PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR DIFERENTES ISOLADOS E RAÇAS FISIOLÓGICAS DE *Xanthomonas campestris* PV. *malvacearum* (E.F. SMITH, 1901) DYE, 1978

EDERALDO JOSÉ CHIAVEGATO
Engº Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. CLÉLIO LIMA SALGADO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1988

Chiavegato, Ederaldo José
C532p Produção de bacteriocinas por diferentes isolados e raças fisiológicas de Xanthomonas campestris pv. malvacearum (E.F. Smith, 1901) Dye, 1978. Piracicaba, 1988.
62p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Algodão - Doença - Controle 2. Bactéria fitopatogênica - Bacteriocina - Produção 3. Bacteriocina - Produção 4. Mancha angular do algodão - Controle I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.95

PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR DIFERENTES ISOLADOS E RAÇAS FISIOLÓGICAS DE *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (E.F. SMITH, 1901) DYE, 1978

Ederaldo José Chiavegato

Aprovado em: 28/02/89

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Clélio Lima Salgado	ESALQ/USP
Prof. Dr. Chukichi Kurozawa	UNESP/Botucatu
Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP

Prof. Dr. Clélio Lima Salgado
Orientador

Aos meus pais

IRMA e REYNALDO

com saudades, minha gratidão.

À minha esposa

LISETE

e meus filhos

VERIDIANA, MARÍLIA e REYNALDO

pelo amor, carinho e compreensão

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

O autor expressa os seus agradecimentos:

- Ao Professor Doutor Clélio Lima Salgado, pela orientação na pesquisa.

- Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela possibilidade de realização do curso de Pós-graduação.

- Ao Dr. Mauro Hideo Sugimori, pelo apoio e sugestões apresentadas durante a realização dos trabalhos.

- Ao Dr. Edivaldo Cia, pelo apoio e sugestões apresentadas, especialmente nos estudos de variabilidade do patógeno e revisão dos originais.

- À Seção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico pela possibilidade de realização dos trabalhos de laboratório.

- Aos Drs. Imre Lajos Gridi-Papp e Milton Geraldo Fuzatto, pelo apoio, sugestões apresentadas e revisão dos originais.

Ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, pelos trabalhos de liofilização da bactéria, sugestões apresentadas e revisão dos originais

Aos Drs. Luiz Henrique Carvalho, Nelson Machado da Silva, Nelson Paulieri Sabino, Júlio Isao Kondo e Popílio Angelo Cavaleri, pelo estímulo.

- À técnica de laboratório Vera Lúcia Lucas Machado pelo auxílio nos trabalhos de laboratório.

- À Srta. Sueli Aparecida Signori pelos serviços de datilografia.

- Aos funcionários da Seção de Algodão e Seção de Microbiologia Fitotécnica do Instituto Agronômico e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1. Bacteriocinas	06
2.2. Variabilidade do patógeno	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Local da pesquisa	22
3.2. Origem dos isolados	22
3.3. Meios de cultura	24
3.4. Isolamento e purificação do patógeno.....	25
3.5. Manutenção e preservação do patógeno	26
3.6. Inoculação do patógeno	27
3.6.1. Obtenção e preparo do inóculo	27
3.6.2. Métodos de inoculação	28
3.7. Identificação das raças fisiológicas	29
3.8. Método de avaliação dos sintomas	29
3.9. Produção de bacteriocinas	30
3.9.1. Determinação da sensibilidade de bacteriocinas ao calor	32
4. RESULTADOS	34
4.1. Produção de bacteriocinas	34
4.1.1. Comportamento dos isolados	34
4.1.2. Influência dos meios de cultura na produção de bacteriocinas	36

Página

4.1.3. Determinação da sensibilidade de bacteriocinas ao calor 37
4.2. Identificação das raças fisiológicas 37
4.3. Produção de bacteriocinas a nível de raça fisiológica 39

5. DISCUSSÃO 42

6. CONCLUSÕES 50

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 52

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Procedência dos isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum*	23
02	Produção de bacteriocinas por diferentes isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum*	35
03	Reação de linhagens diferenciais de algodoeiro inoculadas com vinte e nove isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum*	38
04	Produção de bacteriocinas por diferentes raças fisiológicas de *X. campestris* pv. *malvacearum*	40

PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR DIFERENTES ISOLADOS E RAÇAS FISIOLÓGICAS DE *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (E.F. Smith, 1901) Dye, 1978

Autor: EDERALDO JOSÉ CHIAVEGATO
Orientador: Prof. Dr. CLÉLIO LIMA SALGADO

RESUMO

No presente trabalho, foi investigada a produção de bacteriocinas por diferentes isolados e raças fisiológicas de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (E.F. Smith) Dye.

Isolados provenientes de várias localidades, diferiram entre si quanto à capacidade de produção e à sensibilidade as bacteriocinas, tanto a nível de raças ou de isolados, como em relação à origem desses isolados. Consequentemente, foi impossível a caracterização destes em grupos por tipos de bacteriocinas.

De acordo com os resultados obtidos, as bacteriocinas produzidas são termoestáveis a 79°C por 15 minutos.

Foi observado que 55% dos isolados produziram bacteriocinas contra os demais, quando testados em meio de cultura BDA. Em Agar-Nutriente a produção foi inibida.

Paralelamente aos estudos de produção de bac-

teriocinas, foram feitas observações a respeito da variabilidade patogênica de *X. campestris* pv. *malvacearum*. Foram detectadas as raças fisiológicas 3, 7, 13, 17, 18 e 19, com base nas reações de patogenicidade apresentadas pelo grupo de linhagens diferenciais de algodoeiro. Todas essas raças foram observadas no Estado de São Paulo. A raça 18 foi detectada em amostras provenientes de todos os outros Estados produtores de algodão na Zona Meridional do Brasil (Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul), porém, nessas regiões foi observada ocorrência menos generalizada das demais raças.

PRODUCTION OF BACTERIOCINS BY DIFFERENT ISOLATES AND PHYSIOLOGIC RACES OF *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (E.F. Smith, 1901) Dye, 1978

Author: EDERALDO JOSÉ CHIAVEGATO
Adviser: Prof. Dr. CLÉLIO LIMA SALGADO

SUMMARY

The production of bacteriocins by different isolates and physiologic races of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (E.F. Smith) Dye was investigated.

Isolates coming from several localities differed as bacteriocins productors and to the sensibility to such substances. Differences were also observed among races as well as according to geographic origin. Characterization and grouping of the isolates by the type of bacteriocins produced was not possible.

The bacteriocins were thermostable at 79°C for 15 minutes.

The results showed that 55% of the isolates produced bacteriocins against the others, when tested in PDA medium. Bacteriocin production was inhibited in Nutrient-Agar.

Observations concerning the variability of *X. campestris* pv. *malvacearum* were made. Physiologic races

3, 7, 13, 17, 18 and 19 were detected on the basis of reactions exhibited by the group of cotton lines generally recognized as differentials.

All those races were observed in São Paulo state, Brazil. Race 18 was detected also in samples collected in the other cotton producing meridional states of Brazil (Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás and Mato Grosso do Sul); however, a less generalized occurrence was observed for the other races in the same states.

1. INTRODUÇÃO

Em 1891, no Estado do Alabama, EUA, Atkinson citado por ELLIOTT (1930), foi o primeiro pesquisador a relatar e descrever, com a denominação de ferrugem negra do algodão, a ocorrência de manchas angulosas em folhas de algodoeiro. Após a constatação por Earle (1900), citado por ELLIOTT (1930), de que a doença era devida diretamente à ação de uma bactéria, muitas propostas de classificação para o patógeno foram apresentadas e aceitas por algum tempo, entre as quais: *Pseudomonas malvacearum* E.F. Smith, 1901; *Bacterium malvacearum* (Smith) Smith, 1905; *Bacillus malvacearum* (Smith) Holland, 1920; *Phytomonas malvacearum* (Smith) Bergey et al., 1923 e *Xanthomonas malvacearum* (Smith) Dowson, 1939 (BRADBURY, 1986). Estudando o gênero *Xanthomonas*, DYE & LELLIOTT (1974) concluíram que a maioria das espécies que o compõem difere de *X. campestris* somente pela reação da planta hospedeira. Consequentemente, DYE (1978) propôs caracterizar essas espécies como patotipos de *X. campestris* segundo a especificidade dos hospedeiros aos quais são patogênicos. Com base nesses estudos e também em trabalhos de outros autores para

outros gêneros, YOUNG et alii (1978) apresentaram como uma proposta geral para esses patotipos, considerados como sub-espécies, a utilização do termo patovar para diferenciar a sua capacidade patogênica, mantendo entretanto o conceito global da espécie. Atendendo, desta maneira, as exigências do Código Internacional de Nomenclatura de Bactéria. Com a aceitação dessa proposta pelo Comitê de Taxonomia de Bactérias Fitopatogênicas da Sociedade Internacional de Patologia de Planta (SPP) (DYE et alii, 1980), o patógeno utilizado neste estudo passou a ser denominado, *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (E.F. Smith, 1901) Dye, 1978.

No Brasil, o primeiro relato de ocorrência do patógeno foi feito por HEMPEL (1927), com referência a uma moléstia criptogâmica causada por uma espécie de bactéria, que se desenvolvia nas células interiores das folhas de plantas de algodoeiro, invadindo também o capulho. Na década seguinte, BITTANCOURT (1935) descrevendo a mancha bacteriana, muito comum nas plantações de algodoeiro do Estado de São Paulo, define esta como sendo uma doença das folhas e das maçãs podendo, eventualmente apresentar-se nas hastes. Já nesta época, o autor salienta a importância da associação bactéria x *Colletotrichum gossypii* em maçãs, doença considerada até então, a mais importante nas plantações de algodoeiro do Estado. Atualmente a doença, conhecida principalmente por mancha angular do algodoeiro, vem ocorrendo de forma generalizada em todas as regiões produtoras de algodão no Brasil, prin

cipalmente em lavouras no Estado de São Paulo e Paraná (CIA, 1977 e RUANO & MOHAN, 1982).

Muito influenciada pelas condições de ambiente, a doença pode ocorrer com maior ou menor severidade todos os anos (CRUZ, 1965; CIA et alii, 1976 e CIA, 1977). Para o desenvolvimento de epidemias, além da alta umidade e vento, regimes em que a temperatura noturna se mostra baixa e a diurna alta favorecem a manifestação de sintomas até mesmo em variedades consideradas geneticamente mais resistentes (KIMATI, 1980). Os sintomas provocados pelo patógeno ocorrem principalmente nas folhas, na forma de lesões angulosas e nas maçãs, podendo ainda em condições especiais incidir nos pecíolos, pedúnculos e hastes principais da planta (CIA et alii, 1976 e CIA, 1977). Nas maçãs, as lesões provocadas pela bactéria são invadidas frequentemente por fungos causadores de podridões, principalmente por *C. gossypii*, que é isolado mais frequentemente nestas lesões, contribuindo com esta associação para a completa destruição do produto final (BALMER et alii, 1967).

O controle da doença por meio de produtos químicos, embora possível através de pulverizações das plantas no campo, só se justifica, em nosso meio quando as condições são extremamente favoráveis ao desenvolvimento de epidemias (KIMATI, 1980). De uma maneira geral, o controle mais prático, eficiente e econômico tem sido através do emprego de cultivares resistentes (CIA, 1977). Neste particular, gran-

de número de trabalhos de melhoramento foi realizado, visando à mancha bacteriana (GRIDI-PAPP et alii, 1985). A maioria destes trabalhos entre eles, HUNTER et alii (1968), BRINKERHOFF (1970), CIA (1972), HUSSAIN & BRINKERHOFF (1978), BRINKERHOFF & HUSSAIN (1978), BIRD (1981) e BIRD et alii (1984), é dedicada aos estudos sobre a variabilidade do patógeno.

Até o momento, foram descritas 19 raças da bactéria (BIRD, 1981 e RUANO & MOHAN, 1982), das quais cinco tiveram ocorrência relatada no Brasil, a saber, três no Estado de São Paulo, raças 3, 8 e 10 (CIA, 1972) e duas no Estado do Paraná, raças 18 e 19 (RUANO & MOHAN, 1982).

Considerando a importância do conhecimento das raças fisiológicas para os trabalhos de melhoramento, seria importante também caracterizar o comportamento dessas raças dentro da espécie, uma vez que a avaliação da resistência genética do hospedeiro geralmente é feita através de inoculações com mistura de isolados ou raças do patógeno (THAXTON et alii, 1983; MAHILL et alii, 1983 e BIRD et alii, 1984). Nesse caso, a determinação da produção de bacteriocinas seria de grande valia uma vez que, segundo LWOFF (1953), uma partícula de bacteriocina é suficiente para destruir uma célula bacteriana sensível; raças bacteriocinogênicas poderão destruir as raças sensíveis a esta bacteriocina alterando consequentemente, a proporção das raças na mistura e os resultados das inoculações.

O presente trabalho teve por objetivo investigar a produção de bacteriocinas por diferentes isolados e raças de *X. campestris* pv. *malvacearum* encontrados no Brasil bem como possíveis relações entre eles.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BACTERIOCINAS

Os estudos de bacteriocinas tiveram início em 1925, com a descoberta por Gratia (REEVES, 1965) de uma substância produzida por uma linhagem de *Escherichia coli*, ativa contra outras linhagens sensíveis da mesma espécie. Posteriormente, com a evolução dos estudos, essas substâncias, produzidas por vários membros da família Enterobacteriaceae, foram consideradas como um grupo de antibióticos naturais, altamente específicos. Gratia & Fredericq (1946), citados por MAYR-HARTING et alii (1972), propuseram para esses antibióticos o nome genético de "colicinas".

Após o conhecimento de que outros organismos, além dos coliformes, eram capazes de produzir tais substâncias, JACOB et alii (1953) propuseram o termo geral "bacteriocinas" para designar essas substâncias antibacterianas. Entretanto, a nomenclatura das bacteriocinas encontra-se desordenada porque para denominá-las não foi estabelecido uma norma. Os nomes são derivados a partir do gênero ou da espécie,

ou ainda, de uma linhagem particular da bactéria produtora (VIDAVER, 1976). Dessa forma, são encontrados na literatura denominações tais como: Agrobacteriocina I produzida por *Agrobacterium tumefaciens* (STONIER, 1960), piocina por *Pseudomonas pyocyanea* (GILLIES & GOVAN, 1966); bacteriocina 84 (KERR & HTAY, 1974), Agrocina 84 pela linhagem 84 de *Agrobacterium radiobacter* (MOORE & WARREN, 1979 e KERR, 1980) e siringacina W-1 pela linhagem W-1 de *Pseudomonas syringae* (SMIDT & VIDAVER, 1982 e 1986). Embora sejam atribuídos por alguns pesquisadores nomes específicos a tais substâncias, a maioria deles prefere denominá-las genericamente de bacteriocinas (KUROZAWA, 1980).

Segundo LWOFF (1953), uma partícula apenas de bacteriocina é suficiente para matar uma célula bacteriana sensível e tais partículas diferem de bacteriófagos principalmente por não serem multiplicados pela célula bacteriana afetada, paralelamente ao fato de possuírem natureza protéica e não nucleoprotéica. OKABE & GOTO (1963) relatam que apesar das evidentes diferenças entre as bacteriocinas e os bacteriófagos, os métodos para detectar a presença de ambos em meio de cultura são semelhantes.

Os estudos sobre bacteriocinas foram revistos por diversos autores, entre eles IVANOVICS (1962), REEVES (1965), BRADLEY (1967), NOMURA (1967), REEVES (1972) e TAGG et alii (1976).

Por definição, bacteriocinas são substâncias

bactericidas, antibióticos altamente específicos de natureza protéica, não multiplicáveis, sintetizadas por certas linhagens de bactéria e ativas contra algumas outras linhagens da mesma espécie ou raças estreitamente relacionadas (NOMURA, 1967 e ECHANDI & MOYER, 1979).

Mais recentemente HAYES et alii (1983) descreveram as bacteriocinas como substâncias bactericidas que diferem de outros agentes antimicrobianos pela presença de uma proteína essencial condicionada por genes dos plasmídeos, cuja ação bactericida é efetuada pela ligação a receptores específicos do envoltório celular e ativa principalmente contra os organismos gram-positivos do que aqueles gram-negativos.

BRADLEY (1967) propôs um critério taxonômico classificando as bacteriocinas em dois grupos: a) bacteriocinas que possuem baixo peso molecular - não sedimentáveis, sensíveis à tripsina, termoestáveis e não visíveis ao microscópio eletrônico; b) bacteriocinas que possuem alto peso molecular, sedimentáveis, resistentes à tripsina, termolábeis, visíveis ao microscópio eletrônico e semelhantes a cauda de bacteriófagos. Entretanto, VIDAVER (1976) considera prematura a ampla aceitação dessa proposta uma vez que existem grupos distintos de bacteriocinas e assim, outra classificação seria desejável.

Segundo REEVES (1965), linhagens bacteriocinogênicas embora possuam habilidade genética estável para produzir bacteriocinas, não o fazem todo o tempo ou sob todas as

condições. REEVES (1972) observou que muitos agentes têm sido usados para induzir a produção de bacteriocinas; entre eles estão a luz ultravioleta e mitomicina C, entretanto, nem todas as bacteriocinas são induzíveis. Diversos autores, entre eles VIDAVER (1976), CUPPELS et alii (1978), ECHANDI & MOYER (1979), EXPERT & TOUSSANT (1985) e SMIDT & VIDAVER (1986) têm mostrado aumento na produção de bacteriocinas para algumas espécies de bactéria, com relação à quantidade produzida em condições normais, pela indução com luz ultravioleta e/ou mitomicina C. Por outro lado, ECHANDI (1976), GROSS & VIDAVER (1979), CROWLEY & DE BOER (1980) e KUROZAWA (1980) observaram que o tratamento por um e/ou outro destes agentes, não incrementou a produção de bacteriocinas.

DE VAY et alii (1968) verificaram que a produção de bacteriocina em *P. syringae* foi maior quando em concentrações mais elevadas de agar e D-glucose no meio de cultura. Outros meios tais como extrato de carne e agar, nutriente-agar e ainda outros contendo peptona, mostraram - se excelentes quanto ao crescimento do patógeno mas foram insatisfatórios quanto à produção de bacteriocina. GROSS & VIDAVER (1979) e MESQUITA et alii (1983) também observaram o efeito de inibição de peptona, quando presente em meio de cultura, na produção de bacteriocinas por algumas espécies de *Corynebacterium* e na produção de siringomicina produzida por *P. syringae*. Por outro lado, entre outros autores que verificaram produção de bacteriocinas por diferentes espécies de

bactéria em meio de cultura na presença de peptona, SANTOS (1979) também observou que 47% dos isolados de *X. campestris* produziram bacteriocinas em meio de agar-nutriente (Extrato de carne e peptona).

VIDAVER et alii (1972) verificaram que a temperatura de incubação afetou a produção de bacteriocinas em isolados de *P. syringae*, *P. glycinea* e *P. phaseolicola*. Para as três espécies, a produção de bacteriocina foi melhor entre 20 a 24ºC do que na temperatura de 28ºC, tida como ótima para o crescimento da cultura. CUPPELS et alii (1978) constataram que para *Pseudomonas solanacearum*, embora a temperatura ótima para o crescimento da cultura tenha sido de 32ºC, a condição mais favorável para a produção de bacteriocina se deu a 30ºC. Comportamento semelhante foi observado por GROSS & VIDAVER (1979), trabalhando com 12 espécies de *Corynebacterium*: embora a temperatura média ótima para o crescimento da cultura tenha sido de 25ºC, houve um incremento na produção a 20ºC para a maioria das bacteriocinas testadas.

As bacteriocinas, de um modo geral, são produzidas por muitas linhagens de bactéria, incluindo aquelas fitopatogênicas. Dentre estas, foram observadas linhagens bacteriogênicas em isolados de *A. tumefaciens* (STONIER, 1960), *Erwinia chrysanthemi* (ECHANDI & MOYER, 1979 e EXPERT & TOUSSAINT, 1855), *E. carotovora* (CROWLEY E DE BOER, 1980). *Corynebacterium insidiosum* (NELSON & SEMENIUK, 1964), *C. michi*

ganense (ECHANDI, 1976 e KUROZAWA, 1980), *Corynebacterium spp* (GROSS & VIDAVER, 1979), *C. nebraskense* (VIDAVER, 1981), *P. syringae* (VIDAVER et alii, 1972 e SMIDT & VIDAVER, 1982 e 1986), *P. glycinea* (VIDAVER et alii, 1972 e BECKER, 1980), *P. phaseolicola* (VIDAVER et alii, 1972), *P. solanacearum* (CUPPELS et alii, 1978), *Pseudomonas* spp (VIDAVER & BUCKNER, 1978 e MESQUITA et alii, 1983). Segundo HAMON et alii (1961), várias espécies de *Xanthomonas* possuem a propriedade de produzir bacteriocinas, fazendo referência a *X. juglandis, X. phaseoli, X. albilineans, X. vesicatoria* e *X. betlicola*. YANO (1976) verificou a produção de bacteriocinas por diferentes patovares de *X. campestris*, inclusive dois de *malvacearum*. SANTOS (1979), trabalhando com isolados de *X. campestris* pv. *campestris* provenientes de vários hospedeiros do gênero *Brassica*, verificou que oito dos 17 isolados eram bacteriocinogênicos.

Segundo AZEVEDO (1977), o número de isolados bacteriocinogênicos varia de acordo com a espécie. De fato, entre as espécies de bactérias fitopatogênicas foram observados níveis variáveis, por diversos autores. Entre eles, VIDAVER & BUCKNER (1978) observaram que 85% dos isolados testados de *P. glycinea* são bacteriocinogênicos; ECHANDI (1976) e KUROZAWA (1980) observaram respectivamente 57% e 63% em *C. michiganense*; ECHANDI & MOYER (1979), 88% em *E. chrysantemi*; YANO (1976), 41,9% entre quinze patovares de *X. campestris* e SANTOS (1979), 47% em *X. campestris* pv. *campestris*.

Assim, diversas bactérias fitopatogênicas sintetizam bacteriocinas, entretanto, somente algumas destas têm sido isoladas e caracterizadas (CUPPELS et alii, 1978). Segundo estes autores, siringacina 4A produzida por *P. syringae* foi a primeira bacteriocina produzida por uma bactéria fitopatogênica a ser completamente caracterizada.

Segundo SMIDT & VIDAVER (1986), as bacteriocinas produzidas por bactérias fitopatogênicas diferem muito, quanto às características físicas e químicas, daquelas produzidas por outras bactérias. Resultados não publicados por Vidaver, citado por SMIDT & VIDAVER (1986), indicam que preparações imperfeitas de bacteriocinas têm efetivamente reduzido populações de bactérias fitopatogênicas. Entretanto, a purificação destas é necessária para que isso possa ser atribuída realmente à ação das bacteriocinas. Deste modo, os autores purificaram siringacina W-1, uma bacteriocina produzida pela linhagem Psw-1 de *P. syringae* pv. *syringae*, concluindo que a caracterização biofísica e bioquímica desta bacteriocina é um conhecimento essencial para avaliar o real potencial desta, usada isoladamente ou em combinação com siringacina 4A ou outras bacteriocinas para o controle de doenças causadas por essa bactéria.

Segundo Hamon e Péron (1963), citados por ECHANDI (1976), isolados bacterianos de diferentes origens podem ser diferenciados ou tipificados pelos seus padrões de sensibilidade a bacteriocinas. Embora muito utilizado na área mé

dica, a tipificação tem sido pouco empregada em bactérias fitopatogênicas. Alguns autores têm procurado estabelecer grupos e tipos de bacteriocinas com base na produção, sensibilidade, ou ambos, para algumas dessas espécies. Entre eles, ECHANDI (1976) ilustra o possível uso da tipificação de bacteriocinas na classificação em subgrupos e estudos epidemiológicos de *C. michiganense*, enquanto que YANO (1976) não encontrou relação entre patovares de *X. campestris* e a produção de bacteriocinas, com exceção do observado para os patovares *malvacearum* e *ricinis*. GROSS & VIDAVER (1979), trabalhando com 12 espécies de *Corynebacterium*, sugerem que padrões de sensibilidade a bacteriocinas podem ser úteis na diferenciação de muitas linhagens e espécies deste gênero. Do mesmo modo, VIDAVER & BUCKNER (1978) estabeleceram grupos de linhagens produtoras de bacteriocinas entre várias espécies de *Pseudomonas* fluorescentes fitopatogênicas e observaram que a tipificação destas, especialmente de *P. syringae*, pode ser utilizada em estudos epidemiológicos.

ECHANDI & MOYER (1979) demonstraram o possível uso de bacteriocinas na tipificação e classificação infrasubespecífica de *E. chrysanthemi* e CROWLEY E DE BOER (1980) observaram que a sensibilidade de linhagens de *E. carotovora* var. *atroseptica* e *E. carotovora* var. *carotovora* às mesmas bacteriocinas confirmam a estreita relação entre estes dois patotipos. Adotando o mesmo esquema de classificação em grupos, VIDAVER (1981) verificou que a produção de bacte-

riocinas constitui um instrumento útil para a diferenciação de linhagens de *Corynebacterium nebraskense*. Entretanto, verificou também que há necessidade de mais estudos e deste modo, possa ser utilizada para avaliar a distribuição das diferentes linhagens do patógeno pelo ano de isolamento e origem dos isolados. CARLSON & VIDAVER (1982), trabalhando com várias espécies de *Corynebacterium*, observaram que o tipo de bacteriocina produzida pelos patógenos não pode ser correlacionado com a origem geográfica, cultivar ou ano de isolamento.

A utilização prática de bacteriocinas efetivamente no controle de doenças bacterianas de plantas tem sido verificada. Desde 1973, agricultores na Austrália vem protegendo plantas frutíferas e roseiras contra a galha da coroa, causada por *A. radiobacter* var. *tumefaciens*, por imersão de material vegetal em suspensão de células bacterianas de *A. radiobacter* var. *radiobacter*, produtora da Agromicina 84, alcançando quase completo controle da doença (KERR, 1980). Segundo o autor, este é o primeiro uso comercial de um microrganismo específico para controlar um patógeno de planta no solo e também é o primeiro uso comercial de uma bactéria para o controle de doença de planta.

O valor potencial de bacteriocinas no controle de outras doenças bacterianas de plantas tem sido verificado por diversos autores. Entre eles, Echandi (1975), citado por VIDAVER (1976), verificou que a produção de bacterio-

cina por uma linhagem não patogênica de *C. michiganense* pode controlar o cancro bacteriano do tomateiro.

CUPPELS et alii (1978) isolaram uma bacteriocina produzida pela linhagem B1, variante avirulenta de *P. solanacearum* e observaram que esta linhagem produz um alto título de bacteriocina a qual inibe um grande número de linhagens deste patógeno. Desde modo, os autores sugerem que esta bacteriocina pode ser útil no desenvolvimento de medidas de controle biológico para a murcha bacteriana do tomateiro.

Estudos preliminares não publicados por Vidaver et alii, citados por SMIDT & VIDAVER (1982), indicam que o tratamento foliar em plantas de soja e sementes de milho com diferentes bacteriocinas, reduzem significativamente a produção de bactérias patogênicas quando se inocula subsequentemente.

De uma maneira geral, a produção de bacteriocinas tem sido estudada em meio de cultura. Mais recentemente, SMIDT & VIDAVER (1982) verificaram em tecido de plantas, a produção e atividade de siringacina W-1, uma bacteriocina produzida por uma linhagem de *P. syringae*. A produção da bacteriocina dentro do tecido da planta foi observada quando uma mistura da linhagem produtora de bacteriocina PsW-1, e uma linhagem sensível foi inoculada no caule de uma espécie de feijoeiro. Este é o primeiro relato de produção de bacteriocina dentro do tecido de plantas através de inoculações.

Com base nestas observações sobre a produção de bacteriocinas por uma linhagem e a inibição do crescimento de outra linhagem sensível em tecido de planta, estes pesquisadores propõem a hipótese de que tais partículas possam ser ativas também no ambiente natural da bactéria. Além da possibilidade de que, as bacteriocinas possam ser úteis para o controle de certas doenças bacterianas, da mesma forma estes resultados sustentam as hipóteses propostas por BECKER (1980) e KUROZAWA (1980), de que maiores cuidados devem ser tomados quando da mistura de raças ou isolados de bactérias para inoculações de plantas, uma vez que é evidente ocorrer a destruição de células bacterianas sensíveis pela produção de bacteriocinas em condições naturais, alterando consequentemente os resultados esperados.

2.2. VARIABILIDADE DO PATÓGENO

Com o objetivo principal de identificar genótipos de algodoeiro com resistência a *X. campestris* pv. *malvacearum*, a variabilidade do patógeno tem sido amplamente estudada em muitos países, por vários pesquisadores (CIA, 1972). Como resultado destes trabalhos, foram descritas até o momento, 19 raças fisiológicas do patógeno (BIRD, 1981 e RUANO & MOHAN, 1982).

Os primeiros estudos sobre a variabilidade des

se patógeno foram realizados por HUNTER & BLANK (1954) demonstrando a ocorrência, nos Estados Unidos, de dois tipos patogênicos de *X. campestris* pv. *malvacearum*, com base nas reações de susceptibilidade e resistência em diferentes variedades de algodoeiro. A seguir, Bird & Hunter (1955), citados por HUNTER et alii (1968), designaram esses dois tipos patogênicos como raça fisiológica 1 e raça fisiológica 2 com base nas reações apresentadas pelas linhagens americanas de algodoeiro Stoneville 2B-S9, Stoneville 20 e Mebane B-1.

Outras raças do patógeno foram determinadas por Brinkerhoff (1961) e Bird et alii (1961), citados por HUNTER et alii (1968), utilizando diferentes linhagens de *Gossypium hirsutum* L. e *G. barbadense* L. Porém, Hunter (1963), citado por HUNTER et alii (1968), visando unificar o sistema de determinação de raças fisiológicas, propôs um grupo de linhagens de algodoeiro, que foi adotado pelo Conselho de Doenças do Algodão, estabelecendo o grupo americano de hospedeiros diferenciais. Nesse estudo, foram selecionadas as linhagens, Acala 44, Stoneville 2B-S9, Stoneville 20, Mebane B-1, 1-10B, 20-3, 101-102 B e Gregg, que proporcionaram reações ao patógeno consistentemente razoáveis, sem no entanto interagir com o ambiente. Com base nas reações apresentadas por esses hospedeiros, o autor determinou 12 raças do patógeno. Posteriormente, HUNTER et alii (1968), utilizando o mesmo grupo de hospedeiros diferenciais, confirmaram os resultados obtidos anteriormente para as 12 raças e determinaram as raças 13, 14 e 15.

VERMA & SINGH (1970), trabalhando com estes hospedeiros diferenciais na Índia, relataram a ocorrência de duas novas raças, a 16 e a 17.

BRINKERHOFF (1970), em sua revisão sobre a variabilidade do patógeno, reúne em uma tabela única, as reações apresentadas pelas oito linhagens diferenciais a todas as 17 raças até então determinadas.

BIRD & TSAI (1975) observaram um novo isolado do patógeno, que pelas reações apresentadas pelos oito hospedeiros diferenciais, caracteriza-se como raça 10. Entretanto, com a inclusão de uma nova linhagem, a DPxP4 ao grupo de hospedeiros, a qual se mostrou resistente à raça 10 e susceptível ao novo isolado, os autores sugeriram que este poderia ser designado raça 18. Posteriormente, HUSSAIN & BRINKERHOFF (1978) utilizaram esta linhagem e uma outra, a Empire B4 em adição ao grupo de hospedeiros diferenciais preconizados anteriormente, para a constatação da ocorrência da raça 18 no Paquistão. A seguir, BIRD (1981) propôs formalmente ao Conselho de Doenças do Algodão, a inclusão destes dois novos hospedeiros ao grupo de oito hospedeiros diferenciais até então utilizados, perfazendo portanto um total de dez diferenciais para que estes possam ser usados na diferenciação da raça 18.

RUANO & MOHAN (1982) relataram a ocorrência no Brasil de um isolado do patógeno apresentando comportamento distinto das 18 raças fisiológicas já conhecidas. Desse

modo, os autores propuseram a designação dessa estirpe como raça 19, completando-se assim as 19 raças fisiológicas de *X. campestris* pv. *malvacearum* identificadas até o presente momento.

FOLLIN (1983), trabalhando com o patógeno proveniente da África, encontrou novos tipos virulentos em *G. hirsutum*. Estirpes que são virulentas a todas as dez linhagens do grupo de hospedeiros diferenciais, particularmente à linhagem 101-102 B. Esta linhagem, imune a todas as 19 raças fisiológicas descritas, apresenta reação de susceptibilidade, precisamente mais susceptível do que a linhagem susceptível Acala 44, um hospedeiro sem genes maiores de resistência. Estes resultados foram confirmados por BIRD et alii (1983) e BIRD et alii (1984).

No Brasil, são poucos os estudos sobre a variabilidade de *X. campestris* pv. *malvacearum*. CIA (1972), trabalhando com isolados do patógeno provenientes de diferentes regiões algodoeiras do Estado de São Paulo, constatou a ocorrência das raças fisiológicas 3, 8 e 10, com base nas reações apresentadas pelo grupo de oito hospedeiros diferenciais adotados até aquela data. Segundo aquele autor embora fosse determinada a ocorrência destas três raças, não foi possível determinar a distribuição das mesmas no Estado salientando o grande interesse da determinação das áreas de ocorrência das diferentes raças existentes, para um melhor direcionamento dos programas de melhoramento visando resistência genética ao pa

tógeno. RUANO & MOHAN (1982) além de identificarem uma nova raça, ou seja a raça 19, relataram também a ocorrência da raça 18 pela primeira vez no Brasil, em lavouras de algodão do Estado do Paraná.

CIA (1972), estudando a variabilidade do patógeno, observou que alguns cuidados devem ser tomados quando da manutenção dos isolados, principalmente com relação à viabilidade e ou a patogenicidade destes. Devido às constantes repicagens dos isolados em meio de cultura, verificou-se a perda de patogenicidade após seis repicagens sucessivas. Desse modo, o autor salienta a importância da frequente passagem dos isolados pelos hospedeiros, a fim de serem eliminados os biótipos não patogênicos. Com relação a uma possível seleção por parte dos hospedeiros sobre os isolados, não foi observada alteração na patogenicidade dos respectivos reisolados.

Frequentemente, tem sido observado por diversos autores, entre eles BRODIE & COOPER (1960); SCHANATHORST et alii (1960), SMITH (1962), BRINKERHOFF (1966) e CHEW et alii (1969), a presença de raças do patógeno, ocorrendo juntas ou separadamente numa mesma lavoura. CHOWDHURY et alii (1979) observaram a presença de mais de uma delas no mesmo hospedeiro, na mesma folha e ainda na mesma lesão.

De um modo geral, com a existência de raças fisiológicas do patógeno e a variável distribuição destas, ênfase tem sido dada aos trabalhos de melhoramento para re-

sistência genética. Desse modo, os trabalhos de melhoramento têm sido conduzidos para todas as raças e frequentemente, a mistura de raças tem sido utilizada para inoculações em linhagens de algodoeiro por diversos autores, entre eles THAXTON et alii (1983), MAHILL et alii (1983) e BIRD et alii (1984).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada nos laboratórios da Seção de Microbiologia Fitotécnica e nos laboratórios e casas de vegetação da Seção de Algodão, do Instituto Agronômico, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, em Campinas, S.P.

3.2. Origem dos Isolados

Os isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum* utilizados no presente trabalho foram obtidos de folhas de algodoeiro *G. hirsutum* que apresentavam lesões típicas de mancha angular, provenientes de diferentes regiões algodoeiras dos Estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. Os diferentes isolados, conforme procedência, são listados na Tabela 1.

Tabela 1. Procedência dos isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum*.

Isolado nº	Procedência	
	Município	Estado
1	São Sebastião da Amoreira	PR
2	Flórida Paulista	SP
3	Guaíra	SP
4	Fátima do Sul	MS
5	Guará	SP
6	Cambará	PR
7	Campinas	SP
8	Campinas	SP
9	Quinta do Sol	PR
10	Cambará	PR
11	Taquarituba	SP
12	Mococa	SP
13	Osvaldo Cruz	SP
14	Tangará da Serra	MT
15	Capinópolis	MG
16	Dracena	SP
17	Miguelópolis	SP
18	Rio Verde	GO
19	Leme	SP
20	São Miguel do Iguaçú	MS
21	Castilho	SP
22	Guaíra	SP
23	Aguaí	SP
24	Santo Anastácio	SP
25	Presidente Bernardes	SP
26	Goio-Erê	PR
27	Londrina	PR
28	Aguaí	SP
29	Ituverava	SP

3.3. Meios de Cultura

Foram utilizados os seguintes meios:

I - Meio de cultura para isolamento e manutenção do patógeno

Meio de Batata-Dextrose-Agar (BDA) (CIA,1972)

Dextrose	10g
Batata	200g
Ágar	15g
Água destilada q.s.p. p/	1000ml
pH	7,2

II - Meios de cultura para a produção de bacteriocinas:

A) Meios sólidos:

a) Meio de Batata-Dextrose-Agar (BDA)

Dextrose	10g
Batata	200g
Agar (Difco)	15g
Água Destilada q.s.p. p/....	1000ml
pH	7,2

b) Meio Agar - Nutriente (SANTOS, 1979)

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Agar (Difco)	15g
Água destilada q.s.p. p/.. ..	1000ml
pH	7,2

c) Meio YDC (DYE, 1968)

Dextrose	20g
Extrato de Levedura	10g
$CaCO_3$ precipitado	20g
Agar (Difco)	15g
Água destilada q.s.p. p/ ..	1000ml
pH	7,2

B) Meios semi-sólidos:

Foram utilizadas as mesmas composições dos meios sólidos, exceto a quantidade de agar (Difco) que foi reduzida para 7g.

3.4. Isolamento e Purificação do Patógeno

O isolamento do patógeno foi feito adotando-se a metodologia descrita por CIA (1972). As folhas de algodoeiro com lesões angulosas típicas de mancha angular foram primeiramente herborizadas no local de coleta. Posteriormente, procedeu-se os isolamentos conforme as seguintes etapas:

1. Corte de pedaços da parte lesada do tecido foliar, na região de transição para a área sadia da folha.

2. Imersão dos pedaços de limbo foliar em álcool 95ºG.L., durante um minuto.

3. Imersão dos pedaços de limbo foliar em uma

solução obtida pela diluição de uma parte de hipoclorito de sódio, contendo 2% de cloro ativo, para três partes de água destilada, durante dois minutos.

4. Lavagem dos pedaços de limbo foliar em água esterilizada, por aproximadamente meio minuto.

5. Maceração dos pedaços de limbo foliar em aproximadamente 0,5 ml de água esterilizada em placa de Petri.

6. Transferência da suspensão bacteriana obtida para placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura e espalhada pelo método de "riscas" com o auxílio de uma alça circular.

7. Transferência das placas de Petri para estufa incubadora com temperatura regulada em 28°C.

Após 48 horas de incubação, procedeu-se a purificação dos isolados através da diluição de colônias individuais da bactéria em tubos com água estéril. A seguir, a suspensão bacteriana obtida foi transferida com alça, para placas contendo meio de cultura e novamente incubada por 48 horas a 28°C. Este processo foi repetido por três vezes.

3.5. Manutenção e Preservação do Patógeno

As culturas de bactérias obtidas foram mantidas mediante a transferência periódica, a cada 20 dias, pa-

ra tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado. Foram efetuadas até quatro transferências para cada cultura de bactéria, sendo as culturas renovadas após este período. A renovação das culturas foi feita mediante a inoculação e reisolamento destas, do cultivar susceptível IAC 12-2 (CIA et alii, 1978). Durante os trabalhos, as culturas manipuladas foram mantidas em estufa incubadora com temperatura regulada em 28°C.

A preservação das culturas originais foi realizada mediante: (i) cultivo em tubos com BDA não inclinado e, após três dias de incubação em estufa a 28°C, foi adicionado óleo mineral previamente esterilizado até aproximadamente 1 cm acima do meio de cultura; (ii) através de liofilização, realizada nos laboratórios da Seção de Bactérias Fitopatogênicas, do Instituto Biológico, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Estação Experimental de Campinas, S.P.

3.6. Inoculação do Patógeno

3.6.1. Obtenção e Preparo do Inóculo

Para cada isolado, o inóculo foi obtido a partir do cultivo da bactéria em tubo de ensaio contendo meio BDA inclinado, após incubação em estufa a 28°C por 48 horas.

Posteriormente, foi adicionado quantidade suficiente de água destilada esteril sobre estas culturas, obtendo-se uma suspensão bacteriana com aproximadamente 10^8 UFC/ml (CIA, 1972), correspondendo a 40% de transmitância obtida em aparelho - Espectrofotômetro "Baush & Lomb", Spectronic 20.

3.6.2. Método de Inoculação

A inoculação dos isolados nos hospedeiros diferenciais de raças fisiológicas de *X. campestris* pv. *malvacearum* foi efetuada através do método de ferimento mecânico na página inferior das primeiras folhas definitivas com o auxílio de um estilete de madeira, conforme metodologia adotada por CIA (1972).

A verificação da patogenicidade foi realizada em quatro plantas de cada hospedeiro diferencial. Em cada uma dessas plantas foram inoculados quatro isolados diferentes por folha além do tratamento testemunha. Repetiu-se as inoculações em duas folhas da mesma idade por planta. Desta maneira foram efetuadas oito inoculações para cada isolado.

Os estiletes de madeira previamente mergulhados nas suspensões bacterianas, ou em água esterilizada, no caso da testemunha, foram levemente pressionados sob as folhas, provocando ferimentos em forma de riscas.

3.7. Identificação das Raças Fisiológicas

Para a identificação das raças fisiológicas de *X. campestris* pv. *malvacearum* foi utilizado o grupo de hospedeiros diferenciais composto pelas seguintes linhagens de algodoeiro: Acala 44, Stoneville 2B-S9, Stoneville 20, Mebane B-1, 1-10B, 20-3, 101-102 B, Gregg, Empire B4 e DPxP4 citadas por BIRD (1981), onde são apresentadas as reações de cada uma destas linhagens para 18 raças fisiológicas do patógeno e com o quadro de reações da raça 19 citado por RUANO & MOHAN (1982) para os mesmos hospedeiros diferenciais.

Foram realizados três testes de patogenicidade para as raças do patógeno em casa de vegetação. A temperatura neste ambiente oscilou de 22 a 30°C e a umidade relativa do ar ao redor de 80%.

3.8. Método de Avaliação dos Sintomas

A avaliação de reação dos hospedeiros diferenciais para raças fisiológicas do patógeno foi efetuada quinze dias após a inoculação mediante uma escala de notas de 1 a 5, semelhante a utilizada por CIA (1972), para condições de casa de vegetação. A escala de notas foi empregada conforme descrição a seguir:

1 = necrose seca, escura, restrita a risca.

2 = risca encharcada, verde-oleosa, com pequenas expansões arredondadas, nunca angulosas.

3 = risca encharcada, verde-oleosa, com pequenas expansões angulosas.

4 = risca encharcada, verde-oleosa, com expansões angulosas, não ultrapassando 3 mm.

5 = risca encharcada, verde-oleosa, com expansões angulosas superiores a 3 mm.

Como critério de avaliação das reações pelos hospedeiros diferenciais ao patógeno foi adotado aquele descrito por CIA (1972): Foram considerados resistentes (R) os hospedeiros que mediante os sintomas apresentados receberam nota média máxima de 1,9 e susceptíveis (S) aquelas que apresentaram nota média superior ou igual a 3. Aqueles cujas notas variaram de 2 a 2,9 foram considerados de reações intermediárias (I).

3.9. Produção de Bacteriocinas

Para verificar a produção de bacteriocinas em *X. campestris* pv. *malvacearum* foram adotadas as técnicas descritas por VIDAVER et alii (1972), ECHANDI (1976) e KUROZAWA (1980). Os isolados, mantidos em tubos de ensaio contendo

óleo mineral ou oriundos de reisolamentos de plantas do cultivar IAC 12-2 de algodoeiro susceptível ao patógeno, foram transferidos para placas de Petri contendo 20ml de meio BDA sólido. Após incubação em estufa com temperatura regulada em 28ºC por 48 horas, procedeu-se à transferência de cada isolado para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, através de um replicador descrito por KUROZAWA (1980) obtendo-se desta forma, placas matrizes com oito isolados diferentes por placa. As placas assim semeadas, após 48 horas de incubação a 28°C, foram replicadas para outras placas de Petri contendo 20 ml dos diferentes meios sólidos e novamente incubadas por 48 horas a 24ºC. Foram replicadas placas suficientes para possibilitar todas as combinações desejadas entre os isolados testados. Ao final do período de incubação, as placas de Petri foram invertidas, colocando-se nas tampas de cada uma delas, 1,5 ml de clorofórmio. Após 45 minutos de exposição ao vapor de clorofórmio as placas foram entreabertas em câmara asséptica de ar contínuo durante 60 minutos para a completa evaporação do clorofórmio. A seguir, foram vertidos sobre o meio de cultura destas placas, 4 ml dos meios semisólidos correspondentes, contidos em tubos de ensaios e liquefeitos à temperatura de 45°C em banho-maria, aos quais foram adicionados 0,5 ml de suspensão bacteriana de cada um dos isolados previamente incubados durante 48 horas a 28ºC. Posteriormente, estas placas de Petri foram incubadas por 48 horas a 24°C e após este período procedeu-se à leitura dos ha-

los de inibição formados ao redor das colônias. Deste modo, cada isolado foi testado como produtor de bacteriocina contra todos os demais isolados.

A produção de bacteriocinas através da indução com luz ultravioleta foi testada e comparada com testemunhas não irradiadas. Os isolados em placa de Petri com meio BDA após 36 horas de incubação a 24°C, antes da exposição ao vapor de clorofórmio, foram irradiados com luz ultravioleta (lâmpada germicida de 15W, marca GE, modelo G15T8, comprimento de onda de 253,7 nm) em ambiente asséptico escuro durante 30 segundos a 15 centímetros da fonte luminosa. Após o tratamento, as placas irradiadas foram envolvidas com papel alumínio (BECKER, 1980) e novamente incubadas por mais 12 horas a 24°C. Posteriormente, foram conduzidas conforme os procedimentos descritos anteriormente para produção de bacteriocinas.

Para a determinação dos isolados bacteriocinogênicos, foram realizados três ensaios. O primeiro ensaio foi conduzido com os três meios de cultura citados em 3.3. e os outros dois ensaios seguintes foram conduzidos em meio de BDA.

3.9.1. Determinação da Sensibilidade de Bacteriocinas ao Calor

Os isolados determinados como produtores de bacteriocinas, após o período de incubação de 48 hs a 24°C,

e após a exposição aos vapores de clorofórmio, foram expostos a temperatura de 79°C em uma estufa durante 15 minutos. Decorrido esse tempo, as placas de Petri contendo os isolados foram resfriadas por 10 minutos e mantidas durante 60 minutos em temperatura ambiente, para a seguir receber o meio de cultura semi-sólido inoculado e a seguir as etapas normais descritas anteriormente no item 3.9 para produção de bacteriocinas. A produção de bacteriocina, através do tamanho do halo de inibição apresentado, foi comparada com a produção dos mesmos isolados sem exposição ao calor.

4. RESULTADOS

4.1. PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

4.1.1. Comportamento dos Isolados

Após a realização de três testes em meio BDA, para verificação da produção de bacteriocinas, utilizando-se os 29 isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum*, foi possível determinar que 16 deles produziram bacteriocinas, nas condições do presente estudo. Os resultados de produção e sensibilidade dos isolados a bacteriocinas são apresentados na Tabela 2.

Observa-se que o isolado 1 produziu bacteriocina contra o maior número de isolados e mostrou-se insensível a todas as bacteriocinas produzidas pelos demais, com exceção do isolado 25. Dos 29 isolados testados, 5 foram insensíveis, ou seja, não indicadores de nenhum dos isolados produtores e 13 não foram bacteriocinogênicos. Entre os isolados não bacteriocinogênicos estão incluídos quatro (14, 18, 19 e 26) que não foram estáveis quanto à produção de bac

Tabela 2. Produção de bacteriocinas por diferentes isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum*.

Produtores	Indicadores																													Nº de indicadores
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	19
2	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	10
3	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	14
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
5	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	12
6	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	16
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
11	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	8
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
14*																														
15	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	14
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
17	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	11
18																														
19																														
20	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	14
21	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	10
22	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
23	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	6
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
25	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	4
26																														
27	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	4
28	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	8
29	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	16

Sensível (+) ou Insensível (-) a bacteriocina
* = isolados 14, 18, 19 e 26 não confirmaram a produção de bacteriocinas nos testes realizados.

teriocina em todos os testes realizados. Pode-se notar ainda que os mesmos 5 isolados não indicadores, insensíveis a todos os demais isolados são entretanto, produtores de bacteriocinas.

De uma maneira geral, todas as bacteriocinas produzidas são de tipos diferentes e todos os isolados produtores foram imunes à sua própria bacteriocina.

Não foi observada alteração na produção de bacteriocinas quando os isolados foram submetidos à irradiação com luz ultravioleta.

4.1.2. Influência dos Meios de Cultura na Produção de Bacteriocinas

O primeiro ensaio para determinação dos isolados bacteriocinogênicos foi conduzido utilizando-se os três diferentes meios de cultura descritos no item 3.3. Verificou-se que no meio de BDA, 55% dos isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum* foram capazes de produzir bacteriocinas enquanto que nenhum dos isolados as produziu no meio Agar-Nutriente. No meio YDC, não foi possível a constatação da produção de bacteriocinas, devido a opacidade do meio causada pelo carbonato de cálcio, dificultando a leitura dos halos de inibição.

4.1.3. Determinação da Sensibilidade de Bacteriocinas ao Calor

Foi observado que as bacteriocinas produzidas por todos os isolados não foram inativadas pela exposição a 79°C de temperatura durante 15 minutos.

4.2. Identificação das Raças Fisiológicas

Os resultados obtidos nos três testes para identificação das raças fisiológicas de *X. campestris* pv. *malvacearum* mediante as reações de linhagens diferenciais de algodoeiro, (R) resistentes e (S) susceptíveis, estão resumidos na Tabela 3. Do total de vinte e nove isolados provenientes de diferentes localidades foram observados: Quatorze isolados da raça 18 (3, 5, 16, 19 e 29 do Estado de São Paulo; 1, 6, 9, 10 e 26 do Estado do Paraná; 14 do Estado de Mato Grosso; 15 do Estado de Minas Gerais; 18 do Estado de Goiás e 20 do Estado do Mato Grosso do Sul); três isolados da raça 19 (7 e 13 do Estado de São Paulo e 27 do Estado do Paraná); três isolados da raça 7 (23, 25 e 28 do Estado de São Paulo; dois isolados da raça 13 (21 e 22 do Estado de São Paulo); um isolado da raça 3 (2 do Estado de São Paulo); um isolado da raça 17 (8 do Estado de São Paulo) e cinco isolados não apresentaram patogenicidade (11, 12, 17 e 24 do Estado de São Paulo e 4 do Estado do Mato Grosso do Sul).

Tabela 3. Relação de linhagens diferenciais de algodoeiros inoculadas com vinte e nove isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum*.

Isolados Nº	LINHAGENS										
	Acala 44	Stoneville 2B-S9	Stoneville 20	Mebane B-1	1-10B	20-3	101-102B	Gregg	Empire B-4	DPx4	Raça
1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
2	S	S	R	R	S	R	R				3
3	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NP
5	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
6	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
7	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	19
8	S	S	S	R	R	S	R				17
9	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
10	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NP
12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NP
13	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	19
14	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
15	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
16	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NP
18	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
19	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
20	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
21	S	R	R	R	R	R	R				13
22	S	R	R	R	R	R	R				13
23	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	7
24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NP
25	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	7
26	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18
27	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	19
28	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	7
29	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	18

S = Reação de susceptibilidade; R = Reação de Resistência; NP = Não patogênico.

4.3. Produção de Bacteriocinas a Nível de Raça Fisiológica

A reação de resistência e sensibilidade a bacteriocinas foi variável entre raças e isolados dentro da mesma raça, como pode ser observado na Tabela 4. Exemplo disto pode ser verificado com a raça 18, que foi a mais representativa. De modo geral, a maioria dos isolados desta raça, produziu bacteriocinas contra as demais raças, exceto os da raça 7, bem como apresentou estirpes sensíveis às bacteriocinas produzidas pelos isolados desta mesma raça. Este fato não ocorreu com os demais isolados produtores das outras raças, os quais foram imunes à sua própria bacteriocina. Algumas estirpes da raça 18 foram sensíveis às bacteriocinas produzidas por isolados de outras raças e sem excessão, foram resistentes ao único produtor da raça 19.

Reciprocidade de produção de bacteriocinas entre raças pode ser verificada de uma maneira geral, por exemplo entre as raças 13 e 18 onde os isolados da raça 13 produzem contra alguns isolados da raça 18 e vice-versa. Produções do tipo unidirecional entre raças também foram observadas, como no caso das raças 7 e 18 em que todos os isolados da 7 produzem contra alguns isolados da 18 mas o contrário não ocorreu. Reciprocidade de não produção entre raças foi observada entre os isolados da raça 3 e 7, 3 e 17 e 7 com 17.

Tabela 4. Produção de bacteriocinas por diferentes raças fisiológicas de *X. campestris* pv. *malvacearum*.

Produtores	INDICADORES																									
	RÇ 18										RÇ 19			RÇ 7			RÇ 13		RÇ 3	RÇ 17	Ñ PATOG.				
	1	3	5	6	9	10	15	16	20	29	7	13	27	23	25	28	21	22	2	8	4	11	12	17	24
Raça 18																									
1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
5	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
6	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9	-	-	-	-	-	-	-																		
10	-	-	-	-	-	-	-																		
15	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+		
16	-	-	-	-	-	-	-																		
20	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
29	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+		
Raça 19																									
	-	-	-	-	-	-	-																		
13	-	-	-	-	-	-	-																		
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+					
Raça 7																									
23	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+		
25	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+							
28	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Raça 13																									
21	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+			
22	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Raça 3																									
2	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+		
Raça 17																									
8	-	-	-	-	-	-	-																		
Ñ Patog.																									
	-	-	-	-	-	-	-																		
11	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+		
12	-	-	-	-	-	-	-																		
17	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+			
24	-	-	-	-	-	-	-																		

A exemplo do que ocorreu com os isolados patogênicos comportamento semelhante foi observado para os isolados não patogênicos, com respeito à produção e sensibilidade a bacteriocinas.

5. DISCUSSÃO

Dos três meios de cultura testados no presente estudo para produção de bacteriocinas, por isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum*, apenas o meio BDA se mostrou eficiente. Este meio, além de favorecer principalmente a produção de bacteriocinas é de baixo custo quando comparado com os outros meios e permite a leitura do halo de inibição com maior precisão, devido a sua característica de translucidez. Contrariamente, o meio YDC, escolhido por se mostrar eficiente para o crescimento da cultura bacteriana, impossibilita a leitura dos halos de inibição devido a opacidade do meio causada pelo carbonato de cálcio.

Enquanto que 55% dos isolados do patógeno produziram bacteriocinas no meio BDA, em Agar- Nutriente a produção foi nula, provavelmente devido a presença de peptona no meio. Embora SANTOS (1979), trabalhando com *X. campestris* pv. *campestris*, tenha observado que 47% dos isolados produziram bacteriocina no mesmo meio Agar-Nutriente, diversos pesquisadores entre eles GROSS & VIDAVER (1979) verificaram que a composição do meio de cultura pode afetar profundamente a

produção de bacteriocinas, observando que meios contendo peptona podem incrementar ou inibir a produção.

A produção de bacteriocinas, em níveis bastante variáveis, tem sido verificada em diferentes espécies de bactérias fitopatogênicas. No presente estudo, 55% dos isolados de *X. campestris* pv. *malvacearum* produziram bacteriocinas e este número é bem próximo daqueles obtidos por YANO (1976) entre vários patovares desta espécie e SANTOS (1979) para o patovar *campestris*.

Diferenças na capacidade de produção e sensibilidade à bacteriocinas entre isolados de uma mesma espécie ou entre espécies proximamente relacionadas tem possibilitado a classificação infrasubespecífica das espécies (VIDAVER et alii, 1972; VIDAVER & BUCKNER, 1978). Por outro lado, uma vez que a produção de bacteriocinas embora geneticamente estável é alterada sob determinadas condições (REEVES, 1965), a utilização prática da mesma, quer na diferenciação das espécies ou raças, quer em estudos epidemiológicos, requer uma melhor caracterização da bacteriocina.

Com base nos resultados obtidos, pode-se verificar que todos os isolados produtores diferem entre si quanto à produção e à sensibilidade às bacteriocinas, tanto a nível de raças ou de isolados, bem como em relação à origem desses isolados. Portanto, não foi possível a caracterização destes em grupos por tipo de bacteriocinas devido a esta grande variação apresentada. Estes resultados são semelhantes aos

observados por YANO (1976) em patovares de *X. campestris* e SANTOS (1979) para o patovar *campestris*, sugerindo que a atividade bacteriocinogênica em *Xanthomonas* é mais complexa do que aquelas observadas para outras espécies pertencentes aos demais gêneros de bactérias fitopatogênicas.

De acordo ainda com os resultados obtidos, elementos para uma caracterização inicial das bacteriocinas produzidas puderam ser observados: as bacteriocinas produzidas por todos os 16 isolados produtores, podem ser consideradas termoestáveis e consequentemente, segundo BRADLEY (1967), bacteriocinas termoestáveis possuem baixo peso molecular; a produção por todos os isolados foi influenciada pela condição nutricional do meio de cultura, sendo provavelmente inibida em presença de peptona no meio; irradiação com luz ultravioleta não alterou o tamanho dos halos de inibição em nenhum dos isolados produtores, sugerindo que todas as bacteriocinas produzidas são liberadas totalmente pela ação do clorofórmio.

Excepcionalmente, uniformidade na sensibilidade a bacteriocinas foi observada apenas entre os isolados da raça 7, os quais foram imunes às bacteriocinas produzidas por todas as outras raças. Como foi observada uma grande variação da atividade bacteriocinogênica entre os isolados estudados, ficam impossibilitadas de uma análise definitiva as raças que possuem poucos isolados representantes, como é o caso pelo menos das raças 3, 13 e 17. Embora os isolados des-

tas raças juntamente com os das raças 7 e 19, pouco mais representativas, não foram sensíveis às próprias bacteriocinas produzidas, não se pode afirmar que não o sejam, uma vez que este fato foi evidenciado entre os isolados da raça 18, considerada mais representativa. Como pode ser observado na Tabela 3, a raça 18 é mais patogênica que as demais raças, e embora exista uma certa tendência dos isolados que a representam em produzir bacteriocinas contra um maior número de isolados, não foi observado relação entre produção de bacteriocinas e patogenicidade uma vez que isolados considerados não patogênicos também produziram tais substâncias. Neste particular, a existência de isolados não patogênicos produtores de bacteriocinas pode ser de grande valia na proteção cruzada de doenças bacterianas de plantas.

Segundo LWOFF (1953), uma partícula de bacteriocina é suficiente para matar uma célula bacteriana sensível. Com base nesta informação, BECKER (1980) e KUROZAWA (1980) sugeriram a possibilidade de que quando se deseja fazer inoculações de plantas com mistura de isolados ou raças, aqueles isolados ou raças que possuem propriedades bacteriocinogênicas, causarão a morte das células sensíveis, consequentemente, alterando os resultados das inoculações sobre o hospedeiro. De fato, os resultados obtidos no presente estudo, sustentam esta possibilidade.

Particularmente, para a bactéria em questão, o uso de mistura de raças para inoculação em trabalhos de melhoramento visando resistência do algodoeiro, é prática de rotina, como pode ser observado nos trabalhos de THAXTON et

alii (1983), MAHILL et alii (1983) e BIRD et alii (1984). Tendo em vista que, é possível a presença de mais de uma raça desta bactéria no mesmo hospedeiro, na mesma folha e ainda na mesma lesão (CHOWDHURY et alii, 1979), acrescida da possibilidade de bactérias desenvolveram atividades bacteriocinogênicas no tecido da planta (SMIDT & VIDAVER, 1982) é de se refletir com base nos resultados obtidos no presente estudo, sobre a importância da determinação da produção de bacteriocinas pelos isolados representantes das raças antes de serem misturados e inoculados no hospedeiro.

Como pode ser observado nos trabalhos de BIRD (1981) e RUANO & MOHAN (1982), são conhecidas até o presente momento, 19 raças fisiológicas de *X. campestris* pv. *malvacearum*. Destas, apenas cinco de ocorrência no Brasil ou seja, as raças 3, 8 e 10 no Estado de São Paulo (CIA, 1972) e as raças 18 e 19 no Estado do Paraná (RUANO & MOHAN, 1982).

De acordo com os resultados obtidos, resumidos na Tabela 3, entre os isolados estudados provenientes de diferentes regiões algodoeiras do Brasil (Tabela 1), foi possível detectar a ocorrência de seis raças, sendo as raças 3, 18 e 19 já conhecidas anteriormente enquanto que para as raças 7, 13 e 17 o autor deste trabalho desconhece relatos de ocorrência nas regiões mencionadas.

Até o presente momento, não existiam informações a respeito da ocorrência de raças nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. A única raça

constatada entre os isolados oriundos destas regiões foi a raça 18. Para o Estado do Paraná, não houve alteração das informações sobre as raças, sendo confirmadas as raças 18 e 19 já relatadas. Porém, para o Estado de São Paulo, o panorama foi alterado com a constatação das raças 7, 13, 17, 18 e 19, sobre as quais o autor desconhece relatos de ocorrência e por outro lado, das três raças já detectadas anteriormente ou seja, raças 3, 8, e 10 apenas a raça 3 teve a sua ocorrência confirmada. Sobre a raça 8, embora se tenha trabalhado com isolados provenientes de lavouras das regiões onde esta raça foi detectada pela primeira vez, não foi possível recuperá-la. Entretanto, é prematura qualquer conclusão definitiva a respeito da não recuperação desta raça, uma vez que poucos isolados foram avaliados. A raça 10 também não foi observada, porém, é possível que esta seja a mesma raça 18 detectada no presente estudo. Quando a raça 10 foi detectada por CIA (1972), apenas 17 raças fisiológicas do patógeno tinham sido identificadas até aquela data com base nas reações apresentadas por sete linhagens diferenciais de algodoeiro (BRINKERHOFF, 1970). Destas, apenas a linhagem 101-102B apresentou reação de resistência a esta raça. Posteriormente, HUSSAIN & BRINKERHOFF (1978) acrescentaram a este grupo, permanecendo até a presente data, três novas linhagens para diferenciação da raça 18. Portanto, estas três novas linhagens diferenciam a raça 10 da raça 18 uma vez que as reações das sete linhagens anteriores, são idênticas para am

bas. Deste modo, das dez linhagens que compõem o atual grupo de hospedeiros diferenciais, apenas a linhagem 101 - 102B apresenta resistência à raça 18 enquanto que para a raça 10, além dessa linhagem duas outras das três novas linhagens introduzidas no grupo, apresentam reações de resistência.

Nas condições do presente trabalho, foi possível detectar a presença de raças fisiológicas do patógeno nas regiões algodoeiras estudadas, da seguinte forma: raças 3, 7, 13, 17, 18 e 19 no Estado de São Paulo; raças 18 e 19 no Estado do Paraná; raça 18 nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Como se pode observar, a raça 18, considerada até o presente momento como a mais virulenta, capaz de infectar todas as linhagens portadoras de genes de resistência, com exceção da linhagems 101-102B, foi detectada em todas as regiões estudadas. Embora não tenha sido possível no presente trabalho, seria de grande interesse determinar as áreas de distribuição das diferentes raças fisiológicas para uma melhor orientação, quando da distribuição de cultivares para o plantio. Por ora, o conhecimento da predominância da raça 18, considerada a mais patogênica atualmente, em diferentes regiões algodoeiras, vem contribuir para um direcionamento mais adequado dos programas de melhoramento visando à introdução de resistência genética a esta raça. Cabe ressaltar também que a variabilidade do patógeno deve ser investigada constantemente, uma vez que mutantes tem sido observados (FOLLIN, 1983; BIRD et alii,

1983 e BIRD et alii, 1984), os quais podem infectar todas as linhagens diferenciais inclusive a 101-102B, considerada resistente a todas as raças até então identificadas.

6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir:

a - Existe grande variação entre os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* quanto a capacidade de produção e sensibilidade às bacteriocinas, impossibilitando a caracterização por grupos segundo a atividade bacteriocinogênica tanto a nível de raças ou isolados ou quanto a procedência dos mesmos;

b - As bacteriocinas produzidas mostraram-se termoestáveis a 79°C por 15 minutos;

c - O meio BDA foi adequado para a produção de bacteriocinas por isolados do patógeno, enquanto que em meio Agar-Nutriente a produção foi inibida;

d - Foram detectadas as raças fisiológicas 3, 7, 13, 17, 18 e 19 de *X. campestris* pv. *malvacearum*, com base nas reações de patogenicidade apresentadas pelo grupo de linhagens diferenciais de algodoeiro. Todas estas raças foram observadas no Estado de São Paulo;

e - A raça fisiológica 18 foi detectada em isolados provenientes de todas as regiões produtoras de algodão da Zona Meridional do Brasil, enquanto que para as demais raças foi observado ocorrência menos generalizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J.L. Tópicos de genética microbiana e molecular. II. Genética de Procariotos, Piracicaba, 1977. 207p.

BALMER, E.; B.P.B. CRUZ; A.P. da SILVEIRA. Ocorrência de fungos que afetam as maçãs do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo, 34: 161.167, 1967.

BECKER, W.F. Atividade bacteriocinogênica, resistência a antibióticos e métodos rápidos para determinação da patogenicidade em *Pseudomonas glycinea* Coerper. Piracicaba, ESALQ /USP, 107p., 1980 (Dissertação de Mestrado).

BIRD, L.S. Resistance of TAM-MAR bacterial and host differentials for races. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCES, 41., New Orleans. Proceedings. Memphis, National Cotton Council, 1981. p.6-7.

BIRD, L.E. & A. TSAI. A new race of *Xanthomonas malvacearum*. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCES, 35., New Orleans, Proceedings. Memphis, National Cotton Council, 1975. p.9-10.

BIRD, L.S.; P.M. THAXTON ; C. LIVERMAN. New races of *Xanthomonas malvacearum*. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCES, 43., San Antonio. Proceedings. Memphis, National Cotton Council, 1983. p.6.

BIRD, L.S.; P.M. THAXTON; R.G. PERCY; K.M. EL-ZIK; M. HOWELL; M.A. POSWAL. Resistance to new races of the bacterial blight pathogen and its implications within the multiadversity resistance genetic improvement system for cotton. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCES, 44., Atlanta. Proceedings. Memphis, National Cotton Council, 1984. p.31-35.

BITTANCOURT, A.A. Doenças do Algodoeiro. In: AUTUORI, M. e A.A. BITTANCOURT. Pragas e Doenças do Algodoeiro. São Paulo, Instituto Biológico de São Paulo, 1935. (Tese nº 9), p.15-36.

BRADBURY, J.F. Guide to plant pathogenic bacteria. Farnham Royal, CAB International Mycological Institute, 1986. p.332.

BRADLEY, D. E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriological Review, Baltimore, 31: 230-314, 1967.

BRINKERHOFF, L.A. Variability of *Xanthomonas malvacearum*. The cotton bacterial blight pathogen. Oklahoma, Agric. Exp. St., 1966. 95p. (Tech. Bull., T-98).

BRINKERHOFF, L.A. Variation in *Xanthomonas malvacearum* and its relation to control. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 8: 85-110, 1970.

BRINKERHOFF, L.A. & T. HUSSAIN. Evaluation of american and african bacterial blight resistant upland cotton lines in Pakistan in 1977. Plant Disease Reporter, Beltsville, 62: 1082-1085, 1978.

BRODIE, B.B. & W.E. COOPER. Reaction of differential cotton varieties to isolates of *Xanthomonas malvacearum* in North Carolina. Plant Disease Reporter. Beltsville, 44: 800-801, 1960.

CARLSON, R.R. & A.K. VIDAVER. Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel eletrophoresis of cellular proteins. International Journal of Systematic Bacteriology. Nebraska, 32: 315-326, 1982.

CHEW, C.F.; J.T. PRESLEY; G. STATEN. Survey, screening and breeding for bacterial blight resistance in cotton. Plant Disease Reporter. Beltsville, 53: 390-391, 1969.

CIA, E. Variabilidade de *Xanthomonas malvareacum* (E.F. Smith) Dowson, no Estado de São Paulo. Piracicaba, ESALQ / USP, 57p., 1972 (Tese de Doutoramento).

CIA, E.; C.A.M. FERRAZ; J. SOAVE; M.H. SUGIMORI. Quadro sintomatológico causado por *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dowson em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de São Paulo. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 2: 172-177, 1976.

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. Summa Phytophathologica. Piracicaba, 3: 167-177, 1977.

CIA, E.; I.L. GRIDI-PAPP; C.A.M. FERRAZ. Correlações entre respostas de resistência apresentadas por linhagens de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) a três agentes patogênicos. Summa Phytopathologica. Piracicaba, 4; 111 - 121, 1978.

CHOWDHURY, H.D.; R.P. SINGH; J.P. VERMA. Presence of more than one race of *Xanthomonas malvacearum* in lesion on leaves of *Gossypium hirsutum*. Indian Phytopathology. New Delhi, 32: 110-112, 1979.

CROWLEY, C.F. & S.H. DE BOER. Sensitivity of some *Erwinia carotovora* serogroups to macromolecular bacteriocins. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 26:1023-1028, 1980.

CRUZ, B.P.B.; A.P. SILVEIRA; J. ABRAHÃO; S.G.P. SILVEIRA. Observações preliminares sobre o controle químico da mancha angular do algodoeiro. O Biológico. São Paulo, 31: 117-119, 1965.

CUPPELS, D.A.; R.S. HANSON; A. KELMAN. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. Journal of General Microbiology. Oxford, 109: 295-303, 1978.

DE VAY, J.E.; F.L. LUKEZIC; S.L. SINDEN; H. ENGLISH; D. L. COPLIN. A biocide produced by pathogenic isolates of *Pseudomonas syringae* and its possible role in the bacterial canker disease of peach trees. Phytopathology. Worcester, 58: 95-101, 1968.

DYE, D.W. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The "amylovora" group. New Zealand Journal of Science. Wellington, 11: 590-607, 1968.

DYE, D.W. Genus IX. *Xanthomonas* Dowson, 1939. In: YOUNG, J. M.; D.W. DYE; J.F. BRADBURY; C.G. PANAGOPOULOS e C.F. ROBS. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research. Wellington, 21: 162-177, 1978.

DYE, D.W.; J.F. BRADBURY; M. GOTO; A.C. HAYWARD; R.A. LELLIOTT, M.N. SCHROTH. International standards for ing pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of patho var names and pathotype strains. Review of Plant Pathology. Kew, 59: 153-168, 1980.

DYE, D.W. & R.A. LELLIOTT. Genus II. *Xanthomonas* Dowson, 1939. In: BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS, eds. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8a ed., Baltimore, Willians & Wilkins, Company, 1974. p.243-249.

ECHANDI, E. Bacteriocin production by *Corynebacterium michiganense*. Phytopathology. Saint-Paul, 66: 430-432, 1976.

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

ELLIOTT, C. Manual of Bacterial Plant Pathogen. Baltimore, Willians & Wilkins Company, 1930. 349p.

EXPERT, D. & A. TOUSSAINT. Bacteriocin-resistant mutants of *Erwinia chrysanthemi*: Possible involvement of iron acquisition in phytopathogenicity. Journal of Bacteriology. Baltimore, 163: 221-227, 1985.

FOLLIN, J.C. New races of *Xanthomonas malvacearum* virulent to the B_2 B_3 gene combination in *Gossypium hirsutum* L. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCE, 43.; San Antonio. Proceedings. Memphis, National Cotton Council, 1983. p.5.

GILLIES, R.R. & J.R.W. GOVAN. Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production. Journal of Pathology and Bacteriology. London, 91: 339-345, 1966.

GRIDI-PAPP, I.L.; E. CIA; M.G. FUZATTO; P.A. CAVALERI; E.J. CHIAVEGATO; C.A.M. FERRAZ; N.P. SABINO; J.I. KONDO; J.SOAVE; N. BORTOLETTO, Melhoramento do algodoeiro no Estado de São Paulo: Obtenção da variedade IAC 18. Bragantia. Campinas, 44(2): 645-658, 1985.

GROSS, D.C. & A.K. VIDAVER. Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 25: 367-374, 1979.

HAMON, Y.; M. VÉRON; Y. PÉRON. Contribution a l'étude des propriétés lysogénes et bactériocinogènes dans le genre *Pseudomonas*. Annales de L'Institut Pasteur. Paris, 101: 738-753, 1961.

HAYES, T.J.; K.R. CUNDY; P.B. FERNANDES; J.K. HOOBER. Purification and caracterization of a bacteriocin from *Bacteroides fragilis*. Journal of Bacteriology. Baltimore, 155: 1171-1177, 1983.

HEMPEL, A. As pragas e moléstias mais nocivas do algodoeiro e seu tratamento. São Paulo, Secretaria da Agricultura, Commercio e Obras Públicas do Estado de São Paulo, 1927. 60p.

HUNTER, R.E.; L.A. BRINKERHOFF; L.S. BIRD. The development of a set of upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. Phytopathology. Worcester, 58: 830-832, 1968.

HUNTER, R.E. & L.M. BLANK. Pathogenicity differences of *Xanthomonas malvacearum* isolates. Phytopathology. Baltimore, 44: 332 (Abstr.), 1954.

HUSSAIN, T. & L.A. BRINKERHOFF. Race 18 of the cotton bacterial blight pathogen, *Xanthomonas malvacearum*, identified in Pakistan in 1977. Plant Disease Reporter, Beltsville, 62: 1085-1087, 1978.

IVÂNOVICS, G. Bacteriocins and bacteriocin-like substances. Bacteriological Review. Baltimore, 26: 108-118, 1962.

JACOB, F.; A. LWOFF; L. SIMINOVITCH; E. WOLLMAN. Définition de quelques termes relatifs a la lysogénie. Annales de L'Institut Pasteur. Paris, 84: 222-224, 1953.

KERR, A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. Plant Disease. Saint Paul, 64: 24-30, 1980.

KERR, A. & K. HTAY. Biological control of crown gall through bacteriocin production. Physiological Plant Pathology. New York, 4: 37-44, 1974.

KIMATI, H. Doenças do Algodoeiro - *Gossypium* spp. In: GALLI, F., Coord. Manual de Fitopatologia, 2a. ed., São Paulo, 1980. Editora Agronômica Ceres, Vol. II, cap. 4, p.29-48.

KUROZAWA, C. Caracterização de *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen através de sorologia e sensibilidade a bacteriófagos, a drogas e a bacteriocinas. Botucatu, UNESP, 1980. 61p. (Tese de Livre-Docência).

LWOFF, A. Lysogeny. Bacteriological Reviews. Baltimore, 17: 269-337, 1953.

MAYR-HARTING. A.; A.J. HEDGES; R.C.W. BERKELEY. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R. e D.W. RIBBONS. Methods in Microbiology. New York, Academic Press, 1972. vol. 7A, p.315-422.

MAHILL, J.F.; J.N. JENKINS; W.R. MEREDITH Jr.; V. MEYER. Influence of *Gossypium* citoplasms on expression of bacterial blight. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCES, 43., San Antonio. Proceedings, Memphis, National Cotton Council, 1983. p.6.

MESQUITA, M.M.F.; M.M.L.A. SOUTO; J.M.S. MARTINS. Sensitivity to bacteriophages and bacteriocins among epiphytic fluorescent *Pseudomonads*. Revista de Biologia. Oeiras, 12: 529-538, 1983.

MOORE, L.W. & G. WARREN. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. Annual Review of Phytopathology. Palo Alto, 17: 163-179, 1979.

NELSON, G.A. & G. SEMENIUK. An antagonistic variant of *Corynebacterium insidiosum* and some properties of the inhibitor. Phytopathology. Worcester, 54: 330-335, 1964.

NOMURA, M. Colicins and related bacteriocins. Annual Review Microbiology. Palo Alto, 21: 257-284, 1967.

OKABE, N. & M. GOTO. Bacteriophages of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology. Palo Alto, 1: 397-418, 1963.

REEVES, P. The bacteriocins. Bacteriological Review. Baltimore, 29: 24-45, 1965.

REEVES, P. The bacteriocins. New York. Springer - Verlag, 1972. Vol. 11, 144p.

RUANO, O. & S.K. MOHAN. Nova raça de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) Dye no Estado do Paraná. Fitopatologia Brasileira. Brasília, 7(3): 439-442, 1982.

SANTOS, M.M.L.S. Produção de bacteriocinas e resistência a antibióticos em *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. Piracicaba, ESALQ/USP, 1979. 81p. (Dissertação de Mestrado).

SCHNATHORST, W.C.; P.M. HALISKY; R.D. MARTIN. History, distribution, races, and disease cycle of *Xanthomonas malvacearum* in California. Plant Disease Reporter. Beltsville, 44: 603-608, 1960.

SMIDT, M.L. & A.K. VIDAVER. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* PsW-1 in plant tissue. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 28: 600-604, 1982.

SMIDT, M.L. & A.K. VIDAVER. Isolation and characterization of syringacin W-1, bacteriocin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 32: 231-236, 1986.

SMITH, T.E. A variant culture of *Xanthomonas malvacearum* obtained from weeds roots. Phytopathology. Worcester, 52: 1313-1314, 1962.

STONIER, T. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. Journal of Bacteriology. Baltimore, 79: 889-898, 1960.

TAGG, J.R.; A.S. DAJANI; L.W. WANNAMAKER. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriological Review. Baltimore, 40: 722-756, 1976.

THAXTON, P.; L.S. BIRD; K.M. EL-ZIK. Variability for resistance to new races of *X. malvacearum*. In: BELTWIDE COTTON PRODUCTION RESEARCH CONFERENCES, 43., San Antonio. Proceedings. Memphis, National Cotton Council, 1983. p.5-6.

VERMA, J. P. & R. P. SINGH. Two new races of *Xanthomonas malvacearum*, the cause of blackarm of cotton. Cotton Growing Review. London, 47: 203-205, 1970.

VIDAVER, A.K. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. Annual Review of Phytopathology. Beltsville, 14: 451-465, 1976.

VIDAVER, A.K. Diversity of *Corynebacterium nebraskense* strains causing goss's bacterial wilt and blight of corn. Plant Disease. Saint Paul, 65: 480-483, 1981.

VIDAVER, A.K.; M.L. MATHYS; M.E. THOMAS; M.L. SCHUSTER. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea* and *P. phaseolicola*. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 18: 705-713, 1972.

VIDAVER, A.K. & S. BUCKNER. Typing of fluorescent phytopathogenic pseudomonads by bacteriocin production. Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 24: 14-18, 1978.

YANO, T. Estudo bacteriológico e sorológico de algumas amostras pertencentes à vários patotipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. Campinas, UNICAMP, 1976. 65p. (Dissertação de Mestrado).

YOUNG, J.M.; D.W. DYE; J.F. BRADBURY; C.G. PANAGOPOULOS; C. F. ROBBS. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research. Wellington, 21: 153-177, 1978.