



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FLÁVIA REGINA SPAGO

**EFICIÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE  
*Pseudomonas aeruginosa* NO CONTROLE DE TRÊS  
ESPÉCIES DO GÊNERO *Xanthomonas*.**

FLÁVIA REGINA SPAGO

**EFICIÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE  
*Pseudomonas aeruginosa* NO CONTROLE DE TRÊS  
ESPÉCIES DO GÊNERO *Xanthomonas*.**

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho.

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S733e Spago, Flávia Regina.  
Eficiência de metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* no controle  
de três espécies do gênero *Xanthomonas* / Flávia Regina Spago. – Londrina, 2012.  
95 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.  
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012.  
Inclui bibliografia.

1. Ecologia microbiana – Teses. 2. Xanthomonas – Testes microbiológicos –  
Teses. 3. Pseudomonas aeruginosa – Teses. 4. Microorganismos fitopatogênicos –  
Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.26

FLÁVIA REGINA SPAGO

**EFICIÊNCIA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Pseudomonas aeruginosa* NO CONTROLE DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *Xanthomonas*.**

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Orientador Dr. Galdino  
Andrade Filho  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Marcus Barifouse Matallo  
Instituto Biológico de Campinas – IB

---

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Profa. Dra. Maria Isabel Balbi Peña  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina 12 de Julho de 2012.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina e contou com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho a minha família,  
Irene e Kiel, por estarem sempre  
presentes, apoiando todos os  
momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar a minha vida sempre por caminhos recompensadores.

À minha mãe, Irene Spago, por todo amor, incentivo e apoio nos estudos e em todas as outras etapas de minha vida.

À meu companheiro, Kiel Gonçalves, pela motivação, apoio e companheirismo, pelas demonstrações de amor e carinho nas horas mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade por todos os ensinamentos, paciência, profissionalismo e dedicação ao longo destes anos. Meu muito Obrigado!

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela amizade, apoio na condução e interpretação dos experimentos, por sempre nos receber em seu laboratório dando todo o suporte necessário.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia Gadalupe Tardelli de Jesus Andrade, por ter aberto as portas de seu laboratório para complementar esse trabalho, por toda a paciência e todos os ensinamentos transmitidos ao longo desses anos.

À todos os colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana, Ane, Carina, Carol, Cíntia, Eik, Fernanda, Guilherme, Jamile, Jaqueline, Júnior, Lucilene, Mayara, Priscila, Vanessa, Viviana, pelo apoio nos trabalhos, pela amizade e pelo companheirismo durante os últimos quatro anos.

Aos meus amigos Milena, Ricardo, Juliana, Henrique, Priscila, Saulo pela grande amizade, por me apoiarem sempre quanto as difíceis decisões.

Ao amigo Juca Abramo San Martin, por todos os ensinamentos, pela imensa disposição de trabalho no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise.

Aos Técnicos Marta S. A. Salvador e Oswaldo Capelo, pela amizade, apoio e disposição no trabalho.

À Coordenação da Pós Graduação em Microbiologia, por fornecer condições para a realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pelo apoio e orientação.

À Capes pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

**Muito obrigado!**

*“Não há lágrima que nunca seque, e sorriso que nunca passe. Não há noite tão terrível que não encontre lenitivo com o raiar do dia. E não existe dia tão escaldante que não permita o repouso ao sereno da noite. Não existe amor tão grande que não possa ser substituído pelo fanar do espírito de uma nova paixão. E não existe traição tão gritante que não possa ser esquecida ao se exercer o perdão. Não existe caminho tão distante que a perseverança não permita o homem atravessar. Não existe deserto tão inóspito que o coração e a vontade não consiga conquistar...”*

Geovane Moraes

SPAGO, Flávia Regina. **Eficiência de metabólitos secundários de *Pseudomonas aeruginosa* no controle três espécies do gênero *Xanthomonas***. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

Bactérias do gênero *Xanthomonas* infectam diversas culturas agrícolas causando sérias perdas econômicas em todo o mundo. A utilização dos compostos bactericidas existentes no mercado é pouco eficiente, uma vez que existem muitos organismos resistentes, além de causar danos ao meio ambiente devido a sua ação tóxica. Assim, faz-se necessário a busca por novos compostos que controlem esses fitopatógenos de maneira efetiva, sem colocar em risco as questões ambientais. O objetivo deste trabalho foi isolar compostos do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* e testá-los contra três bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*. Os resultados de microscopia eletrônica mostraram que o composto isolado age sobre as bactérias danificando a estrutura de exopolissacarídeos, estrutura que auxilia a infecção do hospedeiro e protege a bactéria dos fatores ambientais. Observou-se morte celular após uma hora do tratamento das bactérias com o composto. Em casa de vegetação, observou-se uma diminuição significativa na formação de lesões em todos os ensaios conduzidos. No controle de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *citri* os resultados apresentaram uma diminuição significativa na formação e lesões no tratamento preventivo. Já no controle de *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, o número de lesões diminuiu no tratamento curativo. O desenvolvimento de novos produtos, capazes de controlar essas bactérias fitopatogênicas, atuando conjuntamente com outras práticas de controle, é um passo importante para reduzir os danos causados a agricultura e ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** *Xanthomonas*. *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobianos. Controle integrado.

SPAGO, Flávia Regina. **Efficiency of *Pseudomonas aeruginosa* secondary metabolites in the control of three *Xanthomonas* species**. 2012. 98 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

### ABSTRACT

*Xanthomonas* spp. are able to grow inside plant tissues, causing diseases and important agricultural losses in agriculture all over the world. The use of commercial bactericides is inefficient, once there are many resistant microorganisms. These compounds also causes environmental damages due to toxicity. The search for new antimicrobial compounds that effectively control this plant pathogens with no risks for the environment is absolutely necessary. The aim of this work was to isolate secondaries metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* and test them against three different plant pathogenic species of *Xanthomonas*. Electron microscopy results showed that this compound acts on bacterial cell through damage of exopolissacarides adhesion and difficulting cell adhesion and protection against environmental changes. We showed bacterial cell death after one hour of treatment. In greenhouse conditions, the number of lesions in the leaf decreased significantly in all the experiments. Control of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. citri* pv. *citri* demonstrated significant reduction of lesion formation in preventive treatment. Control of *X. axonopodis* pv. *malvacearum* showed lesion reduction in curative treatment. Development of new products, able to control plant patogenic bacteria integrated with other methods of control, is an important step to reduce damages caused to agriculture and environment.

**Keywords:** *Xanthomonas*. *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobials. Integrated control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Produção de exopolissacarídeos por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .....	21
<b>Figura 2</b> – Favorecimento da infecção .....	23
<b>Figura 3</b> – Sintomas do crestamento bacteriano comum causado por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> .....	25
<b>Figura 4</b> – Sintomas causados por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> .....	27
<b>Figura 5</b> – Sintomas causados por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> .....	28
<b>Figura 6</b> - Sintomas causados por <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> .....	31
<b>Artigo 1</b>	
<b>Figure 1</b> – Scanning Electron Micrography of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i> .....	57
<b>Figure 2</b> – Transmission Electron Micrography of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i> .....	57
<b>Artigo 2</b>	
<b>Figure 1</b> – Scanning Electron Micrography of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Malvacearum</i> .....	80
<b>Figure 2</b> – Scanning Electron Micrography of <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Citri</i> .....	80
<b>Figure 3</b> – Scanning Electron Micrography of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i> .....	80
<b>Figure 4</b> – Scanning Electron Micrography of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i> .....	80
<b>Figure 5</b> – Effect of the VLC4f fraction on lesion number of bacterial leaf blight of cotton caused by <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> on plants of <i>Gossypium hirsutum</i> after 20 days of application .....	80
<b>Figure 6</b> – Effect of the VLC4f fraction on lesion number of bacterial leaf blight of citrus canker caused by <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> on plants of <i>Citrus sinensis</i> after 21 days of application.....	80

<b>Figure 7</b> – Effect of the VLC3d fraction on the percentage of lesion of bacterial blight of beans caused by <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> on plants of <i>Phaseolus vulgaris</i> after 20 days of application.....	80
<b>Figure 8</b> – Effect of the VLC4f fraction on the percentage of lesion of bacterial blight of beans caused by <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> on plants of <i>Phaseolus vulgaris</i> after 20 days of application.....	81
<b>Figure 9</b> – Effect of the VLC4f fraction on the percentage of lesion of bacterial blight of beans caused by <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> on plants of <i>Phaseolus vulgaris</i> after 20 days of application.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EAP	Fração acetato de etila
EP	Exopolissacarídio
VLC 1	Fração hexano
VLC 2	Fração diclorometano
VLC 3	Fração acetato de etila
VLC 4	Fração metanol
VLC 5	Fração metanol/água
VLC 6	Fração água
VLC3a	Fração hexano
VLC3b	Fração hexano/diclorometano
VLC3c	Fração diclorometano
VLC3d	Fração diclorometano/acetato de etila
VLC3e	Fração acetato de etila
VLC3f	Fração acetato de etila/metanol
VLC3g	Fração metanol
VLC3h	Fração metanol/água
VLC3i	Fração água
VLC4a	Fração hexano
VLC4 b	Fração hexano/diclorometano
VLC4c	Fração diclorometano
VLC4d	Fração diclorometano/acetato de etila
VLC4e	Fração acetato de etila
VLC4f	Fração acetato de etila/metanol
VLC4g	Fração metanol
VLC4h	Fração metanol/água
VLC4i	Fração água
MIC	Concentração inibitória mínima
NA	Ágar nutriente
NB	Caldo nutriente
OD	Densidade óptica
OsO4	Tetróxido de Ósmio
PSA	Meio Peptona Sacarose Ágar

SEM	Microscopia eletrônica de varredura
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TSA	Meio de soja tríptico
UFC	Unidade formadora de colônias
Xcc	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>
Xap	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
Xam	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
3.1	CONTROLE BIOLÓGICO .....	14
3.2	ANTIMICROBIANOS .....	15
3.2.1	Purificação de Compostos Antimicrobianos por Cromatografia .....	16
3.3	<i>PSEUDOMONAS</i> .....	17
3.3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
3.4	BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS.....	18
3.4.1	Controle de Fitoatógenos .....	21
3.4.2	<i>Xanthomonas</i> sp.....	20
3.4.2.1	Taxonomia.....	22
3.4.2.2	Sobrevivência no ambiente .....	23
3.4.2.3	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> : Agente causal do crestamento bacteriano comum .....	24
3.4.2.3.1	<i>Sintomas do crestamento bacteriano comum</i> .....	25
3.4.2.3.2	<i>Métodos de controle do crestamento bacteriano comum</i> .....	26
3.4.2.4	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> : Agente causal da mancha angular do algodoeiro .....	27
3.4.2.4.1	<i>Sintomas da mancha angular do algodoeiro</i> .....	28
3.4.2.4.2	<i>Métodos de controle da mancha angular do algodoeiro</i> .....	29
3.4.2.5	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> : Agente causal do cancro cítrico asiático .....	30
3.4.2.5.1	<i>Sintomas do cancro cítrico asiático</i> .....	32
3.4.2.5.2	<i>Métodos de controle do cancro cítrico asiático</i> .....	33
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>35</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>ARTIGOS</b> .....	43
<b>Artigo 1 - Ultra structural studies on the antimicrobial activity of <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LN strain)</b> .....	44
<b>Artigo 2 - The action of semi-purified fractions produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in the control of <i>Xanthomonas</i> sp</b> .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

Durante a produção e processamento de produtos agrícolas ocorrem significativas perdas econômicas devido à ação de microrganismos fitopatogênicos que causam danos a planta. Esses microrganismos são capazes de entrar pelas aberturas naturais da planta ou por meio de ferimentos e colonizar os tecidos vegetais, causando sérias doenças.

As bactérias do gênero *Xanthomonas*, são bastonetes gram-negativos, aeróbios, móveis, capazes de colonizar o filoplano e sobreviver epifiticamente na planta. Ao invadir o apoplasto, essas bactérias estabelecem infecção crônica e danificam os tecidos vegetais, causando sérias perdas na quantidade e na qualidade dos produtos da agricultura.

Entre as espécies desse gênero, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. axonopodis* pv. *malvacearum* e *X. citri* pv. *citri*, infectam plantas de feijão, algodão e laranja, respectivamente, desenvolvendo lesões nas folhas, caules e frutos e causando desfolha total da planta em infecções mais severas.

O controle integrado utilizado para minimizar os danos relativos a essas infecções incluem a aplicação de compostos antibióticos, compostos a base de cobre, tratamentos culturais, produção de sementes ou mudas livre de patógenos e desenvolvimento de variedades resistentes. Ainda assim, esses cuidados não são suficientes para minimizar os impactos causados por esses patógenos, principalmente devido ao desenvolvimento de resistência por parte desses microrganismos. Os danos ambientais causados pela aplicação de compostos cúpricos constituem um problema ainda maior, devido a sua alta toxicidade.

Perante esses problemas, torna-se necessário o desenvolvimento de novos produtos antimicrobianos que possam ser integrados às práticas de manejo e que ao mesmo tempo, possuam baixa toxicidade a outros seres vivos e baixa persistência no meio ambiente.

Esse trabalho foi dividido em revisão de literatura e dois artigos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar frações semipurificadas contendo metabólitos secundários com atividade antibiótica produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LN e testar contra três espécies de *Xanthomonas*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir a produção de compostos antibióticos do metabolismo secundário da cepa LN com atividade antibiótica contra *Xanthomonas sp.*
- Obter frações semipurificadas com metabólitos secundários produzidos pela cepa LN utilizando métodos cromatográficos.
- Determinar a ação *in vitro* das frações semipurificadas obtidas contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* e *Xanthomonas citri* pv. *citri*.
- Observar as alterações na morfologia das células de *Xanthomonas* e na produção de biofilme durante o tratamento com as frações semipurificadas, utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

- Determinar a atividade das frações na redução da formação de lesões em feijão, algodão e laranja em condições de casa de vegetação.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bactérias fitopatogênicas são responsáveis por grandes perdas em culturas economicamente importantes, como hortaliças e frutas. Embora muitas pesquisas sejam feitas para reduzir os danos causados por esse tipo de bactéria, uma grande dificuldade encontrada é a falta de controle efetivo contra algumas doenças severas. A proteção de plantas contra esses patógenos é principalmente baseada na utilização de derivados de cobre e antibióticos. Entretanto, esses compostos são considerados como contaminantes ambientais e cepas de bactérias fitopatogênicas resistentes foram descritas em várias culturas (FERRE et al., 2006).

#### 3.1 CONTROLE BIOLÓGICO

Durante o cultivo e pós-colheita de produtos agrícolas, ocorrem significativas perdas econômicas devido à ação de micro-organismos deletérios que causam doenças.

Pequenos ferimentos ou cortes, que ocorrem durante a colheita e transporte, promovem o acesso fácil a patógenos em potencial. A podridão do mofo azul, causada por fungos de várias espécies, incluindo *Penicillium*, *Botrytis cinerea*, e *Monilinia laxa*, assim como outros fungos produtores de micotoxinas, e bactérias como *Erwinia carotovora* e *Xanthomonas vesicatoria* tem sido descritas como micro-organismos causadores de deterioração comum de frutas frescas e hortaliças (TRIAS et al., 2008). Muitos outros fitopatógenos invadem os tecidos da planta hospedeira durante o cultivo, causando sérios danos e diminuindo a produção.

O método de controle primário desses fitopatógenos é o uso de pesticidas químicos. Entretanto, esses não são autorizados para o tratamento pós-colheita e muitos foram retirados do mercado por apresentarem possíveis riscos de toxicidade. Além do mais, aumenta o senso comum sobre o uso de pesticidas, junto com o desenvolvimento de resistência por muitos micro-organismos fitopatogênicos e o alto custo do desenvolvimento de novos químicos, tem promovido a busca por novas alternativas. Dentre as bactérias utilizadas e descritas como agentes biocontroladores estão cepas de *Pantoea*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (TRIAS et al., 2008).

O controle biológico, que pode ser definido pelo uso de um organismo vivo para eliminar ou controlar outro, tem recebido considerável atenção na última década como uma alternativa ao uso de bactericidas ou fungicidas químicos. O uso do controle biológico tem sua origem na crescente preocupação das pessoas a respeito do uso de químicos no meio ambiente. O potencial de controle de organismos fitopatogênicos por microrganismos antagonistas oferece uma alternativa não poluente para as atuais estratégias de manejo de doença que dependem basicamente de pesticidas químicos.

Segundo von der Weid e colaboradores (2003), vários mecanismos tem sido utilizados para explicar a atividade de biocontrole na supressão do patógeno:

- A competição por nutrientes na rizosfera e locais preferidos para a colonização;
- A produção de sideróforos de ferro quelado por pseudomonas que intensifica a competição por ferro;
- A produção de antibióticos metabólitos, como a fenazina carboxílica ácida e o 2,3-diacetilfloroglucinol.
- Enzimas degradadoras de parede celular como  $\beta$ -1,3-glucanases, celulasas, proteases e quitinases, envolvidas no antagonismo frente a fungos fitopatogênicos.

Em adição à necessidade de promover um controle efetivo de doenças de plantas, um agente de biocontrole eficiente deve sobreviver as condições de processamento e estocagem envolvidos em sua formulação e uso. Devem resistir ainda à dessecação, calor, radiação ultravioleta e solventes orgânicos, características que permitem outros processos de formulação e comercialização.

### 3.2 ANTIMICROBIANOS

Os microrganismos convivem em um ambiente bastante competitivo, onde produzem metabólitos secundários com diversas funções. Dentre esses compostos estão os antimicrobianos, produtos potencialmente exploráveis por vários processos biotecnológicos (FEDRIZZI, 2006).

Segundo Korolkovas (1999), antimicrobianos são substâncias químicas capazes, em pequenas concentrações, de inibir o crescimento e/ou matar os micro-organismos. Jolik (2003) define antimicrobianos como substâncias produzidas por micro-organismos ou por síntese química total ou parcial que, em baixas concentrações, inibem o crescimento e/ou matam os micro-organismos.

Existem diversos mecanismos de ação relacionados aos antimicrobianos: podem interferir na síntese de parede celular, nas funções de membrana citoplasmática, na síntese de proteínas e no metabolismo de ácido nucléico e metabolismo intermediário (HARDMAN, 2003).

Os seres vivos em geral, produzem metabólitos com funções construtoras e energéticas através de rotas biossintéticas semelhantes, as quais constituem o chamado metabolismo primário. No entanto, existem outras rotas metabólicas que permitem aos organismos produzirem os mais diversos tipos de substâncias, algumas restritas a certos gêneros e espécies (Heck, 2007). Essas substâncias não são essenciais para os organismos, mas conferem a eles certas vantagens competitivas no ambiente. É o chamado metabolismo secundário.

Alguns micro-organismos são conhecidos por produzirem diversos metabólitos secundários que lhes conferem vantagens em ambientes inóspitos. Os antimicrobianos são exemplos de metabólitos secundários que suprimem o crescimento de outros micro-organismos.

Uma enorme diversidade de compostos antimicrobianos isolados de micro-organismos tem sido estudada, no entanto, o aumento no surgimento de resistência a esses compostos demandam buscas por novos agentes (NKANG et al., 2009).

### 3.2.1 Purificação de Compostos Antimicrobianos por Cromatografia

Um grande número de métodos químicos e biológicos tem sido desenvolvidos para a identificação de compostos antimicrobianos.

Os métodos físico- e químicos incluem cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, métodos colorimétricos e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (FEDRIZZI, 2006).

Cromatografia é um método físico-químico de separação de

substâncias dentro de uma mistura. Fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura. É formada por duas fases imiscíveis: uma fase móvel e uma fase estacionária, onde cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS et al., 1997).

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das substâncias químicas como os antibióticos naturais (tanto os produzidos por plantas como os produzidos por micro-organismos) por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou a espectrometria de massas (OLIVEIRA, 2011).

### 3.3. *PSEUDOMONAS*

O gênero *Pseudomonas* está entre os grupos bacterianos mais estudados em relação à produção de metabólitos secundários com aplicações no controle biológico (MELLO, 2005). As espécies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*, *P. cichorii* e *P. syringae* são exemplos de produtoras de metabólitos secundários utilizados no controle biológico (LANCHEROS, 2011). O potencial de certas estirpes de *Pseudomonas* no controle de doenças de plantas tem sido demonstrado em diversas partes do mundo (BOTELHO et al., 2006).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* se caracterizam por serem bacilos gram-negativos com alta diversidade metabólica, respiração aeróbia e presença de um ou mais flagelos polares (HAAS; DEFAGO, 2005). De acordo com Mercado-Blanco et al. (2007), essas bactérias são encontradas na natureza em abundância, ocupando diversos nichos ecológicos. É um dos grupos mais diversos que ocupam o ambiente terrestre ou aquático, em associação com plantas ou animais (SPIERS et al., 2000).

Metabólitos secundários produzidos por espécies de *Pseudomonas* tem sido testados no controle de fitopatógenos como agentes bactericidas, fungicidas, nematocidas, acaricidas e inseticidas (NEIDIG et al., 2010). Dentre esses metabólitos estão lipídios e compostos relacionados a eles, ácido pseudomônico, fenazinas, indóis, pirolnitrinas, peptídeos ou aminoácidos (LANCHEROS, 2011). Kerr

(1994) sugere que alguns metabolitos secundários produzidos por pseudomonas conferem uma vantagem seletiva para os organismos produtores em seu ambiente natural. A produção de fitotoxinas, por exemplo, permite a colonização de plantas específicas e a produção de compostos antifúngicos por *P. cepacia* permite a colonização da grama *Tripsacum dactyloides*.

### 3.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A espécie bacteriana *P. aeruginosa* produz uma grande variedade de compostos com atividade antibiótica incluindo piocianina, fenazina-1-carboxilica ácida, 1-hidroxifenazinda e fenazina-1-carboxiamida (KANDA et al., 2009).

O conhecimento sobre a produção de substâncias antimicrobianas por cepas de *P. aeruginosa* tem sido estudado há muito tempo. Em 1889, Bouchard observou que pequenas quantidades dessa bactéria injetadas em ratos, preveniam o desenvolvimento de *Bacillus anthracis* em coelhos. Emmerich e Löw (1899) utilizaram o sobrenadante livre de células obtido de uma cultura de *P. aeruginosa* para prevenir a mesma doença em coelhos. Eles também observaram que o produto obtido destruía *Corynebacterium diphtheriae*, estafilococos, estreptococos, pneumococos, gonococos, *Vibrio cholerae* e *Shigella paradysenteriae*, e chamaram o produto de piocianase (HAYS et al., 1945).

Kerr (1994) relatou pela primeira vez, a atividade antifúngica de cepas de *P. aeruginosa*, contra diversos fungos patogênicos. Bhuiyan et al (2009), demonstrou que substâncias produzidas por essa bactéria tem grande atividade antibiótica contra muitas bactérias, incluindo *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* spp, *V. parahaemolyticus*, *Enterococcus faecales*, *Campylobacter* spp, *Staphylococcus aureus*, *V. mimicus*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

## 3.4 BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

Bactérias fitopatogênicas são aquelas capazes de infectar e desenvolver doença em uma planta hospedeira.

As plantas representam uma importante fonte de água e nutrientes para os microrganismos. A filosfera de plantas terrestres promove um dos mais importantes nichos para a habitação microbiana. A filosfera compreende a superfície

e o interior da folha. O interior da folha é composto principalmente por células do mesófilo foliar, nas quais a maior parte da fotossíntese é feita; alguns tecidos vasculares; e um grande espaço intercelular aerófilo (apoplasto) entre as células do mesófilo. Devido a esta proximidade com as células do mesófilo foliar, o apoplasto foliar pode conter muitos nutrientes, enquanto que os nutrientes na superfície foliar são muito mais limitados e espacialmente heterogêneos, em sua maior parte proveniente do apoplasto através de aberturas naturais ou feridas (MELOTTO et al., 2008).

Para ter acesso a esses nutrientes, muitas bactérias patogênicas e mutualísticas como o rizobium são capazes de colonizar, invadir e estabelecer infecção crônica dentro de suas plantas hospedeiras, embora levem a resultados diferentes (SOTO et al., 2009). Para isso, as bactérias utilizam proteínas (METZ et al., 2005), toxinas, fito hormônios e enzimas que degradam a parede celular vegetal, contribuindo significativamente para a completa expressão dos sintomas (COLLMER, 1998).

Vários micro-organismos, patogênicos e saprofíticos, podem sobreviver e até mesmo proliferar como epifíticos na superfície foliar sem causar doença. Poucas epifíticas completam seu ciclo de vida na superfície de plantas e geralmente são incapazes de colonizar o apoplasto. Por outro lado, os patógenos foliares, como *P. syringae*, podem se multiplicar agressivamente no apoplasto como endofíticos patogênicos, levando ao desenvolvimento da doença em condições favoráveis (HIRANO; UPPER, 2000).

Entrar no tecido foliar é um primeiro passo crítico no estabelecimento da infecção foliar. Para ganhar acesso aos espaços intercelulares e tecidos foliares internos, os patógenos devem penetrar a superfície cuticular e a epiderme. Muitos fungos fitopatogênicos tem a habilidade de penetrar diretamente a epiderme utilizando enzimas que degradam a cutícula e a parede celular, por força mecânica ou ambos (MENDGEN et al., 1996). Durante o processo infeccioso, as bactérias fitopatogênicas entram nos tecidos da planta tanto por feridas quando por aberturas naturais e ocupam o apoplasto do tecido da planta ou o xilema, onde se multiplicam e se espalham, um processo que frequentemente envolve a participação de enzimas hidrolíticas e de toxinas (SOTO et al., 2009). Entre as aberturas naturais, os estômatos dominam em número na parte aérea da planta, representando a rota mais importante de entrada de patógenos foliares.

Os patógenos bacterianos de plantas mais comuns colonizam o apoplasto, e então, partem para fora da parede celular, incitando uma série de doenças na maioria das plantas cultiváveis. A maioria desses patógenos são bactérias Gram-negativas, dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, e *Ralstonia*. A maioria possui um hospedeiro específico e irá conduzir uma resposta hipersensitiva em plantas não hospedeiras. A resposta hipersensitiva é uma morte, rápida e programada, das células em contato com o patógeno (COLLMER, 1998).

#### 3.4.1 Controle de fitopatógenos

O controle de doenças bacterianas em plantas é considerado um problema das práticas agrícolas desde que essas doenças foram descritas (AGRIOS, 2005).

Entre as medidas de controle atualmente utilizadas, Lo Cantore et al (2009) cita:

- Procedimentos de quarentena;
- Desinfecção de sementes;
- Práticas culturais;
- Controle químico;
- Resistência da planta hospedeira;
- Programa de certificação de sementes;
- Controle biológico;

Ainda segundo Cantore e colaboradores (2009), essas medidas possuem eficiência limitada e cada uma dessas medidas possui suas vantagens e desvantagens. Isso ocorre porque além dos antibióticos e compostos a base de cobre, não existem outros bactericidas no mercado. Além disso, as bactérias estão cada vez mais resistentes a esses antibióticos, e a aplicação de compostos cúpricos gera grandes impactos ambientais devido a sua toxicidade.

### 3.4.2 XANTHOMONAS SP.

*Xanthomonas* é um gênero da divisão gama do filo Proteobacteria constituído por patógenos de plantas de importância econômica considerável (RODRIGUEZ-R et al., 2012), uma vez que causam um grande impacto na agricultura (WHITE et al., 2009).

Esses patógenos afetam uma ampla variedade de culturas, incluindo *Citrus* spp. (lima, laranja, limão, pomelo, entre outros), *Oryza* spp. (arroz), várias espécies crucíferas (repolho, brócolis, couve-flor, rabanete e *Arabidopsis thaliana*), algodão (*Cotton hirsutum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), e mandioca (*Manihot esculenta*), com os membros individualmente mostrando um alto grau de especificidade com o hospedeiro (RODRIGUEZ-R et al., 2012).

As doenças mais comuns encontradas na natureza incluem murchas vasculares, cancro, manchas foliares e em frutas e crestamento bacteriano (WHITE et al., 2009). Entre os possíveis exemplos estão a mancha angular do arroz e o cancro cítrico, causadas respectivamente por *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. citri* pv. *citri* (KAY; BONAS, 2009).

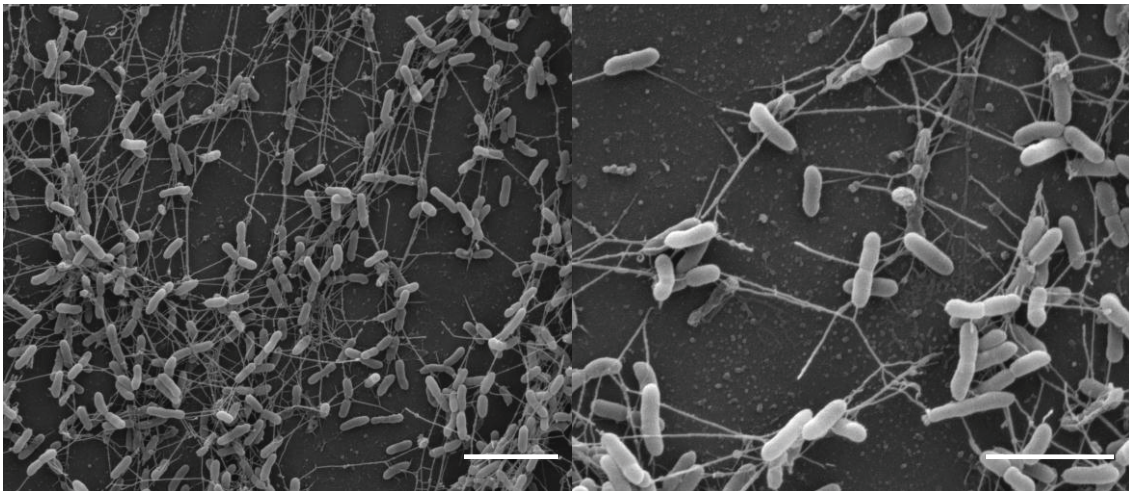
As bactérias do gênero *Xanthomonas* caracterizam-se por serem bastonetes gram-negativos, aeróbios, visíveis ao microscópio óptico e possuem um flagelo polar que lhes permite motilidade. A maioria das linhagens pertencentes a esse gênero possuem colônias lisas, mucoides e de coloração amarelada, devido a presença de um pigmento amarelo, insolúvel, denominado xantomadina (BRADBURY, 1986). Entre as características fisiológicas e bioquímicas, pode-se citar oxidase negativa, catalase positiva, teste negativo para produção de indol, acetoina e urease. Não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, não redutora de nitrato, positiva para hidrólise de amido (HOLT et al., 1994).

*Xanthomonas* spp. infecta a maioria dos grupos de plantas superiores, incluindo cerca de 120 espécies de monocotiledôneas e cerca de 270 espécies de dicotiledôneas (WHITE et al., 2009). A bactéria invade o tecido hospedeiro através de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, ou por meio de ferimentos, e se multiplicam no espaço intercelular do tecido vegetal e/ou xilema (KAY; BONAS, 2009).

Para que ocorra a infecção, são necessários fatores de virulência como lipopolissacarídeos e adesinas, além de um sistema de secreção de proteínas

para dentro da célula hospedeira. Outra característica importante é a produção de exopolissacarídeos, cuja biossíntese está relacionada a capacidade de invasão do microrganismo nas células do hospedeiro. Os exopolissacarídeos apresentam papel importante na proteção contra a dessecação e na concentração de minerais e nutrientes ao redor da célula (Lopes, 2011).

Figura 1 – Produção de exopolissacarídeos por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Barras correspondem a 5 µm.



Fonte: O autor. 07/04/2009

Algumas variáveis climáticas como a temperatura, umidade relativa e a chuva são importantes para o progresso da epidemia no espaço e no tempo, as bactérias possuem capacidade de sobreviver em condições de grande oscilação tanto quanto a sua população quanto as variáveis citadas (MARCUIZZO, 2009).

#### 3.4.2.1 Taxonomia

O gênero *Xanthomonas* tem sido alvo de muitos estudos taxonômicos e filogenéticos, começando com a descrição de *Bacterium vesicatorium* como o agente causal da mancha bacteriana em pimenta e tomate e sua posterior reclassificação em *X. campestris*. *Xanthomonas* foi previamente descrito como um grupo monotípico e, mais tarde, dividido em dois grupos, A e B (RODRIGUEZ-R et al., 2012).

Valterin et al. (1995) relata a classificação do gênero em 183 cepas, dentro de 20 espécies diferentes, principalmente baseado em dados de hibridização de DNA-DNA.

Durante a última década, a taxonomia desse gênero ainda é objeto de debate e reconsiderações. A reclassificação de acordo com o gênero selvagem é proposta, e frequentemente reclassificações subespecíficas e proposições para novas espécies tem sido publicadas (RODRIGUEZ-R et al., 2012). Portanto, vários sinônimos são utilizados para identificar a mesma subespécie bacteriana.

#### 3.4.2.2 Sobrevivência no ambiente

As bactérias do gênero *Xanthomonas* podem permanecer por longos períodos no ambiente, o que dificulta a sua erradicação. Gent et al. (2005), estudando a sobrevivência no solo de *X. axonopodis* pv. *allii*, verificaram que 9 meses após a colheita a bactéria ainda era encontrada no perfil de até 25 cm no solo. Chaves e Granada (1988) identificaram *X. campestris* pv. *phaseoli* a 15 cm de profundidade e também na palhada durante o inverno em áreas onde não se efetua rotação de culturas. *X. campestris* pv. *viticola* foi encontrada em restos culturais de videira (NASCIMENTO; MARIANO, 2004).

Outro veículo de sobrevivência bacteriana e de introdução de fitobactérias em áreas livre de patógenos é a semente. Existem relatos do aparecimento de *X. campestris* pv. *malvacearum* em locais onde não havia sido plantado algodão durante doze anos. (SCHNATHORST, 1964). Algumas bactérias como *X. phaseoli* pv. *sojensis*, *P. glycinea* e *P. tabaci* sobrevivem na semente por até 30 meses, e *X. phaseoli* e *X. phaseoli* var. *fuscans* foram encontradas em sementes de feijão após 15 anos (MARCUIZZO, 2009).

A presença de *Xanthomonas* vivendo epifiticamente no filoplano de plantas hospedeiras ou não hospedeiras também pode levar ao surgimento de epidemias. Kurozawa e Pavan (2005) descrevem a sobrevivência epifítica de *X. vesicatoria* em diversas plantas. Kimura (1981) relata populações de *X. citri* pv. *citri* sobrevivendo na rizosfera de plantas cítricas.

Ravikumar e Khan (2001) constaram a sobrevivência de *X. campestris* pv. *vesicatoria* em aparelhos bucais de *Aulacopjora cincta*, *Eucoptaera praemorsa*, *Phenoptera gracillus*, *Henosepilachna vigntioctopunctata*. Bugbee (1962) descreve

que moscas brancas como *Trialeuroides vaporariorum* são agentes de disseminação e inoculação de *X. campestris* pv. *pelargoni* em gerânio. Larvas minadoras do citrus (*Phyllocnistis citrella*) causam ferimentos na planta, favorecendo a entrada da bactéria *X. citri* pv. *citri* nos tecidos vegetais (BERGAMIN FILHO et al., 2001).

Figura 2 – Favorecimento da infecção. A. Folha com ferimentos causados pela larva minadora dos citrus. B. Larva minadora dos citrus.



Fonte: A. <http://portalnemip.wordpress.com/galeria/imagem-023/>; B. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>

#### 3.4.2.3 *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*: Agente causal do crestamento bacteriano comum

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma das culturas mais antigas de todo o mundo. Essa leguminosa fornece um dos grãos mais importantes para o consumo humano direto, uma vez que é fonte de proteínas e amido, representando uma significativa fonte de nutrientes em países da África e da América Latina (ABD-ALLA et al., 2010), os quais geram cerca de 7 Tg ( $7 \times 10^6$  toneladas) das 23 Tg produzidas em todo o mundo (BROUGHTON et al., 2003).

O crestamento bacteriano comum (CBC) do feijoeiro é uma das doenças mais importantes e mais disseminadas que afetam as plantas de feijão em todo o mundo. As perdas, relacionadas a quantidade e qualidade do fruto, no campo podem atingir de 10 a mais de 50% dependendo da pressão da doença, das condições ambientais e do cultivar utilizado (IZQUIERDO et al., 2004; ASENSIO-S.-MANZANERA et al., 2005; ABD-ALLA et al., 2010). A doença reduz a qualidade das sementes e das vagens, o valor de mercado, levando a importantes perdas em uma

das culturas mais importantes econômica e nutricionalmente em todo o mundo (JACQUES et al., 2005).

O agente causal da CBC é a bactéria gram-negativa *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (VALTERIN et al., 1995), que penetra na planta através de ferimentos ou estômatos, invadindo o espaço intercelular e causando a dissolução gradual da lamela média (OEPP/EPPO, 2008). A bactéria é disseminada através da semente e sobrevive nelas por longos períodos de tempo (KARAVINA et al., 2008), o que torna ainda mais difícil o seu controle.

Jacques et al (2005) mostraram que a Xap forma um biofilme que permite sobreviver nas folhas sobre condições de estresse no campo. Esse biofilme se estabiliza próximo a  $10^5$  UFC/g de folha, quando o número de células ainda não é suficiente para desenvolver os sintomas da doença. Alguns autores consideram que o inóculo com potencial para causar a doença deve ser pelo menos de  $5 \times 10^6$  UFC/20cm<sup>2</sup> de tecido foliar (WELLER E SAETTLER, 1980), quando a bactéria está protegida pelo biofilme e utiliza o exopolissacarídeo para infectar a planta hospedeira. Essa forma epifítica de sobrevivência agrava ainda mais a disseminação da doença no campo.

#### 3.4.2.3.1 Sintomas do Crestamento Bacteriano Comum

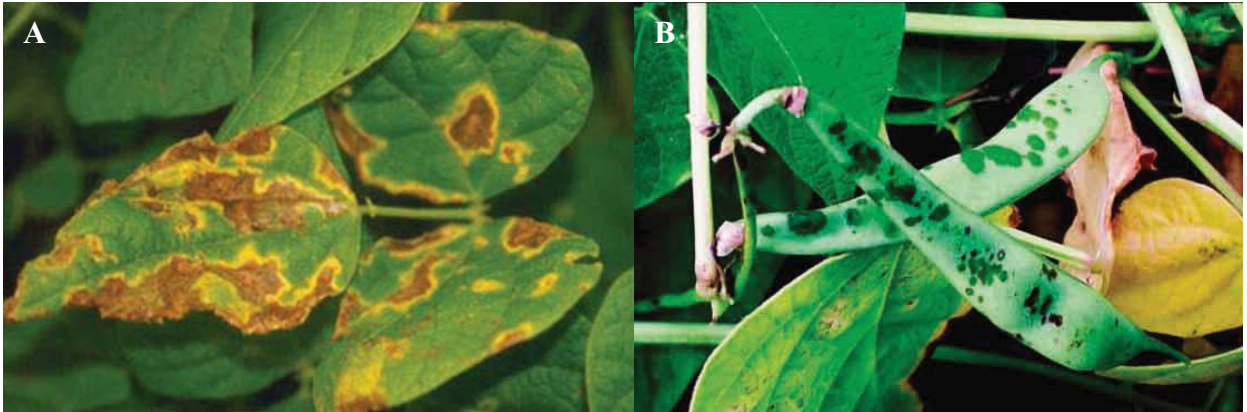
Sob condições favoráveis, como altas temperaturas e alta umidade, a bactéria Xap causa desfolha severa nas plantas atacadas e pode ser um fator limitante ao feijoeiro comum. A doença ocorre em regiões de clima quente principalmente na safra das águas (BIANCHINI, MARINGONI E CARNEIRO, 2005).

Na lavoura, os restos culturais contaminados, os tratos culturais com as plantas molhadas, respingos d'água e vento são importantes disseminadores do patógeno (SAETTLER, 2005).

Uma vez infectando a planta, a bactéria causa redução na taxa fotossintética dos tecidos verdes remanescentes, causando sérios danos (THEODORO, 2004). A doença ataca toda a parte aérea da planta, sendo os sintomas observados principalmente nas folhas onde, inicialmente, aparecem pequenas manchas encharcadas e translúcidas. Essas manchas evoluem para lesões secas e quebradiças rodeadas por um notável halo amarelo (SOUZA et al., 2005). No caule e nas vagens, as lesões podem ser deprimidas e encharcadas e

podem ter coloração avermelhada. As sementes doentes tem aspecto enrugado e com escurecimento de tecido na região do hilo (VIEIRA et al., 1988).

Figura 3 – Sintomas do crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.



Fonte: A. Souza et al, 2005; B. Nunes e Metha, 2007.

#### 3.4.2.3.2 Métodos de controle do Crestamento Bacteriano Comum

O controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro é complicado devido ao crescimento epifítico e assintomático da bactéria nas folhas do feijoeiro (JACQUES et al., 2005) e devido a sobrevivência da bactéria na semente. Sendo assim, o controle dessa doença envolve a adoção conjunta de várias práticas culturais, como o uso de sementes sadias, rotação de culturas por 2 a 3 anos, aração profunda, controle de plantas daninhas, incorporação dos restos culturais ao solo e a utilização de produtos químicos. Além destes procedimentos, recomenda-se o emprego de cultivares com resistência ao crestamento bacteriano comum (THEODORO, 2004). No entanto, o controle químico é ineficiente e o desenvolvimento de cultivares resistentes fornece pouca proteção contra a CBC (RODRIGUES et al., 1999). Os cultivares resistentes não são eficientes contra algumas bactérias endógenas (IZQUIERDO et al., 2004). E mesmo os cultivares resistentes, quando cultivados em áreas infestadas pelo patógeno, podem produzir sementes livres ou infectadas pelo patógeno (MAGABALA, 1997).

#### 3.4.2.4 *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*: Agente causal da Mancha Angular do Algodoeiro

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) tem grande importância econômica mundial e é cultivado em diferentes sistemas de produção. A cultura do algodão é uma das mais tradicionais do Brasil e tem dado sinais de forte avanço nos últimos anos. Sua cadeia produtiva gera riquezas superiores a US\$25 bilhões de dólares anualmente, representando cerca de 4% do PIB nacional e mais de 13,5% do PIB industrial (KOURI, 2006).

Atualmente, a cotonicultura brasileira constata a potencialidade e a viabilidade econômica do uso do caroço do algodão na produção de biodiesel, especialmente na região centro-oeste, onde há a previsão de expansão da área cultivada nos próximos anos (SILVA et al., 2009). Doenças e pragas são as maiores preocupações relacionadas à cultura do algodoeiro (RAGHAVENDRA et al., 2007)

De todas as fitobactérias já descritas na cultura do algodoeiro, a bactéria *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) (sin.: *X. campestris* pv. *malvacearum*) (YOUNG et al., 1996) é a que tem ocasionado os principais problemas sanitários, principalmente pelo fato de ser uma bactéria disseminada pela semente e por apresentar diferentes raças fisiológicas (ALMEIDA, 2001).

A mancha angular do algodoeiro ocorre em todas as áreas mundiais de cultivo de algodão e está entre as doenças mais devastadoras que atacam essa espécie de planta. As perdas de produtividade da fibra podem atingir de 5 a 35% (ZHAI et al., 2010). Huang et al. (2008) relata que as perdas podem atingir de 20 a 30% da cultura. Nos Estados Unidos, as perdas relacionadas a essa doença foram maiores que 3,4% nos últimos anos (XIAO et al., 2010).

É uma doença de importância econômica no mundo todo e sua severidade depende de fatores climáticos e do cultivar (ZANDONÁ et al., 2005). Trata-se de uma cultura de alta rentabilidade e de imensas possibilidades para o Brasil, tanto para o cultivo de sequeiro como para o irrigado, que poderá avançar paulatinamente e levar o País a ganhar posições entre os quatro maiores produtores de fibras do mundo, hoje representados pela China, EUA, Índia e Paquistão.

#### 3.4.2.4.1 Sintomas da Mancha Angular do Algodoeiro

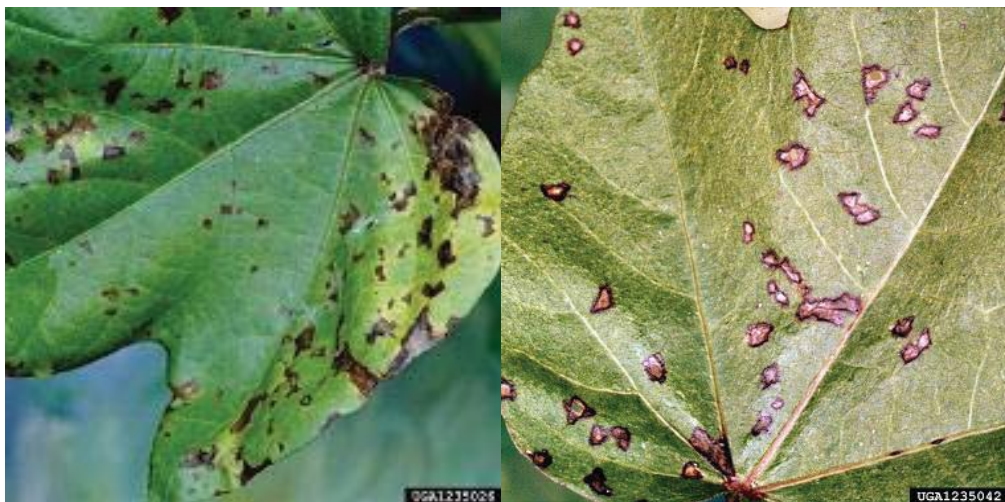
O patógeno penetra na planta hospedeira através de aberturas estomatais ou ferimentos e gera lesões aquosas nas folhas, galhos e frutos,

seguidos pela queda prematura de folhas e redução na quantidade de fibras produzidas (XIAO et al., 2010).

Os sintomas da mancha angular do algodoeiro incluem manchas foliares angulares, lesões aquosas, tronco preto, podridão e queima das plântulas (ZHAI et al., 2010). Nas plantas, esse patógeno causa lesões angulares nas folhas, inicialmente de coloração verde e oleosa e posteriormente parda e necrosada. A aparência angular é devido à restrição da lesão por veias finas da folha de algodão (KOENNING, 2004). Ocorrendo coalescência das lesões, há rasgadura do limbo foliar. As maçãs também são atacadas, observando-se lesões arredondadas, de forma irregular (ALMEIDA et al., 2001). Como a doença progride, os pecíolos das folhas e talos podem ser infectados, resultando em desfolha prematura. Cancros negros podem atingir os troncos ou ramos, causando a morte dessas partes da planta (KOENNING, 2004).

A disseminação do patógeno pode ser favorecida por chuvas frequentes e contínuas e a bactéria é transmitida de uma planta para outra por meio de respingos de água, sendo que o tempo de sobrevivência da Xam no solo pode alcançar até 11 anos, e nas sementes e restos culturais até quatro anos (BALANI, 2009). A extensão do impacto da doença em um campo de cultivo depende das condições ambientais durante a estação, sendo que chuvas fortes e alta umidade, assim como altas temperaturas favorecem o desenvolvimento da doença (KOENNING, 2004).

Figura 4 – Sintomas causados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.



Fonte: Clemson University - USDA Cooperative Extension Slide Series

Figura 5 – Sintomas causados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.



Fonte: Alen, 2011

#### 3.4.2.3.2 Métodos de controle da Mancha Angular do Algodoeiro

Por ser uma bactéria veiculada pela semente, as medidas de controle são dificultadas, além do fato de possibilitar a sua disseminação a longas distâncias, através de lotes de sementes contaminados (ALMEIDA et al. 2001). O patógeno é transmitido por sementes infetadas. No entanto, até agora não existem métodos apropriados para erradicar a bactéria da semente. A doença não é satisfatoriamente controlada por produtos químicos, sendo que, seu controle depende de sementes saudáveis e resistência varietal (ZANDONÁ et al., 2005).

Condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da mancha angular e a ausência de variedades resistentes resultam em sintomas graves da doença. O controle químico da doença consiste em pulverizar antibióticos a base de cobre, tratamento que não é eficaz, a menos que implementado na fase inicial da doença. Além disso, a aplicação de produtos químicos é uma preocupação ambiental (RAGHAVENDRA et al., 2007). O manejo da doença inclui práticas fitossanitárias durante o processamento das sementes, plantio de sementes tratadas com pesticidas e substâncias ácidas, destruição de resíduos da colheita anterior, rotação de culturas e uso de cultivares resistentes (XIAO et al., 2010).

O tratamento químico das sementes, a melhoria das técnicas de cultivo e programas extensivos de crescimento de mudas são combinados para controlar a doença, levando a produção de vários genótipos de algodão com altos

níveis de resistência ou imunidade a doença (ZHAI et al., 2010). Mesmo assim, uma cepa altamente virulenta de Xam foi relatada na África em 1988, podendo superar os maiores genes de resistência contra a mancha angular e infectar todos os cultivares comerciais. Embora essa cepa tenha sido relatada há mais de duas décadas, ela é amplamente prevalente dificultando os programas de desenvolvimento de novos cultivares (HUANG et al, 2008).

Ações corretivas para evitar o desenvolvimento da doença não estão disponíveis. Entre as ações positivas que os produtores podem utilizar está manter a copa o mais aberta possível para reduzir a umidade e promover a secagem da folhagem, não mover equipamentos de cultivo pelo campo quando as folhas estiverem molhadas. Nos campos infestados a colheita deve ocorrer o mais breve possível. A variedade de algodão, lote de sementes e uma classificação quanto à gravidade da doença deve ser determinada. Talos devem ser trituradas na primeira oportunidade. Os campos que têm crestamento bacteriano este ano deve ser plantada a uma variedade resistente à praga do próximo ano ou uma cultura diferente (KOENNING, 2004).

#### 3.4.3.5 *Xanthomonas citri* pv. *citri*: Agente causal do cancro cítrico asiático

A indústria da citricultura tem avançado enormemente em todo o mundo durante os últimos anos, mas ainda é confrontada com uma variedade de stresses bióticos e abióticos, que afetam negativamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas e limitam a produtividade da cultura. O cancro cítrico é um dos maiores e mais devastadores stresses bióticos que atingem a produção de citrus (WANG; LIU, 2012).

Causado por um organismo bastante agressivo e de rápida disseminação, o cancro está presente em pomares de citros de várias partes do mundo, o que inclui países líderes na produção de laranja para a indústria de suco, como o Brasil e os Estados Unidos. Os primeiros relatos da anomalia no território brasileiro ocorreram na década de 50. Desde então, a doença, ressurgente nos pomares, tem provocado a implementação de medidas legais rígidas para o seu controle (AMARAL, 2003).

As plantas cítricas pertencem a família Rutaceae, a qual inclui a laranja (*Citrus sinensis* Osbeck), toranja (*Citrus paradisi* Macf.), mandarin (*Citrus*

*reticulata* Blanco), limão (*Citrus limon* L.), lima (*Citrus aurantifolia* Swingle), cidra (*Citrus medica* L.) e pomelo (*Citrus grandis*, Osbeck; syn. *Citrus maxima* Merr.). Essas plantas fornecem frutas para consumo in natura e para elaboração de suco e são umas das culturas frutíferas mais comuns no mundo devido a seus sabores únicos. As frutas cítricas são ricas em metabolitos secundários como flavonóides, alguns compostos tem aplicação farmacêutica devido a seus efeitos antiinflamatórios e antitumorais. Monoterpenos e flavonoides purificados de casca de citrus possuem atividade antimicrobiana contra vários patógenos que afetam tanto plantas como humanos (CHEN et al, 2012).

A bactéria gram-negativa *X. citri* pv. *citri* (Xcc) é um fitopatogeno bacteriano biotrófico que pertence ao filo Proteobacteria (KHALAF et al., 2011). Esse fitopatógeno causa danos severos em plantas cítricas, levando ao desenvolvimento do cancro em folhas, galhos, brotos e frutas (AINI et al., 2010).

As perdas diretamente relacionadas ao cancro cítrico dependem da severidade da doença que pode envolver desfolha, morte de galhos e queda prematura dos frutos (BEHLAU et al., 2010). O cancro cítrico resulta em uma significativa redução na qualidade dos frutos e na produção (GALLO et al., 2010), principalmente em laranja, uma fruta cultivada pelos maiores produtores mundiais de suco de laranja concentrado, incluindo Brasil e Estados Unidos (JACOB et al., 2011). Além do mais, as frutas infectadas que permanecem nos galhos tem menor valor ou é totalmente inaceitável para o mercado de frutas frescas. A consequência mais séria, entretanto, é o impacto comercial resultante das restrições ao comércio interestadual e internacional das frutas de áreas infectadas com o cancro (BEHLAU et al., 2010). O impacto socioeconômico é o ponto mais crítico de organismos de quarentena, que dificultam a exportação de plantas e frutas para outros países e requerem programas de erradicação caros e uso de produtos químicos para o controle da doença (GALLO et al., 2010).

#### 3.4.3.5.1 Sintomas do Cancro Cítrico Asiático

A Xcc possui diferentes patotipos. O tipo de cancro cítrico mais comum e mais agressivo é o tipo A, comumente conhecido como Cancro cítrico asiático, infecta a maioria das variedades comerciais de citrus, ocorrendo em pelo menos 30 países tropicais e subtropicais (KHODAKARAMIAN; SWINGS, 2011). A

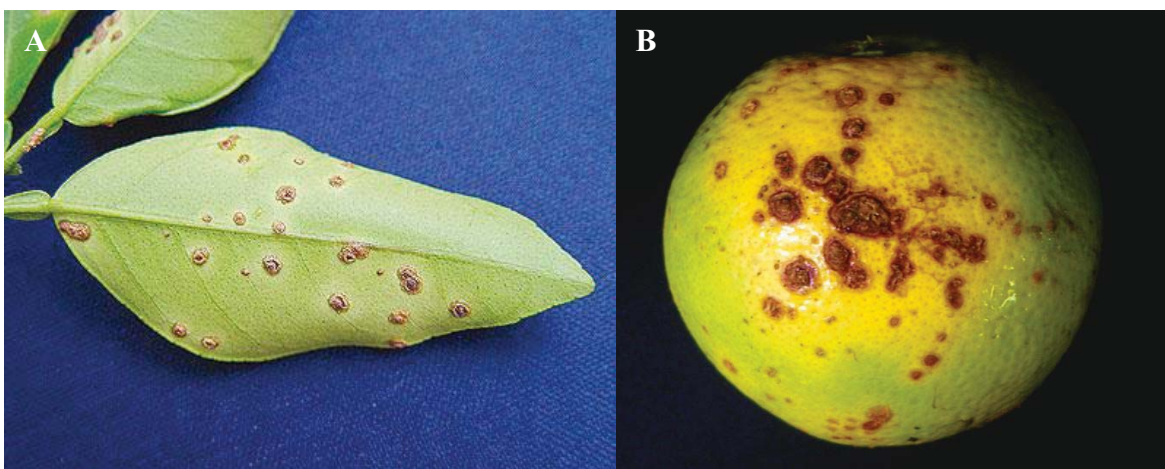
infecção por Xcc ocorre principalmente através de ferimentos ou estômatos, uma vez na folha, as bactérias se multiplicam sob condições ótimas (temperatura entre 20 e 30°C), alcançando uma densidade populacional de 3-4 unidades log por lesão, que é suficiente para atuar como fonte de inóculo (KUMMAR et al., 2011).

As lesões começam como lesões aquosas, pequenos pontos cloróticos que aumentam para lesões hiperplásticas com o centro necrótico rodeado por uma halo amarelo. As lesões maduras frequentemente possuem uma aparência levantada devido a divisão celular (hiperplasia) e alargamento (hipertrofia). A severidade dos sintomas se relaciona com o patotipo da Xcc, com o genótipo do hospedeiro e também de acordo com as condições ambientais (CHEN et al, 2012).

O principal meio de dispersão da Xcc é através de chuva associada com ventos. Mas o patógeno também pode ser dispersado pelo contato direto com pessoas, materiais utilizados no cultivo e na colheita, roupas, equipamentos e implementos. A contaminação dessas superfícies ocorre contato com folhas molhadas infectadas pela bactéria após orvalho intenso ou chuva, e durante o manejo do pomar, tais como poda ou colheita (BOCK et al., 2011).

Os danos causados pela doença afetam toda a parte aérea da planta, sobretudo as folhas e a superfície dos frutos. Este último é a principal fonte de prejuízo econômico, pois inviabiliza a manipulação e comercialização dos frutos. Embora não sejam muito freqüentes, infecções mais severas levam à queda de folhas e frutos e ao secamento de galhos (AMARAL, 2003).

Figura 6– Sintomas causados por *Xanthomonas citri* pv. *citri*



Fonte: A. <http://www2.uol.com.br/debate/1526/regiao/>; B. <http://www.ufrgs.br/agrofitossan/galeria/>

#### 3.4.3.5.2 Controle do Cancro Cítrico Asiático

No Brasil, o cancro cítrico asiático é a forma de cancro mais importante, sendo encontradas em todas as áreas com ocorrência de cancro. Similar a maioria das fitobacterioses, não há um método eficiente de controlar o cancro cítrico. A única maneira de eliminar a doença é através da erradicação das plantas doentes, um procedimento que leva a importantes perdas econômicas.

Por lei, no Estado de São Paulo, a principal área de produção de citrus no Brasil, devem ser eliminadas todas as plantas ao redor do foco da infecção em um raio de 30 metros (LAIA et al, 2009). Outro método de controle consiste em múltiplas pulverizações de plantas afetadas, com produtos cúpricos, o que aumenta os custos de controle.

Além da produção de frutos para suco, as exportações de frutos frescos também ficam comprometidas, pois vários países, como aqueles que compõem a comunidade européia, classificam a doença como “Praga Exótica”, fazendo com que as importações sejam realizadas mediante uma série de exigências. O Brasil, desde a 11<sup>a</sup>. reunião do Grupo de Trabalho Permanente em Quarentena Vegetal (Montevideu, Uruguai, junho de 1995), classifica o cancro cítrico como “Praga Quarentenária A2”, ou seja, a “praga” está presente no país ou região, sendo limitada a uma determinada área oficialmente controlada. Além disso, os governos federais, estaduais e municipais têm promovido ações conjuntas de defesa e inspeção vegetal com a finalidade de prevenir a entrada da doença e controlar a sua disseminação, pela interdição de propriedades com contaminação e eliminação de plantas doentes, inclusive com a implementação da Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC) (AMARAL, 2003).

## CONCLUSÃO

O desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos utilizados na agricultura aliado aos danos ambientais causados pela aplicação de compostos cúpricos para controlar bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, leva à busca por novas alternativas de controle desses microorganismos. Nesse contexto, a busca por novos compostos antimicrobianos naturais e seu uso associado com práticas fitosanitárias pode contribuir para o controle desses fitopatógenos, diminuindo as perdas econômicas na agricultura.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por produzirem uma grande quantidade de metabólitos secundários, alguns dos quais inibem ou diminuem o crescimento de organismos fitopatogênicos. O isolamento de substâncias do isolado *P. aeruginosa* no laboratório de Ecologia Microbiana, da Universidade Estadual de Londrina, demonstrou eficácia no controle de três espécies do gênero *Xanthomonas in vitro* e em condições de casa de vegetação. Os resultados são promissores para futuros testes em campo.

## REFERÊNCIAS

ABD-ALLA, M.H., BASHANDY, S.R., SCHNELL, S. Occurrence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, the Causal Agent of Common Bacterial Blight Disease, on Seeds of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Upper Egypt. **Folia Microbiologica** 55,47-52. 2010.

AINI, L.Q.; HISAE, H. TSUYUMU, S. A TonB-dependent transducer is responsible for regulation of pathogenicity-related genes in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of General Plant Pathology** 76:132–142. 2010

ALLEN, T. Bacterial Blight of Cotton. 2011. IN <http://www.mississippi-crops.com/2011/07/21/update-bacterial-blight-of-cotton/>

ALMEIDA, I. M. G. Bactérias fitopatogênicas exóticas. **Biológico**, São Paulo, v. 63, p. 45-47, 2001.

AMARAL, A. M. do, CARVALHO, S. A., DOMINGUES, A. D., DEZOTTI, D. F., BAPTISTA, J. C., MACHADO, M. A. Reação de acessos de citros à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sob condições de casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Uberlândia, v.28, p.S284, 2003.

ASENSIO-S.-MANZANERA, M.C., ASENSIO, C., SINGH, S.P. Gamete selection for resistance to common and halo blights in dry bean intergene pool populations. **Crop Science** 46,131-135. 2005.

BALANI, D.M. Detecção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares. **Universidade de São Paulo**, 63p. 2009.

BEHLAU, F., BELASQUE JR., J.; GRAHAM, J.H.; LEITE JR.,R.P. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection** 29:300–305. 2010

BERGAMIN FILHO, A.; GOTTWALD, T. R.; LARANJEIRA, F. F. Spatial distribution of citrus canker in São Paulo – Brazil. In: International Workshop on Plant Disease

Epidemiology, 8, 2001, Ouro Preto. Ouro Preto: **International Society of Plant Pathology**, p. 28-29, 2001.

BIANCHINI, A., MARINGONI, A.C. & CARNEIRO, S.M.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. v.2, 4 ed. São Paulo SP. Editora Ceres. 2005. pp. 333-349.

BOCK, C.H.; PARKER, P.E.; COOK, A.Z.; GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R. Infection and decontamination of citrus canker-inoculated leaf surfaces. **Crop Protection** 30:259-264. 2011.

BOTELHO, G.R.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANECK, N.G. A importância dos antibióticos produzidos por *Pseudomonas fluorescens* na supressão de doenças de plantas. **Embrapa Agrobiologia**, 31p. 2006.

BRADBURY, J.F. Guide to plant pathogenic bacteria. **Ferry Lane**, Inglaterra: International Mycological Institute, 332 p. 1986.

BROUGHTON, W. J. Roses by other names: taxonomy of the Rhizobiaceae. *J Bacteriol* 185, 2975–2979. 2003.

BUGBEE, W.M. Whitefly transmission of *Xanthomonas pelargonii*. **Phytopathology**, St. Paul, v.52, n.1 , p.5, 1962.

Bulletin OEPP/EPPO Data sheets on quarantine pests, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, 2008

CHAVEZ, L.C.; GRANADA, G.A. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, causal agent of a bacterial disease of bean, under conditions in the Cauca Valley, Colômbia. **Fitopatologia Colombiana**, v.12, n.1, p.9-14,1988.

CHEN, P.; WANG, L.; CHEN, Y. TZENG, K. CHANG, S. Understanding cellular defence in kumquat and calamondin to citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 79 :1-12. 2012.

COLLINS, H. C.; BRAGA, L. G.; BONATO, S. P. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: **Editora UNICAMP**, p. 279, 1997.

COLLMER, A. Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. **Current Opinion in Plant Biology**. 1:329-335. 1998.

EMMERICH R, LÖW O. Bakteriolytische Enzyme als Ursache der Erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. In: <http://www.landesbioscience.com/journals>

FEDRIZZI, S.M.G. Produção de metabólitos antimicrobianos e sideróforos de isolados provenientes de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Ocidental. **Universidade de São Paulo**. 117p. 2006.

FERRE, R.; BADOSA, E.; FELIU, L.; PLANAS, M.; MONTESINOS, E.; BARDAJI, E. Peptides of Plant-Pathogenic Bacteria by Short Synthetic Cecropin A-Melittin Hybrid Inhibition. **Applied Environmental Microbiology**, 72(5):3302. 2006

GALLO, M.; FERRARI, E.; ELISEO, T.; AMATA, I.; PERTINHEZ, T.A.; KATSUYAMA, A.M.; PACI, M.; FARAH, C.S.; SPISNI, A.; CICERO, D.O. A new member of the ribbon-helix-helix transcription factor superfamily from the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Structural Biology** 170:21–3. 2010.

GENT D.H, LANG J.M, SCHWARTZ H.F: Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. **Plant Disease**. 89, 558–564. 2005.

HARDMAN, J. GOODMAN AND GILMAN: The pharmacological basis of therapeutics. 10. Ed. **Rio de Janeiro: MacGraw Hill**, p. 67-71, 2003.

HAAS, D. AND G. DEFAGO. Biological control of soil-borne pathogens by *Pseudomonas fluorescens*. **Nature Review Microbiology**, 3: 307-319. 2005.

HAYS, E. E., WELLS, I. C., KATZMAN, P. A., CAIN, C. K., JACOBS, F. A., THAYER, S. A., DOISY, E. A., GABY, W. L., ROBERTS, E. C. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal Biological Chemistry** 159, 725–750. 1945.

HECK, M.G. Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. linhagem 2S. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 112p. 2007.

HIRANO, S.S.; UPPER, C.D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 64:624–53. 2000.

HOLT, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9 ed., **Baltimore: Williams & Wilkins**, p. 787, 1994

HUANG,X.; ZHAI, J.; LUO, Y; RUDOLPH, K. Identification of a highly virulent strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **European Journal of Plant Pathology** 122:461–469. 2008.

IZQUIERDO, S.C., VALLEJO, P.R., ESPINOSA, R.G., GONZALEZ, F.C., ISLAS, J.S.S. Selección para resistencia a tizón común en frijol. **Revista Fitotecnia Mexicana** 27,141-147. 2004.

JACOB, T.R.; LAIA, M.L.; FERRO, J.A.; FERRO, M.I.T. Selection and validation of reference genes for gene expression studies by reverse transcription quantitative PCR in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during infection of *Citrus sinensis*. **Biotechnology Letters** 33:1177–1184. 2011.

JACQUES, M.A., JOSI, K., DARRASSE, A., SAMSON, R. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of Field-grown beans. **Applied Environmental Microbiology** 71,2008-2015. 2005.

JOLIK, C. Zinsser microbiologia. 29.ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, p.1696, 2003.

KANDA, A.; OHNISHI. K.; KIBA, A.; HIKICHI, Y. Implication of C-terminal mutation of PopA of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1 in suppression of bacterial wilt. **Plant pathology** 58:159-169. 2009.

- KARAVINA, C., CHIHIYA, J., TIGERE, T.A. Detection and Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* (E.F.SM) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) collected in Zimbabwe. **Journal of Sustainable Development in Africa**, 10(1), 105-119. 2008.
- KERR JR. Suppression of fungal growth exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clinical Microbiology**.;32:525–527. 1994.
- KAY, S.; BONAS, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. **Current Opinion in Microbiology**, 12:37–43. 2009
- KHALAF , A.A.; GMITTER, F.G.; CONESA, A.; DOPAZO, J.; MOORE, G.A. *Fortunella margarita* Transcriptional Reprogramming Triggered by *Xanthomonas*. **BMC Plant Biol.** 11;11:159. 2011.
- KIMURA, O. Importância das populações "residentes" de fitobactérias na epidemiologia de enfermidades bacterianas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.310-311, 1981.
- KHODAKARAMIAN, G.; SWINGS, J. Genetic Diversity and Pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* strains Inducing Citrus Canker Disease in Iran and South Korea. **Indian Journal of Microbiology** 51(2):194–199. 2011.
- Koenning, S. Bacterial Blight (Angular Leaf Spot) of Cotton. Plant Pathology Extension Note No. 3, 2004. In: <http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/Cotton/cdin3/cdin3.htm>
- KOROLKOVAS, A. Dicionário Terapêutico Guanabara. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 21-26, 1999.
- KOURI, J. Cultivo do Algodão Irrigado. Embrapa Algodão. Sistemas de Produção, 3 - 2a. edição ISSN 1678-8710 Versão Eletrônica Set/2006
- KUMAR, N.; EBEL, R.C.; ROBERTS, P.D. Antioxidant metabolism of grapefruit infected with *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Environmental and Experimental Botany** 71 41–49. 2011.
- KUROZAWA C; PAVAN MA. Doenças do Tomateiro. In: KIMATI H; AMORIM L; BERGAMIN FILHO A; CAMARGO LEA; REZENDE JAM (eds.) Manual de

fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: **Agronômica Ceres**. p. 607-626. 2005.

LAIA, M.L.; MOREIRA, L.M.; SILVA, A.C.R.; FERRO, J.A.; OLIVEIRA, J.C.F. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, 9:12. 2009.

LANCHEROS, C.A.C. Atividade antimicrobiana de compostos extracelulares produzidos por *Pseudomonas* sp. Cepa LV em *Trypanosoma cruzi*. **Universidade Estadual de Londrina**, 49p. 2011.

LO CANTORE, P., SHANMUGAIAH, V., IACOBELLIS, N.S. Antibacterial Activity of Essential Oil Components and Their Potential Use in Seed Disinfection. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 57,9454-9461. 2009.

LOPES, L. Avaliação da atividade antibiótica *in vitro* de compostos extracelulares bacterianos sobre *Xanthomonas axonopodis* e no controle da mancha foliar em Eucalipto. **Universidade Estadual de Londrina**, 50p. 2011.

MABAGALA, R.B. The effect of populations of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean reproductive tissues on seed infection of resistant and susceptible bean genotypes. **European Journal of Plant Pathology** 103: 175–181, 1997.

MARCUZZO, L.L. Importância das populações epifíticas na epidemiologia de enfermidades bacterianas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.8, n.2, p. 146-151, 2009

MARTIN, J.L.DEMAIN, A.L. Control of antibiotic synthesis. **Mycrobiology Review** 44:230-251.1980.

MELO, F. M. P. Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus*, Tese (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola), **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)**, Piracicaba, p.120. 2005.

MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., HE, SY.. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. **Annual Review Phytopathology**. 46:101-122. 2008

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**;34:367–86. 1996.

MERCADO-BLANCO, J; VAN DER DRIFT, K.M.G.M.; OLSSON, P.E. THOMAS-OATES, G.E.; VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.H.A.M. Analysis of the pmsCEAB gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, V 183, p 1909 – 1920, 2001.

METZ M.; DAHLBECK D.; MORALES C.Q.; AL SADY, B.; CLARK ,E.T.; STASKAWICZ ,B.J. The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Journal** 41, 801–814. 2005.

NASCIMENTO, A.R.P.; MARIANO, R.L.R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.301-307, 2004.

NEIDIG N, JOUSSET A, NUNES F, BONKOWSKI M, PAUL R J, SCHEU S  
Interference between bacterial feeding nematodes and amoebae relies on innate and inducible mutual toxicity. **Functional Ecology** 24: 1133-1138. 2010.

NUNES, M.P.; MEHTA, Y.R. Manejo integrado de doenças em plantio direto. **Revista Plantio Direto**, edição 101. Aldeia Norte Editora Ltda., Passo Fundo, RS. 2007.

NKANG,A. O.; OKONKO, I. O.; MEJEHA, O. K.; ADEWALE, O. G.; UDEZE, A. O.; FOWOTADE, A.; FAJOBI, E. A.; ADEDEJI A.; OBABALOLA. E. T. Assessment of antibiotics susceptibility profiles of some selected clinical isolates from laboratories in Nigeria. **Journal of Microbiology and Antimicrobials** Vol. 1(2). pp. 019-026, 2009.

- OLIVEIRA, A.G. Produção e purificação de metabólitos secundários com atividade antibiótica produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra bactérias gram negativas: agente causal do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) e isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase. **Universidade Estadual de Londrina**. 131p. 2011.
- RAGHAVENDRA, V.B.L.; PRAKASH, H.S.; AGRIOS, N.G. Dravya, a Product of Seaweed Extract (*Sargassum wightii*), Induces Resistance in Cotton against *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Phytoparasitica** 35(5):442-449. 2005.
- RAVIKUMAR, M.R.; KHAN, A.N.A. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from insect vectors. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v.14, n.2, p.160-161, 2001.
- RODRIGUES, R., LEAL, N.R., PEREIRA, M.G., LAM-SÁNCHEZ, A. Combining ability of *Phaseolus vulgaris* L. for resistance to common bacterial blight. **Genetics and Molecular Biology** 22, 4,571-575. 1999.
- RODRIGUEZ-R, L.M.; GRAJALES, A.; ARRIETA-ORTIZ, M.L.; RESTREPO,S.; BERNAL,A. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. **BMC Microbiology**, 12:43. 2012.
- SAETLER, A.W. Common bacterial blight. In: Compendium of bean diseases. Aps Press p 46-47. 2005.
- SCHNATHORST, W.C. Longevity of *Xanthomonas malvacearum* in dried cotton plants and its significance in dissemination of the pathogen on seeds. **Phytopathology** 54:1009-1011. 1964.
- SILVA, R.R.; STAUDT, R.C.; THEODORO, G.F.; MARINGONI, A.C. Intensidade da mancha-angular do algodoeiro, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, na região de chapadão do sul – safra 2007/08. **VII Congresso Brasileiro do Algodão, Foz do Iguaçu, PR – 2009**
- SOTO, M. J.; DOMINGUEZ-FERRERAS, A.; PÉREZ-MENDOZA, J.; SANHUAN, J.; OLIVARES, J. Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant–bacteria interactions. **Cellular Microbiology** 11(3), 381–388. 2009.

SOTO, M.; SANHUAN, J.; OLIVARES, J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. **Microbiology**, 152, 3167–3174. 2006.

SOUZA, F.F.; FERNANDES, C.F.; RAMALHO, A.R. Doenças do feijoeiro-comum em Rondônia. 2005 in

[http://www.cpafrro.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/rt93\\_feijao.pdf](http://www.cpafrro.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/rt93_feijao.pdf)

SPIERS, A.J., BUCKLING, A., AND RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**. 146: 2345-2350. 2000.

THEODORO, G.F. Reação de cultivares locais de feijão a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, em condições de campo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 3, p. 373-375, 2004.

TRIAS, R.; BAÑERAS, L.; MONTESINOS, E.; BADOSA, E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. **International microbiology** 11:231-236. 2008.

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

VIEIRA, C. Doenças e Pragas do Feijoeiro. 2ª ed, **Imprensa Universitária**, Viçosa. 231p. 1988.

VON DER WEID, D.S. ALVIANO, A.L.S. SANTOS, R.M.A. SOARES, C.S. ALVIANO, SELDIN, L.. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. **Journal of Applied Microbiology**, 95, 1143–1151. 2003.

YOUNG J.M., SADDLER G.S., TAKIKAWA Y., DE BOER S.H., VAUTERIN L., GARDEN L., GVOZDYAK R.I., STEAD D.E: Names of plant pathogenic bacteria 1864–1995. **Review of Plant Pathology**, 75: 721–763. 1996.

WANG, Y.; LIU, J. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates occurrence of citrus canker in susceptible navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Journal of Plant Physiology** p1-7. 2012.

WELLER, D.M.; SAETLER, A.W. Stimulation of seedborn of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var *fucans* as primary inocula in bean blights. **Phytopathology** v 70:500 – 506. 1980.

WHITE, F.F.; POTNIS, N.; JONES, J.B.; KOEBNIK, R. **The type III effectors of *Xanthomonas***. **Molecular plant pathology** 10(6), 749–766. 2009.

XIAO, J.; FANG, D.D.; BHATTI, M. HENDRIX, B.; CANTRELL, R. A SNP haplotype associated with a gene resistant to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Malvacearum* in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Molecular Breeding**, 25:593-602. 2010.

ZANDONÁ, C., MEHTA, Y.R., SCHUSTER, I., ALVES, P.F.R., BOMFETI, C.A., BIBANCO, K.P., SILVA, R.B. & LOPES, L.P. Mecanismo genético de resistência em três cultivares de algodoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

**Fitopatologia Brasileira** 30:647-649. 2005

ZHAI, J.; LUO, Y.; ZHENG, D.; HUANG, X. Evaluation of Genetic Diversity of Highly Virulent Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* by rep-PCR Fingerprinting. **Journal of Phytopathology** 158:764–768 . 2010.

**ARTIGOS**

## Artigo 1

**Ultra structural studies on the antimicrobial activity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by *Pseudomonas aeruginosa* (LN strain).**

Spago, F.R.<sup>1</sup>, Ishii Mauro, C.S.<sup>1</sup>, Bomediano, C.S.<sup>1</sup>, Oliveira Jr, A.G.<sup>1</sup>, Lopes, L.P.<sup>1</sup>, Beranger, J.P.O.<sup>1</sup>, San Martin, J.A.B.<sup>2</sup>, Andrade, C.G.T.J.<sup>2</sup>, Mello, J.C.P.<sup>3</sup>, Andrade, G<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, BR 86051-990, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia, Laboratório de Palafito, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, BR 87020-900, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, BR 86051-990, Brazil.

Corresponding author:

Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, BR 86051-990, Brazil. Telephone/Fax: 55 43 33714791

E-mail: [andradeq@uel.br](mailto:andradeq@uel.br)

**Abstract**

The action of purified compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* (LN strain) was investigated against the causal agent of common bacterial blight of bean, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in *in vitro* conditions and assessed by electron microscopy techniques. LN strain was cultivated, centrifuged and the supernatant was submitted to a liquid-liquid extraction with ethyl acetate, concentrated, frozen and lyophilized. The ethyl-acetate phase (EAP) was fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) using hexane (VLC1), dichloromethane (VLC2), ethyl acetate (VLC3), methanol (VLC4), methanol plus water (VLC5) and water (VLC6). EAP and VLC2, VLC3, and VLC4 fractions inhibited bacterial growth when test diffusion technique was performed. Scanning and transmission electron microscopy showed that VLC3 acts in biofilm formation and on cell morphology of the pathogen, difficulting the infection of bean plants

**Key Words**

Common bacterial blight, ultra structure, phytopathogen, antibiosis, biological control, secondary metabolites.

## 1. Introduction

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are one of the most important grain legumes used as food around the world. It is an important source of dietary protein and starch, representing a significant contribution for human nutrition (Abd-Alla et al., 2010).

The common bacterial blight (CBB) of bean is one of the most economically important diseases that affect bean plants worldwide. Yield losses may range from 10 to more than 50% depending on disease pressure, environmental condition and cultivar (Izquierdo et al., 2004; Asensio-S.-Manzanera et al., 2005). The disease reduces seed and pod quality, market value, leading to important yield losses (Jacques et al., 2005).

The causal agent of CBB is the gram-negative bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), which enters through the stomata or wounds, invading the intercellular spaces and causing gradual dissolution of middle lamella (OEPP/EPPO, 2008). Jacques et al. (2005) showed that *Xap* forms biofilm that enable to survive on leaves under stressful field conditions. This biofilm is stabilized around  $10^5$  CFU/g of leaf fresh weight, when the cells number is not enough to development the symptoms. In this stage, bacteria are protected by the biofilm and use the exopolysaccharides to infect plant host (Jacques et al., 2005).

The control include quarantine procedures, seed disinfection, cultural practices, host plants resistance, seed certification program, chemical control as the use of bactericides and copper. Lo Cantore et al. (2009) related that control measures have limited efficacy, once there are few bactericides available on the market and cooper compounds are toxic, causing negative environment impact. The

chemical control is inefficient and the development of resistant cultivars shows low protection against the CBB (Rodrigues et al., 1999). The resistant cultivars are not effective against some local pathogen strains from different areas, suggesting that this resistance is instable and need a high specificity between the plant and bacterium genotype (Izquierdo et al., 2004). Sanitary control of this seed-borne disease is complicated by the epiphytic and asymptomatic growth of the bacteria on the bean canopy (Jacques et al., 2005). Adb-Alla et al. (2010) related that seed dealers and farmers retain the seeds for long periods under high temperature and humidity and these seeds have higher population of *Xap* than in the preceding season.

As discussed above, the challenge is to find new methods of control that guarantee sustainability and low cost to control the disease, increasing bean production. The aim of this work was to isolate, purify and test a metabolic product from *Pseudomonas aeruginosa* (LN strain) against *Xap* in *in vitro* conditions and verify its action on cell morphology and biofilm formation using methods of electron microscopy.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Bacterial strains and growth condition*

The causal agent of CBB (*Xap*) was grown on PSA medium (Lopes et al., 2008) at 28 °C for 48 h and stored in 30% glycerol (v:v) at -20 °C for up than one month. The strain was also cryopreserved, frozen in liquid nitrogen and kept at -180°C. For all the experiments the cell concentration of *Xap* was adjusted for  $10^{12}$  CFU mL<sup>-1</sup> (590 nm).

The antagonist bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* LN strain, isolated from a recent formed citrus canker lesion on leaves of orange plants (*Citrus sinensis* cv. Valence), was collected in Astorga, Brazil [23°13'29.11" S; 51°39'47.20" W] (Rampazo, 2004). The strain was stored as described for *Xap* and cultured in Tryptich soy agar (TSA) plus copper chloride (100 mg L<sup>-1</sup>) as described by Cain et al. (2000), for 24 h at 28 °C.

## 2.2. Production and separation of antibiotic substances

The LN strain was cultured in TSA plus 100 mg L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O until log phase (10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, O.D 0.08,  $\lambda$  = 590 nm), an aliquot of 150  $\mu$ L of cell suspension in sterile saline was inoculated in 1.5 L of TSB plus 100 mg L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O and cultivated for 15 days at 28 °C and 100 rpm. After, the culture was centrifuged (20 min, 4 °C; 18000 g), and 500 mL of cell-free supernatant were submitted 10 times to a liquid-liquid partition with ethyl acetate 1:1 (v/v). The ethyl-acetate phase (EAP) obtained was concentrated in a rotaevaporator (Rotavapor R 215, Büchi) under reduced pressure at 60 °C, then the sample was frozen in liquid nitrogen and lyophilized. The final amount obtained was approximately 1 g of EAP per 17 L of supernatant.

## 2.3. Purification of the EAP by vacuum liquid chromatography (VLC)

VLC was carried out in a glass column (20 mm diameter x 350 mm H) filled with 30 g of silica gel 60 (0.063–0.200 mm, Merck) coupled to a vacuum pump with 51 kPa. The EAP (1 g mixed with 3 g of silica gel 60) was fractionated using the following mobile phase (v/v): hexane (100; VLC1), dichloromethane (100; VLC2), ethyl acetate (100; VLC3), methanol (100; VLC4), methanol:water (1:1; VLC5) and

water (100; VLC6). Fifty milliliters of each eluent was passed through the column 8 times, concentrated in a rotaevaporator under reduced pressure at 60° C, frozen in liquid nitrogen and lyophilized.

#### 2.4. Evaluation of antibiotic activity by disk diffusion technique

The EAP and the seven semi-purified fractions were tested against *Xap* in seven concentrations (10,000, 2 000, 1000, 500, 250, 200 and 100 µg) with three replicates. Each fraction was solved with the specific organic solvent used in VLC and 5 µL was added to a diffusion disk. After the evaporation of solvents, the disks were placed on PSA streaked with *Xap* ( $10^{12}$  CFU mL<sup>-1</sup>) by swab. As negative control, only the solvent was added to the disk. The plates were incubated at 28 °C for 48 h and the diameter of inhibition halos was measured (mm).

#### 2.5. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of EAP and VLC3 fractions on *Xap* growth

The MIC test was carried out in plates with 96 wells. In each well were added 100 µL of the fraction tested dissolved in nutrient broth (NB) and 100 µL of *Xap* suspension ( $10^{12}$  CFU mL<sup>-1</sup>) in NB to rtheeach following concentration: 3000, 1500, 750, 375, 187.5, 93.75, 46.88, 23.44, 11.72, and 5.86 µg mL<sup>-1</sup>. The test was carried out in triplicate. As positive control, 100 µL of NB and 100 µL of *Xap* suspension ( $10^{12}$  CFU.mL<sup>-1</sup>) in NB, were used. As negative control, 200 µL of NB were used. For each fraction concentration, a control of each fraction solved in NB was used. The plates were incubated for 48 h at 28 °C and the optical density was determined (590 nm) (ASYS UVM 340).

## 2.6. *Electron microscopy study*

*Xap* was grown in tubes containing NB (24 h, 28 °C, 100 rpm). When the culture was in the log phase, the cell concentration was adjusted at  $10^{12}$  CFU mL<sup>-1</sup> (O.D = 0.09;  $\lambda$  = 590 nm) and 10 mL of cell suspension was sampled in 12 tubes plus 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of VLC3 fraction. Other five tubes with NB in the absence of the VLC3 fraction were considered as the control. The tubes were incubated for 6 h at 28 °C and 100 rpm. After one, three and six hours, four aliquots of 20  $\mu$ L and one aliquot of 2 mL were collected to prepare the material for scanning and transmission electron microscopy, respectively. For scanning electron microscopy (SEM), 20  $\mu$ L of cell suspensions of *Xap* ( $10^{12}$  CFU mL<sup>-1</sup>) were spotted onto glass slides previously coated with a thin layer of polylysine. Each slide plus *Xap* was fixed by immersion in 1 mL of 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium cacodylate buffer (pH 7.2) solution for 12 h, following a post-fixation in OsO<sub>4</sub> 1% for 2 h. The fixed material was dehydrated in an ethanol gradient (70, 80, 90 and 100 °GL), and the sample critical point dried in CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). Finally, the slides were taped onto stubs, coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed under a FEI Quanta 200 scanning electron microscope. For transmission electron microscopy (TEM), 2 mL of cell suspensions for each time were centrifuged (20 min, 4 °C, 44,000g). The pellets were fixed as described above for SEM. After dehydration in an ethanol series, the material was embedded and blocked in Araldite®. The block was cut into ultrathin sections of 60–70 nm (Leica ULTRACUT UCT Leica UCT) and stained with 2% uranyl acetate for 15 min and in lead citrate (Reynold's solution) for 20 min, and observed under a FEI Tecnai 12 transmission electron microscope.

## 2. Results

### 2.1 Evaluation of antibiotic activity by disk diffusion technique and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of EAP and VLC3 fractions on *Xap* growth

The EAP fraction showed the highest inhibitory activity (Table 1). After partition of EAP by VLC, VLC2 fraction showed smaller antibiotic activity halo (12 mm in 10,000 µg), while, VLC3, and VLC4 showed a higher antimicrobial activity against *Xap* (22.5 mm and 17.5 mm in 10,000 µg, respectively). VLC1, VLC5 and VLC6 did not show effect in any concentration tested (Table 1). The MIC of the EAP and VLC3 was both 5 µg.

### 2.2 Electron microscopy study

The SEM analysis showed intact cells and the presence of exopolysaccharide (EPS) linking one cell to another in the control in all of 3 times evaluated (Figure 1A). After 1 hour in VLC3 treatment, the cells morphology was disturbed, showing elongated cells and the exopolysaccharide structure disarranged (Figure 1B). In the next times, the fragmentation of biofilm and the cell collapse of *Xap* was even more evident (Figures 1C and 1D). TEM results showed intact control cell and uniform and full of substance cytoplasm (Figure 2A). After one hour of treatment with VLC3 circles membranes were formed and a thinner cell wall was observed (Figure 2B). After 3 hours of treatment, the cell wall and plasmatic membrane was completely damaged and the cells were collapsed (Figure 2C).

### 3 Discussion

There are few studies relating the use of bioproducts with antimicrobial activity to control *Xap*.

In *in vitro* antibiosis tests, the fractions soluble in ethyl acetate showed better results when compared with other fractions, showing that the antimicrobial substance has affinity by more polar compounds. The water solubility of the fractions and the low MIC (5 µg) observed are good characteristic for a product to be used in agriculture. Zannata et al. (2007) related that *Pseudomonas* and *Bacillus* are good biocontrol organisms because did not show pathogenicity, allergenicity or toxigenicity effect on people, domestic animals and wildlife. Non-spore-forming bacteria, such as the pseudomonads, are sensitive to stresses potentially encountered during formulation and lose viability during prolonged storage (Stockwell and Stack, 2007), problems that are solved using the purified metabolites with antimicrobial activities produced by *Pseudomonas* sp., that not requires the same conservation conditions than a live organism.

Probably the biofilm formed by *Xap* lead to enhanced resistance to stresses and is thought to be adaptive traits of epiphytic bacteria (Saettler, 1989; Jacques et al., 2005). The fact of the VLC3 extract of *P. aeruginosa* can prevent the biofilm formation by *Xap* or damage the biofilm structure suggest that VLC3 affects *Xap* survival and establishment on plant host. In *X. campestris* pv. *campestris* the epiphytic survival is largely known, and is influenced by cell concentration and production of xanthomonadin and exopolysaccharide (EP) production (Cha et al., 1998). Also, these compounds protect the bacteria against environmental factors and/or host physiology and help the bacterial infection process and consequently lesions formation. In the electron microscopy studies, was observed the EP

degradation by VLC3 fraction, fact that could reduce *Xap* capability to infect host plant, decreasing the virulence, and its resistance to stress conditions.

This was further evident by the TEM study where the extracts completely collapsed the bacterial cell and inhibited *Xap* growth. The deformation observed in *Xap* cells by SEM and TEM techniques could be related to plasmatic membrane disorder and changes in the integrity of the cell wall, which maintain osmotic pressure and cell shape.

This study showed that semipurified fractions obtained from *Pseudomonas* sp. metabolism has a great antibiotic effect on *Xap*, reducing the capacity of biofilm formation through EP destruction. Future study is needed to test the efficiency of these compounds in the control of CBB disease under field conditions and the capacity of inducing resistance on bean plant.

#### **4 Acknowledgements**

To the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) who enabled the execution of this study by conceding Ph.D for F.R. Spago research grants.

#### **5 References**

Abd-Alla, M.H., Bashandy, S.R., Schnell, S., 2010. Occurrence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight disease, on seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Upper Egypt. Folia Microbiol 55,47-52.

Asensio-S.-Manzanera, M.C., Asensio, C., Singh, S.P., 2005. Gamete selection for resistance to common and halo blights in dry bean intergene pool populations. *Crop Science* 46,131-135.

Cain, C.C., Henry, A.T., Waldo III, R.H., Casida Jr, L.J., Falkinham III, J.O., 2000. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broadspectrum antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol* 66,4139-4141.

Lo Cantore, P., Shanmugaiah, V., Iacobellis, N.S., 2009. antibacterial activity of essential oil components and their potential use in seed disinfection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57,9454-9461.

Cha, C., Gao, P., Chen, -C., Shaw, P.D., Farrand, S.K., 1998. Production of acyl-homoserine-lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11,1119-1129.

Izquierdo, S.C., Vallejo, P.R., Espinosa, R.G., Gonzalez, F.C., Islas, J.S.S., 2004.. Selección para resistência a tizón común en frijol. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27,141-147.

Jacques, M.A., Josi, K., Darrasse, A., Samson, R., 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl environ microbiol* 71,2008-2015.

Lopes, L.P.; Alves, P.F.R.; Zandoná, C.; Nunes, M.P.; Mehta, Y.R., 2008. Meio semi-seletivo para detectar *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e sua erradicação através do tratamento de sementes com o fungicida tolylfluanid. *Summa Phytopathologica* 34,287-288.

Bulletin OEPP/EPPO Data sheets on quarantine pests, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

Rampazo, L.G.L., 2004. Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. Universidade Estadual de Londrina. Master thesis. Brasil. p. 57.

Rodrigues, R., Leal, N.R., Pereira, M.G., Lam-Sánchez, A., 1999. Combining ability of *Phaseolus vulgaris* L. for resistance to common bacterial blight. *Genetics and Molecular Biology* 22, 4,571-575.

Saettler, A.W., 1989. Common bacterial blight. In: *Bean production problems in tropici*. Centro Internacional de Agricultura Tropical p. 261-283.

Stockwell, V.O., Stack, J.P., 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology* 97,244-249.

Zanatta, Z.G.C., Moura, A.B., Maia, L.C., SANTOS, A.S., 2007. Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38,511–515.

## Table Legend

**Table 1:** Antibiotic activity against *Xap* by disk diffusion technique method of free-cell supernatant, ethyl-acetate fraction and fractions purified by vacuum liquid chromatography extracted of secondary metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LN strain.

Fractions	Concentration ( $\mu\text{g}$ )						
	10,000	2,000	1,000	500	250	200	100
<b>EAP</b>	25 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1	23 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2.6	12.3 $\pm$ 2.5	10 $\pm$ 2	9.3 $\pm$ 1.5
<b>VLC1</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>VLC2</b>	12 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	11.6 $\pm$ 1.5	9.6 $\pm$ 1.5	-	-
<b>VLC3</b>	22.5 $\pm$ 1.8	23 $\pm$ 1	20.3 $\pm$ 7	18 $\pm$ 1	14.3 $\pm$ 1.1	14 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1
<b>VLC4</b>	17.5 $\pm$ 2	14.3 $\pm$ 2	17 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	11.6 $\pm$ 0.5	10.6 $\pm$ 0.5
<b>VLC5</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>VLC6</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>Solvent</b>	-	-	-	-	-	-	-

Solvent was considered as negative control. The data represent the mean of three replicates and its respective standard deviation; Values of halo inhibition (mm); absence of halo formation (-).

## Figures Legends

**Figure 1** – Scanning Electron Micrography of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

(A) viable cells and exopolysaccharide in untreated control *Xap* culture after 1 h incubation; (B) Disrupted exopolysaccharide and dead cells in *Xap* culture treated with VCL3 after 1 h; (C) *Xap* culture treated with VLC3 after 3 h; (D) Dead *Xap* cells 6 h after treatment with VLC3 showing complete lack of exopolysaccharide. Viable cells (VC); nonviable cells (UC); exopolysaccharide (EP); absence of exopolysaccharide (AEP). Bars = 5  $\mu$ m

**Figure 2** – Transmission Electron Micrography of *Xanthomonas axonopodis* pv.

*phaseoli*. (A) *Xap* culture untreated with VCL3 after 1 h (97,000 x); (B) Deforming *Xap* cell treated with VCL3 after 1 h; (C) Disrupted cells treated with VLC3 after 3 h; (D) Dead cell treated with VCL3 after 6 h. Viable cells (VC); unviable cells (UC); Cell wall (CW). Bars = 1  $\mu$ m

Figure 1

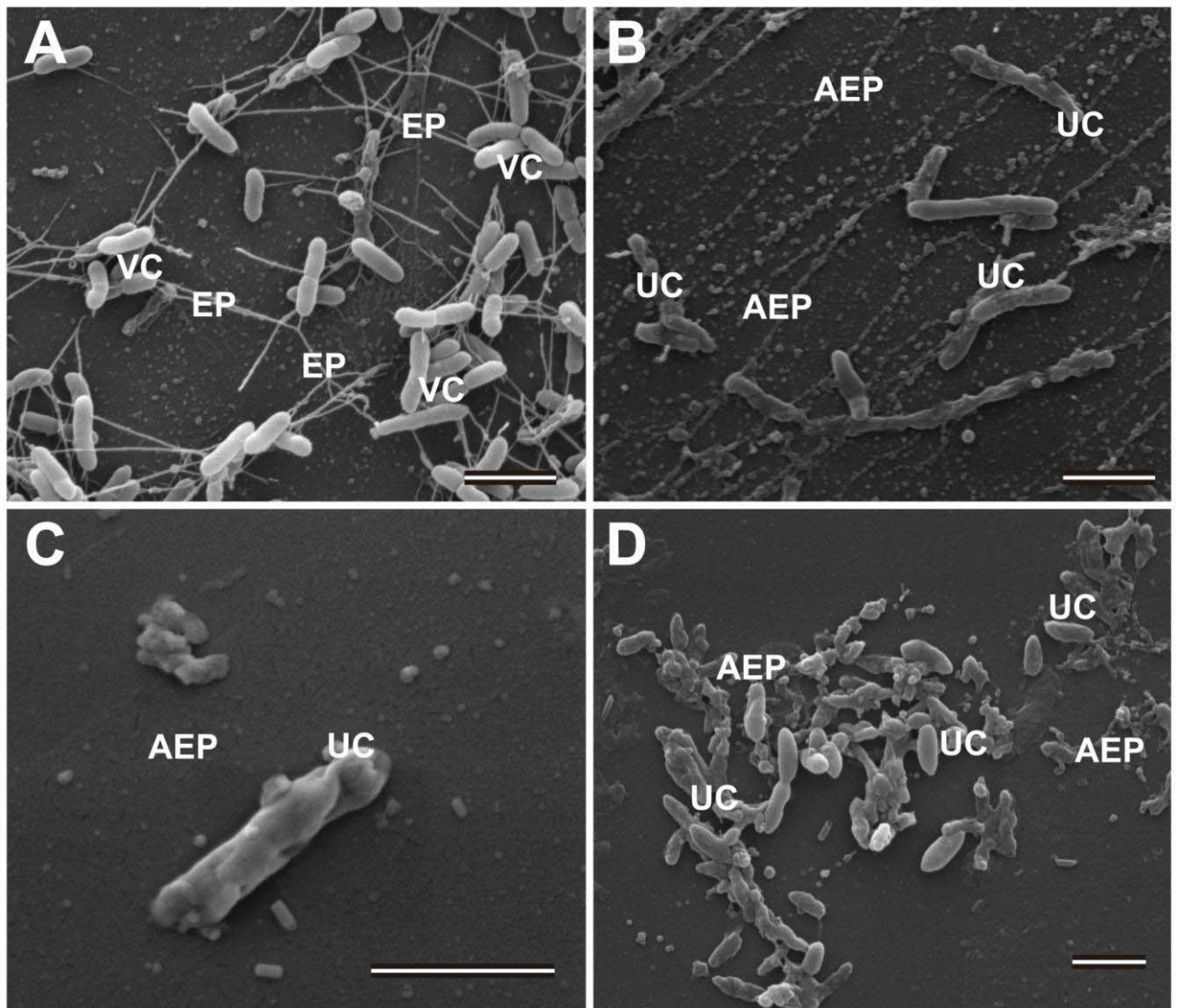
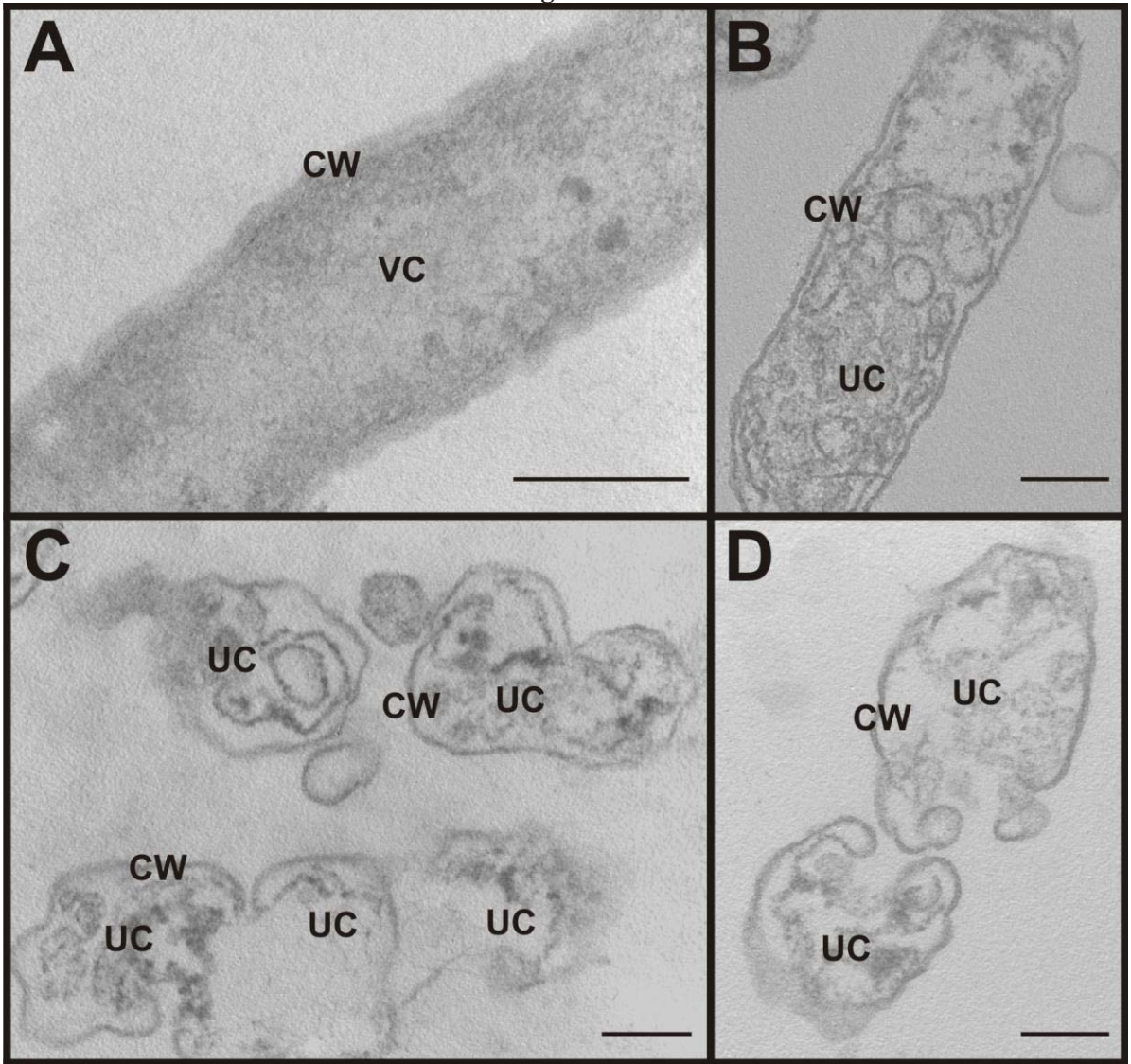


Figure 2



## Artigo 2

### **The action of semi-purified fractions produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the control of *Xanthomonas* sp.**

Spago, F.R.<sup>1</sup>, Ishii Mauro, C.S.<sup>1</sup>, Oliveira, A.G.<sup>1</sup>, Beranger, J.P.O.<sup>1</sup>, Cely, M.V.T.<sup>1</sup>, Góis, C.G.M.<sup>1</sup>; Andrade, C.G.T.J.<sup>2</sup>, Mello, J.C.P.<sup>3</sup>, Andrade, G<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, BR 86051-990, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia e Farmacologia, Laboratório de Palafito, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, BR 87020-900, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, BR 86051-990, Brazil.

Corresponding author:

Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, BR 86051-990, Paraná, Brazil. Telephone/Fax: 55 43 33714791

E-mail: [andradeq@uel.br](mailto:andradeq@uel.br)

## **Abstract**

The action of semipurified fractions, produced by *Pseudomonas aeruginosa* (LN strain), against three *Xanthomonas* species, was investigated under greenhouse conditions and using electron microscopy techniques. Compounds of LN strain metabolism were fractionated by chromatographic techniques, and tested against *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. citri* pv. *citri* by disk diffusion technique. Fractions with antibiotic activity were tested under greenhouse conditions and their activity was evaluated using electron microscopy. Scanning electron microscopy showed that VLC4f acts in biofilm formation while VLC4f and VLC3d act on cell morphology. The semi-purified fractions controlled bacterial diseases under greenhouse conditions, where VLC4f fraction showed better results, reducing the number of lesion in cotton and orange leaves by 94%, and reducing the percentage of lesion in bean leaves by 73%. The data suggested that the fractions showed an effective effect and should be an alternative to the use of chemical compounds to control plant diseases caused by *Xanthomonas* sp. in greenhouse conditions.

## **Key Words**

Citrus canker, common bacterial blight of bean, bacterial leaf blight of cotton, ultrastructure, phytopathogen, antibiosis.

## 1. Introduction

*Xanthomonas* is a large genus of gram-negative, yellow-pigmented, plant-associated bacteria. Pathogenic species and pathovars within species show a high degree of host plant specificity and combined are known to cause diseases on nearly 400 plant hosts, including both eudicots and monocots (Lu et al., 2008). The phyllosphere is a highly stressful environment, but it provides a selective habitat and a source of substrates for these bacteria. *Xanthomonas* colonize host phylloplane before entering leaf tissues and engaging in an invasive pathogenic phase (Mhedbi-Hajri et al., 2011).

Some important diseases caused by xanthomonads bacteria are common bacterial blight of beans (CBB), bacterial leaf blight of cotton (BLB) and citrus canker, leading to serious quality and quantity product losses.

The CBB, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, is one of the most economically important disease that affect bean plants worldwide. Yield losses may range from 10 to more than 50% depending on disease pressure, environmental condition and cultivar (Izquierdo et al., 2004; Asensio-S.-Manzanera et al., 2005). The disease reduces seed and pod quality, market value, leading to important yield losses (Jacques et al., 2005).

BLB, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* is one of the most serious diseases which occurs in all cotton-growing countries of the world and affects the yield and fiber quality. The pathogen is internally seed-borne and yield losses due to bacterial leaf blight have been estimated up to 50% under field conditions (Salah Eddin et al., 2007).

Citrus Canker, caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri* is a serious disease which infects citrus plants (*Citrus* spp.) leading to a large economic loss in citrus production worldwide (Lins et al, 2009). The symptoms consist of erumpent lesions on fruit, leaves and young stems, reducing fruit quality and production (Oliveira et al., 2011).

The control measures for these diseases include quarantine procedures, disease-free seedlings, use of resistant cultivars, windbreaks to hinder inoculum dispersal, use of bactericides and copper based compounds. These control measures have limited efficacy, there are few bactericides available on the market and copper compounds are toxic, impacting the environment (Lo Cantore et al., 2009).

The challenge is to find new methods that guarantee the sustainability of the environment with low cost to control these diseases. The aim of this work was to obtain a semipurified fractions and test a metabolic product from *Pseudomonas aeruginosa* (LN strain) against *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. citri* pv. *citri* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* under greenhouse condition and verify its action on biofilm formation and cell morphology using electron microscopy methods.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Bacterial strains and growth condition*

Bacteria were routinely grown for 48 h on culture medium at 28°C and stored in 30% glycerol (v:v) at -20 °C for up one month. For longer term storage, 200 µL of each culture was mixed with 800 µL of glycerol (30%), frozen in liquid nitrogen. For all *in vitro* and *in vivo* experiments the cell concentration was adjusted for 10<sup>12</sup> CFU

mL<sup>-1</sup> (590 nm). Culture media used were luria broth agar, nutrient agar, peptone sucrose agar (Lopes et al., 2008) and tryptic soy agar plus 100 mg L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Cain et al., 2000) for the growth of *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. citri* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and LN, respectively.

The antagonist bacterium, *P. aeruginosa* (LN strain), was isolated from a recent formed citrus canker lesion on the leave of orange (*C. sinencis* cv. Valence) plants, was collected in Astorga, Brazil [23°13'29.11" S; 51°39'47.20" W] (Rampazo, 2004).

## 2.2. Production and separation of antibiotic substances

The initial inoculum of the LN strain was obtained from a culture stored in glycerol and cultivated as described above. During the log phase of bacterial growth (10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, λ = 590 nm O.D. = 0.09), a 150 μL aliquot of cell suspension was inoculated in 1.5 L of TSB plus 100 mg L<sup>-1</sup> CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O and cultivated for 15 days at 28 °C and 100 rpm. Subsequently, the culture was centrifuged (20 min, 4 °C; 18000g), and 500 mL aliquots of cell-free supernatant were submitted 10 times to a liquid-liquid partition with ethyl-acetate 1:1 (v:v). The ethyl-acetate phase (EAP) obtained was concentrated at 60 °C in a rotaevaporator (Rotavapor R 215, Büchi) under reduced pressure. The sample was then frozen in liquid nitrogen and lyophilized. The final amount obtained was approximately 1 g of EAP per 17 L of supernatant.

### 2.2.1. Purification of the EAP by vacuum liquid chromatography (VLC)

VLC was carried out in a glass column (20 mm diameter x 350 mm H) filled with 30 g of silica gel 60 (0.063–0.200 mm, Merck) coupled to a vacuum pump with

51 kPa. The EAP (1 g mixed with 3 g of silica gel 60) was fractionated using the following mobile phase (v/v): hexane (100; VLC1), dichloromethane (100; VLC2), ethyl acetate (100; VLC3), methanol (100; VLC4), methanol:water (1:1; VLC5) and water (100; VLC6). Fifth milliliters of each organic solvent were passed eight times through the column, concentrated at 60 °C in a rotaevaporator under reduced pressure, and lyophilized.

### *2.2.2. Purification of the VLC3 and VLC4 by vacuum liquid chromatography*

VLC was carried out as described above. Each phase was fractionated using the following mobile phase (v/v): hexane (100; VLC3a; VLC4a), hexane:dichloromethane (1:1, VLC3b; VLC4b), dichloromethane (100; VLC3c; VLC4c), dichloromethane:ethyl acetate (1:1, VLC3d; VLC4d), ethyl acetate (100, VLC3e; VLC4e), ethyl acetate:methanol (1:1, VLC3f; VLC4f), methanol (100; VLC3g; VLC4g), methanol:water (1:1; VLC3h; VLC4h) and water (100; VLC3i; VLC4i).

### *2.3. Evaluation of antibiotic activity by disk diffusion technique*

The EAP and the 24 semipurified fractions were tested against phytopathogenic bacteria (250 µg) with three replicates. Each phase was solved with the specific organic solvent used in VLC and 5 µL was added to a diffusion disk. After evaporation of solvents, the disks were placed on culture media streaked by swab with the respective bacterium ( $10^{12}$  CFU mL<sup>-1</sup>). As negative control, only the solvent was added to the disk and evaporated. The plates were incubated at 28 °C for 48 h before the inhibition halos were measured (mm).

#### 2.4. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of EAP, VLC3, VLC4, VLC3d and VLC4f fractions on *Xanthomonas* strains

The MIC test was carried out in plates with 96 wells. In each well were added 100  $\mu\text{L}$  of the fraction tested dissolved in nutrient broth (NB) and 100  $\mu\text{L}$  of cell suspension ( $10^{12}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) in NB in the following concentration: 3000, 1500, 750, 375, 187.5, 93.75, 46.88, 23.44, 11.72, and 5.86  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The test was carried out in triplicate. As positive control, 100  $\mu\text{L}$  of NB and 100  $\mu\text{L}$  of cell suspension ( $10^{12}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) in NB, were used. As negative control, 200  $\mu\text{L}$  of NB were used and for each concentration of the fraction, one control of the fraction solved in NB was used. The plates were incubated for 48 h at 28 °C and then the optical density was determined at 590 nm (ASYS UVM 340).

#### 2.5. Electron microscopy study

*Xanthomonas* strain was grown in tubes containing the respective culture broth (24 h, 28 °C, 100 rpm). When the culture was in the log phase, the cell concentration was adjusted to  $10^{12}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  and 10 mL aliquots of cell suspension were sampled in 12 tubes plus 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of VLC4f or VLC3d fraction. Other five tubes with culture broth in the absence of the fraction were considered as control. The tubes were incubated for 3 h at 28 °C and 100 rpm. At three different times (after 30, 60 and 180 min), four 1 mL aliquots were collected to prepare the material for scanning electron microscopy. Each aliquot was fixed by immersion in 1 mL of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol  $^{-1}$  sodium phosphate buffer (pH 7.0) solution for 1 h then, 20  $\mu\text{L}$  of cell suspensions ( $10^{12}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) were spotted onto glass slides previously coated with a thin layer of polylysine. Other 1 mL of fixer was added to each glass slide for more 3 h. The samples were post-fixed in  $\text{OsO}_4$  1% for 1 h. The fixed

material was dehydrated in an ethanol gradient (70, 80, 90 and 100°GL). Scanning electron microscopy (SEM) samples were submitted to critical point dried in CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer) and the slides were taped onto stubs, coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed under a FEI Quanta 200 scanning electron microscope.

## 2.6. Plant growth and greenhouse conditions

### 2.6.1. Cotton (*Gossypium hirsutum*) and bean (*Phaseolus vulgaris*)

Prior to sowing, the seeds were disinfected by immersion for 2 min in 70% ethanol, following 0.2% of NaClO for 2 min and thoroughly rinsed with distilled water. Bean plants were grown in one-liter pots containing a soil-sand mixture (1:1) previously treated with NPK (14-14-14) and inoculated with 1 mL of *Rhizobium* suspension ( $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) per pot. Plants were kept in greenhouse at 25 °C/22 °C and 10 h/14 h day/night with relative humidity of 80%. After germination, 25 mL of Hewitt's solution for legume plants (Hewitt, 1966) were added, and plants were watered with tap water when needed. Cotton plants were grown in two-liter pots containing a soil-sand mixture (3:1) previously treated with NPK (14-14-14). Plants were kept in a greenhouse at 30 °C/26 °C and 10 h/14 h day/night with relative humidity of 80%. After germination, 25 mL of Hewitt's solution for non-legume plants (Hewitt, 1966) were added, and plants were watered with tap water when needed.

### 2.6.2. Growth of orange plants (*Citrus sinensis*)

Plants of *C. sinensis* cv. Valence were grown in three-liters pots with non-sterile soil Rhodic Ferralsol (FAO, 1994) and kept in greenhouse at 28 °C/22 °C and

10 h/14 h day/night with relative humidity of 80%. Every 15 days, 150 mL of Hewitt's solution for non-legume plants were added, and plants were watered with tap water when needed.

### *2.7. Evaluation of the action of the VLC4f and the VLC3d fraction on lesion formation*

Experiments were carried out to determine the action of VLC4f on lesion formation by *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. citri* pv. *citri* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, and the action of VLC3d fraction on lesion formation by *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. All experiments were repeated twice to confirm the results.

#### *2.7.1. Control of Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum by CLV4f in greenhouse*

Two experiments were conducted in a completely randomized block design composed of two regimens (preventive and curative), three doses of VLC4f ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (D1 = 250; D2 = 500 and D3 = 750) with 10 replicates (2 x 3 x 10, n = 60). One positive control (VLC0 = sprayed with *X. axonopodis* pv. *malvacearum* suspension) and one negative control (sprayed with distilled water) were used. To assure high humidity, plants were covered with black plastic bags of 50 L for 24 h at 30 °C. Two regimens were used to test the effect (curative or preventive) that the spray moment would have on lesion formation. The preventive regimen, four mL of VLC4f fraction were sprayed per plant 24 h before 4 mL of *X. axonopodis* pv. *malvacearum* suspension (O.D. = 0.11, k = 590 nm) per plant were inoculated. In the curative regimen, the plants were firstly inoculated 4 mL of *X. axonopodis* pv. *malvacearum* and then sprayed with different concentrations of VLC4f. The control plants were sprayed with 4 mL of distilled water per plant in the both regimen treatments (solvent

used to dilute the VLC4f). The results were reported as the number of lesions in leaves per plant 20 days after application.

### 2.7.2. Control of *Xanthomonas citri* pv. *citri* by CLV4f in greenhouse

Two experiments were conducted in a completely randomized block design composed of two regimens (preventive and curative), three doses of the VLC4f ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (D1 = 20; D2 = 100 and D3 = 500) with five replicates (2 x 3 x 5, n = 30). One positive control (VLC0 = sprayed with *X. citri* pv. *citri* 306 suspension) and one negative control (sprayed with distilled water) were used. Plants were covered for 24 h at 28 °C with black plastic bags of 50 L to form a moist chamber. Two regimens were used to check the effect (curative or preventive) the sprayed time would have on lesion formation conducted as detailed from *X. axonopodis* pv. *malvacearum*. Eight mL of *X. citri* pv. *citri* suspension (O.D. = 0.1, k = 590 nm) and VLC4f fraction were used per plant. The results were reported as the number of lesions in leaves per plant and five plants per treatment after 21 days of application.

### 2.7.3. Control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by CLV4f and CLV3d in greenhouse

Three experiments were carried out to determine the action of VLC3d and the VLC4f fraction on the bacterial blight of bean control. The experimental design used was a randomized block composed of two regimens (preventive and curative), three doses with 10 replicates (2 x 3 x 10, n = 60). The first experiment, three doses of the VLC3d ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (D1 = 250, D2 = 500 and D3 = 700), one positive control (VLC0 = sprayed with *X. axonopodis* pv. *phaseoli* suspension) and one negative control (sprayed with distilled water) with ten plants each were used. The second experiment

was also a completely randomized block design comprising two regimens (preventive and curative), three doses of VLC4f fraction ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (D1 = 750, D2 = 1250 and D3 = 2000) with ten replicates ( $2 \times 3 \times 10$ ,  $n = 60$ ), one positive control (VLC0 = sprayed *X. axonopodis* pv. *phaseoli* suspension) and one negative control (sprayed distilled water) with ten replicates each. In the third experiment a completely randomized block design comprising two regimens (preventive and curative), four VLC4f fraction doses (D1 = 750  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , D2 = 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , D3 = 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , D4 = 125  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) with eight replicates ( $2 \times 3 \times 10$ ,  $n = 60$ ), and one positive control (VLC0 = sprayed *X. axonopodis* pv. *phaseoli* suspension) and one negative control (sprayed distilled water). Four mL of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* and 4 mL of the fraction were used in each plant, and the experiments was conducted as described from *X. axonopodis* pv. *malvacearum*. The results were reported as the percentage of lesions in leaves per plant and ten plants per treatment after 20 days of application.

### 2.8. Statistical Analysis

Data were analyzed with BioEstat (version 5.0) software. When the normality of the data and homogeneity of variances was confirmed, one-way analyses of variance (ANOVA) and Tukey's test were performed at  $p < 0.05$  level of probability. Percentage data was transformed by Arcsine  $\sqrt{x+0.5}$ .

## 3. Results

### 3.1. Evaluation of antibiotic activity by disk diffusion technique

The VLC4f fraction showed the highest antibiotic activity halos for *X. axonopodis* pv. *malvacearum* and *X. citri* pv. *citri* (14 and 20 mm, respectively, in 250

µg). At the same concentration, EAP, VCL3, VCL4, VCL3d and VCL4f showed inhibition halos of 12, 14, 12, 14, and 10 mm, respectively, in the control of *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. These were the purified fractions selected to use in greenhouse tests.

### 3.2. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The MIC of the VLC4f against *X. citri* pv. *citri* was 23 µg mL<sup>-1</sup> and against *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, 46.5 µg mL<sup>-1</sup>. From *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, the MIC of the EAP and VLC3 was 5 µg mL<sup>-1</sup>, lower than the other fractions. The VLC4 and VLC3d fractions showed MIC of 23 µg mL<sup>-1</sup> and VLC4f, 46.5 µg mL<sup>-1</sup>. Although EAP and VLC3 demonstrated the lowest MIC to control *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, these fractions were more toxic to plant cells than VLC3d and VLC4f. Because of that, these fractions were not tested.

### 3.3. Electron microscopy study

#### 3.3.1. SEM of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

In control treatment, SEM analysis showed intact cells and the presence of exopolysaccharide linking one cell to another (Fig 1a). Thirty min after treatment with VLC4f fraction, cell shape was little disturbed with few depressions in the surface and intact exopolysaccharide structure (Fig 1b). Ninety and 180 min after, cell number reduced with some cells seemed to be completely damaged and showing reduced biofilm quantity (Fig 1c and 1d).

#### 3.3.2. SEM of *Xanthomonas citri* pv. *citri*

Control cells observed in SEM appears intact (Fig 2a). Thirty min after VLC4f treatment, the cells have a shrunken appearance (Fig 2b), completely collapsing after 180 min of treatment. The exopolysaccharide formed during the culture time appears to be deranged and, finally, completely destroyed (Fig 2c). Thirty min after, viable cells were not identified in glass slides, confirming the results obtained by disk diffusion and MIC, that demonstrated that this bacterial specie was more sensitive to the action of VLC4f than the others tested.

### 3.3.3. SEM of *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*

SEM evaluations showed that VLC3d causes more damage to *X. axonopodis pv. phaseoli* cells than VLC4f, as demonstrated in disc diffusion tests. In both treatments, the control showed intact cells and presence of exopolysaccharide (Fig 3a and 4a). VLC4f treatment caused damages in the cells after 30 min, remaining almost the same in subsequent times evaluation (Fig 3b, 3c and 3d). Otherwise, the treatment with VLC3d showed shrunken and completely damaged cells after 30 min (Fig 4b) and a disruption in exopolysaccharide after 180 min of treatment (Fig 4d).

## 3.4. Evaluation of the action of the VLC4f and VLC3d fraction on lesion formation

### 3.4.1. Control of *Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum* by CLV4f in greenhouse

*In vivo* experiments were carried out to verify the action of VLC4f on the lesion formation by *X. axonopodis pv. malvacearum*. Curative treatment decreased significantly the percentage of lesion in cotton leaves in all the three concentrations tested. Plants treated with D1, D2 and D3 showed reduction of the number of lesions,

by 94%, 83% and 91% respectively when compared to the control (Fig 5). Preventive treatment was not significant ( $P < 0.05$ ) when One-way ANOVA was performed.

#### 3.4.2. Control of *Xanthomonas citri* pv. *citri* by CLV4f in greenhouse

VLC4f reduced significantly the number of lesion caused by *X. citri* pv. *citri* on orange leaves in the preventive treatment, showing a decrease of 94% in D1, 83% in D2 and 83% in D3 treatment (Fig 6). Curative treatment was not significant ( $P < 0.05$ ) when One-way ANOVA was performed.

#### 3.4.3. Control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by CLV4f and CLV3d in greenhouse

Three *in vivo* experiments were carried out. In the first, the application of VLC3d fraction in preventive treatment decreased significantly the percentage of lesion in bean leaves in all the three concentration tested (Fig 7a). Plants treated with D1, D2 and D3 showed 39%, 37% and 38%, respectively, fewer lesions when compared to the control. On the other hand, when VLC3d were applied on leaves in the curative treatment, the percentage of lesions per plant was greater than the control (Fig 7b). VLC4f had a greater effect on lesion formation with  $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ , in both experiments. In the second experiment, D1 decreased about 54 % in preventive treatment (Fig 8a) and in the third experiment showed that D4 decreased 73% the percentage of lesion when compared to the control (Fig 9a). Curative treatment was not significant ( $P < 0.05$ ) when One-way ANOVA was performed.

## 4. Discussion

Although many authors have studied the control of *Xanthomonas* sp. by biological agents, there are few studies relating the use of these agents to control *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. citri* pv. *citri* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Silva et al. (2008) related that the isolate *Pseudomonas* DFs842 reduced CBB severity in 39.1%. Other studies reported the use of *Pseudomonas* isolates to control several bacterial diseases, Wilson et al. (2002) showed that *P. syringae* Cit7, achieved a mean reduction of 78% in foliar disease severity of bacterial speck of tomato and, the bacterial strain *P. fluorescens* A506 provided 61.2% reduction in foliar disease severity. The use of purified compounds produced by *Pseudomonas* sp. (LV strain) to control *X. citri* pv. *citri* in orange, reduced the number of lesion in more than 90% (Oliveira et al., 2011). Salah Eddin et al. (2007) demonstrated that talc-based powder formulation of *P. fluorescens* Pf1 effectively controlled the BLB under greenhouse conditions when they were applied to seed and foliage.

In the present study, the *in vitro* antibiosis test showed that the secondary metabolites produced by *P. aeruginosa*, that are soluble in ethyl acetate and/or methanol, had the better results when compared with other fractions, indicating that the antimicrobial substances are more polar compounds. This affinity makes these products easily solved in water, what is an important requirement to use these substances in field conditions. Other advantage is that *Pseudomonas* is a good agent of biocontrol because it does not present pathogenicity, allergenicity or toxigenicity effect on people, domestic animals and wildlife (Zannata et al, 2007).

Stockwell and Stack (2007) related that non-spore-forming bacteria, such as the pseudomonads, are sensitive to stresses potentially encountered during formulation and lose viability during prolonged storage. These complications can be solved using the purified metabolites with antimicrobial activities produced by *P.*

*aeruginosa*, which not requires the same conservation conditions than a live organism, showing stability in long period of light and elevated temperatures.

EAP fraction showed higher activity *in vitro* against *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, but this fraction exhibited high phytotoxic effects when sprayed in the bean leaves than VLC3d and VLC4f (data not shown). For this reason, the EAP fraction was not tested in greenhouse conditions.

In greenhouse tests, VLC3d and VLC4f were effective to reduce lesion formation in all the three plant species. *Pseudomonas* sp. produce a wide spectrum of bioactive metabolites, such as antibiotics, siderophores, volatiles, and growth-promoting substances (Weller, 2007). These bacteria can act as inductor of systemic resistance, as showed in control of *Fusarium oxysporum* (van Peer et al., 1991) and *Colletotrichum orbiculare* (Wei et al., 1991). Production of phenazine derivative pyocyanin by *P. aeruginosa* induces resistance in bean and tomato against *Botrytis cinerea* (Audenaert et al., 2002; Chin-a-woeng et al., 2002). The efficiency of preventive treatment against *X. citri* pv. *citri* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* could involve other mechanisms than antibiotic activity, such as induced resistance. The existence of no positive correlation between the effectiveness of the control is an attribute often associated with resistance induction (Silva et al., 2008). In greenhouse tests we did not observed positive correlation associated with fraction concentration and percentage of lesion. This fact can be well observed in VLC4f treatment against *X. citri* pv. *citri* and VCL3d treatment against *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, where different doses concentration did not differ significantly from each other.

However, greenhouse tests to control BLB showed inhibition of lesion formation in the curative treatment, reducing the number of lesion in 94%. This experiment showed that exist a local action of the compound in cell structure and

biofilm formation, as observed in SEM evaluation. More studies are needed to verify the possibility of induced resistance mechanism in the preventive treatment in orange and bean plants.

One of the problems to control phytopathogenic diseases is that pathogenic bacteria can survive on plant leaves and seeds without cause disease, been disseminate in the environment. In *X. campestris* pv. *campestris* the epiphytic survival is largely known, and is influenced by cell concentration and xanthomonadin and exopolysaccharide (EP) production (Cha et al., 1998). Also, these compounds protect bacteria against environmental factors and host physiology and help the host infection and consequently lesions formation. Probably the biofilm formed by *Xanthomonas* lead to enhanced resistance to stress and is thought to be adaptive traits of epiphytic bacteria (Saettler, 1989; Jacques et al., 2005). In the electron microscopy studies, we observed the degradation of the EP by VLC4f fraction in *X. axonopodis* pv. *malvacearum* and *X. citri* pv. *citri* studies, fact that could be associated with the great reduction in lesion formation observed in greenhouse experiments. Although the UFC number did not shown significant differences between the control and the treatments, the reduction and disarrangement in EP could diminish the virulence level of these bacteria. Then, the disorganization of this biofilm caused by VLC4f would leave bacteria more vulnerable to other integrate methods of control and environmental conditions.

This study showed that semipurified fractions obtained from *P. aeruginosa* metabolism have an efficient antibiotic effect on *Xanthomonas* sp., reducing the capacity of pathogen infection and will represents the base for tests under field conditions and tests of inducing resistance on plants.

## 5. Acknowledgements

To the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) who enabled the execution of this study by conceding PhD for F.R. Spago research grants.

## 6. References

- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., Höfte, M. 2002. Induction of Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of Salicylic Acid, Pyochelin, and Pyocyanin. *Mol Plant Microbe In* 15,1147-1156.
- Asensio-S.-Manzanera, M.C., Asensio, C., Singh, S.P. 2005. Gamete selection for resistance to common and halo blights in dry bean intergene pool populations. *Crop Sci* 46,131-135.
- Cain, C.C., Henry, A.T., Waldo III, R.H., Casida Jr, L.J., Falkinham III, J.O. 2000. Identification and characteristics of a novel Burkholderia strain with broadspectrum antimicrobial activity. *Appl Environ Microb* 66,4139-4141.
- Cha, C., Gao, P., Chen, -C., Shaw, P.D., Farrand, S.K. 1998. Production of acyl-homoserine-lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe In* 11,1119-1129.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol*, 157, 503–523
- Izquierdo, S.C., Vallejo, P.R., Espinosa, R.G., Gonzalez, F.C., Islas, J.S.S. 2004. Selección para resistencia a tizón común en frijol. *Rev Fitotec Mex* 27,141-147.
- FAO., 1994. Soil Map of the World. Revised legend with corrections. p. 140.FAO-UNESCO ISRIC, Wageningen, Rome.
- Hewitt, E. J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. p. 547. East Malling: Commonwealth Agricultural Bureau.
- Jacques, M.A., Josi, K., Darrasse, A., Samson, R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of Field-grown beans. *Appl Environ Microb* 71,2008-2015.
- Lins E.C. ; Belasque Jr, J.; Marcassa, L.G. 2009. Detection of citrus canker in citrus plants using laser induced fluorescence spectroscopy. *Precis Agric*, 10,319–330.

- Lo Cantore, P., Shanmugaiah, V., Iacobellis, N.S. 2009. Antibacterial Activity of Essential Oil Components and Their Potential Use in Seed Disinfection. *J Agr Food Chem* 57,9454-9461.
- Lopes, L.P.; Alves, P.F.R.; Zandoná, C.; Nunes, M.P.; Mehta, Y.R. 2008. Meio semi-seletivo para detectar *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e sua erradicação através do tratamento de sementes com o fungicida tolylfluanid. *Summa Phytopathol* 34,287-288.
- Lu, H.; Patil, P.; Sluys, M.V.; White, F.F.; Ryan, R.P.; Dow, J.M.; Rabinowicz, P.; Salzberg, S.L.; Leach, J.E.; Sonti, R.; Brendel, V.; Bogdanove, A.J. 2008. Acquisition and Evolution of Plant Pathogenesis– Associated Gene Clusters and Candidate Determinants of Tissue-Specificity in *Xanthomonas*. *PlosOne Online*, 3(11), 1-13.
- Mhedbi-Hajri, N.; Darrasse, A.; Pigné, S.; Durand, K.; Fouteau, S.; Barbe, V.; Manceau, C.; Lemaire, C.; Jacques, M.A. 2011. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evol Biol*, 11,67, 1-12.
- Oliveira, A.G., Murate, L.S., Spago, F.R., Lopes, L.P., Beranger, J.P.O., San Martin, J.A.B., Nogueira, M.A., Mello, J.C.P., Andrade, C.G.T.J., Andrade, G. 2011. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biol Control* 56,125-131.
- Rampazo, L.G.L. 2004. Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. p. 57. Universidade Estadual de Londrina. Master thesis. Brasil.
- Saettler, A.W. 1989. Common bacterial blight. In: Bean production problems in tropici. p. 261-283. Centro Internacional de Agricultura Tropical
- Salah Eddin, K.; Marimuthu, T.; Ladhakshmi, D.; Velazhahan, R. 2007. Biological control of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* with *Pseudomonas fluorescens*. *Arch Phytopathology and Plant Protect*, 40(4), 291 – 300.
- Silva, E.G., Moura, A.B., Deuner, C.C., Farias, D.R. 2008. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. *Rev Ceres (Impr)* 55,377-383.
- Stockwell, V.O., Stack, J.P. 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology* 97,244-249.
- van Peer, R., Niemann, G. J., and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81,728-734.

- Wei, G., Kloepper, J. W., and Tuzun, S. 1991. Induction of systematic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81, 1508-1512.
- Weller, D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology* 97, 250-256.
- Wilson, M., Campbell, H.L., Ji, P., Jones, J.B., Cuppels, D.A. 2002. Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in north America. *Phytopathology* 92, 1284-1292.
- Zanatta, Z.G.C., Moura, A.B., Maia, L.C., SANTOS, A.S. 2007. Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). *Braz Microbiol*, 38, 511–515.

## Appendices

### Figures Legends

**Figure 1** – Scanning Electron Micrography of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. (A) untreated control *X. axonopodis* pv. *malvacearum* culture; (B) *X. axonopodis* pv. *malvacearum* culture treated with VCL4f after 30 min; (C) *X. axonopodis* pv. *malvacearum* culture treated with VLC4f after 90 min; (D) *X. axonopodis* pv. *malvacearum* cells 180 min after treatment with VLC4f. Viable cells (VC); nonviable cells (UC); exopolysaccharide (EP); absence of exopolysaccharide (AEP).

**Figure 2** – Scanning Electron Micrography of *Xanthomonas citri* pv. *citri*. (A) untreated control *X. citri* pv. *citri* culture; (B) *X. citri* pv. *citri* culture treated with VCL4f after 30 min; (C) *X. citri* pv. *citri* culture treated with VLC4f after 90 min; (D) *X. citri* pv. *citri* cells 180 min after treatment with VLC4f. Viable cells (VC); nonviable cells (UC); exopolysaccharide (EP); absence of exopolysaccharide (AEP).

**Figure 3** – Scanning Electron Micrography of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. (A) untreated control *X. axonopodis* pv. *phaseoli* culture; (B) *X. axonopodis* pv. *phaseoli* culture treated with VCL4f after 30 min; (C) *X. axonopodis* pv. *phaseoli* culture treated with VLC4f after 90 min; (D) *X. axonopodis* pv. *phaseoli* cells 180 min after treatment with VLC4f. Viable cells (VC); nonviable cells (UC); exopolysaccharide .

**Figure 4** – Scanning Electron Micrography of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. (A) untreated control *X. axonopodis* pv. *phaseoli* culture; (B) *X. axonopodis* pv. *phaseoli* culture treated with VLC3d after 30 min; (C) *X. axonopodis* pv. *phaseoli* culture treated with VLC3d after 90 min; (D) *X. axonopodis* pv. *phaseoli* cells 180 min after treatment with VLC3d. Viable cells (VC); nonviable cells (UC); exopolysaccharide (EP); absence of exopolysaccharide (AEP).

**Figure 5** – Effect of the VLC4f fraction on lesion number of bacterial leaf blight of cotton caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* on plants of *Gossypium hirsutum* after 20 days of application. Doses: (□) D0 = *X. axonopodis* pv. *malvacearum* suspension, (▣) D1 = 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; (▢) D2 = 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; (⊠) D3 = 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . (A) Preventive treatment. (P<0.05). (B) Curative treatment (P<0.05)

**Figure 6** – Effect of the VLC4f fraction on lesion number of bacterial leaf blight of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri* on plants of *Citrus sinensis* after 21 days of application. Doses: (□) D0 = *X. citri* pv. *citri* suspension, (▣) D1 = 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; (▢) D2 = 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; (⊠) D3 = 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . (A) Preventive treatment. (P<0.05). (B) Curative treatment (P<0.05)

**Figure 7** – Effect of the VLC3d fraction on the percentage of lesion of bacterial blight of beans caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on plants of *Phaseolus vulgaris* after 20 days of application. Doses: (□) D0 = *X. axonopodis* pv. *phaseoli* suspension, (▣) D1 = 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; (▢) D2 = 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; (⊠) D3 = 700  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . (A) Preventive treatment. (P<0.05). (B) Curative treatment (P<0.05)

**Figure 8** – Effect of the VLC4f fraction on the percentage of lesion of bacterial blight of beans caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on plants of *Phaseolus vulgaris* after 20 days of application. Doses: (□) D0 = *X. axonopodis* pv. *phaseoli* suspension, (▤) D1 = 750 µg mL<sup>-1</sup>; (▥) D2 = 1250 µg mL<sup>-1</sup>; (⊠) D3 = 2000 µg mL<sup>-1</sup>. (A) Preventive treatment. (P<0.05). (B) Curative treatment (P<0.05)

**Figure 9** – Effect of the VLC4f fraction on the percentage of lesion of bacterial blight of beans caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on plants of *Phaseolus vulgaris* after 20 days of application. Doses: (□) D0 = *X. axonopodis* pv. *phaseoli* suspension, (▤) D1 = 125 µg mL<sup>-1</sup>; (▥) D2 = 250 µg mL<sup>-1</sup>; (⊠) D3 = 500 µg mL<sup>-1</sup>, (□) D4 = 750 µg mL<sup>-1</sup>. (A) Preventive treatment. (P<0.05). (B) Curative treatment (P<0.05).

Figure 1

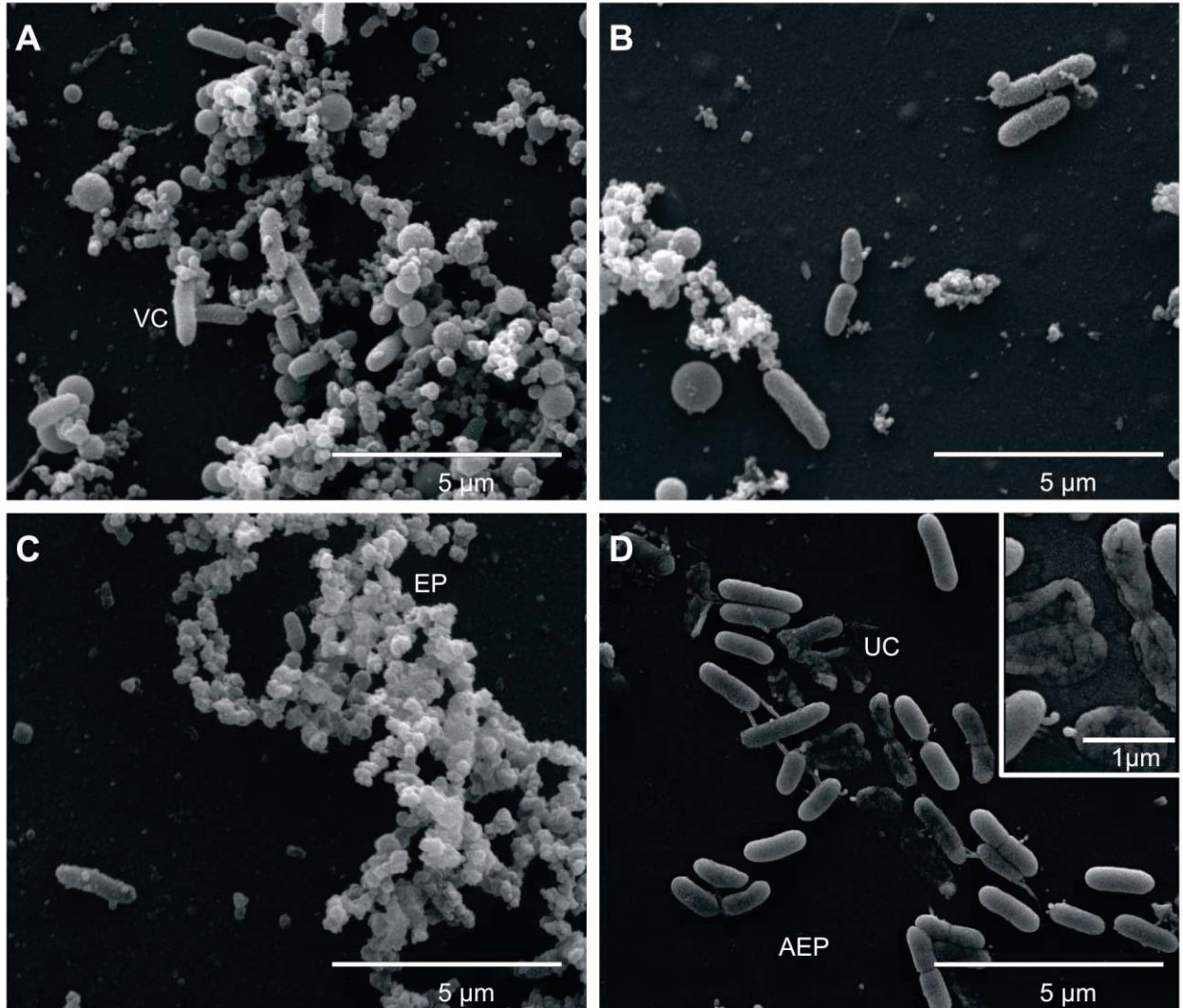


Figure 2

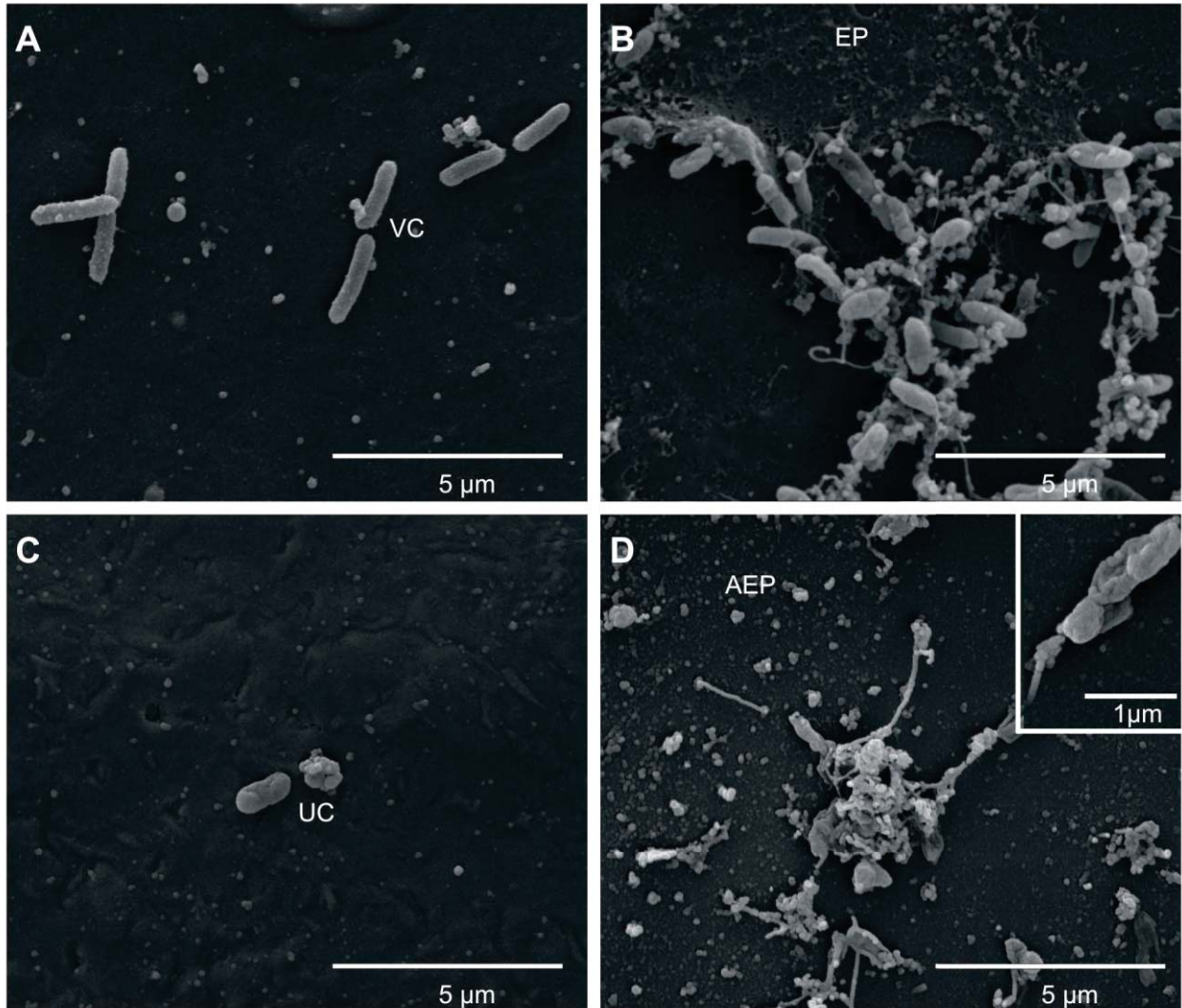


Figure 3

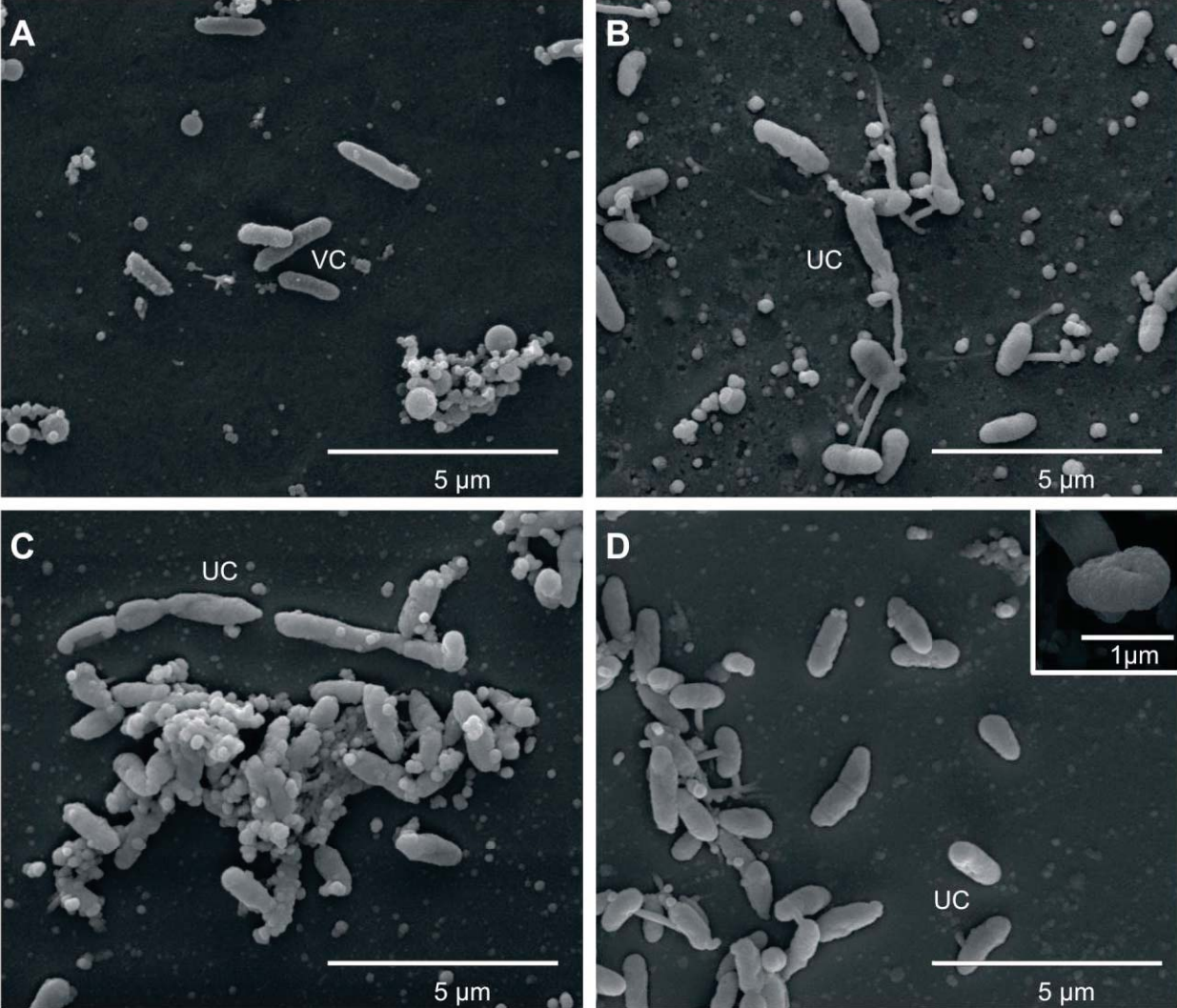


Figure 4

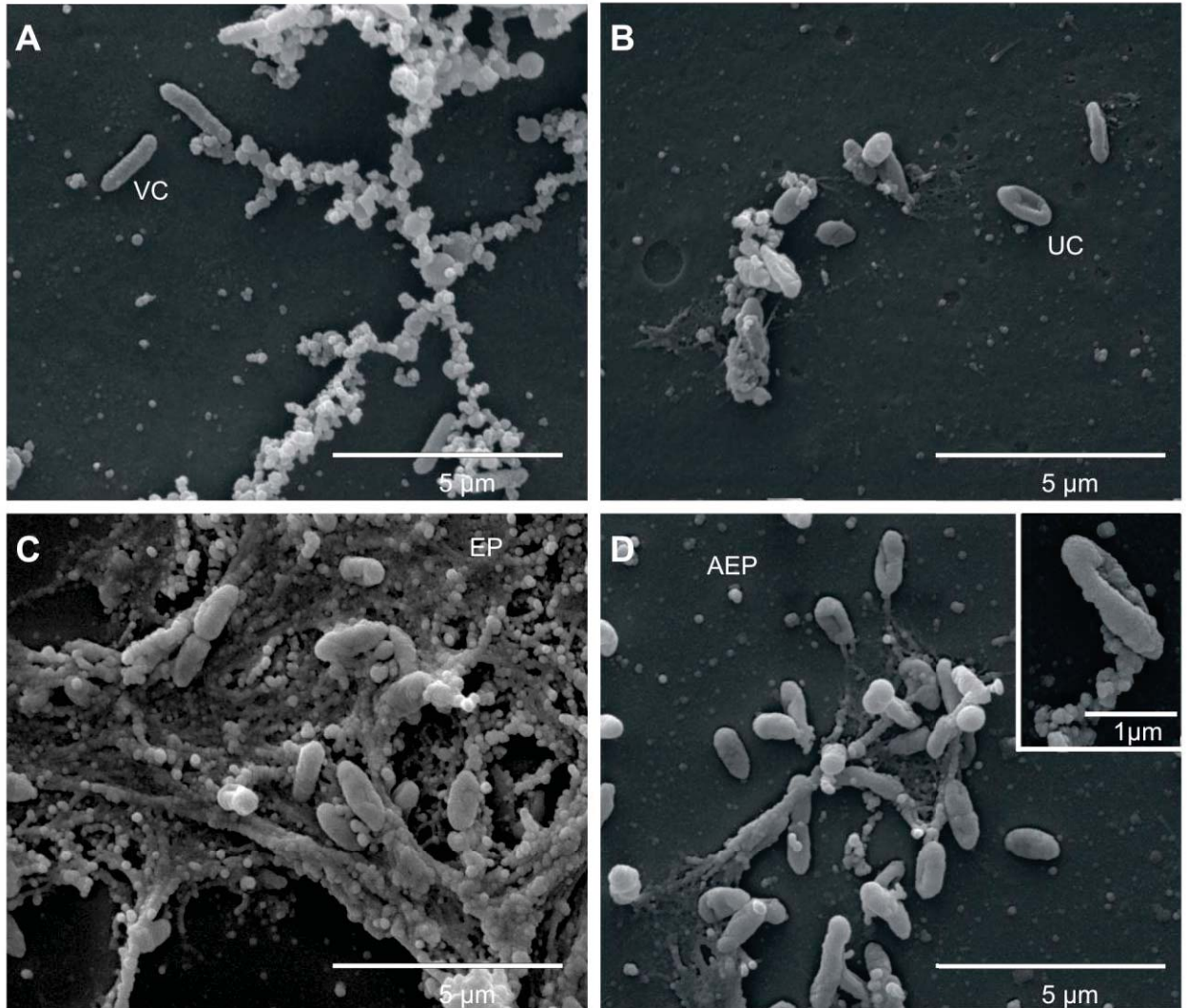


Figure 5

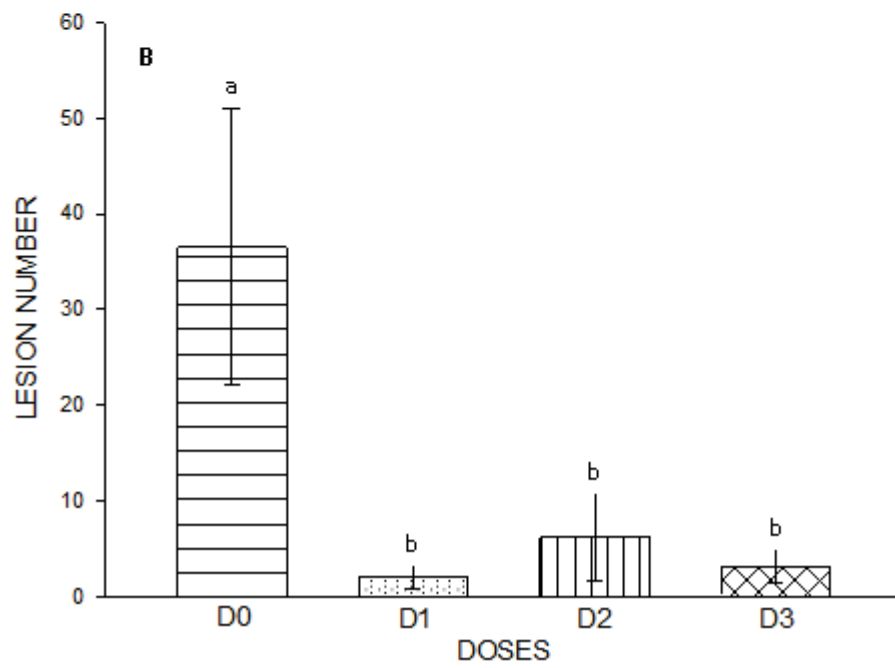
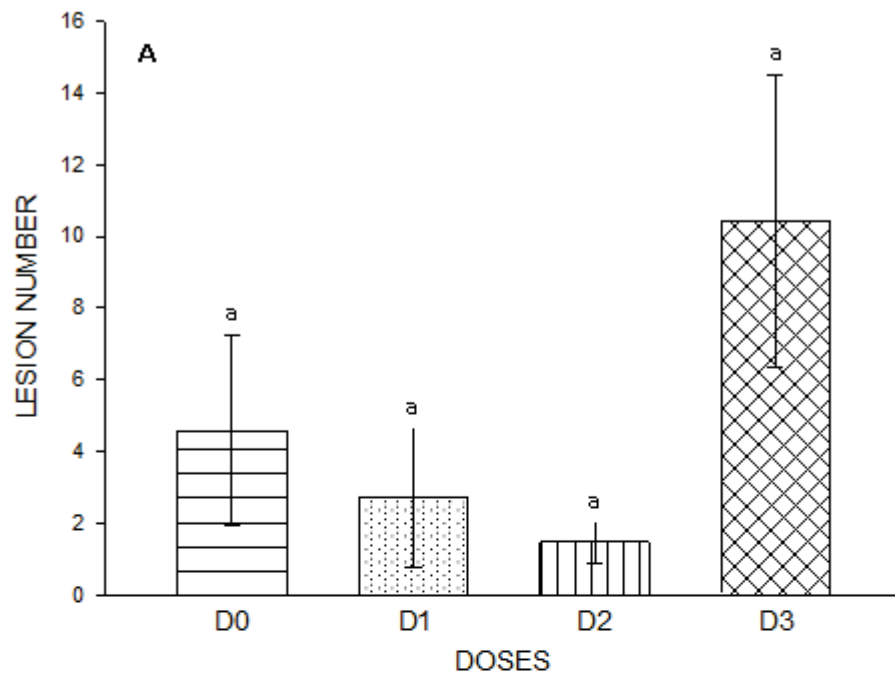


Figure 6

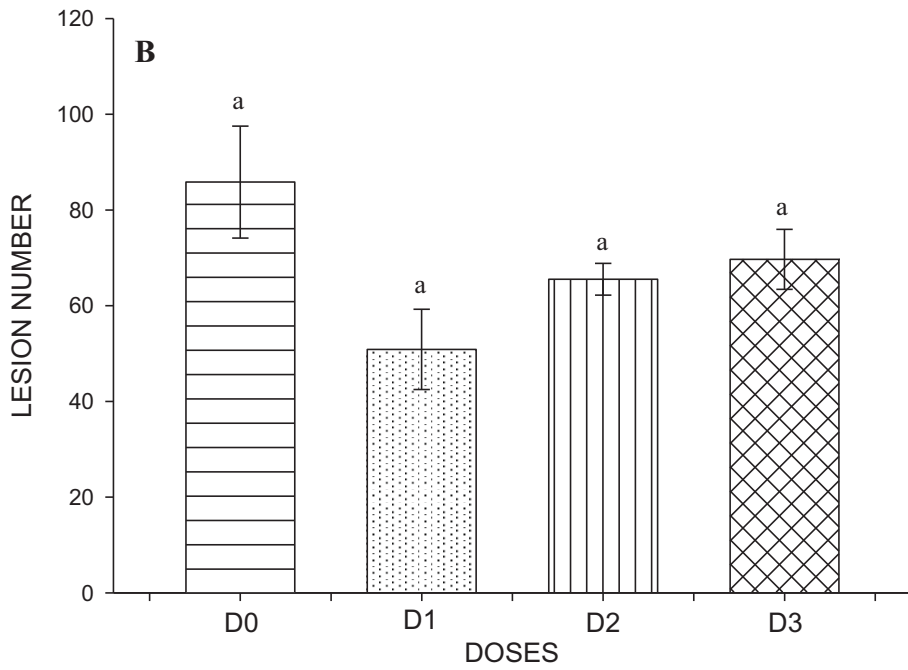
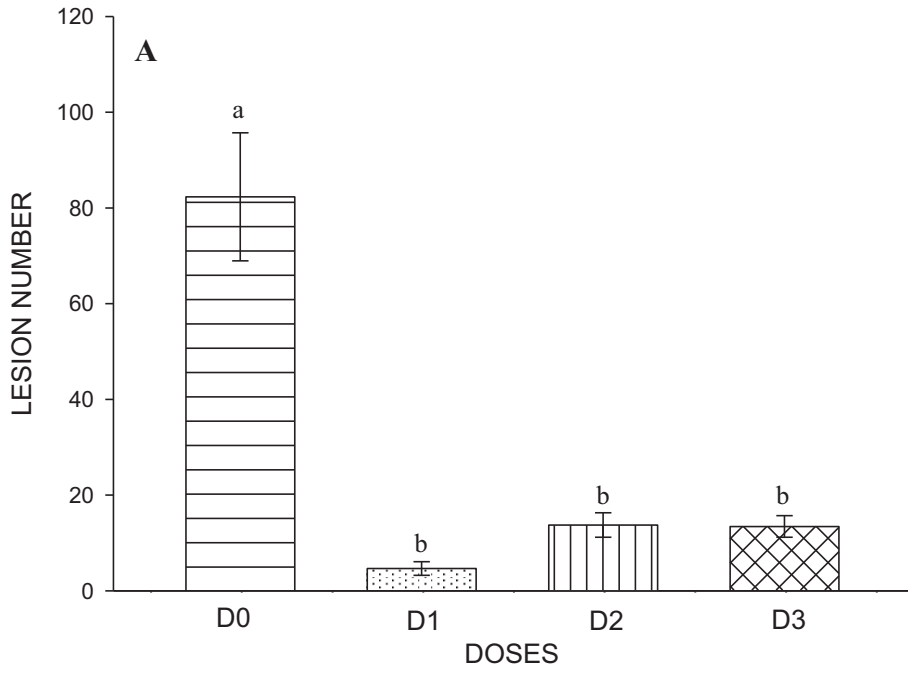


Figure 7

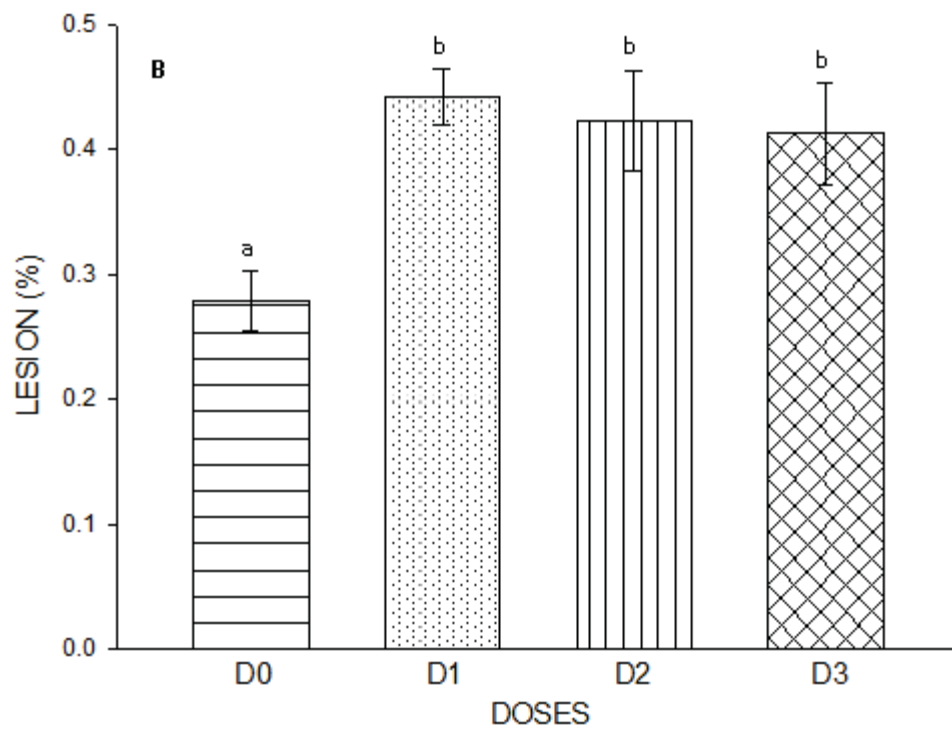
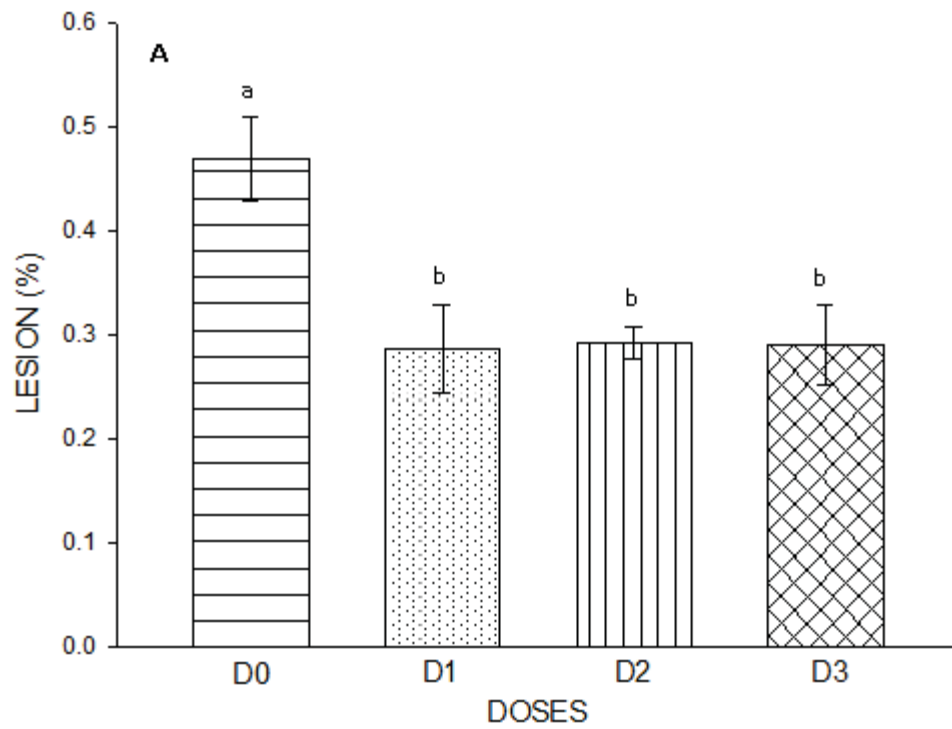


Figure 8

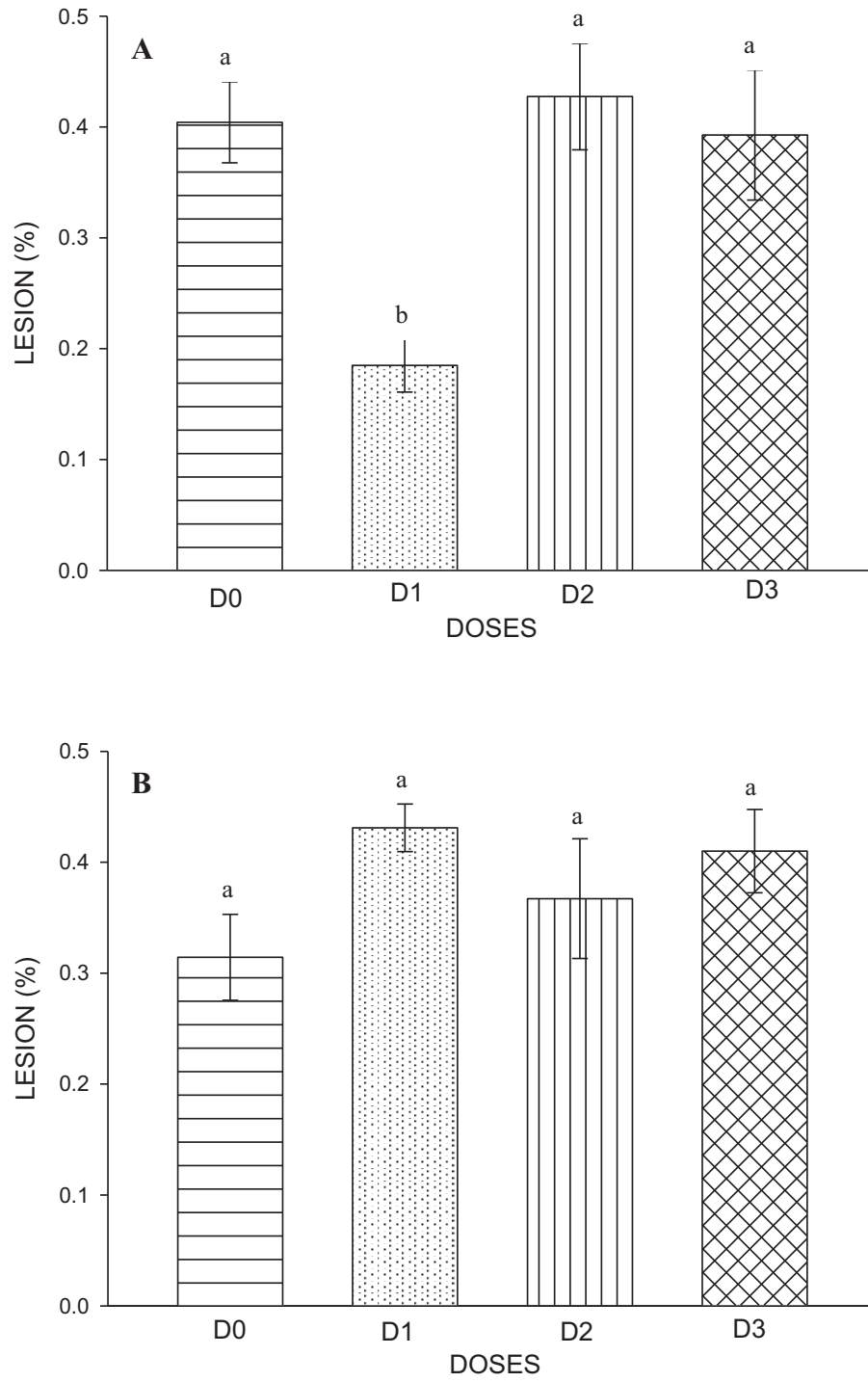


Figure 9

