

Produção e sensibilidade de isolados brasileiros de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* à bacteriocinas*

Marcel Bonini¹, Júlio Rodrigues Neto² e Antonio Carlos Maringoni¹

¹Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, CP 237, 18603-970 Botucatu, SP ²Instituto Biológico, CP 70, 13001-970 Campinas, SP. *Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada à Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP, Botucatu, SP.

Autor correspondente: Antonio Carlos Maringoni (maringoni@fca.unesp.br)

Data de chegada: 16/03/2012. Aceito para publicação em: 01/08/2012.

1806

RESUMO

Bonini, M.; Rodrigues Neto, J.; Maringoni, A.C. Produção e sensibilidade de isolados brasileiros de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* à bacteriocinas. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.3, p.232-234, 2012.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a produção e a sensibilidade de 48 isolados brasileiros de *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) à bacteriocinas.

Pelos resultados obtidos, nenhum isolado de Xac foi sensível às bacteriocinas produzidas pelos isolados bacterianos avaliados.

Palavras-chave adicionais: cancro cítrico, *Citrus* spp., bactéria

ABSTRACT

Bonini, M.; Rodrigues Neto, J.; Maringoni, A.C. Production and sensitivity of Brazilian isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* to bacteriocins. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.3, p.232-234, 2012.

The aim of this study was to evaluate the production and sensitivity of 48 Brazilian isolates of *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) to bacteriocins.

Based on the obtained results, no isolate of Xac was sensitive to the bacteriocins produced by the evaluated bacterial isolates.

Additional keywords: citrus canker, *Citrus* spp., bacterium

O cancro cítrico é uma das principais doenças bacterianas da parte aérea que afeta a cultura dos citros em várias regiões do mundo. No Brasil, esta doença foi inicialmente constatada por A. A. Bitancourt, em 1957, na região da Alta Sorocabana, no estado de São Paulo. Atualmente, no país, além do estado de São Paulo, esta doença já foi constatada em outros estados da federação entre eles: Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. São conhecidos seis diferentes tipos de cancro que ocorrem em *Citrus* spp., porém no Brasil há a ocorrência do cancro cítrico asiático ou cancrose A, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), em plantas cítricas em geral, e a cancrose C, causada por *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, em limão galego (7). Conforme Bull et al. (2), *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* são denominadas atualmente de *X. citri* subsp. *citri* e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*, respectivamente.

Inúmeras técnicas têm sido empregadas para a caracterização de diferentes gêneros e espécies de isolados bacterianos sendo a produção e sensibilidade à bacteriocinas uma delas. Historicamente, o termo bacteriocina era aplicado para compostos antibióticos produzidos por bactérias com especificidade primária e ação restrita a isolados do mesmo gênero. Entretanto, as bacteriocinas são constituídas de proteínas e suas especificidades e composição química as distinguem dos antibióticos (6, 8).

A produção de bacteriocinas já foi observada em mais de 30 gêneros de bactérias, incluindo muitos patógenos de plantas (9). Após muitos

estudos e caracterização de centenas de bacteriocinas, constatou-se que elas são quimicamente heterogêneas e possuem propriedade primária de restrição biológica específica (9).

Do ponto de vista ecológico, as bacteriocinas servem como anticompetidores que facilitam 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 dentro de um nicho ou limitar o avanço de células bacterianas vizinhas (6).

Em experimento conduzido por Matsuo et. al. (4), no Japão, visando avaliar a produção de bacteriocinas em 19 isolados Xac, foi constatado que todos isolados de Xac produziram substâncias inibitórias a maioria dos isolados de várias patovares de *X. campestris* ensaiadas. Em outro ensaio realizado pelos mesmos autores, utilizando o isolado X 1-1-1 de *X. campestris* pv. *campestris* como indicador sensível, constatou que 48 isolados de Xac produziram bacteriocinas enquanto que os outros isolados de várias espécies de *Xanthomonas* não foram produtores dessas substâncias (4). Estudos com isolados de Xac procedentes do Irã, com a finalidade de avaliar características fisiológicas e bioquímicas, diferenciaram os isolados pela produção de bacteriocinas (5). Foi constatada a presença de vários isolados de Xac bacteriocinogênicos, porém a sensibilidade dos isolados variaram (5). Nos experimentos realizados por Matsuo et. al. (4) e Mohammad et. al. (5) foram verificados que isolados bacteriocinogênicos de Xac produzem bacteriocinas contra eles mesmos.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de bacteriocinas entre isolados brasileiros de Xac. Para tanto, 48 isolados de Xac (Tabela 1), obtidos de diferentes localidades do país, pertencentes à coleção do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), Araquara, SP, foram testados entre si para verificar a produção de bacteriocinas, utilizando as técnicas descritas por Matsuo et.al. (4) e Maringoni & Kurozawa (3). Os isolados foram transferidos inicialmente 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 por litro). Após o crescimento das colônias (30°C/24h), estas foram transferidas para outra placa de Petri de vidro contendo meio YPDA, com o auxílio de um aparato contendo nove discos de feltro de 4 mm de diâmetro (2), onde cada disco

correspondeu a um isolado de Xac, As placas de Petri foram incubadas nas mesmas condições. Essas placas serviram de matrizes para repicagens, visando avaliar a produção de bacteriocinas. Para cada isolado bacteriano foram feitas quatro repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri de vidro. Após o crescimento dos isolados de Xac na superfície do meio de cultura (30°C/24h), as placas foram colocadas, na posição invertida, em capela de exaustão, e adicionado 1 mL de clorofórmio em cada tampa, permanecendo por 2 horas para inativação das bactérias. Para se observar a produção de bacteriocinas, 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 a 30 °C, durante 24 h. As placas de Petri foram incubadas durante 30°C/24 h e observada a presença ou não de halo de inibição ao redor das colônias produtoras (4).

Os 48 isolados de Xac avaliados não produziram bacteriocinas antagonicas ou inibitórias à mesma patovar, conforme ilustrado na Figura 1. No trabalho de Matsuo et.al.(4) os isolados de Xac foram resistentes à própria bacteriocina, com exceção do isolado Ku 7101 que foi sensível à bacteriocina produzida por ele. Mohammad et. al. (5) verificaram que a maioria dos isolados iranianos de Xac foi sensível à bacteriocina de pelo menos um isolado de Xac, embora tenha sido constatada a sensibilidade ao isolado RK, à sua própria bacteriocina, resultado semelhante àquele observado por Matsuo et al. (4). Embora não tenha sido constatada a sensibilidade dos isolados de Xac às bacteriocinas produzidas por eles neste trabalho, Bonini et al. (1), trabalhando com 25 isolados de Xac que estão listados na Tabela 1, constataram todos os isolados de Xac produziram bacteriocinas que foram sensíveis a isolados de *X. campestris* pv. *campestris* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e que apenas 20 isolados de Xac foram sensíveis às bacteriocinas produzidas por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Os resultados aqui obtidos demonstraram que os isolados de Xac são homogêneos, sendo os mesmos insensíveis às bacteriocinas

Tabela 1. Relação dos isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* oriundos do FUNDECITRUS.

Isolado	Código	Local
1	FDC-002	Lins-SP
2	FDC-004	Cuiabá-MT
3	FDC-007	Bataguassu-MS
4	FDC-011	Palmital-SP
5	FDC-016	Itaquiraí-MS
6	FDC-018	São Miguel D'oeste -PR
7	FDC-021	Araras-SP
8	FDC-022	Ourinhos-SP
9	FDC-039	Frutal-MG
10	FDC-075	Casa Branca-SP
11	FDC-101	São Sebastião do Cai - RS
12	FDC-106	Chapecó-SC
13	FDC-108	Maratá-RS
14	FDC-118	Umuarama-PR
15	FDC-121	Goio-Erê - PR
16	FDC-213	Presidente Prudente - SP
17	FDC-501	Iacri - SP
18	FDC-543	Rubinéia - SP
19	FDC-553	Aparecida D'oeste - SP
20	FDC-545	Avaré - SP
21	FDC-561	Cafelândia - SP
22	FDC-585	Barbosa - SP
23	FDC-601	Bom Princípio - RS
24	FDC-609	Chapecó - SC
25	FDC-616	Águas de Chapecó - SC
26	FDC-625	Aratiba - RS
27	FDC-714	Jales - SP
28	FDC-719	Parapuã - SP
29	FDC-769	Narandiba - SP
30	FDC-806	Boa Vista - RR
31	12844	-
32	12845	-
33	12851	-
34	12853	-
35	12856	-
36	12864	-
37	12867	-
38	12868	-
39	12874	-
40	12876	-
41	12917	-
42	12967	-
43	12973	-
44	12873	-
45	14001	-
46	14002	-
47	14003	-
48	14004	-

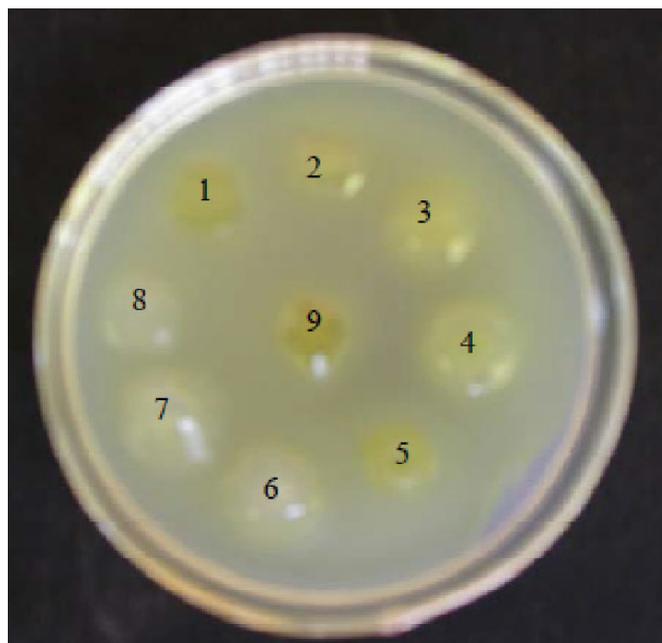


Figura 1. Insensibilidade do isolado de *X. axonopodis* pv. *citri* (FDC-585) às bacteriocinas produzidas por outros nove isolados da bactéria (1 - FDC-002, 2 - FDC-039, 3 - FDC-021, 4 - FDC-561, 5 - FDC-501, 6 - FDC-714, 7 - FDC-769, 8 - FDC-118 e 9 - FDC-213).

poduzidas por eles. Essa característica não é um bom marcador biológico para avaliar a variabilidade dos isolados de Xac, diferente do observado para *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, em que 17 isolados bacterianos puderam ser agrupados em 12 diferentes grupos em função da sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelos isolados bacteriocinogênicos (3).

AGRADECIMENTOS

A FUNDECITRUS, pelo fornecimento dos isolados bacterianos e à FAPESP, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonini, M.; Maringoni, A.C.; Rodrigues Neto, J. Characterization of *Xanthomonas* spp. strains by bacteriocins. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.1, p.24 - 29, 2007.
2. Bull, C.T.; De Boer, S.H.; Denny, T.P.; Firrao, G.; Fischer-Le Seaux, M.; Saddler, G.S.; Scortichini, M.; Stead, D.E.; Takikawa, Y. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. **Journal of Plant Pathology**, Pizza, v.92, n.3, p.551-592, 2010.
3. Maringoni, A.C.; Kurozawa, C. Tipificação de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por bacteriocinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n.9, p. 1339-1345, 2002.
4. Matsuo, N.; Matsuyama, N.; Wakimoto, S. Production of a specific bacteriocin by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Annals Phytopathology Society of Japan**, Tokyo, v. 47, p.571-574, 1981.
5. 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 of Phytopathology**, Berlin, v.149, p.65-75, 2001.
6. Riley, M.A.; Wertz, J.E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.56, p.117-137, 2002.
7. Rossetti, V. **Manual ilustrado das doenças dos citros**. Piracicaba: FEALQ; FUNDECITUS, 2001. 207p.
8. Vidaver, A.K. Bacteriocins: the lure and the reality. **Plant Disease**, St Paul, v.67, p.471-475, 1983.
9. Vidaver, A.K. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.14, p.451-465, 1976.