuo et al. (1981) sugeriram que há diferenças entre o tipo de bacteriocina produzida por *Xac*, do que aquela produzida por outros patovares de *Xanthomonas*, podendo essa ser uma propriedade específica da *Xac*.

Experimento conduzido para produção de bacteriocina em 19 isolados de *Xac*, Matsuo et. al. (1981) demonstraram que todos os isolados produziram substâncias antibacterianas contra a maioria dos patovares de *X. campestris*. Outro teste realizado pelos mesmos autores utilizando o isolado X 1-1-1 de *X. campestris* pv. *campestris* como indicador sensível, verificaram que os 48 isolados de *Xac* produziram bacteriocina enquanto que os outros isolados de várias espécies de *Xanthomonas* não produziram.

Nos experimentos realizados por Matsuo et. al. (1981) e Mohammadi et. al. (2001) foram verificados que isolados bacteriocinogênicos de *Xac* produzem bacteriocina contra si mesmos.

Estudos com isolados de *Xac* procedentes do Irã, com a finalidade de avaliar características fisiológicas e bioquímicas, diferenciaram isolados pela produção de

bacteriocina (Mohammadi et al., 2001). Foi constatada a presença de vários isolados bacteriocinogênicos de *Xac* porém a sensibilidade dos isolados às bacteriocinas variaram.

Jabeen et al. (2004) verificaram a sensibilidade de um isolado de *Xac* a bacteriocina de um isolado de *E. carotovora* que foi denominada erwiniocina NA4.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção e preservação dos isolados bacterianos

Nesse trabalho foram utilizados 48 isolados bacterianos de *Xac*, obtidos da Coleção de Culturas do Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara – SP (FUNDECITRUS), constituída de isolados de procedentes de várias regiões do Brasil, e 14 isolados de várias espécies e patovares de *Xanthomonas*, da coleção de culturas bacterianas do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu - SP. Todos isolados foram preservados pelos métodos de dessecação do papel de filtro ou em meio de cultura inclinado contendo óleo mineral esterilizado ou em tubos de microcentrifuga com solução salina tampão fosfato, 0.01 M pH 7,1 (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação de isolados bacterianos utilizados e sua referência

Isolado	Código	Local de coleta	
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	FDC-002	Lins-SP	
	FDC-004	Cuiabá-MT	
	FDC-007	Bataguassu-MS	
	FDC-011	Palmital-SP	
	FDC-016	Itaquiraí-MS	
	FDC-018	São Miguel D'oeste –PR	
	FDC-021	Araras-SP	
	FDC-022	Ourinhos-SP	
	FDC-039	Frutal-MG	
	FDC-075	Casa Branca-SP	
	FDC-101	São Sebastião do Caí – RS	
	FDC-106	Chapecó-SC	
	FDC-108	Maratá-RS	
	FDC-118	Umuarama-PR	
	FDC-121	Goio-Erê - PR	
	FDC-213	Presidente Prudente - SP	
	FDC-501	Iacri - SP	
	FDC-543	Rubinéia – SP	
	FDC-553	Aparecida D'oeste – SP	
	FDC-545	Avaré – SP	
	FDC-561	Cafelândia – SP	
	FDC-585	Barbosa - SP	
	FDC-601	Bom Princípio – RS	
	FDC-609	Chapecó – SC	
	FDC-616	Águas de Chapecó – SC	
	FDC-625	Aratiba – RS	
	FDC-714	Jales – SP	
	FDC-719	Parapuã – SP	
	FDC-769	Narandiba – SP	
	FDC-806	Boa Vista - RR	
		12844	-
		12845	-
		12851	-
		12853	-
		12856	-
		12864	-
	12867	-	
	12868	-	
	12874	-	
	12876	-	
	12917	-	
	12967	-	

Continua

continuação		
Isolado	Código	Local de coleta
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	12973	-
	12873	-
	14001	-
	14002	-
	14003	-
	14004	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>	Al 2940	Piracicaba - SP
	Al 2937	Salinópolis - SP
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Co 2909	São Manoel – SP
	Br 2908	São Manoel – SP
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	I-4	-
	F-41	-
	Feij 2496	Botucatu - SP
	Feij 7631	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	Man 2763	Casa Branca – SP
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	Mar 2850-A	Botucatu - SP
	Mar 2850-B	Botucatu - SP
<i>X. vesicatoria</i>	Pi 2046	-
	P-29	-
<i>X. cucubitae</i>	7582	-

FDC – Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara - SP



## **5.2 Produção de bacteriocinas**

### **5.2.1 Avaliação da produção de bacteriocina**

Quarenta e oito isolados de *Xac* foram testados entre si para verificar a produção de bacteriocina, utilizando as técnicas descritas por Kurozawa (1980), Matsuo et.al. (1981) e Maringoni & Kurozawa (2002). Os isolados foram repicados para o meio YPD (0,6g peptona, 3g dextrose, 3g extrato de levedura e 1000 mL água destilada) incubados durante 30° C/24h, e posteriormente semeados em placas de Petri contendo meio YPDA (meio YPD acrescido de 15g ágar) e, após o crescimento das colônias (30°C/24h), estas foram transferidas para outra placa de Petri contendo meio YPDA com o auxílio de um repicador de feltro, contendo nove discos de 4 mm de diâmetro (Maringoni & Kurozawa, 2002), onde cada disco correspondeu a um isolado de *Xac*, incubadas sob as mesmas condições. Essas placas serviram de matrizes para repicagens visando avaliar a produção de bacteriocinas. Para cada isolado bacteriano foram feitas no mínimo quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Após o crescimento dos isolados de *Xac* na superfície do meio de cultura, as placas foram colocadas, na posição invertida, em capela de exaustão, e adicionado 1 mL de clorofórmio em cada tampa das placas, permanecendo por 2 horas para inativação das bactérias. Para se observar a produção de bacteriocina foram vertidos 5 mL do meio YPDA semi-sólido (meio YPD acrescido de 5g ágar por litro) fundente (45° C), acrescido de 1 mL de suspensão bacteriana previamente cultivada em meio líquido YPD. As placas de Petri foram incubados durante 30° C/24h e observada a presença ou não de halo de inibição ao redor das colônias produtoras de bacteriocina (Mohammad et al., 2001).

### **5.2.2 Influência do meio de cultura, temperatura e tempo de incubação**

Nove isolados de *Xac* foram testados entre si, empregando-se a técnica descrita por Matsuo et.al.(1981) sendo estes cultivados em diferentes meios de cultura, temperaturas e tempos de incubação: YPDA (30°C/48 e 72h), BDA (água de cozimento de

200g de batatas, 20g de dextrose , 15g de ágar e 1000 mL de água) a 25°C e 30°C/ 24h) e NA+0,5% de NaCl (5g de peptona, 3g extrato de carne, 5g NaCl, 15g agar, 1000mL água destilada) a 25°C e 30°C/24h, com o intuito de se avaliar a influência dessas variáveis na produção de bacteriocina.

### **5.2.3 Avaliação da produção de bacteriocina por *Xanthomona axonopodis* pv. *citri* e sensibilidade de isolados de *Xanthomonas* spp.**

Foi avaliada a produção de bacteriocina de 25 isolados de de *Xac*, (FDC-806, FDC-213, FDC-022, FDC-616, FDC-121, FDC-609, FDC-075, FDC-106, FDC-767, FDC-714, FDC-118, FDC-585, FDC-625, FDC-601, FDC-561, FDC-553, FDC-007, FDC-011, 12976, 12864, 14002, 12856, FDC-039, FDC-545, FDC-501) contra 14 isolados de *Xanthomonas* spp. descritos na Tabela 1, a fim de detectar a produção e sensibilidade a bacteriocina pelos isolados de *Xac* utilizando-se as técnicas descritas no item 5.2.1.

## **5.3 Caracterização de bacteriocinas produzidas por isolados bacteriocinogênicos**

### **5.3.1 Produção de bacteriocina bruta em meio líquido**

O método utilizado foi adaptado de Gross & Vidaver (1990). Colônias de isolados bacteriocinogênicos (FDC-806 e Mar 2850-A) foram repicadas em meio líquido YPD (20 ml) e incubados a 30°C/24h, sob agitação. Em seguida a incubação, centrifugaram-se as suspensões bacterianas (aproximadamente 12000 g/2 min). Os sobrenadantes (bacteriocina bruta) obtidos foram transferidos para tubos de ensaio esterilizados, com tampas rosqueáveis. Foram vertidos 5 mL de meio YPDA semi-sólido fundente, contendo 1 mL de suspensão bacteriana (isolado indicador), previamente cultivado em meio YPD líquido. Seguida a solidificação do meio YPDA fundente foi colocado no centro da placa um disco de papel de filtro esterilizado (13 mm de diâmetro) e neste disco de papel foi depositado 20 µL da bacteriocina bruta. Os isolados foram testados um contra o outro. Foram feitas cinco repetições por isolado.

Os resultados foram avaliados 24 h após a incubação das placas de Petri, a 30°C, observando-se a presença (+) ou ausência (-) de halo inibição ao redor do disco de papel.

### **5.3.2 Sensibilidade térmica**

Amostras de 500 µL de meio de cultura contendo bacteriocina bruta dos isolados bacterianos (FDC-806 e Mar 2850-A) foram tratadas às temperaturas de: 37°C/60 min, 42°C/60 min, 65°C/30 min, 80°C/15 min e 100°C/15 min, conforme utilizado por Oliveira (1992) . Avaliou-se a atividade inibidora das amostras após o tratamento térmico com um isolado sensível (FDC-806 ou Mar 2850-A). Para tanto, verteu-se 5 mL do meio semi-sólido fundente (45° C), acrescido de 1 mL de suspensão bacteriana do isolado sensível previamente cultivada em meio líquido YPD, no meio YPDA. Um disco de papel de filtro (13mm de diâmetro) esterilizado foi colocado no centro da placa de Petri e no centro deste foi adicionado 20 µL da bacteriocina bruta tratada. Para cada temperatura realizaram-se cinco repetições. As placas de Petri foram incubadas a 30°C/24h. A presença de halo de inibição ao redor do disco do papel de filtro indicou a não degradação da bacteriocina pelo tratamento térmico. Os tratamentos testemunhas foram representados por meio de cultura YPD, com o extrato bruto sem o tratamento térmico (Gross & Vidaver, 1990; Oliveira & Rosato, 1996).

### **5.3.3 Sensibilidade enzimática**

Os ensaios para se analisar a sensibilidade das bacteriocinas às enzimas foram realizados com amostras de bacteriocinas bruta dos isolados FDC-806 e Mar 2850-A. Alíquotas de 500 µL de bacteriocinas brutas foram tratadas separadamente com proteinase K a 2% (QBIOGENE) 15 µL/mL, tripsina a 0,25% (GIBCO) 120µL/mL, lisozima a 1% (SIGMA) 60µL /mL, RNase a 2U/µL (INVITROGEN) 25µL/mL e DNase a 1U/µL (INVITROGEN )100 µL/mL, 37°/2 h, e então testadas em placa de Petri contra o isolado sensível (FDC-806 ou Mar 2850-A) como consta na item 5.3.1. Para cada teste com cada uma das enzimas realizaram-se cinco repetições.

#### **5.3.4 Atividade bacteriofágica**

À dois mililitros do extrato bruto dos isolados (FDC-806 e Mar 2850-A) foram acrescentados de 10%v/v de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada em agitador automático e deixada para decantar por 30 minutos visando a separação do clorofórmio do extrato bruto. Cerca de 100 $\mu$ L do extrato bruto tratado foi adicionado a 5mL de meio YPD semi-sólido fundente contendo 500 $\mu$ L dos isolados indicadores (FDC-806 e Mar 2850-A), cultivados em meio YPD, durante 30°C/24h, e vertido sobre uma placa de Petri contendo meio YPDA. Após 24 horas de incubação foi avaliada a presença de placas de lise, na superfície do meio de cultura onde houve o crescimento das bactérias

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Produção e sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* a bacteriocina**

Dos 48 isolados de *Xac* testados nesse trabalho, nenhum foi sensível á bacteriocinas produzidas pelos isolados da mesma patovar, conforme ilustrado na Figura 1. Constataram-se que isolados brasileiros de *Xac* utilizados nos testes não produziram bacteriocinas antagônica à própria patovar. No trabalho de Matsuo et al.(1981) a maioria dos isolados testados de *Xac* originário do Japão foram resistentes a própria bacteriocina, com exceção do isolado Ku 7101 que foi sensível à própria bacteriocina. Mohammadi et. al. (2001) verificaram que a maioria dos isolados iranianos de *Xac* foi sensível a bacteriocina de pelo menos um isolado bacteriocinogênico da *Xac*, embora tenha sido constatada a sensibilidade do isolado RK à sua própria bacteriocina, resultado semelhante àquele observado por Matsuo et al. (1981).

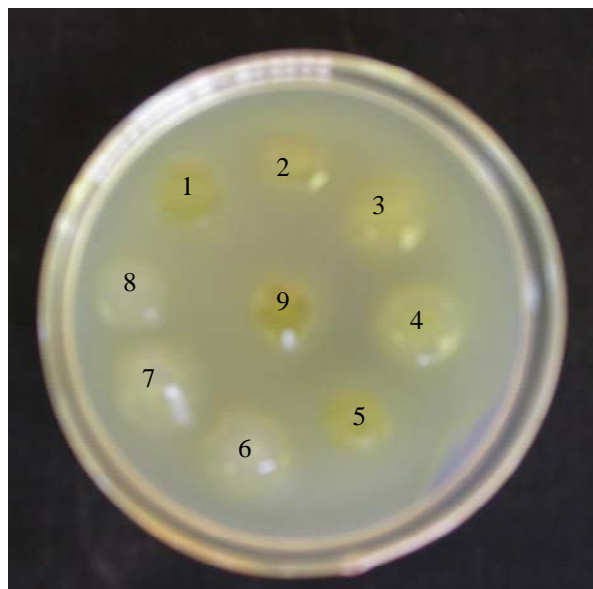


Figura 1. Insensibilidade do isolado de *X. axonopodis* pv. *citri* (FDC-585) a bacteriocinas produzidas por nove isolados da mesma patovar (1- FDC-002, 2- FDC-039, 3- FDC-021, 4- FDC-561, 5- FDC-501, 6- FDC-714, 7- FDC-769, 8- FDC-118 e 9- FDC-213)

Em decorrência da não detecção de bacteriocinas no meio de cultura e temperatura padrão, foram realizados experimentos a fim de avaliar a influência dos meios de cultura, temperaturas e tempos de incubação na produção de bacteriocinas entre os isolados de *Xac*. Nesses experimentos foi confirmada a não ocorrência da produção de bacteriocinas antagônicas aos isolados de *Xac*, mesmo variando o meio de cultura e a temperatura (Tabela 2) e o tempo de incubação (Tabela 3).

Tabela 2 – Efeito da temperatura de incubação e do meio de cultura na sensibilidade à bacteriocinas no tempo de incubação de 24 horas, por isolados de *X. axonopodis* pv. *citri*.

Isolado Produtor	Isolado Sensível			
	FDC-806, FDC-213, FDC-022, FDC-616, FDC-121, FDC-609, FDC-075, FDC-106, FDC-767			
	BDA		NA+NaCl	
	25°C	30°C	25°C	30°C
FDC-806	-	-	-	-
FDC-213	-	-	-	-
FDC-022	-	-	-	-
FDC-616	-	-	-	-
FDC-121	-	-	-	-
FDC-609	-	-	-	-
FDC-075	-	-	-	-
FDC-106	-	-	-	-
FDC-767	-	-	-	-

(-) ausência de halo de inibição

Tabela 3 – Efeito do tempo de incubação na sensibilidade à bacteriocinas por isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* na temperatura de incubação de 30°C.

Isolado Produtor	Isolado Sensível	
	FDC-806, FDC-213, FDC-022, FDC-616, FDC-121, FDC-609, FDC-075, FDC-106, FDC-767	
	48 h	72 h
FDC-806	-	-
FDC-213	-	-
FDC-022	-	-
FDC-616	-	-
FDC-121	-	-
FDC-609	-	-
FDC-075	-	-
FDC-106	-	-
FDC-767	-	-

(-) ausência de halo de inibição

meio YPDA

A variação do meio de cultura, temperatura e tempo de incubação não surtiu efeito na produção e na sensibilidade às bacteriocinas pelos isolados de *Xac* avaliados. O mesmo não ocorreu no trabalho de Biagi & Azevedo (1992) pois foram verificadas diferenças na porcentagem de isolados bactericinogênicos dentro do gênero *Xanthomonas*, em resposta ao meio de cultura utilizado e ao maior tempo de incubação que facilitou a observação do halo de inibição. Esse resultado também foi observado por Oliveira & Rosato (1996) em *X. vesicatoria*.

Quanto a temperatura de incubação, esta pode afetar a formação de halo de inibição, segundo Gross & Vidaver (1978), para bactérias corineformes o maior halo de inibição foi observado a 20°C, sendo até quatro vezes maior que a 25°C. Resultado semelhante foi verificado para *X. axonopodis* pv. *glycines* pois houve maior produção de bacteriocina na temperatura de 20°C, abaixo da ótima de crescimento que foi de 30°C (Fett et al. 1987).

Os 25 isolados de *Xac* produziram bacteriocinas que inibiram o crescimento dos isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Mar 2850A e Mar 2850B) e um dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* (Br 2808). O isolado de *X. axonopodis* pv. *manihotis* apresentou sensibilidade variável às bacteriocinas dos isolados FDC-213, FDC-106, FDC-585, FDC-625, FDC-601, FDC-007, 14002 e 12856 (Tabela 4). A Figura 2 ilustra a sensibilidade do isolados Mar 2850A de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* às bacteriocinas produzidas por nove isolados de *Xac*.

Foi detectada a sensibilidade da maioria dos isolados de *Xac* às bacteriocinas dos isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Mar 2850A e Mar 2850B) com exceção dos isolados FDC-585, FDC-625, FDC-601, FDC-011 e 14002 que foram insensíveis (Tabela 5).



Tabela 4 - Produção de bacteriocinas por vinte e cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e sensibilidade de isolados de *Xanthomonas* spp.

Isolado produtor	Isolado sensível												
	Al 2940	Man-2763	Feij-2498	Pi2046	P-29	7582	Co 2909	Br 2908	Mar 2850-A	Mar 2850-B	I-4	F-41	Al 2937
FDC-806	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-213	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-022	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-616	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-121	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-609	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-075	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-106	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-767	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-714	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-039	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-545	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-501	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-118	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-585	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-625	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-601	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-561	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-553	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-007	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
FDC-011	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
12864	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
14002	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
12856	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
12876	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

(+) presença de halo de inibição (-) ausência de halo de inibição

Tabela 5 - Produção de bacteriocina por isolados de *Xanthomonas* spp. e sensibilidade de vinte e cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Isolado produtor	Isolado sensível																								
	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	FDC	
	806	213	022	616	121	609	075	106	767	714	039	545	501	118	585	625	601	561	553	007	011	12976	12864	14002	12856
Al 2937	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Al 2940	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Man-2763	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Feij-2498	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Feij-7631	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pi2046	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P-29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Co2909	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7582	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Br 2908	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mar 2850-A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Mar 2850-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
I-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F-41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) presença de halo de inibição (-) ausência de halo de inibição

Figura 2. Ação inibitória da bacteriocina produzida por nove isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (1- FDC-806, 2- FDC-213, 3- FDC-022, 4- FDC-616, 5- FDC-121, 6- FDC-609, 7- FDC-075, 8- FDC-106 e 9- FDC-767) contra um isolado indicador de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Mar 2850-A).

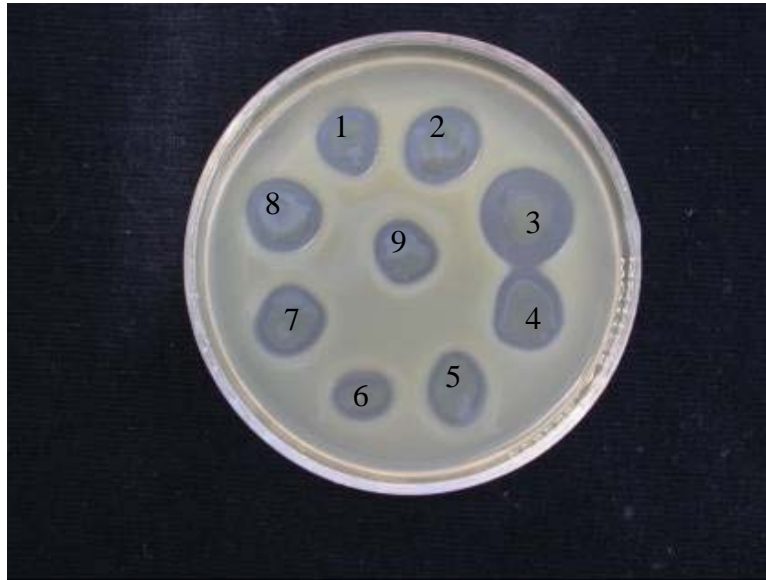


Figura 3. Ação inibitória da bacteriocina de dois isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (1- Mar 2550-A e 2- Mar 2850-B) contra um isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (FDC-806).



A produção de bacteriocina inibitórias por bactérias do gênero *Xanthomonas* contra isolados de uma outra espécie ou patovar é comum (Matsuo et.al.1981; Fett et al. 1987; Biagi & Azevedo, 1992; Oliveira & Rosato, 1996). Esse fato foi observado para maioria dos isolados de *Xac* às bacteriocinas produzidas pelos isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Na literatura há relato da sensibilidade da *Xac* a erwinicina NA4, produzida por *E. carotovora* (Jabeen et al, 2004).

Com os resultados obtidos neste trabalho evidencia-se a possibilidade do uso de bacteriocinas produzidas por *Xac* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* para identificação dessas patovares.

## 6.2 Caracterização de bacteriocinas produzidas por *Xac* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae*

Os resultados referentes ao tratamento térmico dos extratos de bacteriocina brutos dos isolados FDC-806 (*Xac*) e Mar 2850-A (*X. axonopodis* pv. *passiflorae*), em diferentes temperaturas e tempo de exposição, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Efeito do tratamento térmico, em diferentes temperaturas e tempo de exposição, sobre bacteriocinas produzidas por *Xac* (FDC-806) e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Mar 2850-A).

Isolado	Testemunha	Temperatura e tempo de incubação		
		37°C/60min	42°C/60min	65°C, 80°C e 100°C/15min
FDC-806	+	+	-	-
Mar-2850A	+	+	+	-

(+) presença de halo de inibição

(-) ausência de halo de inibição

A bacteriocina produzida pelo isolado FDC-806 (*Xac*), foi degradada a temperatura igual ou superior a 42°C, nos diferentes tempos de exposição. Já a bacteriocina produzida pelo isolado Mar 2850-A (*X. axonopodis* pv. *passiflorae*) foi degradada a temperatura igual ou superior a 65°C por 15 minutos. Bacteriocinas termolábeis foram

produzidas por *Erwinia* spp. (Echandi & Moyer, 1979) e *X. axonopodis* pv. *glycines* (Fett et al. 1987)

Porém a maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias corineformes são resistentes ao calor (termoestáveis) com exceção daquelas produzidas por *Cff* (Gross & Vidaver, 1978).

Na Tabela 7 são apresentados os resultados referentes à ação das enzimas proteinase K, tripsina, lisozima, RNase e DNase sobre os extratos brutos de bacteriocina produzida pelos isolados FDC-806 e Mar 2850-A. Constatou-se nas concentrações e tempo de tratamento empregados com as diferentes enzimas, que a bacteriocina produzida pelo isolado FDC-806 foi resistente apenas à lisozima enquanto que a bacteriocina do isolado Mar 2850-A, foi resistente à proteinase K, tripsina, lisozima e RNase.

Tabela 7 – Atividade das amostras de bacteriocina após o tratamento com as enzimas proteinase, tripsina, lisozima, RNase e DNase, com tempo de incubação de 2 horas a 37°C

Tratamentos	Proteinase K	Tripsina	Lisozima	RNase	DNase
FDC-806	-	-	+	-	-
Mar-2850A	+	+	+	+	-

(+) resistente ; (-) sensível

A origem protéica da bacteriocina produzida pelo isolado FDC-806 foi sugerida, pois Fett et al. (1987), Oliveira & Rosato (1996) e Tudor-Nelson et al.(2003) encontraram resultados semelhantes com bacteriocinas por eles estudadas. Entretanto, não se descarta a hipótese da bacteriocinas produzida pelo isolado Mar 2850-A seja também de origem protéica, necessitando de um maior tempo de incubação para ocorrer as reações enzimáticas e também há a possibilidade da formação de complexos com moléculas diversas presentes no extrato bruto que dificultaram a ação da proteinase K, conforme constatado por Oliveira (1992).

A sensibilidade a DNase pode ser explicada pela presença de fragmentos de DNA na bacteriocina bruta (Oliveira, 1992). Segundo Fett et al. (1987) podem ocorrer diferenças na sensibilidade ao tratamento com tripsina e DNase indicando que *X.*

*axonopodis glycines* produzem mais de um tipo de bacteriocina. RNase e DNase não afetaram a atividade das bacteriocinas produzidas pela maioria das bactérias corineformes (Gross & Vidaver, 1978) e a bacteriocina de *Cff* é resistente a trypsin.

As bacteriocinas dos isolados bacterianos avaliados neste trabalho foram resistentes a ação da lisozima demonstrando a não associação com moléculas de lipídeos ou carboidrato (Yildirim & Johnson, 1998; Park et al., 2003).

Sabendo-se que bacteriófagos podem formar áreas de inibição no crescimento de bactérias *in vitro*, semelhantes à ação de bacteriocinas, foi realizado um ensaio para verificar a presença de partículas de bacteriófagos nos extratos brutos de bacteriocinas dos isolados FDC-806 e Mar 2850-A. Não foi observada a presença de placas de lise no crescimento dos isolados bacterianos indicadores, evidenciando a não presença de partículas de bacteriófagos nos extratos brutos analisados. Este procedimento é padrão para caracterização de bacteriocinas conforme trabalhos de Frey et al. (1987), Oliveira & Rosato (1996) e Tudor- Nelson et al. (2003).

De acordo com Bradley (1967) os nomes das bacteriocinas geralmente derivam do gênero, espécie ou patovar (Fett et al., 1987) usando-se a raiz do nome derivado seguido do sufixo “cina”. Então como se desconhece citações sobre essas bacteriocinas estudadas, sugere-se o nome de citricina para bacteriocina da *Xac* e passifloricina para a da *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Os genes responsáveis pela produção da citricina e da passifloricina poderão ser isoladas, sequenciadas e serem inseridas respectivamente em plantas de maracujá e de citros visando à obtenção de plantas resistentes à mancha oleosa e ao cancro cítrico.

## 7 CONCLUSÕES

- Os isolados de *Xac* avaliados, provenientes de várias localidades do Brasil, não são sensíveis à bacteriocina da própria patovar.
- Isolados de *Xac* produzem bacteriocina inibitória a *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e de ação variável para *X. campestris* pv. *campestris* e *X. axonopodis* pv. *manihotis*
- A maioria dos isolados de *Xac* são sensíveis a bacteriocina produzida por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.
- Bacteriocina produzida por isolados de *Xac* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* são termolábeis e diferenciam-se quando à ação das enzimas proteinase K, tripsina e RNase.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**AGRIANUAL 2004.** São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformação. 2004 -

BARBOSA, J.C.; GIMENES-FERNADES, N.; MASSARI, C. A.; AYRES, A.J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo Sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.27, p.30-35, 2001.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; GOTTWALD, T.R.; LARANJEIRA, F.F. Spatial distribution of citrus canker in São Paulo. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT DISEASE EPIDEMIOLOGY, 2001, Ouro Preto. **Proceeding...** Ouro Preto: International Society of Plant Pathology, 2001, p.28-29.

BIAGI, C.M.R.; AZEVEDO, J.L. Detecção de bacteriocinas produzidas por bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.49, p.1-8, 1992.



BIAGI, C.M.R.; AZEVEDO, J.L. Eliminação da produção de bacteriocinas em *Erwinia* e *Pseudomonas* fitopatogênicas. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52, p.148-150, 1995.

BRADLEY, D.E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. **Bacteriological Reviews**, Washington, v.31, p.230-314, 1967.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **Biológico**, São Paulo, v.23, p.101-111, 1957.

CIVEROLO, E.L. Bacterial canker disease of citrus. **Journal of Rio Grande Valley Horticulture Society**, Texas, v.37, p.127-145, 1984.

CHUNG K, DICKSON J, CROUSE J.. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.1329–1333, 1989.

ECHANDI, E. Bacteriocin production by *Corynebacterium michiganense*. **Phytopathology**, St. Paul, v.66, p.430-432, 1976.

ECHANDI, E. & MOYER, J.W. Production, properties, and morphology of bacteriocins from *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology**, St. Paul, v.69, p. 1204-1207, 1979.

FEICHTENBERGER, E. Pesquisa em cancro citrico pelo Instituto Biológico atualizado: 1982-1984. **Laranja**, Cordeirópolis, v.5, p.237-251, 1984.

FETT, W.F.; DUNN, M.F.; MAHER, G.T.; MALEEF, B.E. Bacteriocin and temperate phage of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. **Current Microbiology**, New York, v.16, p.137-144, 1987.

FREY, P; SMITH, J.J.; ALBAR, L.; PRIOR, P.; SADDLER, G.S.; TRIGALET-DEMERY, D.; TRIGALET, A. Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race 1 of the French West Indies and correlation with genomic variation of pathogen. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.473-479, 1996.

Cancro Citrico. **FUNDECITRUS**, Araraquara, 7 jun 2005. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>> Acesso em 7 jun 2005.

GABRIEL, D.W.; KINGSLEY, M.T.; HUNTER, J.E.; GOTTWALD, T.R. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Shmith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* straim. **International Journal System Bacteriology**, Bordeaux, v.39, p. 14-22, 1989.

GIMENES-FERNADES, N; BARBOSA, J.C.; AYRES, A.J.; MASSARI, C. A. Plantas doentes não detectadas nas inspeções dificultam a erradicação do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, p.320-325, 2000.

GOODMAN, R.N. The infection process. In: INTERNATIONAL CITRUS SYMPOSIUM, 12, 1962, Riverside. **Proceeding...** Riverside: University of California, 1962, p 3-72.

GOTO, M.; OHTA, K; OKABE, N. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. 2. Longevity and survival density of the bacterium on artificially infested weeds, plant residues and soils. **Annual Phytopathology Society Japan**, Tokyo,v.41, p.141-147, 1975.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1990, 342p.

GOTO, M. Plant diseases of international importance. 7. Citrus Canker, Disease of fruit crops. **Printice Hall Publish**, Englewood Cliffs, v.3, p170-208, 1992.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAN, J.H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, n.9, p.930-935, 1992.

GOTTWALD, T.R.; McGUIRE, R.C.; GARRAN, S. Asiatic citrus caker: spatial and temporal spread in simulated new planting situation in Argentina. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, p.739-745, 1988.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R. Research perspectives on eradication of citrus bacterial canker disease in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p.1193-1200, 1991.

GRAHAN, J.H.; GOTTWALD, T.R.; CIVEROLO, E.L.; McGUIRE, R.G. Population dynamic and survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, n.5, p.423-427, 1989.

GRAHAN, J.H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and strain of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in cultivars varying in susceptibility to bacterial disease. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, n.11, p.1319-1325, 1992.

GRAHAN, J.H. Varietal susceptibility to citrus canker: Observation from southern Brazil. **Citrus Industry**, St., Bartow, v.82, n.6, p.15-17, 2001.

GROSS, D.C.; VIDAVER, A.K. Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. **Canadian Journal Microbiology**, Toronto, v.25, p.367-374, 1978.

GROSS, D.C.; VIDAVER, A.K. Bacteriocins. In: **Methods in Phytobacteriology**. Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 245-249, 1990.

HEU, S.; OH, J.; KANG, Y, RYU, S; CHO, S. K.; CHO, Y.; CHO, M. *gly* gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas*

*campestris* pv. *glicines* 8ra. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.67(9), p4105-4110, 2001.

JABEEN, N.; RASOOL, S.A.; AHMAD, S.; AJAZ, M.; SAEED, S. Isolation, identification and bacteriocin production by indigenous disease plant and soil associated bacteria, **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v.7, n.11, p.1893-1897, 2004.

KAIRU, G.M. Biochemical and pathogenic isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. **Plant Pathology**, Oxford,, v.46, p. 239-246, 1997.

KERR, A. & HTAY, K. Biological control of crown gall through bacteriocin production. **Physiology Plant Pathology**, Bangor, v.4, p.37-44, 1974.

KUIZUMI, M.; KIMIJIMA, E.; TSUHAMOTO, T.; TOGAWA, M.; MASUI, S. Dispersion of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. In: International Society of Citriculture, 1996, Sun City. **Proceeding...** Sum City, 1996, p.340-344.

KUROZAWA, C. **Caracterização de *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen através de sorologia e sensibilidade a bacteriófagos, a drogas e a bacteriocina**. 1980. 61f. tese (Livre-docência) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MALAVOLTA Jr, V, A. Cancro cítrico – Prevenção e erradicação. **Laranja**, Cordeirópolis, v.4, p.189-196, 1984.

MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C. Tipificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por bacteriocinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37(9), p.1339-1355, 2002.

MATSUO, N; MATSUYAMA, N; WAKIMOTO, S. Production of a specific bacteriocin by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Annual Phytopathology Society Japan**, , Tokyo, v. 47, p.571-574, 1981.

MOHAMMAD, M.; MIZÂEE, M.R.; RAHIMIAN, H. Physiological and biochemical characteristics of iranian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the agent of citrus bacterial canker disease. **Journal Phytopathology**, Berlin, v.149, p.65-75, 2001.

NACIMENTO, J.F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J.M.A.; RÊGO, M.M.; ARAUJO, A.E.S. Ocorrência de Cancro Cítrico no Estado de Roraima, **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, p.81, 2003.

NAMEKATA, T. Citrus canker disease situation in Brazil. ROSSETI, V. (Coord.) In: International Symposium of Citrus Canker, Declinio/Blight and Similar Disease, 1, 1987, São Paulo, SP. **Proceeding...** Campinas: Fundação Cargil, p.9-14, 1988.

NAMEKATA, T. O cancro cítrico. In: O. RODRIGUES, F. VIÉGAS, J. POMPEU JR. & A.S. AMARO (Eds), **Citricultura Brasileira**. 2º. Ed., Fundação Cargil, p.775-786, 1991.

OLIVEIRA, V.M. **Produção de bacteriocina por *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*: detecção, caracterização e potencial para proteção de plantas.** 1992. 224f. Dissertação (Mestrado) - UNICAMP, Campinas.

OLIVEIRA, V.M.; ROSATO, Y.B. *In vitro* effect of a bacteriocinogenic strain over sensitive and non-sensitive strain of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.22, p 162-168, 1996.

PARK, S.H.; ITOH, K.; FUJISAWA, T. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 95, p.294–300, 2003.

PORTO, O .M.; DORNELES,C.M.M.; PORTO, M.D.M. Ocorrência de cancro cítrico no Rio Grande do Sul. Congresso Brasileiro de Fruticultura, 6, 1981, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981, p.1386-1388.

RALOFF J. Staging germ warfare in foods. **Science News**, Washington, v.153:89–90, 1998.

RILEY, M.A.; WERTZ, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application, **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.56, p.117–137, 2002.

PRATES, H.S.; NAKANO, O .; GRAVENA, S. **A minadora das folhas de citros *Phyllocnistis citrella* (Stainton).** Comunicado Técnico 129, Campinas: CATI , 3p, 1996.

RODRIGUES, J.C.V.; ROSSETTI, V.; MACHADO, M.A.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; NOGUEIRA, N.L. Lagarta minadora dos citros: um fator do aumento de pragas e cancro cítrico. **Laranja**, Cordeirópolis, v.19, n.1, p.49-60, 1998.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia vegetal**. Viçosa: Ed UFV, 2001, 279p.

ROSSETTI, V.V. **Manual ilustrado de doenças do citros**. Piracicaba: Fealq/Fundecitrus, 2001, 207p.

SCHUBERT, T.S.; RIZVI, S.A.; SUN, X.; GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; DIXON, W.N. Meeting the challenge of eradication citrus canker in Florida Again. **Plant Disease**, St. Paul, v.85(4), p.340-356, 2001

SIQUEIRA, M.F.; ROMEIRO, R.S. Atividade bacteriocinogênica entre isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae* . **Revista Ceres**, Viçosa, v.46, p.103-107, 1999.

SUN, X. STALL, R.E.; JONES, J.B.; CUBERO, J.; GOTTWALD, J.H.; DIXON, W.N.; SCHUBERT, T.S.; CHALOUX, P.H.; STROMBERG, V.K.; LACY, G.H.; SUTTON, B.D. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from key/mexican lime e alemow in South Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, p.1179-1188.



TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. **Bacteriological Review**, Washington, v.40, p.722-756, 1976.

TAKATSU, A. Preservação das bactérias fitopatogênicas pelo método de dessecação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.5, p.461, 1980.

TOLEDO, L. R. O desafio dos pomos de ouro. **Globo Rural**, São Paulo, n.232, p.40-48, 2005.

TUDOR-NELSON, S.M.; MINSAVAGE, G.V.; STALL, R.E.; JONES, B.J. Bacteriocin-like substances from tomato race 3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, St. Paul, v.93, n.11, p.1415-1421, 2003.

TUITE, J. Plant Pathological Methods fungi and bacterial. **Burgess Publishings Company**, Lafayette. 239p, 1969.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal System Bacteriology**, Bordeaux, v.45, p.472-489, 1995.

VERNIÈRE, C.; HARTUNG, J.S.; PRUVOST, O.P.; CIVEROLO, E.L.; ALVAREZ, A.E.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonoposis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology**, Ireland, v.104, p.477-487, 1998.

VIDAVER, A.K. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.14, p.451-465, 1976.

VIDAVER, A . K. Bacteriocins: the lure and the reality. **Plant Disease**, St Paul, v.67, p.471-475, 1983.

VIDAVER, A.K.; BUCKNER, S. Typing of fluorescent phytopathogenic pseudomonads by bacteriocin production. **Canadian Journal Microbiology**, Toronto, v.24, p.14-18, 1977.

XU, G. W.; GONZALEZ, C. F. Plasmid, genomic, and bacteriocin diversity in U.S. strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. **Phytopathology**. St. Paul, v.81, p.628-631, 1991.

YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M.G. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. **Letters in Applied Microbiology**, London, v.26(4), p.297-304, 1998.