



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
LABORATÓRIO DE ECOLOGIA MICROBIANA

FLÁVIA REGINA SPAGO DE CAMARGO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AGENTES
BIOLÓGICOS E SEUS PRODUTOS NO CONTROLE
DA CANCRO CÍTRICO CAUSADO POR *Xanthomonas*
axonopodis pv. *citri***

FLÁVIA REGINA SPAGO DE CAMARGO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AGENTES
BIOLÓGICOS E SEUS PRODUTOS NO CONTROLE DA
CANCRO CÍTRICO CAUSADO POR *Xanthomonas*
axonopodis pv. *citri***

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
2006

FLÁVIA REGINA SPAGO DE CAMARGO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE AGENTES
BIOLÓGICOS E SEUS PRODUTOS NO CONTROLE DA
CANCRO CÍTRICO CAUSADO POR *Xanthomonas*
axonopodis pv. *citri***

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Prof. Dr. Martin Homechin

Londrina, 16 de fevereiro de 2006.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, à equipe do Laboratório de Ecologia Microbiana da UEL e a todos os meus amigos que me acompanharam e ajudaram em mais essa etapa.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui e por ter me dado fé para sempre prosseguir.

Ao Prof. Dr. **Galdino Andrade**, pela orientação, incentivo, pelos exemplos profissionais e pela grande amizade cultivada ao longo desses quatro anos de convivência.

Ao Dr. **Rui Pereira Leite Jr.**, pelo fornecimento da cepa estudada, das mudas de laranja e de informações sem as quais esse trabalho não seria realizado.

Ao Prof. **Dr. João Carlos Pallazzo de Mello**, pela colaboração ao longo de todo o trabalho, pela concessão do laboratório e de materiais para a realização do mesmo, pelas idéias valiosas e pela amizade.

À minha mãe **Irene**, pelo amor e carinho, pelo companheirismo e pelo incentivo e apoio nas minhas decisões profissionais, meu muito obrigado.

A todos do **laboratório de Ecologia Microbiana** da UEL e do **laboratório de Farmacognosia** da UEM pela amizade, ajuda e aprendizado em todo esse tempo de convívio.

Ao técnico **Márcio Ferreira Cruz**, pela amizade e por toda a ajuda e agilidade com a burocracia.

À **Coordenação do Mestrado**, por fornecer as condições necessárias para a realização deste curso.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus grandes amigos **Alexandre, André, Andréa, Ariane, Gisele, Graziela, Juliana, Kiel, Letícia, Wanner**, companheiros de todas as horas, pela amizade, pelos muitos momentos que rimos juntos e também por aqueles que choramos juntos. Obrigada pelo apoio, pela força, pela paciência e pelo carinho.

CAMARGO, Flávia Regina Spago. **Avaliação do potencial de agentes biológicos e seus produtos no controle do cancro cítrico causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Londrina, 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

O Cancro cítrico asiático, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) (Hasse), é uma doença mundialmente conhecida na maioria das áreas de produção comercial de citrus. Estratégias limitadas existem para o controle do cancro cítrico nos cultivares mais susceptíveis. A aplicação de microrganismos como agentes para controlar a doença é um grande progresso ecológico para solucionar o problema. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e bactérias antagonistas (EC, FRC, LV e LN) e seus produtos (suspensões bacterianas, sobrenadantes livre-de-células e a fração acetato de etila obtida pelo tratamento do sobrenadante de LN com solventes orgânicos) foram testados para o controle da população de Xac, da incidência e severidade do cancro cítrico em folhas de laranja (*Citrus sinensis* cv. Valencia). Os produtos bacterianos foram pulverizados nas folhas ou deixados em contato direto com as mesmas antes (pré) ou após (pós) a inoculação de Xac. Os resultados mostraram uma redução na população de Xac quando a suspensão bacteriana da cepa EC foi aplicada. Em outro experimento todas as cepas reduziram o número de lesões e a área de lesão quando as folhas foram tratadas com o sobrenadante livre-de-células, também foi observado o mesmo efeito quando as folhas foram tratadas com a fração de acetato de etila da cepa LN. Todos os efeitos inibitórios foram observados quando as folhas foram tratadas com os produtos bacterianos após a inoculação de Xac. Esses resultados mostram que bactérias antagonistas e seus produtos podem ser usados no controle do cancro cítrico.

CAMARGO, Flávia Regina Spago. **Avaliação do potencial de agentes biológicos e seus produtos no controle do cancro cítrico causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Londrina, 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

Asiatic citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) (Hasse) is a disease known worldwide in the majority of commercial citrus production areas. Limited strategies exist for suppression of citrus canker on more susceptible cultivars. The application of microorganisms as agent to control citrus canker is a great ecological progress to solve these problems. The experiments were carried out in a greenhouse conditions and the antagonist bacteria (EC, FRC, LV and LN) and their product (bacterial suspensions, cell-free supernatants and ethyl-acetate fraction from LN strain) were tested on the control of Xac population, citrus canker incidence and severity in orange leaves (*Citrus sinensis* cv. Valencia). The bacterial products were sprayed or left in direct contact with orange leaves before (pre) or after (post) inoculation of Xac. The results showed a reduction of population of Xac when the bacterial suspension from strain EC was applied. In other experiment all strains reduced lesion number and lesion area when the leaves were treated with cell-free supernatant, also was observed the same effect when the leaves were treated with fraction of ethyl-acetate from LN strain. All inhibitory effect were observed when the leaves were treated with bacterial products after Xac inoculation. These results showed that antagonist bacteria and their products could be used in the control of citrus canker disease caused by Xac.

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	8
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
	REFERÊNCIAS	22
	ARTIGO: THE EFFECT OF ANTAGONIST BACTERIA AND THEIR PRODUCTS ON CITRUS CANCKER INCIDENCE AND SEVERITY IN ORANGE TREES	28
	Abstract	30
1	Introduction	31
2	Material and Methods	32
2.1	Bacterial cultures	32
2.2	Plant growth conditions	33
2.3	Effect of antagonist bacteria on Xac 306 population	33
2.4	Effect of cell-free supernatants on citrus cancker incidence and severity	34
2.5	Effect of ethyl-acetate fraction from LN strain on citrus cancker incidence and severity	35
2.6	Statistical analysis to quantify the effect of antagonistic bacteria	35
3	Results	36
3.1	Effect of antagonist bacteria on Xac 306 population	36
3.2	Effect of cell-free supernatants on citrus cancker incidence and severity	36
3.3	Effect of ethyl-acetate fraction from LN strain on citrus cancker incidence and severity	37
3.4	Bacterial antagonist ability on Xac 306 population size	37
3.5	Bacterial antagonist ability on the incidence and severity of citrus cancker ...	38
4	Discussion	38
	References	41

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O cancro cítrico asiático (ACC) é uma doença bacteriana economicamente importante a qual ataca seriamente a maioria das espécies e cultivares de citrus reduzindo a qualidade externa dos frutos cítricos em muitas áreas de produção em todo mundo, incluindo cultivares e híbridos de laranja doce, pomelo e lima (Cubero et al., 2001; Leksonboom et al., 2001).

Segundo Pruvost et al. (2002), a doença ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais onde altas temperaturas e chuvas ocorrem concomitantemente, sendo endêmica através do sudeste asiático em muitos países que fazem fronteira com o oceano Índico e em algumas áreas da América do Sul. No Brasil a primeira constatação foi em 1957 (Namekata et al., 2002).

O agente bacteriano, primeiramente isolado por Hasse (1915), foi recentemente reclassificado como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Hasse) Dawson (sinônimo: *X. campestris* pv. *citri* Dye patotipo A e *X. axonopodis* pv. *citri* Vauterin). É amplamente distribuído e endêmico em muitas dessas áreas e pode causar danos extensivos a ramos, folhas e frutos de variedades de citrus susceptíveis (Poe, 1999; Vernière et al., 2003; Gotwalld et al., 2002; Brunings e Gabriel, 2003).

De acordo com Bebendo (1995), Brunings e Gabriel (2003) e Graham et al. (2004) o patógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) é um bastonete gram-negativo, esbelto, estritamente aeróbio, móvel por um único flagelo polar, com crescimento lento, colônias de formato côncavo, não mucóides em cultura com pigmentação amarela e com aspecto bastante viscoso devido à produção de exopolissacarídeos. Membros do gênero *Xanthomonas* sempre estão associados

com plantas (embora nem sempre patogênicos); nenhum é de vida livre e quase todo crescimento é endofítico (Brunings e Gabriel, 2003).

A gama de hospedeiros de *Xac* é ampla, abrangendo plantas da família Rutaceae (Brunings e Gabriel, 2003; Cubero e Graham, 2002; Graham et al., 2004). Entre elas muitas espécies de citrus e híbridos entre espécies de citrus e a laranja trifoliada *Poncirus trifoliata* (Gottwald et al., 1993; Graham et al., 1990a; Leite e Mohan, 1984). Afeta primariamente *Citrus spp.*, *Fortunella spp.*, e *Poncirus spp.*, em todo o mundo (Brunings e Gabriel, 2003). Leksonboom et al. (2001) afirma que todo cultivar de citrus é susceptível ao cancro, sendo laranja azeda e laranja doce moderadamente susceptíveis e *Citrus aurantifolia* (lime) severamente afetado.

Civerolo (1984), além de Citrus e Poncirus, lista um número de plantas da família Rutaceae que servem como hospedeiros para *Xac* em condições experimentais. Sem entretanto terem papel significativo na epidemiologia em locais onde a doença é endêmica e sem ocorrência da larva minadora dos citrus, porém servem como um reservatório de inoculo problemático em um programa de erradicação. Os determinantes fundamentais nos hospedeiros para o desenvolvimento do cancro cítrico são o estágio de expansão foliar e a resistência do tecido do mesófilo. A susceptibilidade das folhas à colonização pela bactéria é maior quando estas encontram-se desenvolvidas com metade a dois terços de expansão, estágio no qual os estômatos abrem-se, mas a cutícula foliar não encontra-se completamente formada e ocorre maior embebição por água. À medida que as folhas se expandem, a cutícula torna-se espessa e a força requerida para a água infiltrar-se no tecido é aumentada dramaticamente. Simultaneamente, a camada celular do mesófilo por baixo da epiderme cutinizada leva a um aumento na resistência ao estabelecimento e crescimento das bactérias (Graham et al., 2004).

Folhas com 50 a 80% de expansão são as mais susceptíveis a infecções por estômatos (Pruvost et al., 2002).

Em comparações extensivas de 54 espécies de citrus nenhum nível de significância foi detectado quando o citrus foi inoculado com *Xac* por ferimento. A resistência observada nas situações de campo tem, ao contrário, sido correlacionada com o tamanho e o número de aberturas estomatais disponíveis para permitir a entrada da bactéria do cancro na planta por chuvas com vento. É bem conhecido que folhas e ramos de citrus macios, imaturos são mais susceptíveis ao cancro que citrus maduros. A ausência de resistência fisiológica efetiva dos citrus torna a probabilidade de encontrar qualquer tipo de gene de resistência ao cancro nos citrus improvável, uma vez que estes são altamente susceptíveis em inoculações artificiais (Brunings e Gabriel, 2003).

Como em muitas outras doenças bacterianas, o patógeno entra naturalmente pelos estômatos do hospedeiro (Gottwald e Graham, 1992; Graham et al., 1992a, b) ou por meio de ferimentos (Koizumi e Kuhara, 1982) através de respingos de chuva; não existem evidências de um estágio de crescimento epifítico (Brunings e Gabriel, 2003; Roberts, 2002). Os primeiros sintomas nas folhas iniciam-se ao redor do 9º dia de infecção na forma de lesões circulares minúsculas, ligeiramente elevadas, em forma de bolha. Conforme as lesões envelhecem ocorre a formação de pústulas esponjosas brancas ou amarelas, as quais escurecem e se espessam passando a uma cor castanho claro a marrom ásperas e com bordos saturados de água, freqüentemente circundados por um halo clorótico (Graham et al., 2004; Cubero e Graham, 2002; Gottwald et al., 2002; Vernière et al., 2003; Leksonboom et al., 2001). Com a idade da lesão, a margem saturada de água

desaparece. O centro da lesão tornase elevado e esponjoso ou corticoso, sendo tipicamente visíveis nos dois lados da folha (Graham et al., 2004).

Em ramos e frutos, os sintomas são similares: lesões elevadas e corticosas circundadas por uma margem oleosa ou saturada de água, sem presença de halos nos ramos (Leksonboom et al., 2001; Graham et al., 2001), mas devem estar presentes nas dos frutos.

Lesões nos ramos em brotos jovens angulares perpetuam o inóculo e prolongam a sobrevivência de *Xac* em áreas onde o cancro cítrico é endêmico. Se os ramos não forem mortos por infecções circundantes, as lesões podem persistir por muitos anos (Graham et al., 2004).

A susceptibilidade dos hospedeiros cítricos pode ser variável com a idade do tecido e ciclo de desenvolvimento da árvore, entre espécies e cultivares e com o modo de infecção e tecido infectado. Tecidos jovens de frutos e folhas são mais susceptíveis e inoculações com contato direto da bactéria com o mesófilo, freqüentemente resultam em lesões. A estrutura e densidade estomatal parecem não estarem relacionadas com a susceptibilidade embora isto tenha sido previamente informado. A expressão dos sintomas depende da temperatura, a qual reduz ou aumenta o período de incubação (Vernière et al., 2003). A ideal está entre 20 e 39 °C (Rossetti, 2001), com um ótimo entre 20 e 30 °C (Koizumi, 1985).

Segundo Vernière et al. (2003), quando a *Xac* é inoculadas em hospedeiros tolerantes ou frutos maduros, os sintomas podem diferir ligeiramente e são erupções relativas. Entretanto, infecções recentes em frutos imaturos podem resultar em rachaduras e má formação nos frutos.

Quando existe umidade livre na superfície foliar as bactérias são liberadas de uma matriz polissacarídica extracelular e se dispersam para novo

crescimento por respingos de chuva (Gottwald et al., 1989; Pruvost et al., 2002), por chuvas com vento (Goto et al., 1992; Timmer et al., 1991), pelos movimentos assistidos pelo homem (tais como poda, colheita e borrifamento realizados dentro e entre os laranjais) (Graham et al., 2004) e por movimento de plantas ou de partes de plantas infectadas, e pela atividade de pássaros, insetos e/ou mamíferos. (Poe, 1999; Graham et al., 2004).

Segundo Stall et al. (1980) e Goto et al. (1992) a água da chuva coletada de folhas com lesões podem conter entre 10^5 e 10^8 ufc/mL. Chuva com ventos dirigidos é o principal agente de dispersão e ventos com velocidade de 8 m/s facilitam a penetração da bactéria através dos poros dos estômatos e ferimentos provocados por espinhos, insetos, a exemplo da larva minadora dos citrus (*Phyllocnistis citrella* (Stainton)) e areia, uma vez que causam congestionamento de água nas folhas e nos tecidos de ramos verdes (Pruvost et al., 2002). Evidências circunstanciais fortes apontam para um transporte ocasional de médias a longas distâncias (10–15 km) por incomuns eventos de tempestades, como tornados e tempestades tropicais. A dispersão regional da bactéria normalmente pode se dar pelo transporte de partes ou plantas doentes e emprego de equipamentos contaminados pelo contato com plantas doentes. A bactéria permanece viva nos bordos e lesões em folhas e frutos até a queda dos mesmos, pode sobreviver por vários anos em lesões em ramos lenhosos (Graham et al., 2004).

Todo tecido de citrus sobre o chão tem máxima susceptibilidade à infecção por *Xac* durante a última metade da fase de expansão no crescimento (Graham et al., 2004). Bactérias presentes em lesões em folhas e ramos constituem na principal fonte de infecções secundárias epidemiologicamente significativas.

Xac pode permanecer viável por até seis meses em órgãos infectados, mesmo após a queda destes (Rao e Hingorani, 1963a; Rao e Hingorani, 1963b), e se estabelecer como “epífita” no filoplano de plantas não hospedeiras (Goto, 1972; Goto et al, 1975a; Goto et al., 1975b; Carvalho et al., 1984). Os exopolissacarídeos produzidos por *Xac* também são importantes na preservação do inóculo em condições ambientais (Koizumi, 1979; Goto e Hyodo, 1985).

Alvarez et al. (2004) afirma que a transmissão da maioria das doenças bacterianas ocorre através das sementes ou material propagativo contaminados, a detecção desses patógenos nesses materiais é de extrema importância, principalmente no comércio internacional.

A recente introdução de certos insetos pragas dos citrus tem prejudicado os programas de erradicação, pois os danos físicos causados por estas pode contribuir para aumento na susceptibilidade das plantas á infecção pela bactéria. A exemplo, danos da larva minadora dos citrus que têm sido associadas com o aumento na expansão da doença (Poe, 1999; Gravena et al., 1998), a qual facilita a infecção bacteriana através de:

a) promovendo o corte na cutícula e abertura do mesófilo foliar para infecções diretas quando respingos de água ou vento com chuva levam a bactéria em contato com a superfície foliar;

b) provocando ferimentos que levam maior tempo para cicatrização que ferimentos mecânicos, com maior período de exposição a infecção bacteriana;

c) transporte de inóculo no corpo contaminado para as galerias de alimentação.

Esses processos resultam na proliferação de infecções mesofílicas dentro das galerias (Bergamin-Filho et al., 2000; Graham et al., 1996; Gottwald et al.,

2002; Vernière et al, 2003). Como as lesões induzidas pela larva minadora expandem, elas rompem através da epiderme e coalescem formando infecções massivas cobrindo grandes áreas da lâmina foliar. Essas lesões geram muitas vezes mais inóculos comparadas a infecções estomáticas (Graham et al., 2004).

Em árvores fortemente afetadas, infecções severas causam desfolha, manchas nos frutos, abscisão prematura dos frutos afetados, morte dos ramos e debilitação geral da árvore (Graham et al., 2004; Roberts, 2002; Cubero et al., 2001; Vernière et al., 2003; Poe, 1999; Pruvost et al., 2002; Leksonboom et al., 2001; Gottwald et al., 2002).

Segundo Graham et al. (2004), estratégias limitadas existem para a supressão do cancro cítrico nos cultivares mais sensíveis. Frutos manchados não são comercializados e o acesso dos frutos expostos é restrito no mercado. O impacto econômico da perda de mercado é muito maior que o da redução na qualidade e no rendimento da colheita. A má formação dos frutos e a presença de lesões de cancro tornam o fruto inaceitável para a comercialização (Vernière et al., 2003) ou com baixo valor no mercado (Gottwald et al., 2002; Poe, 1999; Pruvost et al., 2002; Brunings e Gabriel, 2003). Em uma tentativa de proibir a introdução da doença, muitas áreas de crescimento de citrus restringem a importação de citrus para áreas ou países com infecção conhecida (Gottwald et al., 2002).

Durante os últimos 20 anos na Florida, introduções de *Xac* e erradicação do cancro cítrico têm recebido considerável atenção, principalmente devido ao longo alcance nacional e internacional do comércio, das implicações políticas, legais e sócio-econômicas do conceito de erradicação (Gottwald et al., 2001; Schubert et al., 2001).

Em muitos outros países o diagnóstico do cancro cítrico resulta em ações que forçam a imediata remoção e destruição das árvores infectadas, ocorrendo poda e desfolha das árvores com cancro e também as árvores expostas dentro de um raio de 1900 pés da árvore infectada (uma área de 0,4 milhas quadradas) nos Estados Unidos (Brunings e Gabriel, 2003), de 38,1 m na Argentina e de 30m no Brasil (Gotwalld et al., 2002). Em certos casos, esta prática pode até eliminar totalmente a doença, porém não há garantia de que o cancro cítrico não ocorra novamente, caso as medidas de prevenção sejam "amenizadas" (Schubert et al., 2001).

Além da erradicação, outros métodos de controle do ACC são utilizados, como a plantação de variedades de citrus resistentes, localização dos berçários de mudas em áreas livres de cancro cítrico, estabelecimento de quebra-ventos nas áreas de produção para prevenir ou reduzir o risco de epidemia de cancro cítrico, uso preventivo de "sprays" de cobres e de controle da larva minadora dos citrus (Roberts, 2002).

Segundo Graham et al. (2004) ainda são construídas cercas para restringir o acesso ao pomar, os "sprays" de desinfecção são aplicados à maquinaria do pomar e nos equipamentos de colheita e os trabalhadores dos pomares devem concordar com as medidas para completa desinfecção de roupas, sapatos e luvas. As frutas frescas para comercialização interna e exportação são sujeitas a protocolos de inspeção rigorosos para que as frutas nos pomares estejam livres dos sintomas do cancro cítrico e a tratamentos de sanitização na casa de embalagem.

Devido a sua alta susceptibilidade, pomelo, lima Mexicana e muitas laranjas doces de meia estação (exemplo Navel, Hamlin) não são recomendadas para o plantio, a menos que um programa intensivo de controle seja empreendido

(Leite e Mohan, 1990). Programas de “screening” têm identificado laranjas doces, híbridos de mandarins (tangerinas, tangelos, tangors) e lima Tahiti de meia e tardia estação selecionadas, com um aceitável nível de resistência ao cancro cítrico. Ainda assim, esses cultivares podem ser susceptíveis em estágios jovens e requerem “spray” para o controle da larva minadora dos citrus para evitar a infecção.

O uso de bactericidas à base de cobre é uma medida de controle padrão para o cancro cítrico em todo mundo (Koizumi, 1985; Leite e Mohan, 1990). O cobre reduz a população bacteriana na superfície foliar e múltiplas aplicações são necessárias para alcançar o controle necessário nos hospedeiros susceptíveis (Stall et al., 1980). Programas com “sprays” a base de cobre são efetivos quando as folhas são jovens para proteger folhas do meio ao completo estágio de expansão em um período de duas a quatro semanas (Graham et al., 1992a; Stall et al., 1982). Como o cobre diminui a infecção por contato da bactéria com a superfície, a efetividade dos programas com “sprays” a base de cobre é superada pelas chuvas com vento que introduzem a bactéria diretamente no estômato (Gottwald e Graham, 1992; Gottwald e Timmer, 1995). Em adição à sua parcial efetividade sob condições de chuvas com ventos, bactericidas a base de cobre têm outra possível desvantagem depois de usado a longo prazo, incluindo resistência ao cobre nas populações de xanthomonas (Rinaldi e Leite, 2000; Sigee et al., 1993) e o acúmulo de cobre metálico nos solos com potencial fitotóxico e efeitos ambientais (Alva et al., 1995).

Outro possível método de controle é o uso de substâncias indutoras de resistência sistêmica, um processo de resistência ativa que depende das barreiras químicas e físicas da planta hospedeira, ativadas por agentes indutores bióticos ou abióticos (Kessmann et al., 1994). Tal resistência é ativada contra muitos organismos, incluindo bactérias e fungos. Uma ampla gama de compostos, tais

como benzotiadiazóis, ácido salicílico e proteína harpina, são conhecidos por serem indutores de resistência de plantas a doenças (Romero et al., 2001; Wei et al., 1992). Graham et al. (2004) relatam que “sprays” dessas substâncias em combinação com o cobre não provou eficiência no controle do cancro cítrico quando aplicados em pomares do sul do Brasil, enquanto o cobre vai de moderada a altamente eficiente.

Alguns extratos de plantas foram reportados como inibidores efetivos do crescimento de bactérias fitopatogênicas sendo *Xac* também suprimida por extratos de plantas, sendo de interesse como fontes alternativas de pesticidas naturais para o controle de pestes de plantas (Leksomboon et al,1998; Leksomboon et al,2000; Garden et al,1978; Grainge e Alvarez,1987).

As conseqüências da utilização de grandes quantidades de defensivos na citricultura podem ser consideradas sob o aspecto das pragas e do ambiente. Com relação às pragas, estas podem desenvolver resistência aos produtos, exigindo aumento das concentrações e do número de aplicações anuais. Persistindo esse sistema, pode-se provocar elevado nível de contaminação do solo, da água, da planta, do homem e de todos os organismos vivos componentes do agroecossistema cítrico. Como conseqüências inevitáveis, os inimigos naturais serão eliminados e novas pragas deverão surgir, além do aumento de casos de intoxicação e o aparecimento de resíduos químicos no suco e nos frutos, repercutindo na comercialização desses produtos no Brasil e no exterior (Alves et al., 2001).

Nos últimos 90 anos, ciência, indústria e pessoal regulador do mundo todo tem feito recomendações pra erradicar o cancro cítrico, baseados nas taxas de custo/benefício para as ações planejadas (Broadbent et al., 1992; Schubert et al., 2001).

Um princípio seguido para a prevenção da doença é que quando as fontes chaves de inóculo para uma doença são conhecidas, medidas efetivas podem ser implementadas para prevenir novas expansões e subseqüente erupções da doença (Alvarez et al., 2004).

Segundo Graham et al. (2004), *Xac* é um fitopatógeno candidato à erradicação porque a doença tem características fundamentais que tornam o conceito plausível e altamente desejável:

(a) A bactéria é incapaz de sobreviver fora da lesão hospedeira por longos períodos;

(b) A bactéria não possui um vetor eficiente (aparte aos humanos);

(c) As características lesões elevadas são facilmente identificáveis, o que permite um diagnóstico relativamente rápido e acurado;

(d) A gama de hospedeiros da bactéria é restrita a culturas de frutos perenes de alto valor;

(e) Muitas variedades comerciais de citrus são de moderada a altamente susceptíveis, assim as medidas de controle são apenas modestamente efetivas e relativamente custosas;

(f) A doença foi erradicada com sucesso previamente durante campanhas na Florida, Austrália e na África do Sul.

De acordo com Kloepper et al., (1999) o controle biológico de fitopatógenos com o uso de microrganismos antagonistas apresenta-se como uma estratégia promissora para a proteção de plantas. O controle biológico é definido como a redução da soma de inóculo ou das atividades que determinam a doença provocada por um patógeno, por um ou mais organismos que não o homem (Cook e Baker, 1983).

Os mecanismos de interações entre microrganismos patogênicos e antagonistas podem ser a antibiose, a competição, o parasitismo, a predação, a hipovirulência e a indução da defesa do hospedeiro. No presente trabalho será estudada a antibiose como um dos mecanismos de interação entre o patógeno e os antagonistas. Apesar de existirem trabalhos sobre o uso de microrganismos antagonistas no controle biológico de bactérias do gênero *Xanthomonas* (Wulff et al., 2002; Stromberg et al., 2004), poucas informações estão disponíveis em relação à aplicação desses microrganismos no controle de *Xac*.

Segundo Cook (1993), o uso pouco difundido de agentes biológicos no controle de doenças em plantas se devem às dificuldades técnicas de utilização, devido à falta de conhecimento de sua biologia e ecologia, e aos custos de desenvolvimento e obtenção de aprovação regulatória. Além disso, o filoplano representa um grande obstáculo para uso de microrganismos no controle biológico, devido à baixa disponibilidade de nutrientes (Bettioli e Ghini, 1995 e Mercier e Lindow, 2000).

Ainda assim, existe uma preocupação crescente com relação ao uso de pesticidas químicos, devido ao acúmulo dos mesmos nos alimentos e no ambiente, o que se torna um aspecto positivo em relação ao controle biológico (Safiyazov et al., 1995; Walsh et al., 2001; Quimby et al., 2002; Gan-Mor e Matthews, 2003).

Os agentes biológicos têm possibilidade de adaptação às pressões ambientais e às alterações na população do patógeno (Holt e Hochberg, 1997), além de serem mais seletivos que os agentes químicos e não são tóxicos contra organismos não-alvo (Mendelsohn et al., 1995; Capalbo e Nardo, 2000). O controle biológico pode ser utilizado pelo aprimoramento seletivo do crescimento e da

atividade dos componentes antagonistas da microbiota natural das plantas (Garret, 1982).

O uso de microrganismos para o controle de pragas dos citrus representa um grande avanço ecológico para solucionar esses problemas, tornando o agroecossistema mais sustentável, econômica e biologicamente (Alves et al., 2001).

2 OBJETIVOS

A partir de isolados bacterianos obtidos a partir de amostras ambientais e de folhas e frutos com e sem lesões de cancro cítrico pretende-se:

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar bactérias antagonistas e seus produtos no controle de lesões foliares de cancro cítrico causadas pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, em *Citrus sinensis* cv. Valencia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Avaliar o efeito antagonista de suspensões bacterianas na população de *Xac* 306 em lesões foliares.

b) Avaliar a eficiência da aplicação do sobrenadante de culturas bacterianas antagonistas livres de células na incidência e severidade de lesões foliares de cancro cítrico em tratamentos preventivos e curativos.

c) Avaliar a eficiência da aplicação de frações, obtidas pelo tratamento do sobrenadante livre de células com solventes orgânicos, no controle da incidência e severidade do cancro cítrico em tratamentos preventivos e curativos.

REFERÊNCIAS

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

ALVAREZ, A.M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol* 42:339–66.

ALVES, S.B.; MEDEIROS, M.B.; TAMAI, M.A.; LOPES, R.B. 2001. Trofobiose e microrganismos na proteção de plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*.

BEBENDO, I. P. Manchas foliares. 1995. 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. 848-858.

BERGAMIN-FILHO, A., AMORIM, L., LARANJEIRA, F. and GOTTWALD, T.R. 2000. Epidemiology of citrus canker in Brazil with and without the Asian citrus leafminer. *Proceedings of the Intern. Citrus Canker Research Workshop, Ft. Pierce, Florida*. <<http://doacs.state.fl.us/canker>>.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. 1995. 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.

BROADBENT, P., FAHEY, P.C., GILLINGS, M.R., BRADLEY, J.K. AND BARNES, D. 1992. Asiatic citrus canker detected in a pummelo orchard in northern Australia. *Plant Dis.* 76, 824–829.

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

CAPALBO, D. M. F. e NARDO, E. A. B. 2000. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico. In: Melo, I. S. e Azevedo, J. L. *Controle Biológico. Volume 2*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 351-387.

CARVALHO, M. L. V., MALAVOLTA JR., V. A.; PALAZZO, D. A., ROSSETTI, V., and NOGUEIRA, E. M. C. 1984. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye in soil in nonhost plants. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1:368-370.

CIVEROLLO, E. L. 1984. Bacterial canker disease of citrus. *J. Rio Grande Valley Hortic. Assoc.*, 37:127-146.

COOK, R. J., and BAKER, K. F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. Saint Paul: American Phytopathological Society.

COOK, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 31:53-80.

- CUBERO, J. , GRAHAM J. H.,GOTTWALD T. R. 2001. Quantitative PCR Method for Diagnosis of Citrus Bacterial Canker. *Applied and environmental microbiology* 67: 2849–2852
- CUBERO, J. , GRAHAM J. H. 2002. Genetic Relationship among Worldwide Strains of *Xanthomonas* Causing Canker in Citrus Species and Design of New Primers for Their Identification by PCR. *Applied and environmental microbiology* 68: 1257–1264.
- GAN-MOR, S., MATTHEWS, G. A. 2003. Recent developments in sprayers for application of biopesticides - An overview. *Biosystems Engineering*, 84:119-125.
- GARDEN,L., CHAUMONT J.P., CHARTIER R.. 1978. Antibacterial activity of 200 plant extracts against phytopathogenic bacteria. *Phytiatrie- Phytopharmacie (France)* 27 : 285-294.
- GARRET, C. M. E. 1982. Bacterial diseases of food plants – An overview. In: Rhodes-Roberts, M. E., and Skinner, F. A. (eds.) *Bacteria and plants*. The Society for Applied Bacteriology Symposium Series n. 10, Academic Press, p. 125-142.
- GOTO, M. 1972. Survival of *Xanthomonas citri* in the bark tissues of citrus trees. *Canadian Journal of Botany*, 50:629-635.
- GOTO, M., OHTA, K., and OKABE, N. 1975a. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. I. Detection of the bacterium from a grass (*Zoysia japonica*). *Annual Phytopathology Society of Japan*, 41:9-14.
- GOTO, M., OHTA, K., and OKABE, N. 1975b. Studies on saprophytic survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. II. Longevity and survival density of the bacterium on artificially infected weeds, plant residues and soils. *Annual Phytopathology Society of Japan*, 41:141-147.
- GOTO, M., and HYODO, H. 1985. Role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 51:22-31.
- GOTO, M. 1992. Citrus canker. In: Kumar, J. ed. *Plant diseases of international importance: Diseases of fruit crops*. Vol. III. Englewood Cliffs: Prentice Hall, p. 170-208.
- GOTTWALD, T.R., TIMMER, L.W., and MCGUIRE, R.G. 1989. Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. *Phytopathology*, 79:1276-1283.
- GOTTWALD, T. R., and GRAHAM, J. H. 1992. A device for precise and nondisruptive stomata inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. *Phytopathology*, 82:930-935.
- GOTTWALD, T. R., GRAHAM, J. H., CIVEROLO, E. L., BARRETT, H. C., HEARN, C. J. 1993. Differential host range of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Dis.* 77:1004-1009.

GOTTWALD, T. R., and TIMMER, L. W. 1995. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Tropical Agriculture*, 72:194-201.

GOTTWALD, T. R., HUGHES, G., GRAHAM, J. H., SUN, X., AND RILEY, T. 2001. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. *Phytopathology*, 91:30-34.

GOTTWALD, T. R., SUN, X., RILEY, T., GRAHAM, J. H., FERRANDINO, F., and TAYLOR, E. L. 2002. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, 92:361-377.

GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R. and FARDELMANN, D. 1990. Cultivar-specific interactions for strains of *Xanthomonas campestris* from Florida that cause citrus canker and citrus bacterial spot. *Plant Dis.* 74, 753–756.

GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., RILEY, T. D., and ACHOR, D. 1992a. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology*, 82:1319-1325.

GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R., RILEY, T.D. and BRUCE, M.A. 1992b. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. *Phytopathology*, 82, 452–457.

GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R., BROWNING, H.S. and ACHOR, D.S. 1996. Citrus leafminer exacerbated the outbreak of Asiatic citrus canker in South Florida. In: *Proceedings of the International Conference on Citrus Leafminer*, Orlando, Florida (Hoy, M.A., ed.), p. 83. Gainesville, FL: University of Florida.

GRAHAM, J.H. 2001. Varietal susceptibility to citrus canker: Observations from southern Brazil. *Citrus Ind.* 82(6), 15–17.

GRAHAM, J.H., GOTTWALD, T.R., CUBERO, J., ACHOR, D.S., 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular plant pathology* 5, 1–15.

GRAINGE, M.D. and A.M. ALVAREZ. 1987. Antibacterial and antifungal activity of *Artabotrys hexapetalus* leaf extracts. *Intern Trop Plant Diseases* 5 : 173-179.

GRAVENA, S. 1998. Manejo ecológico de pragas dos citros – Conceito, princípios e aplicação. In: L. C. Donadio e O. Rodriguez, eds. *Anais do Quinto Seminário Internacional de citros – Tratos culturais*. Bebedouro: Fundação Cargil, p. 221-249.

HASSE, C. H. 1915. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. *Journal of the Agricultural Research*, 4:96-100.

HOLT, R. D., and HOCHBERG M. E. 1997. When is biological control evolutionarily stable (or is it)? *Ecology*, 78:1673-1683.

KESSMANN, H., STAUV, T., HOFFMANN, C., MAETZKE, T. and HERZOG, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32, 439–459.

KLOEPPER, J. W., RODRÍGUEZ-KÁBANA, R., ZEHNDER, G. W., MURPHY, J. F., SIKORA, E., and FERNÁNDEZ, C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, 28:21-26.

KOIZUMI, M. 1979. Ultrastructural changes in susceptible and resistant plants of citrus following artificial inoculation with *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 45:635-644.

KOIZUMI, M. and KUHARA, S. 1982. Evaluation of citrus plants for resistance to bacterial canker disease in relation to lesion extension. *Bull. Tree Fruit Res. D.* 4, 73–92.

KOIZUMI, M. 1985. Citrus canker: The world situation. In: Timmer, L. W. ed. *Citrus canker: An international perspective*. University of Florida: Lake Alfred, p. 2-7.

LEITE, R. P. JR, and MOHAN, S. K. 1984. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* (Hasse) Dye in soil and in association with some gramineous plants. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1:365-368.

LEITE, R. P. JR, and MOHAN, 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.

LEKSOMBOON, C., THAVEECHAI N., KOSITRATANA W.. 1998. Effect of Thai medicinal plant extracts on growth of phytopathogenic bacteria, *In* Proceeding of the 36th Kasetsart University Annual Conference, Plant Section, February 3-5, 1998, Kasetsart University, Bangkok. (in Thai).

LEKSOMBOON, C., THAVEECHAI N., KOSITRATANA W., PAISOOKSANTIVATANA Y.. 2000. Antiphytobacterial activity of medicinal plant extracts. *Science (Thai)* 54 : 91-97.

LEKSOMBOON, C., THAVEECHAI N., KOSITRATANA W. 2001. Potential of Plant Extracts for Controlling Citrus Canker of Lime. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 35 : 392 - 396

MENDELSON, M.L., ELLWANGER, T. C., ROSE, R. I., KOUGH, J. L., and HUTTON, P. O. 1995. *Registration of biologicals: How product formulations affect data requirements*. Washington: American Chemical Society.

MERCIER, J., and LINDOW, S. E. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:369-374.

- NAMEKATA, T., MONTES, S.M.N. FERRARI, E.M., NOGUEIRA, C. 2002. Contribuição à bibliografia sobre cancro cítrico – resumo dos trabalhos publicados por pesquisadores do instituto biológico e em colaboração com pesquisadores de outras instituições (1957 – 1999). Arq. Inst. Biol., 69: 123-141.
- POE, S. 1999. United States Department of Agriculture Marketing and Regulatory Programs Animal and Plant Health Inspection Service Citrus Canker Eradication Program Environmental Assessment.
- PRUVOST, O., BOHER, B., BROCHERIEUX, C., NICOLE, M., CHIROLEU, F. 2002. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Leaf Lesions Under Tropical Environmental Conditions and Simulated Splash Dispersal of Inoculum. Phytopathology 92:336-346.
- QUIMBY, P. C., KING, L. R., and GREY, W. E. 2002. Biological control as a means of enhancing the sustainability of crop/land management systems. Agriculture, Ecosystems and Environment, 88:147-152.
- RAO, Y. P., and HINGORANI, M. K. 1963a. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson in leaves and soil. Indian Phytopathology, 16:362-364.
- RAO, Y. P., and HINGORANI, M. K. 1963b. The possible occurrence of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. Indian Phytopathology, 16:374-375.
- RINALDI, D.A.M.F. and LEITE, R.P. Jr 2000. Adaptation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* population to the presence of copper compounds in nature. Proc. Int. Soc. Citric. 2, 1064.
- ROBERTS, P.D., 2002. Citrus Canker Management Strategies. Indian river citrus seminar. Southwest Florida Research and Education Center.
- ROMERO, A.M., KOUSIK, C.S. and RITCHIE, D.F. 2001. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. Plant Dis. 85, 189–194.
- ROSSETTI, V. A. 2001. Manual ilustrado de doenças dos citros. Piracicaba: FEALQ/Fundecitrus.
- SAFIYAZOV, J. S., MANNANOV, R. N., and SATTAROVA, R. K. 1995. The use of bacterial antagonists for the control of cotton diseases. Field Crops Research, 43:51-54.
- SCHUBERT, T. S., RIZBI, S. A., SUN, X., GOTTWALD, T. R., GRAHAM, J. H., and DIXON, W. N. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – Again. Plant Disease, 5:340-356.
- SIGEE, D.C. 1993. Bacterial Plant Pathology : Cell and Molecular Aspects. Cambridge University Press, Cambridge. 325p.

STALL, R. E., MILLER, J. W., MARCO, C. M., and DEECHENIQUE, B. I. C. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. Proceedings of the Florida Horticultural Society, 93:10-14.

STALL, R.E., MILLER, J.W., MARCO, G.M. and CANTEROS DE ECHENIQUE, B. 1982. Timing of sprays to control canker of grapefruit in Argentina. Proc. Int. Soc. Citric. 1, 414–417.

STROMBERG, K. D., KINKEL, L. L., and LEONARD, K. J. 2004. 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.

TIMMER, L.W., GOTTWALD, T.R. and ZITKO, S.E. 1991. Bacterial exudation from lesions of Asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. Plant Dis. 75, 192–195.

VERNIÈRE, C., HARTUNG, J. S., PRUVOST, O. P., CIVEROLO, E. L., ALVAREZ, A. M., MAESTRI, P., and LUISETTI, J. 2003. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. European Journal of Plant Pathology, 104:477-487.

WALSH, U. F., MORRISSEY, J. P., and O’GARA, F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: From functional genomics to commercial exploitation. Current Opinion in Biotechnology, 12:289-295.

WEI, Z.M., LABY, R.J., ZUMOFF, C.H., BAUER, D.W., HE, S.Y., COLLMER, A. BEER, S.V. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science, 257, 85–88.

WULFF, E. G., MGUNI, C. M., MORTENSEN, C. N., KESWANI, C. L., and HOCKENHULL, J. 2002. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. European Journal of Plant Pathology, 108:317-325.

**ARTIGO: THE EFFECT OF ANTAGONIST BACTERIA AND THEIR PRODUCTS
ON CITRUS CANKER INCIDENCE AND SEVERITY IN ORANGE TREES**

The effect of antagonist bacteria and their products on citrus canker incidence and severity in orange trees

Flávia R. Spago de Camargo,^a Gisele M. Lovato,^a Letícia Sayuri Murate,^a Marco A. Nogueira,^a Márcio F. Cruz,^a Rui P. Leite Jr,^b João Carlos P. de Mello,^c and Galdino Andrade,*

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

^bInstituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Londrina, PR, Brazil

^cLaboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

* Corresponding author: Tel./Fax: +55 43 3371 4791
E-mail adress: andradeg@uel.br (G. Andrade)

Abstract

The experiments were carried out in a greenhouse conditions and the antagonist bacteria (EC, FRC, LV and LN) and their product (bacterial suspensions, cell-free supernatants and ethyl acetate fraction from LN strain) were tested on the control of citrus canker incidence and severity, caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306 (Xac 306) in orange leaves. The bacterial products were sprayed or left in direct contact with orange leaves (*Citrus sinensis* cv. Valencia), before (pre) or after (post) inoculation of Xac 306. The results showed a reduction of population of Xac 306 when the bacterial suspension from strain EC was applied. In other experiment all strains reduced lesion number and lesion area when the leaves were treated with cell-free supernatant, also was observed the same effect when the leaves were treated with fraction of ethyl-acetate from LN strain. All inhibitory effect were observed when the leaves were treated with bacterial products after Xac 306 inoculation. These results showed that antagonist bacteria and their products could be used in the control of citrus canker disease caused by Xac.

Key words: citrus canker, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, antagonist bacteria, biological control.

1. Introduction

Asiatic citrus canker (ACC) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) (Hase) is a disease known worldwide in the majority of commercial citrus production areas (Gotwalld et al., 2002). It is the most virulent form of citrus canker and affects the widest range of hosts, including *Citrus spp.* and many closely related rutaceous plants (Cubero and Graham, 2002) in tropical and subtropical areas around the world (Goto, 1992).

Xac enters directly through stomata or by way of wounds and cause circular and water soaked lesions that become raised and blister-like. On heavily infected trees, citrus canker causes defoliation and premature fruit drop, die-back of twigs and general debilitation of the tree (Brunings and Gabriel, 2003; Cubero and Graham, 2002; Graham et al., 2004; Pruvost et al., 2002).

Limited strategies exist for suppression of citrus canker on more susceptible cultivars. The methods used to control ACC include eradication, resistant varieties of citrus, and chemical control such as preventive copper sprays on young leaves (Graham et al., 2004). However, the bacterium can develop resistance to the products demanding an increase in copper application numbers. Therefore, copper is a heavy metal that cause a high level of contamination in the soil, water and every live organism of citric orchard. Consequently, natural enemies can appear, cases of intoxication can increase and chemical residuous can appear in juice and fruits (Alves et al., 2001).

The application of microorganisms as agent to control citrus canker is a great ecological progress to solve these problems (Alves et al.,2001) and the use of antagonist bacteria or their metabolites has been proposed as a promising strategy for plant protection (Földes et al., 2000).

The main challenge in the development of a microbial biological agent is finding one microorganism that has a wide capacity to adapt on the specific environment of the phyloplane and act against Xac, so the biological control of citrus canker do not receive so much attention in joint efforts against this disease.

The major goal of the present study was to test Xac-antagonist bacteria and their products on the incidence and severity of the citrus canker in *Citrus sinensis* cv. Valencia in a greenhouse conditions.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial cultures

The pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306 (Xac 306) was used in all experiments. Xac 306 was stored in phosphate buffer (KH₂PO₄ 1g; K₂HPO₄ 1.5 g; distilled water 1000 mL, pH 7.0). This strain has a high virulence and its genome has been recently sequenced (da Silva et al., 2002). Two antagonist bacteria were isolated from citrus canker lesions (strains LV and LN) in culture media plus copper chloride (0.1g L⁻¹), once Cain et al. (2000) suggests that some bacteria isolated in culture media added copper might produce antagonistic substances. One antagonist bacterium was isolated from fallen orange fruit in orchard (strain FRC) and other was isolated from dairy water (strain EC) (Rampazo, 2004). All antagonist bacteria isolated are a gram-negative rod shaped bacteria. Antagonist strains were stored in 40% (v/v) glycerol stocks at minus 20 °C.

2.2. Plant growth conditions

Citrus sinensis cv. Valencia, is a moderate resistant (Roberts, 2002) orange cultivar, and was used in all experiments in a greenhouse conditions (28 °C/22 °C temperature and 10 h/14 h photoperiod day/night respectively; 80 % relative humidity). Plants were watered three times a week and fertilized twice a month with Hewith solution for non-legume (Hewith, 1966). In preliminary studies was standardized the Xac 306 inoculation method to induce a great number of canker lesions formation on young leaves by Xac 306. Plants were pruned and then inoculated during the last half of the expansion phase of growth. After sprayed bacterial suspension or their products, the plants were covered with plastic bags for 24 hours in order to form a moist chamber that would improve the efficiency of Xac 306 infection and the penetration of antagonistic strains or their products into the leaves.

2.3. Effect of antagonist bacteria on Xac 306 population

In this experiment was tested the ability of antagonist bacteria to reduce the Xac 306 population inside the lesions. Xac 306, EC and FRC was grown for 48 h at 28 °C in nutrient agar (NA), LV in NA plus 0.1 g L⁻¹ copper chloride (NACu) and LN in Tryptic soy agar plus 0.1 g L⁻¹ copper chloride (TSACu). Cells were harvested from culture medium with a sterile inoculation loop and suspended in sterile phosphate buffer (pH = 7.0). The bacterial inoculum was composed by cells suspended in phosphate buffer plus Tween 20 (0.25%) with 10⁸ CFU mL⁻¹ adjusted by spectrophotometer (λ = 590 nm).

The total 35 plants were inoculated with cells suspension of Xac 306 (10⁸ CFU/mL) by spraying with a hand pumped atomizer until inoculum began to run off the leaf surface. The experiment was composed by four bacteria suspended in phosphate buffer (EC, FRC, LV, LN) and were considered as control plants the ones sprayed only with phosphate buffer. All treatments had seven replicates. After 21 days, when citrus canker lesions had

already formed, the plants were sprayed with antagonistic bacteria (10^8 CFU mL⁻¹) and the control plants with sterile phosphate buffer. After 2, 4, 8, 16 and 32 days nine lesions of each plant were collected with a sterile scissors and softened individually in test tubes with 1 mL of distilled water. After dilution, 50 μ L of softened lesions suspension were inoculated in Petri dishes with SX media and were incubated for 48 h at 28 °C and the CFU number was determined (Zuberer, 1994).

2.4. Effect of cell-free supernatants on citrus canker incidence and severity

Each antagonist bacteria grew in culture media (14 days at 28 °C; 100 rpm). The cultures were centrifuged (9,000 rpm/20 min, 4 °C) and a sample of free cells suspension was inoculated in an appropriated culture media to verify the absence of bacteria cells. The suspension of Xac 306 (10^8 CFU mL⁻¹) in phosphate buffer was inoculated by spraying in leaves of 35 plants. The antagonist were inoculated by spraying in 7 plants 24 h before (pre-treatment) or after (post-treatment) inoculation of Xac 306. The control plant was sprayed only with nutrient broth (NB), previous experiments showed that copper concentration used in the culture media did not inhibited the lesions formation and its number. After 21 days the number of citrus canker lesion was evaluated.

In another experiment, a cotton piece (1.5 cm²) was embedded with 1mL of bacterial suspension of Xac 306 (10^8 CFU mL⁻¹) and fixed in abaxial surface of each leaf which was involved with Parafilm® and fixed by metal clips. Before (pre) or after (post) 24 h the cotton pieces were removed and another piece of cotton was embedded with cell-free supernatant antagonist was fastened in the same position for 24 h. As a pathogen only control was used cotton piece embedded with NB. After 21 days the lesion area was determined.

2.5. Effect of ethyl-acetate fraction from LN strain on citrus canker incidence and severity

Supernatants were extracted with dichloromethane, ethyl-acetate and *n*-butanol successively. The combined extracts were evaporated under reduced pressure to eliminate the organic phase. It was obtained the H₂O phase at the end. All fractions were lyophilized to give dark brown solids (dichloromethane and ethyl-acetate) and white solids (*n*-butanol). All fractions were redissolved in H₂O (0.06 mg mL⁻¹) and tested in wells made in nutrient agar. Xac 306 suspension (10¹² CFU/mL) was inoculated using *pour plate* method. Ethyl-acetate fraction from LN strain had the greatest effect *in vitro*, and was chosen for greenhouse tests.

Many concentrations were first inoculated in leaves to test cytotoxic effect. Three concentrations were not harmful for leaf: 0.003, 0.006 and 0.01 g mL⁻¹. Xac 306 (10⁸ CFU mL⁻¹) was sprayed in leaves or embedded in a cotton piece and putted in contact with leaves of 7 plants for each concentration. Before (pre) or after (post) 24 h ethyl-acetate fraction from LN strain was inoculated by spraying or in cotton pieces. After 21 days the number of citrus canker lesions per leaf was evaluated for spraying method and the lesion area was evaluated for cotton piece method.

2.6. Statistical analysis to quantify the effect of antagonistic bacteria

To determine the significant differences among treatments were used one way ANOVA (Devore and Peck, 1993) of log-transformed data (Hirano et al., 1982) and Duncan test at level 5 %, (RPC) and (RDC).

Successful bacterial antagonists were defined as those that significantly reduced the sizes of population pathogen and/or citrus canker incidence or severity when compared with pathogen only control in each experiment. Since the results varied significantly among experiments, a method for relating effectiveness of bacterial antagonists was needed. The indices RPC (relative population control index) and RDC (relative disease

control index), described for Stromberg et al. (2000), were calculated for each antagonist-pathogen to verify Xac 306 population sizes suppression and citrus canker incidence and severity suppression by each antagonist.

3. Results

3.1. Effect of antagonist bacteria on Xac 306 population

When antagonistic bacteria were sprayed on canker lesions formed in the leaves, the strains LV and LN increased the Xac 306 population at 4 day after antagonist inoculation when compared with control. Sinergistic effect was also observed in canker lesions treated with LN, when compared with lesions treated with EC and FRC. But after 8 day EC strain reduced significantly Xac 306 population in the lesions and the effect was kept until 32 days when compared with non-inoculated plants (Fig 1). When treated with LN strain, the population size in lesion after 8 days can not be determined, maybe because the lesions collected in those leaves were old, once after 16 and 32 days the ufc number of Xac 306 was great in this treatment.

3.2. Effect of cell-free supernatants on citrus canker incidence and severity

Spraying of cell-free supernatant did not show significative difference when compared with control (data not shown), this probably occurred because the cell-free supernatant could not adhere to leaf surface. But when was used a piece of cotton embebed with 1 mL of supernatant significantly differences in lesion area were observed in all treatment in the post19 treatment when compared with control. In the pre-treatment

experiment was not observe any difference. Data for LN strain in pre-treatment was not show because the leaves fall with high number of lesions formed (Fig 2).

3.3. *Effect of ethyl-acetate fraction from LN strain on citrus canker incidence and severity*

First at all, in *in vitro* conditions the EC and FRC strains showed the smallest inhibition halos in cell-free supernatant and organic solvents fraction tests. In this experiment the LV strain inhibited Xac 306 in all fractions obtained with organic solvents except in non-soluble fraction (H₂O phase). LN strain showed the biggest antagonistic effect against Xac 306 (Table 3.1).

In plant experiment, in the post-treatment the ethyl-acetate fraction showed the same effect in all concentration tested and reduced significantly the lesion number in orange leaves when compared to the control plants inoculated only with Xac 306. On the other hand, the pre-treatment did not show any effect on the lesion number (Fig 3).

Ethyl-acetate fraction from LN strain was also tested with cotton pieces. Once again, post-treatment showed significant reduction in lesion area for all concentration tested when compared with control, also the doses used showed different effects among them. In pre-treatment, the concentrations 0.006 and 0.01 increased significantly lesion area on orange leaves when compared with control inoculated only Xac 306 (Fig 4).

3.4. *Bacterial antagonist ability on Xac 306 population size*

The relative population control index (RPC) is the log difference in pathogen population size between pathogen only control and antagonist treatment. The RPC is the proportional log decrease in pathogen density compared to pathogen control (Stromberg et al., 2004).

The EC strain showed more capacity to reduce Xac 306 population in the citrus canker lesions and the others strains evaluated did not show significant effect. Strains LV and LN increased significantly pathogen population size associated with the citrus canker lesions after 4 day of the antagonistic inoculation (Table 2).

3.5. Bacterial antagonist ability on the incidence and severity of citrus canker

The relative disease control index (RDC) is the proportional decrease in disease severity compared to the pathogen only control (Stromberg et al., 2004). Sprayed cell-free supernatants had no effect on the lesion number in the pre and post-treatment, on the other hand, when the inoculation was made by a piece of cotton, the lesion area was reduced significantly in all antagonistic strains but only in post-treatment when compared with control. In pre-treatment only LV supernatants reduced disease severity (Table 3).

The differences among ethyl-acetate concentrations obtained by fraction from LN supernatant is more clear when the RDC index was applied. Independent of the method used to inoculate the supernatant (spraying or in a embedded cotton piece), the post-treatment showed significant effect in the incidence and the severity of citrus canker in all concentrations tested, reducing lesion number and lesion area respectively (Table 4). In the pre-treatment, the lesion area was increased by concentrations 0.006 and 0.01 g mL⁻¹ (Table 4)

4. Discussion

The absence of papers, which studies biological control of Xac (lesions formation and/or number of cells alive) using antagonistic bacteria or their metabolites, cause

some difficult to discuss the present results, because we can not compare with other finds obtained by others studies. However, there are some studies that used bacteria as control agent with others species of *Xanthomonas* causing disease in other plants.

The antagonistic strains showed different effects on the number of UFC of Xac inside the lesions, this results could be occurred because the strains were isolated from diferents place. Stromberg et al. (2000) suggest that the intensity of resource competition between potential antagonists and the pathogen varies among potential antagonists. The biggest ihibitory effect observed during the experiment was caused by EC, only one there was not isolated from canker lesions. All other antagonistic strains were isolated from canker lesions and increased the Xac 306 population inside the lesions. Stromberg et al., (2000) defines biocontrol as a function of both the probability that a potential antagonist will colonize infected sites of Xac 306 and the ability to reduce the size of pathogen population in those sites. In the present study, all strain that increased Xac 306 population were recupered from lesion environment, then this effect, could be involved with some compounds that is recognised by pathogen improving its population and not due to the non-colonization of the site. Just as microbial antagonists utilize a diverse arsenal of mechanisms to dominate interactions with pathogens, which have surprisingly diverse responses to counteract antagonism (Duffy et al., 2003).

Inducing antagonists to produce secondary metabolites in *in vitro* conditions, and spraying them in orange leaves increased the efficiencie in disease control. When the product used was cell-free supernatant the effect observed in lesions area, was influenced by the time (pre or post) that the product was applied showing great difference with inhibitory effect on the lesions area in the post-treatment when compared with control. This result suggests that bacterial antagonists have a direct action on Xac 306.

In the opposite of our findings, Stromberg et al. (2000) suggested that inoculation of antagonists prior symptom development consists in the way to control disease caused by *X. translucens* pv. *translucens* in wheat. However the authors did not used antagonistic strains isolated from lesions and according Kinkel (1997), carrying capacities for microbes on leaves vary among plant species. In other studies Rampazo (2004), when used bacterial suspension of the same strains used in the present paper, found the same results obtained here, where the pre-treatment increased Xac 306 population. The results shows that antagonistic effect is influenced by the time it was applied in the case of Xac 306.

When the fraction obtained by ethyl-acetate sprayed or embebed in piece of coton, the same results were found, it means that the antagonistic effect was observed only in the post3 treatment for all concentrations of the extract.

Variable performance remains an obstacle to the use of many more promising biocontrol agents in agriculture and horticulture. This variable performance has been ascribed to a multitude of factors, including poor survival and colonization by the introduced strain, and variable expression of key antagonistic traits (Duffy et al., 2003). Cell-free substances applied for pathogen control showed better effects in citrus canker supression, once it is not susceptible to these factors.

In the case of applied RPC the EC strain confirm your antagonistic effect on Xac 306 population. In the case of RDC the products from antagonistic bacteria used decreased incidence and severety of citrus canker disease on applied after Xac 306 infection.

Acknowledgements

We would like to thank the Coordination of the Graduate Professionals Development Program (CAPES) for granting a Master's Degree scholarship and financial support.

References

- Alves, S.B., Medeiros, M.B., Tamai, M.A, Lopes, R.B., 2001. Trofobiose e microrganismos na proteção de plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* n.21.
- Brunings, A.M., Gabriel, D.W., 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* 4:141-157.
- Cain, C.C., Henry, A.T., Waldo III, R.H., Casida Jr, L.J., Falkinham III, J.O., 2000. Identification and characteristics of a novel Burkholderia strain with broad-spectrum antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4139-4141.
- Cubero, J., Graham, J.H., 2002. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1257-1264.
- Devore J. and Peck R., 1993. *Statistics: the Exploration and Analysis of Data*, Duxbury, Pacific Grove, California.
- Duffy, B., Schouten, A. and Raaijmakers, J.M. 2003. Pathogen self-defence: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41:501–538.
- Földes, T., Bánhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., Szigeti, J., 2000. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* 89:840-846.
- Goto, M., 1992. Citrus canker. In: Kumar, J. ed. *Plant diseases of international importance: Diseases of Fruit Crops*. Vol. III. Englewood Cliffs: Prentice Hall p. 170-208.
- Gottwald, T.R., Sun, X., Riley, T., Graham, J.H., Ferrandino, F., and Taylor, E.L. 2002. Geo16 referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, 92:361-377.

- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Cubero, J., Achor, D.S., 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular plant pathology* 5, 1–15.
- Hewith, E.J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition, 2nd ed. Farnham: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Hirano, S.S., Nordheim, E.V., Arny, D.C., Upper, C.D., 1982. Lognormal Distribution of Epiphytic Bacterial Populations on Leaf Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 44:695–700.
- Kinkel, L.L., 1997. Microbial Population Dynamics on Plant Surfaces. *Annual Review of Phytopathology* 35:327-347.
- Pruvost, O., Boher, B., Brocherieux, C., Nicole, M., Chiroleu, F., 2002. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. *Phytopathology* 92:336-346.
- Rampazo, L.G.L, 2004. Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na incidência de lesões foliares do cancro cítrico. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina.
- Roberts, P.D., 2002. Citrus Canker Management Strategies. Indian river citrus seminar. Southwest Florida Research and Education Center.
- Silva, A.C. da., [et.al.], 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 23;417(6887):459-63.
- 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., 2004. 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.
- Zuberer, D.A., 1994. Recovery and enumeration of viable bacteria. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S., (eds) *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*. American Society of Agronomy, Madison 119-144.

Figures key

Figure 1. Effect of antagonist bacterial suspension on Xac 306 population in a canker lesion.

Diferent letters for each time shows significative difference according to Duncan test

($P \leq 0.05$).

Figure 2 Effect of antagonist cell-free supernatants on citrus canker severity. Diferent letters

for each time shows significative difference according to Duncan test ($P \leq 0.05$).

Figure 3: Effect of spraying ethyl-acetate fraction from LN strain on citrus canker incidence.

Diferent letters for each time shows significative difference according to Duncan test

($P \leq 0.05$).

Figure 4: Effect of ethyl-acetate fraction from LN strain on citrus canker severity. Diferent

letters for each time shows significative difference according to Duncan test ($P \leq 0.05$).

Figure 1

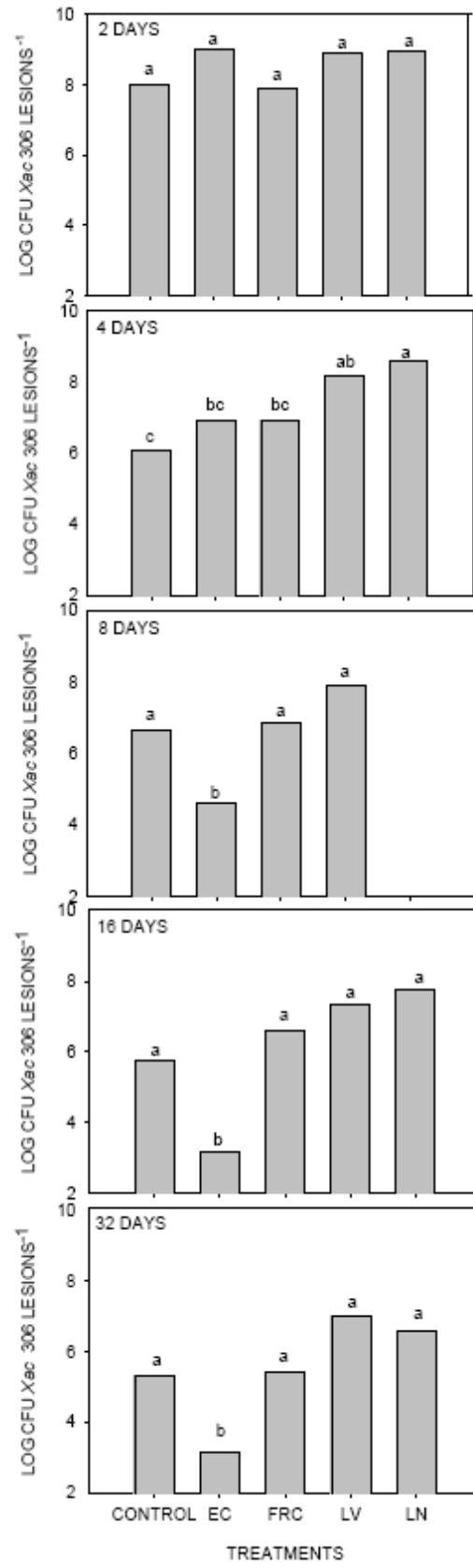


Figure 2

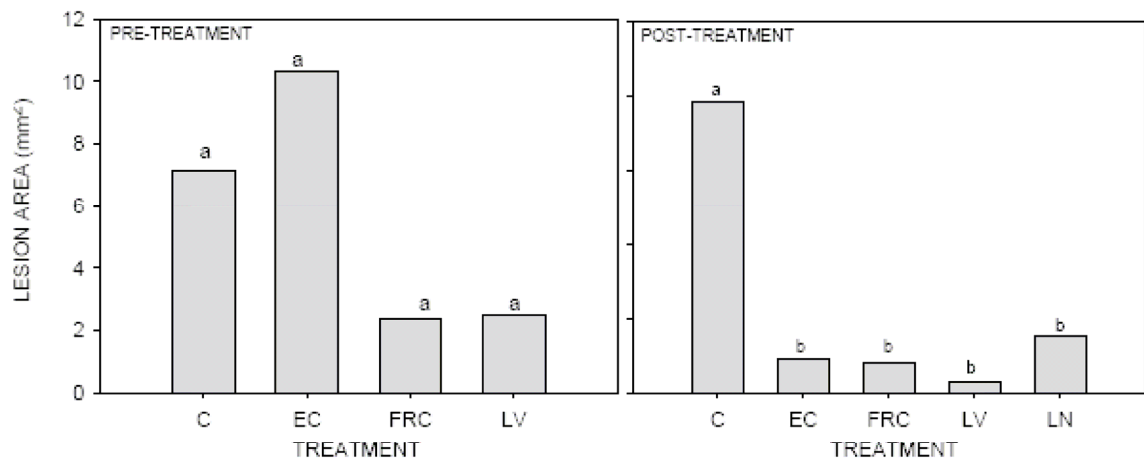


Figure 3

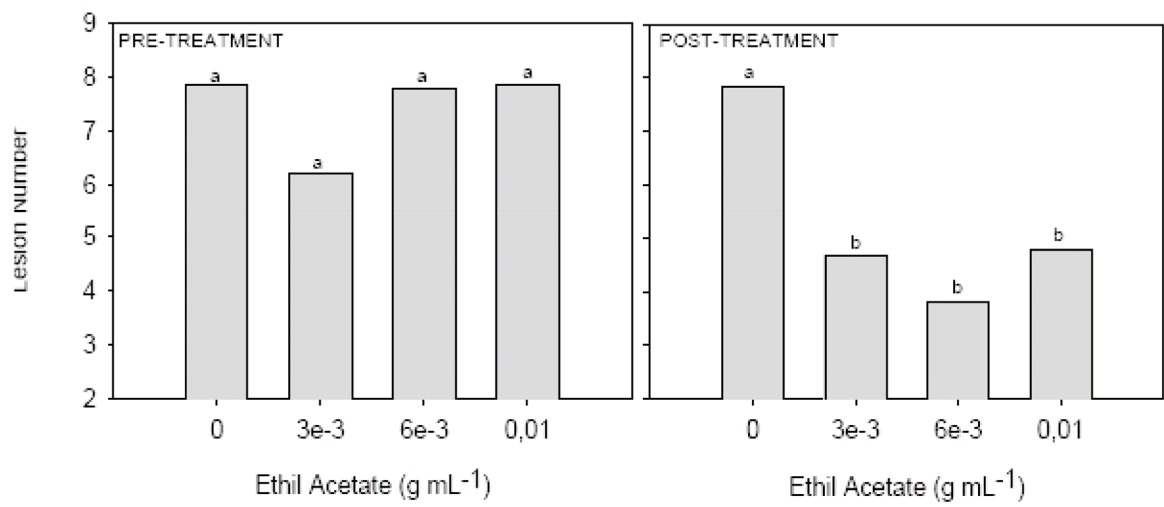


Figure 4

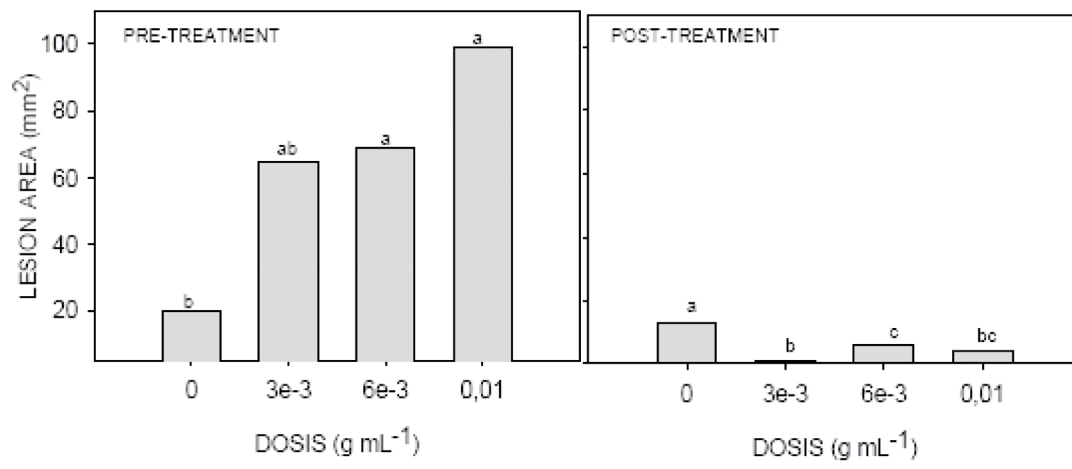


Table 1. Evaluation of *in vitro* antagonism test of cell-free supernatants and organic solvents fractions from antagonistic bacteria products.

Antagonist strains	Cell-free Supernatants	Organic Solvents Fractions ^a					
		Aqueous	Ethyl-acetate	Dicloromethane	<i>n</i> -Butane	Dicloromethane White	Ethy-Lacetate White
EC	17	0	13	0	17	0	0
FRC	15	0	14	0	0	0	0
LV	20	0	20	25	13	22	21
LN	45	0	40	30	0	13	15

^a Fractions obtained from extraction of cell-free supernatants with organic solvents. Numbers show the diameter of inhibition halos (mm).

Table 2. Biological control of Xac 306 population inside the canker lesions by bacterial antagonist

Bacterial antagonist ^a	RPC ^b				
	Time (days)				
	2	4	8	16	32
EC	-1.11019	-1.33277	1.793665*	2.114559*	2.489441*
FRC	0.056835	-1.36058	0.250113	-0.82979	0.67731
LV	-0.57704	-2.54452*	-1.27901	-2.00725	-1.41558
LN	-0.75159	-2.80509*	-	-1.65821	-0.28859

^a Bacterial antagonist inoculated at a density of 10^8 CFU mL⁻¹ 21 days after Xac 306 inoculation.

^b Relative population control index. Positive index demonstrates population suppression by the antagonist.

* Significant difference compared to control according to the Duncan test ($P \leq 0.05$).

Table 3 - Biological control of citrus canker incidence and severity by antagonist cell-free supernatants.

Cell-free supernatants ^a	RDC ^b			
	Spread		Cotton	
	Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment
EC	0.035215	-0.617	0.272404	0.605748*
FRC	0.343743	-0.3527	0.526197	0.500718*
LV	0.540717	-0.6921	0.600454*	0.674546*
LN	-0.51445	-0.50914	0.223408	0.406158*

^a Cell-free supernatants obtained from liquid culture of antagonist strains. Source: (Rampazo, 2004).

^b Relative disease control index. Positive index demonstrates disease suppression by the antagonist.

* Significant difference compared to control according to the Duncan test ($P \leq 0.05$).

Table 4 - Biological control of citrus canker incidence and severity by ethyl-acetate fraction from LN strain.

Ethyl-acetate concentrations (g mL ⁻¹) ^a	RDC ^b			
	Spread		Cotton	
	Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment
0.003	0.071564	0.181658*	0.019742	0.801048*
0.006	-0.08722	0.265598*	-0,07209*	0.280828*
0.01	-0.06364	0.211815*	-0.42671*	0.482538*

^a Fraction obtained from extraction of cell-free supernatants with ethyl-acetate.

^b Relative disease control index. Positive index demonstrates disease supression by the antagonist.

* Significant difference compared to control according to the Duncan test ($P \leq 0.05$).