



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
LABORATÓRIO DE ECOLOGIA MICROBIANA**

LETÍCIA SAYURI MURATE

**ATIVIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
BACTERIANOS NO CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO**

**Londrina
2007**

LETÍCIA SAYURI MURATE

**ATIVIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
BACTERIANOS NO CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO**

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
2007**

LETÍCIA SAYURI MURATE

**ATIVIDADE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
BACTERIANOS NO CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Prof. Dr. Martin Homechin

Londrina, 20 de abril de 2007.

DEDICATÓRIA

À minha família; aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana e todos que de alguma forma me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Carlos e Mivako por todo amor, carinho, apoio e incentivo, e por todo o sacrifício e dedicação que tiveram com suas filhas; por serem espelhos de vida e por acreditarem em mim.

As minhas irmãs Patrícia e Márcia pela amizade e paciência, as quais são muito importantes para mim.

Ao meu namorado Wilson pelo amor, paciência, companheirismo e pelo exemplo de dedicação que você me mostrou.

Aos meus familiares que também me apoiaram muito, em especial para Tia Cristina, Melina e Yuna.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade, pela orientação e pela confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Nogueira pelas preciosas informações e pelo exemplo de competência profissional.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello por ajudar a fornecer condições para o desenvolvimento deste trabalho, permitindo a utilização de alguns equipamentos de seu laboratório.

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

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

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

Aos companheiros de laboratório Lela, Camila, Cícera, Cristiane, Fabiana, Flávia, Ivana, Luís Eduardo, Marina, Nathália, Rafael, Rebeca e Thaís pela convivência; em especial Dafila e Admilton pela ajuda nos experimentos. .

Aos meus grandes amigos Andrea, Gisele, Graziela, Ricardo, Shoyu, Tici e Wanner pela força e por todo carinho, principalmente nos momentos difíceis.

Ao Luís Gustavo de Lázaro Rampazo, do Instituto Agronômico do Paraná, pela cooperação no desenvolvimento do trabalho.

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

MUITO OBRIGADA!!!

LISTA DE TABELAS

Table 1. Effects of fraction derived from the supernatant of LN culture extracted with methanol (AMF) and ethyl acetate (EAF), and fractions obtained from vacuum liquid chromatography extracted with n-hexane (VLC1), dichloromethane (VLC2), ethyl acetate (VLC3), methanol (VLC4), water: methanol mix vol:vol (VLC5) and distilled water (VLC6) in ten-fold dilution on the growth of *Xac 306* in nutrient agar in Petri dishes.....41

Table 2. Effects of fraction derived from the second extraction with ethyl acetate (EAF) of supernatant of LN culture and fractions obtained from vacuum liquid chromatography extracted with dichloromethane (VLC2), ethyl acetate (VLC3), and methanol (VLC4) in two-fold dilution on the growth of *Xac 306* cultured in 24-well tissue culture plate. (+) growth inhibition and (-) no inhibition.....42

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Correlation between rate of cell mortality and fractions concentrations. (A) [EAF] Fraction from the second extraction with ethyl acetate of supernatant of bacterial culture. (B) [VLC2] Fraction derived from de vacuum liquid chromatography extracted with dichloromethane. (C) [VLC3] Fraction derived from de vacuum liquid chromatography extracted with ethyl acetate.....44

Figure 2. Control of citrus canker lesion formation by *Xac 306* on leaf of orange trees (*C. sinensis* pv. Valencia) by fractions derived from the second extraction with ethyl acetate (EAF) of supernatant of LN culture and fractions obtained from vacuum liquid chromatography extracted with dichloromethane (VLC2), ethyl acetate (VLC3) in a concentration of 10 mg mL⁻¹. Values are the means of 5 replicates. Means for each treatment with the same letter are not significantly different of Tukey test ($p \leq 0.05$).....45

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	01
1.1 Origem e distribuição geográfica	01
1.2 Etiologia	02
1.3 Sintomatologia	03
1.4 Epidemiologia do cancro cítrico	04
1.5 Larva minadora dos citros	06
1.6 Controle do Cancro Cítrico	07
1.7 Controle Biológico	13
1.8 Metabólitos bacterianos com atividade antimicrobiana	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
ARTIGO: ACTIVITY OF BACTERIAL SECONDARY METABOLITES IN THE	29
CONTROL OF CITRUS CANKER	
Abstract	30
1. Introduction	31
2. Material and methods	32
2.1. <i>Bacterial Strains and Growth Conditions</i>	32
2.2. <i>Xac 306 inoculum</i>	32
2.3. <i>Antagonistic bacterial extract</i>	33
2.4. <i>Vacuum liquid chromatography (VLC)</i>	33
2.5. <i>Antimicrobial activity assay in Petri dishes</i>	34
2.6. <i>Antimicrobial activity assay in 24-well tissue culture plate</i>	34
2.7. <i>Citotoxicity assay</i>	35
2.8. <i>Antimicrobial activity test in orange trees</i>	35
3. Results	35
3.1. <i>Antimicrobial activity assay in Petri dishes</i>	35
3.2. <i>Antimicrobial activity assay in 24-well tissue culture plate</i>	36
3.3. <i>Citotoxicity assay</i>	36
3.4. <i>Antimicrobial activity test in orange trees</i>	36
4. Discussion	37
References	38
Figures legend	43

MURATE, Letícia Sayuri. **Atividade de metabólitos secundários bacterianos no controle do cancro cítrico**. Londrina, 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

O desafio é encontrar novos métodos para o controle da doença do cancro. Atualmente, o controle é feito através de erradicação ou uso de metais pesados (cobre) como bactericidas. A bactéria LN foi cultivada em meio líquido e o sobrenadante, centrifugado para retirada de células, foi tratado com metanol (AMF) e acetato de etila (AEF), e posteriormente o extrato foi concentrado, filtrado, liofilizado; e fracionado por cromatografia líquida a vácuo (CLV). Depois da CLV, oito frações foram obtidas: FAM, FAE, CLV1, CLV2, CLV3, CLV4, CLV5 e CLV6. Todas as frações foram testadas para atividade contra *Xanthomonas axanopodis* pv. *citri* (Xac 306) para ensaios de atividade antimicrobiana, em placas de petri e placas de cultura com 24 poços, esse método demonstrou efeito inibitório mas em diferentes concentrações. Efeito citotóxico em todas as frações em $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Em plantas somente CLV3 mostrou resultados significantes ($p < 0,05$), reduzindo a incidência de lesões de cancro.

MURATE, Letícia Sayuri. **Activity of bacterial secondary metabolites in the control of citrus canker**. Londrina, 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

The challenge is finding new methods to control citrus canker disease. Today the control is making to cut plants or use heavy metal (copper) as bactericide. The LN bacteria strain was cultured in liquid medium and the supernatant free-cells was treated with methanol (AMF) and ethyl acetate (AEF), respectively, and then the extract was concentrated, filtrated, lyophilized; and fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC). After VLC, eight fractions were obtained: AMF, EAF, VLC1, VLC2, VLC3, VLC4, VLC5 and VLC6. All fractions were tested its activity against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac 306) by antimicrobial activity assay, in Petri dishes and *in 24-well tissue culture plate* method showed inhibitory effect but in different concentrations. Citotoxicity effects were observed in all fractions in 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration. In plants only VLC3 showed significant results ($p < 0.05$), reducing the incidence of canker lesions.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Origem e distribuição geográfica da doença

Cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, é um dos fatores importantes na produção de citros no mundo (Gottwald et al., 2002). Sob condições de elevados níveis da doença, ocorre queda prematura dos frutos, com conseqüente perda de produção. Não existem medidas de controle capazes de eliminar a doença, e medidas como erradicação de plantas doentes e das sob suspeitas de contaminação se torna a maneira mais eficaz de controlar a doença (Gottwald et al., 2001), causando grandes danos econômicos.

As primeiras indicações do cancro cítrico se deu na Índia, em folhas herbarizadas de cidra (*Citrus medica*), coletadas entre 1827 e 1831 (Bitancourt, 1957; Fawcett e Jenkins, 1993). Originário do Sudeste Asiático, mesmo centro de origem dos citros, o cancro cítrico atingiu várias regiões do mundo (Koizumi, 1985). A primeira constatação da bactéria causadora da doença no Hemisfério Ocidental foi feita nos Estados Unidos por volta de 1910, em mudas de citros provenientes do Japão (Stall e Seymour, 1983). Anos mais tarde, sua ocorrência foi relatada na África do Sul, em 1916; na Austrália e Nova Zelândia, em 1937; e nas Ilhas Fiji, em 1954 (Jones et al., 1984). Hoje está presente em países localizados na Oceania, Ásia e América, infectando plantas da família Rutaceae (Civerolo, 1984). Na América do Sul já havia sido relatada no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (Feichtenberger, 1997; Leite Junior, 1990) e recentemente na Bolívia (Braithwait et al., 2002). No Brasil, foi introduzida provavelmente por volta de 1957 no município de Presidente Prudente em material propagativo proveniente do Japão (Bitancourt, 1957). Disseminou-se para outras regiões e Estados brasileiros, como nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais (Feichtenberger et al., 1997) e por último em Roraima (Nascimento et al., 2003).

1.2 Etiologia

A *Xanthomonas axanopodis* pv. *citri* (Bactéria, Proteobacteria, Subdivisão Gamma, Xanthomadales), agente causal do cancro cítrico, é um bastonete gram-negativo, aeróbio estrito e apresenta um único flagelo polar. Quando cultivada em meio ágar nutriente apresenta colônias amarelas, com aspecto viscoso devido a produção de exopolissacarídeos, sendo visíveis após 24 e 72 horas de incubação a uma temperatura de 28 °C (Brunnings e Gabriel; 2003).

Existem tipos distintos de doenças do cancro cítrico causados por diferentes patovares ou variantes da bactéria *Xanthomonas axanopodis*; a separação dessas formas é baseada conforme susceptibilidade de hospedeiros e outras características fenotípicas e genotípicas das cepas. O cancro cítrico asiático (cancrose A), causado pela cepa asiática *X. axanopodis* pv. *citri*, é a forma mais severa da doença. Afeta várias espécies da família Rutáceas e encontra-se disseminado na Ásia, África, América e Oceania. A Cancrose B, causada pela cepa B de *X. axanopodis* pv. *aurantifolii*, com maior importância em limões verdadeiros (*Citrus limon*) e lima ácida “Galego” (*Citrus aurantifolia*), sendo encontrada na Argentina, Paraguai e Uruguai. A Cancrose C, também causada pela *X. axanopodis* pv. *aurantifolii*, foi isolada em 1970 de lima mexicana no Estado de São Paulo, mas é raramente encontrada desde então. O único hospedeiro natural conhecido dessa bactéria é o limão Galego. Outras formas da bactéria do cancro cítrico têm sido relatadas, como os isolados A* descobertos em Omã, Arábia Saudita, Irã e Índia que produzem lesões como Cancro A somente em lima mexicana, mas aparentam ser distintas da cepa A (Vernière et al., 1998; Mohammadi et al., 2001).

O processo infeccioso envolvendo bactérias do gênero *Xanthomonas* compreende etapas, como penetração na planta através de ferimentos e aberturas naturais, multiplicação nos espaços intercelulares até que estes se tornem preenchidos pelas células bacterianas ou por seus exopolissacarídeos (Rudolph, 1993), levando ao desenvolvimento de uma borda encharcada, aumento da permeabilidade das células das plantas, com a perda de nutrientes pelas células da planta. Em algumas espécies e patovares de *Xanthomonas*, a bactéria invade o tecido vascular, onde se multiplica e se propaga através deste. Durante o processo infeccioso nos tecidos foliares ou vasculares, as

células adjacentes as infectadas começam a se degradar. Ocorre degeneração das organelas das plantas as quais se dilatam e fragmentam, e ao final as células bacterianas penetram e se multiplicam dentro das células. Como sintomas causados inclui cloroses, necroses, murcha, hipertrofia, podridão, e cancrios (Rudolph, 1993). Esse patógeno têm sido descritos como sendo ambos biotrófico (i.e. alimentando-se no espaço intercelular do tecido hospedeiro) uma vez que multiplicam-se consideravelmente antes de qualquer dano visível e, necrogênicos por matar as células da planta causando necrose (Alfano e Collmer, 1996). Entretanto, pode ser que várias são consideradas como hemi-tróficas, isto é, bactérias que se alimentam inicialmente do espaço intercelular do tecido hospedeiro, mas depois destroem e matam células hospedeiras e utilizam os nutrientes das células mortas.

1.3 Sintomas

A doença pode ocorrer em toda a parte aérea da planta cítrica com sintomas característicos os quais variam de acordo com o tipo e idade do órgão infectado pela bactéria. A temperatura ideal para a infecção varia entre 20^o e 30^oC (Koizumi, 1977).

Inicialmente, na superfície de ramos, folhas e frutos jovens, aparecem lesões eruptivas, levemente salientes, puntiformes, de cor creme ou parda, as quais tornam-se esponjosas, esbranquiçadas e pardacentas e algumas vezes circundadas por halo amarelo (Leite Junior, 1990; Rossetti, 2001).

A penetração do patógeno no tecido da planta hospedeira se dá através dos estômatos (Graham et al., 1992 a, b) e/ou ferimentos nos tecidos (Koizumi e Kuhara, 1982). Os primeiros sintomas nas folhas aparecem na forma de pequenas pústulas após 9 dias de infecção. Com o aumento da idade das lesões, estas se tornam claras, e após marrons, e surge uma borda encharcada, freqüentemente circundada por halo clorótico. O tamanho das lesões nas folhas depende muito da suscetibilidade do hospedeiro, podendo atingir até 10 mm de diâmetro em cultivares suscetíveis de laranja e pomelo (Leite Junior, 1990; Stall e Seymour, 1983). Quando a incidência da doença é elevada, a doença provoca a desfolha prematura de ramos, comprometendo o processo fotossintético, que por sua vez reflete em baixas produções e no

depauperamento generalizado da planta (Gottwald et al., 1998; Leite Junior, 1990).

Quando as lesões atingem grandes áreas podem provocar a morte prematura de ramos (Feichtenberger, 1997). Nos frutos, as lesões podem atingir a parte interna da casca e geralmente são maiores do que em folhas apresentando fissuras no centro (Feichtenberger, 1997; Leite Junior 1990). Quando o nível de doença é elevado, o desenvolvimento dessas lesões pode acarretar a queda dos frutos antes de atingirem a maturação final e prejudicar a qualidade dos frutos remanescentes na planta pela presença de lesões e/ou deformações (Gottwald et al., 1997; Vernière et al., 2003).

1.4 Epidemiologia do cancro cítrico

Em folhas e ramos, a infecção natural ocorre até seis semanas após o início do desenvolvimento desses órgãos e os frutos são suscetíveis até cerca de 90 dias a partir da queda das pétalas, podendo ser mais prolongado na ocorrência de ferimentos (Feichtenberger, 1997; Leite Junior, 1990; Zubrzycki, 1998). Folhas são mais suscetíveis até atingirem aproximadamente 85% do tamanho normal (Goto, 1990) e tornam-se mais resistentes quando completam total expansão (Graham; Gottwald, 1991). Estudos realizados por Graham e Gottwald (1991) mostram que a maior suscetibilidade dos frutos ocorre quando estes apresentam de 2 a 4 cm de diâmetro e se prolonga, porém de forma menos acentuada, até o seu completo crescimento.

Stall et al. (1980) observaram que em condições de campo as lesões de cancro apresentam a mesma quantidade de inóculo, independentemente do seu tamanho, idade e do cultivar no qual a lesão foi produzida, podendo variar de 10^5 a 10^6 UFC/lesão. A liberação de células bacterianas, no entanto, é mais intensa em lesões novas (Timmer et al., 1991). Na presença de filme de água, a exsudação é instantânea, liberando de 10^4 a 10^5 UFC/lesão (Bock; Parker; Gottwald, 2001). Progressivamente, as lesões tornam-se suberizadas e a liberação do inóculo ocorre lentamente (Timmer et al., 1991).

Segundo Canteros (2000), a intensidade do cancro cítrico nas plantas e a severidade dos sintomas nos frutos variam com as estações do ano, sendo menores em anos com índices pluviométricos reduzidos na primavera. Leite Junior et al. (1987) constataram que precipitações elevadas e aumento da

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

A bactéria se multiplica em lesões nas folhas, galhos e frutos. Ventos-dirigidos com chuva é o principal agente condutor de dispersão. E ventos com velocidade ≥ 8 m/s aumentam a penetração da bactéria através das aberturas dos estômatos ou ferimentos causados pelas tempestades, insetos como a larva minadora do citrus (*Phyllocnistis citrella*) e rajadas de areia. De acordo com Gottwald et al. (2002), os incrementos dos níveis de cancro cítrico normalmente são observados cerca de 100 dias após a ocorrência de chuvas acompanhadas por ventos intensos.

Xanthomonas axanopodis pv. *citri* persiste em lesões velhas de uma estação de crescimento para a outra, especialmente naquelas lesões formadas depois da estação de crescimento (Koizumi, 1977). O inóculo bacteriano se mantém viável tão longo quanto for à sobrevivência das células hospedeiras na vizinhança da lesão, embora a população de bactérias decline rapidamente em baixas temperaturas. Em condições tropicais não ocorre diminuição da população, porque o crescimento das bactérias continua na margem de lesões velhas até o surgimento de condições favoráveis (Pruvost et al., 2002). Um polissacarídeo extracelular encapsula as células das bactérias exsudadas na superfície da lesão e isto auxilia na sua dispersão e sobrevivência (Goto e Hyodo, 1985). A persistência da *Xanthomonas axanopodis* pv. *citri* por várias semanas em material de plantas não hospedeiras e na zona de raízes de algumas gramíneas embaixo de árvores doentes foi reportado no Japão (Goto et al., 1975) e no Brasil (Pereira et al., 1978). Graham et al. (2000) detectaram bactérias sobrevivendo em varias superfícies inanimadas como metal, plástico, roupas e madeira processada sob sombra, mas o inóculo exposto sob sol, morre em 24-72 horas. Uma vez folhas doentes ou frutos tenham caído no chão, a população de bactéria declina para um nível não detectável em 1-2

meses por causa do antagonismo e competição com organismos saprofiticos (Graham et al., 1989).

Algumas células bacterianas podem sobreviver por vários anos nas lesões de ramos de galhos (Goto, 1992). Bactérias que se depositam nas superfícies de plantas morrem em poucas horas devido a dessecação e exposição direta aos raios solares (Graham et al., 2000); sobrevivem por poucos dias no solo, e alguns meses em restos de plantas que foram incorporadas ao solo (Graham et al., 1989). Por outro lado, podem sobreviver por vários anos em tecidos infectados que tinham sido guardados secos e livres do solo (Goto, 1992).

1.5 Larva minadora dos citros

Com o surgimento da larva minadora dos citros houve um importante aumento nos níveis de cancro cítrico e mudança no comportamento da doença nos pomares da Brasil e da Flórida, onde o inseto também ocorre (Bergamin Filho et al., 2001; Gottwald et al., 1997; Rodrigues et al., 1998). Até 1996, o padrão de distribuição do cancro cítrico no pomar sempre foi muito agregado, devido ao seu mecanismo de disseminação por respingos de chuva e ventos. Este tipo de padrão fazia com que a erradicação de plantas fosse uma medida eficiente de controle da doença. Com a introdução da larva minadora dos citros a distribuição espacial do cancro vem sendo modificada, ocorrendo padrões de agregação intermediários com numerosas infecções satélites e até distribuição ao acaso de plantas afetadas.

A atividade de alimentação da larva minadora facilita a infecção bacteriana de três maneiras: primeiro, o rompimento da cutícula abre o mesófilo da folha para infecção bacteriana direta, aumentando as vias de entrada da bactéria por contato ou chuvas com vento; segundo, a ferida da larva minadora cicatriza mais lentamente que feridas mecânicas, permitindo um longo período de exposição para infecção bacteriana; terceiro, a larva minadora pode se tornar contaminada pela bactéria e transportá-la através das galerias de alimentação. Esses processos resultam em uma proliferação da infecção do mesófilo dentro das galerias (Bergamin-Filho et al. 2001; Graham et al. 1996).

As galerias formadas pela ação da larva minadora dos citros promovem atraso no crescimento de mudas, prejudicam o ramo produtivo, provoca queda

prematura de folhas, que por sua vez levam à redução da produção (Gravena, 1994) e da taxa fotossintética da planta (Penteado Dias et al., 1997). Nos Estados Unidos e Honduras também foi observado o ataque da larva minadora dos citros em frutos (Gottwald et al., 1997). Vários autores vêm relacionando o aumento de cancro cítrico com a presença de larva minadora dos citros (Cook, 1988; Gottwald et al., 1997; Rodrigues et al., 1998; Venkateswarlu e Ramapandu, 1992). Feichtenberger (2000) relata que com a introdução deste inseto no Brasil houve expressivo crescimento do número de focos da doença, associados na sua maioria com as galerias. Observações realizadas no Paraná e no Rio Grande do Sul evidenciaram que em pomares infectados com a bactéria do cancro houve aumento do nível da doença, quando comparado aos anos anteriores, devido à presença de galerias construídas pela larva minadora dos citros (Rodrigues et al., 1998). Chagas e Parra (1998) observaram que as galerias facilitam a penetração e o desenvolvimento do cancro. Experimentos de laboratório demonstraram que lesões de cancro estavam presentes em cerca de 85 a 100% das folhas danificadas pela larva minadora dos citros, quando inoculadas com a bactéria (Chagas et al., 1998).

1.6 Controle do Cancro Cítrico

Xac é um patógeno de planta candidato a erradicação porque possui características fundamentais: (i) a bactéria é incapaz de sobreviver fora da lesão no hospedeiro por grandes períodos; (ii) a bactéria não tem um vetor eficiente (além do homem); (iii) as lesões são facilmente identificáveis, o que permite um diagnóstico relativamente rápido e preciso; (iv) a gama de hospedeiros da bactéria inclui lavouras de árvores frutíferas perenes de alto valor comercial; (v) muitas variedades comerciais de citros são moderadamente a altamente susceptíveis, portanto, as medidas de controle da doença são pouco eficazes e relativamente caras e (vi) a doença tem sido erradicada com sucesso em campanhas na Florida, Austrália e África do Sul.

Em 1972 foi regulamentada a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANEEC), que estabeleceu a adoção de medidas de exclusão e erradicação para o controle da doença. Com o objetivo de viabilizar o restabelecimento da citricultura nas áreas anteriormente interditas, iniciou-se em 1978 um programa de pesquisa no Estado, com a finalidade principal de

estudar o cancro cítrico nas condições paranaenses e, dessa forma, desenvolver e avaliar medidas apropriadas para a sua prevenção e controle. Baseados nos resultados obtidos em pesquisas conduzidas no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) e também em informações adicionais provenientes de outros países, foi desenvolvido um programa de manejo integrado para efetivamente prevenir a ocorrência e controlar a doença em novos plantios de citros (Leite Junior, 1990; Leite Junior e Moham, 1990). Entre outras conseqüências, o manejo integrado da doença promoveu alterações consideráveis nas medidas regulatórias anteriormente estabelecidas.

Até o início da década de 80, as medidas regulatórias de quarentena eram aplicadas aos municípios. Assim, a constatação do cancro cítrico em pomares de uma única propriedade implicava na interdição de todas as outras propriedades do município para o cultivo de citros (Leite Junior, 1990). No entanto, no final dos anos 80, os critérios adotados pela campanha de erradicação foram revisados e as medidas regulatórias de quarentena e erradicação passaram a ser aplicadas nas propriedades (Leite Junior e Moham, 1990). Inicialmente, essas medidas foram consideradas para todas as plantas cítricas doentes ou não. Posteriormente, com o estabelecimento de modificações dos critérios de erradicação, somente as plantas doentes e aquelas adjacentes num raio de até 1 quilômetro passaram a ser eliminadas (Hatschbach, 1986; Leite Junior e Moham, 1990). Nesta época, após a erradicação, a propriedade deveria ficar em quarentena por no mínimo um ano; período em que ficava proibido o cultivo ou a propagação de plantas cítricas na área. Foi a partir de então que somente implantações de pomares com cultivares de citros recomendados para o Estado passaram a ser permitidos (Hatschbach, 1986; Leite Junior e Moham, 1990).

Alguns procedimentos para o manejo do cancro cítrico e o comércio de frutas frescas e mudas foram adotados: (i) os viveiros devem ser localizados em locais livres de cancro cítrico, (ii) os pomares são manejados para prevenir ou reduzir o risco de epidemias de cancro cítrico através do estabelecimento de quebra-ventos, pulverização preventiva com cobre, construção de cercas para restringir o acesso aos pomares; (iv) pulverização de desinfetantes sobre a maquinaria, equipamentos de colheita dos pomares e trabalhadores, bem como a desinfecção de suas roupas e calçados; e (v) frutas frescas para comércio

interno e exportação são sujeitas a uma inspeção rigorosa para garantir a isenção dos sintomas do cancro cítrico em frutas em pomares e tratamentos sanitários nas câmaras de armazenagem de frutos.

Bactericidas à base de cobre são uma medida de controle padrão para o cancro cítrico em todo o mundo (Koizumi, 1985; Leite Junior e Mohan, 1990). Cobre reduz a população bacteriana na superfície das folhas e aplicações múltiplas são necessárias para alcançar um controle adequado em hospedeiros susceptíveis (Stall et al., 1980). A pulverização à base de cobre é efetiva por um período de 2 a 4 semanas quando as taxas de formação e crescimento das folhas se igualam (Graham et al., 1992a; Stall et al., 1982b). Os frutos são susceptíveis conforme vão crescendo de 2-6 mm de diâmetro por um período de 90-120 dias, dependendo da espécie de citrus (Graham et al., 1992b). Quando a incidência da infecção do cancro no início da formação das folhas é reduzido, a infecção subsequente do fruto é reduzida. Assim, a prevenção de lesões nos frutos será mais efetiva se for feito um tratamento das folhas no verão, durante sua formação (Kuhara, 1978; Stall et al., 1982b). A eficiência das pulverizações com cobre depende do seu contato com a bactéria na superfície da folha. Por isso a ocorrência de chuvas com ventos pode comprometer a eficiência desses programas de controle, visto que nesses casos as bactérias são introduzidas diretamente nos estômatos (Gottwald e Graham, 1992; Gottwald e Timmer, 1995). Após uso contínuo de bactericidas as base de cobre pode haver desenvolvimento de resistência das populações de *Xanthomonas* ao produto, o que compromete a eficiência do tratamento (Rinaldi e Leite Junior, 2000). Além disso, o acúmulo do metal no solo pode levar a efeitos tóxicos às plantas e ao ambiente (Alva et al., 1995). Outros bactericidas de contato testados, incluindo antibióticos, não são tão eficientes quanto os produtos à base de cobre (Leite Junior e Mohan, 1990; Timmer, 1988), além do fato de que tem ocorrido o desenvolvimento de resistência ao antibiótico por populações de *Xanthomonas* (Ritchie e Dittspongpitch, 1991).

Para um microorganismo ter sucesso no processo infectivo é necessário ocorrer adesão de suas células ao tecido da planta, transposição de barreiras existentes, inativação dos genes de defesa encontrados no hospedeiro, e, em alguns casos, produção de toxinas e enzimas extracelulares que possam facilitar a entrada no tecido vegetal. Por sua vez, plantas podem produzir

moléculas conhecidas como elicitores, as quais podem induzir respostas de defesa no tecido da planta. Dessas substâncias tóxicas, destacam-se as fitoalexinas, substâncias antimicrobianas de largo espectro, que são acumuladas em quantidades suficientes para restringir o desenvolvimento do patógeno (Dixon e Lamb, 1990). Algumas respostas de defesa são limitadas ao local de infecção, enquanto outras, como produção de inibidores de proteinases, ocorrem sistemicamente em regiões distantes do local de estímulo inicial (Bowles, 1990).

Várias linhagens bacterianas contêm determinantes de resistência a metais pesados, como Cu^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} e Zn^{+2} , localizados em plasmídios e transposons. Genes responsáveis pela captura de íons são expressos constitutivamente e, quando há aumento do nível desses íons metálicos, este sistema de captura continua a atuar. Como estes cátions são transportados para dentro das células, podem interferir nas funções normais de outros cátions e, conseqüentemente, da própria célula (Nies, 1992). Desta forma, a evolução de determinantes de resistência a metais pesados foi crucial para a sobrevivência de diversas bactérias. Os principais mecanismos de resistência podem assim serem enumerados: (1) seqüestro intra ou extracelular por componentes que se ligam a metais; (2) sistema de efluxo de cátions ou de ânions, através de um processo de transporte através da membrana, codificados por plasmídios bacterianos; (3) conversão enzimática de uma forma tóxica de um íon para uma forma menos tóxica e (4) diminuição da afinidade ao metal no sítio reativo da célula. Segundo Nies (1992), o sistema de componentes que se ligam a metais é mais comum em eucariotos, enquanto em procaríotos o efluxo de íons é mais encontrado.

Íons cobre são requeridos para a síntese de metaloproteínas que são, na sua grande maioria, oxigenases e proteínas transportadoras de elétrons (Brown et. al, 1992). Ao mesmo tempo em que as bactérias utilizam cobre em baixas concentrações, elas precisam desenvolver um mecanismo de regulação bem apurado, pois altos níveis de cobre podem ser tóxicos para as células. O cobre pode formar radicais OH^* altamente reativos através de reações redox, podendo participar de reações deletérias como oxidação de proteínas, rompimento de membranas, peroxidação de lipídios e alterações na estrutura e/ou função de macromoléculas (Brown et al., 1992).

Tanto no Estado de São Paulo como na Flórida, as duas maiores regiões produtoras de citrus do mundo, o controle do cancro cítrico baseia-se principalmente em medidas de exclusão e erradicação (Barbosa et al., 2001; Gottwald et al., 2001). A erradicação é uma prática de controle adotada depois do patógeno ser introduzido em uma nova área, mas que não tenha ainda se estabelecido permanentemente, eliminando-se o hospedeiro doente ou que tenha sido exposto ao patógeno (Kimati e Bergamin Filho; 1995). A erradicação só é tecnicamente recomendável quando o patógeno tem poucos hospedeiros e baixa capacidade de disseminação, sendo economicamente viável quando a presença do patógeno ainda se restringe a uma área geográfica relativamente reduzida (Kimati e Bergamin Filho; 1995). De maneira particular, algumas características epidemiológicas do cancro cítrico possibilitam seu controle pela erradicação de plantas infectadas e circunvizinhas. Trata-se de uma doença de fácil reconhecimento dos sintomas em condições de campo, permitindo uma rápida diagnose; apresenta disseminação relativamente lenta; possui grupo restrito de hospedeiros cultivados. Além disso, seu agente causal apresenta baixa capacidade de sobrevivência fora do hospedeiro (Schubert et al., 2001). No entanto, a erradicação é uma medida drástica de controle que pode culminar com a eliminação de milhares de plantas em pomares e viveiros, com uma conseqüente elevação dos custos (Leite Junior, 1990).

No Estado de São Paulo onde a erradicação de plantas doentes é a principal forma de controle do cancro cítrico, a legislação determina a eliminação das plantas doentes e das demais suspeitas de infecção. Em talhões com incidência de até 0,5% as plantas doentes e aquelas dentro de um raio de 30 m a partir das plantas doentes são erradicadas. Incidências superiores a 0,5% implicam na eliminação total do talhão afetado. Neste caso, a área é mantida por no mínimo dois anos sem ser cultivada com plantas cítricas. Esse método passou a ser adotado em 1999 quando o padrão de progresso espacial do cancro cítrico foi alterado em função da larva minadora dos citros (Fundecitrus, 2007).

O manejo integrado de qualquer doença envolve a adoção de uma série de medidas que em conjunto visam eliminar ou reduzir os níveis de ocorrência do patógeno em determinada área ou região. Considerando que medidas isoladas não têm demonstrado eficiência para prevenir a introdução e o

estabelecimento da doença em novas áreas e nem a sua erradicação total em várias regiões, no Paraná o controle do cancro cítrico vem sendo realizado pela integração de medidas que envolvem principalmente, além de práticas de erradicação e quarentena, medidas regulatórias, uso de cultivares resistentes, desfolha química de plantas suspeitas, poda de órgãos de plantas sintomáticas, escolha de áreas adequadas para estabelecimento de novos pomares, produção e uso de material propagativo sadio, controle da larva minadora dos citros e controle químico e cultural da doença (Leite Junior e Mohan, 1990; Leite Junior et al., 1987).

O emprego de cultivares resistentes é fundamental no manejo integrado do cancro cítrico, pois é o meio mais econômico e eficiente no controle da doença. A identificação de cultivares apresentando características agrônômicas e comerciais desejáveis, com níveis adequados de resistência à doença, constitui um fator de grande importância para diminuir os riscos de contaminação nas áreas indenizadas, em novos plantios localizados em áreas livres desta doença ou em áreas onde ocorreu erradicação e liberação para replantio (Leite Junior; Santos, 1988; Leite Junior, 1990).

O controle da larva minadora dos citros é uma medida de prevenção importante. Normalmente recomenda-se a intervenção utilizando controle químico quando o talhão apresentar 50% de plantas com brotações novas, ou ainda quando a incidência de ramos com larva minadora dos citros vivos atingir de 10 a 30% em pomares jovens e adultos, respectivamente (Rossetti, 2001).

A utilização de quebra-ventos é uma das práticas eficientes para a prevenção e controle do cancro cítrico (Kuhara, 1978; Leite Junior e Mohan, 1990). Esta medida cultural de controle promove a redução da ação direta das correntes de ar sobre o pomar, proporcionando condições menos favoráveis para a disseminação e penetração da bactéria no tecido hospedeiro (Leite Junior, 1990). Por consequência, promove a redução de ferimentos nos tecidos da planta, causados pelo vento e abrasão de aerossóis, que servem de porta de entrada para a bactéria (Leite Junior, 1990). Além disso, áreas protegidas por quebra-ventos perdem menor quantidade de água, devido à redução da evapotranspiração e, conseqüentemente, favorecer ao aumento da produtividade dos pomares (Leal, 1986).

Os quebra-ventos arbóreos não devem constituir em uma barreira compacta. Devem ser implantados perpendicularmente à direção dos ventos dominantes (Rossetti, 2001) ou em sistemas de compartimentação, em áreas onde não ocorra direção predominante de incidência dos ventos (Leal, 1986). A distância entre as linhas de quebra-ventos depende da topografia do terreno e da espécie arbórea utilizada (Finch, 1988).

As espécies utilizadas como quebra-ventos devem apresentar menor competição com as plantas cítricas, crescimento rápido e uniforme, copa densa, resistência a pragas e doenças e não serem hospedeiras de patógenos que afetam a cultura. Entre as espécies recomendadas com quebra-ventos estão a casuarina (*Casuarina equisetifolia* e *C. cunninghamiana*), a grevilha (*Grevillea robusta*), a leucena (*Leucaena leucocephala*), o pinus (*Pinus* spp.), o sansão-do-campo (*Mimosa caesalpinifolia*), o jambolão (*Eugenia* spp.) e o eucalipto (*Eucalyptus* spp.) (Leite Junior, 1990; Rossetti, 2001).

1.7 Controle Biológico

O combate a doenças é altamente dependente de produtos químicos, que são de modo geral, eficazes para o controle dos agentes causais, mas apresentam, por sua vez, conseqüências indesejáveis. Essas substâncias, em alguns casos, são altamente venenosas, se acumulam no organismo e são capazes de causar câncer e mutações genéticas em descendentes (Lima et al. 2000).

O desafio dos produtores para controle de doenças tem aumentado cada vez mais com a demanda por produtos livres de resíduos químicos tóxicos e pela percepção do público em geral sobre o impacto potencial das práticas utilizadas no controle de doenças, como o uso de agrotóxicos, sobre a saúde dos seres humanos e o ambiente. Tais pressões exercidas pela sociedade promovem estabelecimento de políticas governamentais que restringem a utilização de agrotóxicos (Gullino e Kujipers, 1994; Ragsdale e Sisler, 1994). Desta forma, agricultores, bem como os pesquisadores começaram a considerar o uso de métodos alternativos no combate às doenças (Punja e Utkhede, 2003).

O controle alternativo no contexto da proteção de plantas contra fitopatógenos engloba o controle biológico e indução de resistência. Alguns

autores, no entanto, classificam a indução de resistência como um tipo de controle biológico (Pascholati, 1998). O controle biológico tem com premissa básica, manter a densidade populacional das espécies de pragas associadas à agricultura, em níveis economicamente e ecologicamente aceitáveis (Lima et al., 2000). Cook e Baker (1983) redefiniram o controle biológico como sendo a “redução da soma do inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismo que não o homem”.

Dentre os 200 produtos biológicos disponíveis no mercado, os biopesticidas, que possuem microrganismos como ingrediente ativo, representaram em 1995, apenas 0,7% do mercado mundial de pesticidas, mas com crescimento entre 10 a 25% ao ano, enquanto que os pesticidas químicos tem crescido em percentuais entre 1 a 2%. A maior parte do mercado de biopesticidas (cerca de 80%) é representada por produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos. Outros exemplos de microrganismos comercializados são a *Agrobacterium radiobacter* no controle da galha da coroa causada por *A. tumefaciens*, vírus *Baculovirus anticarsia* contra a lagarta desfolhadora (*Anticarsia gemmatalis*) em soja, *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* utilizado com bioherbicida em culturas de arroz e soja, *Trichoderma harzianum* no controle de *Sclerotium rolfsii* e a levedura *Candida oleophila* no controle de fitopatógenos em pós-colheita (Nardo e Capalbo, 2000).

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

No Brasil, centros de pesquisas, universidades e indústrias vêm realizando estudos para desenvolver novos produtos biológicos que poderiam ser utilizados no controle de doenças e pragas. Nos programas de controle biológico de fitopatógenos, está incluída a prática de manejo favorecendo

antagonistas nativos e adição de microrganismo previamente estudados (Melo, 1998).

Os produtos utilizados no controle biológico, quando comparados aos defensivos agrícolas, apresentam baixo custo e toxicidade e são menos agressivos ao meio ambiente, devido à redução de aplicação de produtos químicos utilizados no controle de doenças, como os antibióticos e fungicidas.

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

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

No contexto de controle biológico, Baker (1985), Bettiol e Ghini (1995) definem que os mecanismos das interações entre os microrganismos patogênicos e antagônicos podem ser divididos em: (i) antibiose: interação onde um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem ação danosa sobre outro; (ii) competição: ocorre quando dois ou mais organismos concorrem entre si, principalmente por nutrientes, oxigênio e espaço; (iii) parasitismo: quando um microorganismo vive sobre e/ou alimenta-se de outro (ex: parasitas que atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência de patógeno, reduzindo seu inóculo); (iv) predação situação onde um microrganismo obtém seus nutrientes a partir do patógeno (ex: predação por amebas e *Bdellovibrio bacteriovorum*); (v) hipovirulência: diz respeito à introdução de uma linhagem menos agressiva ou não patogênica comparada ao patógeno, a qual pode, ainda que raramente, transmitir esta característica

às linhagens patogênicas; (vi) indução de defesa do hospedeiro: ação direcionada ao hospedeiro por meio dos próprios organismos ou seus metabólitos.

1.8 Metabólitos bacterianos com atividade antimicrobiana

Os antibióticos são metabólitos secundários que se acumulam no meio de cultura no fim da fase de crescimento exponencial. Esses produtos não são essenciais para o crescimento e reprodução dos microrganismos que os produzem. No entanto, em termos competitivos, os microrganismos produtores de antibióticos são favorecidos em relação aos não produtores. Esses tipos de substâncias químicas matam ou inibem o crescimento de outras espécies microbianas, mesmo em pequenas quantidades.

Algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* são produtoras de compostos antifúngicos, tais como, antibióticos e enzimas líticas. Enzimas líticas (quitinase, β -1,3-glucanase, protease) são responsáveis pela lise e hiperparasitismo dos antagonistas contra fungos patogênicos (Gupta et al., 2006). Neste mesmo contexto, pode-se destacar espécies do gênero *Bacillus* com produção de metabólitos secundários com atividade antagonista contra fungos e algumas bactérias antagonistas (Krebs et al., 1998). Muitos desses antibióticos produzidos por *Bacillus* têm sido caracterizados como dipeptídeos ou peptídeos cíclicos com baixo peso molecular (Nakano e Zuber, 1990). Estes ajudam no crescimento e resistência da planta hospedeira, e possuem atividade antagonista direta contra o patógeno (Dolej e Bochow, 1996).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Obtenção de substâncias com propriedades antagonistas para o controle de Xac a partir da bactéria LN.

2.2 Específicos:

a) Obter os metabólitos secundários produzidos durante o crescimento da bactéria antagonista LN;

b) Avaliar na condição de *in vitro* e *in vivo* em (*Citrus sinensis* cv. Valência) a ação dos metabólitos secundários;

c) Realizar teste de citotoxicidade com metabólitos secundários

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFANO J. R., COLLMER, A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell*, 8, p. 1683-1698, 1996.
- ALVA, A. K., GRAHAM, J. H., ANDERSON, C. A. Soil pH and copper effects on young 'Hamlin' orange trees. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 59, p. 481-487, 1995.
- BAKER, C. J., STAVELY, J. R., MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. *Plant Disease*, 69, p. 770-772, 1985.
- BARBOSA, J. C., GIMENEZ-FERNANDES, N. MASSARI, C. A., AYRES, A. J. Incidência e distribuição do cancro cítrico em pomares comerciais de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. *Summa Phytopathologica*, 27, p. 30-35, 2001.
- BERGAMIN FILHO, A., GOTTWALD, T. R., LARANJEIRA, F. F. Spatial distribution of citrus canker in São Paulo – Brazil. In: *International Workshop on Plant Disease Epidemiology*, 8, 2001, Ouro Preto. Ouro Preto: International Society of Plant Pathology, p. 28-29, 2001.
- BETTIOL, W., GHINI, R. Controle Biológico. In: Bergamin Filho, A., Kimati H. e Amorin, L. eds. *Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos*. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 717-728, 1995.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. *O Biológico* 23, p. 101-111, 1957.
- BOWLES, D. Signals in the wounded plant. *Nature* 243, p. 314-315, 1990.
- BROWN, N. L., ROUCH, D. A., LEE, B.T.O. Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid*, 27, p. 41-51, 1992

- BRAITHWAIT, M., LEITE Jr, R. P. SMITH, J. J., BOA, E., SADDLER, G. S. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolívia. *Plant Pathology*, 51, p. 383, 2002.
- CANTEROS, B. I. Citrus canker in Argentina – control, eradication and current management. In: International citrus canker research workshop, Fort Pierce, 2000. <<http://www.docs.state.fl.us/canker>>
- CHAGAS, M. C. M., PARRA, J. R. P. Exigências térmicas para o desenvolvimento de *Phyllocnistis citrella* (Lepdoptera: Gracillariidae). In: Congresso Brasileiro de Entomologia; Encontro Nacional de Fitossanitaristas, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro SEB, p.335, 1998.
- CHAGAS, M. C. M., NAMEKATA, T., ROSSI, J. C., CERÁVOLO, S. M. M., PARRA, J. R. P., LOPES, J. R. S. Papel da larva dos citros *Phyllocnistis citrella* (Lepdoptera: Gracillariidae) na infecção pelo cancro citrico. In: Congresso Brasileiro de Entomologia; Encontro Nacional de Fitossanitaristas, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro SEB, p.336, 1998.
- CIVEROLO, E. L. Bacterial canker disease of citrus. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultrual Society*, 37, p. 127-146, 1984.
- COOK, R. J., BAKER, K. F. *The Nature and Practice of Biological Control of plant pathogens*. St Paul: The Amercian Phytopathological Society, p. 615, 1983.
- COOK, A. A. Association of citrus canker pustules with leaf miner tunnels in North Yemen. *Plant Disease*, 72, p. 546, 1988.
- DIXON, R., LAMB, C.J. Molecular communications in interactions between plants and microbe pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 41,p. 339-367, 1990
- DOLEJ, S.; BOCHOW, H. Studies of the mode of action of *Bacillus subtilis* culture filtrates in the model pahtosystem tomato seedling – *Fusarium*

oxyporum f.sp. radicylicopersici. Mededelingen Faculteit. Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit (Gent), v. 61. p. 483-489, 1996.

FAWCET, H. S., JENKINS, A. E. Records from citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and United States. *Phytopathology*, 23, p. 820-824, 1993.

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

FEICHTENBERGER, E. Manejo integrado das principais doenças dos citros no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 33, 2000, Belém. Brasília: SBF, p. 288-295, 2000.

FINCH, S. J. Field windbreaks: design criteria. *Agricultural Ecosystems & Environment*, 23, p. 215-228, 1988.

FUNDECITRUS. Cancro cítrico. <<http://www.fundecitrus.com.br/cancro.html>>, 2007.

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. Purification of the most stable endochitinase from *Streptomyces* RC 1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 90, p. 653-661, 2000.

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

- GOTO, M., HYODO, H. Role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 51, p. 22-31, 1985.
- GOTO, M. *Fundamentals of Plant Bacterial Pathology*. San Diego: Academic Press, p. 342, 1990.
- GOTO, M. Citrus canker. In: Kumar, J. ed. *Plant diseases of international importance: Diseases of fruit crops*. Vol III. Englewood Cliffs: Prentice Hall, p. 170-208, 1992.
- GOTTWALD, T. R. e GRAHAM, J. H. A device for precise and non-disruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. *Phytopathology*, 82, p. 930-935, 1992.
- GOTTWALD, T. R., TIMMER, L. W. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Trop. Agric.*, 72, p. 194-201, 1995.
- GOTTWALD, T. R. GRAHAM, J. H., SCHUBERT, T. S. An epidemiological analysis of the spread of citrus canker in urban Miami, Florida, and synergistic interaction with the Asian leaf miner. *Fruits*, 52, p. 383-390, 1997.
- GOTTWALD, T. R., MCGUIRE, R.C, GRAHAM, S. Asiatic citrus canker: spatial and temporal spread in simulated new planting situation in Argentina. *Phytopathology*, 78, p. 739-745, 1998
- GOTTWALD, T. R., HUGHES, G., GRAHAM, J. H., SUN, X., RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basics of regulatory policy for an invasive species. *Phytopathology*, 91, p. 30-34, 2001.

- GOTTWALD, T. R., SUN, X., RILEY, T., GRAHAM, J. H., FERRANDINO, F., TAYLOR, E.L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*, 92, p. 361-377, 2002.
- GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., CIVEROLO, E. L., McGUIRE, R. G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. *Plant Disease*, 73, p. 423-427, 1989.
- GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R. Research perspectives on eradication of citrus bacterial diseases in Florida. *Plant Disease*, 75, p. 1193-1200, 1991.
- GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., RILEY, T. D e ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology*, 82, p. 1319-1325, 1992a.
- GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., RILEY, T. D e BRUCE, M. A. Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. *Phytopathology*, 82, p. 452-457, 1992b.
- GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., BROWNING, H. S. ACHOR, D. S. Citrus leafminer exacerbated the outbreak of Asiatic citrus canker in South Florida. In: *Proceedings of the International Conference on Citrus Leafminer*, Orlando, Florida, p. 83. Gainesville, FL: University of Florida, 1996.
- GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., RILEY, T. D., CUBERO, J., DROUILLARD, D. L. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker. *Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop*, Ft. Pierce, Florida. <http://doacs.state.fl.us/canker>, 2000.
- GRAVENA, S. A mais nova ameaça da citricultura brasileira. *Laranja*, 15, p. 397-404, 1994.

- GULLINO, M. L., KUIJPERS, L. A. M. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides Europe. *Annual Review of Phytopathology*, 32, p. 559-579, 1994.
- GUPTA, C.P.; KUMAR B.; DUBEY R.C.; MAHESHWARI D. K. Chitinase-mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC₁ against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. *BioControl*, n. 51, p. 821-835, 2006.
- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84, p. 377-393, 2000.
- HATSCHBACH, L. C. Legislação da Campanha de Erradicação do Cancro Cítrico. In: I Encontro Paranaense de Citricultura, Londrina, p. 111-129, 1986.
- JONES, D. R, MOFFETT, M. L., NAVARATNAM, S. J. Citrus Canker on Thursday Island. *Australian Plant Pathology*, 13, p. 64-65, 1984.
- KIMATI, H., BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H., Amorim, L. (Ed). *Manual de fitopatologia*, São Paulo: Ceres, 1, p. 692-709, 1995.
- KOIZUMI, M. Relation of temperature to the development of citrus canker lesions in the spring. *Proceedings of International Society of Citriculture*, 3, p. 924-928, 1977.
- KOIZUMI, M. Citrus canker: The World Situation. In: *Citrus Canker: an International Perspective*, p. 2-7. Lake Alfred, FL: Citrus Research & Education Center, University of Florida, 1985.

- KOIZUMI, M. E KUHARA, S. Evaluation of citrus plants for resistance to bacterial canker disease in relation to lesion extension. Bull. Tree Fruit Resistance, 4, p. 73-92, 1982.
- KOIZUMI, S., KIJIMA, E., TSUKAMOTO, T., TOGAWA, M., MASUI, S. Dispersal of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. In: International Citrus Congress, 1996, Sun City. Riverside: International Society of Citriculture, 1, p. 340-344, 1996.
- KREBS, B.; HÖDING, B.; KÜBART, S.; ALEMAYEHU, W., M.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; GROSCH, R.; BOCHOW, H.; HEVESI, M. Use of *Bacillus subtilis* as a biological control agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. Journal of Plant Disease and Plant Protection, v. 105, p. 181-197, 1998.
- KUHARA, S. Present epidemic status and control of the citrus canker disease (*Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson) in Japan. Rev. Plant. Prot. Res., 11, p. 132-142, 1978.
- LEAL, A. C. Quebra ventos arbóreos: aspectos fundamentais de uma técnica altamente promissora. Londrina: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, p. 28, 1986.
- LEITE Jr., R. P., MOHAM, S. K., PEREIRA, A. L. G., CAMPACCI, C. A. Controle integrado do cancro cítrico: efeito da resistência genética e da aplicação de bactericidas. Fitopatologia Brasileira, 12, p. 257-263, 1987.
- LEITE Jr., R. P., MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. Crop Protection, 9, p. 3-7, 1990.
- LIMA, L. H. C., MARCO, J. L., FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: Melo I. S., Azevedo, J. L (Ed.).

- Controle Biológico. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2, p. 263-304, 2000.
- LUMSDEM, R. D. Development of *Gliocladium virens* for damping-off disease control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18, p. 463-468, 1996.
- MATHRE, D. E., COOK, R. J., CALLAN, N. W. From discovery to use – traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Disease*, 83, p. 972-983, 1999.
- MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO I. S., AZEVEDO, J. L. *Controle Biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 17-67, 1998.
- MOHAMMADI, M., MIRZAEI, M. R., RAHIMI, H. Physiological and biological characteristics of Iranian strains of *Xanthomonas axanopodis* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *J. Phytopathol.*, 149, p. 65-75, 2001.
- NAKANO, M.M.; ZUBER, P. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Critical Review in Biotechnology*, v. 10, p. 223-240, 1990.
- NARDO, E. A . B., CAPALBO, D. M. F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. In: Melo I. S., Azevedo, J. L. (Ed.). *Controle Biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1, p. 231-262, 1998.
- NASCIMENTO, J. F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J. M. A.; REGO, M. M.; ARAUJO, A. E. S. Ocorrência de Cancro Cítrico no Estado de Roraima. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, Araras, 2003.
- NIES, D.H. Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid*, 27, p.17-28, 1992.

- PASCHOLATI, S. F. Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- PENTEADO DIAS, A. M., GRAVENA, S. PAIVA, P. E. B., PINTO, R. A. Parasitóides de *Phyllocnistis citrella* (Lepdoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae) no Estado de São Paulo. *Laranja*, 18, p. 79-84, 1997.
- PEREIRA, A. L., WATANABE, K., ZAGATTO, A. G., CIANCIULLI, P. L. Survival of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson, the causal agent of citrus canker in the rhizosphere of guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) *Biologico*, 44, p. 135-138, 1978.
- PRUVOST, O., BOHER, C., BROCHERIEUX, C., NICOLE, M., CHIRROLEU, F. Survival of *Xanthomonas axanopodis* pv. *citri* in leaf lesions under subtropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. *Phytopathology*, 92, p. 336-346, 2002.
- PUNJA, Z. K., UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, 21, p. 400-407, 2003.
- RAGSDALE, N. N., SISLER, H. D. Social and political implications of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Annual Review of Plant Pathology*, 32, p. 545-557, 1994.
- RINALDI, D. A. M. F., LEITE Jr., R. P. *Xanthomonas axanopodis* pv. *citri* population to the presence of copper compounds in nature. *Proc. Int. Soc. Citric.*, 2, p. 1064, 2000.
- RITCHIE, D. F., DITTSPONGPITCH, V. Copper and streptomycin resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease*, 75, p. 733-736, 1991.

- ROGRIGUES, J. C. V., ROSSETTI, V., MACHADO, M. A., TEÓFILO SOBRINHO, M., NOGUEIRA, N.L. Larva dos citros: um fator de aumento de pragas e cancro cítrico. *Laranja*, 19, p. 49-60, 1998.
- ROSSETTI, V. *Manual Ilustrado de Doenças dos Citros*. Piracicaba: Fealq/FUNDECITRUS, p. 207, 2001.
- RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: Swings JG, Civerolo EL, editors. *Xanthomonas*. London: Chapman and Hall, p. 193-264, 1993.
- SCHUBERT, T. S., RIZVI, S. A., SUN, X., GOTTWALD, T. R., GRAHAM, J. H., DIXON, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – again. *Plant Disease*, 85, p. 340-356, 2001.
- STALL, R. E, SEYMOUR, C. P. Canker, a threat to citrus in the gulf-cost states. *Plant Disease*, 67, p. 5881-585, 1983.
- STALL, R. E., MILLER, J. W., MARCO, G. M., CANTEROS de ECHENIQUE, B. I. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. *Proc. Fl. State Hort. Soc.*, 93, p. 10-14, 1980
- STALL, R. E., MILLER, J. W., MARCO, G. M. e CANTEROS de ECHENIQUE, B. I.. Timing of sprays to control canker of grapefruit in Argentina. *Proceedings of International Society of Citriculture*, 1, p. 414-417, 1982b.
- STALL, R. E., SEYMOUR, C. P. Canker, a threat to citrus in the gulf- cost states. *Plant Disease*, 67, p. 581-585, 1983.
- TIMMER, L. W. Evaluation of bactericides for control of citrus canker in Argentina. *Proc. Fl. State Hort. Soc.*, 101, p. 6-9, 1988.
- TIMMER, L. W., GOTTWALD, T. R., ZITKO, S. E. Bacterial exudation from lesions of Asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. *Plant Disease*, 75, p. 192-195, 1991.

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

VERNIÈRE, C., J., GOTTWALD, T. R., PRUVOST, O. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axanopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. *Phytopathology*, 93, p. 832-843, 2003.

ZUBRZYCK, H.M. Produção de frutas cítricas no Nordeste argentino na presença do cancro cítrico (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*). In: *Seminário Internacional de Citrus – Tratos Culturais*, 5, p. 251-272, 1998.

1 **Activity of bacterial secondary metabolites in the control of citrus canker**

2

3 Letícia Sayuri Murate^a, Admilton Gonçalves de Oliveira Junior^a, Marco Antonio Nogueira^a,
4 Marcio Ferreira Cruz^a, Dafila Santos Lima^a, João Carlos Palazzo de Mello^b, Carlos Mitihiko
5 Nozawa^c, Martin Homechin^d, and Galdino Andrade^{a*}

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

8 ^bLaboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade
9 Estadual de Maringá, PR. Brazil

10 ^cLaboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de
11 Londrina, PR. Brazil

12 ^dLaboratório de Fitopatologia, Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de
13 Londrina, PR, Brazil

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

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

1 **Abstract**

2

3 The challenge is finding new methods to control citrus canker disease. Today the control
4 is making to cut plants or use heavy metal (copper) as bactericide. The LN bacteria strain
5 was cultured in liquid medium and the supernatant free-cells was treated with methanol
6 (AMF) and ethyl acetate (AEF), respectively, and than the extract was concentrated, filtrated,
7 lyophilized; and fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC). After VLC, eight
8 fractions were obtained: AMF, EAF, VLC1, VLC2, VLC3, VLC4, VLC5 and VLC6. All
9 fractions were tested its activity against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac 306) by
10 antimicrobial activity assay, in Petri dishes and *in 24-well tissue culture plate* method showed
11 inhibitory effect but in different concentrations. Citotoxicity effects were observed in all
12 fractions in 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration. In plants only VLC3 showed significant results
13 ($p < 0.05$), reducing the incidence of canker lesions.

14

15 **Key words:** *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, antibiosis, biological control, citotoxicity.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 1. Introduction

2

3 Citrus canker (CC), caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) is a
4 serious disease for worldwide in citrus production (Gottwald et al., 2002). The pathogen
5 causes necrotic lesions on leaves, stems and fruits. Severe infections can cause defoliation,
6 blemished fruits, premature fruit drop, twig dieback, general tree decline (Schubert and Sun,
7 2003), and consequent yield decrease. The losses can reach hundreds of million of dollars
8 per year. Only in Florida, US\$ 200 millions had been spent until 2001, not including the
9 losses with the elimination of contaminated trees and plantlets (Schubert et al., 2001).

10 The infective process begins with the entrance of *Xac* through natural openings (stomata)
11 or wounds. Inside the plant, cells of *Xac* multiply in intracellular space until the spaces
12 become filled with bacteria or exopolysaccharide (Rudolph, 1993). The earliest symptoms on
13 leaves appear, under optimum conditions, as slightly raised tiny blister-like lesions about 4-7
14 days after inoculation (Koizumi, 1985). As the lesion ages, they turn brown, and a water-
15 soaked margin appears surrounded by a chlorotic halo.

16 The methods used to control CC in areas of the world where it is endemic, involves use of
17 resistant varieties of citrus, windbreaks to hinder inoculum dispersal and timely applications
18 of copper-containing bactericides (Schubert and Sun, 2003). However, the bacterium can
19 develop resistance to the products, thus demanding an increase of copper application
20 frequency. In addition, there is an increasing concern about the accumulation of such
21 substances in food and in environment (Quimby et al., 2002). For these reasons, the use of
22 antagonist bacteria or their metabolites has been proposed as a promising strategy for plant
23 protection (Földes et al., 2000).

24 The purpose of the present study was to evaluate antibacterial secondary metabolites
25 produced by bacteria strain LN on the severity of citrus canker lesion caused in *Citrus*
26 *sinensis* cv. Valencia, by isolate 306 of *Xac* (*Xac* 306); whose genome had been sequenced
27 (Da Silva et al., 2002) and their citotoxicity in vitro.

28

1 **2. Material and methods**

2

3 *2.1. Bacterial Strains and Growth Conditions*

4 The pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* strain 306 (*Xac 306*) was used in all
5 experiments. These bacteria was stored in 40% (v/v) glycerol at – 20 °C. The renovation of
6 the cells was made each 6 months on nutrient agar, at 28 °C during 48 h; to maintenance of
7 biological viability.

8 The non-pathogenic antagonist bacteria strain LN (patent pandeing) was isolated from
9 leaves with citrus canker lesions collected in Astorga, PR, Brazil (Rampazo, 2004). The
10 procedure of storing and cell maintenance was the same as for *Xac 306*, except the culture
11 medium that was tryptic soil agar (TSA) plus copper chloride (0.1 g.L⁻¹). Cain et al. (2000)
12 suggests that some bacteria isolated from culture media added copper might produce
13 antagonistic substances.

14

15 *2.2. Xac 306 inoculum*

16 The antagonist bacterium inoculum was prepared from cultures grown for 48 h at 28 °C on
17 TSA plus copper chloride. Cells were removed from the surface of the growth medium with a
18 sterile loop and suspended in sterile phosphate buffer (KH₂PO₄ 1 g; K₂HPO₄ 1.5 g; distilled
19 water 1000 mL, pH 7.0). Inoculum concentration was determined spectrophotometrically
20 ($\lambda=590\text{nm}$) and adjusted to a final density of 10⁸ CFU mL⁻¹ using sterile phosphate buffer.

21 Pathogen inoculum was prepared from cultures of *Xac 306* grown on nutrient agar for 48
22 h at 28 °C. *Xac 306* was prepared as described above, and the pathogen final concentration
23 was adjusted to 10¹² CFU mL⁻¹.

24

25 *2.3. Antagonistic bacterial extract*

26 Bacteria strain LN (patent pandeing) was grown in TSB plus copper (Cain et al., 2000)
27 (1500 mL) and incubated in a shaker at 28 °C and 100 rpm, during 15 days. After bacterial

1 growth, the medium was centrifuged in a refrigerated centrifuge (9,000 g at 4 °C), to obtain
2 the secondary metabolites in the supernatant. The solid residue was discarded.

3 Aliquots of 500 mL were extracted with ethyl acetate (500 mL) in separation filler. This
4 process was repeated five times. The organic phase, called acetate fraction (AF 0.031g) was
5 concentrated in rotatory evaporator and lyophilized. The lyophilized was suspended in
6 methanol and filtrated; these filtrated was lyophilized originated the acetate methanol fraction
7 (AMF 0.022g). The AMF was suspended in ethyl acetate, filtrated and the filtrated was
8 lyophilized; originating the acetate- ethyl acetate fraction (AEF 0.020g).

10 2.4. Vacuum liquid chromatography (VLC)

11 VLC was performed using a glass column (20 mm ϕ x 140 mm height), silica gel 60 (0.063
12 – 0.200 mm, Merck), air compressor at 51 kPa (~380 mm Hg) and the organic solvents were
13 hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, methanol plus distilled water 1:1 (v/v),
14 and distilled water; in this order (Mello and Petrovick, 2000). Nine grams of silica gel were
15 packaged in the glass column; afterwards in the top of the column 1.55 g of AEF fraction was
16 added. Twenty milliliters of each solvent was added fours times. The respective organic
17 phases were collected and dried originating the fractions hexane (VLC1 0.0014g),
18 dichloromethane (VLC2 0.1541g), ethyl acetate (VLC3 0.5659g), methanol (VLC4 0.7217g)
19 water: methanol mix vol:vol (VLC5 0.0197g) and distilled water (VLC6 0.0022g). All organic
20 phases were concentrated in rotatory evaporator and lyophilized.

22 2.5. Antimicrobial activity assay in Petri dishes

23 The experiments were performed by four replication per treatment (fractions). Petri plates
24 containing nutrient agar were inoculated with a suspension of 10^{12} CFU of *Xac 306* in pour
25 plate. An 150 μ L aliquot of AMF, EAF and all fractions of VLC were tested in a concentration
26 of 0.01 at 0.0001 mg.mL⁻¹ in wells of 9 mm diameter. The plates were incubated at 28°C
27 during 48 h and control was used distilled water for each tested fraction.

2.6. Antimicrobial activity assay in 24-well tissue culture plate

In this step the experiments was performed in duplicate. The fractions which showed more antimicrobial activity against *Xac 306* (EAF, VLC2, VLC3 and VLC4) in the item 2.3 were selected to the next step. In this test a 24-well tissue culture plate containing 1.9 mL of nutrient broth was inoculated with of *Xac 306* (10^{12} CFU mL⁻¹) per well. Two-fold dilution of fractions concentration such as 5,000 ; 2,500 ; 1,250 ; 625 ; 312.5 ; 156.25 ; 78.12 ; 39.06 ; 19.53 ; and 9.76 µg mL⁻¹ were tested. Distilled water as used as control for each fraction tested. The minimal inhibitory concentration was defined as the lowest concentration of FAM, FAE and VLC fractions which had non-bacterial growth after incubation. To determine the minimal inhibitory concentration, 50 µL of each wells with no visible growth were picked up from each well, and inoculated on nutrient agar and incubated at 28 °C during 48 h to check viable cells of *Xac 306* cells observing the presence or absence of *Xac 306* colony in Petri dishes.

2.7. Citotoxicity assay

Epithelial cells of human larynx carcinoma ATCC CCL-23 (HEp-2) were grown in DMEN (GiBco™), supplemented with 10% fetal bovine serum and treated with 100 µg/mL of streptomycin, 100 units mL⁻¹ of penicillin and 2.5 µg mL⁻¹ of fungizone. Cells were kept at -80 °C.

The fractions effects on cell viability were analyzed using the colorimetric MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenil tetrazolium bromide) method (MTT-based assay kit, Sigma Chem. Co.) according to the manufacturer's instructions. Cells were grown in microplates with 96-wells for 48 h. After attachment to plates, the supernatant of each well was removed carefully and replace with 100 µL of fresh DMEN containing different concentrations of EAF, VLC2, and VLC3. All the fractions were tested in the same concentration (50; 10; 5; 1; 0.5 and 0.05 µg.mL⁻¹). The plates were incubated for 72 h at 37 °C in a 5% CO₂ chamber with humidified atmosphere. The absorbance of each well was measured in a microplate reader at 490 nm and 630 nm. The experiment was performed in four replicate per fraction.

1 2.8. Antimicrobial activity test in orange leaves

2 Plants of *Citrus sinensis* cv. Valencia were used in the greenhouse experiments under the
3 following conditions: 28 °C/22 °C and 10 h/14 h day/night respectively and 80% relative
4 humidity. Plants were watered three times at each seven days and fertilized twice a month
5 with Hewitt solution for non-legume (Hewitt, 1966).

6 Orange leaves with 15 days-old were treated with EAF, VLC2, and VLC3 fractions which
7 showed high antimicrobial activity against *Xac 306* in a microdilution experiment. All the
8 fractions were applied at the concentration 0.01 g.mL⁻¹ diluted in distilled water and applied
9 with a hand-sprayer in the abaxial and adaxial leaf surface. The application was realized
10 before or after leaves inoculation with *Xac 306*.

11 Plants were covered with black plastic bags for 24 h before and after each application, to
12 form wet and dark chambers in order to stimulate the stomata opening and improve the
13 efficiency of bacterial infection and the action of the treatments. Control plants were sprayed
14 with distilled water. The plants were watered three times a week. The number of citrus canker
15 lesions per leaf was determined 21 days after inoculation to harvest 18 leaves per plant. The
16 average number of lesions was calculated by the equation: $\sum n^{\circ} \text{ lesions in 18 leaves} / \sum \text{area of}$
17 18 leaves. The treatments with the fractions were done before (pre-treatment) and after
18 (post-treatment) the pathogen spraying, in five replications. Analysis of variance was
19 performed on root square-transformed data and means were compared by Tukey multiple
20 range test at $p < 0.05$. Data were transformed by $\sqrt{y+0,5} - \text{SQRT}(y+0,5)$.

21

22

23 3. Results

24

25 3.1. Antimicrobial activity assay in Petri dishes

26 In this experiment antimicrobial activity was tested in all fraction obtained from supernatant
27 of LN culture extracted by ethyl acetate (EAF and AMF) and obtained from EAF fractionation
28 in vacuum liquid chromatography extracted with n-hexane (VLC1), dichloromethane (VLC2),

1 ethyl acetate (VLC3), methanol (VLC4), water: methanol mix vol:vol (VLC5), and distilled
2 water (VLC6). In this experiment only EAF, VLC2, VLC3, and VLC4 showed antimicrobial
3 activity against *Xac* 306 (Table 1). However different effects were observed. EAF and VLC2
4 fractions had the highest antimicrobial effect were found halo with 30 mm of diameter on 0.01
5 mg mL⁻¹, in the same concentration VLC3 presented halo with 20 mm, and VLC4 10 mm.
6 The 0.001 mg mL⁻¹ the EAF, VLC2 and VLC3 showed the same antimicrobial effect, and
7 VLC4 did not have any effect (Table 1).

8

9 *3.2. Antimicrobial activity assay in 24-well tissue culture plate*

10 In this experiment was tested the bactericidal effect only a fractions which showed
11 antimicrobial effect against *Xac* 306. EAF fraction showed bactericidal effect in concentration
12 of 5000 until 312.5 µg mL⁻¹. On the other hand in VLC2 and VLC3 the bactericidal effect was
13 observed also in 156.25 µg mL⁻¹. However VLC4 showed bactericidal effect only in 5000 and
14 2500 µg mL⁻¹ (Table 2)

15

16 *3.3. Citotoxicity assay*

17 In this assay the citotoxicity capacity of EAF, VLC2 and VLC3 fractions were tested. In the
18 ten-fold dilutions curves the three fractions showed similar citotoxicity effects on the different
19 concentrations evaluated (Figure 1). Similar results were obtained for CC₅₀ which was
20 calculated using the regression equation from each one, and the three fractions EAF, VLC2
21 and VLC3 showed CC₅₀ values approximated 36.98; 30.09 and 32.22 µg.mL⁻¹, respectively.

22

23 *3.4. Antimicrobial activity test in orange leaves*

24 The fractions EAF, VLC2, and VLC3 were tested in the greenhouse experiments to check
25 its capacity to reduce the area of citrus canker lesions formed on leaves. The strategies used
26 to treat the leaves with fractions before or after infestation with *Xac* 306 did not show any
27 inhibitory effect (data not show). However, the leaves treated with CLV3 fraction had 40%

1 less lesions area when compared with control. The fractions EAF and VLC2 did not differed
2 significantly to the control (Figure 2).

3

4

5 **4. Discussion**

6

7 The results shows that antibiosis of fractions from secondary metabolites extracted with
8 different organic solvents against *Xac 306* population *in vitro*, really exist as well as its ability
9 to control the severity of citrus canker *in planta*. EAF, VLC2 and VLC3 had highest
10 antimicrobial efficiency to the control of *Xac 306 in vitro*, when compared with the others
11 fractions tested (AMF, EAF, VLC1, VLC4, VLC5 and VLC6). The highest effect observed was
12 obtained from compounds soluble first at all in ethyl acetate (EAF). After that when the EAF
13 fraction was fractionated by vacuum liquid chromatography the bactericidal effect also was
14 observed in another fraction obtained from dichloromethane (VLC2). However the highest
15 bactericidal effect against *Xac 306* after chromatography assay still was found in ethyl-
16 acetate fraction.

17 The concentrations of EAF, VLC2, and VLC3 fractions considered non-citotoxic were far
18 below the concentrations was found bactericidal effects in the three assays carried out in the
19 paper. The maximum non-citotoxic concentrations observed for mammals cell was $10 \mu\text{g mL}^{-1}$
20 ¹ and to *Xac 306* was $156.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ *in vitro*, and *in planta* the amount which was observed
21 antimicrobial effect was $10,000 \mu\text{g mL}^{-1}$. However the leaves treated did not have any
22 aspects of toxicity; like color changes or morphological aspects.

23 The application (before or after sprayed *Xac 306*) of the fractions did not affect the
24 occurrence of citrus canker lesions. After one day on the leaf *Xac 306* is not fully established
25 (Koizumi, 1988). Despite the fact that the fraction VLC3 decreased significantly the citrus
26 canker lesions when compared with control, and showing a possibility to control the severity
27 of citrus canker. However, the level of this control is not enough to justify the solution of citrus
28 canker disease, before a field experiment will not carried out to verify that in this

1 experimental conditions we can observed the same effects that was observed in a
2 greenhouse experiment, that is the challenge for the future.

3 In conclusion, AEF, VLC2, VLC3 and VLC4 fractions had antagonistic effect against *Xac*
4 *306 in vitro*. AEF, VLC2 and VLC3 demonstrated non-citotoxic effect in concentration of 10
5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ on HEp-2 cells. VLC3 had significant results in the control of foliar citrus canker
6 lesions caused in *Citrus sinensis* cv. *Valencia* in greenhouse conditions.

7 On the other hand, others studies need to carry to determine the best conditions for
8 application to get the high efficiency of the bactericidal effect of the VLC3 fraction also
9 including EAF and VLC3 as well as the identification and purification secondaries metabolites
10 extracted from the LN supernatant. These determinations are very important to evaluate the
11 possible impact of these metabolites on the environment, given that the biological nature of
12 the secondary metabolites not necessarily assures that they are not hazardous to the
13 environment (Cook et al., 1996).

14

15

16 **5. References**

17

18 Cain, C. C., Henry, A. T., Waldo III, R. H., Casida Jr, L. J., Falkinham III, J.O., 2000.

19 Identification and characteristics as a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum
20 antimicrobial activity. Appl. Environm. Microbiol. 68, 1257-1264.

21 Cook, R.J., Bruckart, W.L., Coulson, J. R., Goettel, M.S., Humber, R. A.; Lumsdem, R.D.,

22 Maddox, J.V., McManus, M.L., Moore, L., Meyer, S. F., Quimby, P.C., Stack, J.P. Jr.,

23 Vaughn, J.L., 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease

24 control: A framework for scientific evaluation. Biol. Control 28, 201-219.

25 Da Silva, A.C.R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B.,

26 Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida, N. F., Alves, L. M. C., Amaral, A. M.,

27 Bertolini, M. C., Camargo, L. E. A., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J.,

28 Chambergo, F., Clapina, L.P., Cicarelli, R. M. B., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J. R.,

- 1 El-Dorry, H., Faria, J. B., Ferreira, A. J. S., Ferreria, R. C. C., Ferro, M. I. T., Formighieri,
2 E. F., Franco, M. C., Greggio, C. C., Gruber, A., Katsuyama, A. M., Kishi, L.T., Leite R.
3 P. Jr., Lemos, E. G. M., Lemos, M.V. F., Locali, E. C., Machado, M.A., Madeira, A. M. B.
4 N., Martinez-Rossi, N. M., Martins, E. C., Meidanis, J., Menck, C. F. M., Miyaki, C. Y.,
5 Moon, D. H., Moreira, L. M., Novo, M. T. M., Okura, V. K., Oliveira, M. C., Oliveira, V. R.,
6 Pereira, H. A., Rossi, A., Sena, J. A. D., Silva, C., Souza, R. F., Spinola, L. A. F., Takita,
7 M. A., Tamura, R. E., Teixeira, E. C., Tezza, R. I. D., Santos, M. T., Truffi, D., Tsai, S.
8 M., White, F. F., Setúbal, J. C., Kitajima, J. P. 2002. Comparison of the genomes of two
9 *Xanthomonas* pathogens with different host specifics. *Nature* 417, 459-463.
- 10 Földes, T., Bánhegyi, I., Herpai, Z., Varga, L., Szigeti, J., 2000. Isolation of *Bacillus* strains
11 from rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against
12 phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. *J. Appl. Microbiol.*
13 89, 840-846.
- 14 Gottwald, T.R., Graham, J.H., Sun, X., Riley, T., Ferrandino, F., Taylor, E. L., 2002. Geo-
15 referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida.
16 *Phytopathol.* 92, 361-377.
- 17 Hewitt, E.J., 1966. Sand and water culture methods used in study of plant nutrition, 2nd ed:
18 Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham
- 19 Koizumi, M., 1985. Citrus canker: The World Situation. In: Citrus Canker: an International
20 Perspective, Citrus Research & Education Center, University of Florida, Lake Alfred, FL,
21 pp. 2-7.
- 22 Koizumi, M., 1988. Mechanisms of disease development and host resistance of citrus
23 canker. In: V. Rossetti (Coord.). Processing of International Symposium of Citrus Canker,
24 Blight and Similar Diseases. Fundação Cargil, Campinas, pp. 138-145.
- 25 Mello, J.C.P.; Petrovick, P.R., 2000. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC.
26 (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. *Acta Farm. Bonaer.* 19, 211-215.
- 27 Quimby, P.C., King, L.R., Grey, W.E., 2002. Biological control as means of enhancing the
28 sustainability of crop/land management systems. *Agric. Ecosys. Environ.* 88, 147-152.

- 1 Rampazo, L.G.L., 2004. Evaluation of the effect of biological agents and their products into
2 the incidence of citrus canker lesions. State University of Londrina, Master thesis,
3 Londrina, Brazil, p. 59.
- 4 Rudolph, K., 1993. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: Swings, J.G., Civerolo, E.L.
5 (Eds.). *Xanthomonas*. Chapman and Hall, London, pp. 193-264.
- 6 Schubert, T.S., Rizbi, S.A., Gottwald, T. R.,Graham, J.H.,Dixon, W. N., 2001. Meeting the
7 challenge of eradicating citrus canker in Florida – Again. *Plant Dis.* 5, 340-356.
- 8 Schubert, T. S., Sun, X., 2003. Bacterial Citrus Canker. *Plant Pathol. Circ.* 377, 1-6.
- 9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

1 Table 1. Effects of fraction derived from the supernatant of LN culture extracted with
 2 methanol (AMF) and ethyl acetate (EAF), and fractions obtained from vacuum liquid
 3 chromatography extracted with n-hexane (VLC1), dichloromethane (VLC2), ethyl acetate
 4 (VLC3), methanol (VLC4), water: methanol mix vol:vol (VLC5) and distilled water (VLC6) in
 5 ten-fold dilution on the growth of *Xac 306* in nutrient agar in Petri dishes.

6

Fraction	Concentration (mg mL ⁻¹)	Halo diameter (mm)
AMF	0.01	no effect
	0.001	
	0.0001	
AEF	0.01	30
	0.001	12
	0.0001	---
VLC1	0.01	no effect
	0.001	
	0.0001	
VLC2	0.01	30
	0.001	12
	0.0001	---
VLC3	0.01	20
	0.001	10
	0.0001	---
VLC4	0.01	10
	0.001	---
	0.0001	---
VLC5	0.01	no effect
	0.001	
	0.0001	
VLC6	0.01	no effect
	0.001	
	0.0001	

1 **Figures legend**

2

3

4 Figure 1. Correlation between rate of cell mortality and fractions concentrations. (A)
5 [EAF] Fraction from the second extraction with ethyl acetate of supernatant of bacterial
6 culture. (B) [VLC2] Fraction derived from de vacuum liquid chromatography extracted
7 with dichloromethane. (C) [VLC3] Fraction derived from de vacuum liquid
8 chromatography extracted with ethyl acetate.

9

10 Figure 2. Control of citrus canker lesion formation by *Xac 306* on leaf of orange trees
11 (*C. sinensis* pv. Valencia) by fractions derived from the second extraction with ethyl
12 acetate (EAF) of supernatant of LN culture and fractions obtained from vacuum liquid
13 chromatography extracted with dichloromethane (VLC2), ethyl acetate (VLC3) in a
14 concentration of 10 mg mL⁻¹. Values are the means of 5 replicates. Means for each
15 treatment with the same letter are not significantly different of Tukey test ($p \leq 0.05$).

Figure 1

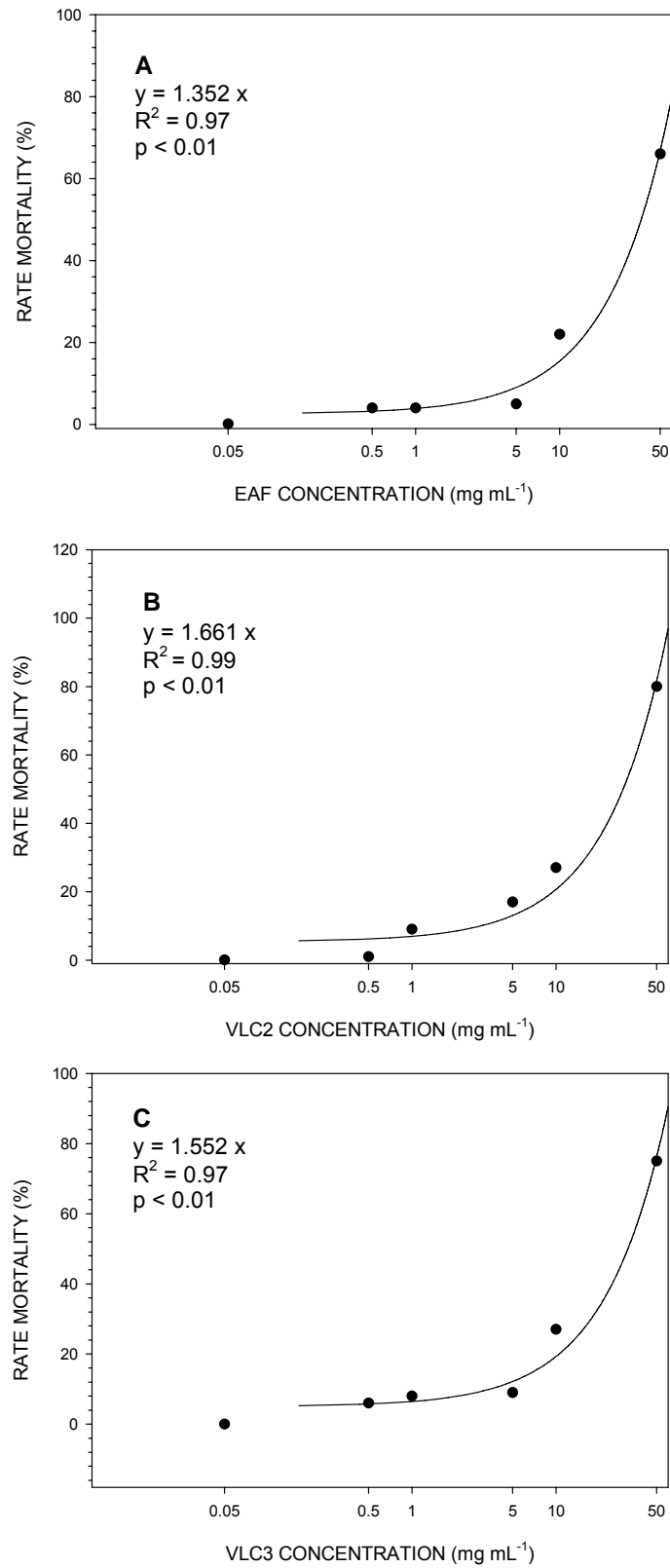


Figure 2

