



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA CORRÊA DA SILVA VASCONCELLOS

**AÇÃO ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO DE *Pseudomonas* sp.
NO CONTROLE DA *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.**

FERNANDA CORRÊA DA SILVA VASCONCELLOS

**AÇÃO ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO DE *Pseudomonas* sp.
NO CONTROLE DA *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Londrina
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V331a Vasconcellos, Fernanda Corrêa da Silva.

Ação antibiótica de metabólito de *Pseudomonas* sp. no controle da *Xanthomonas* arboricola pv. pruni / Fernanda Corrêa da Silva Vasconcellos. – Londrina, 2010.
34 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas – Teses. 2. *Xanthomonas* – Teses. 3. Pêssego - Doenças e pragas – Teses. 4. Pragas agrícolas - Controle biológico – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Universidade Estadual de Londrina. IV. Título.

CDU 632.3

FERNANDA CORRÊA DA SILVA VASCONCELLOS

**AÇÃO ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO DE *Pseudomonas* sp. NO
CONTROLE DA *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
UEM – Maringá - PR

Prof. Dr. Waldemar Zangaro
UEL – Londrina - PR

Londrina, 14 de janeiro de 2010.

À minha família, em especial, meus pais e meu irmão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, princípio e fim de todas as coisas, pelo dom da vida, pela força, pela coragem e pela oportunidade.

À toda minha família, em especial meus pais, Neister e Elizabeth e meu irmão Gabriel, pelo incentivo, carinho, dedicação, confiança e apoio em todos os momentos através de palavras, gestos e orações.

Ao prof. Dr. Galdino Andrade, pela orientação, me fornecendo toda infraestrutura adequada para realização desta dissertação.

Ao prof. Dr. Marco Antônio Nogueira, pelo apoio e incentivo ao longo deste trabalho.

Ao prof. Dr. João Carlos de Mello, por aceitar em participar de minha banca e pelo apoio dado para o aperfeiçoamento desta linha de pesquisa.

Ao prof. Waldemar Zangaro, por aceitar participar de minha banca e pelos conselhos dado ao longo do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pelo companheirismo durante a produção deste trabalho. Em especial ao meu colega Admilton que me ajudou em todos os momentos, estando sempre disposto a elucidar minhas dúvidas, pelas longas conversas, pelos conselhos dados durante a execução deste trabalho.

Às minhas amigas e colegas de laboratório Lucilene, Suzana, Jamile, Cíntia e Kellen por todos os ótimos momentos que tivemos nesse período de convívio, pelo companheirismo, pela paciência, pelo apoio, pelo carinho, pelas festas, pela ajuda profissional e principalmente por nossa grande e sincera amizade.

À Coordenação do curso de Mestrado, por oferecer condições para realização desta dissertação.

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

VASCONCELLOS, Fernanda Corrêa da Silva. **Ação antibiótica de metabólito de *Pseudomonas* sp. no controle da *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni***. Londrina, 2010. 34 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A bacteriose no pessegueiro é causada pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) que é considerada um dos maiores problemas da cultura. São utilizados para o controle desta doença produtos à base de cobre e antibióticos, que podem causar resistência bacteriana e contaminar o meio ambiente. Com isso, o controle biológico é uma alternativa para controlar os fitopatógenos. Portanto, avaliou-se o metabólito produzido pela bactéria *Pseudomonas* sp. no controle da *Xap*. A *Pseudomonas* sp. foi cultivada em caldo nutriente + CuCl₂ por 15 dias (28 °C, 100 rpm) e em seguida centrifugada (9.000 rpm, 20 min, 4 °C). O sobrenadante foi tratado com diclorometano, concentrado em rotavapor a 45 °C, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. A fase diclorometano (FD) obtida foi fracionada por cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando os solventes, Hexano (F1), Diclorometano (F2) e Acetato de Etila (F3). A fração F3 foi testada quanto à atividade antibiótica contra a *Xap* através da técnica de difusão em ágar, na concentração inibitória mínima, na avaliação ultra-estrutural utilizando a microscopia eletrônica de varredura e na avaliação sobre a ocorrência de lesões em folha. Nesta avaliação as plantas foram mantidas em casa de vegetação e foram tratadas com a fração F3 em dois tempos de aplicação (pré e pós tratamento) nas concentrações de 50, 150, 450 µg mL⁻¹. O número de lesões foi avaliado a partir da contagem nas folhas das plantas. No teste de difusão em ágar todas as concentrações inibiram a *Xap*, sendo a concentração inibitória mínima de 50 µg mL⁻¹. Na avaliação ultra-estrutural pode-se observar alterações no exopolissacarídeo e na morfologia bacteriana. Na última avaliação os dois tratamentos foram significativos no controle da *Xap* sendo a concentração 450 µg mL⁻¹ mais efetiva contra a bacteriose. Com isso, pode-se concluir que a fração F3 pode ser uma boa alternativa de controle para a bacteriose, diminuindo assim o uso de agrotóxicos, sendo necessário mais estudos desta fração para ser utilizada no campo.

Palavras-chave: Bacteriose. Controle biológico. Lesão foliar. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	9
2.1	GERAL	9
2.2	ESPECÍFICOS	9
3	REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1	HISTÓRICO.....	10
3.1.1	Pêssego	10
3.1.2	<i>Xanthomonas Arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	11
3.1.3	<i>Pseudomonas</i> sp.	12
3.2	CICLO DA DOENÇA	13
3.3	CONTROLE DA BACTERIOSE	13
3.3.1	Controle Químico	13
3.3.2	Controle Biológico	14
	REFERÊNCIAS	16
	ARTIGO – ANTIBIOTIC ACTIVITY OF EXTRACELLULAR COMPOUND PRODUCED BY <i>PSEUDOMONAS</i> SP. AGAINST <i>XANTHOMONAS ARBORICOLA</i> PV. <i>PRUNI</i>	19
	Abstract	20
1	INTRODUCTION	20
2	MATERIAL AND METHODS	22
2.1	BACTERIAL STRAINS	22
2.2	PRODUCTION AND PURIFICATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCES	22
2.3	VACUUM LIQUID CHROMATOGRAPHY (VLC) OF DICHLOROMETHANE PHASE (DP).....	22
2.4	EVALUATION OF ANTIBIOSIS ACTIVITY IN VITRO TESTS	23
2.4.1	Evaluation of Antibiosis Effect by Agar Diffusion Technique on <i>Xap</i>	23

2.4.2	Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	23
2.4.3	Electron Microscope Study	23
2.5	EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY OF F3 FRACTION ON LESION FORMATION ON LEAF	24
3	RESULTS	25
3.1	EVALUATION OF ANTIBIOSIS ACTIVITY IN VITRO TESTS.....	25
3.1.1	Evaluation of Antibiosis Effect by Agar Diffusion Technique on <i>Xap</i> and Minimum Inhibitory Concentration (MIC).....	25
3.1.2	Electron Microscopy Study.....	25
3.2	EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY OF FRACTION F3 ON LESION FORMATION ON LEAF	25
4	DISCUSSION	26
	REFERENCES	27
	ANEXOS	30

1 INTRODUÇÃO

A Mancha Bacteriana ou Bacteriose do pêsego é causada pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), sendo uma das principais enfermidades no pessegueiro, na qual o controle químico tem sido pouco eficiente. A enfermidade quando se instala no pomar é de difícil controle, representando um custo adicional pela necessidade do extenso uso de agrotóxicos.

A poluição e a aplicação de agrotóxicos e fertilizantes podem ocasionar o desequilíbrio da população microbiana residente no filoplano, ou seja, na parte aérea da planta. A bacteriose é considerada uma doença importante, principalmente quando as condições ambientais são favoráveis para sua ocorrência, como, temperaturas altas e precipitações pluviométricas freqüentes. O principal dano dessa doença é a desfolha precoce que resulta em enfraquecimento da planta, redução de produção na safra seguinte e mancha nos frutos ocasionando perdas econômicas.

Nos países que fazem parte da EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) a *Xap* é considerada uma praga quarentenária A2, que apresenta distribuição restrita e está sob controle oficial (EPPO 2007). No Brasil, a distribuição da bacteriose é ampla, devido à disseminação através de mudas e materiais de propagação contaminados. Para o controle dessa doença, novas alternativas são necessárias, como o controle biológico que deve ser bem mais estudado, uma vez que o controle químico não tem demonstrado eficiência contra *Xap*.

O controle biológico consiste em manter, um equilíbrio no agro ecossistema, de modo, que o hospedeiro na presença do fitopatógeno não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos organismos patogênicos. Seus princípios baseiam-se na relação antagônica de microrganismos que inibem fitopatógenos por competição por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos. Dentre as bactérias estudadas para a utilização no controle biológico esta a *Pseudomonas* sp. que produz metabólitos antibióticos que inibem o crescimento de fitopatógenos. Portanto, este trabalho visa estudar o metabólito produzido pela bactéria *Pseudomonas* sp. no controle da bactéria fitopatogênica *Xap*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Produção, purificação e obtenção de metabólito com propriedade antibiótica produzido pela *Pseudomonas* sp. para o controle da bacteriose causada pela *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Produção do metabólito bacteriano com atividade antibiótica durante o crescimento da *Pseudomonas* sp.
- b) Purificar e obter o metabólito com atividade antibiótica por meio da cromatografia líquida a vácuo.
- c) Avaliar a atividade antibiótica *in vitro* pela técnica de difusão em ágar e determinar a concentração inibitória mínima (CIM).
- d) Avaliar a ação antibiótica do metabólito na morfologia celular da *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* pela técnica de microscopia eletrônica de varredura.
- e) Avaliar a atividade antibiótica *in vivo* do metabólito na incidência de lesões foliares, no pessegueiro cv. Maciel, causadas pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* em condição de casa de vegetação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO

3.1.1 Pêssego

O pessegueiro é originário da China, e existem relatos do cultivo há mais de 20 séculos. Provavelmente foi levado à Pérsia por rotas comerciais, tornando-se como fruta persa e dando origem erroneamente ao seu nome *Prunus persica* (L.) Batsch. Há relatos de que chegou ao Brasil em 1532 com Martin Afonso de Souza (Osório e Fortes 2003).

O Rio Grande do Sul é o principal produtor de pêssego do Brasil, possuindo uma área superior a 10 mil hectares (Madail e Reichert 2003). No município de Pelotas localizam-se as maiores indústrias de conserva de pêssego, sendo industrializados mais de 90% da produção brasileira (Protas e Madail 2003).

Existem vários tipos de cultivares de pessegueiro como as produtoras de frutos de mesa, cultivares produtores de frutos para industrialização e de dupla finalidade, como é o caso da variedade Maciel, que é moderadamente suscetível à bacteriose (Medeiros e Raseira 1998). Os cultivares de pêssego de dupla finalidade, além de serem utilizados para processamento em conserva, estão em crescente aceitação pelos produtores e consumidores da fruta *in natura*, devido sua excelência em qualidade (Ceretta et al. 2000).

A produção de pêssegos no Brasil ainda é muito dependente de agrotóxicos para o controle de doenças e pragas. Segundo Osório e Fortes (2003) por muito tempo o cultivo do pessegueiro vai depender do uso de produtos químicos, por que não há uma alternativa viável para o controle da bacteriose.

Entretanto, para Mattos (2003) o sistema de produção adotado pelo produtor deve priorizar a utilização de métodos biológicos de controle de pragas e doenças, que minimizem o uso de produtos químicos.

O alto custo socioeconômico dos agrotóxicos vem impulsionando a busca de alternativas eficientes e ecologicamente compatíveis com a Produção Integrada do Pêssego (PIP), como por exemplo, a viabilização do controle biológico (Giolo et al. 2008). No ano de 1999 iniciou-se no Rio Grande do Sul a PIP, que tem como objetivos reduzir o uso de

agrotóxicos, minimizar as perdas pré e pós-colheita, utilizar práticas de manejo do solo que reduzam o impacto ambiental e o gasto de energia, oferecer à sociedade frutas de qualidade e manter a competitividade do produtor com a oferta de frutas certificadas. Neste sistema, são adotados, o cultivo mínimo do solo (roçadas na entrelinha e no máximo duas aplicações de herbicidas na linha) a poda verde, o monitoramento de pragas e doenças, a recomendação de adubação baseada na análise foliar e do solo, a cobertura verde na entrelinha, a minimização do uso de agrotóxicos, a atualização do produtor nas tecnologias da PIP e o registro de todas as atividades executadas no pomar, em caderneta de campo (Fachinello et al. 2003).

3.1.2 *Xanthomonas Arboricola* pv. *pruni*

O gênero *Xanthomonas* apresenta uma ampla diversidade de bactérias fitopatogênicas, que devido à sua grande importância econômica, tem sido alvo de vários estudos de reclassificação e nomenclatura. Antigamente a *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* era citada como *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*; essa mudança foi realizada para agrupar patovares semelhantes geneticamente, incluindo *X. arboricola* pv. *corylina*, *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. arboricola* pv. *populi* e *X. arboricola* pv. *poinsettiicola* (Vauterin et al. 1995).

De acordo com Vauterin et al. (1995), é uma bactéria gram negativa, bacilo, móvel com flagelo polar, colônias com pigmentação amarela e um aspecto viscoso devido à produção de exopolissacarídeos. As colônias em ágar nutriente são lisas, circulares, com crescimento mucoso (Silva 2003).

A *Xap* foi descrita inicialmente na América do Norte em 1903, sendo uma importante doença de pessegueiros, ameixeiras, damasqueiros e amendoeiras. Desde sua descrição inicial na América do Norte, já foi observada na Austrália, Nova Zelândia, África do Sul, Brasil e vários países europeus como, Itália, Romênia, França, (Boudon et al. 2005) Áustria, Holanda e Bulgária (Zacardelli et al. 1998).

3.1.3 *Pseudomonas* sp.

As bactérias têm atraído uma enorme atenção como agentes de controle biológico, uma vez que, são fáceis de manipular, possuem um tempo de geração rápido e também por produzirem metabólitos secundários e toxinas (Warrior et al. 2002). Dentre os gêneros mais estudados como agentes de controle biológico estão *Bacillus* e *Pseudomonas* (Melo 2005). *Pseudomonas* sp. é uma bactéria gram negativa, bacilo, aeróbia e móvel. Encontrada abundantemente na natureza e adaptada a diversos nichos ecológicos (Mercado-Blanco e Bakker 2007).

As bactérias endofíticas estão presentes em todas as espécies de vegetais, permanecendo em estado de latência ou colonizando ativamente os tecidos (Hallman et al. 1997). A estrita relação que estas bactérias tem com o hospedeiro faz com que sejam candidatas naturais a serem usadas no controle de doenças (Silva et al. 2006).

A propagação da doença pode ser restringida por microrganismos endofíticos, que são capazes de inibir o desenvolvimento do fitopatógeno (Volksch e May 2001). A redução do crescimento ocorre pela produção de metabólitos secundários, o que pode proporcionar resistência contra esses fitopatógenos, já que todas as plantas superiores são hospedeiras de um ou mais microrganismos endofíticos (Firácová et al. 2007). Esse é o caso de *Pseudomonas* sp., que é encontrada em diversas plantas como bactéria endofítica (Mercado-Blanco e Bakker 2007).

Por ocuparem um nicho ecológico semelhante aqueles ocupados por fitopatógenos, às bactérias endofíticas apresentam um grande potencial para o controle biológico (Hallman et al. 1997). Este controle pode ser resultado de alguns mecanismos, como, competição por espaço, competição por nutrientes na planta hospedeira e produção de compostos antimicrobianos (Pleban et al. 1997). É ideal que os microrganismos que produzem esses compostos antimicrobianos estejam no mesmo nicho que as bactérias fitopatogênicas para garantir a eficácia do produto (Shoda 2000).

3.2 CICLO DA DOENÇA

A *Xap* chega na superfície foliar através do ar, água ou outro tipo de vetor (Beattie e Lindow 1999). De acordo com Garrido e Sônego (2005), a infecção bacteriana no tecido da planta ocorre pela penetração da bactéria através de aberturas naturais, estômatos e hidatódios, de ferimentos causados na planta por diversos fatores e também pela zona de abscisão foliar. Após este contato inicial com o hospedeiro, há a multiplicação bacteriana formando micro-colônias nos espaços intercelulares da folha (Beattie e Lindow 1999) e a formação de exopolissacarídeos (EPS) (Leite et al. 2001). Os EPS protegem a bactéria da dessecação, diminuir o contato com componentes tóxicos de defesa da planta e aumentar a adesão da bactéria conferindo fator de virulência, o que promove a colonização nos tecidos da planta hospedeira (Medeiros et al. 2003). Como os EPS têm capacidade de reter água, os espaços intercelulares tornam-se congestionados, ocorrendo o *water soaking*, causando a degradação tecidual (Rudolph 1993; Rottava 2005). Esta degradação tecidual é caracterizada pelo aparecimento de lesões circulares nas folhas que começam amarelo-esverdeadas e com o passar do tempo tornam-se púrpuras até marrons, que é quando ocorre o desprendimento das lesões (Ritchie, 1995) e consequente desfolha prematura, causando o enfraquecimento da planta, podendo levar à morte (Medeiros e Raseira 1998).

3.3 CONTROLE DA BACTERIOSE

3.3.1 Controle Químico

Os microrganismos fitopatogênicos são uma ameaça à produção de alimentos e à estabilidade do agro-ecossistema. Como a produção agrícola intensificou-se nas últimas décadas, os produtores se tornaram mais dependentes de agrotóxicos, como um método relativamente viável para proteção das culturas, contribuindo com a estabilidade econômica (Compant et al. 2005).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa 2006), somente produtos à base de cobre, como, hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre, sulfato de

cobre, carbonato básico de cobre, oxina cobre, óxido cuproso estão autorizados para o uso agrícola na produção de pêssegos. Junto com o cobre podem ser utilizados antibióticos como a oxitetraciclina e estreptomicina para combater a bacteriose (Mcmanus et al. 2002).

A aplicação do cobre é uma medida profilática que é recomendada para minimizar o impacto da bacteriose em vários países (Aarrouf et al. 2008). Entretanto, na Nova Zelândia já foram encontradas bactérias fitopatogênicas resistentes ao cobre e à estreptomicina, de acordo com Vanneste e Voyle (2003). Para Stadnik e Talamini (2004), o uso de agrotóxicos para proteção de plantas contra fitopatógenos é uma alternativa atraente pela sua simplicidade, resultados satisfatórios em curto prazo e por não exigir conhecimentos com relação à dinâmica que cerca os processos ecológicos básicos do agro-ecossistema. Entretanto, os aspectos positivos desse sistema são suprimidos com o passar do tempo e uma sucessão de desvantagens tem início. Pode-se citar o acúmulo de substâncias nocivas no solo e na água, com conseqüente contaminação do ambiente e do homem, ocorrência de microrganismos resistentes e o desequilíbrio ambiental pela falta de seletividade dos produtos utilizados, já que boa parte dos agrotóxicos aplicados no campo são perdidos. Estima-se que cerca de 90% dos agrotóxicos utilizados não atingem o alvo, sendo dissipados para o meio ambiente e tendo como ponto final à água e, principalmente, o solo (Ghini e Bettiol 2000).

3.3.2 Controle Biológico

O conceito de controle de doenças mudou nas últimas décadas. Anteriormente, o objetivo era eliminar completamente os patógenos com o uso indiscriminado e contínuo de produtos químicos sem medir as conseqüências. Este procedimento provocou alterações no ambiente, como a seleção de patógenos resistentes, ocorrência de surtos de doença, diminuição de microrganismos benéficos, além de causar efeitos nocivos ao homem, aos animais e ao meio ambiente, pelo acúmulo de resíduos no solo, na água e nos alimentos. Com isso, o controle biológico visa contribuir para o ecossistema em equilíbrio, de modo que o hospedeiro não sofra danos significativos na presença do fitopatógeno (Grigoletti et al. 2000).

Na tentativa de minimizar os riscos ambientais e potencializar o controle de pragas e doenças, o manejo integrado, combinado com técnicas de controle biológico e

modificação de práticas culturais, tem recebido muita atenção nos últimos anos (Godoy 2008).

Como já dito, a Produção Integrada de Pêssego iniciou-se em 1999, com o objetivo de reduzir o uso de agrotóxicos, as perdas pré e pós-colheita, utilizar práticas de manejo que reduzam o impacto ambiental oferecendo a sociedade frutas de qualidade (Fachinello et al. 2003). A preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos vem exigindo produtos agrícolas diferenciados, levando ao desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e, portanto, menos dependentes do uso de agrotóxicos (Ghini e Bettioli 2000). Com isso é crescente a demanda por medidas de controle de doenças que minimizem a contaminação ambiental, visando aos sistemas agrícolas auto-sustentáveis. Essa mudança de visão tem por base o manejo adequado dos recursos naturais, no sentido de reduzir a utilização de produtos químicos e de estimular a utilização de substâncias naturais nos sistemas agrícolas (Benchimol et al. 2008).

No controle biológico de doenças, o objetivo é a redução da capacidade dos patógenos causarem perdas significativas de produção, evitando-se perturbar o equilíbrio ambiental (Stadnik e Talamini 2004), já que é difícil o controle de bactérias fitopatogênicas e ainda não há uma estratégia 100% eficaz (Bashan e de Bashan 2002).

Os microrganismos do filoplano, ou seja, que residem na parte aérea da planta, consistem basicamente de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. No filoplano são intensas as competições por nutrientes, antibiose e parasitismo resultando, em um controle biológico natural (Grigoletti et al. 2000).

Para Pagani et al. (1998), a aplicação de produtos adequados, assim como a determinação da suscetibilidade, permitirá desenvolver uma estratégia de controle efetivo que contribua para o manejo integrado da bacteriose. Para Gnanamanickam et al. (2002), há uma série de desafios e oportunidades, incluindo a descoberta e implementação de microrganismos no controle biológico.

O controle biológico deve ser considerado uma ferramenta essencial que otimize a atividade do produtor, maximizando seu retorno financeiro (Warrior et al. 2002). Uma estratégia promissora seria a utilização de moléculas com maior eficácia antimicrobiana e mínimo impacto ambiental. A busca por tais moléculas tem intensificado a procura por metabólitos secundários produzidos por bactérias e fungos (Godoy 2008).

REFERÊNCIAS

- Aarouf, J.; Garcin, A.; Lizzi, Y.; Maâtaoui El M. (2008). Immunolocalization and Histocytopathological Effects of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on Naturally Infected Leaf and Fruit Tissues of Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *J. Phytopathology*, 156: 338-45.
- Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2006). Disponível em: www.anvisa.gov.br.
- Bashan, Y.; de Bashan, L.E. (2002). Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, *Azospirillum brasilense*, streptomycin sulfate, and chemo-thermal seed treatment. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 821-29.
- Beattie, G.A.; Lindow, S.E. (1999). Bacterial Colonization of Leaves: A Spectrum of Strategies. *Phytopathology*. n. 5, 89: 353-59.
- Benchimol, R.L.; Silva, C.M.; Verzignassi, J.R. (2008). Utilização de Substâncias Naturais para o Controle de Doenças de Plantas na Região Amazônica. Documentos - EMBRAPA Amazônia Oriental, n. 346, 31p.
- Boudon, S.; Manceau, C.; Nottéghem, J.L. (2005). Structure and Origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* Populations Causing Bacterial Spot of Stone Fruit Trees in Western Europe. *Phytopathology*, n. 9, 95: 1081-88.
- Ceretta, M.; Antunes, P.L.; Brackmann, A.; Nakasu, B.H. (2000) Conservação em atmosfera controlada de pêssego cultivar eldorado. *Ciência Rural*, Santa Maria, n. 1, 30: 73-79.
- Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C.; Barka, E.A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and environmental microbiology*, n. 9, 71: 4951-59.
- EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization, (2007). Disponível em: www.eppo.org/QUARANTINE/quarantine.htm
- Fachinello, J. C.; Tibola, C. S.; Vicenzi M.; Parizotto, E.; Picolotto, L.; Mattos, M. L. T. (2003). Produção integrada de pêssegos: três anos de experiência na região de Pelotas – RS. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal*, n. 2, 25: 256-258.
- Firácová, S.; Sturdicová, M.; Múcková, M. (2007). Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia, Bratislava*, n. 3, 62: 251-57.
- Garrido, L.R.; Sônego, O.R. (2005). Doenças do Pessegueiro na Região da Serra Gaúcha. Circular Técnica - EMBRAPA Uva e Vinho, n. 61, Bento Gonçalves, RS.
- Ghini, R.; Bettiol, W. (2000). Proteção de plantas na agricultura sustentável. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, n.1, 17: 61-70.
- Giolo, F. P.; Grutmacher, A.D.; Manzoni, C.G.; Fachinello, J.C.; Grutmacher, D.D.; Nornberg, S.D. (2008). Persistência de agrotóxicos indicados na produção integrada de pêssego a *Trichogramma pretiosum* RILEY, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Rev. Bras. Frutic.* n. 1, 30: 122-26.

- Gnanamanickam, S.S.; Vasudevan, P.; Reddy, M.S.; Kloepper, J.W.; D efago, G. (2002). Principles of biological control. In: Biological Control of Crop Diseases. n. 1, p. 1-9.
- Godoy, M.F.P. (2008). Atividade antimicrobiana de extratos e fra es do cultivo *in vitro* de *Lentinula edodes* contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, *Guignardia citricarpa*, *Colletotrichum sublineolum* e *Tobacco mosaic virus*. In: Tese de Doutorado - Piracicaba/ESALQ: USP, 125p.
- Grigolleti, Jr A.; Santos, A. F.; Auer, C.G. (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. Floresta. n.1/2, 30: 155-165.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W. F.; Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology. 43: 895-914.
- Leite, B; Pascholati, S.F.; Kitagima, E.W.; Ishida, M.L. (2001). Mecanismos de adesão de bactérias e fungos as plantas hospedeiras. Rapp, v. 9, 41p.
- Macmanus, P.S.; Stockwell, V.O.; Sundin, G.W.; Jones, A.L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 443-65.
- Madail, J.C.M.; Reichert, L.J. (2003). Produ o Mundial e Nacional. In: Frutas do Brasil – Produ o. EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, p. 13.
- Mattos, M.L.T. Meio Ambiente e Segurança Alimentar. (2003) In: Frutas do Brasil – Fitossanidade. EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, p. 50.
- Medeiros, A.R.B.; Ferreira, M.A.S.V.; Dianese, J.C. (2003). Mecanismos de agressão e defesa nas intera es planta-patógeno, 289 p.
- Medeiros, C.A.B.; Raseira, M.C.B. (1998). A cultura do pessegueiro. EMBRAPA, Brasília, 350p.
- Melo, F.M.P. (2005). Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a. Disserta o de mestrado. USP. 102p.
- Mercado-Blanco, J.; Bakker, P.A.H.M. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. Antonie van Leeuwenhoek. 92: 367-89.
- Osório, V.A.; Fortes, J.F. (2003). Frutas do Brasil – Fitossanidade. EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, p.09.
- Pagani, C.; Silvera, E.; Wallasek, W.; Solares, E. (1998). Avances en la identificacion del momento de mayor susceptibilidad en la fruta a la infeccion de “mancha bacteriana” en duraznero. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Reunión Técnica sobre Protección Vegetal en Frutales. Serie Actividades de difusión, Uruguay, n. 178, 37p.
- Pleban, S. Chernin, L.; Chet, I. (1997). Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. Letters in Applied Microbiology. 25: 284–88.
- Protas, J.F. da S.; Madail, J.C.M. (2003). Características econ micas e sociais da produ o de p essego no Rio Grande do Sul. EMBRAPA, Clima Temperado, Pelotas, RS.

- Ritchie, D.F. (1995). Bacterial Spot. In: APS Press (ed.). Compendium of stone fruit diseases. The American Phytopathological Society, USA, p. 50-52.
- Rottava, I. (2005). Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp. para produção de goma xantana. Dissertação de mestrado - URI - Erechim/ RS. 95p.
- Shoda, M. (2000). Bacterial control of plant disease. J. Biosci. Bioeng, n. 6, 89: 515-21.
- Silva, H.S.; Bettiol, W.; Terrasan, C.R.F.; Tozzi, J.P.L.; Melo, I.S.; Nunes, F.V. (2006). Microrganismos Endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. n. 38.
- Silva, I.T. (2003). Imunogenicidade e especificidade sorológica do exopolissacarídeo capsular e lipopolissacarídeo da parede celular da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. UFV, tese de *Magister scientiae*, 38 p.
- Stadnik, M.J.; Talamini, V. (2004). Manejo Ecológico de Doenças de Plantas. 293 p.
- Vanneste, J.L.; Voyle, M.D. (2003). Genetic basis of copper resistance in New Zealand strains of *Pseudomonas Syringae*. Horticultural Pathology. 56: 109-12.
- Vauterin, L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. n. 3, 45: 472-89.
- Volksch, B.; May, R. (2001). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. Microb. Ecol. 41: 132-39.
- Warrior, P.; Konduru, K.; Vasudevan, P. (2002). Formulation of Biological Control Agents for Pest and Disease Management. In: Biological Control of Crop Diseases.
- Zacardelli, M.; Malaguti, S.; Bazzi, C. (1998). Biological and epidemiological aspects of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on peach in Italy. Journal of Plant Pathol. n. 2, 80: 125-32.

ARTIGO**ANTIBIOTIC ACTIVITY OF EXTRACELLULAR COMPOUND PRODUCED BY
*PSEUDOMONAS SP. AGAINST XANTHOMONAS ARBORICOLA PV. PRUNI***

**Fernanda Corrêa da Silva Vasconcellos; Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior;
Lucilene Lopes de Paula; Jamile Priscila de Oliveira Beranger; Flavia Regina Spago;
João Carlos Palazzo de Mello; Juca Abramo Barrera San Martin; Celia Guadalupe
Tardeli de Jesus Andrade; Marco Antonio Nogueira; Galdino Andrade.**

**ANTIBIOTIC ACTIVITY OF EXTRACELLULAR COMPOUND PRODUCED BY
PSEUDOMONAS SP. AGAINST *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *PRUNI***

**Fernanda Corrêa da Silva Vasconcellos¹; Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior¹;
Lucilene Lopes de Paula¹; Jamile Priscila de Oliveira Beranger¹; Flavia Regina Spago¹;
João Carlos Palazzo de Mello²; Juca Abramo Barrera San Martin³; Celia Guadalupe
Tardeli de Jesus Andrade³; Marco Antonio Nogueira¹; Galdino Andrade¹.**

Abstract

Bacterial spot is caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), which is considered a major problem in peach orchards. Products based on copper and antibiotics are used to control and the biocontrol is a new alternative. The objective was evaluate the antibiotic activity of the metabolite produced by *Pseudomonas* sp. cultivated, for 15 days (28 °C, 100 rpm⁻¹) against *Xap*. The free-cells supernatant was fractionated with dichloromethane, concentrated and lyophilized. The same solvent was fractionated in vacuum liquid chromatography (VLC). The antibiotic activity of F3 fraction was tested as well as the effect on cell ultra-structural. In a greenhouse experiment plants were sprayed with F3 before or after *Xap* infection. The results showed changes in exopolysaccharides and cell morphology. The antibiotic activity of F3 (450 µg mL⁻¹) was more effective against *Xap*. We conclude that the F3 showed antibiotic activity against *Xap*, *in vitro* and in plant experiments.

Keywords: Peach trees. bacterial spot. Biological control. Lesions in leaf. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

1 INTRODUCTION

Bacterial spot is a disease of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch), caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Vauterin et al. 1995) is considered an important disease, especially when environmental conditions are favorable, such as high humidity and temperature. The symptoms of bacterial spot is characterized by aqueous spots, brown or purple, which dry up and fall causing perforations in leaves, with consequent weakening and premature defoliation of the plant, causing its death (Fortes and Martins 1998).

¹ Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil. Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, Brasil. E-mail: andradeg@uel.br

² Departamento de Farmácia e Farmacologia, Laboratório de Produtos Fitoterápicos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil.

³ Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Brazil.

According to Mio et al. (2004), products based on copper are allowed to control bacterial spot, such as copper hydroxide, copper oxychloride and cuprous oxide. Sometimes copper compounds are mixed with antibiotics such as streptomycin or oxytetracycline to control bacterial spot (Mcmanus et al. 2002). However, the use of this method could select resistant pathogens causing, outbreaks of disease, reduction of beneficial microorganisms and is harmful to humans, animals and the environment, by the residue accumulation in soil, water and food.

Biological control is an alternative to increase the sustainability of agriculture, decreasing the impact in non-target organisms (Grigoletti et al. 2000). The most important bacteria genera used as biocontrol agent are *Bacillus* and *Pseudomonas* (Melo 2005), which produce many bactericidal or fungicide compounds (Shoda 2000). The disease could be suppressed by the presence of endophytic microorganisms (Volksch and May 2001) and the application antagonistic bacterial products will provide an effective control that contributes to the management of bacterial spot (Pagani et al. 1998).

The *Pseudomonas* sp. is used as a biopesticide in the U.S.A. since 1990, as biological control is an attractive strategy for plant diseases. Products used as agents that have several species of *Pseudomonas* sp. are currently registered in the Environmental Protection Agency of the U.S.A., and as biopesticides are commercially available to producers (Stockwell and Stack 2007). Therefore, the aim of biological control is to reduce the damage caused by the phytopathogen in the plant and the wide distribution of *Pseudomonas* sp. with antagonist activity, may be possible to develop specific strategies for biological control (Gardener 2007).

Thus, is important for the biological control is accepted by the producers, just to stimulate investigation and research these products to occur the reduction of pesticides can become reality (Battu and Reddy 2009). Since research on greenhouse offer success in the biological control the phytopathogens and knowledge obtained from this system can assist in the transition to the field (Paulitz and Belanger 2001).

The metabolite used in the biological control in this study is produced by *Pseudomonas* sp. strain LV. This bacteria was isolated the lesions of citrus canker where have many bacteria competing for nutrients, space and producing antibiotic compounds against *X. axonopodis* pv. *citri*, phytopathogen bacteria agent causal the citrus canker.

The Laboratory Microbial Ecology group, works with the *Pseudomonas* sp. at nine years, to isolate, purify, identify the metabolite molecule and test it against disease caused by different species the *Xanthomonas* sp. plants such as *Citrus sinensis* cv. Valencia,

Eucalyptus sp., *Phaseolus vulgaris* and *Prunus persica* cv. Maciel. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antibiotic activity of the metabolite produced by *Pseudomonas* sp. against *X. arboricola* pv. *pruni*.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 BACTERIAL STRAINS

The bacteria strain used in the experiments was *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) was kindly providing by Dr. Bernardo Ueno (EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, Brazil) and *Pseudomonas* sp. strain LV metabolite producer is from our own collection (Rampazo 2004). The strains were stored in a glycerol solution 30% and kept in liquid nitrogen and the *Pseudomonas* strain has been used in many experiments to test the disease control caused by others species of *Xanthomonas* genus in different plants. The F3 fraction was chosen because this fraction showed a high inhibition halo in antibiosis experiment against many *Xanthomonas* species.

2.2 PRODUCTION AND PURIFICATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCES

The method of production was patented (Patent #PI0803350-1; www.inpi.gov.br). The metabolite production was obtained from the culture of *Pseudomonas* sp. (10^8 CFU mL⁻¹) (O.D. = 0.09, λ = 590 nm) where 150 μ l of this suspension was inoculated in 1.5 L of nutrient broth plus copper chloride - CuCl₂.2H₂O (150 mg. L⁻¹) and incubated at 28 °C for 15 days at 100 rpm in horizontal shaker. After that, the culture was centrifuged (9.000 rpm, 20 min, 4 °C⁻¹) and the supernatant, free-cells, was treated with the dichloromethane 1:1 (v: v) in separation funnel, in aliquots of 500 mL of supernatant plus solvent. For each separation, this procedure was repeated 10 times, shaken once for 30 s and left resting for 15 min. The dichloromethane phase (DP), which was obtained in the partition was concentrated in a rotavapor under reduce pressure 10 L at 45 °C, frozen in liquid nitrogen and lyophilized (24 h). The amount obtained was around 0.5 g of DP per 15 L of supernatant.

2.3 VACUUM LIQUID CHROMATOGRAPHY (VLC) OF DICHLOROMETHANE PHASE (DP)

The DP was fractionated by VLC, with glass column (20 mm Φ x 350 mm high) attached to a vacuum pump 51 kPa. The column was filled with 30 g of silica gel 60 and

2 g of DP was mixed with 5 g of silica gel. For the passages in the organic solvents, hexane, dichloromethane, ethyl acetate at 1:1 (v: v), were used aliquots of 40 mL with 10 repetitions for each solvent, which were obtained in 3 fractions, hexane fraction (F1), dichloromethane fraction (F2) and ethyl acetate fraction (F3). The fractions were concentrated in a rotavapor under reduce pressure at 45 °C, frozen in liquid nitrogen, lyophilized.

2.4 EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY IN VITRO TESTS:

2.4.1 Evaluation of Antibiosis Effect by Agar Diffusion Technique on *Xap*

The evaluation of the antibiotic activity of F3 fraction was made by the diffusion method in agar (pour plate). Aliquots of 1000 μL of *Xap* in log phase (10^8 CFU mL^{-1}) (O.D. = 0.37, $\lambda = 590\text{nm}$) were placed in Petri dishes with nutrient agar. After, wells were made of 9 mm Φ on agar. Aliquots of 150 μL of F3 fraction were added in the wells at concentrations of 1.000; 100 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and sterile distilled water was used as negative control (solvent used in the suspension of F3 fraction). The experiment was conducted with 3 concentrations of F3, 3 replicates (3 x 3, n = 9). The plates were incubated at 28 °C 48 h⁻¹, and inhibition halos were evaluated (mm).

2.4.2 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC was carried out in plates of cells culture with 24 wells, 6 concentrations of F3 fraction (100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and was considered a negative control the nutrient broth and positive control cells suspension of *Xap*, in log phase. In each well, there was added 1.8 mL of nutrient broth plus 100 μL cells suspension of *Xap* and 100 μL of the respective concentration of F3 fraction. The plates were incubated at 28 °C 48h⁻¹, subsequently added 20 μL 2, 3, 5-trifenil tetrazolium chloride (TTC – 1%) and incubated at 28 °C 20 min⁻¹. The results were evaluated as following sensible (-) no colour change and resistant (+) colour change to pink.

2.4.3 Electron Microscopy Study

Evaluation of antibiotic action of F3 fraction in the cellular morphology of the *Xap* was carried out with a concentration of F3 fraction and three different times the

incubation (T1; T3 and T6 h), and control with sterile distilled water (solvent used in the suspension of F3 fraction). The inoculum of *Xap* was obtained from liquid culture in log phase. Aliquots of 100 μL of F3 fraction and distilled water control were added in tubes containing 10 μL of nutrient broth with *Xap* and concentration of ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) F3 fraction, incubated for 1; 3 and 6 h at 28 °C with horizontal shaker at 100 rpm.

Aliquots of 20 μL of the treatments 1; 3 and 6 h were transferred to glass slides previously coated with poly-L-lysine and placed at 28 °C for 1 h to dry, then slides were fixed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 12 h. After post-fixed in a solution in OsO_4 1% for 2 h. The samples were dehydrated in an ethanol gradient 70, 80, 90 and 100 °GL, and were completely dehydrated on critical point dried in CO_2 (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). After, the slides were coated with gold (SDC BALTEC 050 Sputter Coater). Finally, the samples were observed by scanning electron microscopy (FEI Quanta 200).

2.5 EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY OF F3 FRACTION ON LESION FORMATION ON LEAF

Plants of *Prunus persica* cv. Maciel were kept in a greenhouse (25 °C) and watered with tap water when needed.

The experiment had two application times of F3 fraction (pre and post-treatment), with three concentrations (50; 150; $450 \mu\text{g mL}^{-1}$), one positive control with *Xap* and one negative control with distilled water, 4 replications. The sprayed of F3 fraction was made in mature leaves selected by the same aspect, size and color. Before application, plants were covered for 24 h $30 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ with transparent plastic to form a moist chamber and facilitate to open the stomata. In the pre-treatment, the plants were sprayed with 10 mL of F3 fraction per plant at concentrations of 50; 150; $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ and closed. After 24 h, the plants were again sprayed with a suspension of 10 mL of *Xap* (O.D. = 0.37, $\lambda = 590 \text{ nm}$) per plant. After 24 h the moist chamber was removed from plants. In the post-treatment, was adopted the same procedure described above except the order of the spraying which was first inoculated to *Xap* and after sprayed the concentrations of F3 fraction. Were used 10 mL of distilled water in controls pre and post-treatment (solvent used to dilute the F3 fraction).

The number of lesions was evaluated by counting the lesions on each plant for treatment and the data submitted to regression ($P < 0.05$).

3 RESULTS

3.1 EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY IN VITRO TESTS

3.1.1 Evaluation of Antibiosis Effect by Agar Diffusion Technique on *Xap* and Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Two *in vitro* test were carried out, the first one was evaluated the antibiosis effect by agar diffusion technique and the three concentrations tested showed antibiosis effect, where the most effect was observed in $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Table 1). The second experiment was evaluated the minimum inhibitory concentration, where in $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ no cellular activity was observed after applied TTC 1% (Table 2).

3.1.2 Electron Microscopy Study

During the time the cell ultra structure is changing until the total collapse of bacteria cell. In the scanning electron microscopy, after six hour, no changes were observed in non-treated cells (Figure 1A). The cells treated after one hour the exopolisaccharide almost disappeared, but the cell morphology showed few changes (Figure 1B). After three hours, was observed completely absence of exopolysaccharide and the cell morphology was disarranged (Figure 1C). After six hours decrease cells morphology was completely disarranged, showing more length cells, and cell wall with things like a hollow (Figure 1D).

3.2 EVALUATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY OF F3 FRACTION ON LESION FORMATION ON LEAF

After the effect observed *in vitro* experiments and in cell morphology in the scanning electron microscope, the next step was study the influence of F3 fraction on lesions formation on peach leaves. Off course is a previous experiment, and was carried out in a greenhouse conditions with a no large plants number as will in a field conditions.

In plants experiments were used three concentrations 50 ; 150 ; $450 \mu\text{g mL}^{-1}$, in two different times, such as pre-treatment, before F3 fraction and after *Xap* suspension and post-treatment, before *Xap* and after F3 fraction. In the pre-treatment significant differences were observed among all treatments when compared with control. Among concentrations no differences were observed between 150 and $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ of F3 fraction (Figure 2A). The

same results were observed in the post-treatment, where all the concentrations showed significant differences with control plants and no difference was observed between number of lesions in plants treated with 150 and 450 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of F3 fraction (Figure 2B).

When compared the percentage of effect of F3 fraction on lesion formation between pre and post-treatment and among different concentrations applied, only dose showed significant difference, between pre and post-treatment no difference was observed (Figure 2). Some phytotoxicity effect was observed in the high concentration sprayed. When compared this effect among treatments we can observe that this effect decrease when decrease the concentration of F3 fraction. No difference was observed between pre and post-treatment (Figure 3).

4 DISCUSSION

There are few studies of biological control of *Xap* and there are several studies that used a *Pseudomonas* sp. as biological control agent producing different antibiotic compounds that can be used to plant pathogenic fungi and bacteria (Haas and Defago 2005). According to Xie et al. (2003) the gram-negative bacteria are natural sources of compounds for biological control. They isolated several gram-negative bacteria in rice seeds, with a predominance of *Pseudomonas* species such as *P. resinovonans*, *P. putida* B1, *P. fluorescens*, *P. fulva*, *P. viridilivida* that showed antagonism to fungi and bacteria. Volksch and May (2001) suggested that the success in controlling the phytopathogen are related with the occupation of the same ecological niche, utilization of similar nutritional resources, toleration of the adverse conditions in the same manner and multiplication under similar environmental conditions.

The *in vitro* experiments, F3 fraction showed antibiotic effect in all tests, indicating that this fraction may help in the control of bacterial spot associated with other products or forms of management to control this disease. The effect of F3 on cell viability was confirmed in the ultra-structural study indicating that is fast and effective against *Xap*, this results indicating that F3 showed a high potential to control *Xap*. Cells treated with F3 fraction decreased exopolysaccharide production, which is essential for bacteria survival, colony organization, because protect the bacteria against desiccation and increase adhesion in host plant during infection (Medeiros et al. 2003).

Moreover *in vivo* experiment, results showed that the highest concentration was the best to control bacterial spot both in the post-treatment and in the pre-treatment., This

means that the application time had not influence on lesions formation control. However the concentrations showed different effects. Oliveira (2008) found F3 fraction decreased lesions area of citrus canker leaves of *Citrus sinensis* cv. Valencia caused by *X. axonopodis* pv. *citri*. Different effect was also observed, small concentration was more effective in *X. axonopodis* pv. *citri* but in *Xap* we found effectiveness in concentrations of F3 four times higher. The same author showed that lesions formation control is influenced by pre and post-treatment, that is not finding in our study. However, these results suggest that there is a natural antagonism between the bacteria with a high degree of genetic similarity, as well as, the ecological niche, favoring the use of bacteria as a biological control agent against a phytopathogen (Mercado-Blanco and Bakker 2007).

In the field experiments need to determine how this compound behavior and preserve the antibiotic effect in this condition to control *Xap*. In the greenhouse all conditions help *Xap* infection, establishment and lesions formation on the leaves, because the temperature and humidity were controlled facilitating the opening of the stomata for bacteria infection.

When some effect on lesion formation by *Xap* is observed in this experimental condition we could suggest that F3 fraction should be a new challenge on *Xap* control in the field. The phytotoxicity effect is another problem that needs to solve. To find the optimal concentration does not cause phytotoxicity is essential for decrease injury on the peach trees, as occurred in this work, but for Menezes (2005), many products used in biological control may cause phytotoxicity at highest concentrations, although it depends on plant species in which the product is being used. Therefore, knowing the chemical properties and biological activity of the product, can be a good biological control agent (Rimando and Duke 2003).

The present paper showed that, the F3 fraction showed antibiosis effect against *Xap*, disarranged the bacteria cell and EPS formation, and suggest that may be effective in the control of lesion formation on leaves by *Xap* and further studies needs to carry out in a field conditions.

REFERENCES

Battu P.R., Reddy M.S. (2009). Isolation of secondary metabolites from *Pseudomonas fluorescens* and its characterization. Asian J. Research Chem. 2: 26-29.

- Fortes J.F., Martins O.M. (1998). In: A cultura do pessegueiro. EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS, 255-56.
- Gardener B.B.M. (2007). Diversity and Ecology of Biocontrol *Pseudomonas* spp. in Agricultural Systems In: The Nature and Application of Biocontrol Microbes III: *Pseudomonas* spp. Phytopathology. 97: 221-26.
- Grigolleti A Jr., Santos A. F., Auer C.G. (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. Floresta. 30: 155-165.
- Haas D., D'efago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology. doi: 10.1038/nrmicro 1129.
- Macmanus P.S., Stockwell V.O., Sundin G.W., Jones A.L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 443-65.
- Medeiros R.B., Ferreira M.A.S.V., Dianese J.C., (2003). Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno. 289 p.
- Melo F.M.P. (2005). Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelo endófito de mandioca *Bacillus pumilus* MAIIM4a. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 102 p.
- Menezes E.L.A. (2005). Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 205). 58 p.
- Mercado-Blanco, J.; Bakker, P.A.H.M. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. Antonie van Leeuwenhoek. 92:367-89.
- Mio, L. L. M.; Garrido, L.; Ueno, B. Doenças de Fruteiras de Carço. (2004). In: Monteiro, L. B.; Mio, Louise L. M.; Serrat, B. M.; Motta, A. C. V.; Cuquel, F. L. (Org.). Fruteiras de Carço - Uma Visão Ecológica. Curitiba, p. 169-222.
- Oliveira A.G. Jr. (2008). Avaliação da atividade antibiótica de compostos extracelulares bacteriano no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cepa 306. Universidade Estadual de Londrina. Dissertação de Mestrado, 64 p.
- Pagani C., Silvera E., Wallasek, W., Solares, E. (1998). Avances en la identificación del momento de mayor susceptibilidad en la fruta a la infección de "mancha bacteriana" en duraznero. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria-Reunión Técnica sobre Protección Vegetal en Frutales. Serie Actividades de difusión, Uruguay. 37 p.
- Paulitz, T.C., Bélanger, R.R, (2001). Biological control in greenhouse systems. Annu. Rev. Phytol. 39: 103-33.
- Rampazo L.G.L. (2004). Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na incidência de lesões foliares do cancro cítrico. Universidade Estadual de Londrina. Dissertação de mestrado, 67 p.

Rimando A.M., Duke S.O. (2003). Natural Products for Pest Management. In: Pest Management Science. 59: 708-717.

Shoda M., (2000). Bacterial Control of Plant Diseases. J. Biosci. Bioeng. 89: 515-521.

Stockwell V.O., Stack J.P. (2007). Using *Pseudomonas* spp. for Integrated Biological Control. In: The Nature and Application of Biocontrol Microbes III: *Pseudomonas* spp. Phytopathology. 97: 244-49.

Vauterin L., Hoste B., Kersters K., Swings J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 472-89.

Volksch B., May R. (2001). Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. Microb. Ecol. 41: 132-39.

Xie G., Soad A., Swings J., Mew T.W. (2003). Diversity of Gram negative bacteria antagonistic against major pathogens of rice from rice seed in the tropic environment. J. Zhejiang Univ. Sci. A. 4: 463-68.

ANEXOS

ANEXO A

Table 1 – Evaluation of antibiosis effect of F3 fraction by agar diffusion technique on *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Fraction	Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halo (mm)
F3	1000	31.0
		32.0
		34.0
F3	100	19.0
		20.0
		19.0
F3	50	15.0
		14.0
		16.0

Table 2 – Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of F3 fraction against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Concentrations ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	F3 fraction
100	-
50	-
25	+
12.5	+
6.25	+
3.12	+

(-) Inaltered/sensible pink colour/resistant(+)

ANEXO B

Figures keys

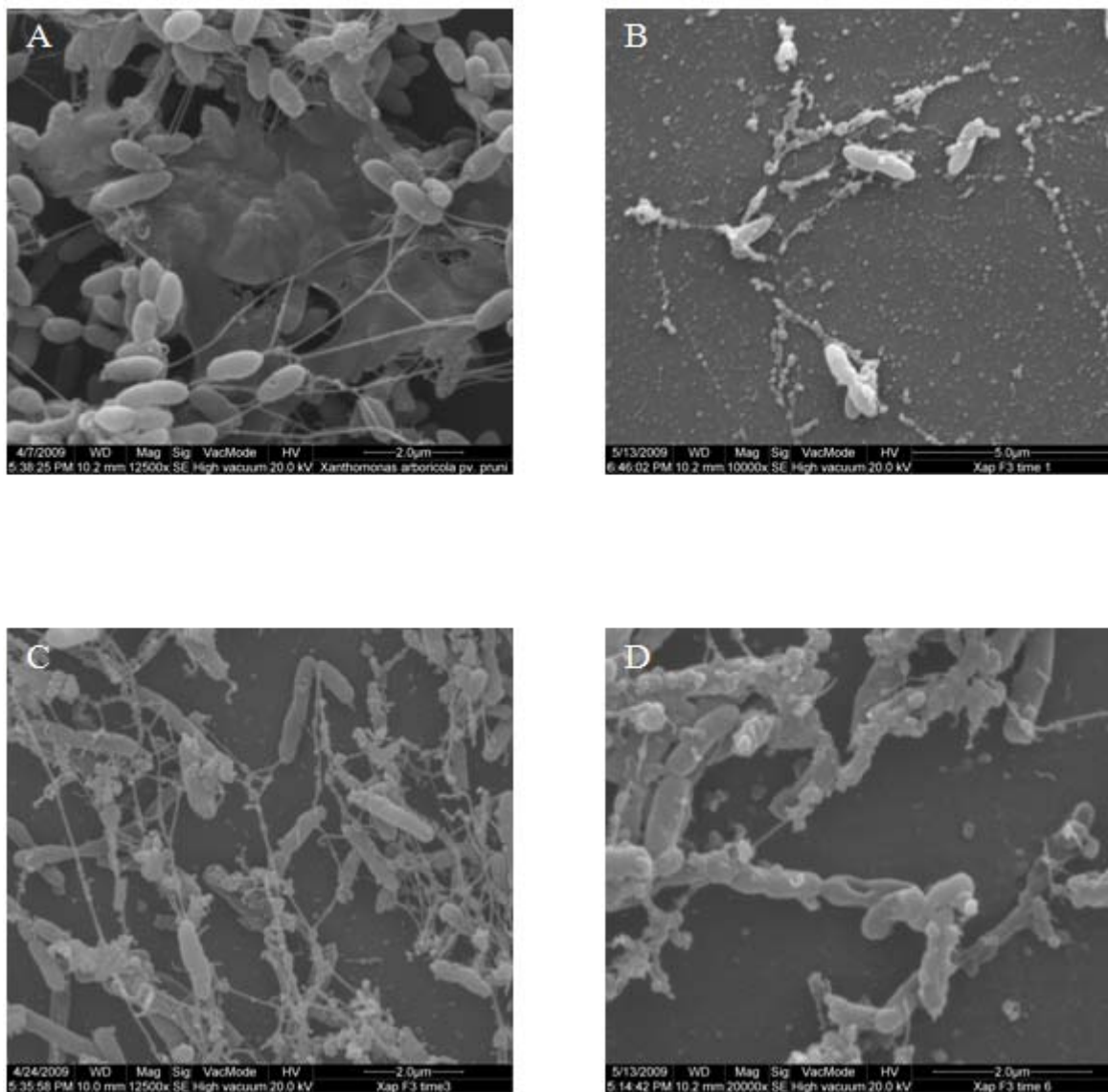


Figure 1 – Scanning Electron Microscope of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Antibiotic activity and morphological changes in the *Xap* treated with F3 fraction with concentration of $200\mu\text{g mL}^{-1}$. A) *Xap* culture non-treated with F3 fraction (T0 – 12, 500 X), B) *Xap* culture after 1 h treated with F3 fraction (T1 – 10, 000 X), C) *Xap* culture after 3 h treated with F3 fraction (T3 – 12, 500 X) , D) *Xap* culture after 6 h treated with F3 fraction (T6 – 20,000 X).

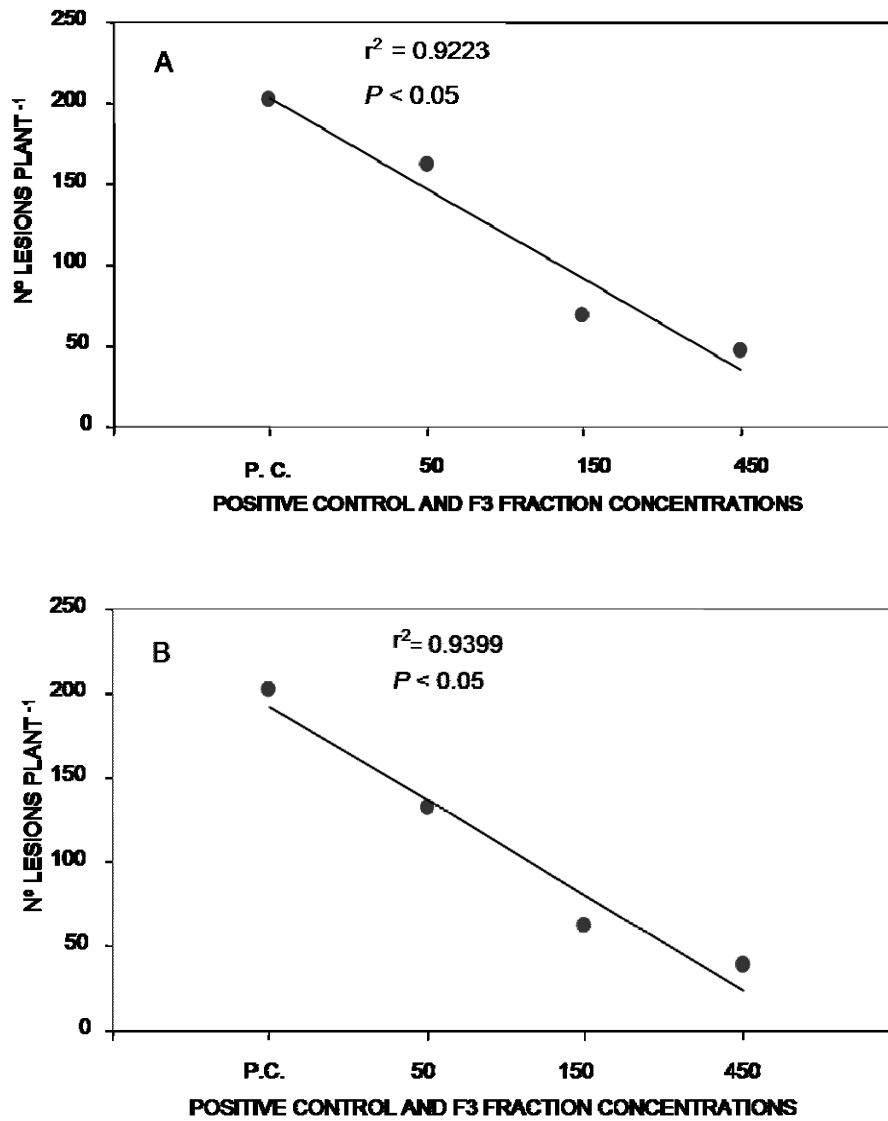


Figure 2 – Correlation between doses effect ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, $450 \mu\text{g mL}^{-1}$) and number of lesions formed by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on leaves of peach after 21 days of sprayed. A: Pre -treatment. B. Post -treatment.

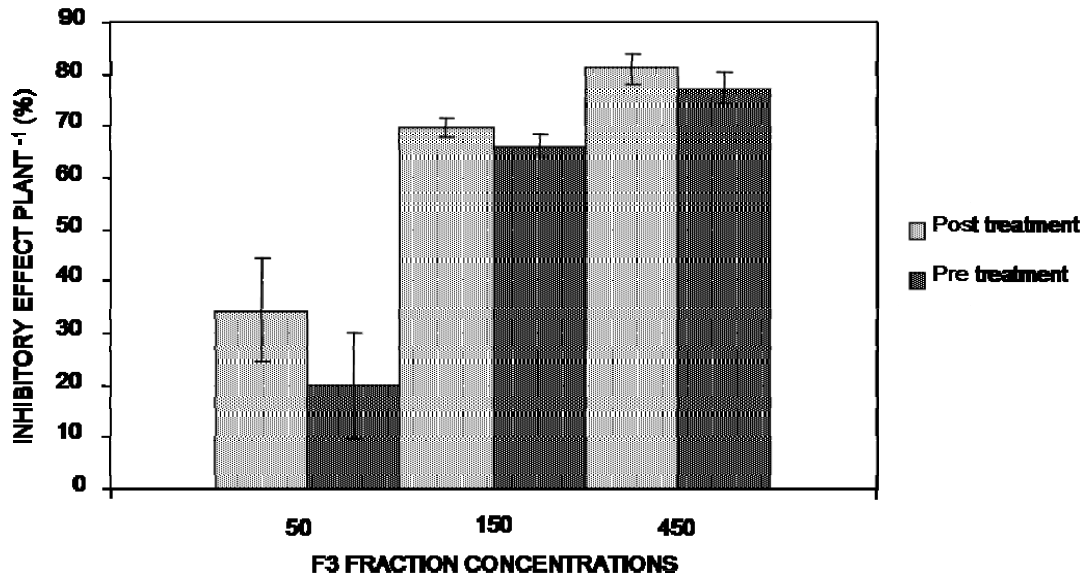


Figure 3 – Inhibitory effect F3 fraction in lesions formed by *Xap* on peach trees in a post-treatment and pre-treatment, ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, $450 \mu\text{g mL}^{-1}$). The bars corresponding to the standard deviation of each treatment ($P < 0.05$).

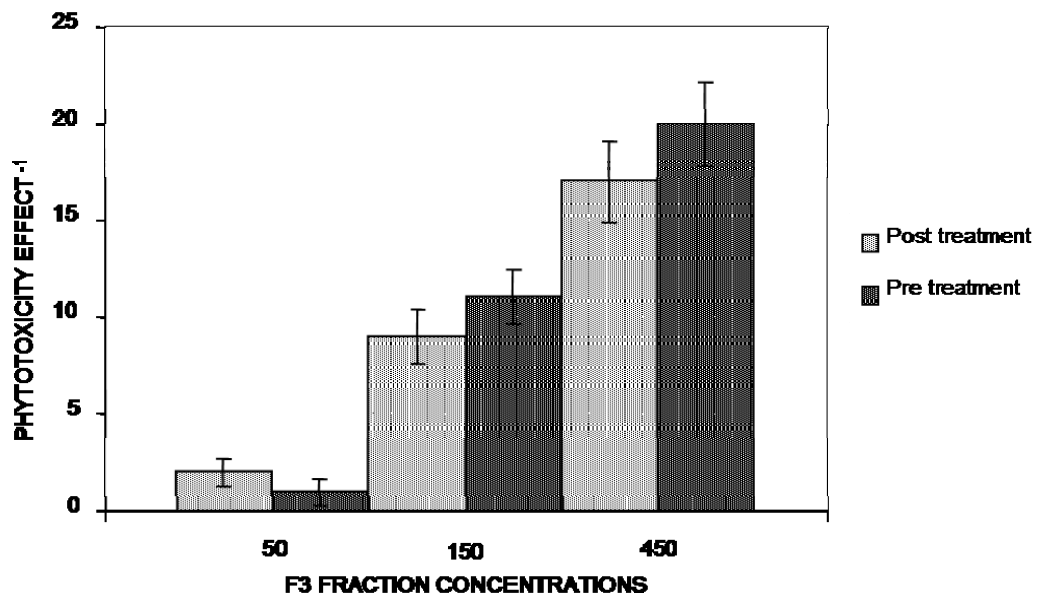


Figure 4 – Number of leaves with phytotoxicity produced by F3 fraction of three concentrations ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, $450 \mu\text{g mL}^{-1}$) in a post-treatment and pre-treatment. The bars corresponding to the standard deviation of each treatment ($P < 0.05$).