



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADMILTON GONÇALVES DE OLIVEIRA JÚNIOR

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE
COMPOSTOS EXTRACELULARES BACTERIANO NO
CONTROLE DE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV.

CITRI CEPA 306

Londrina
2008

ADMILTON GONÇALVES DE OLIVEIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE
COMPOSTOS EXTRACELULARES BACTERIANO NO
CONTROLE DE XANTHOMONAS AXONOPODIS PV.
CITRI CEPA 306**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof.Dr. Galdino Andrade

Londrina
2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Prof. Dr. Martin Homechin

Londrina, 28 de fevereiro de 2008

DEDICATÓRIA

A Deus, pela luz que me ilumina, À minha família; a equipe do Laboratório de Ecologia Microbiana e a todos aqueles que de alguma forma me acompanharam no desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz que me guia.

Aos meus pais Admilton e Tereza pelo incentivo e apoio financeiro para a realização do curso.

A meu irmão William, minha cunhada Kátia e minha namorada, pela confiança, companheirismo, motivação ao longo de todo mestrado.

Aos meus familiares pelo apoio, em especial para o Tio João e Tia Vera, Tio Paulo e Tia Lucia, Tia Leidi.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade pela orientação, amizade, incentivo ao longo deste trabalho e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Nogueira pela amizade, brilhantismo estatístico e valiosas informações para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela amizade, ajuda constante na condução dos experimentos e por permitir a utilização de equipamentos de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Martin Homechin pelas valiosas sugestões, as quais foram muito importantes nos resultados dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Dubuc pela grande amizade, ensinamentos grandiosos, confiança, contudo, por sua pessoa.

À Coordenação do Mestrado em Microbiologia, por fornecer condições para a realização deste curso.

Ao técnico do laboratório, Márcio por estar sempre disposto a ajudar.

Aos companheiros de laboratório Ivana, Marina, Dáfila, Cícera, Cristiane, Luís Eduardo, Daniel, Laura, Kellen, Brasil, e em especial a Letícia pela ajuda nos experimentos e o Eik pelas fotos, e também por fazerem com que o mestrado fosse

não somente um período de aprimoramento profissional, mas também de crescimento pessoal.

Aos meus grandes amigos Gustavo, Pedro, Helber, Valdemir pelo incentivo e confiança desde a graduação.

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

OLIVEIRA JÚNIOR, Admilton Gonçalves. **Avaliação da atividade antibiótica de compostos extracelulares bacteriano no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cepa 306**. Londrina, 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina – UEL.

RESUMO

O Cancro cítrico causado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) é considerado um dos maiores problemas fitossanitários e econômicos para citricultura mundial. Atualmente, a forma mais utilizada de controle é a erradicação das plantas doentes e/ou pulverização com produtos a base de cobre. A obtenção de novos produtos para controle do cancro cítrico é necessária, uma vez que as formas atuais de controle não atuam efetivamente na doença e podem contaminar o ambiente pelo uso de metal pesado. A bactéria cepa LV (*Pseudomonas* sp) foi cultivada em caldo nutriente + $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 mg L⁻¹) por 15 dias (28 °C, 100 rpm) em seguida centrifugada (9.000 rpm, 20 min, 4°C), sendo o sobrenadante tratado com diclorometano por partição líquido-líquido, concentrado em rotavapor a 45°C, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. A fase diclorometano (FD) obtida, foi fracionada por cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando seis solventes com polaridade crescente. Foi testada a ação antibiótica da FD e das frações obtidas na CLV contra a *Xac* cepa 306 através da técnica de difusão em ágar, e determinada a concentração inibitória mínima em placas de cultura de 24 poços onde a FD e a fração F3 tiveram maior efeito antibiótico. As plantas foram tratadas com a FD e com a fração F3 que apresentou maior ação *in vitro*. Os resultados mostraram que ocorreu a diminuição da presença de lesão em cerca de 80% e 94% nas plantas tratadas com FD e F3 respectivamente. Estes resultados

indicam que o uso de substâncias com ação antibiótica pode ser uma excelente ferramenta para o controle da *Xac*.

Palavras-chave: Citricultura. Fitopatógeno. Cancro cítrico. Controle biológico. Antibiose. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

OLIVEIRA JÚNIOR, Admilton Gonçalves. **Evaluation of the antibiotic activity of extracellular bacterial compounds in the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306**. Londrina, 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina – UEL.

ABSTRACT

The disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) is a big problem for citriculture. Usually the control is made by cutted sick plants and/or treated with copper product. The challenge today is find the new product which is more effective to control canker citrus. The bacteria strain LV (*Pseudomonas* sp.) was cultured in nutrient broth plus $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 mg L⁻¹) for 15 days (28 °C, 100 rpm) followed of centrifugation (9,000 rpm ; 20 min ; 4°C), the supernatant was treated with dichloromethane in a liquid-liquid extraction, and concentrated with rotator evaporator at 45°C, freezed in a liquid nitrogen and lyophilized. The phase of dichloromethane (PD) was fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) using six organic solvents with crescent polarity. The antibiotic activity of FD and the fraction obtained from VLC was tested against *Xac* strain 306 using agar diffusion technique in a Petri dishes. Also the inhibitory minimum concentration was estimated in a cell culture plates with 24 wells. The results showed the FD and the fraction F3 were more effective to control the *Xac* 306 growth. In a greenhouse experiment plant was treated with FD and F3 fraction (high effective *in vitro* experiment). The results showed that the lesions formation was inhibited around 80% and 94% in plants treated with FD and F3 respectively. The data suggested that the use of antibiotic compounds produced by bacteria should be an excellent tool to control plant disease in this case the canker citrus.

Keywords: Citriculture. Phytopathogen. Citrus canker. Biological control. Antibiosis.

Xanthomonas axonopodis pv. *citri*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teste de sensibilidade da *Xac 306* ao cloreto de cobre

Tabela 2: Avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar da fase diclorometano (FD), fração hexano (F1), fração diclorometano (F2), fração acetato de etila (F3), fração metanol (F4), fração metanol e água (F5) e fração água (F6), frente à *Xac 306*.

Tabela 3: Determinação da concentração inibitória mínima da fase diclorometano (FD), fase diclorometano autoclavada a 121°C 20min-1 (FDT), fração hexano (F1), fração diclorometano (F2), fração acetato de etila (F3), fração metanol (F4), fração metanol e água (F5) e fração água (F6), frente à *Xac 306*.

LEGENDA DE FIGURAS

Figura 1: Regressão ($p < 0.05$, $n = 40$) dose-efeito da aplicação de três doses da fase diclorometano (D0 = água destilada, D1 = 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D2 = 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D3 = 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *Xac 306* em plantas de *C. sinensis* cv. Valência após 21 dias da aplicação. (A) Pré-tratamento. (B) Pós-tratamento.

Figura 2: Regressão ($p < 0.05$, $n = 50$) dose-efeito da aplicação de quatro doses da fração F3 obtida a partir do tratamento da fase FD com acetato de etila (D0=água destilada, D1=10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D2=1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D3=100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D4=10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *Xac 306* em plantas de *C. sinensis* cv. Valência após 21 dias de aplicação. (A) Pré-tratamento, (B) Pós-tratamento.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 Geral	2
2.2 Específicos	2
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Cancro Cítrico: Histórico e Importância	3
3.2 Etiologia	5
3.3 Ciclo da Doença	7
3.3.1 <i>Disseminação</i>	7
3.3.2 <i>Infecção</i>	8
3.3.3 <i>Colonização</i>	9
3.3.4 <i>Sobrevivência</i>	10
3.4 Controle do Cancro Cítrico	11
3.4.1 <i>Erradicação e Exclusão</i>	11
3.4.2 <i>Controle Químico</i>	12
3.4.3 <i>Controle Biológico</i>	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
ARTIGO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE COMPOSTOS EXTRACELULARES BACTERIANO NO CONTROLE DE XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. CITRI CEPA 306	25
RESUMO	26
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 <i>Cepas de bactérias</i>	28
2.2 <i>Produção e extração das substâncias antibióticas</i>	28
2.3 <i>Teste de sensibilidade da Xac 306 ao cloreto de cobre</i>	29
2.4 <i>Quantificação do resíduo de cobre remanescente na fase diclorometano</i>	29
2.5 <i>Purificação das substâncias antibióticas por cromatografia líquida a vácuo (CLV)</i>	29
2.6 <i>Avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar</i>	30
2.7 <i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e termoestabilidade da fase diclorometano</i>	30
2.8 <i>Avaliação da ação das substâncias antibióticas FD e F3 sobre a formação de lesão em folha</i>	31
2.9 <i>Efeito citotóxico das substâncias antibióticas FD e F3</i>	32
3 RESULTADOS	32

<i>3.1 Sensibilidade da Xac 306 a diferentes concentrações de cloreto de cobre</i>	32
<i>3.2 Análise de resíduo de cobre na fase diclorometano</i>	33
<i>3.3 Avaliação da ação antibiótica in vitro pelo método de difusão em ágar</i>	33
<i>3.4 Determinação da concentração inibitória mínima e termoestabilidade da fase diclorometano</i>	33
<i>3.5 Avaliação da ação das substâncias antibióticas FD e F3 sobre a formação de lesão em folha</i>	34
<i>3.6 Efeito citotóxico das substâncias antibióticas FD e F3</i>	34
4 DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÃO	37
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
Legenda das figuras	45

1 INTRODUÇÃO

O Cancro cítrico é considerado um dos maiores problemas fitossanitário para a citricultura em diversas partes do mundo. De um modo geral ela ocorre mais severamente em países ou regiões com clima mais quente e úmido. O mais antigo relato data de 1827 e 1831 com Fawcett e Jenkins, (1933) em folhas de *Citrus medica* provenientes da Índia, sendo descrita primeiramente por Hasse em 1915 nos EUA, Já no Brasil, os primeiros relatos ocorreram na década de 50.

Cinco tipos diferentes de cancro cítrico foram agrupados em função da sintomatologia apresentada e os diferentes hospedeiros afetados: A, B, C, D e E. O tipo A, ou cancro cítrico asiático, é o principal e mais severo tipo presente nos pomares, sendo causado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), bastonete aeróbio, Gram negativo, monotríquio.

Os sintomas constituem-se em lesões circulares, corticosas, salientes, de coloração amarronzada e aspecto eruptivo ocorrendo em folhas, frutos e ramos. A infecção pode ser de forma passiva, ganhando o interior dos tecidos de citros através de aberturas naturais, como os estômatos, por ferimentos causados mecanicamente ou pela atividade de insetos.

O estudo do efeito de diversas medidas para o controle e prevenção do cancro cítrico assume grande importância, tanto para áreas com culturas de citros onde a erradicação de plantas doentes não é a principal medida de controle, como no Estado do Paraná, quanto para regiões aonde a prática de erradicação vem sendo adotada como principal medida para eliminar a doença, como no Estado de São Paulo.

Tendo em vista a grande importância que o cancro cítrico assume na citricultura mundial e o problema da rápida disseminação da bactéria nos pomares, a

busca por novas medidas de controle é uma alternativa necessária, uma vez que, as formas atuais de controle não atuam efetivamente na doença e podem contaminar o meio ambiente pelo uso de metal pesado. Medidas isoladas não têm demonstrado eficiência para prevenir a introdução e o estabelecimento da fitopatologia em novas áreas até mesmo a sua erradicação total em várias regiões. No entanto, antes de estas medidas serem efetivamente adotadas, é fundamental que a eficácia no controle de níveis de infecção nos pomares e o seu efeito na produção das plantas sejam consistentemente estudados.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Obtenção de metabólitos secundários com propriedades antibióticas produzidos pela cepa LV (*Pseudomonas* sp) para o controle do cancro cítrico causado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cepa 306.

2.2 Específicos:

- a) Produzir substâncias extracelulares bacterianas com ação antibiótica durante o crescimento da cepa LV;
- b) Fracionar a fase orgânica em cromatografia líquida a vácuo;
- c) Avaliar a termoestabilidade da fase orgânica;
- d) Avaliar a ação antibiótica e determinar a concentração inibitória mínima *in vitro* da fase orgânica e suas frações;
- e) Determinar a citotoxicidade das substâncias com ação antibiótica;

f) Avaliar a ação antibiótica da fase orgânica e a melhor fração na incidência de lesões foliar do cancro cítrico em condição de casa de vegetação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cancro Cítrico: Histórico e Importância

A produção e exportação de citros no Brasil garantiram o primeiro lugar no ranking mundial, tendo como principal concorrente os EUA (FAO, 2006). O Brasil produz quase a metade do suco de laranja consumido no mundo, que responde anualmente por mais de um bilhão de dólares nas exportações brasileiras. Entretanto, esta posição vem sendo constantemente ameaçada pelo grave problema fitossanitário que representa o cancro cítrico para a produção nacional, aumentando os custos, desestimulando o citricultor e causando problemas na exportação devido a barreiras fitossanitárias que muitas vezes são impostas por países concorrentes. Entre 1997 e 2000, quase quatro milhões de árvores e mudas foram erradicadas devido ao cancro cítrico, gerando um prejuízo acumulado de aproximadamente R\$ 300 milhões (Bernardo Esteves, 2001).

O cancro cítrico é originário do sudoeste da Ásia, mesmo centro de origem dos citros, as primeiras indicações de sua existência datam dos anos entre 1827 e 1831 em folhas herbarizadas de *Citrus medica* provenientes da Índia (Bitancourt, 1957). A partir daí, esta doença tem se disseminado pelo mundo, principalmente pela importação de material vegetativo contaminado, propagando-se para várias regiões do planeta tais como Oceania, África, América do Sul e do Norte (Koizumi, 1985; Leite Junior e Moham; 1990; Feichtenberger, 1997). A erradicação do cancro

cítrico é mérito de poucos países tais como a África do Sul e Nova Zelândia (Koizumi, 1985).

Nos EUA, apesar do cancro cítrico ter sido considerado erradicado na década de 40 (Dopson, 1964), por volta de 1984 novos focos foram encontrados, levando à eliminação de milhões de plantas o que representou em um prejuízo acumulado de aproximadamente 100 milhões de dólares. Hoje, apesar dos esforços, a Flórida ainda possui focos da doença devido à disseminação da bactéria, principalmente em pomares residenciais. No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez no município de Presidente Prudente - SP em 1957 (Bitancourt, 1957), dando assim início a várias medidas de controle com o objetivo de evitar a disseminação da doença. No entanto, o agente causal do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac)) foi disseminada para vários estados brasileiros, como Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e Roraima (Feichtenberger et al., 1997; Leite Junior e Moham, 1990; Nascimento et al., 2003).

Com o objetivo de conter e eliminar focos da doença em território brasileiro foi criada a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC), conforme Decreto nº 70.601 de 09/12/1974. No início, o processo de erradicação envolvia o mapeamento e avaliação de todas as plantas cítricas das zonas rural e urbana. Uma vez constatada a doença por engenheiros agrônomos da CANECC, a propriedade podia sofrer interdição total.

A erradicação em si se dava através da eliminação das plantas infectadas e as suspeitas em um raio de 50 metros a partir do foco inicial. Para viveiros de mudas, todas as mudas deveriam ser eliminadas incluindo as sadias além das mudas de outros viveiros em um raio de até 200 metros. A eliminação podia ser

através do uso de herbicidas, ou a forma mais indicada, através da queima das plantas depois de arrancadas *in loco* (Rosetti, 1977; Leite Junior e Monhan, 1990). Com o passar do tempo, discussão entre entidades governamentais, produtores e pesquisadores fizeram com que limites impostos pela CANECC fossem modificados.

A partir do ano de 1996, com a introdução da lagarta minadora do citros, *Phyllocnistis citrella*, mudou as características epidemiológicas do patossistema em vigência, citros-*Xanthomonas* para citros-*Xanthomonas-Phyllocnistis* (Bergamin Filho et al., 2001), ocasionando um aumento na incidência do cancro cítrico e novas mudanças nas legislações, a fim de diminuir ou até mesmo eliminar os focos da bactéria.

O recente seqüenciamento completo do genoma da bactéria *Xac* cepa 306 permitiu evidenciar a considerável versatilidade bioquímica e uma série de mecanismos que esse organismo utiliza para a sua sobrevivência e para a infecção da planta hospedeira (Da Silva et al., 2002). Aspectos como, produção de compostos potencialmente capazes de aumentar a capacidade da bactéria em causar danos à planta, proteínas que atenuam o efeito de antibióticos, proteínas que destroem as células do interior da folha, permitirá abrir novas linhas de pesquisa para combater o cancro cítrico.

3.2 Etiologia

A taxonomia do agente causal do cancro cítrico vem sendo constantemente revisada, com isso, propostas de reclassificação tem sido feitas por alguns pesquisadores (Shaad et al., 2000, 2005; Brunings e Gabriel, 2003). Em virtude disto, adotamos no presente trabalho a seguinte classificação aceita na literatura

mundial, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) (Vauterin et al., 1995). A Xac (Bactéria, Proteobacteria, Subdivisão Gamma, Xanthomadales), é um bastonete estritamente aeróbio apresentando reação Gram-negativa, motilidade por flagelo polar (monotríquio), colônias com pigmentação amarela e um aspecto viscoso devido à produção de exopolissacarídeos.

A Xac cresce na maioria dos meios utilizados em laboratório e é facilmente isolada de tecido vegetal infectado. Colônias são visíveis após 24 e 72 horas de incubação a uma temperatura de 28 °C (Brunnings e Gabriel; 2003). As condições ideais para o crescimento da Xac são umidade elevada e temperatura entre 20 e 30 °C.

Cinco tipos ou patovares de cancro cítrico foram agrupados em A, B, C, D e E, com base na sintomatologia apresentada e nos diferentes hospedeiros afetados. O cancro cítrico asiático (cancrose A), causado pela cepa asiática *X. axonopodis* pv. *citri*, é a forma mais severa da doença. Afeta várias espécies da família Rutácea e encontram-se disseminado na Ásia, África, América e Oceania. A Cancrose B, causada pela cepa B de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, com maior importância em limões verdadeiros (*Citrus limon*) e lima ácida “Galego” (*Citrus aurantifolia*), sendo encontrada na Argentina, Paraguai e Uruguai. A Cancrose C, causada pela cepa C da *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, foi isolada em 1970 de lima mexicana no Estado de São Paulo, mas é raramente encontrada desde então. A cancrose D, causada pela cepa D de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*, o único hospedeiro natural conhecido dessa bactéria é o limão Galego (*Citrus aurantifolia*) (Leite Junior e Moham, 1990).

Outras formas da bactéria do cancro cítrico têm sido relatadas, como os isolados descobertos em Omã, Arábia Saudita, Irã e Índia que produzem lesões

como a canrose A somente em lima mexicana, mas aparentam ser distintas da cepa A (Vernière et al., 1998; Mohammadi et al., 2001).

Os cultivares cítricos são classificados quanto à variabilidade nos níveis de resistência ao cancro cítrico, sendo considerado com resistente a altamente suscetíveis, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de algumas cultivares cítricos quanto a níveis de resistência ao cancro cítrico

Nível de resistência	Cultivares cítricos	
	Nome popular	Nome científico
Altamente Resistentes	Calamondin	<i>C. mitis</i>
	Laranjinha Kinkan	<i>Fortunella spp</i>
Resistentes	Laranja Doce, Moro	<i>C. sinensis</i>
	Tangerina Pokan, Tankan	<i>C. reticulata</i>
Moderadamente resistente	Laranja Doce, Pêra, Valencia	<i>C. sinensis</i>
	Tangerina Dancy	<i>C. reticulata</i>
Moderadamente suscetíveis	Laranja Doce, Natal	<i>C. sinensis</i>
	Tangerina Cravo, King, Romana	<i>C. reticulata</i>
Suscetíveis	Laranja Doce, Bahia, Ruby e Hamlin	<i>C. sinensis</i>
Altamente suscetíveis	Limão verdadeiro	<i>C. limon</i>
	Lima ácida Galego	<i>C. aurantifolia</i>
	Tangerina Lee	<i>C. reticulata</i>
	Grapefruit	<i>C. paradisi</i>

*Adaptado de Gottwald et al., (2002) e Shubert e Sun, (2003).

3.3 Ciclo da Doença

3.3.1 Disseminação

A disseminação da bactéria se dá principalmente através de três fatores essenciais à dispersão da doença: altas temperaturas, umidade elevada acompanhada de ventos fortes e novas brotações nos pomares.

As precipitações elevadas e aumento da temperatura no início da estação de maior fluxo de crescimento são fatores favoráveis ao desenvolvimento epidêmico de cancro cítrico. Isso provavelmente está relacionado ao fato de que em condições de alta umidade as lesões de cancro exsudam mais células bacterianas na superfície afetada (Leite Junior et al., 1987). Além disso, as células bacterianas são mantidas ativas por mais tempo quando a umidade do ar é elevada, aumentando com isso a viabilidade e conseqüentemente a amplitude de dispersão do inóculo (Koizumi et al., 1996).

Em precipitações acompanhadas de fortes ventos, um filme de água é formado desde o filoplano até as células do mesófilo, passando por entre as células estomáticas. Nesta condição, lesões novas exsudam células bacterianas imediatamente, chegando a liberar de 10^4 a 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Em lesões mais velhas e suberizadas, a liberação da *Xac* ocorre mais lentamente.

3.3.2 Infecção

A *Xac* tem capacidade de infectar folhas, ramos e frutos. A penetração e infecção se dão através de aberturas naturais (principalmente estômatos), ou por ação mecânica com ferimentos causados por espinhos, grão de areia, pelo homem ou por insetos (Fundecitrus, 2006). As faces abaxiais das folhas são mais suscetíveis que as faces adaxiais, em razão da maior densidade de estômatos presentes (Grahm et al., 1992).

Fatores climáticos como temperatura e umidade exercem importante papel no sucesso da infecção. A duração do molhamento e o próprio filme de água sobre a folha influenciam na capacidade da bactéria ganhar a câmara sub-estomática ou um

ferimento. Nas folhas, o período de expansão foliar é mais suscetível a infecção da bactéria *Xac* do que aquele posterior à maturação. Já em frutos, o período de suscetibilidade ocorre entre 60 a 90 dias após a sua formação.

3.3.3 Colonização

Uma vez no interior do tecido de citros, a colonização por *Xac* restringe-se ao sítio de infecção. No início da colonização, as células da *Xac* multiplicam-se no espaço intercelular envolvidas por matriz de polissacarídeos extracelular. As primeiras lesões salientes começam aparecer após 7 a 10 dias, formadas por hipertrofia e hiperplasia de células do mesofilo foliar.

As lesões apresentam coloração amarelada no início de sua formação e vão se tornando de cor marrom e corticosa ao longo do tempo, ao redor das lesões podem-se formar halos cloróticos e/ou halos aquosos. Quando ocorre uma infecção via estômato, a lesão se torna mais rapidamente visível em ambas as faces da folha (Figura 1A, B e C).

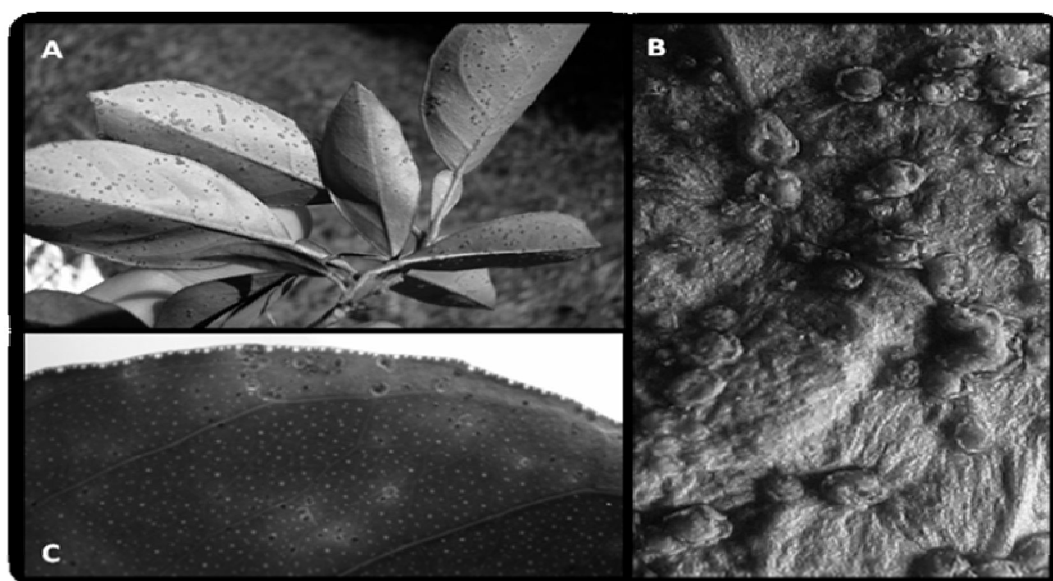


Figura 1. Lesões de cancro cítrico causadas por *Xac* 306 em folhas de *C. sinensis*, aumento de 1X (A), 3X (B), 1X (C).

A multiplicação da *Xac* no sítio de colonização ocorre somente durante a fase de expansão da lesão, com isso, a população de bactéria produzida por lesão esta fortemente relacionada ao tamanho da lesão (Grahm et al., 1992).

3.3.4 Sobrevivência

A sobrevivência de *Xac* no ambiente pode chegar até seis meses em órgãos infectados, mesmo após a queda dos mesmos. Em ambiente aberto, a sobrevivência da bactéria pode chegar por volta de 15 dias em solo e por volta de 62 dias tanto no filoplano quanto em rizoplano de algumas gramíneas

A produção de exopolissacarídeo pelas bactérias exsudadas na superfície das lesões possui um importante papel na dispersão e sobrevivência no ambiente (Goto e Hyodo, 1985). A persistência da *Xac* por várias semanas em material de plantas não hospedeiras e na zona de raízes de algumas gramíneas embaixo de árvores doentes foi observado no Japão e no Brasil (Goto et al., 1975; Pereira et al., 1978).

Em casos de folhas e frutos em decomposição caídos no chão, à população de bactéria declina para um nível não detectável em 1-2 meses por sofrer interferência de bactérias antagonistas e competição com organismos saprofíticos (Graham et al., 1989). Em materiais como metal, plástico, tecido ou madeira, a *Xac* possui um período de sobrevivência relativamente curto, podendo chegar até 72 horas (Graham et al., 2000).

3.4 Controle do Cancro Cítrico

3.4.1 Erradicação e Exclusão

Diversas medidas de controle vêm sendo utilizadas a fim de reduzir os prejuízos causados pelo cancro cítrico. Dentre elas destacamos medidas de caráter curativo como a erradicação das plantas doentes que causa um grande prejuízo ao produtor (Leite Junior e Moham, 1990) e o tratamento químico com pulverização das plantas infectadas com produtos a base de cobre que pode contaminar o ambiente por ser um metal pesado (Koizumi, 1985; Leite Junior e Mohan, 1990), e as medidas de caráter preventivo: (1) localização de viveiros em locais livres de cancro cítrico, (2) pomares manejados para prevenir ou reduzir o risco de epidemias de cancro cítrico através do estabelecimento de quebra-ventos, (3) construção de cercas para restringir o acesso aos pomares; (4) pulverização de desinfetantes sobre a maquinaria, equipamentos de colheita dos pomares e trabalhadores, bem como a desinfecção de suas roupas e calçados; e (5) frutas frescas para comércio interno e exportação são sujeitas a uma inspeção rigorosa para garantir a isenção dos sintomas do cancro cítrico em frutas em pomares e tratamentos sanitários nas câmaras de armazenagem de frutos.

Inicialmente, essas medidas foram consideradas para todas as plantas cítricas doentes ou não. Posteriormente, com o estabelecimento de modificações dos critérios de erradicação, somente as plantas doentes e aquelas adjacentes num raio de até 30 metros passaram a ser eliminadas.

A utilização de quebra-ventos é uma das práticas eficientes para a prevenção e controle do cancro cítrico. Esta medida cultural de controle promove a redução da ação direta das correntes de ar sobre o pomar, proporcionando condições menos favoráveis para a disseminação e penetração da bactéria no

tecido hospedeiro. Por conseqüência, promove a redução de ferimentos nos tecidos da planta, causados pelo vento e abrasão de aerossóis, que servem de porta de entrada para bactérias (Leite Junior e Mohan, 1990). Além disso, áreas protegidas por quebra-ventos perdem menor quantidade de água, devido à redução da evapotranspiração e, conseqüentemente, favorecer ao aumento da produtividade dos pomares.

O quebra-vento arbóreo não deve ser uma barreira compacta. Estes devem estar dispostos perpendicularmente à direção dominante do vento ou em sistemas de compartimentação, em áreas onde não ocorra direção predominante de incidência do vento. A distância entre as linhas de quebra-ventos depende da topografia do terreno e da espécie arbórea utilizada.

As espécies utilizadas como quebra-ventos devem ter como características, menor competição com as plantas cítricas, crescimento rápido e uniforme, copa densa, resistência a pragas e doenças e não serem hospedeiras de patógenos que afetam a cultura. Entre as espécies mais recomendadas estão: a casuarina (*Casuarina equisetifolia* e *C. cunninghamiana*), a grevilha (*Grevillea robusta*), a leucena (*Leucaena leucocephala*), o pinus (*Pinus spp.*), o sansão-do-campo (*Mimosa caesalpiniiifolia*), o jambolão (*Eugenia spp.*) e o eucalipto (*Eucalyptus spp.*) (Leite Junior e Mohan, 1990).

3.4.2 Controle Químico

O uso de produtos à base de cobre como forma de controle do cancro é feito em todos os países produtores de citros (Koizumi, 1985; Leite Junior e Mohan, 1990). O cobre reduz a população bacteriana na superfície das folhas e aplicações múltiplas são necessárias para alcançar um controle adequado em hospedeiros

susceptíveis (Stall et al., 1980). A pulverização à base de cobre é efetiva por um período de duas a quatro semanas quando as taxas de formação e crescimento das folhas se igualam (Graham et al., 1992; Stall et al., 1982). Os frutos são susceptíveis conforme vão crescendo de 2-6 mm de diâmetro por um período de 60-120 dias, dependendo da espécie de citros. A eficiência das pulverizações com cobre depende do seu contato com a bactéria na superfície da folha. Por isso a ocorrência de chuvas com ventos pode comprometer a eficiência desses programas de controle, visto que nesses casos as bactérias são introduzidas diretamente nos estômatos.

Devido ao uso contínuo de produtos à base de cobre pode ocorrer o aparecimento de cepas de *Xac* resistentes ao produto, o que compromete a eficiência do controle (Rinaldi e Leite Junior, 2000). Além disso, o acúmulo do metal no solo pode contaminar as plantas, o solo e o meio ambiente (Alva et al., 1995).

Íons cobre são requeridos para a síntese de metaloproteínas que são, na sua grande maioria, oxigenases e proteínas transportadoras de elétrons. Ao mesmo tempo em que as bactérias utilizam cobre em baixas concentrações, elas precisam desenvolver um mecanismo de regulação bem apurado, pois altos níveis de cobre podem ser tóxicos para as células.

3.4.3 Controle Biológico

As exigências dos consumidores por produtos agrícolas livres de resíduos tóxicos e por uma agricultura mais cuidadosa como o meio ambiente, ao longo dos anos, tem feito os agricultores buscarem tecnologia cada dia mais limpa para a produção de alimentos. A pressão do mercado tem forçado os governos a estabelecerem novas políticas públicas quanto à utilização de agrotóxicos no

controle de fitopatologias (Gullino e Kujipers, 1994; Ragsdale e Sisler, 1994). Desta forma, todos os seguimentos envolvidos na cadeia produtiva de produtos agrícolas estão envolvidos na busca de produtos fitossanitários menos tóxicos para os consumidores e ao meio ambiente (Punja e Utkhede, 2003).

Mesmo sendo eficaz no controle dos agentes causais, o controle de fitopatógenos através da utilização de produtos químicos pode apresentar efeitos colaterais ao hospedeiro ou níveis de contaminação na cadeia trófica nem sempre aceitáveis. Estas substâncias, em alguns casos, podem apresentar níveis de toxidez elevados, devido ao acúmulo na cadeia trófica causando doenças muitas vezes graves como o câncer (Lima et al. 2000).

A procura de microrganismos com potencial de uso como agente de controle biológico, ou a obtenção de moléculas com ação antimicrobiana produzidas por estes microrganismos, é uma das alternativas para o controle de fitopatógenos.

Após a descoberta inicial, o isolamento de agentes de controle biológico da fase laboratorial até a obtenção do produto comercial é uma tarefa difícil. Sendo necessário obter informações com relação à eficácia, modo de ação do agente, a sobrevivência, colonização e potencial de toxicidade para espécies não alvo. Além disso, estudo com relação à formulação, estabilidade e vida de prateleira também são necessários (Lumsden, 1996; Mathre et al., 1999; Harmam, 2000).

No Brasil, centros de pesquisas, universidades e indústrias vêm realizando estudos para desenvolver novos produtos biológicos que poderiam ser utilizados no controle de doenças e pragas. Nos programas de controle biológico de fitopatógenos, está incluída a prática de manejo favorecendo antagonistas nativos e adição de microrganismos previamente estudados (Melo, 1998).

O sucesso nos programas está relacionado com as propriedades antagônicas e mecanismo de ação do organismo como, por exemplo, a inibição de fitopatógenos por meio da competição por nutrientes, oxigênio e espaço, parasitismo direto ou produção de metabólitos secundários que degradam a parede celular como enzimas líticas e biosurfactantes. Além disso, várias espécies de bactérias, principalmente *Pseudomonas* e *Streptomyces*, produzem vários tipos de antibióticos, os quais podem ser utilizados também pela indústria farmacêutica (Gomes et al., 2000).

Muitos pesquisadores vêm trabalhando na área de biocontrole, entretanto, poucos produtos biológicos foram introduzidos no mercado. O sucesso do controle biológico em condições de campo está relacionado ao melhor entendimento sobre a ecologia dos agentes antagonistas e do patógeno. É necessário o conhecimento sobre espectro de ação, produção de antibióticos, resistência a fatores ambientais estressantes e instabilidade genética dos agentes de biocontrole (Melo, 1998).

O controle biológico possui diferentes mecanismos de interação entre os microrganismos patogênicos e antagônicos: (1) antibiose: interação onde um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem ação danosa sobre outro; (2) competição: ocorre quando dois ou mais organismos concorrem entre si, principalmente por nutrientes, oxigênio e espaço; (3) parasitismo: quando um microorganismo vive sobre e/ou alimenta-se de outro; (4) predação: situação onde um microorganismo obtém seus nutrientes a partir do patógeno; (5) hipovirulência: diz respeito à introdução de uma linhagem menos agressiva ou não patogênica comparada ao patógeno, a qual pode, ainda que raramente, transmitir esta característica às linhagens patogênicas; (6) indução de defesa do hospedeiro: ação

direcionada ao hospedeiro por meio dos próprios organismos ou seus metabólitos (Baker 1985; Bettiol e Ghini 1995).

As substâncias eliminadas pelas bactérias na competição por um nicho podem ser metabólitos secundários com ação antibiótica que em meio de crescimento, começam a ser produzidos no fim da fase de crescimento exponencial. Esses produtos não são essenciais para o crescimento e reprodução dos microrganismos que os produzem. No entanto, em termos competitivos, os microrganismos produtores de antibióticos são favorecidos em relação aos não produtores. Esses tipos de substâncias químicas matam ou inibem o crescimento de outras espécies microbianas, mesmo em pequenas quantidades.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVA, A. K., GRAHAM, J. H., ANDERSON, C. A. 1995. Soil pH and copper effects on young 'Hamlin' orange trees. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 59, p. 481-487.

BAKER, C. J., STAVELY, J. R., MOCK, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Disease*, 69, p. 770-772.

BERGAMIN FILHO, A., GOTTWALD, T. R., LARANJEIRA, F. F. 2001. 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.

BETTIOL, W., GHINI, R. 1995. Controle Biológico. In: Bergamin Filho, A., Kimati H. e Amorin, L. eds. Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 717-728,

BITANCOURT, A. A. 1957. O cancro cítrico. O Biológico 23: 101-111.

BRAITHWAIT, M., LEITE Jr, R. P. SMITH, J. J., BOA, E., SADDLER, G. S. 2002. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolívia. Plant Pathology, 51, p. 383.

BRUNINGS, A.M., and GABRIEL, D.W. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Molecular Plant Pathology, 4: 141-157.

DA SILVA, A.C.R., FERRO, J. A., REINACH, F. C., FARAH, C. S., FURLAN, L. R., QUAGGIO, R. B., MONTEIRO-VITORELLO, C. B., VAN SLUYS, M. A., ALMEIDA, N. F., ALVES, L. M. C., AMARAL, A. M., BERTOLINI, M. C., CAMARGO, L. E. A., CAMAROTTE, G., CANNAVAN, F., CARDOZO, J., CHAMBERGO, F., CLAPINA, L.P., CICARELLI, R. M. B., COUTINHO, L.L., CURSINO-SANTOS, J. R., EL-DORRY, H., FARIA, J. B., FERREIRA, A. J. S., FERRERIA, R. C. C., FERRO, M. I. T., FORMIGHIERI, E. F., FRANCO, M. C., GREGGIO, C. C., GRUBER, A., KATSUYAMA, A. M., KISHI, L.T., LEITE R. P. JR., LEMOS, E. G. M., LEMOS, M.V. F., LOCALI, E. C., MACHADO, M.A., MADEIRA, A. M. B. N., MARTINEZ-ROSSI, N. M., MARTINS, E. C., MEIDANIS, J., MENCK, C. F. M., MIYAKI, C. Y., MOON, D. H., MOREIRA, L. M., NOVO, M. T. M., OKURA, V. K., OLIVEIRA, M. C., OLIVEIRA, V. R., PEREIRA, H. A., ROSSI, A., SENA, J. A. D., SILVA, C.,

SOUZA, R. F., SPINOLA, L. A. F., TAKITA, M. A., TAMURA, R. E., TEIXEIRA, E. C., TEZZA, R. I. D., SANTOS, M. T., TRUFFI, D., TSAI, S. M., WHITE, F. F., SETÚBAL, J. C., KITAJIMA, J. P. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with different host specificities. *Nature* 417, 459-463.

DOPSON, R. N. 1964. The eradication of citrus canker. *Plant Disease Reporter*, v. 48, p.30-31.

ESTEVES, B. Brasil decifra genoma de novo fitopatógeno. *Ciência Hoje*. 2001.

Disponível em: <http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/2697>.

Acesso em: 20/11/2007

FAO., 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Citrus: statistics fruit fresh and processed annual. Capturado em 10 fevereiro 2008. on line. Disponível em: <http://www.fao.org>.

FAWCETT, H. S.; JENKINS, A. E. 1933. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus citrus in England and the United States. *Phytopathology*. St. Paul, v. 23, p. 820-824.

FEICHTENBERGER, E. 1997. Manejo ecológico das principais doenças fúngicas e bacterianas dos citros no Brasil. Anais do Quinto Seminário Internacional de Citros – Tratos Culturais. Bebedouro: Fundação Cargil, p. 23-65.

FUNDECITRUS. Cancro Cítrico. <http://www.fundecitrus.com.br/cancro.html> (Janeiro. 2008).

GOMES, R. C., SÊMEDO, L. T. A. S, SOARES, R. M. A., LINHARES, R. F., ULHOA, C. J., ALVIANO, C. S., COELHO, R. R. R. 2000. Purification of the most stable endochitinase from *Streptomyces* RC 1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 90, p. 653-661.

GOTO, M., HYODO, H. 1985. Role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 51, p. 22-31.

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

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SHUBERT, T.S. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, St. Paul. DOI: 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.

GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., CIVEROLO, E. L., McGUIRE, R. G. 1989. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Disease*, 73, p. 423-427.

- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. 1992. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology*, v. 82, n. 11, p. 1319-1325.
- GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., RILEY, T. D., CUBERO, J., DROUILLARD, D. 2000. L. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker. Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop, Ft. Pierce, Florida. <http://doacs.state.fl.us/canker>.
- GULLINO, M. L., KUIJPERS, L. A. M. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides Europe. *Annual Review of Phytopathology*, 32, p. 559-579.
- HARMAN, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84, p. 377-393.
- HASSE, C. H. 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. *Journal of the Agricultural Research*, 4: 96-100.
- KOIZUMI, M. 1985. Citrus canker: The World Situation. In: *Citrus Canker: an International Perspective*, p. 2-7. Lake Alfred, FL: Citrus Research & Education Center, University of Florida.

- KOIZUMI, S., KIJIMA, E., TSUKAMOTO, T., TOGAWA, M., MASUI, S. 1996. Dispersal of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. In: International Citrus Congress, 1996, Sun City. Riverside: International Society of Citriculture, 1, p. 340-344.
- LEITE Jr., R. P., MOHAM, S. K., PEREIRA, A. L. G., CAMPACCI, C. A. 1987. Controle integrado do cancro cítrico: efeito da resistência genética e da aplicação de bactericidas. *Fitopatologia Brasileira*, 12, p. 257-263.
- LEITE JUNIOR., R. P e MOHAM, S. K. 1990. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná. *Crop Protection*, 9: 3-7.
- LIMA, L. H. C., MARCO, J. L., FELIX, C. R., 2000. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: Melo I. S., Azevedo, J. L (Ed.). *Controle Biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2, p. 263-304.
- LUMSDEM, R. D. 1996. Development of *Gliocladium virens* for damping-off disease control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18, p. 463-468.
- MATHRE, D. E., COOK, R. J., CALLAN, N. W. 1999. From discovery to use – traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Disease*, 83, p. 972-983.

- MELO, I. S. 1998. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO I. S., AZEVEDO, J. L. Controle Biológico. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 17-67.
- MOHAMMADI, M., MIRZAEI, M. R., RAHIMIAN, H. 2001. Physiological and biological characteristics of Iranian strains of *Xanthomonas axanopodis* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. J. Phytopathol., 149, p. 65-75.
- NASCIMENTO, J. F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J. M. A.; RÊGO, M. M.; ARAÚJO, A. E. S. 2003. Ocorrência de cancro cítrico no Estado de Roraima. Summa Phytopathologica. Botucatu, v. 29, p. 81-82.
- PEREIRA, A. L., WATANABE, K., ZAGATTO, A. G., CIANCIULLI, P. L. 1978. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, the causal agent of citrus canker in the rhizosphere of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) Biologico, 44, p. 135-138.
- PUNJA, Z. K., UTKHEDE, R. S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends in Biotechnology, 21, p. 400-407.
- RAGSDALE, N. N., SISLER, H. D. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. Annual Review of Plant Pathology, 32, p. 545-557.
- ROSSETTI, V. 1977. Citrus canker in Latin America: A review. Proceedings of the International Society of Citriculture, 3: 918-924.

RINALDI, D. A. M. F., LEITE JUNIOR., R. P. 2000. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* population to the presence of copper compounds in nature. Proc. Int. Soc. Citric., 2, p. 1064.

SCHUBERT, T.S., e SUN, X. 1996. (fifth revision January 2003). Bacterial citrus canker. Plant Pathology Circular 377. Florida Department of Agriculture & Conservation Services. Division of Plant Industry.

SHAAD, N. W., POSTNIKOVA, E., LACY, G. H., SECHLER, A., AGARKOVA, I., STROMBERG, P. E., STROMBERG, V. K., VIDAVER, A. K. 2005. Reclassifications of *Xanthomonas campestris* pv *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. ver. Comb. nov., and *X. alfalfa* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov., *X. campestris* pv. *alfalfa* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfa* subsp. *alfalfa* (ex Riker at al., 1935) sp. nov. nom. rev., and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v. 28, p. 494-518.

SHAAD, N. W., VIDAVER, A. K., LACY, G. H., RUDOLPH, K., JONES, J. B. 2000. Evaluation of proposed amended names of several *Pseudomonads* an

Xanthomonads and recommendations. *Phytopatology*, St. Paul, v. 90, n. 3, p. 208-213.

STALL, R. E., MILLER, J. W., MARCO, G. M. e CANTEROS de ECHENIQUE, B. I. 1982. Timing of sprays to control cancrrosis of grapefruit in Argentina. *Proceedingas of International Society of Citriculture*, 1, p. 414-417.

STALL, R. E., MILLER, J. W., MARCO, G. M., CANTEROS de ECHENIQUE, B. I. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing cancrrosis of citrus in Argentina. *Proc. Fl. State Hort. Soc.*, 93, p. 10-14.

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

VERNIÈRE, C. J., HARTUNG, J. S., PRUVOST, O. P., CIVEROLO, E. L., ALVAREZ, A. M., MAESTRI, P. LUISETTI, J. 1998. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axanopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104, p. 477-487.

Avaliação da atividade antibiótica de compostos extracelulares bacteriano no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cepa 306

Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior^a, Leticia Sayuri Murate^a, Laura Priscila Toledo Bernal^a, Marcio Ferreira Cruz^a, Marco Antonio Nogueira^a, João Carlos Palazzo de Mello^b, Carlos Mitihiko Nozawa^c, Galdino Andrade^a.

^aLaboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, Londrina, PR, 86051-990. Brasil.

^bLaboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, PR. Brasil.

^cLaboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil.

Resumo

O Cancro cítrico causado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) é considerado um dos maiores problemas fitossanitários e econômicos para citricultura mundial. Atualmente, a forma mais utilizada de controle é a erradicação das plantas doentes e/ou pulverização com produtos a base de cobre. A obtenção de novos produtos para controle do cancro cítrico é necessária, uma vez que as formas atuais de controle não atuam efetivamente na doença e podem contaminar o ambiente pelo uso de metal pesado. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antibiótica de composto produzido por um isolado de *Pseudomonas* sp (cepa LV) no crescimento da *Xac* 306 *in vitro*, e na formação de lesões de cancro cítrico em folha de *Citrus sinensis* cv. Valência. A cepa LV foi cultivada em caldo nutriente + $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (100 mg L^{-1}) por 15 dias (28°C , 100 rpm) em seguida centrifugada (9.000 rpm, 20 min, 4°C), sendo o sobrenadante tratado com diclorometano por partição líquido-líquido, concentrado em rotavapor a 45°C , congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. A fase diclorometano (FD) obtida, foi fracionada por cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando seis solventes com polaridade crescente. Foi testada a ação antibiótica da FD e das frações obtidas na CLV contra a *Xac* cepa 306 através da técnica de difusão em ágar, e determinada a concentração inibitória mínima em placas de cultura de 24 poços onde a FD e a fração F3 tiveram maior efeito antibiótico. As plantas foram tratadas com a FD e com a fração F3 que apresentou maior ação *in vitro*. Os resultados mostraram que ocorreu a diminuição da presença de lesão em cerca de 80% e 94% nas plantas tratadas com FD e F3 respectivamente. Estes resultados indicam que o uso de substâncias com ação antibiótica pode ser uma excelente ferramenta para o controle da *Xac*.

Palavras-chave: Citricultura, Fitopatógeno, Cancro cítrico; Controle biológico, antibiose, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, com uma produção de aproximadamente 19 milhões de toneladas de frutas ano (FAO, 2006), sendo a citricultura uma das atividades mais importantes do agronegócio. Contudo, o cancro cítrico é considerado uma doença potencialmente grave para diversas regiões produtoras de citros no mundo (Gottwald et al., 2002; Kimati e Bergamin Filho, 1995; Leite Júnior et al., 1988; Stall e Civerolo, 1991; Stall e Seymour, 1983) pois trata-se de uma doença séria, que ataca a maioria das cultivares comerciais e o seu controle é limitado.

O mais antigo relato data de 1827 e 1831 (Fawcett e Jenkins, 1933) sendo observado em folhas de *Citrus medica* provenientes da Índia. Foi descrita primeiramente por Hasse em 1915 nos EUA, e no Brasil na década de 50 (Bitancourt, 1957).

Cinco tipos diferentes de cancro cítrico foram agrupados em função da sintomatologia apresentada e os diferentes hospedeiros afetados: A, B, C, D e E, (Feichtenberger, 1997; Gabriel et al., 1989). O tipo A, ou cancro cítrico asiático, é o principal e mais severo tipo presente nos pomares, sendo causado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), bastonete aeróbio, Gram negativo, monotríquio. A *Xac* pode infectar toda parte aérea da planta, causando sintomas característicos podendo variar em função do tipo e idade do órgão afetado.

Diversas medidas de controle vêm sendo utilizados a fim de reduzir os prejuízos causados pelo cancro cítrico. Dentre elas destacamos a erradicação das plantas doentes (Leite Junior e Moham, 1990) e o tratamento químico com pulverização das plantas infectadas, com produtos a base de cobre (Koizumi, 1985; Leite Junior e Mohan, 1990).

Outra estratégia que pode ser utilizada no controle do cancro cítrico é o controle utilizando metabólitos bacterianos com ação antibiótica, produzidos a partir de bactérias antagonistas, produtos já utilizados com sucesso em outras culturas (Kloepper et al., 1999). Estes microrganismos competem entre si inter e intra-especificamente dentro dos nichos

nos quais vivem, sendo uma das formas de adquirirem maior competitividade (Andrade, 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antibiótica de composto produzido por um isolado de *Pseudomonas* sp (cepa LV) no crescimento da *Xac* 306 *in vitro*, e na formação de lesões de cancro cítrico em folha de *Citrus sinensis* cv. Valência.

2 Material e Métodos

2.1 Cepas de bactérias

A cepa patogênica tipo utilizada foi a *Xac* 306, a mesma que teve o seu genoma sequenciado (Da Silva et al., 2002), gentilmente cedida pelo Dr. Rui Pereira Leite Junior, IAPAR, Londrina, PR. A cepa LV, (*Pseudomonas* sp) isolada a partir de lesão de cancro cítrico de fruto proveniente de um pomar com alto índice de ocorrência da doença (Rampazo, 2004). Para a preservação das cepas, cultivo jovens foram criopreservados em solução de glicerol 20% (v:v) a -20°C.

2.2 Produção e extração das substâncias antibióticas

O inóculo utilizado para a produção de metabólitos foi obtido a partir de cultura da cepa LV na fase log com 10^8 UFC mL⁻¹ (D.O.= 0.9, λ = 590 nm), sendo retirada uma alíquota de 150 µL desta suspensão e inoculada em 1.5 L de caldo nutriente (CN) + 100 mg.L⁻¹ CuCl₂ . 2H₂O, e incubada no escuro a 28°C por 15 dias a 100 rpm em agitador horizontal. Após o cultivo, as células foram peletizadas por centrifugação (9.000 rpm 20 min, 4°C). O sobrenadante livre de células foi tratado com diclorometano na razão 1:1 (v:v) por partição líquido-líquido em funil de separação de 2000 mL, em alíquotas de 500 mL do sobrenadante e do solvente. Para cada separação, este procedimento foi repetido 15 vezes, deixando em repouso por 15 min cada. A fase diclorometano (FD) obtida na partição foi concentrada em

rotavapor de 10 L a 45°C, em seguida, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada por 24 h, sendo obtido aproximadamente 0.5 g da FD para cada 15 L de sobrenadante.

2.3 Teste de sensibilidade da Xac 306 ao cloreto de cobre

Devido à sensibilidade da Xac a determinadas concentrações de cobre (Marco e Stall, 1983) e a utilização de cloreto de cobre no meio de cultura da cepa LV, foi avaliado a sensibilidade da Xac 306 ao cloreto de cobre a partir de uma curva de concentração (0, 5, 10, 25, 50 e 100 µg.mL⁻¹) adicionadas em AN em placa de Petri com três repetições para cada concentração (6 x 3, n=18) e a Xac 306 sem cloreto de cobre como controle positivo. Foi utilizado como inóculo uma suspensão da Xac 306 de 10¹² UFC mL⁻¹ (D.O. = 1.0, λ=590 nm) em solução salina 0.85% estéril. As placas de Petri foram inoculadas com uma suspensão de 20 µL desta suspensão na superfície e incubadas a 28 °C 48 h⁻¹. Os resultados foram considerados como sensível (-) quando não houve crescimento e resistente (+) quando houve crescimento.

2.4 Quantificação do resíduo de cobre remanescente na fase diclorometano

O resíduo remanescente de cobre foi determinado a partir de dissolução de 2 g da FD em água e leitura direta em espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado no Instituto Agronômico de Campinas – CPD de Solos e Recursos Ambientais.

2.5 Purificação das substâncias antibióticas por cromatografia líquida a vácuo (CLV)

A FD foi fracionada através de CLV, em coluna de vidro (20 mm Φ x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de vácuo 51 kPa. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm, Merck), e como fases móveis solventes orgânicos com polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, metanol e água destilada na razão 1:1 (v:v) e água destilada. A coluna foi montada com 30 g de sílica gel; em seguida uma mistura de 2 g da FD e 5 g de sílica gel. Para as passagens dos solventes orgânicos

foram utilizados alíquotas de 40 mL com 10 repetições para cada solvente, obtendo-se 6 frações: (F1) hexano; (F2) diclorometano; (F3) acetato de etila; (F4) metanol; (F5) metanol e água destilada e (F6) água destilada. As frações foram concentradas em rotavapor a 45 °C, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 24 h.

2.6 Avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar

A avaliação da ação antibiótica da FD e das frações F foram pelo método de difusão em ágar com poços de 9 mm de diâmetro feito equidistantes no ágar. O desenho experimental foi conduzido com: 3 concentrações da FD e das frações F, 4 repetições (3 x 4, n=12) e como controle negativo foi utilizado água destilada estéril. O inóculo da *Xac 306* foi obtido a partir de cultura em fase exponencial a uma concentração de 10^{12} UFC mL⁻¹ e inoculado em placa de Petri com AN pela técnica de pour-plate. Alíquotas de 150 µL da FD e das frações F foram adicionadas nos poços com uma curva de concentração de 100, 1000 e 10000 µg mL⁻¹ e água destilada estéril para controle negativo (solvente usado na suspensão da FD e das frações F). As placas foram incubadas a 28 °C 48 h⁻¹. A leitura foi feita através da medida dos halos de inibição (mm).

2.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e termoestabilidade da fase diclorometano

A CIM foi feita em placas de cultura de células com 24 poços. O desenho experimental utilizado foi o seguinte: 10 concentrações da FD e das frações F, 4 repetições (10 x 4, n=40) e foi considerado como controle negativo caldo nutriente e como positivo uma suspensão de *Xac 306*. Foram adicionados em cada poço a seguinte sequência: 1.8 mL de CN, 100 µL de uma suspensão da *Xac 306* na mesma concentração descrita acima e 100 µL de uma curva de concentração (5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.12, 39,06, 19,53 e 9.76 µg mL⁻¹) da FD, fase diclorometano autoclavada (120 °C 20 min⁻¹) (FDT) e das frações F. Foi considerado como controle positivo *Xac 306* inoculada em CN e como controle negativo água destilada estéril. As placas foram incubadas a 28 °C 48 h⁻¹ em

seguida foi adicionado 20 μL de uma solução de cloreto de 2, 3, 5-trifenil tetrazólio (TTC) a 1% e incubadas a 28 °C 20 min^{-1} . A leitura foi realizada através da mudança de cor através da observação da viabilidade celular, foi considerado sensível (-) na ausência de cor e resistente (+) na presença de coloração rosa - avermelhada.

2.8 Avaliação da ação das substâncias antibióticas FD e F3 sobre a formação de lesão em folha

As plantas de *C. sinensis* cv. Valência foram cultivadas em vasos de 3 L com solo não estéril (Rhodic Ferralsol) (FAO, 1994) mantidos em casa de vegetação (28 °C/22 °C e 10 h/14 h dia/noite, umidade relativa de 80%). A cada 15 dias foram adicionados 150 mL de solução nutritiva de Hewitt para não leguminosas (Hewitt, 1966) e regadas conforme a necessidade com água de torneira.

Foram realizados dois experimentos. O primeiro experimento foi em blocos casualizados com o seguinte delineamento experimental: 2 tempos de aplicação (pré e pós), 3 concentrações da FD, 5 repetições (2 x 3 x 5, n = 40) e dois controles positivos com *Xac* 306 e água destilada para o pré e pós-tratamento com 5 plantas cada. A aplicação da FD foi feita após 15 dias da poda e foram selecionadas 18 a 20 folhas jovens com aproximadamente o mesmo tamanho. Antes da aplicação as plantas foram cobertas por 24 h com saco de polietileno preto para formar uma câmara úmida e escura, permanecendo nestas condições por mais 48 h até o final das aplicações dos tratamentos. No pré-tratamento, os vasos foram abertos e as plantas pulverizadas com 8 mL da FD por planta nas concentrações de (10.000, 1.000, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 8 mL de água destilada no controle (solvente utilizado para diluir a FD) e fechados, após 24 h, os vasos foram novamente abertos e pulverizados com uma suspensão de 8 mL de *Xac* 306 (10^8 UFC mL^{-1}) por planta e fechados. Após 24 h foi tirado à câmara úmida e escura dos vasos. No pós-tratamento, foi adotado o mesmo procedimento descrito anteriormente com exceção da ordem das pulverizações que primeiramente foram inoculadas com *Xac* 306 e depois pulverizadas com as concentrações da FD.

O segundo experimento também foi em blocos casualizados e teve o seguinte desenho experimental 2 tempos de aplicação (pré e pós), 4 concentrações da F3, 5 repetições (2 x 4 x 5, n = 50), e dois controles positivos com Xac 306 e água destilada para o pré e pós-tratamento com 5 plantas cada. Para o pré e pós-tratamento, foi adotado o mesmo procedimento descrito acima, com exceção do composto antibiótico que foi a F3 com as seguintes concentrações (10.000, 1.000, 100, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O número de lesão dos experimentos foi determinado após 21 dias da aplicação. O número de lesão por folha foi avaliada a partir da contagem das lesões em 18 folhas coletadas de cada repetição por tratamento e os dados submetido à análise estatística por regressão ($p < 0.05$).

2.9 Efeito citotóxico das substâncias antibióticas FD e F3

Para o teste de citotoxicidade foi utilizado células epiteliais de carcinoma de faringe humana ATCC CCL-23 (HEp-2) estocadas a -80%, As células foram cultivadas em meio DMEN (GiBco™), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina, 100 unidades mL^{-1} de penicilina e 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fungizona.

A leitura da viabilidade celular foi feita com MTT de acordo com as instruções do método (MTT-baseado no kit, Sigma Chem. Co.). O cultivo celular foi feito em micro placas de 96 poços e incubadas a 37 °C 48 h⁻¹ com 5% CO₂. Após a formação do tapete celular o sobrenadante foi descartado e transferido para cada poço 100 μL de meio DMEN contendo diferentes concentrações da FD e da F3 (FD: 1000.000, 100.000, 10.000 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$; F3: 2300, 230, 23 e 2,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As placas foram incubadas a 37 °C 72 h⁻¹ com 5% CO₂ e a leitura feita em leitor de ELISA com 490 e 630 nm. O experimento foi realizado em quadruplicata.

3 Resultados

3.1 Sensibilidade da Xac 306 a diferentes concentrações de cloreto de cobre

A Xac 306 apresentou resistência a todas as concentrações de cloreto de cobre testadas (Tabela 1).

3.2 Análise de resíduo de cobre na fase diclorometano

O cloreto de cobre que foi adicionado no meio de cultura da cepa LV que poderia ter apresentado efeito bactericida na FD ou nas frações F proveniente do sobrenadante não foi observado. Pois na FD que foi extraída diretamente do sobrenadante e apresentou grande efeito antibiótico nos experimentos *in vitro* e *in vivo* tinha uma quantidade de cobre de 1.7 mg kg^{-1} . Considerando que a concentração mínima inibitória é de 3 g L^{-1} e que a Xac 306 apresentou resistência em 100 mg mL^{-1} , a concentração contida na FD é muito menor do que a concentração inibitória mínima considerada.

3.3 Avaliação da ação antibiótica *in vitro* pelo método de difusão em ágar

Na avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar da FD e das frações F, a FD apresentou halos inibitórios de crescimento da Xac 306. No entanto somente a F3 mostrou ter efeito semelhante à FD formando halos de inibição de crescimento com diâmetro aproximados, 42 e 38.5 mm na concentração de $10.000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As F1, F2 e F4 apresentaram baixa ação antibiótica com halos de inibição de 13, 12.5 e 10 mm respectivamente. Na F1, a concentração $1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou o mesmo efeito encontrado na $10.000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2).

3.4 Determinação da concentração inibitória mínima e termoestabilidade da fase diclorometano

A CIM, da FD foi de $78.12 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, diferentemente da FDT, que apresentou inibição parcial na mesma concentração. Nas frações, a F3 apresentou menor CIM com inibição na concentração de $19.53 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Já as F1 e F2 tiveram como menor concentração inibitória

2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a F4 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as frações F5 e F6 não tiveram efeito inibitório frente à *Xac* 306 (Tabela 3).

3.5 Avaliação da ação das substâncias antibióticas FD e F3 sobre a formação de lesão em folha

Nos dois experimentos *in vivo* realizados, foi avaliado o efeito antibiótico na formação de lesão de cancro cítrico nas folhas. No primeiro experimento onde foi aplicado a FD, no pré-tratamento, o efeito inibitório foi observado a partir da D1 sendo maior na D2 e na D3. Na regressão as diferenças entre dose-efeito foi significativa ($r^2 = 0.9868$, $p < 0.01$) mostrando que a dose mínima testada foi a mais efetiva no controle da formação de lesão. As plantas tratadas com a D3 apresentaram 80% menos lesão nas folhas quando comparadas com o controle (Figura 1 A). No pós-tratamento as concentrações maiores D1 e D2 estimularam a formação de lesão quando comparadas com o controle. Somente a D3 teve efeito inibitório na formação de lesão. Isto mostra um modelo diferente na dose-efeito quando o produto é aplicado após a infecção de *Xac* 306 tendo também diferenças significativas no número de lesão formadas ($r^2 = 0.9449$, $p < 0.01$) (Figura 1 B).

No segundo experimento, onde foi aplicado a F3 (obtida na CLV a partir do tratamento da FD com acetato de etila), no pré-tratamento, todas as concentrações diminuíram o número de lesão e a dose-efeito na regressão foi significativa ($r^2 = 0.8037$, $p < 0.01$). As plantas tratadas com a D1, D2 e D3 diminuíram em aproximadamente 65 % no número de lesão e as plantas tratadas com a D4 o número de lesão foi reduzido em 92 %, quando comparado com as plantas controle (Figura 2A). As plantas tratadas com a F3 no pós-tratamento a correlação dose-efeito também foi significativa ($r^2 = 0.9938$, $p < 0.01$), onde todas as concentrações diminuíram o número de lesão, no entanto o efeito na formação de lesão foi diferente, quando comparada ao controle a D1 diminuiu em 42.4%, a D2 79,8%, a D3 87.7% e a mais efetiva foi a D4 com 93.5% (Figura 2B).

3.6 Efeito citotóxico das substâncias antibióticas FD e F3

No teste de citotoxicidade, a FD apresentou efeito citotóxico somente nas duas concentrações maiores (1.000.000 e 100.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) o mesmo ocorreu com a F3 (2300 e 230 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Estes resultados demonstraram que as concentrações que foram utilizadas nos experimentos *in vivo*, e que apresentaram melhores efeitos no controle da formação de lesão, são ambas 10 vezes menores do que as concentrações mínimas que apresentaram efeito citotóxico.

4 Discussão

Apesar do uso de pequenas concentrações de cobre no meio de cultura da cepa LV, não foi observado nenhuma interferência na ação antibiótica das substâncias testadas, já que o residual de cobre encontrado na FD foi muitas vezes menor do que a concentração inibitória mínima considerada para diminuir a presença de lesões foliares através de pulverizações periódicas nas fases de brotação das plantas cítricas (Koller et al., 2006). A ação antibiótica do cobre frente à patógenos depende diretamente da concentração de íons livres na solução (Lee et al., 1993).

Nos testes de antibiose *in vitro*, a F3 seguida pela FD foram as que apresentaram maior efeito inibitório e menor CIM frente à *Xac* 306. Como a F3 é extraída da FD por fracionamento na CLV, os resultados indicam que as substâncias com ação antibióticas solúveis em acetato de etila, presente na FD foram extraídas na F3, com isso, as outras frações apresentaram pouca ou nenhuma ação antibiótica.

Para os experimentos *in vivo* foi utilizada a FD e a F3, por apresentarem maior ação antibiótica nos experimentos *in vitro* e baixa concentração inibitória mínima. A FD na concentração D3 do pré-tratamento diminuiu aproximadamente 80% no número de lesões foliares, por outro lado, no pós-tratamento os efeitos observados forma diferentes. A D1 estimulou o número de lesões e a D2 não teve efeito tendo aproximadamente o mesmo número de lesões do controle. Mesmo a D3 que apresentou melhor controle, a sua

eficiência diminuiu bastante, pois a redução no número de lesões foi somente de 30% em relação ao controle. Isto demonstra que a forma de tratamento com a FD tem efeitos diferentes no controle das lesões o que é reforçado pelo fato de ambos os modelos apresentaram diferenças significativas na correlação dose-efeito e um alto valor de r^2 . Essas diferenças no controle de lesão do cancro cítrico com relação à época de tratamento também foram observadas nos experimentos de Camargo (2006) que avaliou o efeito do sobrenadante no controle de lesão de cancro cítrico.

Na F3 no pré-tratamento todas as doses tiveram um grande efeito inibitório no número de lesão, sendo a mais efetiva a menor dose a D4 e no pós-tratamento o efeito observado foi menor do que no pré-tratamento, sugerindo que apesar de não ocorrer o estímulo na formação de lesão como na FD, o efeito observado foi menor do que no pré-tratamento. Isto significa que o tempo de aplicação é um importante fator na relação dose-efeito. Diferenças no número de lesões entre o pré e pós-tratamento também foi observado no trabalho de Camargo (2006), diferentemente de Murati (2007) onde a diminuição do número de lesões foliares não apresentou diferença nos tempos de aplicações.

As diferenças observadas no presente trabalho entre os tratamentos FD e a F3 possivelmente estão relacionadas com o grau de pureza das substâncias, demonstrando que quanto mais puro as substâncias, maior o efeito observado na formação de lesão.

Para os testes de citotoxicidade a FD e a F3, substâncias com melhor ação antibiótica *in vitro* e *in vivo* não apresentaram efeito tóxico nas concentrações com maior ação antibiótica, sendo 10 vezes menor do que a concentração mínima citotóxica, demonstrando que a melhor concentração pode ser manipulada sem efeito tóxico para o aplicador.

O fato da FD e da fração F3 obtida através da CLV terem apresentado efeito inibitório na formação de lesões, é um importante indício de que estas substâncias podem ajudar no controle do cancro cítrico, podendo estar associados a outros produtos ou a formas de manejo para o controle da doença. No entanto, experimentos de campo devem ser realizados para determinar qual será o comportamento destas substâncias nestas

condições. As condições experimentais aqui utilizadas facilitaram a formação das lesões nas folhas, uma vez que, a cepa 306 é de alta virulência, a concentração celular de *Xac* 306 usada era muitas vezes acima da encontrada naturalmente e a câmara úmida e escura teve função importante na abertura dos estômatos para facilitar a entrada da *Xac* 306 através dos estômatos e infectar as folhas.

5 Conclusão

A ação das substâncias antibióticas produzida pela cepa LV tem efeito inibitório na formação de lesões foliares do cancro cítrico. Este efeito é um resultado bastante promissor na obtenção de novos produtos para o controle de doenças causadas por bactérias em citros. No entanto este é o desafio para os próximos anos, buscar o controle efetivo das bactérias fitopatogênicas e diminuir os prejuízos causados por estes microrganismos na citricultura mundial.

5 Referências Bibliográficas

- Andrade, G., 2004., Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: Varma, A., Abbott, L., Werner, D., Hampp, R. (Eds.), *Plant Surface Microbiology*, Springer-Verlag, pp. 51-69.
- Assis, S.M.P., Mariano, R.L.R., MichereV, S.J., Rildo, S.B., 1996. Biological control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: Tang, W., Cook, R.J., Rovira, A. (Eds.), *Advances in Biological Control of Plant Disease*. Agricultural University Press, Beijing, China, pp. 347–353.

- Bora, L.C., Gangopadhyay, S., Chand, J., 1993. Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* Dye) of mung bean with phylloplane antagonists. *Plant Pathology*. 23, 162–168.
- Bitancourt, A.A., 1957. O cancro cítrico. *O Biológico*. 23, 101-111.
- Byrne, J.M., Dianese, A.C., Jia, P., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Louws, F.J., Miller, S.A., Jones, J.B., Wilson, M., 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under Weld conditions at several locations in North America. *Biological Control*. 32, 408–418.
- Camargo, F.R.S., 2006. Avaliação do potencial de agentes biológicos e seus produtos no controle do cancro cítrico causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Londrina, Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Brasil. 51.
- Da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M.C., Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E.A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Clapina, L.P., Cicarelli, R.M.B., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J.S., Ferreria, R.C.C., Ferro, M.I.T., Formighieri, E.F., Franco, M.C., Greggio, C.C., Gruber, A., Katsuyama, A.M., Kishi, L.T., Leite R.P.Jr., Lemos, E.G.M., Lemos, M.V.F., Locali, E.C., Machado, M.A., Madeira, A.M.B.N., Martinez-Rossi, N.M., Martins, E.C., Meidanis, J., Menck, C.F.M., Miyaki, C.Y., Moon, D.H., Moreira, L.M., Novo, M.T.M., Okura, V.K., Oliveira, M.C., Oliveira, V.R., Pereira, H.A., Rossi, A., Sena, J.A.D., Silva, C., Souza, R.F., Spinola, L.A.F., Takita, M.A., Tamura, R.E., Teixeira, E.C., Tezza, R.I.D., Santos, M.T., Truffi, D., Tsai, S.M., White, F.F., Setúbal, J.C., Kitajima, J.P., 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with different host specificities. *Nature*. 417, 459-463.
- FAO., 1994. Soil Map of theWorld. Revised legend with corrections. FAO-UNESCO ISRIC, Wageningen, Rome. 140.

- FAO., 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Citrus: statistics fruit fresh and processed annual. Capturado em 10 fevereiro 2008. on line. Disponível em: <http://www.fao.org>.
- Fawcett, H.S., Jenkins, A.E., 1933. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus Citrus in England and the United States. *Phytopathology*. 23, 820-824.
- Feichtenberger, E., 1997. Manejo ecológico das principais doenças fúngicas e bacterianas dos citros no Brasil. Anais do Quinto Seminário Internacional de Citros – Tratos Culturais. 23-65.
- Gabriel, D.W., Kingsley, M.T., Hunter, J.E., Gottwald, T.R., 1989. Reinstatement of *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39, 14-22.
- Gottwald, T.R., Graham, J.H., Shubert, T.S., 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. doi: 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- Hasse, C.H., 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. *Journal of the Agricultural Research*. 4, 96-100.
- Hewitt, E. J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. East Maling: Commonwealth Agricultural Bureau. 547.
- Kloepper, J.W., Rodríguez-Kábana, R., Zehnder, G.W., Murphy, J.F., Sikora, E., Fernandez, C., 1999. Plant root bacterial interaction in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*. 28, 21-26.
- Koller, O.C., Oliveira, R.B.L., Nunes, D.S., Dal Soglio, F., Panzenhagen, N.V., Sartori, I.A., Manteze, F., 2006. Controle químico do cancro cítrico em plantas jovens sob manejo convencional e orgânico. *Ciência Rural*. 36, 1043-1048.
- Kimati, H., Bergamin Filho, A., 1995. Princípios gerais de controle. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (Eds.), *Manual de fitopatologia*, Ceres, São Paulo, pp. 692-709.

- Koizumi, M., 1985. Citrus canker: The world situation. In: Citrus canker: an International perspective, Citrus Research & Education Center, University of Florida, pp. 2-7.
- Lee, Y.A., Schroth, M.N., Hedson, M., Lindow, S.E., Wang, X.L., Onson, B., Buchner, R.P. Teviotdale, B., 1993. Increased toxicity of iron-emended copper-containing bactericides to the walnut blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. *Phytopathology*. 83,1460-1465.
- Leite Junior, R.P., Santos, S.D., 1988. Susceptibilidade do limão Siciliano (*Citrus lemon*), enxertado sobre diferentes porta enxertos, ao cancro cítrico causado por *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Fitopatologia Brasileira*. 13, 353- 358.
- Leite Junior, R.P. e Moham, S.K., 1990. Integrated Management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. *Crop Protection*. 9, 3-7.
- Marco, G.M., Stall, R.E., 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensibility to copper. *Plant Disease*. 67, 779-781.
- Murate, L.S., 2007. Activity of bacterial secondary metabolites in the control of citrus canker. Londrina, Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina. 57.
- 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. Dissertação de Mestrado. Brasil. 57.
- Stall, R.E. e Civerolo, E.L., 1991. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Annual Review of Phytopathol*. 29, 339-420.
- Stall, R.E. e Seymour, C.P., 1983. Canker, a threat to citrus in the gulf-cost states. *Plant Disease*. 67,581-585.
- Stromberg, K.D., Kinkel, L.L., Leonard, K.J., 2000. Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the causal agent of bacterial leaf streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. *Biological Control*.17, 61–72.

- Stromberg, K. D., Kinkel, L. L., Leonard, K. J., 2003. Quantifying the effect of bacterial antagonists on the relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and subsequent bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. *Biological Control*. 29, 58-65.
- Verma, J.P., Singh, R.P., 1987. Interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, phylloplane bacteria and *Gossypium hirsutum*. In: Focal Theme (Botany) ISCA Symposium. 163–178.
- Zhang, L., Birch, R.G., 1997. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. *Journal of Applied Microbiology*. 82, 448–454.

Tabela 1: Teste de sensibilidade da *Xac* 306 ao cloreto de cobre

Cepa	Concentração de cloreto de cobre ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Crescimento bacteriano
<i>Xac</i> 306	0	+
	5	+
	10	+
	25	+
	50	+
	100	+

(+) resistência ao cobre, (-) sensível ao cobre

Tabela 2: Avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar da fase diclorometano (FD), fração hexano (F1), fração diclorometano (F2), fração acetato de etila (F3), fração metanol (F4), fração metanol e água (F5) e fração água (F6), frente à *Xac* 306.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Diâmetro do halo (mm)
FD	10000	38.5
	1000	21.5
	100	16.0
F1	10000	13.0
	1000	13.0
	100	
F2	10000	12.5
	1000	-
	100	-
F3	10000	42.0
	1000	26.5
	100	10.5
F4	10000	10.0
	1000	-
	100	-
F5	10000	-
	1000	-
	100	-
F6	100	-
	1000	-
	10000	-

(-) sem formação de halos de inibição

Tabela 3: Determinação da concentração inibitória mínima da fase diclorometano (FD), fase diclorometano autoclavada a 121°C 20min⁻¹ (FDT), fração hexano (F1), fração diclorometano (F2), fração acetato de etila (F3), fração metanol (F4), fração metanol e água (F5) e fração água (F6), frente à *Xac* 306

Concentração (µg mL ⁻¹)	Compostos antibióticos							
	FD	FDT	F1	F2	F3	F4	F5	F6
5000	-	-	-	-	-	-	+	+
2500	-	-	-	-	-	-	+	+
1250	-	-	+	+	-	-	+	+
625	-	-	+	+	-	-	+	+
312.5	-	-	+	+	-	+	+	+
156.25	-	-	+	+	-	+	+	+
78.12	-	+-	+	+	-	+	+	+
39.06	+	+	+	+	-	+	+	+
19.53	+	+	+	+	-	+	+	+
9.76	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) sensível, (+) resistente, (+-) inibição parcial

Legenda das Figuras

Figura 1: Regressão ($p < 0.05$, $n = 40$) dose-efeito da aplicação de três doses da fase diclorometano ($D0 = \text{água destilada}$, $D1 = 10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $D2 = 1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $D3 = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *Xac 306* em plantas de *C. sinensis* cv. Valência após 21 dias da aplicação. (A) Pré-tratamento. (B) Pós-tratamento.

Figura 2: Regressão ($p < 0.05$, $n = 50$) dose-efeito da aplicação de quatro doses da fração F3 obtida a partir do tratamento da fase FD com acetato de etila ($D0 = \text{água destilada}$, $D1 = 10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $D2 = 1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, $D3 = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $D4 = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *Xac 306* em plantas de *C. sinensis* cv. Valência após 21 dias de aplicação. (A) Pré-tratamento, (B) Pós-tratamento.

Figure 1

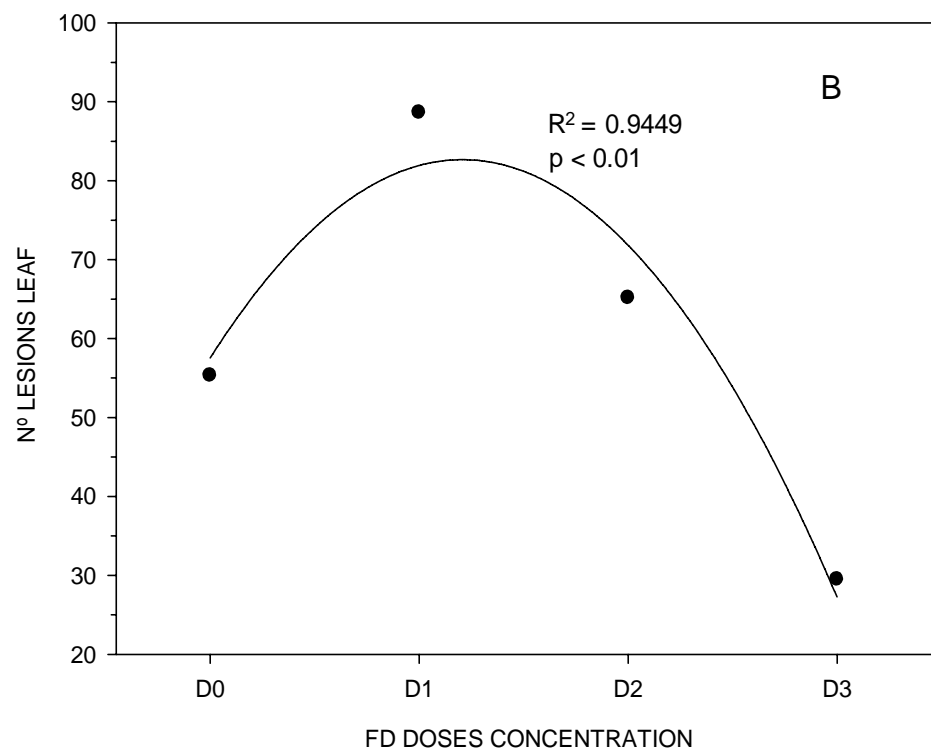
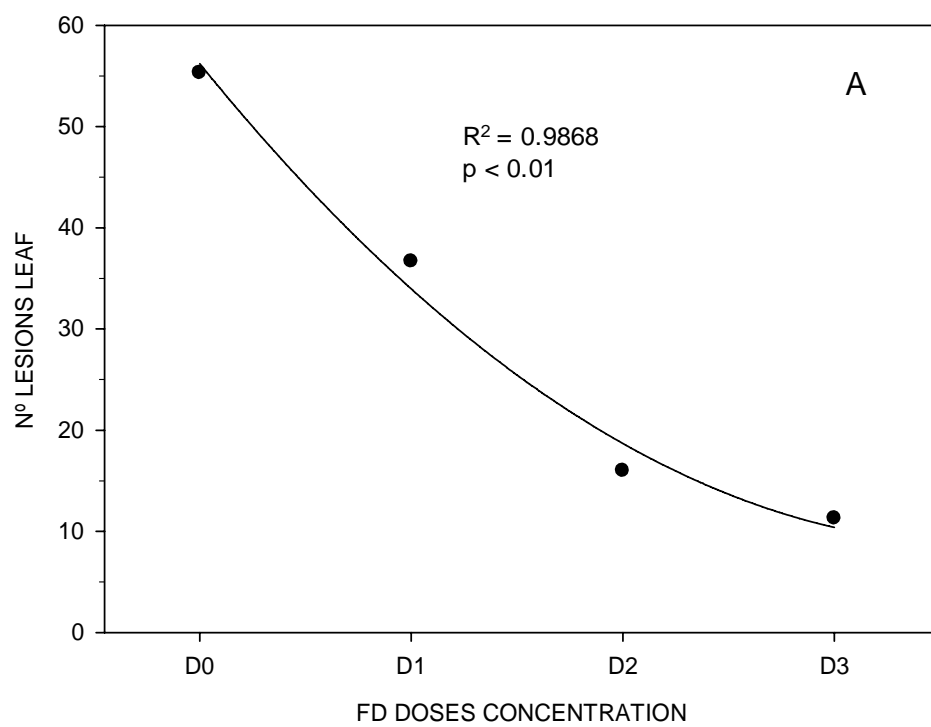


Figure 2

