



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCILENE DE PAULA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA *IN VITRO* DE  
COMPOSTOS EXTRACELULARES BACTERIANO SOBRE  
*XANTHOMONAS AXONOPODIS* E NO CONTROLE DA  
MANCHA FOLIAR EM EUCALIPTO**

---

Londrina  
2011

LUCILENE DE PAULA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA *IN VITRO* DE  
COMPOSTOS EXTRACELULARES BACTERIANO SOBRE  
*XANTHOMONAS AXONOPODIS* E NO CONTROLE DA  
MANCHA FOLIAR EM EUCALIPTO**

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  
2011

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

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

L864a Lopes, Lucilene de Paula.

Avaliação da atividade antibiótica *in vitro* de compostos extracelulares bacteriano sobre *Xanthomonas axonopodis* e no controle da mancha foliar em eucalipto / Lucilene de Paula Lopes. – Londrina, 2011.  
48 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Xanthomonas – Teses. 2. Eucalipto – Doenças e Pragas – Teses. 3. Pseudomonas – Teses. 4. Bactérias patogênicas – Teses. I. Andrade, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 632.35

LUCILENE DE PAULA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA *IN VITRO* DE  
COMPOSTOS EXTRACELULARES BACTERIANO SOBRE  
*XANTHOMONAS AXONOPODIS* E NO CONTROLE DA MANCHA  
FOLIAR EM EUCALIPTO**

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.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Galdino Andrade  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Maria Isabel Balbi Pena  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Gerson Nakazato  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2011

*“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência,  
portanto, não é um feito, mas um hábito”.*

*(Aristóteles)*

## **DEDICATÓRIA**

*A Deus, que me protege e me ilumina; a minha família,  
pela confiança e segurança, e ao meu noivo Rodrigo, pelo  
amor e dedicação.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me ilumina e me guia em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Adenir e Lucia pelo amor, incentivo e paciência durante esses dois anos.

À minha família Luciane, Tony, Lara, Davi, Luciano, Luciana e Letícia, por estarem ao meu lado e me amarem incondicionalmente.

Ao meu noivo Rodrigo, que me incentivou, ajudou esteve ao meu lado em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade, pela orientação e incentivo ao longo destes dois anos de trabalho.

Aos Professores da banca, Maria Isabel Balbi Pena e Gerson Nakazato, pelas precisas correções e sugestões.

À técnica do laboratório Marta Salvador, pela amizade e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos companheiros de laboratório Luciana, Viviana, Dáfila, Flávia, Eik, Kellen, Cris, Luís Eduardo, Ane, Mayara, Carol, Fernanda, Priscila, Vanessa, Nathali, Luan e em especial ao Júnior, que me ensinou, ajudou e foi companheiro até os últimos momentos.

Às minhas grandes amigas Cíntia Greice e Jamile, pela amizade mais que especial, pela ajuda nos experimentos, e por estarem presente em mais essa etapa da minha vida.

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

LOPES, Lucilene de Paula. **Avaliação da atividade antibiótica *in vitro* de compostos extracelulares bacteriano sobre *Xanthomonas axonopodis* e no controle da Mancha Foliar em eucalipto**. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

A mancha foliar, causada por *Xanthomonas axonopodis*, é uma das principais bacterioses que afeta a cultura do eucalipto. O patógeno causa lesões foliares que diminuem a área fotossintética e impedem o crescimento da planta. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibiótica de metabólitos produzidos por *Pseudomonas* sp., extraídos com diclorometano e fracionados por cromatografia líquida a vácuo, contra *X. axonopodis*. A atividade antibiótica da fase acetato de etila (F3) foi determinada por testes de difusão em agar, bioautografia, determinação da concentração inibitória mínima e ação sobre a morfologia das células de *X. axonopodis*, por microscopia eletrônica de varredura. Em experimento em casa de vegetação, mudas de eucalipto foram pulverizadas com F3 antes ou depois da infecção com *X. axonopodis*. Resultados da microscopia eletrônica mostraram mudanças nos exopolissacarídeos e na morfologia das células tratadas. Em plantas pulverizadas com F3 e inoculadas com *X. axonopodis*, o número de lesões foliares foi 93.9% menor, quando comparado com as plantas não tratadas. Conclui-se que F3 apresenta atividade antibiótica contra *X. axonopodis* e pode ser uma alternativa no controle da mancha foliar em mudas de eucalipto.

**Palavras – chave:** Xanthomonas. Eucalipto. Doenças e pragas. Pseudomonas. Bactérias patogênicas.

LOPES, Lucilene de Paula. **Evaluation of antibiotic activity *in vitro* of compounds on extracellular bacterial *Xanthomonas axonopodis* and control of leaf spot on Eucalyptus** . 2011. 48 f. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

### ABSTRACT

The bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas axonopodis*, is considered a major problem in eucalyptus seedlings production. The pathogen cause leaf lesion that reduces the area of photosynthesis and prevents plant growth. The objective of this study was to evaluate the antibiotic activity of the metabolite produced by *Pseudomonas* sp., extracted with dichloromethane and fractionated by vacuum liquid chromatography, against *X. axonopodis*. The antibiotic activity of ethyl acetate phase (F3) was determined by agar diffusion tests, bioautography determination of minimum inhibitory concentration and action on the cell morphology of *X. axonopodis*, by scanning electron microscopy. In greenhouse experiment, eucalyptus seedlings were sprayed with F3 before or after *X. axonopodis* infection. Electron microscopy results showed changes in exopolysaccharides and cell morphology of cells treated. In plants sprayed with F3 and inoculated with *X. axonopodis*, the number of leaf lesions was 93.9% lower when compared with untreated plants. We conclude that F3 showed antibiotic activity against *X. axonopodis* which could help on the control of bacterial leaf spot in eucalyptus seedlings.

**Keywords:** Xanthomonas. Eucalyptus Diseases and pests. Eucalyptus Pathogenic bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Distribuição de florestas plantadas com eucalipto e pinus no Brasil, por estado, em 2009 ..... 17
- Figura 2** – Sintomas da mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em folhas de eucalipto (fonte: Gonçalves et al., 2008).....22

## ARTIGO

- Figura 1** – Esquema da Cromatografia em Camada Delgada e Biotografia da fase diclorometano (FD), extraída de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas* sp. cepa LV, e da fase acetato de etila (F3) obtida a partir de FD por cromatografia líquida a vácuo (CLV)..... 38
- Figura 2** – Curva de crescimento de *Xanthomonas axonopodis*, tratada e não tratada com F3 (fase acetato de etila 100%) obtida por cromatografia líquida a vácuo (CLV) da FD (fase diclorometano), extraída de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas* sp. Cepa LV, na concentração de 100 ug mL<sup>-1</sup> .....40
- Figura 3** – Avaliação da atividade antibiótica da fração F3 (fase acetato de etila 100%) obtida por cromatografia líquida a vácuo (CLV) da FD (fase diclorometano), extraída de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas* sp. cepa LV, sobre o desenvolvimento da Mancha Foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em mudas de Eucalipto, após 15, 20 e 30 dias de inoculação, na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup> .....41
- Figura 4** – Microscopia eletrônica de varredura de células de *Xanthomonas axonopodis* do Eucalipto tratadas e não tratadas com fração F3 (fase acetato de etila 100%) obtida por cromatografia líquida a vácuo (CLV) da FD (fase diclorometano), extraída de metabólitos secundários

produzidos por *Pseudomonas* sp. cepa LV. (A) Células controle, não tratadas (5.000x; 20.000x); (B) Células de *X. axonopodis* após 1 de tratamento (10.000x), (C) Células de *X. axonopodis* após 3 horas de tratamento (10.000), (D) células de *X. axonopodis* após 6 horas de tratamento (20.000x). Células viáveis (CV); células inviáveis (CI); exopolissacarídeos (EP); ausência de exopolissacarídeos (AEP).....42

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1	A CULTURA DO EUCALIPTO .....	15
3.2	BREVE HISTÓRICO DA EUCALIPTOCULTURA .....	15
3.3	IMPORTÂNCIA DO EUCALIPTO NO BRASIL .....	17
3.4	DOENÇAS DO EUCALIPTO .....	18
3.5	GÊNERO XANTHOMONAS .....	19
3.6	MANCHA FOLIAR DO EUCALIPTO .....	20
3.7	CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS .....	23
	REFERÊNCIAS.....	25
	<b>ARTIGO – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA IN VITRO DE COMPOSTOS EXTRACELULARES SOBRE XANTHOMONAS AXONOPODIS E NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR EM EUCALIPTO</b> .....	30
	RESUMO .....	31
	ABSTRACT.....	31
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	32
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
2.1	CEPAS BACTERIANAS .....	33
2.2	PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA .....	34
2.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) .....	34
2.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA .....	35
2.4.1	CCD Bioautografia.....	35
2.4.2	Difusão em Agar .....	35
2.4.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	36

2.4.4	Avaliação da Atividade Antibiótica de F3 sobre o Desenvolvimento da Mancha Foliar em Mudanças de Eucalipto.....	36
2.4.5	Análise Ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	37
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O eucalipto é a espécie florestal mais cultivada no mundo, com cerca de 7,8 milhões de hectares de área plantada. Chegou ao Brasil por volta de 1868 e nos últimos anos a expansão dos plantios tem suprido a demanda de matéria prima para a produção de papel, celulose, óleos vegetais, madeira para serraria, entre outros (Ferreira e Santos, 1997; FAO, 2000; ABRAF, 2010).

Desde a década de 70, uma variedade de doenças foi registrada no campo e em viveiros no Brasil (Alfenas et al., 2009). A Mancha Foliar reportada pela primeira vez por Truman (1974) na Austrália é uma das principais bacterioses que afeta o eucalipto e causa grandes prejuízos devido aos altos índices da doença, principalmente em fase de viveiro (Alfenas e Ferreira, 2008).

A bactéria, *Xanthomonas axonopodis*, causadora da mancha foliar, habita a superfície da folha e penetra na planta de forma passiva através de aberturas naturais como estômatos e hidatódios (Hirano e Upper, 1983; Leyns et al., 1984). O patógeno invade os espaços intercelulares, se multiplica dentro das células vegetais e causa sintomas como lesões angulares distribuídas por toda região foliar, que limitam a área fotossintética e restringem o crescimento das plantas (Chan e Goodwin, 1999; Alfenas et al., 2009)

A utilização de produtos químicos como herbicidas e fungicidas é pouco empregada na eucalipticultura e a única alternativa para a prevenção da mancha foliar do eucalipto é o manejo integrado que visa reduzir as condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno. No entanto, milhões de mudas são descartadas anualmente em decorrência dos altos índices da doença (Alfenas et al., 2009).

A busca por novas opções de controle se torna necessária e optar por uma estratégia alternativa sem o uso de produtos químicos é importante para não agredir a biodiversidade das áreas florestais. O controle biológico é uma alternativa promissora no controle de doenças em plantas e o uso de microrganismos como agente de biocontrole ou de compostos do metabolismo secundário, produzidos por cepas antagonistas, estão sendo cada vez mais explorados (Shoda, 2000; Harman, 2000; Byrne et al., 2005; Ran et al., 2005; Lemessa e Zeller, 2007; Oliveira et al., 2011).

Neste contexto, buscando encontrar uma nova alternativa para a mancha foliar do eucalipto, a atividade antibiótica de compostos extracelulares produzidos por *Pseudomonas* sp., cepa LV, foi avaliada no controle de *X. axonopodis* em ensaios *in vitro* e em casa de vegetação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibiótica de compostos extracelulares produzidos pela cepa LV (*Pseudomonas* sp.) no controle de *Xanthomonas axonopodis* em Eucalipto.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter compostos extracelulares bacteriano com atividade antibiótica durante o crescimento da cepa LV (*Pseudomonas* sp.);
- b) Fracionar os compostos com atividade antibiótica, produzidos pela cepa LV, em cromatografia líquida a vácuo;
- c) Avaliar a atividade antibiótica no controle de *X. axonopodis in vitro*;
- d) Avaliar a atividade antibiótica no controle de *X. axonopodis* em mudas de eucalipto;
- e) Observar os efeitos do composto extracelular em contato com as células de *X. axonopodis* pela microscopia eletrônica de varredura.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A CULTURA DO EUCALIPTO

Aproximadamente 700 espécies florestais do gênero *Eucalyptus* são conhecidas. O gênero engloba desde árvores de grande porte até pequenos arbustos ornamentais. As espécies mais comuns atingem de 20 a 60 metros de altura, no entanto, há espécies de maior porte cujo caule pode atingir até 90 metros (Mangieri e Dimitri, 1971).

A copa de suas árvores é geralmente rala e alongada, o tronco quase sempre retilíneo e cilíndrico, com cascas ou muito lisas ou muito ásperas e fissuradas, dependendo da espécie. As folhas são aromáticas e dispostas nos ramos de maneira oposta na parte inferior e alterna na parte superior. As flores são hermafroditas agrupadas em forma de inflorescência, geralmente melíferas e os frutos são constituídos por cápsulas lenhosas com sementes muito pequenas (Eldridge et al., 1993).

O eucalipto se desenvolve com grande rapidez e por volta do sétimo ano permite um primeiro corte do tronco para o aproveitamento da madeira. Por crescer rapidamente, tolerar cortes sucessivos e fornecer matéria-prima para diversos fins se tornou uma das árvores mais comumente cultivadas (Berguer, 2000).

#### 3.2 BREVE HISTÓRICO DA EUCALIPTOCULTURA

O eucalipto é nativo da Austrália e foi descoberto pelos ingleses e descrito pela primeira vez em 1788. O Chile foi o primeiro país da América do Sul a introduzir o eucalipto em 1823. No Uruguai, as primeiras sementes foram recebidas em 1853, e na Argentina, as primeiras espécies chegaram em 1865 (Ferreira e Santos, 1997).

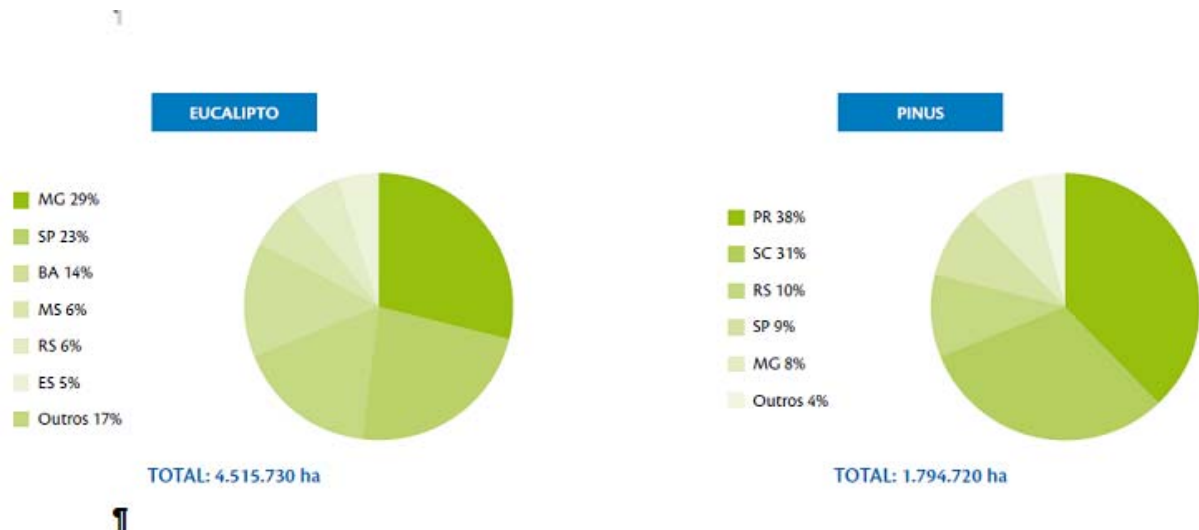
No Brasil, os primeiros plantios foram instalados no Rio Grande do Sul em 1868, e até o princípio do século XX, a cultura do eucalipto fez parte de

coleções de alguns jardins botânicos como árvore decorativa, sem importância comercial (Tonini et al., 2006). Desde o início do século XVI até meados do século XX, o extrativismo predominava na exploração das florestas naturais no Brasil, e por esse motivo a Mata Atlântica e a Floresta da Araucária foram praticamente extintas. Em função da devastação ocorrida, da impossibilidade de repor as florestas com espécies nativas e com o objetivo de produzir madeira para atender ao consumo existente na época, iniciaram-se as primeiras pesquisas em Silvicultura no início do século XX. A nova silvicultura passou a ser chamada de Intensiva, baseada em espécies exóticas, principalmente do gênero *Eucalyptus* (Ferreira e Santos, 1997).

Os primeiros estudos técnicos e científicos sobre a cultura no Brasil foram iniciados a partir de 1904, com Edmundo Navarro de Andrade na Companhia Paulista de Estradas de Ferro, que introduziu no Horto de Jundiaí, SP, espécies oriundas da Austrália. Por apresentar boa adaptação, fornecer em menor tempo combustível para a ferrovia e madeira para dormentes, o plantio de eucalipto foi estimulado, havendo a expansão da eucaliptocultura (Ferreira e Santos, 1997).

Após seis anos de estudos, comparando espécies exóticas e nativas, Navarro de Andrade chegou à conclusão que o eucalipto deveria ser cultivado em larga escala, e do estado de São Paulo, o plantio se estendeu para todo o centro e sul do País (Jacobs, 1971).

Segundos dados da ABRAF (2010), atualmente a área total de florestas plantadas no Brasil corresponde mais de 6.7 milhões de ha, sendo 4.5 milhões de eucalipto, 1.7 milhões de ha de pinus (Figura 1) e 472 mil ha de outras espécies como acácia, seringueira, paricá, entre outras. A área de plantações de eucalipto em 2009 obteve um aumento de 4.4% em relação a 2008, considerado modesto quando comparado com a expansão na maioria dos estados brasileiros com crescimento médio de 7.1% ao ano entre 2004-2009. O fato é decorrente da crise financeira internacional que afetou a economia mundial e reduziu a demanda dos compradores dos produtos baseadas em madeira originária de florestas de eucalipto (ABRAF, 2010).



**Figura 1** – Distribuição de florestas plantadas com eucalipto e pinus no Brasil, por estado, em 2009

Fonte: (ABRAF, 2010).

### 3.3 IMPORTÂNCIA DO EUCALIPTO NO BRASIL

As espécies de *Eucalyptus* possuem grande capacidade de produzir madeira por unidade de área em um ciclo relativamente curto (Drumond et al., 1997). O corte para a industrialização ocorre, geralmente, aos sete anos, em um regime que permite até três ciclos sucessivas (MAPA/SPA, 2007).

O setor de papel e celulose brasileiro tem grande importância no contexto econômico e social, levando o País à condição de maior produtor mundial de celulose de fibra curta (Tonini et al., 2006). O Estado de Minas Gerais detém tecnologia avançada, as indústrias de painéis de madeira modernizaram-se rapidamente para garantir competitividade, diminuindo a fabricação de chapas duras, devido às pressões ambientais, e aumentando a produção de MDF (Fibra de média densidade) (MAPA/SPA, 2007).

A cultura do eucalipto possui rápido crescimento, alta produtividade, ampla diversidade de espécies, grande capacidade de adaptação às mais diferentes condições de solo e clima, tornando-se uma alternativa contra a devastação das florestas nativas em diversas regiões do planeta (Simões et al., 1981). O reflorestamento com espécies de rápido crescimento se tornou essencial para

garantir a preservação das florestas nativas e a demanda crescente de matéria-prima derivada dos recursos naturais florestais (Drumund et al., 1997).

Espécies de eucalipto são amplamente cultivadas no Brasil, e nos últimos anos tem suprido a crescente demanda de matéria para a produção de celulose, madeira para serraria, óleos essenciais, carvão vegetal, poste de eletricidade, mourões de cerca, entre outras (Alfenas et al., 2009).

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Silvicultura, o comércio mundial em 2007 movimentou aproximadamente US\$ 10 trilhões, sendo os produtos de origem florestal um dos 10 mais comercializados internacionalmente, atingindo cerca de 3% do comércio global, equivalente a cerca de US\$ 300 bilhões (SBS, 2008).

O setor de base florestal brasileiro tem participação significativa no Produto Interno Bruto Nacional (PIB), representando 3.4% do PIB nacional, ou seja, US\$ 44.6 bilhões. O setor florestal teve um aumento de 11% nas exportações, com US\$ 9.1 bilhões, correspondendo a 5.6% do total exportado pelo país em 2007. O segmento de celulose e papel teve maior participação nas exportações com US\$ 4.7 bilhões e um crescimento de 18% em relação a 2006. As exportações de madeira representaram cerca de US\$ 3.3 bilhões (SBS, 2008), e os empregos em toda a cadeia produtiva da atividade florestal em 2007 foram da ordem de 8.6 milhões, onde o segmento de florestas plantadas proporcionou 4.6 milhões de empregos (SBS, 2008).

### 3.4 DOENÇAS DO EUCALIPTO

Após a introdução do eucalipto no Estado de São Paulo para fins comerciais, a cultura se manteve praticamente livre de doenças até 1970. Contudo, a expansão de áreas cultivadas em regiões mais quentes e mais úmidas, o plantio de espécies suscetíveis e os ciclos sucessivos da cultura, têm favorecido a incidência de doenças nos viveiros e no campo (Alfenas et al., 2009).

No campo, as doenças podem ocorrer desde o plantio até a retirada das árvores, e nos viveiros, as fases de multiplicação de brotos, enraizamento e aclimatização são mais vulneráveis ao aparecimento de fitopatógenos. Segundo

Alfenas et al. (2009), as perdas de mudas em viveiros, ocasionadas pelo estabelecimento de enfermidades, causam grandes prejuízos aos viveristas, podendo levar a um prejuízo aproximado de R\$7.700,00, se houver apenas 1% de perda de uma produção de 100.000 estacas/dia.

Doenças como murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Hayward, 1991), ferrugem, causada por *Puccinia psidii* (Ferreira et al., 1983), entre outras, já foram registradas em eucalipto, no entanto, neste estudo vamos destacar apenas a macha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis*, umas das principais doenças foliares que afeta a cultura (Alfenas et al., 2009).

### 3.5 GÊNERO XANTHOMONAS

O gênero *Xanthomonas* compreende uma vasta gama de fitopatógenos que pode causar doenças nos principais grupos de plantas superiores, incluindo 124 espécies de monocotiledôneas e 264 de dicotiledôneas, causando grande impacto, principalmente, em culturas agrícolas como feijão, tomate, laranja, entre outros (Leyns et al., 1984; White et al., 2009).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* pertencem à família *Xanthomonadaceae*, são aeróbias estritas, bastonetes (0.4-0.7 µm de largura e 0.7-1.8 µm de comprimento), Gram-negativas, com a presença de um único flagelo polar (1.7-3 µm de comprimento) (Leyns et al., 1984). A temperatura ótima de crescimento está entre 25 – 30 °C, e as colônias são lisas, mucóides com pigmentação amarelada (Starr e Stephens, 1964), capaz de proteger as células contra danos fotobiológicos (Jenkins e Starr, 1982).

As bactérias habitam a superfície da folha e em condições favoráveis de temperatura e umidade penetram na planta por aberturas naturais como estômatos e hidatódios (Hirano e Upper, 1983). Durante o processo de infecção, o patógeno invade os espaços intercelulares, adquire nutrientes e neutraliza as respostas de defesa da planta. Mais tarde, as células da planta adjacentes as colônias bacterianas começam a ser degradadas, as organelas vegetais degeneram-se, a parede celular entumesce e se fragmenta e finalmente as células bacterianas entram e se multiplicam dentro da célula vegetal, causando

sintomas como cloroses, necroses, murchamento, podridão, entre outros (Chan e Goodwin, 1999).

O sucesso da infecção pode depender dos fatores de virulência como os lipopolissacarídeos (LPS) e adesinas, e de um sistema que secreta proteínas para dentro da célula hospedeira e elicitam reação de hipersensibilidade em determinados hospedeiros. Estima-se que entre 20 a 100 genes estão envolvidos na fitopatogenicidade das espécies do gênero *Xanthomonas* (Chan e Goodwin, 1999; Cornelis, 2000; Valls et al., 2006; Buttner e Bonas, 2010).

Além dos LPS e das adesinas localizadas na membrana externa, outro fator de virulência muito importante é a produção de exopolissacarídeos (EPS) (Buttner e Bonas, 2010), macromolécula constituinte de todas as células microbianas. Os EPSs estão divididos em três grupos conforme sua localização: intracelular, localizado no interior da célula ou como parte da membrana citoplasmática; na parede celular, como parte estrutural da célula; extracelular, produzidos no interior da célula, sendo posteriormente secretado para o meio externo (Sutherland, 1982).

A biossíntese de EPS está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo, e além da grande importância durante a colonização, pode proteger contra dessecação, concentrar minerais e nutrientes ao redor da célula, reduzir contato com macromoléculas hidrofóbicas e aumentar a adesão às superfícies inertes ou biológicas, características que garantem a sobrevivência do fitopatógeno (Denny, 1995).

Durante a infecção, os EPSs prolongam o encharcamento dos tecidos por sua natureza hidrofílica, diminuindo o contato da bactéria com componentes tóxicos, minimizando a interação com a célula vegetal (Denny, 1995).

### 3.6 MANCHA FOLIAR DO EUCALIPTO

A Mancha Foliar em eucalipto foi reportada pela primeira vez na Austrália, na década de 70, quando Truman (1974) descreveu o declínio de árvores de *Eucalyptus citriodora*, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *eucalypti*. No Brasil, Pomella et al. (1995) descreveu lesões foliares em viveiro de eucalipto no

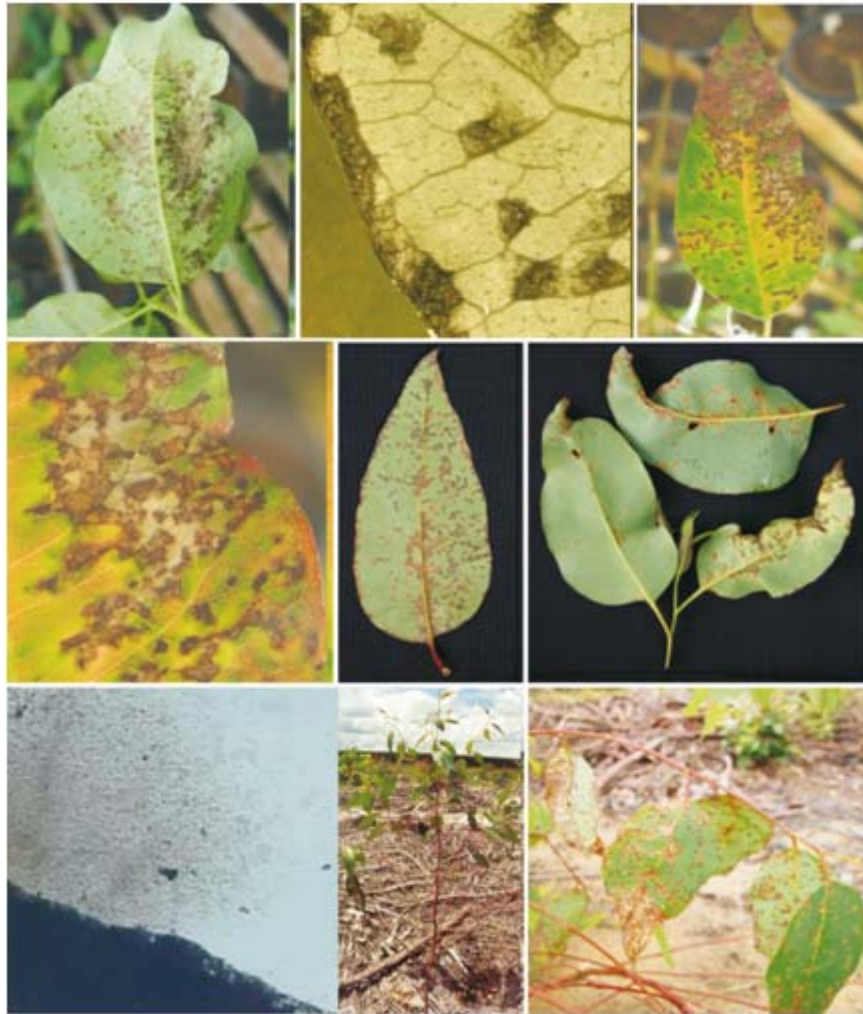
Estado de São Paulo, causados por *Pseudomonas cichorii*. A doença também foi registrada em condições de campo, associada com outras espécies de bactérias como *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas cichorii* e *Erwinia* sp. (Alfenas et al., 2001; Gonçalves et al., 2001; Reis et al., 1996), no entanto, Gonçalves e colaboradores (2008) reportam que, apesar da presença de outras espécies bacterianas associadas a doença, *X. axonopodis* é o agente etiológico predominante da mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus* sp.

Atualmente, a mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* é uma das principais doenças foliares, que vem causando grandes problemas em eucaliptos, principalmente em viveiro. Alfenas e Ferreira (2008) quantificaram as perdas registradas nos viveiros clonais do Brasil no período de 2003 a 2008, onde mais de R\$14,5 milhões de prejuízo foram relatados, devido ao descarte de mudas infectadas.

Mudas irrigadas por aspersão são mais vulneráveis à incidência da doença, devido à lâmina de água formada sobre as folhas, que facilita a disseminação, a multiplicação e a penetração do patógeno. A água livre na superfície foliar é imprescindível para que ocorra a movimentação e penetração da bactéria, uma vez que estas penetram de forma passiva por aberturas naturais, como os estômatos e hidatódios (Hirano e Upper, 1983; Beattie e Lindow, 1999).

Segundo Gonçalves (2003) e Neves (2007) a idade da folha influencia no processo de infecção, e além da água livre na superfície da folha e nos espaços intercelulares, o patógeno requer temperatura e umidade elevada para estabelecer a infecção.

No início da infecção, as folhas apresentam lesões encharcadas, angulares que se encontram entre as nervuras, distribuídas aleatoriamente ou concentradas na nervura principal. Lesões longilíneas nas bordas da folha também são bastante comuns. Com o avanço da doença, essas lesões se tornam ressecadas na cor palha, podendo apresentar orifícios nas áreas necrosadas, reduzindo a área fotossintética e conseqüentemente restringindo o crescimento da planta (figura 2). Essas mudas ficam comprometidas e inviabilizadas para o plantio, resultando no descarte. Em condições de campo, a incidência é menos freqüente, mas pode causar anelamento e morte de porções apicais (Neves, 2007; Silva, 2007; Gonçalves et al., 2008).



**Figura 2** – Sintomas da mancha foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em folhas de eucalipto (fonte: Gonçalves et al., 2008).

A prevenção da mancha foliar é realizada, basicamente, com práticas de manejo, que tem como objetivo diminuir as fontes de inóculo, assim como evitar as condições favoráveis para o desenvolvimento da infecção. As práticas mais recomendáveis são o descarte de plantas com sintomas da doença, evitar o molhamento das folhas, não utilizar clones suscetíveis nas épocas mais quentes do ano, preferir o uso de viveiros com cobertura e fazer a desinfecção dos materiais e/ou ferramentas utilizados nos plantios (Alfenas et al., 2009).

A utilização de agroquímicos nas plantações de eucalipto é muito reduzida. Quando comparado com as culturas agrícolas, observa-se que há poucos registros de inseticidas e herbicidas e não há no mercado, fungicidas e bactericidas destinados ao eucalipto (Alfenas et al., 2009). Evitar o uso de produtos químicos e

buscar novas alternativas de controle de doenças é muito importante para manter o equilíbrio da diversidade de espécies nas áreas florestais.

O controle biológico apresenta-se como uma possibilidade promissora no controle de doenças, e microrganismos antagonistas são cada vez mais utilizados com agentes de biocontrole (Shoda, 2000). Mafia et al. (2003) e Teixeira et al. (2007) reportam o uso de fungos antagonistas e de rizobactérias no controle de algumas doenças do eucalipto causadas por fungos, no entanto, há poucos relatos do controle biológico ou do uso de produtos do metabolismo no controle de *X. axonopodis* do eucalipto.

### 3.7 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS

No controle alternativo de doença estão inseridos o controle biológico e o controle induzido conhecido como indução de resistência, resistência induzida e imunização, que visam controlar doenças ou pragas com menor impacto ambiental, menos riscos para o homem e com redução de custos (Moraes, 1992).

As práticas utilizadas no controle alternativo não fazem uso de defensivos agrícolas (Moraes, 1992). É uma alternativa para tentar reduzir o uso de produtos químicos, que muitas vezes são usados indiscriminadamente, apresentando danos ao meio ambiente e riscos, tanto para o trabalhador envolvido na aplicação quanto aos consumidores (Bastos, 2003).

A diferença fundamental entre as duas formas de controle alternativo é o fato da ação controladora do controle biológico se dar diretamente sobre o patógeno, enquanto que no controle induzido a ação ocorre na planta hospedeira, modificando sua relação com o patógeno (Moraes, 1992).

O controle biológico de fitopatógenos pode ser realizado com a utilização direta de microrganismos antagônicos não patogênicos, existentes na natureza, que agem diretamente sobre a praga ou patógeno. Essa ação pode ocorrer por predação, parasitismo ou pela produção de substâncias antibióticas tóxicas (antibiose), resultando na inibição ou até mesmo na morte do patógeno. Os microrganismos antagonistas podem produzir enzimas com potencial para degradar a parede celular do fitopatógeno. O próprio patógeno também pode liberar enzimas

degradativas devido ao estresse sofrido pela falta de nutriente, oxigênio e espaço, nesse caso o controle biológico se dá de forma indireta, pela competição (Moraes, 1992; Gomes et al., 2001).

Essas substâncias eliminadas por microrganismos, principalmente bactérias, quando em competição por nicho, são produtos do metabolismo secundário produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano e não são diretamente essenciais à sobrevivência dos microrganismos que os produzem. No entanto, os microrganismos produtores de antibióticos são favorecidos em relação aos não produtores. Uma das formas de ser mais competitivo é pela produção de compostos extracelulares que inibem o crescimento de outras populações microbianas, favorecendo assim a manutenção da sua população. Esses tipos de substâncias químicas podem matar ou inibir o crescimento de outras espécies microbianas, mesmo em pequenas quantidades (Andrade, 2004).

O processo de isolamento, seleção e produção dos microrganismos antagonistas pelo homem permite que eles sejam utilizados no manejo de pragas e controle de doenças em grande escala. A obtenção e utilização de moléculas com ação antimicrobiana produzidas por microrganismos é uma alternativa de grande potencial para o controle de fitopatógenos, uma vez que mantém a densidade populacional das espécies de patógenos ou pragas em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis e não prejudica o desenvolvimento das plantas (Harman, 2000).

A utilização de compostos extracelulares bacterianos com atividade antibiótica produzidos durante o crescimento de *Pseudomonas sp.* vem sendo reportada por Rampazo (2004) e Oliveira et al. (2010) no controle do Cancro cítrico causado pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri.*, onde cerca de 93% do número de lesões foliares foram reduzidas com o uso do composto. Os ótimos resultados encontrados serviram como base e estimularam o desenvolvimento desse trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ABRAF, 2010. Anuário estatístico da ABRAF 2010, ano base 2009/ ABRAF. Brasília. p.140.
- Alfenas A.C., Gonçalves, R.C., Romeiro, R.S., 2001. Mancha foliar e desfolha de *Eucalyptus urophylla* x *E. maidenii*. Fitopatologia Brasileira 26, 294. Abstract.
- Alfenas, A.C., Ferreira, E.M., 2008. Emerging diseases in eucalyptus plantations. Fitopatologia Brasileira. 33, 25-26.
- Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Mafia, R.G., Assis, T.F., 2009. Clonagem e doenças do eucalipto. 2.ed - Viçosa, MG. Editora UFV. p.500.
- Andrade G., 2004. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: (Eds.) Ajit Varma; Lynette Abbott; Dietrich Werner; Rudiger Hampp. Plant surface microbiology. p.51-69.
- Bastos, C.N., 2003. Estratégia de Controle Biológico de Fitopatógenos do Cacaueiro. Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos, 7. Anais, p.25-27.
- Beattie, G. A., Lindow, S. E., 1999. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. Mini Review. Phytopathology 89, 353-359.
- Berguer, R., 2000. Crescimento e qualidade da madeira de um clone de *Eucalyptus saligna* Smith sob o efeito do espaçamento e da fertilização. Universidade Federal de Santa Maria, Dissertação de Mestrado. p. 106.
- Buttner, D., Bonas, U., 2010. Regulation and secretion of Xanthomonas virulence factors. FEMS Microbiol. 34, 107–133. Review.
- 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.
- Cornelis, G.R., 2000. Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. The Royal Society. 355, 681-693.
- Chan, J.W.Y.F., Goodwin, P.H., 1999. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. Biotechnology Advances. 17, 489–508.

- Denny, T.P., 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*. 33, 173 - 197.
- Drumond, M.A.; Oliveira, V.R, Rodrigues, B.S.A., 1997. Competição de Espécies e Procedências de *Eucalyptus* na Região dos Tabuleiros Costeiros do Estado de Sergipe. In: Conferência IUFRO sobre Silvicultura e Melhoramento de Eucaliptos. 1, 101 - 105.
- Eldridge, K.G.; Davidson, J., Harwood, C., WYC, G.V., 1993. *Eucalypt* domestication and breeding. Oxford science publication, 288p.
- FAO., 2000. The global outlook for future wood supply from forest plantations. Working paper GFPOS/WP/03, Rome, Italy, p.156.
- Ferreira, F.A., 1983. Ferrugem do eucalipto. *Revista Árvore*. 7, 91-109.
- Ferreira, M., Santos, P.E.T.,1997. Melhoramento Genético Florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: Breve Histórico e Perspectivas. In: Conferência IUFRO sobre Silvicultura e Melhoramento de Eucaliptos. Salvador. Colombo: EMBRAPA – Centro de Pesquisa de Florestas. 1, 14 - 34.
- 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., 2001. 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, 653 - 661.
- Gonçalves, R.C., Alfenas, A.C., Oliveira, J.R., Silva, I.T., Oda, S., Assis T.F., Tonon, A., 2001. Mancha foliar e seca de ponteiros do eucalipto causada por fitobactérias, no Brasil e na Argentina. *Fitopatologia Brasileira*. 26, p. 294. Abstract.
- Gonçalves, R.C., 2003. Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado, 94p.
- Gonçalves, R.C., Lau, D., Oliveira, J.R., Maffia, L.A., Cascardo, J.C.M., Alfenas, A.C., 2008. Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 33, 180 -188.
- Harman, G.E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. 84, 377 - 393.

- Hayward, A.C., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology. 29, 65 - 87.
- Hirano, S. S., Upper, C. D., 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 21, 243 - 270.
- Jacobs, M.R., 1971. O que o eucalipto pode fazer pelo Brasil. Projeto de Desenvolvimento e Pesquisa Florestal, Série Técnica. Rio de Janeiro, p.23.
- Jenkins, C.L., Starr, M.P., 1982. The Brominated Aryl-Polyene (Xanthomonadin) Pigments of *Xanthomonas juglandis* Protect Against Photobiological Damage. Current Microbiology. 7, 323 – 326.
- Lemessa, F., Zeller, W., 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. Biological Control 42, 336 - 344.
- Leyns, F., Cleene, M., Swings, J.G., Ley, J., 1984. The Host Range of the Genus *Xanthomonas*. The Botanical Review. 50, 308 – 352.
- Mafia, R.G., Alfenas, A.C., Maffia, L.A., Ventura, G.M., Sanfuentes, E.A., 2003. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o Controle Biológico de *Rhizoctonia solani* na Propagação Clonal de *Eucalyptus* sp. Fitopatologia Brasileira, 28, 101 – 105.
- Mangieri, H.R., Dimitri, M.J., 1971. Los eucaliptos en la silvicultura. Buenos Aires: Acme, p. 226.
- MAPA/SPA, 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. Cadeia Produtiva de Madeira. Série Agronegócios, 6, p.84.
- Moraes, W.B.C., 1992. Controle alternativo de fitopatógenos. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 27, 175 - 190.
- Neves, D.A., 2007. Condições Favoráveis à Mancha Foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em Eucalipto. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Mestrado, p.33.
- Oliveira A. G., Murate, L.S., Spago, F.R., Lopes, L.P., Beranger, J.P.O., San Martin, J.A.B., Nogueira, M.A., Andrade, C.G.T.J., Mello, J.C.P., Andrade, G., 2011. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the

- Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*. 56, 125–131.
- Pomella A.W.V, Romeiro R.S, Ferreira F.A., Oliveira J.R., 1995. Lesões foliares em viveiro de eucalipto incitadas por uma espécie fluorescente de *Pseudomonas*. *Fitopatologia Brasileira* 20, p. 374. Abstract.
- Ran, L.X., Li, Z.N., Wu, G.J., Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., 2005. Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *European Journal of Plant Pathology*. 113, 59–70.
- Rampazo, L.G.L., 2004. Avaliação do efeito de agentes biológicos e seus produtos na incidência de lesões de cancro cítrico. Universidade Estadual de Londrina. Dissertação de Mestrado, p.59.
- Reis, A.V., Souza, R.M., Castro, H.A., Cardoso, M.A.F.C., Kobayasti, L., 1996. Uma nova bacteriose em mudas de eucalipto incitada por *Xanthomonas campestris*. *Fitopatologia Brasileira* 21, p. 342. Abstract.
- SBS. Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2008. Fatos e números do Brasil florestal. Dezembro, p.93.
- Silva, A.G., 2007. Histologia e Influência de Nutrientes na Intensidade da Bacteriose Foliar do Eucalipto causada por *Xanthomonas axonopodis*. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Doutorado, p.71.
- Simões, J.W., Brandi, R.M., Leite, N.B., Balloni, E.A., 1981. Formação, manejo e exploração de florestas com espécies de rápido crescimento. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Brasília, p.131.
- Shoda, M., 2000. Bacterial Control of Plant Diseases. *Jornal of Bioscience and Bioengineering*. 89, 515 – 521. Review.
- Sutherland, I. W., 1982. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*. 23, 80 – 142.
- Starr, M.P., Stepheus, W.L., 1964. Pigmentation and taxonomy of the Genus *Xanthomonas*. *Journal of Bacteriology*. 87, 293 – 302.
- Teixeira, D.A., Alfenas, A.C., Mafia, R.G., Maffia, L.A., Ferreira, E.M., 2007. Evidências de Indução de Resistência Sistêmica à Ferrugem do Eucalipto

Mediada por Rizobactérias Promotoras do Crescimento em Plantas. *Fitopatologia Brasileira*. 30, 350 – 356.

Tonini, H., Schneider, P.R., Finger, C.A.G., 2006. Curvas de índice de sítio para povoamentos clonais de *Eucalyptus saligna* Smith para a depressão central e serra do sudeste, Rio Grande do sul. *Ciência Florestal*. 16, 27 - 43.

Truman, R., 1974. Die-back of *Eucalyptus citriodora* Caused by *Xanthomonas eucalypti* sp.n. *Phytopatology*. 64, 143 – 144.

Valls, M., Genin, S., Boucher, C., 2006. Integrated Regulation of the Type III Secretion System and Other Virulence Determinants in *Ralstonia solanacearum*. *Plos Pathogens*. 2, 798 - 807.

White, F.F., Potnis, N., Jones, J.B., Koebnik, R., 2009. The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology*. 6, 749–766. Review.

**ARTIGO**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA *IN VITRO* DE COMPOSTOS EXTRACELULARES SOBRE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* E NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR EM EUCALIPTO.

**Lucilene de Paula Lopes, Admilton Gonçalves de Oliveira, Jamile Priscila de Oliveira Beranger, Flavia Regina Spago, Cíntia Greice Matsuoca Góis, Juca Abramo Barrera San Martin, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, João Carlos Palazzo de Mello, and Galdino Andrade.**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA *IN VITRO* DE COMPOSTOS EXTRACELULARES SOBRE *XANTHOMONAS AXONOPODIS* E NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR EM EUCALIPTO.

**Lucilene de Paula Lopes<sup>1</sup>, Admilton Gonçalves de Oliveira<sup>1</sup>, Jamile Priscila de Oliveira Beranger<sup>1</sup>, Flavia Regina Spago<sup>1</sup>, Cíntia Greice Matsuoca Góis<sup>1</sup>, Juca Abramo Barrera San Martin<sup>2</sup>, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade<sup>2</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>3</sup>, and Galdino Andrade<sup>1</sup>.**

### Resumo

A mancha foliar, causada por *Xanthomonas axonopodis*, é uma das principais bacterioses que afeta a cultura do eucalipto. O patógeno causa lesões foliares que diminuem a área fotossintética e impedem o crescimento da planta. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibiótica de metabólitos produzidos por *Pseudomonas* sp., extraídos com diclorometano e fracionados por cromatografia líquida a vácuo, contra *X. axonopodis*. A atividade antibiótica da fase acetato de etila (F3) foi determinada por testes de difusão em agar, bioautografia, determinação da concentração inibitória mínima e ação sobre a morfologia das células de *X. axonopodis*, por microscopia eletrônica de varredura. Em experimento em casa de vegetação, mudas de eucalipto foram pulverizadas com F3 antes ou depois da infecção com *X. axonopodis*. Resultados da microscopia eletrônica mostraram mudanças nos exopolissacarídeos e na morfologia das células tratadas. Em plantas pulverizadas com F3 e inoculadas com *X. axonopodis*, o número de lesões foliares foi 93.9% menor, quando comparado com as plantas não tratadas. Conclui-se que F3 apresenta atividade antibiótica contra *X. axonopodis* e pode ser uma alternativa no controle da mancha foliar em mudas de eucalipto.

**Palavras - chave:** Mancha foliar. Eucalipto. *Xanthomonas axonopodis*. Atividade antibiótica. Antimicrobiano.

### Abstract

The bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas axonopodis*, is considered a major problem in eucalyptus seedlings production. The pathogen cause leaf lesion that reduces the area of photosynthesis and prevents plant growth. The objective of this study was to evaluate the antibiotic activity of the metabolite produced by *Pseudomonas* sp., extracted with dichloromethane and fractionated by vacuum liquid

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brazil. Caixa Postal 6001. CEP 86051-990. Brazil. Phone/Fax: +55-43-3371-4791. E-mail: andradeg@uel.br

<sup>2</sup> Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Farmácia e Farmacologia, Laboratório de Produtos Fitoterápicos Universidade Estadual de Maringá, Maringá, CEP 87020-900, Brazil

chromatography, against *X. axonopodis*. The antibiotic activity of ethyl acetate phase (F3) was determined by agar diffusion tests, bioautography determination of minimum inhibitory concentration and action on the cell morphology of *X. axonopodis*, by scanning electron microscopy. In greenhouse experiment, eucalyptus seedlings were sprayed with F3 before or after *X. axonopodis* infection. Electron microscopy results showed changes in exopolysaccharides and cell morphology of cells treated. In plants sprayed with F3 and inoculated with *X. axonopodis*, the number of leaf lesions was 93.9% lower when compared with untreated plants. We conclude that F3 showed antibiotic activity against *X. axonopodis* which could help on the control of bacterial leaf spot in eucalyptus seedlings.

**Keywords:** Leaf spot. Eucalyptus. *Xanthomonas axonopodis*. Antibiotic activity. Antimicrobial.

## 1 INTRODUÇÃO

A mancha foiar causada por *Xanthomonas axonopodis* é uma das principais doenças foliares que afeta a cultura do eucalipto (Gonçalves et al., 2008; Alfenas et al., 2009). No estágio inicial da bacteriose, as plantas apresentam lesões angulares encharcadas concentradas ao longo da nervura principal, nas margens da folha ou distribuídas aleatoriamente sobre o limbo. Com o progresso da doença essas lesões se tornam ressecadas, reduzem a área fotossintética, comprometem o crescimento da planta e causam desfolha (Gonçalves et al., 2008).

O controle da bacteriose, basicamente, consiste na prática de manejo que reduz as fontes de inóculo e as condições que favorecem a infecção. A estratégia de prevenção mais utilizada é o uso de ferramentas e/ou materiais de cultivo livres de contaminação, além de preterir o uso de clones suscetíveis e irrigação por aspersão (Alfenas et al., 2009). A mancha foliar incide intensamente em mudas irrigadas por aspersão, uma vez que neste processo, um filme de água é formado no filoplano das plantas, sendo de fundamental importância para a disseminação, multiplicação e penetração do patógeno (Beattie e Lindow, 1999; Hirano e Upper, 1983).

A aplicação de defensivos agrícolas para prevenir a bacteriose, assim como pragas e outras doenças, não é comum na eucalipultura. As intervenções com agroquímicos são menos freqüentes em eucalipto quando comparadas com culturas agrícolas, desta forma poucos herbicidas, inseticidas, fungicidas e bactericidas são registrados para eucalipto. (Alfenas et al., 2009). A busca por novas opções de controle se torna necessária, uma vez que as formas de

prevenções atuais não eliminam o risco de infecção por completo e milhões de mudas são descartadas anualmente em decorrência dos altos índices da doença (Alfenas e Ferreira, 2008). Optar por uma forma alternativa de controle sem a utilização de agroquímicos é recomendável para garantir o equilíbrio biológico e manter a biodiversidade nas áreas florestais.

A busca por microrganismos com potencial uso como agentes de biocontrole apresenta-se como uma estratégia promissora no controle de doenças causadas por bactérias e fungos em plantas (Shoda, 2000; Byrne et al., 2005; Ran et al., 2005; Lemessa e Zeller, 2007). Compostos do metabolismo secundário produzidos por espécies antagonistas, quando em competição, podem inibir o crescimento de espécies patogênicas. A produção, purificação e uso desses compostos também pode ser uma estratégia viável no controle de fitopatógenos (Harman, 2000; Oliveira et al., 2011).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da fração FD (fase diclorometano) produzida por *Pseudomonas* sp. (cepa LV) e das demais frações F obtida de FD após o fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV), no controle da mancha foliar em mudas de eucalipto, e na ultraestrutura de células de *X. axonopodis*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 CEPAS BACTERIANAS**

A bactéria fitopatogênica *X. axonopodis*, isolado BSC475a, cuja sequência está depositada no GenBank (acesso EF101967), foi gentilmente cedida pelo Dr. Acelino Couto Alfenas (Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil).

O agente de biocontrole utilizado foi a *Pseudomonas* sp. (cepa LV), isolada no Município de Astorga, PR, Brasil (Rampazo, 2004). As cepas utilizadas nos experimentos foram criopreservadas em solução de glicerol 20% em nitrogênio líquido.

## 2.2 PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

A produção, extração e fracionamento dos compostos antibióticos foram realizados de acordo com Oliveira et al. (2011), (Patente 2008; Processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para o controle de doenças causadas por bactérias em plantas, 10 de setembro - PI 0803350-1; [www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br)).

A cepa LV foi cultivada em meio líquido (caldo nutriente adicionado de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ) por 15 dias a  $28^\circ\text{C}/100 \text{ rpm}$ . Após o cultivo, as células foram peletizadas por centrifugação e descartadas ( $9.000 \text{ rpm}/20 \text{ min.}/4^\circ\text{C}$ ). O sobrenadante livre de células foi transferido para funis de separação de 2000 mL, onde foi realizada partição líquido-líquido na razão 1:1 (v/v) em alíquotas de 500 mL do sobrenadante e 500 mL do solvente orgânico (diclorometano).

A fase diclorometano (FD) obtida foi concentrada em evaporador rotatório a  $40^\circ\text{C}$ , e em seguida, o volume final foi evaporado em ventilador a temperatura ambiente ao abrigo da luz. O composto concentrado foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado por 24h.

Posteriormente a FD obtida no processo de partição foi fracionada pelo método de cromatografia líquida a vácuo (CLV), em coluna de vidro (20 mm  $\Phi$  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. As seis frações obtidas: (F1) hexano; (F2) diclorometano; (F3) acetato de etila; (F4) metanol; (F5) metanol e água destilada e (F6) água destilada foram concentradas em evaporador rotatório a  $40^\circ\text{C}$ , em seguida, o volume final foi evaporado em ventilador a temperatura ambiente ao abrigo da luz. O composto concentrado de cada fração foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado por 24h.

## 2.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A CCD foi realizada para avaliação analítica qualitativa dos componentes das frações obtidas nos processos de separação, utilizando-se

cromatoplasas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck®) em suporte de alumínio. O sistema eluente (fase móvel) utilizado foi uma mistura de éter de petróleo/diclorometano/acetato de etila/metanol. Luz ultravioleta (comprimento de onda, 254 nm e 366 nm) e a técnica CCD Bioautografia, foram os agentes utilizados para a revelação das placas. A velocidade de migração dos constituintes da mistura foi caracterizada por um valor numérico, *R<sub>f</sub>*, que exprime a relação entre a distância percorrida pelo composto desde a origem ( $\Delta x$ ), pela frente do solvente desde a origem ( $\Delta y$ ).

## 2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

### 2.4.1 CCD Bioautografia

A fim de determinar qualitativamente a atividade antibiótica das frações, o teste de CCD Bioautografia (Rahalison et al. 1991) foi realizado, onde as cromatofolhas foram depositadas em placas de Petri inoculadas com suspensão de *X. axonopodis* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, D.O 0.1,  $\lambda = 590$  nm), pelo método de pour plate. As placas foram incubadas a 24h/28 °C, e a leitura foi realizada através da medida do diâmetro dos halos de inibição (mm), revelados em solução de cloreto de 2,3,5-trifenil-1H-tetrazólio (TTC) a 1% .

### 2.4.2 Difusão em Agar

A avaliação da ação antibiótica de todas as frações foi realizada utilizando discos de antibiograma feitos de papel filtro de 6 mm. O desenho experimental foi conduzido com 1 concentração e 7 frações, com duas repetições cada (7 x 1 x 2, n = 14). O inóculo de *X. axonopodis* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) foi semeado em meio de cultura AN (ágar nutriente), utilizando swab umedecido no inóculo. Alíquotas de 5µL de cada fração, contendo 1000 µg, foram adicionadas nos discos e incubados 24h/28°C. A leitura foi realizada medindo-se o diâmetro dos halos de inibição (mm), obtendo-se a média para cada fração.

#### 2.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM da fração F3 foi realizada em placas de cultura de células com 24 poços. O desenho experimental foi de 6 concentrações da F3 com 4 repetições cada (6 x 4, n = 24). Como controle negativo foi considerado o meio de cultura em caldo inoculado com água destilada estéril e como controle positivo, meio de cultura em caldo inoculado com suspensão de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de *X. axonopodis*. Foram adicionados em cada poço, 0.9 mL de caldo nutriente, 50µL de suspensão da bactéria e 50µL dos estoques de F3, nas concentrações de 3.12; 6.25; 12.5; 25; 50 e 100µg mL<sup>-1</sup>. Após a incubação de 24 h/28°C, foram adicionados 10µL de solução de cloreto de 2, 3, 5-trifenil tetrazólio (TTC) a 1% em cada poço, com incubação por mais 20 min./28 °C. A leitura foi realizada observando a mudança de cor, causada pela viabilidade celular, considerada sensível (-) na ausência de cor e resistente (+) na presença de coloração rosa - avermelhada.

Após a determinação da CIM, alíquotas de 10µL da suspensão de *X.axonopodis* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) crescidas em caldo nutriente com F3 (100µg mL<sup>-1</sup>) e sem F3, nos tempos de cultivo de 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 20 horas, foram plaqueadas em meio de cultura AN, em 3 repetições cada, com incubação por 24 h/28 °C. Após a incubação, o número de UFC de cada tempo foi calculado, com objetivo de avaliar o tempo mínimo que a F3 leva para inviabilizar todas as células.

#### 2.4.4 Avaliação da Atividade Antibiótica de F3 sobre o Desenvolvimento da Mancha Foliar em Mudas de Eucalipto

O clone de *E. urograndis* 1404 (híbrido de *E.urophylla* e *E. grandis*) utilizado no experimento, gentilmente cedido pela Indústria de Papel Klabin (Telêmaco Borba, PR, Brasil), tem como característica alta sensibilidade a Mancha Foliar causada pela *X. axonopodis*. As mudas foram cultivadas em sacos de 2L de solo do tipo Rhodic Ferrasol (FAO, 1994) não estéril, na proporção de 1:1 solo e areia, mantidas em casa de vegetação em temperatura ambiente e regadas conforme a necessidade, com água de torneira.

O experimento foi realizado com mudas de 90 dias com 15 folhas cada, em blocos casualizados, tendo como desenho experimental 2 tempos de aplicação da fração F3 (pré e pós) na concentração de 1.000µg mL<sup>-1</sup>. No controle

negativo, as plantas foram pulverizadas com água destilada estéril e no controle positivo, com suspensão de *X. axonopodis* ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) em 5 repetições (4 x 1 x 5, n = 20). Antes da inoculação, as mudas foram regadas e cobertas com sacos de polietileno, formando uma câmara úmida por 24 horas. No pré - tratamento, cada planta foi pulverizada com 8 mL de F3, com incubação por 24 horas, e inoculadas com suspensão de *X. axonopodis*, com mais 24 horas de incubação em câmara úmida. No pós - tratamento, as plantas foram primeiramente inoculadas com a suspensão de *X. axonopodis* e após 24 horas pulverizadas com F3, os métodos de pulverização e manutenção em câmara úmida foram os mesmos descritos anteriormente. O número de lesões por planta foi avaliado, aos 15, 20 e 30 dias após a inoculação. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Tukey, ( $p < 0.05$ ).

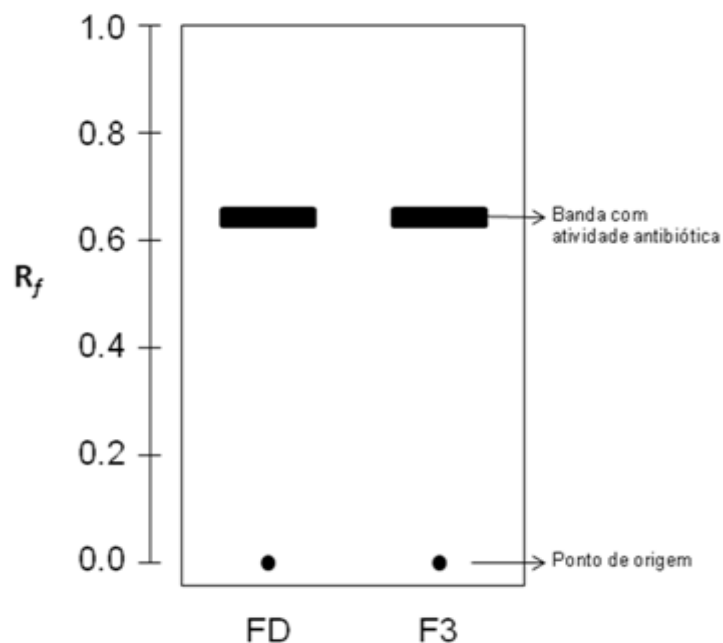
#### 2.4.5 Análise Ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de *X. axonopodis* utilizadas no estudo de microscopia eletrônica foram obtidas a partir do cultivo de células em tubos com caldo nutriente (24 h/ 28 ° C/ 100 rpm). A cultura em fase log foi ajustada a concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> e 10 mL da suspensão de *X. axonopodis* foram amostrados em 12 tubos adicionados de 200ug mL<sup>-1</sup> de F3. Quatro tubos com caldo nutriente na ausência de F3 foram considerados controle e incubados por 6 h/28°C/100 rpm. Em três diferentes tempos (após uma, três e seis horas) alíquotas de 20µL dos tratamentos foram transferidas para lâminas de vidro previamente revestidas com poli-lisina e colocadas em estufa a 28°C por 1 h para secagem. Em seguida, as lâminas foram fixadas em uma solução contendo 2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por um período de 12 h. Após a fixação, as lâminas foram lavadas com tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2) e pós-fixadas em uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio por 2 h. As amostras foram desidratadas em etanol nas concentrações de 100, 90, 80 e 70%, e posteriormente secas ao ponto crítico de CO<sub>2</sub> (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). Após a secagem, as lâminas foram revestidas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater), e finalmente visualizadas sob microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CCD Bioautografia

Na técnica de CCD Bioautografia foi observada a presença de uma banda com atividade antibiótica em FD que se repetiu em F3, apresentando o mesmo valor de  $R_f$  (0.66). Nas demais frações nenhuma banda apresentou atividade antibiótica frente a *X. axonopodis* (Figura 1).



**Figura 1** – Esquema da Cromatografia em Camada Delgada e Bioautografia da fase diclorometano (FD), extraída de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas* sp. cepa LV, e da fase acetato de etila (F3) obtida a partir de FD por cromatografia líquida a vácuo (CLV).

#### 3.2 Difusão em Agar

Na avaliação da ação antibiótica por difusão em agar foi observada a formação de halos de inibição com médias de 23.5 e 30.5 mm de diâmetro nas frações FD e F3, respectivamente. As frações F1, F2, F4, F5 e F6 não apresentaram efeito antibiótico frente a *X. axonopodis*, não havendo a presença de halos de inibição (Tabela 1).

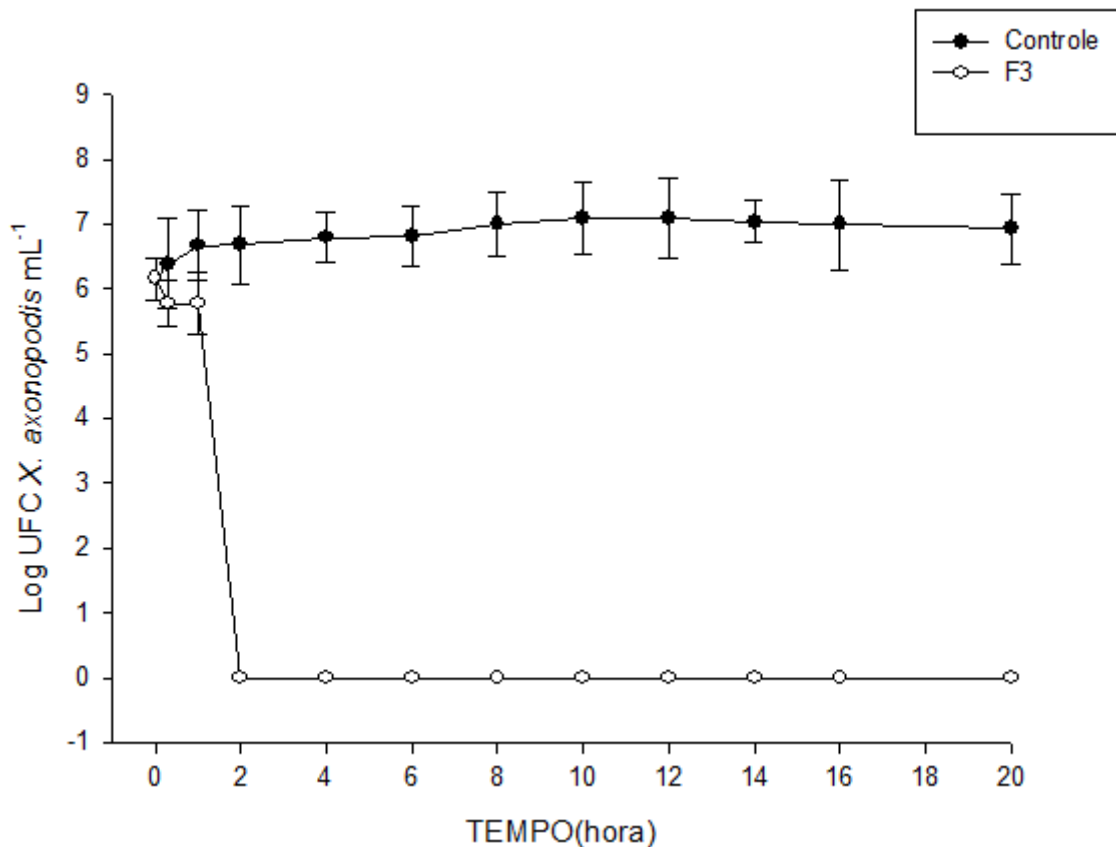
**Tabela 1** – Avaliação da atividade antibiótica do extrato bruto FD (fase diclorometano) e das suas frações purificadas por cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando seis fases móveis com polaridade crescente (F1, 100% de hexano; F2, diclorometano 100%; F3 acetato de etila 100%; F4, metanol 100%; F5 metanol / água (1:1, v / v) e F6, água 100%), frente a *Xanthomonas axonopodis*

AMOSTRAS (Diâmetro do Halo de inibição em mm) <sup>α</sup>								
Frações <sup>α</sup>	FD <sup>α</sup>	F1 <sup>α</sup>	F2 <sup>α</sup>	F3 <sup>α</sup>	F4 <sup>α</sup>	F5 <sup>α</sup>	F6 <sup>α</sup>	CN <sup>α</sup>
Médias <sup>α</sup>	23.5±0.7 <sup>α</sup>	- <sup>α</sup>	- <sup>α</sup>	30.5±2.1 <sup>α</sup>	- <sup>α</sup>	- <sup>α</sup>	- <sup>α</sup>	- <sup>α</sup>

(-) Ausência de halo de inibição; CN Controle Negativo.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DA CIM

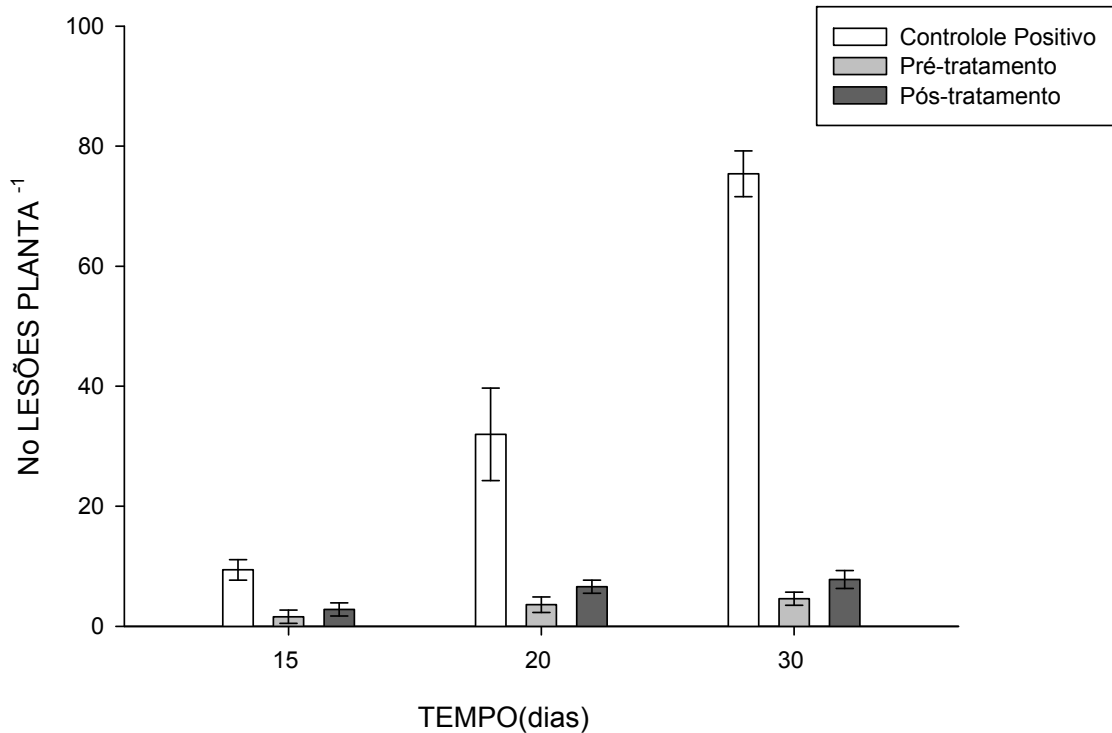
A CIM de F3 frente a *X. axonopodis* foi de 100µg mL<sup>-1</sup>. A cultura de *X. axonopodis* quando tratada com a CIM de F3, diminuiu significativamente o número de UFC com apenas uma hora de cultivo e após duas horas, todas as células observadas estavam mortas, quando comparadas com a cultura não tratada (Figura 2).



**Figura 2** – Curva de crescimento de *Xanthomonas axonopodis* tratada e não tratada com F3 (fase acetato de etila 100%) obtida por cromatografia líquida a vácuo (CLV) da FD (fase diclorometano), extraída de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas* sp. Cepa LV, na concentração de 100 ug mL<sup>-1</sup>.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE F3 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA BACTERIOSE EM MUDAS DE EUCALIPTO

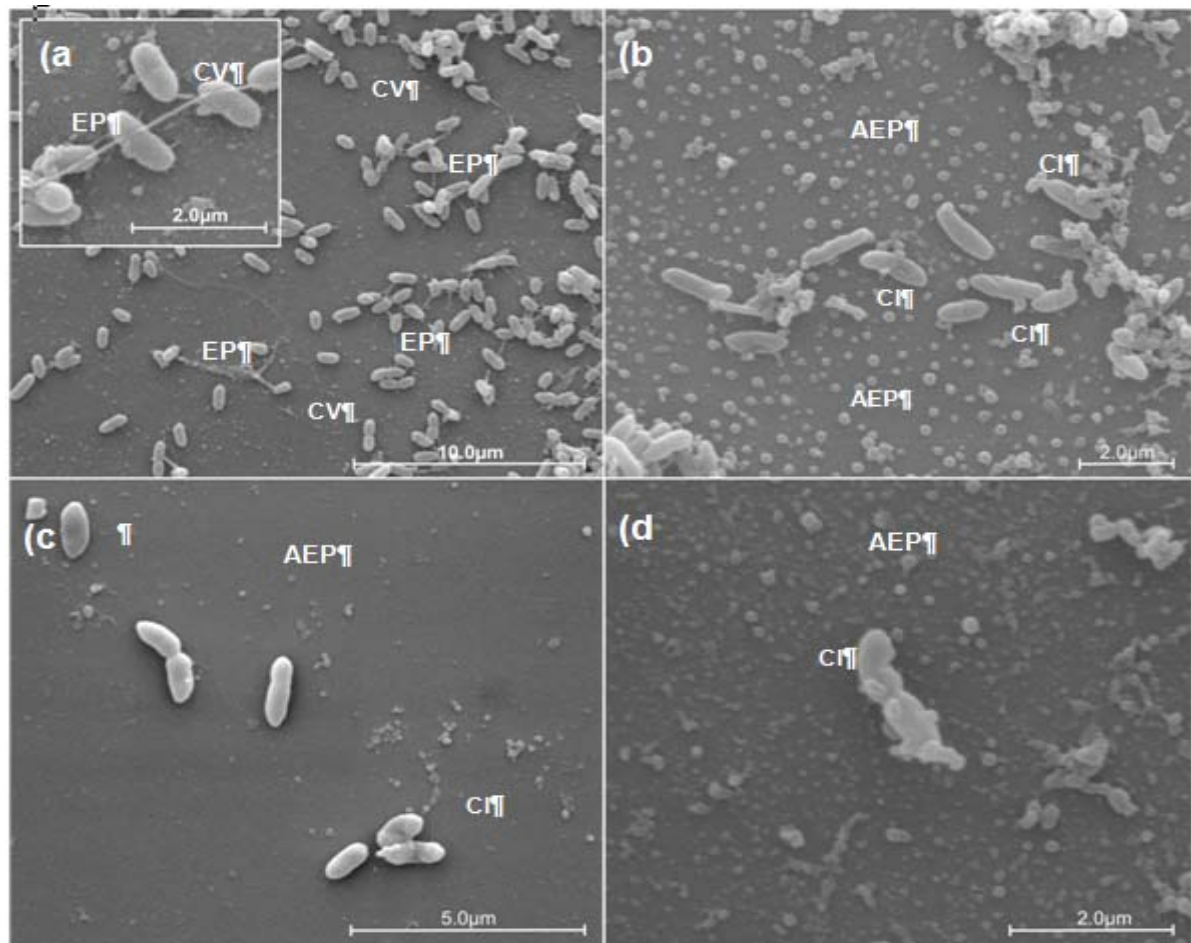
Nas plantas do controle negativo (não tratadas e não infectadas) não foi observada a presença de lesões, já no controle positivo (infectadas com *X. axonopodis* e não tratadas) foi observado crescente número de lesões, apresentando médias de 9.4, 32.0 e 75.4 aos 15, 20 e 30 dias após a inoculação, respectivamente. Tanto no pré quanto no pós-tratamento, o número de lesões diminuiu significativamente em relação ao controle positivo. No entanto, não houve diferenças significativas entre o tempo de aplicação em nenhuma das avaliações (Figura 3). Após 30 dias da infecção as plantas tratadas com F3 reduziram o número de lesões em 93.9% no pré- tratamento e 89.7% no pós, quando comparados com o controle positivo.



**Figura 3** – Avaliação da atividade antibiótica da fração F3 (fase acetato de etila 100%) obtida por cromatografia líquida a vácuo (CLV) da FD (fase diclorometano), extraída de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas* sp. cepa LV, sobre o desenvolvimento da Mancha Foliar causada por *Xanthomonas axonopodis* em mudas de Eucalipto, após 15, 20 e 30 dias de inoculação, na concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 3.5 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL POR MEV

Na avaliação por MEV, as células da cultura controle, não tratadas, estavam intactas sem nenhuma alteração morfológica na parede celular nem no citoplasma e com a presença de exopolissacarídeos (EPS) (Figura 4A). Após 1 hora de tratamento com a fração F3, as células de *X. axonopodis* apresentaram alterações morfológicas na parede celular e ausência de exopolissacarídeos (Figura 4B). A partir de 3 horas de tratamento as células já apresentavam severas alterações na parede celular e lise celular (Figuras 4C e 4D).



**Figura 4** – Microscopia eletrônica de varredura de células de *Xanthomonas axonopodis* tratadas e não tratadas com fração F3 (fase acetato de etila 100%) obtida por cromatografia líquida a vácuo (CLV) da FD (fase diclorometano), extraída de metabólitos secundários produzidos por *Pseudomonas* sp. cepa LV. (A) Células controle, não tratadas (5.000x; 20.000x); (B) Células de *X. axonopodis* após 1 de tratamento (10.000x), (C) Células de *X. axonopodis* após 3 horas de tratamento (10.000), (D) células de *X. axonopodis* após 6 horas de tratamento (20.000x). Células viáveis (CV); células inviáveis (CI); exopolissacarídeos (EP); ausência de exopolissacarídeos (AEP).

#### 4 DISCUSSÃO

Muitos autores relatam o uso de microrganismos como fungos antagonistas, rizobactérias e principalmente bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, como agentes de biocontrole de doenças em plantas (Shoda, 2000, Byrne et al., 2005; Lemessa e Zeller, 2007; Mafia, 2009; Todorova e Kozhuharova, 2010), no entanto, há poucos relatos sobre o uso de microrganismos ou de compostos de metabolismo secundário no controle de *X. axonopodis* do eucalipto.

Apesar da importância da mancha foliar causada por *X. axonopodis* e dos grandes prejuízos ocasionados pelos altos índices da bacteriose,

principalmente nos viveiros clonais, pouco se sabe sobre o processo de infecção e seu desenvolvimento em eucalipto (Alfenas e Ferreira, 2008; Alfenas et al., 2009).

Os resultados deste estudo revelam que a F3 em comparação com as demais frações F possui maior atividade antibiótica frente a *X. axonopodis*. O efeito antibiótico aumentou quando a fração foi purificada, sendo a F3 um composto extraído a partir de FD por CLV, demonstrando que os compostos com ação antibiótica possui alta solubilidade ao solvente acetato de etila.

Na concentração de  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  de F3, *X. axonopodis* apresentou sensibilidade nos testes de CIM a partir da primeira hora de incubação. Nos experimentos em casa de vegetação, a F3 não apresentou efeito fitotóxico, e se mostrou eficiente no controle da bacteriose em mudas de eucalipto, diminuindo significativamente o número de lesões foliares, tanto no pré quanto no pós-tratamento. Comparando este estudo com os resultados encontrados por Oliveira et al. (2011), observou-se que a mesma fração F3 também possui alta atividade antibiótica contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xcc*), diminuindo 93.5% o número de lesões do cancro cítrico em laranjas. Nos resultados de Vasconcelos (2009) a F3 reduziu cerca de 80% o número de lesões foliares causadas por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, em mudas de pessegueiro. A fração F3, portanto, se mostrou tão eficiente no controle da mancha foliar do Eucalipto quanto no controle do cancro em laranjas e da mancha foliar do pessegueiro, podendo inferir que bactérias do gênero *Xanthomonas* possuem alta sensibilidade ao composto F3.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ji et al. (2008) no uso de cepas de *Lysobacter antibioticus* isolada da rizosfera de cultura de arroz no controle de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), responsável pelo crestamento bacteriano em arroz, onde a inoculação de plantas suscetíveis ao patógeno com sobrenadante de cultura de células de *L. antibioticus*, reduziu a incidência da doença quando comparados com as plantas controle, inoculadas com água. Em experimento de difusão em agar, Ji et al. (2008) relata que 5 frações obtidas pela extração do sobrenadante com acetato de etila e fracionamento por CCD, também apresentaram formação de halos inibitórios contra *Xoo*. Os resultados demonstram que, assim como a fração F3, os compostos com atividade antibiótica obtidos por *L. antibioticus*, foram produzidos durante o cultivo das células antagonistas e apresentaram solubilidade em acetato de etila.

Nos estudos de MEV foi observada na cultura tratada com F3, ausência de EPS, sendo que este efeito pode estar relacionado com a degradação ou com a deficiência na biossíntese de EPS, no entanto outros estudos devem ser realizados para determinar quais dos processos estão efetivamente envolvidos. Considerando a importância da formação de EPS no processo infeccioso de bactérias em plantas, é possível relacionar essa ausência, com a redução da formação de lesões nas plantas tratadas com F3 e infectadas com *X. axonopodis*. Dharmapuri e Sonti (1999) reportam que a produção de EPS é um fator de virulência importante no processo de infecção de *Xoo* em arroz. Kemp et al. (2004) relata que cepas mutantes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* com deficiência na biossíntese de EPS, quando infiltradas na planta, foram incapazes de se multiplicar e causar os sintomas típicos do crestamento bacteriano em mandioca. O mesmo ocorre para *Ralstonia solanacearum*, responsável pela murcha bacteriana em uma vasta gama de hospedeiros, incluindo o eucalipto. Segundo Denny (1995), cepas mutantes de *R. solanacearum* não produtoras de EPS apresentam redução na virulência, podendo perder sua patogenicidade.

Além da ausência de EPS, foi observado em MEV, alterações morfológicas severas na parede celular, e embora o mecanismo de ação de F3 ainda não esteja estabelecido, os resultados sugerem que as deformidades na parede celular podem ter ocasionado a lise das células. No trabalho desenvolvido por Zhang et al., (2008), alterações morfológicas similares foram observadas na parede celular de bactérias gram-negativas como *Xoo* e *Escherichia coli*, e gram-positivas como *Micrococcus subtilis* e *Bacillus subtilis*, tratadas com o sobrenadante de proteínas Hpa2, clonadas de *Xoo*. O autor relata que as proteínas Hpa2 possuem atividade lítica que causaram as deformidades na parede e levaram ao extravasamento do conteúdo celular.

Os resultados deste estudo se mostraram relevantes e sugerem que a fração F3 obtida por CLV a partir de FD, produzida por *Pseudomonas* sp., pode ser uma nova alternativa no controle da *Xanthomonas axonopodis* do eucalipto. No entanto, futuros trabalhos devem ser realizados a fim de purificar, determinar e identificar as moléculas efetivamente envolvidas na atividade antibiótica.

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que possibilitou a realização deste estudo concedendo bolsas de estudos para PIBIC, MSc. e PhD. A Indústria de Papel Klabin, que disponibilizou mudas de eucalipto que foram utilizadas nos experimentos.

## REFERÊNCIAS

- Alfenas, A.C., Ferreira, E.M., 2008. Emerging diseases in eucalyptus plantations. *Fitopatologia Brasileira* 33, 25 - 26.
- Alfenas, A.C., Zauza, E.A.V., Mafia, R.G., Assis, T.F., 2009. Clonagem e doenças do eucalipto. 2.ed - Viçosa, MG. Editora UFV. p.500.
- Beattie, G. A., Lindow, S. E., 1999. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. Mini Review. *Phytopathology* 89, 353 - 359.
- 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.
- Denny, T.P. 1995. Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis 33, 173-197.
- Dharmapuri, S., Sonti, R.V., 1999. A transposon insertion in the gumG homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiology Letters* 179, 53 - 59.
- Gonçalves, R.C., Lau, D., Oliveira, J.R., Maffia, L.A., Cascardo, J.C.M., Alfenas, A.C., 2008. Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 33, 180 -188.
- Harman, G.E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84, 377 - 393.
- Hirano, S. S., Upper, C. D., 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 21, 243 - 270.

- Ji, G.H., Wei, L.F., He, Y.Q., Wu, Y.P., Bai, X.H., 2008. Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13-1. *Biological Control* 45, 288 – 296.
- Kemp, B. P, Horne, J., Bryant, A., Cooper, R. M., 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gum D gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*). *Physiology Molecular Plant Pathology* 64, 209 – 218.
- Lemessa, F., Zeller, W., 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control* 42, 336 - 344.
- Mafia, R.G., Alfenas, A.C., Maffia, L.A., Ferreira, E.M., Binoti, D.H.B., Mafia, G.M.V., 2009. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. *Tropical Plant Pathology* 34, 10-17.
- Oliveira A. G., Murate, L.S., Spago, F.R., Lopes, L.P., Beranger, J.P.O., San Martin, J.A.B., Nogueira, M.A., Andrade, C.G.T.J., Mello, J.C.P., Andrade, G., 2011. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control* 56, 125 – 131.
- Patent, 2008. Process of production, purification and obtation of substances with antibiotic activity to control diseases caused by bacteria in plants September 10th.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., Frenk, E., 1991. A. Bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis* 2, 199-203.

- Ran, L.X., Li, Z.N., Wu, G.J., Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., 2005. Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *European Journal of Plant Pathology* 113, 59–70.
- 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.
- Shoda, M., 2000. Bacterial Control of Plant Diseases. *Jornal of Bioscience and Bioengineering* 89, 515 – 521. Review.
- Todorova, S., Kozhuharova, L., 2010. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World J Microbiol Biotechnol* 26, 1207 - 1216.
- Vasconcellos, F.C.S., 2009. Antibiotic activity of the extracellular compound produced by *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni*. Universidade Estadual de Londrina. Master thesis. Brasil. p. 57.
- Zhang, J., Wang, X., Zhang, Y., Zhang, G., Wang, J., 2008. A conserved Hpa2 protein has lytic activity against the bacterial cell wall in phytopathogenic *Xanthomonas oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 79, 605–616.