



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA FONTEQUE PISTORI

**CONTROLE DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* EM
PLANTAS DE *Citrus sinensis* MEDIADO POR
BIOCOMPOSTO**

Londrina
2014

JULIANA FONTEQUE PISTORI

**CONTROLE DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* EM
PLANTAS DE *Citrus sinensis* MEDIADO POR
BIOCOMPOSTO**

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
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P679c Pistori, Juliana Fonteque.

Controle de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas de *Citrus sinensis* mediado por biocomposto / Juliana Fonteque Pistori. – Londrina, 2014.
91 f.: il.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* – Teses. 2. Produtos naturais na agricultura – Teses. 3. Frutas cítricas – Doenças e pragas – Teses. 4. Plantas – Bacteriologia – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579.841.1

JULIANA FONTEQUE PISTORI

**CONTROLE DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* EM PLANTAS DE
Citrus sinensis MEDIADO POR BIOCOMPOSTO**

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.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof Dr. Nelson Arno Wulff
Fundo de Defesa da Citricultura -
FUNDECITRUS

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de junho de 2014

**"Trabalhar pelo que se ama é amar aquilo em que se trabalha."
(Leon Tolstoi)**

DEDICO

Dedico esse trabalho a Deus, pois ele foi realizado inteiramente para sua honra e para sua glória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, por ter confiado a mim este trabalho e por estar ao meu lado todos os dias, me fortalecendo e me encorajando para realizá-lo.

A minha mãe Eliane, por me amar e apoiar, e sempre estar ao meu lado.

Aos meu irmãos Alexandre e Viviane e meus cunhados (as) Isabel e Peter pelo amor e companheirismo.

Ao meu Marido, Junior, por sempre me apoiar em todas as minhas decisões, pelo seu carinho, paciência, compreensão, e auxílio nas horas de dificuldade.

A minha filha Isadora, por ter feito com que eu me tornasse uma pessoa melhor e enxergasse o verdadeiro sentido da vida.

Ao meu orientador, Professor Dr. Galdino Andrade, pela confiança depositada, por oferecer subsídios para minha aprendizagem e pela simpatia conquistada.

Ao meu co-orientador Dr. Rui Pereira Leite Jr, por abrir as portas de seu laboratório para que este trabalho fosse realizado, pela sua confiança e seus ensinamentos.

A Professora Suely por permitir que uma parte deste trabalho se realizasse em seu laboratório e as amigos Eliandro Tavares e Alexandre Morey por se disporem em me ajudar e me ensinar.

Ao Professor e amigo Dr. Admilton Gonçalves Oliveira Júnior, por ter contribuído essencialmente no meu aprendizado, pela contribuição na realização de todos os experimentos, pelo conhecimento transmitido e pela amizade.

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Ecologia Microbiana (LEM), Viviana, Vanessa, Deise, Cleverson, Glenda, Marcelo, Carolzinha, Marta, Jamile, Mayara, Ane e Miguel, pela amizade, contribuição e convivência saudável.

As minhas amigas do Doutorado Bárbara e Carol por deixarem meus dias mais alegres e coloridos e por contribuírem com minha formação.

As minhas queridas companheiras de turma Flávia Lassie e Luana Munhoz pela amizade, companheirismo e cumplicidade.

A todos do laboratório de bacteriologia do IAPAR, Jeanedy, Guto, Michele, Angelita, Adriana, Flavia, Camila, Gabriela, Paulo, Thiago, Eliana, Vanessa, Maria Gabriela, Fátima, Israel, Tereza, Andrey, Ivã e Haoan por me receberem, me ajudarem, aconselharem e compartilharem bons momentos.

A minha querida amiga Luciana Meneguim que tanto me ajudou, aconselhou, ensinou e apoiou durante toda minha jornada contribuindo diretamente com meu crescimento acadêmico.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) por abrir as portas e me receberem contribuindo com uma parte crucial no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica e realização deste trabalho.

PISTORI, Juliana Fontequê. **Controle de *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediado por biocomposto**. 2014, 91 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O Huanglongbing (HLB, *ex-greening*), é considerado a mais grave das doenças de citros. Não há medidas de controle efetivas e de baixo custo, nem mesmo métodos curativos para o HLB. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade da fração F4A resultante do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) em plantas de *Citrus sinensis* no controle do Huanglongbing. O primeiro experimento teve como objetivo avaliar diferenças na população bacteriana de *Ca. Liberibacter asiaticus* pela técnica de q-PCR, plantas de *Citrus sinensis* do cultivar Valencia foram inoculadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* pela técnica de enxertia e três concentrações da fração F4A foram avaliadas sendo elas $10\mu\text{g/mL}^{-1}$, $100\mu\text{g/mL}^{-1}$ e $1000\mu\text{g/mL}^{-1}$ em dois tempos de aplicação denominados de preventivo e curativo, tendo como delineamento experimental blocos casualizados, com sete réplicas biológicas para cada tratamento. O segundo experimento teve como objetivo investigar o potencial indutor de resistência da fração através da expressão do gene β -1,3 glucanase em plantas de *Citrus sinensis* (Valencia) pela técnica de RT-PCR. Três réplicas biológicas foram utilizadas por tratamento, os tratamentos foram os seguintes: aplicação da fração F4A nas concentrações de $10\mu\text{g/mL}^{-1}$, $100\mu\text{g/mL}^{-1}$ e $1000\mu\text{g/mL}^{-1}$, como controle positivo foi utilizado o produto comercial BION e como controle negativo apenas água destilada, o experimento foi avaliado 24h, 7 dias e 15 dias após a aplicação dos compostos. No primeiro experimento o tratamento curativo com $100\mu\text{g/mL}^{-1}$ da Fração F4A foi capaz de reduzir em duas unidades de Log a população de *Ca. Liberibacter asiaticus* em comparação com as plantas testemunhas. No segundo experimento a expressão do gene de resistência para β -1,3 glucanase foi 9 vezes mais expressa no tratamento com $100\mu\text{g/mL}^{-1}$ da Fração F4A após 24h da aplicação e 12,9 vezes mais expressa após o sétimo dia de aplicação. Os resultados deste estudo mostram-se promissores e sugerem que os compostos produzidos pela cepa LV de *Pseudomonas aeruginosa* surgem como uma possível alternativa no controle da doença Huanglongbing.

Palavras-chave: Citrus. Produto Natural. Indução de Resistência. Antibiótico.

PISTORI, Juliana Fonteque. **Candidatus Liberibacter asiaticus control mediated biocompound**. 2014. 91 p. Dissertation (MSc in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The Huanglongbing (HLB) is considered the most serious citrus diseases. There is no effective control measures and low cost, even curative methods for HLB. Thus, this study aimed to evaluate the activity of the fraction F4A resulting from secondary metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* (strain LV) in *Citrus sinensis* in control of HLB. Two experiments were conducted, the first plants of *Citrus sinensis* cultivar Valencia were inoculated with *Ca. Liberibacter asiaticus* by the technique of grafting and the fraction F4A three concentrations were applied, namely: 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and as negative control only distilled water was used. Two time intervals were evaluated termed preventive and curative, the experimental design was completely randomized with seven biological replicates for each treatment. After four and eight months after inoculation DNA samples were extracted and analyzed by Q-PCR technique for the quantification of *Ca. Liberibacter asiaticus* on plants. In the second experiment, three biological replicates of *Citrus sinensis* (Valencia) were used, the treatments were: for the ratio F4A concentrations of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as a positive control the commercial product was used BION as a negative control and only distilled water, the experiment was evaluated 24h, 7 days and 15 days after application of the compounds, and evaluated by RT-PCR to investigate the potential to induce resistance Fraction F4A, through expression of gene β -1,3 glucanase. In the first experiment curative treatment with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fraction F4A was able to reduce by two unit Log population of *Ca. Liberibacter asiaticus* compared with control plants. In the second experiment the expression of the resistance gene β -1,3 glucanase was 9 times higher in treatment with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fraction F4A 24h after application and 12.9 times more expressed after the seventh day of application. The results of this study are promising and suggest that the compounds produced by LV strain of *P. aeruginosa* emerge as a possible alternative for disease control HLB.

Key words: Citrus. Natural Product. Induction of Resistance. Antibiotic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Sintomas do Huanglongbing causadas pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas de laranja23
- Figura 2** – Porcentagem de plantas erradicadas devido ao huanglongbing entre os anos de 2005 e 2012.....25

ARTIGO

- Figura 1** – Gel de agarose de produtos da PCR de plantas cítricas tratadas com $100 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ da fração F4A, utilizando os primers A2/J5, que amplificam fragmento de 703 pares de base. M= marcador molecular 1kb Plus. CP= controle positivo65
- Figura 2** – Curva padrão obtida através de diluições seriadas de plasmídios contendo gene de *Ca. Liberibacter asiaticus* através do método Taqman de detecção com o par de primers HLBas/HLB e a sonda HLBp. A partir do ciclo 33,2 não foi possível obter detecção dos alvos66
- Figura 3** - Curva padrão utilizada para quantificação do DNA de *Ca. Liberibacter asiaticus* com o par de primers HLBas/HLBr e a sonda HLBp, obtida através da diluição em série dos plasmídeos contendo a sequência alvo do amplicon67
- Figura 4** - Expressão relativa do gene *PR2* (β -1,3 glucanase) em folhas de *Citrus sinensis* 24h após a aplicação da fração F4A. A expressão relativa do gene foi calculada de acordo com o método $\Delta\Delta\text{Ct}$. Os valores representam a média de três repetições biológicas para cada tratamento. Os tratamentos foram: aplicados via foliar para a fração F4A nas concentrações de $10 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. O produto acibenzolar-S-methyl (ASM) foi aplicado via solo na doseagem de 200 mg/planta68
- Figura 5** – Expressão relativa do gene *PR-2* (β -1,3 glucanase) de folhas de *Citrus sinensis* 7 dias após das aplicação dos compostos. A expressão relativa do gene foi calculada de acordo com o

método $\Delta\Delta Ct$. Os valores representam a média de três repetições biológicas para cada tratamento. Os tratamentos foram aplicados via foliar para a fração F4A, nas concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, e via solo acibenzolar-S-methyl (ASM) na dosagem de 200 mg/planta69

Figura 6 – Expressão relativa do gene *PR-2* (β -1,3 glucanase) de folhas de *Citrus sinensis* 15 dias após das aplicação dos compostos. A expressão relativa do gene foi calculada de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$. Os valores representam a média de três repetições biológicas para cada tratamento. Os tratamentos foram aplicados via foliar para a fração F4A, nas concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, e via solo acibenzolar-S-methyl (ASM) na dosagem de 200 mg/planta70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Frações obtidas a partir da cromatografia líquida a vácuo com solventes orgânicos em ordem de polaridade crescente71
- Tabela 2** – Avaliação da presença de plantas cítricas com resultado positivo para *Ca. Liberibacter asiaticus* em teste de PCR convencional aos 120 e 240 dias após a inoculação..72
- Tabela 3** – População estimada de *Ca. Liberibacter asiaticus* por PCR quantitativo (Q-PCR) e número de células bacterianas expresso em Log_{10}73

SUMÁRIO

| | | |
|---------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 16 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3.1 | CITRICULTURA | 17 |
| 3.2 | HUANGLONGBING | 19 |
| 3.3 | AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO | 20 |
| 3.4 | SINTOMATOLOGIA | 22 |
| 3.5 | MÉTODOS DE CONTROLE..... | 24 |
| 3.6 | CONTROLE ALTERNATIVO..... | 26 |
| | REFERÊNCIAS | 31 |
| ARTIGO | Controle de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> em plantas de <i>Citrus sinensis</i> mediado por biocomposto | 39 |
| | Resumo | 39 |
| | Introdução | 40 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 2.1 | <i>Agente de Biocontrole</i> | 43 |
| 2.2 | <i>Obtenção e extração de compostos bioativos</i> | 43 |
| 2.3 | <i>Ensaio em casa de vegetação</i> | 44 |
| 2.4 | <i>Análises moleculares das plantas de laranja tratadas com a fração F4A</i> | 45 |
| 2.4.1 | <i>Determinação da presença do <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> por PCR</i> | 45 |
| 2.4.2 | <i>Análise quantitativa de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (qPCR)</i> | 45 |
| 2.4.3 | <i>Análises estatísticas</i> | 46 |
| 2.5 | <i>Avaliação do potencial indutor de resistência da fração F4A em plantas de <i>Citrus sinensis</i> por RT-PCR</i> | 47 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 2.5.1 | <i>Material vegetal e tratamentos</i> | 47 |
| 2.5.2 | <i>Extração de RNA</i> | 47 |
| 2.5.3 | <i>Síntese de cDNA</i> | 48 |
| 2.5.4 | <i>RT-qPCR</i> | 48 |
| 3 | RESULTADOS | 49 |
| 3.1 | <i>Determinação da infecção das plantas cítricas com base na reação da polimerase em cadeia (PCR) convencional</i> | 49 |
| 3.2 | <i>Análise quantitativa de Candidatus Liberibacter asiaticus por q-PCR</i> | 49 |
| 3.3 | <i>Avaliação da atividade indutora de resistência da fração F4A em plantas de Citrus sinensis por RT-PCR</i> | 51 |
| 4 | DISCUSSÃO | 52 |
| 5 | REFERÊNCIAS | 57 |
| ANEXOS | | 74 |
| ANEXO A - | Inclusão de processo de patente (20/11/2011)..... | 75 |
| ANEXO B - | Biological Control..... | 92 |

1 INTRODUÇÃO

A citricultura tem grande importância para a economia brasileira contribuindo com a balança comercial nacional e principalmente, como geradora direta e indireta de 400.000 empregos na área rural (LOPES et al., 2011). No Brasil, a produção de citros ocorre principalmente no Estado de São Paulo, onde encontram-se cerca de 85% da produção brasileira de laranjas. As laranjeiras [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] são os citros de maior importância econômica (LOPES et al., 2011).

A produção de citros vem sendo constantemente ameaçada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* sp agente causal do huanglongbing (HLB), três espécies de *Candidatus Liberibacter* são conhecidas. O HLB é considerado uma das mais devastadoras doenças do citros de todo o mundo. Restrita a países da Ásia e da África, a doença teve seu agente causal identificado no Estado de São Paulo pela primeira vez em 2004 (COLETTA FILHO et al., 2004). A doença é de particular importância para a citricultura brasileira, pois pode causar consideráveis e irreversíveis danos a praticamente todas as variedades de citros (BOVÉ, 2006).

A principal forma de disseminação da doença ocorre através de insetos vetores. Duas espécies de psílido são responsáveis pela transmissão da bactéria, *Diaphorina citri* Kuwayama é responsável pela transmissão das espécies asiática e americana de *Candidatus Liberibacter*, e *Trioza erytreae* Del Guercio é o transmissor da espécie africana de *Liberibacter* (DA GRAÇA, 1991).

O HLB se caracteriza por uma série de sintomas que muitas vezes podem ser confundidos com deficiência de Zn, Ca, B e Mn, os frutos apresentam-se com tamanho reduzido e assimétrico com amadurecimento incompleto e abortamento de sementes, a planta apresenta redução do número de radículas, queda acentuada de folhas e frutos e seca dos ramos a partir da extremidade.

Plantas infectadas com HLB apresentam morte econômica (= incapacidade de produção econômica) em curto espaço de tempo e morte biológica com ataque severo da bactéria (BOVÉ, GARNIER 2003; COLLETA – FILHO et al., 2004; LOPES, FRARE 2008; BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

As práticas de manejo da doença consistem em erradicação dos pomares infectados, o plantio de mudas saudáveis, e o controle do inseto vetor, não havendo, portanto métodos curativos para o HLB (BELASQUE JR et al., 2009).

Há uma constante busca por medidas de controle da doença, e optar por medidas estratégicas que não agridam o meio ambiente é de grande importância para a preservação da biodiversidade. O controle alternativo torna-se promissor no controle de doenças em plantas, e o uso de microrganismos ou de compostos produzidos através do metabolismo secundário de cepas antagonistas estão sendo cada vez mais explorados (SHODA, 2000; HARMAM, 2000; BYRNE et al., 2005; RAN et al., 2005; LEMESSA, ZELLER, 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Neste contexto buscando encontrar uma alternativa para o controle do HLB, a atividade de compostos extracelulares produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV, foi avaliada no controle de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em casa de vegetação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da fração F4A produzida através do metabolismo secundário de *P. aeruginosa* (cepa LV) no controle de *Ca. Liberibacter asiaticus* em plantas de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Obter compostos extracelulares de *P. aeruginosa* (cepa LV) através do cultivo em meio líquido.
- 2.2.2 Fracionar os compostos produzidos pela cepa LV por cromatografia líquida a vácuo.
- 2.2.3 Investigar a Resistência Sistêmica Adquirida através da expressão do gene PR-2 (β -1,3 glucanase) em plantas de *Citrus sinensis* tratadas com a fração F4A.
- 2.2.4 Quantificar por meio de PCR em tempo real a população de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em folhas e ramos de laranja Valência inoculadas e submetidas a tratamento com a fração F4A.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CITRICULTURA

Registros apontam que as plantas cítricas são originárias da Ásia e ilhas adjacentes, regiões úmidas tropicais e subtropicais. No que se refere à laranja estudos apontam que as plantas tiveram origem no Sul Asiático, provavelmente na China a cerca de 4.000 anos atrás (NEVES et al., 2010).

No Brasil as plantas cítricas foram introduzidas pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na Bahia onde expandiu-se por todo território nacional devido as boas condições para vegetar (RODRIGUEZ et al., 1991).

No início do século XX a citricultura brasileira não era considerada um negócio rentável, no entanto a boa qualidade da laranja produzida propiciou o aumento da produção, e a partir da década de 1920 começou-se a exportação para a Argentina, e em 1930 para a Europa (RODRIGUEZ et al., 1991; REIS, 2008). A citricultura no Brasil desenvolveu-se primeiramente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia (RODRIGUEZ et al., 1991).

No entanto foi no estado de São Paulo que a citricultura encontrou seu principal centro de desenvolvimento garantindo o consumo da produção (RODRIGUEZ et al., 1991) sendo responsável por 77,2 % da produção nacional de laranja e em 2011 a produção paulista foi estimada em torno de 15 milhões de toneladas. Dentre os demais estados produtores destacam-se Bahia, Minas Gerais, Sergipe e Paraná (IBGE, 2011).

O Paraná é o terceiro maior produtor de laranjas do País. A citricultura paranaense primeiramente esteve, concentrada no município de Cerro Azul, se expandindo no final da década de 80 em razão das pesquisas realizadas no

Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR que visava o manejo e controle do cancro cítrico (LEITE JR et al., 1987; LEITE JR and MOHAN, 1990). O Paraná contribuiu com uma produção de 503 mil toneladas de laranja (12.328 caixas de 40,8 kg), o que equivale a 2,7% da produção brasileira, porém com um rendimento médio de 26.000kg/ha, que é 15% superior a média nacional (NUNES et al., 2010).

A citricultura se tornou um dos setores mais produtivos e com maior potencial para crescimento no setor do agronegócio brasileiro. O Brasil detém 30% da produção mundial de laranja *in natura* e 59% do comércio de suco de laranja, o agronegócio cítrico movimenta nove bilhões de reais por ano e gera mais de 400 mil empregos diretos e indiretos (IBGE, 2010; NEVES, JANK, 2006).

As variedades copa de citros cultivados em plantios comerciais são, basicamente, representadas pelas laranjas, tangerinas, limões, limas ácidas e pomelos. As laranjas (*Citrus sinensis*) predominam na maioria dos países cítricos com, aproximadamente, dois terços dos plantios. No Brasil, dentre as laranjas comerciais destacam-se Pêra, Natal, Valência e Hamlin. As três primeiras variedades perfazem mais de 80% da citricultura paulista (PIO et al., 2005).

Entre as principais barreiras que ameaçam a citricultura encontram-se os problemas causados por pragas e doenças (AMARO et al., 1997; AFONSO; SILVA, 1999; NEVES, 1999). Existem cerca de 300 pragas e doenças afetando a citricultura brasileira. Entre as doenças bacterianas que representam as maiores preocupações por parte do setor estão o huanglongbing (HLB), a clorose variegada dos citros (CVC) e o cancro cítrico.

3.2 HUANGLONGBING

Huanglongbing” é uma palavra de origem chinesa, designada as árvores que possuem sua copa afetada, e apresentam um ou mais ramos com folhas amarelas se destacando dos ramos normais. Esta doença foi primeiramente chamada de doença do “dragão amarelo”, nome proposto em homenagem ao Dr. Kung Hsiang Lin, pesquisador chinês, que relatou pela primeira vez a doença no Sul da China em 1919 (BOVÉ, 2006).

O Huanglongbing (HLB), também conhecido como Greening é considerado a mais importante e destrutiva doença da citricultura mundial (BOVÉ, 2006; GOTTWALD et al., 2007). Esta doença pode debilitar a capacidade produtiva de citros, com perdas relatadas de 30 a 100% (AUBERT et al., 1993).

O HLB está entre as doenças mais antigas do citros sendo conhecida há mais de um século no leste da Ásia (BOVÉ et al., 2006; DA GRAÇA, 1991; GOTTWALD, 2010). No entanto, esta doença foi amplamente ignorada até sua recente introdução para as Américas e apresenta um inédito desafio em áreas de produção de citros infectadas (WANG, TRIVEDI, 2013). No Brasil foi primeiramente detectada em março de 2004 em pomares localizados na região de Araraquara no estado de São Paulo (COLLETTA FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005), essa foi a primeira detecção da doença no continente americano. Em 2005 ocorreu a primeira detecção da doença em Minas Gerais e em 2007 no Paraná (BELASQUE JR et al., 2010).

Todas as espécies de citros comerciais e de cultivares copa são suscetíveis a infecção do HLB independentemente do porta-enxerto (BOVÉ, 2006).

3.3 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

O agente causal da doença HLB dos citros, são bactérias Gram-negativas classificadas como α -Proteobacteria, da ordem Rhizobiales e família *Rhizobiaceae*, denominadas de *Candidatus Liberibacter* spp. (JAGOUIEIX et al., 1994). Por serem restritas aos vasos do floema, também conhecidos como vasos liberianos, foram inicialmente propostas como *Liberobacter* (JAGOUIEIX et al., 1994), mas teve o nome alterado para *Liberibacter*, para ajuste ao nome latino correto (MACHADO et al., 2010).

Ca. Liberibacter spp. são bactérias não cultiváveis e por isso, receberam a denominação *Candidatus*, na condição de candidato a ter tal classificação assim que mais conhecimentos sobre sua biologia sejam adquiridos (MACHADO et al., 2010). Três espécies de *Ca. Liberibacter* estão associados ao HLB, *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus* e *Ca. Liberibacter americanus*.

Nos países asiáticos como Japão, Índia, China, Filipinas e Vietnã entre outros, a doença está associada à presença da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus*, no continente Africano em países como a África do Sul e o Zibabue o HLB está associado a *Ca. Liberibacter africanus*, já no continente americano estão presentes *Ca. Liberibacter asiaticus* em países como Brasil, México, Cuba, Estados Unidos entre outros (COLETTA-FILHO et al., 2004; HALBERT, 2005; MARTINEZ et al., 2009) e *Ca. Liberibacter americanus* encontrado somente no Brasil até o momento (TEIXEIRA et al., 2005).

Dados mostram que “africanus”, “asiaticus” e “americanus” são três espécies diferentes de *Liberibacter* (TEIXEIRA et al., 2005) a comparação entre os

DNAr 16S das formas asiática e africana mostrou que eles são 97,8% homólogos (JAGOUÉIX et al., 1994). Enquanto a seqüência de *Ca. Liberibacter africanus* e *Ca. Liberibacter asiaticus* compartilham 81,2% de identidade, a porcentagem de *Ca. Liberibacter americanus* e *Ca. Liberibacter africanus* é de 72,2%, já a identidade de *Ca. Liberibacter americanus* e *Ca. Liberibacter asiaticus* é apenas 71,4% (TEIXEIRA et al., 2008).

A transmissão de *Ca. Liberibacter* spp. ocorre naturalmente nos pomares por meio de insetos vetores, mas pode também ser transmitida pelo método de enxertia de material vegetal contaminado (BOVÉ, 2006), a transmissão das espécies asiática e americana de *Ca. Liberibacter* ocorre através do psíldeo, *Diaphorina citri* Kuwayama (CAPOOR and VISWANATH, 1967; YAMAMOTO et al., 2006) descrito pela primeira vez em 1940 por Ângelo da Costa Lima, da escola Nacional de Agronomia do Estado do Rio de Janeiro, Brasil (ESALQ – USP), já a espécie africana é transmitida por outra espécie de psíldeo o *Trioza erythrae* (MCCLEAN and OBERHOLZER, 1965), no entanto estudos mostraram que em condições experimentais *D. citri* e *T. erythrae* são capazes de transmitir a forma asiática e africana de HLB (MASSONIE and BOVÉ, 1976; LALLEMAND and BOVÉ, 1986).

Através do processo de alimentação, o psíldeo do citros adquire o agente causal do HLB de fontes infectadas, sendo que o tempo mínimo de aquisição pode variar de 15 a 30 min para *D. citri* e 24 h para *T. erythrae*, uma vez adquirido, o psíldeo mantém as bactérias e a capacidade de transmiti-la ao longo de sua vida útil (GOTTWALD, DA GRAÇA and BASSANEZI, 2007).

A planta conhecida como murta ou falsa-murta (*Murraya paniculata*), utilizada largamente como espécie ornamental no Brasil, também é hospedeira dos

tipos asiático e americano de *Ca. Liberibacter* e do inseto vetor *D. citri* (BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

3.4 SINTOMATOLOGIA

Os sintomas do HLB se manifestam no limbo foliar, na brotação de ramos, no crescimento e amadurecimento dos frutos e no próprio desenvolvimento geral da planta. Em plantas doentes, o floema e o sistema fotossintético são afetados, desencadeando inúmeras alterações na planta (COLETTA-FILHO and CARLOS, 2010)

Plantas infectadas com HLB são caracterizadas pela presença de um ou poucos ramos, com folhas amareladas e manchas assimétricas, com perda de parte da sua coloração verde. Tais folhas apresentam o que é chamado de “mosqueado”, este é o sintoma mais característico do HLB onde ocorre a doença, seja na Ásia, na África ou na América, e sejam quais forem às espécies de citros afetadas, com o tempo todo o limbo foliar pode vir a se transformar uniformemente amarelo e as folhas podem tornar-se mais espessas (BOVÉ, 2006).

Os sintomas foliares principalmente o mosqueado pode estar associado ao excessivo acúmulo de amido nas folhas com conseqüente rompimento dos cloroplastos (ETXEBERRIA et al., 2008). Alguns autores sugerem que a emissão de compostos voláteis pelo patógeno poderia afetar o metabolismo dos carboidratos primários promovendo o acúmulo de amido nas folhas (EZQUER et al., 2010).

Plantas Infectadas possuem a formação de calose nos elementos de tubos crivados do floema impedindo a distribuição da seiva elaborada para flores,

frutos, folhas jovens e sistema radicular (KIM et al., 2009), causando diminuição na formação de raízes secundárias (DA GRAÇA, 1991; ETXEBERRIA et al., 2009), morte de ponteiros, diminuição do tamanho dos frutos, assimetria, bem como aumento da acidez e diminuição do teor de sólidos solúveis, causando diminuição da qualidade dos frutos (DAGULO et al., 2009)

Os frutos apresentam ainda sementes abortadas com coloração marrom. Na medida em que amadurecem permanecem com a coloração verde, daí o nome “greening”, em casos severos, toda a planta mostra sinais da doença que passa a apresentar um menor desenvolvimento geral em relação às sadias (GOTTWALD; DA GRAÇA, BASSANEZI, 2007).

Figura 1 - Sintomas do Huanglongbing causados pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas de laranja.



Fonte: (FUNDECITRUS, 2013)

3.5 MÉTODOS DE CONTROLE

Não há métodos de controle curativos para o HLB que possam ser usados em pomares comerciais, desta forma, é fundamental prevenir a infecção das plantas (BELASQUE JR et al., 2009). Tentativas de controle da doença com injeções de antibióticos foram realizadas porém com resultados insatisfatórios (BOVÉ, 2006), pois, além do risco ambiental, uma vez interrompido o tratamento os sintomas voltavam a parecer, ou seja, as plantas continuavam doentes (BELASQUE JR et al. 2009). A poda de ramos sintomáticos e assintomáticos também foi testada como uma medida de controle, mostrando-se igualmente ineficaz (LOPES et al., 2007).

Programas de melhoramento nutricional foram estudados para o controle de *Ca. Liberibacter asiaticus* na Flórida, EUA, e no Brasil. Entretanto, o uso destes suplementos nutricionais não foram capazes de reduzir a população bacteriana em plantas de citros infectadas e nem reestabelecer a produtividade dos pomares cítricos (GOTTWALD et al., 2012; BASSANEZI et al., 2013)

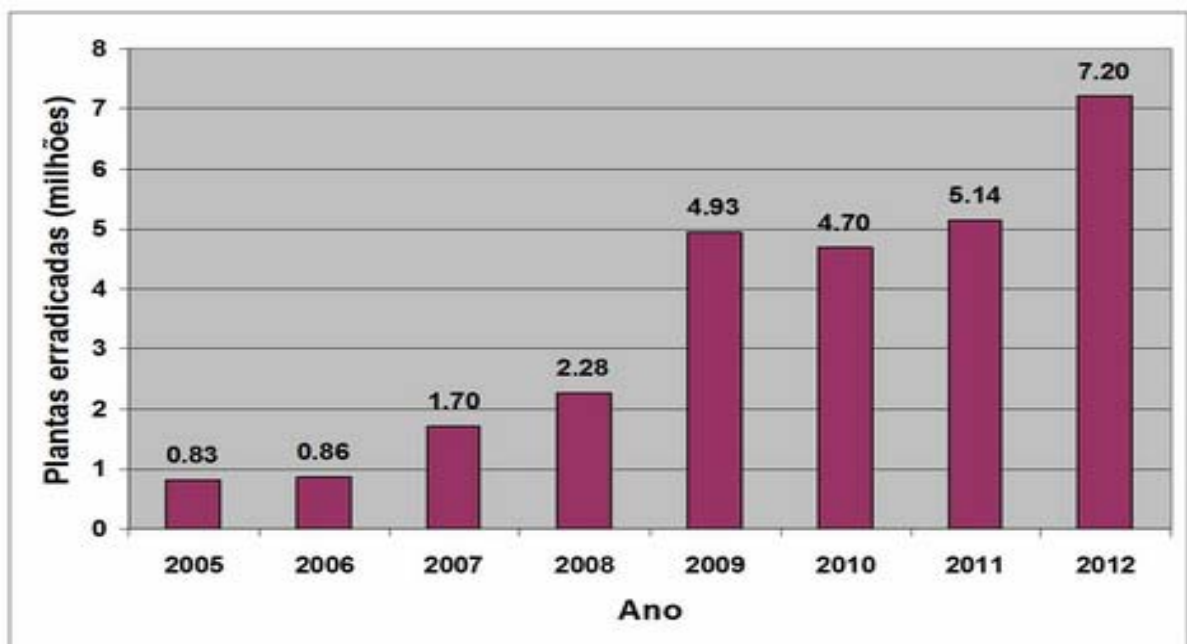
Ainda não são conhecidas fontes de resistência ao HLB, e todas as espécies cítricas plantadas comercialmente no País são suscetíveis a *Ca. Liberibacter asiaticus* e *Ca. L. americanus*, e ao seu inseto vetor (*Diaphorina citri*). (BELASQUE JR et al. 2009).

Atualmente, as estratégias de manejo dessa doença consistem principalmente no controle químico do psílideo, remoção das plantas infectadas, além do plantio de mudas certificadas livres da bactéria (BASSANEZI, 2010). O manejo do HLB fundamenta-se, portanto, na prevenção de novas infecções em plantas saudáveis, reduzindo o inóculo presente em plantas e insetos vetores (BASSANEZI, 2010). Recomenda-se ainda a eliminação das plantas de murta-de-

cheiro ou falsa-murta (*Murraya paniculata*) que podem servir como um reservatório de *Ca. Liberibacter asiaticus* e atuar como “ponte” para as espécies cítricas, uma vez que esta espécie de planta pode hospedar uma grande quantidade de *Diaphorina citri* (DAMSTEEGT et al., 2010).

Independentemente de estarem infectadas ou de sua localização, essas medidas requerem tempo, recursos humanos e financeiros, e também que sejam adotadas continuamente e em escala regional (BELASQUE JR et al., 2009).

Figura 2 - Porcentagem de plantas erradicadas devido ao huanglongbing entre os anos de 2005 e 2012.



Fonte: (FUNDECITRUS, 2013)

3.6 CONTROLE ALTERNATIVO

O controle alternativo de pragas ou doenças de plantas não requer o uso de defensivos agrícolas, no entanto estes podem estar associados de maneira integrada aos métodos tradicionais de controle químico ou de práticas culturais

como, por exemplo, a rotação de culturas, poda e eliminação de restos culturais (MORAIS, 1992).

Dentro do controle alternativo estão incluídos o controle biológico, indução de resistência, resistência induzida e imunização, estes visam o controle de pragas e doenças com menos impacto ambiental, e com menor risco para o homem (MORAIS, 1992), uma vez que o uso intensivo de pesticidas na agricultura tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água, a resistência de patógenos, e o desequilíbrio biológico entre outros (BETTIOL et al., 2001).

Dentro do controle biológico, a ação controladora se faz diretamente sobre o patógeno (MORAIS, 1992), e pode ser efetuado pela ação de microrganismos antagônicos (BORRERO et al., 2009; LARKIN and TAVANTZIS, 2013; SUÁREZ-ESTRELLA et al., 2007).

O efeito desta microbiota antagonista implica em uma variedade de ações tais como, competição por nutrientes e nicho ecológico, produção de enzimas líticas e antibióticos, parasitismo e mudanças na disponibilidade de nutrientes (BORRERO et al., 2006, 2009). Ao longo dos últimos 20 anos, numerosos estudos demonstraram inequivocamente que metabólitos, como antibióticos, enzimas, e os voláteis produzidos por bactérias antagonistas desempenham papéis fundamentais no controle de vários patógenos de plantas (WELLER, 1988; WHIPPS 1997).

O sucesso de muitos microrganismos antagonistas em ensaios de laboratório e em testes piloto em casa de vegetação, tem gerado o interesse de muitas indústrias de agroquímicos no desenvolvimento e na comercialização de bioprodutos, contendo microrganismos antagonistas para o controle de doenças em

plantas (SHARMA et al., 2009), estes podem ainda ser benéficos para a planta hospedeira diretamente através da produção de metabólitos, que ou estimulam o desenvolvimento radicular e o crescimento da planta, ou desencadeiam a indução de resistência sistêmica adquirida (VAN LOON et al. , 1998).

Este fenômeno de resistência em plantas tornou-se conhecido apenas no início do século passado, tendo como marco inicial o trabalho desenvolvido por Chester em 1933 (MORAES, 1998). A partir deste trabalho, muitos outros foram realizados na busca de produtos de defesa com função semelhante à de anticorpos animais em plantas (LUCAS, 1999), entretanto, todos fracassaram. Um segundo marco foi a descoberta das fitoalexinas, nos anos 40, as quais foram mais amplamente estudadas na década de 70 (PASCHOLATI, 1998).

A indução de resistência vem se firmando como uma opção ecologicamente correta e economicamente viável, e tem sido demonstrada em diversas espécies de plantas (HAMMERSCHMIDT; KUAE, VAN LOON, 2001; PASCHOLATI, 2003).

Este processo envolve a ativação de mecanismos de defesa, que estavam inativos ou latentes na planta, pelo uso de agentes bióticos e abióticos sem alterar o genoma da planta (PASCHOLATI and LEITE, 1994), estes agentes são conhecidos como indutores de resistência (HAMMOND-KOSACK and JONES, 2000). A utilização destes indutores leva a ativação da Resistência Sistêmica Adquirida (RSA), o que gera uma marcante redução nos sintomas da doença após subsequentes infecções, inclusive com diferentes espécies de patógenos (KESSAMANN et al., 1994; MARTINEZ et al.,2000).

Existem vários relatos na literatura de diversas substâncias de origem biótica que agem como indutores de resistência (KUC', 2001), como frações de parede celular de plantas, de fungos (DOKE; RAMIREZ; TOMIYAMA, 1987) e de bactérias; lipopolissacarídeos de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PIETERSE et al., 2001; VAN LOON; BEKKER; PIETERSE, 1998); fluido intercelular de plantas; extratos vegetais (FOUGHT and KUC', 1996) e de microrganismos não patogênicos, como *S. cerevisiae* (PASCHOLATI, 1998) e substâncias provenientes de fitopatógenos, como *Phytophthora* spp., *Pyricularia oryzae* e *Erwinia amylovora* (KELLER et al., 1996; SCHAFFRATH; SCHEINPFLUG; REISNER, 1995; WEI et al., 1992; YU, 1995). Há também agentes abióticos conhecidos como indutores de resistência como o ácido salicílico, (HAMMERSCHMIDT and DAN, 1997), ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (HIJWEGNWN; VERHAAR; ZADOKS., 1996) e acibenzolar-S-metil (ASM) (CAVALCANTI et al., 2006).

A resistência da planta, é definida como sendo a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada de um microrganismo em seu interior, bem como criar condições adversas para a colonização de seus tecidos pelo mesmo (PASCHOLATI et al., 1995).

Desta forma as plantas podem se defender passivamente ou ativamente; esses mecanismos são subdivididos em pré-formados e pós-formados, isto é, que já existem, ou podem ser ativados. Os fatores pré formados incluem cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores ou podem ser bioquímicos que envolvem a presença de fenóis, alcalóides, fototoxinas, glicosídeos, cianogênicos, e glicosídeos fenólicos. Já para os mecanismos pós - formados as barreiras estruturais podem envolver a lignificação, suberificação, formação de papilas e de camadas de

abscisão e de cortiça, bem como as tiloses (PASCHOLATI and LEITE, 1994). Por sua vez os mecanismos bioquímicos pós formados podem englobar o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas a patogênese (*PR- proteins*) (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008), dentre as PR proteínas mais pesquisadas estão as quitinases e as β -1,3 glucanases. Estas duas enzimas tem atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes na parede dos patógenos (ANDREU et al., 1998; LORITO et al., 1993; WALTON, 1997)

Proteínas-PR acumulam-se em locais de infecção e em sítios distantes destes (STICHER et al.,1997). Sua síntese e acúmulo possuem caráter de resposta ativa e sistêmica em caso de resistência induzida (VAN LOON, 1985). Podem se acumular nos espaços intercelulares quando teriam uma ação direta sobre os patógenos e também em vacúolos, onde teriam ação após eventos de patogênese, que culminam com a descompartimentalização. Atualmente, essas proteínas são agrupadas em 17 famílias, sendo que algumas têm atividade conhecida e outras não (VAN LOON et al., 2006).

A resistência induzida pode inicialmente ser localizada na região de infecção, na tentativa de impedir e/ou retardar a penetração do patógeno. Posteriormente, esta resistência passa a ocorrer em locais da planta, distantes do local da infecção pelo patógeno, ou do local de aplicação dos agentes elicitores, caracterizando, assim, a resposta sistêmica adquirida (AGRIOS, 2004). O mecanismo da RSA envolve uma cascata de eventos e sinais, os quais iniciam-se no momento da interação planta/patógeno ou do tratamento com fatores bióticos ou abióticos, levando a alterações no seu metabolismo celular, culminando com a emissão de sinais moleculares dirigidos para outras partes da planta, atuando de forma inespecífica, promovendo a redução da severidade da doença (FERNANDES

et al., 2009). Em resposta à distribuição dos sinais dentro da planta, esta seria induzida a sintetizar agentes de defesa, incluindo as PR-Proteínas, além da formação de barreiras estruturais, como a lignina. A participação de compostos, como o óxido nítrico, etileno, ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA), tem sido sugerida como sinalizadores da RSA. A participação do SA na RSA deve-se à sua presença, em altos níveis, em plantas que apresentam esta resposta (DOREY et al., 1997; DURNER et al., 1997; FERNANDES et al, 2009).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 5. Ed. San Diego, Califórnia: Elsevier Academic Press, 922p. 2004
- AFONSO, A., SILVA, M. Laranja: custo de produção. *Anuário da agricultura Brasileira: Agriannual*, 302-303. 2000
- Amaro, A. A., Maia, M. L., Gonzalez, M. A., Donadio, L. C., Moreira, C. S. Efeitos econômicos decorrentes da clorose variegada dos citros. *Clorose Variegada dos Citros, Bebedouro*, 162. 1997
- Aubert, B. Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. Pages 134-142 in: *Proc. 4th Cong. Int. Soc. Citrus Nurserymen*. R. Etienne, ed., South Africa. 1993
- Andreu, A., Tonón, C., van damme, M., Huarte, M., Daleo, G. Effect of glucans from different races of *Phytophthora infestans* on defense reactions in potato tube. *European Journal of Plant Pathology*, v. 104, p. 777-783, 1998.
- BASSANEZI, R. B., LOPES, S. A., BELASQUE Jr. J., SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T., MIRANDA, M. P., TEIXEIRA, D. C., WULFF, N. A. Epidemiologia do Huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. *Citrus Research & Technology, Cordeirópolis*, v.31, n.1, p 11-23, 2010a.
- BETTIOL, W., GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. *Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário*. 2001.
- Belasque Junior, J., Barbosa, J. C., Massari, C. A., Ayres, A. J. Incidência e distribuição do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil *Citrus Research & Technology*, 31(01), 01-09. 2010
- Belasque Junior, J., Bergamin Filho, A., Bassanezi, R. B., Barbosa, J. C., Fernandes, N. G., Yamamoto, P. T., and Massari, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*, 34(3), 137-145. 2009
- Bové, J. M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*. 88:7-37. 2006.
- Bové, J. M., Garnier, M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science*, 164(3), 423-438. 2003.
- Borrero, C., Ordovás, J., Trillas, M.I., Avilés, M. Tomato Fusarium wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterised by Biolog. *Soil Biology and Biochemistry*. 38, 1631–1637. 2006

Borrero, C., Trillas, M.I., Avilés, M. Carnation Fusarium wilt suppression in four composts. *Europe Journal of Plant Pathology*. 123, 425–433. 2009.

Byrne, J. M., Dianese, A. C., Ji, P., Campbell, H. L.; Cuppels, D. A.; Louws, F. J.; Wilson, M. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biological Control*, 32(3), 408-418. 2005.

Capoor, S. P., Rao, D. G., Viswanath, S. M. Diaphorina citri Kuway a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian Journal of Agricultural Science* 37:572-576. 1967

Coletta-Filho, H. D., Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., De Negri, J. D., Pompeu Jr, J., Machado, M. A., Muller, G. W. First report of the causal agent of Huanglongbing (“Candidatus Liberibacter asiaticus”) in Brazil. *Plant Disease*, 88(12), 1382-1382, 2004.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., RIBEIRO JÚNIOR, P.M., COSTA, J.C.B., SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.372-380, 2006.

COHEN L, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In LYR, H., Russel, P.E.; Sisler, H.D. (Eds.). *Modern Fungicides and antifungal compounds*. Andover: Intercept. P, 461-466, 1996.

Dagulo, L., Danyluk, M. D., Spann, T. M., Valim, M. F., Goodrich-Schneider, R., Sims, C., & Rouseff, R. Chemical characterization of orange juice from trees infected with citrus greening (huanglongbing). *Journal of food science*, 75(2), C199-C207, 2009.

Damsteegt, V., E. Postnikova, A. Stone, M. Kuhlmann, C. Wilson, A. Sechler, N. Schaad, R. Brlansky, and W. Schneider. The relevance of *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causal agent of huanglongbing (HLB). *Plant Disease*. (in press). 2010.

da Graça, J. V. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathology*. 29:109 136, 1991.

DOKE, N., RAMIREZ, A.V., TOMIYAMA, K. Systemic induction of resistance in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal wall components of the fungus. *Journal of Phytopathology*, v.119, p. 232-239, 1987.

DOREY, S., BAILLIEUL, F., PIERREL, M. A., SAINDRENAN, P., FRITIG, B., KAUFFMANN, S. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, St. Paul, v. 10, p. 646-655, 1997.

DURNER, J., SHAH, J., KLESSIG, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, Oxford, v. 2, p. 266-274, 1997.

Ezquer, I., Li, J., Ovecka, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Montero, M., Pozueta-Romero, J. Microbial volatile emissions promote accumulation of exceptionally high levels of starch in leaves in mono- and dicotyledonous plants. *Plant and cell physiology*, 51(10), 1674-1693, 2010.

Etxeberria, E., Gonzalez, P., Achor, D., Albrigo, G. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 76-83, 2009.

FERNANDES, C. D. F., VIEIRA JÚNIOR, J. R., da SILVA, D. S. G., REIS, N., ANTUNES JÚNIOR, H. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Embrapa Rondônia. Documentos, 2009.

FOUGHT, L., KUĆ, J. Lack of specificity in plant extracts and chemicals as inducers of systemic resistance in cucumber plants to anthracnose. *Journal of Phytopathology*, v. 144, p. 1-6, 1996.

Garnier, M., Danel, N., Bové, J. M. The greening organism is a gram negative bacterium. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 9th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.115-124, 1984.

Gottwald, T. R. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:119-139, 2010.

Gottwald, T. R., da Graça, J. V., Bassanezi, R. B. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 6, 2007.

Halbert, S. E. The Discovery of huanglongbing in Florida, Proceeding of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing. Research Workshop. Florida Citrus Mutual, Orlando, p.H- 3, 2005.

Harman, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84(4), 377-393, 2000.

Hammerschmidt, R., Kuae, J., Van Loon, L.C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v.107, n.1, p.01-06, 2001.

HAMMERSCHMIDT, D., DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: ECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. Environmentally safe approaches to crop disease control. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, p.177-99, 1997.

Hammond-Kosack, KE., Jones, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773–1791, 1996.

HIJWEGNWN, T., VERHAAR, M.A., ZADOKS, J.C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Pathology*, v.45, p.632-635, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>. Acesso em : Fev 2014.

Jagoueix, S., Bove, J. M.; Garnier, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 379-386, 1994.

Kessman, H., Staub, T., Hoffman, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S., Ryals, J. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32: 439-459, 1994.

KELLER, H., BLEIN, J.P., BONNET, P., RICCI, P. Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiology*, v. 110, p. 365-376, 1996.

Kim, J. S., Sagaram, U. S., Burns, J. K., Li, J. L., Wang, N. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology*, 99(1), 50-57, 2009.

KUĆ, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, v. 107, p. 7-12, 2001.

Larkin, R.P., Tavantzis, S. Use of biocontrol organisms and compost amendments for improved control of soilborne diseases and increased potato production. *American Journal Potato Research*. 90 (3), 261–270, 2013.

Lallemand, J., Fos, A., Bové, J. M. Transmission de la bacterie associée à la forme africaine de la maladie du "greening" par le psylle asiatique *Diaphorina citri* Kuwayama. *Fruits* 41:341-343, 1986.

Leite Jr, R. P., Mohan, S. K. Integrated management of citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. *Crop Protection* 9:3-7, 1990.

Leite Jr, R. P., Moham, S. K., Pereira, A. L. G., Campacci, C. A. Controle integrado de cancro cítrico: efeito da resistência genética e da aplicação de bactericidas. *Fitopatologia Brasileira* 12:257-263, 1987.

Lemessa, F., Zeller, W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological control*, 42(3), 336-344, 2007..

Lopes, S. A., Frare, G. F., Yamamoto, P. T., Ayres, A. J., Barbosa, J. C. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. *European Journal of Plant Pathology* 119:463-468, 2007.

Lopes, S. A., Frare, G. F. Graft Transmission and Cultivar Reaction of Citrus to 'Candidatus *Liberibacter americanus*'. *Plant Disease*, 92(1), 21-24, 2008.

LOPES, J., DÉO, T., ANDRADE, B. M., GIROTO, M., FELIPE, A., JUNIOR, C., LIMA, F. Importância econômica dos citros no Brasil. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*. 2011

Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E.; Pintor-Toro, J. A., Scala, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 7860-7865, 1998.

Lucas, J. A. Plant immunisation: from myth to SAR. *Pesticide Science*, 55(2), 193-196. 1999

Machado, M. A., Locali-Fabris, E. C., Coletta Filho, H. D. Candidatus *Liberibacter* spp., citrus huanglongbing agents. *Citrus Research and Technology*, 31(1), 25-35, 2010.

Martínez, Y., Llauger, R., Batista, L., Luis, M., Iglesia, A., Collazo, C., Tablada, L. M. First report of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' associated with Huanglongbing in Cuba. *Plant Pathology*, 58(2), 389-389, 2009.

MARTINEZ, C., BACCOU, J.C., BRESSON, E., BAISSAC, Y., DANIEL, J. F., JALLOUL, A., MONTILLET, J.L., GEIGER, J.P., ASSIGBETSE, K. & NICOLE, M. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Plant Physiology* 122:757-766, 2000.

McClellan, A. P. D.; Oberholzer, P. C. J. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. *South Africa Journal of Agricultural Science* 8:297-298, 1965.

Moraes, W. B. Controle alternativo de fitopatógenos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 27(13), 175-190, 1992.

NEVES, E. Motivos de otimismo. *Agroanalysis*, Rio de Janeiro, 19(12), 36-38, 1999.

Neves, M. F., Trombin, V. G., Milan, P., Lopes, F. F., Cressoni, F., Kalaki, R. O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto: Citrus BR, 2010.

Neves, M. F., Jank, M.S. Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015 Laranja. São Paulo, 2006.

NUNES, W., SOUZA, E., LEITE Jr, R. P., SALVADOR, C., RINALDI, D., CROCE FILHO, J., PAIVA, P. Plano de ação para o controle de huanglongbing no estado do Paraná, Brasil. *Citrus Research & Technology*, 31(2), 169-177, 2010.

Oliveira, A. G., Murate, L. S., Spago, F. R., Lopes, L. D. P., Beranger, J. P. D. O., Martin, J. A. B. S., Andrade, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*, 56(2), 125-131, 2011.

Pascholati, S.F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI?. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.29, n.1, p.115-116, 2003.

Pascholati, S. F.; Leite, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. *Revisão anual de patologia de plantas*, 2, 1-51, 1994.

Pascholati, S. F.; Leite, B.; Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. Hospedeiro: mecanismos de resistência. *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*, 3, 417-453, 1995.

PASCHOLATI, S. F. Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos. Piracicaba, 1998, 123p. Tese Livre Docência – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Pio, R. M., Figueiredo, J. D., Stuchi, E. S., Cardoso, S. D. B.; MATTOS JUNIOR, D. D. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). *Citros*. Campinas: Instituto Agrônomo; Fundag, p. 37-66, 2005.

PIETERSE, C.M.J., VAN PELT J.A., VAN WEES S.C.M., TON J., LÉON-KLOOSTERZIEL K. M., KEURENTJES J. J.B., VERHAGEN B.W.M., KNOESTER M.; VAN DER SLUIS I.; BAKKER P.A.H.M., VAN LOON L.C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. *European Journal of Plant Pathology*, v. 107, p. 51-61, 2001.

Ran, L. X., Li, Z. N., Wu, G. J., Van Loon, L. C., Bakker, P. H. Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *European journal of plant pathology*, 113(1), 59-70, 2005.

Reis, E. M. dos. A Política Fitossanitária de Combate ao Cancro Cítrico na Região de Presidente Prudente- Sp. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências e Tecnologia. Presidente Prudente: UNESP, 150p, 2008.

Rodríguez, O., Pompeu Jr, J., Amaro, A. A. *Citricultura brasileira*. Fundação Cargill, 1991.

Sticher, L., Mauch-mani, B., Metraux, J.P. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 35:235-270, 1997.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R., PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, p.227-248, 2008.

SCHAFFRATH, U., SCHEINPFLUG. H., REISENER, H.J. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: Isolation, characterization and physiological properties. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 46, p.293-307, 1995.

Sharma, R. R., Singh, D., Singh, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221, 2009.

Shoda, M. Bacterial control of plant diseases. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(6), 515-521, 2000.

Suárez-Estrella, F., Bustamante, M.A., Moral, R., Vargas-García, M.C., López, M.J., Moreno, J. In vitro control of *Fusarium* wilt using agroindustrial subproduct-based composts. *Journal of Plant Pathology*. 94 (1), 59–70, 2012.

Teixeira, D. C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E. C., Wulff, N. A., Eveillard-Jagoueix, S., Bové, J. M. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 22(3), 139-150, 2008.

Teixeira, D.C., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., da Costa, P. I., Ayres, A. J., Bové, J. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1857-1862, 2005.

Van Loon, L. C., Van Strien, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55, 85–97, 1999.

VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M., PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v.36, p.453-483, 1998.

Van Loon, L. C. Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*. Dordrecht. 4:111-116, 1985.

Van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology*. 114:135-162, 2006.

Walton, J. D. *Biochemical Plant Pathology*. *Plant Biochemistry*, 487, 1997.

Wang, N., Trivedi, P. Citrus Huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology*, 103(7), 652-665, 2013.

Weller, D. M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379–407, 1988.

Whipps, J. M. Developments in the biological control of soilborne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26: 1–133, 1997.

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

Yamamoto, P. T., Felipe, M. R., Garbim, L. F., Coelho, J. H. C., Ximenes N. L., Martins, E. C., Leite, A. P. R., Sousa, M. C., Abrahao, D. P., Braz, J. D. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In: Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop, Ribeirão Preto, SP, Brazil. p.96, 2006.

YU, L. M. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v. 92, p. 4088-4094, 1995.

ARTIGO

Controle de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas de *Citrus sinensis* mediado por biocomposto

Juliana Fontequè Pistori^{a,c}, Admilton Gonçalves de Oliveira^a, Martha Viviana Torres Cely^a, Luciana Meneguim^c, Luana Delgado Munhoz^a, Alexandre Tadachi Morey^b, Sueli Fumie Yamada Ogatta^b, Rui Pereira Leite Junior^c, Galdino Andrade^a

^aDepartamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 86051-990, Brazil

^bDepartamento de Microbiologia, Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismo, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 86051-990, Brazil

^cInstituto Agrônomo do Paraná, Laboratório de bacteriologia, IAPAR, Londrina, 86105-000

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade da fração F4A resultante do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) no controle do HLB. Dois experimentos foram realizados, no primeiro plantas de *Citrus sinensis* do cultivar Valência foram inoculadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* pela técnica de enxertia e três concentrações da fração F4A foram aplicadas ($10\mu\text{g mL}^{-1}$, $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e $1000\mu\text{g mL}^{-1}$) e como controle negativo foi utilizado água destilada estéril. Dois tempos de aplicação foram avaliados denominados de preventivo e curativo, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete plantas para cada tratamento. Após quatro e oito meses da infecção as amostras de DNA foram extraídas e analisadas pela técnica de q-PCR para quantificação de *Ca. Liberibacter asiaticus* nas plantas de citros. No segundo experimento foram utilizados três replicatas biológicas de plantas de *Citrus sinensis* (Valencia), os tratamentos foram: aplicação da fração F4A nas concentrações de $10\mu\text{g mL}^{-1}$, $100\mu\text{g mL}^{-1}$ e $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, como controle positivo foi utilizado o produto comercial BION e como controle negativo apenas água destilada, as extrações de RNA foram realizadas 24h, 7 dias e 15 dias após a aplicação dos compostos, e avaliados pela técnica de RT-qPCR, para investigação do potencial indutor de resistência da Fração F4A, através da expressão do gene β -1,3 glucanase. No primeiro experimento o tratamento curativo com $100\mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A foi capaz de reduzir em duas unidade de Log a população de *Ca. Liberibacter asiaticus* em comparação com as plantas testemunhas. No segundo experimento a expressão do gene de resistência β -1,3 glucanase foi 9 vezes maior no tratamento com $100\mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A após 24h da aplicação e 12.9 vezes mais expressa após o sétimo dia de aplicação. Os resultados deste estudo são promissores e sugerem que os compostos produzidos pela cepa LV de *P. aeruginosa* pode ser uma possível alternativa no controle da doença HLB.

Palavras- chave: Citrus; Produto Natural; Indução de Resistência; Antibiótico

Introdução

A doença Huanglongbing, (HLB), também conhecida como *Greening*, é considerada uma das mais devastadoras para a cultura de citros no mundo (Bové, 2006) sendo detectada no Brasil pela primeira vez na cidade de Matão - SP, 2004 (Coletta-Filho et al., 2004). O HLB é uma doença que afeta severamente a cultura dos citros e coloca em risco esse importante setor do agronegócio pelas dificuldades de seu manejo e pelos danos causados.

O agente causal do HLB envolve três espécies de bactérias não cultiváveis denominadas de *Candidatus Liberibacter* spp. (Bové, 2006). Estas bactérias foram caracterizadas como bactérias Gram-negativa (Garnier et al., 1984) e pertencentes ao grupo das alfa-proteobactérias (Jagoueix et al., 1994). Nos diversos países asiáticos onde a doença ocorre, o HLB está associado à presença da bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus*, já no continente Africano, o HLB está associado a *Ca. Liberibacter africanus* (Garnier and Bové, 1996). Na América do Sul ocorrem *Ca. Liberibacter americanus* e *Ca. Liberibacter asiaticus* (Teixeira et al., 2005).

O principal agente transmissor é um inseto da família Psylloidea, sendo que duas espécies estão associadas à transmissão de *Ca. Liberibacter* spp. A *Diaphorina citri* é responsável pela transmissão das espécies asiática e americana de *Ca. Liberibacter* (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006) e *Trioza erytreae* presente na África é responsável pela transmissão da espécie africana (McClellan and Oberholzer, 1965).

As plantas infectadas com as bactérias do HLB apresentam morte econômica em curto espaço de tempo, devido a redução do número de radículas, queda acentuada de folhas e frutos, e seca dos ramos a partir da extremidade

(Bové, 2006). Além disso, não há medidas de controle efetivas e de baixo custo, nem mesmo métodos curativos para o HLB. O controle preconizado envolve o plantio de mudas saudáveis, a eliminação de plantas doentes e o controle do inseto vetor (Bové, 2006; Lopes, 2006)

Tratamentos com injeções de tetraciclina foram testadas em alguns países para o controle do HLB. No entanto, esta técnica foi abandonada por razões ecológicas e pelo fato da tetraciclina ser um antibiótico bacteriostático (Bové, 2006). Programas de melhoramento nutricional foram estudados para o controle de *Ca. Liberibacter asiaticus* na Flórida, EUA, e no Brasil. Entretanto, o uso destes suplementos nutricionais não foram capazes de reduzir a população bacteriana em plantas de citros infectadas e nem reestabelecer a produtividade dos pomares cítricos (Gottwald et al., 2012; Bassanezi et al., 2013).

Há uma constante busca por medidas de controle para o HLB. Nos últimos anos, um grande número de estudos tem mostrado a possibilidade da utilização de agentes biológicos no controle de doenças de plantas (Wilson, 2004; Wilson and Backman, 1999; Castaño, 2013). Além disso, vários mecanismos de ação envolvendo microrganismos antagonistas tem sido descritos para controlar o desenvolvimento de patógenos, como por exemplo, antibiose, competição por espaço e nutrientes, interação direta com o patógeno e indução de resistência (Orietta Fernandez-Larrea, 2001).

Entre as principais estratégias no controle de fitopatógenos destaca-se a ativação das defesas naturais da planta, por meio da indução de resistência sistêmica adquirida (IRSA) (Louws et al., 2001). Moléculas elicitoras podem ativar a resistência sistêmica, protegendo os tecidos da planta contra o ataque de uma ampla variedade de patógenos (Hammond-Kosack and Parker, 2003). A resistência

expressa pela planta está associada entre outros mecanismos ao aumento de atividade de proteínas relacionadas à patogênese (PR), sendo mediada por um processo dependente do ácido salicílico. Entre as PR proteínas, encontram-se hidrolases, como as β -1,3 glucanases (PR-2), que são capazes de inibir o crescimento de patógenos (Schlumbaum et al., 1986) e quitinases (PR-3) (Van Loon and Van Strien 1999).

Oliveira et al. (2011) relatam que o uso do composto semi purificado denominado de fração F3D produzido através do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) foi eficaz no controle de *Xanthomonas citri* pv. *citri*, agente causal do cancro cítrico. Vasconcellos et al. (2014) reportou uma diminuição de 80% no número de lesões causadas por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* em mudas de pessegueiro (*Prunus persica*) pelo uso do mesmo composto. Lopes et al. (2012) obtiveram um controle efetivo em mudas de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) tratadas em casa de vegetação com a fração F3D, em relação ao crestamento foliar causada por *Xanthomonas axonopodis*. Estes trabalhos sugerem que esta fração pode atuar tanto como um indutor de resistência, como também possuir um efeito de antibiose.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da fração F4A, análoga a fração F3D produzida pelo metabolismo secundário de *P. aeruginosa* (cepa LV) no controle de *Ca. Liberibacter asiaticus* em plantas de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Agente de biocontrole

O agente de biocontrole utilizado neste estudo foi *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV), isolada a partir de lesões de cancro cítrico em folhas de laranja coletadas em pomar no Município de Astorga, PR (Rampazo, 2004). A cepa foi isolada em meio de cultura acrescido de cloreto de cobre ($100 \mu\text{g mL}^{-1} \text{CuCl}_2$) de acordo com Cain et al. (2000) e mantida em glicerol 30% a -20°C .

2.2 Obtenção e extração de compostos bioativos

O processo de obtenção e extração dos compostos bioativos do metabolismo secundário de *P. aeruginosa* cepa LV, foram realizados de acordo com protocolo patenteado (Patente, 2008). O extrato bruto obtido foi fracionado por cromatografia de adsorção a vácuo, em coluna de vidro (20 mm Φ x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de vácuo 51 kPa. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm, Merck[®]), e como fases móveis foram utilizadas solventes orgânicos com polaridade crescente: hexano (100%), hexano/diclorometano (1:1) diclorometano (100%), diclorometano/acetato de etila (1:1), acetato de etila (100%), acetato de etila/metanol (1:1), metanol (100%), metanol/água (1:1) e água (100%) (Tabela 1). As frações obtidas foram concentradas e as propriedades físicas, tais como a aparência, cor, odor e solubilidade foram determinadas de acordo com os procedimentos padrão. O perfil químico cromatográfico foi determinado por cromatografia em camada delgada (CCD). Os resultados foram comparados com os obtidos por Oliveira et al. (2011) (Anexo 2). A fração F4A apresentou o mesmo perfil físico e cromatográfico encontrados por Oliveira et al. (2011). Portanto para este estudo a fração F4A foi utilizada em todos os experimentos.

2.3 Ensaio em casa de vegetação

Plantas de *Citrus sinensis* do cultivar Valência, enxertados em limão cravo, foram cultivadas em vasos com solo não esterilizado mantidos em casa de vegetação com temperatura entre 20 °C e 30 °C e fertilizadas quando necessário. O experimento foi realizado com mudas de aproximadamente dois anos de idade em blocos casualizados tendo como desenho experimental dois tempos de aplicação da fração F4A, denominados de preventivo e curativo, com três concentrações: 10 µg mL⁻¹; 100 µg mL⁻¹ e 1000 µg mL⁻¹. No tratamento preventivo, as plantas foram tratadas sete dias antes da inoculação, e no tratamento curativo, as plantas foram tratadas 30 dias após a infecção, todas as plantas foram tratadas pelo método de aspersão em folha até o ponto de escorrimento, e a aplicação da fração seguiu-se a cada 60 dias por um período de um ano tanto para o tratamento preventivo quanto para o tratamento curativo. Todas as plantas foram tratadas pelo método de aspersão e como controle negativo utilizou-se apenas água destilada.

Para cada tratamento, foram inoculadas sete plantas utilizando dois segmentos de borbulhas infectadas, enxertadas aproximadamente 5 cm acima da linha do porta enxerto em locais opostos ao da região principal do tronco. As borbulhas foram obtidas a partir de plantas em pomar, na cidade de Cambé -PR com aproximadamente 4 anos de idade, variedade Valência, PCR positivas para HLB e com sintomas da doença.

2.4 Análises moleculares das plantas de laranja tratadas com a fração F4A

2.4.1 Determinação da presença do *Ca. Liberibacter asiaticus* por PCR

O DNA total das plantas inoculadas e tratadas foi extraído quatro e oito meses após a inoculação, a extração foi realizada a partir da nervura central e pecíolo das folhas. (Murray and Thompson,1980).

Todas as amostras foram analisadas por PCR convencional para confirmação de presença ou ausência de plantas infectadas com *Ca. Liberibacter asiaticus* utilizando os primers RPLA2 (5' - TAT AAA GGT TGA CCT GAG TTT – 3') e RPLJ5 (5' – ACA AAA GCA GAA ATA GCA ACA – 3') que amplifica fragmento de 703 pares de bases (Hocquellet et al.,1999). As reações foram conduzidas em termociclador com desnaturação inicial de 30 seg a 94°C seguido de hibridação a 62°C por 30seg, extensão a 72°C por 1min seguido de 35 ciclos

2.4.2 Análise quantitativa de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (qPCR)

As reações de q-PCR foram conduzidas com primers e sonda específicos para *Ca. Liberibacter asiaticus*, baseado no rDNA 16S (Li et al., 2006) . As reações foram conduzidas em termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) no laboratório de pesquisa e diagnóstico do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), Araraquara, SP, utilizando o sistema Taqman de detecção.

As reações continham 10 µM de cada primer específico para *Ca. Liberibacter asiaticus*, 5 µM da sonda marcada com FAM (6-carboxy-fluorescein) na extremidade 5' e Quencher (BHQ)-1 na extremidade 3' (Applied Biosystems, Foster City, USA), 1X Path ID master mix (Applied Biosystems) e 300 ng do DNA genômico. As reações de qPCR foram realizadas em um volume final de 15 µL. As condições da PCR foram de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 95°C por 15 seg em 40 ciclos e

58°C por 60 seg (Li et al., 2006). Todas as reações foram feitas em duplicata, como controle negativo foi utilizado DNA de plantas de *C. sinensis* sadias e como controle positivo foi utilizado DNA de *Ca. Liberibacter asiaticus*, extraído de plantas de citros infectadas. Os valores de Ct foram utilizados para estimar o número de cópias de *Ca. Liberibacter asiaticus*.

A curva padrão foi determinada a partir dos produtos de amplificação da PCR do gene ribossomal 16S (rRNA) de *Ca. Liberibacter asiaticus*, utilizando os seguintes primers Oi1 (5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3') e Oi2C (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'). Os fragmentos de 1.200 pares de base (pb) gerados foram clonados no vetor pGEM-T (Promega), utilizando como transformante a cepa DH5α de *Escherichia coli*. Os plasmídeos das colônias transformantes (que continham o inserto 16S do rDNA de *Ca. Liberibacter asiaticus*) foram purificados utilizando PCR-Clean-Up System (Promega). A conversão do número de cópias do rRNA 16S foi realizada de acordo com Lopes et al. (2009). Para a construção da curva foram realizadas diluições em série dos plasmídeos conforme descrito por Lopes et al. (2013).

2.4.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o log do número de cópias de *Ca. Liberibacter asiaticus* por grama de tecido vegetal. Estes valores foram submetidos à análise de variância, seguido pelo teste de Dunnett para a comparação de médias. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Estatística 7.0.

2.5 Avaliação do potencial indutor de resistência da fração F4A em plantas de *citrus sinensis* por RT-qPCR.

2.5.1 Material vegetal e tratamentos

Para o monitoramento da expressão do gene *PR-2* que codifica a enzima β -1,3 glucanase realizou-se um novo experimento, as avaliações foram feitas em plantas de *C. sinensis* de aproximadamente 2 anos de idade enxertadas em limão cravo e mantidas em casa de vegetação, em triplicata com os seguintes tratamentos: (1) aplicação foliar da fração F4A na concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$, (2) Aplicação foliar da fração F4A na concentração de $100\mu\text{g mL}^{-1}$, (3) aplicação foliar da fração F4A na concentração de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, (4) aplicação via solo de acibenzolar-S-methyl (BION) na concentração de 200mg por planta e (5) Aplicação foliar de água destilada como controle negativo.

Duas folhas por planta foram coletadas, 24h, 7 dias e 15 dias após a aplicação dos produtos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração do RNA.

2.5.2 Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de duas folhas por planta em nitrogênio líquido e 200mg do tecido foi processado segundo o protocolo descrito por Chomczynski and Sacchi (1987) com algumas modificações.

2.5.3 Síntese de cDNA

Todas as amostras de RNA foram quantificadas em Nanodrop. A partir de 1 µg de RNA realizou-se a síntese da segunda fita (cDNA) utilizando-se a enzima M-MLV (Invitrogen) de acordo com as informações do fabricante.

2.5.4 RT-qPCR

A indução da RSA foi monitorada através dos níveis relativos de transcrição (mRNA) para o gene *PR-2*. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene β-1,3 glucanase de *Citrus sinensis* responsável pela síntese de proteínas relacionadas à patogênese (*PR-2*) e para o gene endógeno GAPDH-C gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que codificam proteínas “housekeeping”, de funções constitutivas a partir de seqüências já descritas por Francis et al., (2009).

Os níveis de transcrição foram detectados por Real Time de transcrição reversa (RT-qPCR) em aparelho LightCycler® Nano SW 1.0 (Roche), através do sistema SYBR® Green de detecção. Para cada reação foram utilizados 250 nm de cada primer, 10 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix (Invitrogen) e 1µL do cDNA em uma reação com volume final de 20µL. As condições da PCR foram de 95°C por 5 min, 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, em 40 ciclos e 72°C por 5 min.

Os níveis relativos de mRNA foram calculados de acordo com o tratamento controle e normalizados com o gene de referencia GAPDH-C. A quantificação relativa foi realizada utilizando o programa REST-2009 (Qiagen software) e a quantidade de gene alvo foi normalizada através da referência endógena e calculada utilizando o método comparativo $\Delta\Delta Ct$.

3 Resultados

3.1 *Determinação da infecção das plantas cítricas com base na reação da polimerase em cadeia (PCR) convencional*

Nas análises de PCR realizadas quatro meses após a infecção, o tratamento com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A mostrou-se mais efetivo em relação aos demais tratamentos na proteção das plantas cítricas, apresentando percentual de 14,2% de plantas com presença positiva para a bactéria do HLB no tratamento preventivo e de 0% no tratamento curativo. Em contraste, para os demais tratamentos com a fração F4A, a proporção de plantas infectadas variou de 28,5 a 42,8% e para a testemunha a variação foi de 42,8 a 71,4% de plantas infectadas (Tabela 2; Figura 1).

Após oito meses da infecção, uma nova extração de DNA foi realizada com o objetivo de identificar o progresso da infecção das plantas cítricas pela bactéria do HLB. Em análise por PCR convencional, o maior percentual de plantas infectadas foi observado nas plantas testemunhas do tratamento preventivo com um total de 71,4% de plantas positivas para *Ca. Liberibacter asiaticus* (Tabela 2).

3.2 *Análise quantitativa de Candidatus Liberibacter asiaticus por q-PCR*

As quantificações foram realizadas com base na curva padrão envolvendo os valores de Ct para as plantas que apresentaram resultado positivo para *Ca. Liberibacter asiaticus*. O início e o limite de detecção da fluorescência das amostras ocorreram entre os ciclos 17 e 33,2 (Figuras 2 e 3). Portanto, o valor de Ct 34,0, que corresponde ao log de 0,9 células foi utilizado como o limite

de detecção mais baixo para quantificação de *Ca. Liberibacter asiaticus*. Os valores de Ct (ciclo “Threshold” – piso de fluorescência) variaram de 17,5 a 37,3 entre as amostras de DNA das plantas de laranja analisadas. Os menores valores de Ct indicam uma maior quantidade do produto amplificado e consequentemente maior concentração bacteriana de *Ca. Liberibacter asiaticus*.

Com base na curva padrão estabelecida, foi possível estimar o número de cópias alvo das amostras analisadas. Os índices de eficiência da curva foram de 103%, apresentando-se dentro dos padrões aceitáveis (95% a 105%) e com uma correlação linear de $r^2 = 1$. Desta forma, os resultados mostraram que quatro meses após a inoculação, o tratamento curativo com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A apresentou redução de duas unidades logarítmicas na população de *Ca. Liberibacter asiaticus* nas plantas cítricas tratadas com essa fração quando comparada à população da bactéria presente nas plantas testemunhas (Tabela 3). Estes valores foram significativamente diferentes nas análises estatísticas ($p \leq 0.05$), indicando que este tratamento foi o mais efetivo no controle da doença. No entanto estes valores não foram consistentes nas avaliações realizadas oito meses após a inoculação (Tabela 3).

Por outro lado, os tratamentos com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A não apresentaram diminuição significativa na população de *Ca. Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas, tanto no tratamento preventivo quanto no tratamento curativo (Tabela 3).

3.3 Avaliação da atividade indutora de resistência da fração F4A em plantas de *Citrus sinensis* por RT-PCR.

Vinte e quatro horas após a aplicação da fração, a expressão do gene da β -1,3 glucanase foi nove vezes maior nas plantas tratadas com a concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A quando comparadas às plantas controle (Figura 4). Por outro lado, as plantas tratadas com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A e com o produto comercial BION não apresentaram diferenças significativas de expressão do gene *PR-2* em relação às plantas controle (Figura 4).

No entanto, os níveis de expressão do gene da β -1,3 glucanase nas plantas após o sétimo dia do tratamento apresentaram as maiores taxas de expressão para os tratamentos com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A, sendo este 14,7 e 12,9 vezes maior em relação às plantas controle, respectivamente (Figura 5). Os tratamentos com $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A e BION não apresentaram níveis significantes de expressão do gene em relação ao grupo controle (Figura 5). No décimo quinto dia após a aplicação dos tratamentos, apenas as plantas cítricas tratadas com BION apresentaram níveis significativos β -1,3 glucanase, sendo nestas 4,7 vezes maiores do que nas plantas do grupo controle (Figura 6).

4 Discussão

A incidência de fitopatógenos representa um grave problema para a agricultura, e a utilização de agentes de biocontrole como os microrganismos endofíticos tem mostrando alta capacidade de controle de doenças em plantas (Byrne et al., 2005; Mercado-Blanco et al., 2004; Roberts et al., 2005; Spadaro and Gullino, 2005). No entanto não há relatos sobre a utilização de microrganismos ou compostos metabólicos no controle de *Ca. Liberibacter* sp nem mesmo de agentes químicos.

A fração F4A não apresentou efeito fitotóxico e foi eficaz na redução populacional de *Ca. Liberibacter asiaticus* nos ensaios em casa de vegetação o qual reduziu significativamente o número de bactérias quando aplicado após a inoculação, esta fração em sua forma menos purificada já foi relatada por outros autores como um potente agente antimicrobiano frente a bactérias fitopatogênicas (Oliveira et al., 2011; Lopes et al., 2012; Vasconcellos et al., 2014). Estes estudos sugerem que esta fração além de ter um alto poder antibiótico poderia estar atuando também como um indutor de resistência em plantas devido a sua composição e seu perfil cromatográfico.

Plantas de laranja quando tratadas com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração F4A expressaram nove vezes mais o gene de resistência da β -1,3 glucanase após 24 h da aplicação, e ao sétimo dia as mesmas plantas apresentaram uma expressão 12,9 vezes maior em relação as plantas não tratadas (testemunhas) e as plantas tratadas com o indutor de resistência BION.

A aplicação de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ não apresentou níveis significativos de expressão gênica, em nenhum dos tempos analisados, sugerindo que a utilização de

altas dosagens da fração diminui a eficiência do composto de maneira significativa na indução de respostas de defesa das plantas assim como na atividade antibiótica (Oliveira et al., 2011).

Isolados de *Pseudomonas* sp., são frequentemente relatados como indutores de resistência sistêmica em culturas agrônomicas (Maurhofer et al., 1994, Van Loon et al., 1997). Nesse sentido, já foi comprovado que um isolado de *P. aeruginosa* (KMPCH) induziu resistência a *Botrytis cinerea* em tomate (Audenaert et al., 2002a).

Outro isolado (7NSK2) de *P. aeruginosa* produtor de três tipos de sideróforos, foi capaz de induzir resistência à *B. cinérea* em feijão e tomate (De Meyer and Höfte, 1997; De Meyer et al., 1999b; Audenaert et al., 2002b), a *Colletotrichum lindemuthianum* em feijão (Bigirimana and Höfte, 2002) e ao vírus do mosaico (TMV) em fumo (De Meyer et al., 1999a)..

A purificação parcial de elicitores obtidos a partir de extratos de cogumelo permitiram a Di Piero (2003) verificar uma redução na severidade da antracnose em plântulas de pepino. Frações oriundas da cromatografia de *Saccharomyces cerevisiae* foram testadas por Labanca (2002), induzindo resistência local em pepino contra *Coletothichum lagenarium*, e proporcionaram reduções de 50% a 70% nas áreas lesionadas.

O indutor de resistência BION foi eficaz na resposta de indução sistêmica em plantas tratadas e avaliadas após o décimo quinto dia da aplicação do composto, Francis et al. (2009) já relataram que a aplicação de Acibenzoar-S-methyl induziu o aumento da expressão de β -1,3 glucanase e reduziu o número de lesões de cancro cítrico em plântulas de *Citrumelo Swingle* em condições controladas.

A população de *Ca. Liberibacter asiaticus* revelada por q-PCR em plantas tratadas com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ após quatro meses de inoculação foi significativamente reduzida quando comparada com as plantas não tratadas (testemunhas). Estes resultados sugerem que o tratamento com esta dosagem pode atuar na redução bacteriana tanto por seu potencial indutor de resistência quanto por seu efeito antibacteriano, devido ao fato de *Ca. Liberibacter asiaticus* ser um fitopatógeno não cultivável não foi possível obter resultados mais precisos sobre o efeito da fração sobre o este fitofatógeno em ensaios *in vitro* como os observados por outros autores (Oliveira et al., 2011 ; Lopes et al., 2011; Vasconcellos et al., 2014).

Oliveira et al. (2011) relataram o controle de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) causadora do cancro cítrico, com o uso de uma fração análoga a fração utilizada no presente estudo denominada de F3D, e obtiveram uma diminuição de 93,5% no número de lesões do cancro cítrico além de grandes alterações morfológicas nas células de *Xcc*, dados semelhantes foram observados por Vasconcellos et al. (2014) onde mostraram uma diminuição de 80% no número de lesões foliares causadas por *X. arboricola* pv. *pruni* em mudas de pessegueiro com a aplicação da fração obtida pela cepa LV.

Os resultados indicam que a fração F4A foi eficaz na diminuição populacional da bactéria do Huanglongbing. Novamente esta fração confirma o seu efeito antibiótico no controle de bactéria Gram negativa em laranja demonstrando sua ação sistêmica na planta. Por outro lado, foi confirmado neste estudo que a fração F4A mostrou-se mais ativa na indução de resistência em laranja, do que o BION, produto amplamente utilizado na cultura de laranja.

Uma vez que há uma busca constante por controle do HLB e pomares afetados pela doença, esse trabalho vem oferecer uma possibilidade de controle. No entanto novos estudos devem ser conduzidos para elucidar eventuais questionamentos sobre a verdadeira ação dessa fração sobre *Ca. Liberibacter asiaticus* bem como na planta cítrica.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que possibilitaram a realização deste estudo concedendo bolsas de estudos. Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) pela colaboração na realização dos experimentos.

5 Referências bibliográficas

- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., Hofte, M., 2002a. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:1147-1156.
- Audenaert, K., De Meyer, G., Hofte, M., 2002b. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* 128:491-501
- Benhamou, N., Bélanger, R.R., 1998. Benzothiadiazole-Mediated Induced Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Tomato. *Plant physiology*, 118(4), 1203-1212.
- Borrero, C., Ordovás, J., Trillas, M.I., Avilés, M., 2006. Tomato Fusarium wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterised by Biolog R. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1631–1637.
- Borrero, C., Trillas, M.I., Avilés, M., 2009. Carnation Fusarium wilt suppression in four composts. *Eur. J. Plant Pathol.* 123, 425–433.
- Bové, Joseph M., 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology*, v. 88, n. 1, p. 7-37,.
- Bigirimana, J., Hofte, M., 2002. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. *Phytoparasitica* 30:159-168.
- Byrne, J.M., Dianese, A.C., Campbell, H.L., Cuppels, D.A., Louws, F.J., Miller, S.A., Jones, J.B., Wilson, M., 2005. Biological control of bacterial spot of tomato under

- field conditions at several locations in North America. *Biological Control* 32, 408–418.
- Cain, C.C., Henry, A.T., Waldo, R.H., Casida, L.J., Falkinham, J.O., 2000. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad spectrum antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4139-4141.
- Capoor, S.P., Rao, D.G., Viswanath, S.M., 1967. *Diaphorina citri* Kuway a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian Journal of Agricultural Science* 37:572-576
- Castaño, R., Borrero, C., Trillas, M.I., Avilés, M. 2013. Selection of biological control agents against tomato Fusarium wilt and evaluation in greenhouse conditions of two selected agents in three growing media. *Biological Control*, 58(1), 105-116.
- Coletta-Filho, H.D., Targon, M.L.P.N., Takita, M.A., De Negri, J.D., Pompeu Jr, J., Machado, M.A., Muller, G.W. 2004. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease*, 88 (12), 1382-1382.
- De Meyer, G., Audenaert, K., Hofte, M. 1999a. *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on salicylic acid but is not associated with PR1a gene expression. *European Journal of Plant Pathology* 105:513-517..
- De Meyer, G., Capiou, K., Audenaert, K., Buchala, A., Métraux, J.P., Hofte, M., 1999b. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway on bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:450-459.

- Jagoueix, S., Bové, J.M., Garnier, M., 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (3):379-386.
- Di Piero, Robson Marcelo., 2003. Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo (USP). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Francis, M. I., Redondo, A., Burns, J. K., Graham, J. H., 2009. Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *European journal of plant pathology*, 124 (2), 283-292.
- Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Ryals, J., 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal*, 10(1), 71-82.
- Garnier, M., Danel, N., Bové, J.M., 1984. The greening organism is a gram negative bacterium. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Proceedings of 9th Conference IOCV, Riverside: University of California. p.115-124
- Gottwald, T. R., Graham, J. H., Irey, M. S., McCollum, T. G., Wood, B. W., 2012. Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress q. *Crop Protection*, 36(7), 3e82.

- Hammond-Kosack, K.E., Parker, J.E. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: Fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr.Opin.Biotechnol.* 14:177-193.
- Hoffland, E., Hakulinen, J., Van Pelt, J.A., 1996. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology* 86:757-762.
- Jagoueix, S., Bové, J.M., Garnier, M., 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (3):379-386.
- Kawaradani, K.S., Morita, S., Tanaka, Y., 1994. The enzymes activities in eggplant infected with the soilborne diseases and application to diagnosis for diseases. *Annals of the Phytopathological Society of Japan, Tokyo*, v. 60, n.4, p. 507-513.
- Kupper, K.C., Gimenes-Fernandes, N., Goes, A.D., 2003. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia brasileira*, 28(3), 251-257.
- Labanca, Elaine Regina Godoy., 2002. Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*), 107 p. Dissertação- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Li, W., Hartung, J.S., Levy, L., 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66 (1), 104-115.

- Liu, L., Kloepper, J.W., Tuzun, S., 1995a. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:843-847.
- Liu, L., Kloepper, J.W., Tuzun, S., 1995b. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85:695-698.
- Liu, L., Kloepper, J.W., Tuzun, S., 1995c. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85:1064-1068.
- Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.F., Martins, E.C., Fassini, C.G., Sousa, M.C., Barbosa, J.C., and Beattie, G. A. C. 2013. 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. *Plant Disease*. 97:1563-1570.
- Lopes, L.P., Oliveira Jr, A.G., Beranger, J.P., Góis, C.G., Vasconcellos, F., Martin, J. A.S., Andrade, G., 2012. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. Against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. *Tropical Plant Pathology*, 37(4),233-238.
- Lopes, S.A., 2006. Situação do Huanglongbing no Estado de São Paulo. In: Zambolin, L and Bassanezi, R.B. (Eds). *Doenças quarentenárias dos citros*. Viçosa: UFV. p. 175-193.
- Louws, F.J., Wilson, M., Campbell H.L., 2001. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, v.85, n.5, p.481-488.

- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., M'etraux, J.P., D'efago, G., 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84: 139–146
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A., Jiménez-Díaz, R.M., 2004. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*. 30, 474-486.
- McClellan, A.P.D., Oberholzer, P.C.J., 1965. Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange. *South Africa Journal of Agricultural Science* 8:297-298.
- Oliveira, A.G., Murate, L.S., Spago, F.R., Lopes, L.D.P., Beranger, J.P.D.O., Martin, J.A.B.S., and Andrade, G., 2011. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv.citri 306 strain. *Biological Control*,56, 125-131.
- Patente (2008). Processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para o controle de doenças causadas por bactérias em plantas, #PI0803350-1 A2; setembro de 2008, <http://www.inpi.gov.br>.
- Ramamoorthy, V., Ragachander, T., Samiyappan, R., 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Plant and soil*, v. 239, n. 1, p. 55-68..
- Rampazo, L.G.L., 2004. Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na incidência de lesões foliares do cancro cítrico. Dissertação MS. Universidade Estadual de Londrina. Londrina PR.
- Roberts, D.P., Lohrke, S.M., Meyer, S.L.F., Buyer, J.S., Bowers, J.H., Baker, C.J., Li, W., Souza, J.T., Lewis, J.A., Chung, S., 2005. Biocontrol agents applied

- individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Prot.* 24, 141–155.
- Romeiro, R.S., Kimura, O., 1997. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Phytopathology* 145:495-498.
- Schlumbauam., Mauchf, Vogeliv., Boller, T. 1986. Plant chitinases are potent inhibitors offungal growth. *Nature, London* 324, 365-367.
- Spadaro, D., Gullino, M.L., 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Prot.* 24, 601–613.
- Teixeira, D.C., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., da Costa, P. I., Ayres, A. J., Bové, J., 2005. ‘Candidatus Liberibacter americanus’, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,55(5), 1857-1862.
- Van Loon, L.C., Van Strien, E.A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathology*.55, 85–97.
- Vasconcellos, F. C., Oliveira, A.G., Lopes-Santos, L., Cely, M.V.T., Simionato, A.S., Pistori, J.F., and Andrade, G. 2014. Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Agricultural Sciences*, 5, 71.
- Vega, Orietta Fernández-Larrea. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica)*, [En línea], p. 96-100.
- Wilson, M., Backman, P.A. 1999. Biological control of plant pathogens. In: Ruberson, J.R. (Ed.); *Handbook of Pest Management*. Marcel Dekker, NY,pp. 309-335.

Wilson, Mark. 2004. Management of bacterial diseases of plants: Biological control.

In: Encyclopedia of Plant and Crop Science, p. 1-3.

Yamamoto, P.T., Felipe, M.R., Garbim, L.F., Coelho, J.H.C., Ximenes, N.L.,

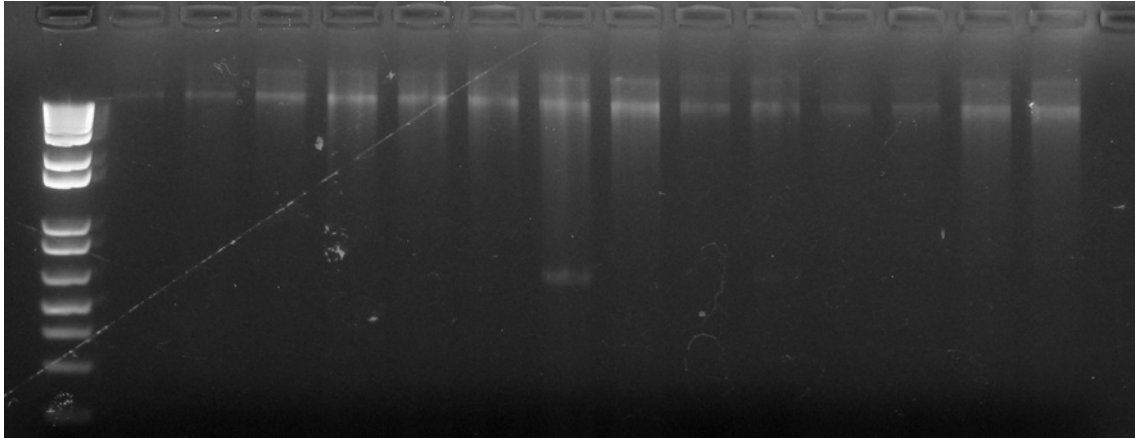
Martins, E.C., Leite, A.P.R., Sousa, M.C., Abrahao, D.P., Braz J.D., 2006.

Diaphorinacitri (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium

Candidatus Liberibacter americanus. In: Proceedings of the Huanglongbing-

Greening International Workshop, Ribeirão Preto, SP, Brazil. p.9

TABELAS E FIGURAS



M Tratamento preventivo Tratamento curativo
CP

Figura 1 - Gel de agarose de produtos da PCR de plantas cítricas tratadas com $100 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ da fração F4A após 120 dias de inoculação utilizando os primers A2/J5, que amplificam fragmento de 703 pares de base. M= marcador molecular 1kb Plus. CP= controle positivo.

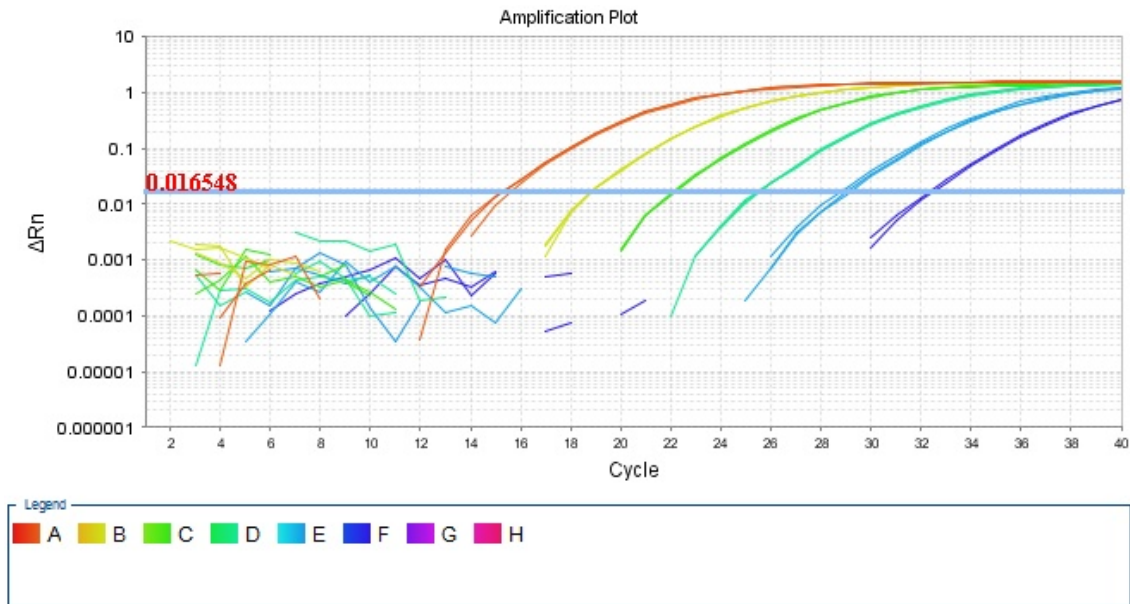


Figura 2 - Curva padrão obtida através de diluições seriadas de plasmídios contendo gene de *Ca. Liberibacter asiaticus* através do método Taqman de detecção com o par de primers HLBas/ HLB e a sonda HLBp. A partir do ciclo 33,2 não foi possível obter detecção dos alvos.

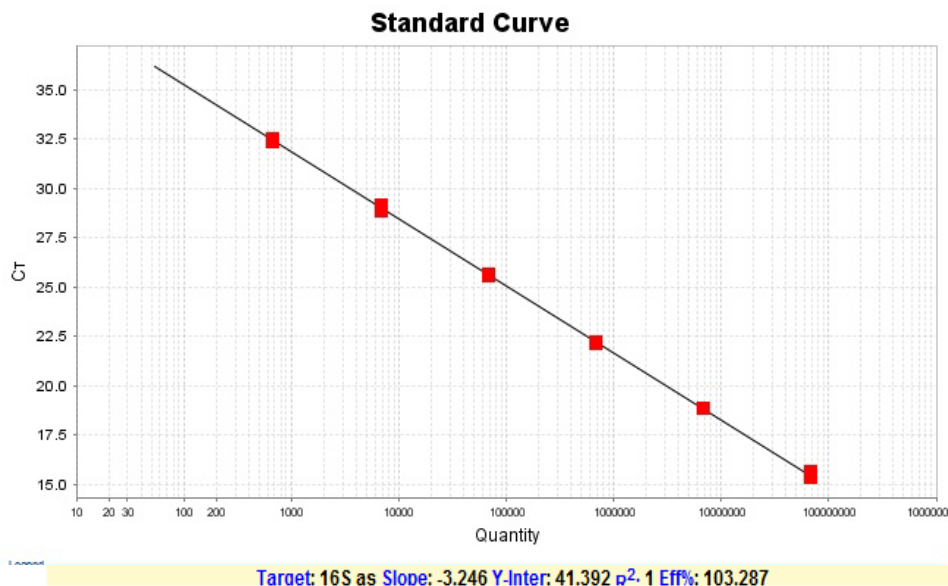


Figura 3 - Curva padrão utilizada para quantificação do DNA de *Ca. Liberibacter asiaticus* com o par de primers HLBas/ HLB e a sonda HLBp, obtida através da diluição em série dos plasmídeos contendo a sequência alvo do amplicon.

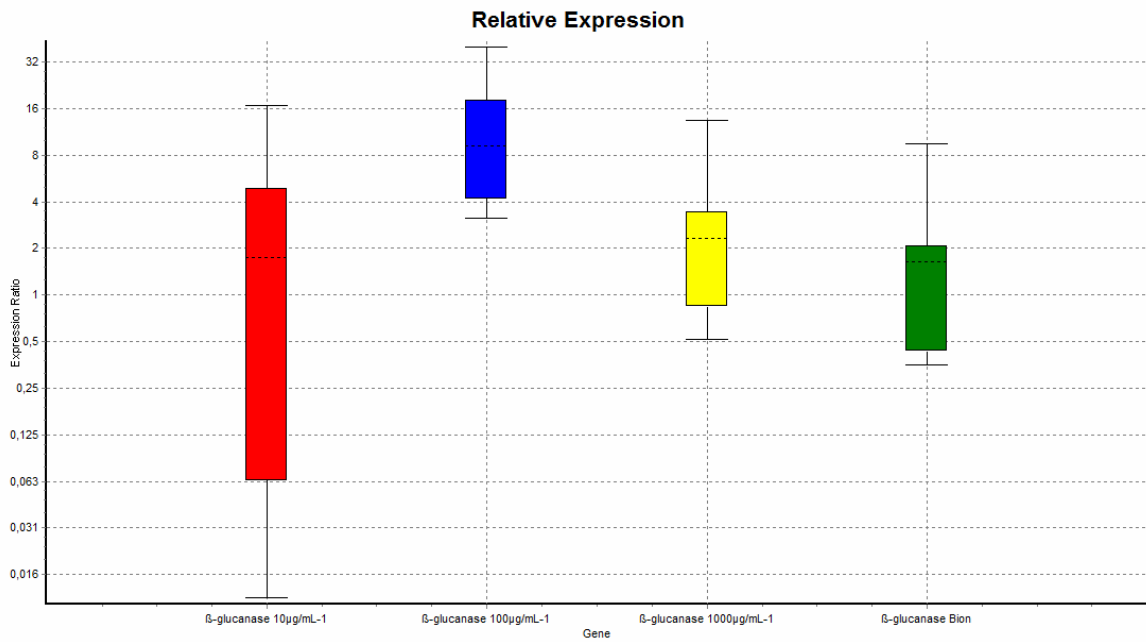


Figura 4 - Expressão relativa do gene *PR2* (β -1,3 glucanase) em folhas de *Citrus sinensis* 24h após a aplicação da fração F4A. A expressão relativa do gene foi calculada de acordo com o método $\Delta\Delta C_t$. Os valores representam a média de três repetições biológicas para cada tratamento. Os tratamentos foram: aplicados via foliar para a fração F4A nas concentrações de 10 μ g/mL⁻¹, 100 μ g/mL⁻¹ e 1000 μ g/mL⁻¹. O produto acibenzolar-S-methyl (ASM) foi aplicado via solo na doseagem de 200 mg/planta.

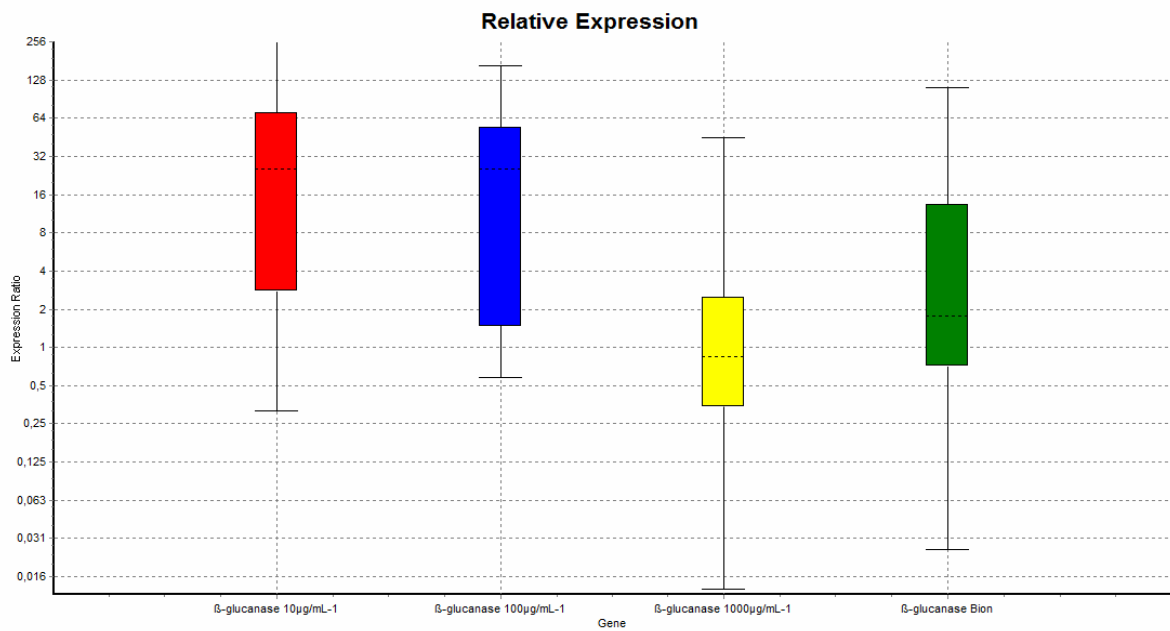


Figura 5 - Expressão relativa do gene *PR-2* (β -1,3 glucanase) de folhas de *Citrus sinensis* 7 dias após das aplicação dos compostos. A expressão relativa do gene foi calculada de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$. Os valores representam a média de três repetições biológicas para cada tratamento. Os tratamentos foram aplicados via foliar para a fração F4A, nas concentrações de 10 μ g mL⁻¹, 100 μ g mL⁻¹, 1000 μ g mL⁻¹, e via solo acibenzolar-S-methyl (ASM) na dosagem de 200 mg/planta.

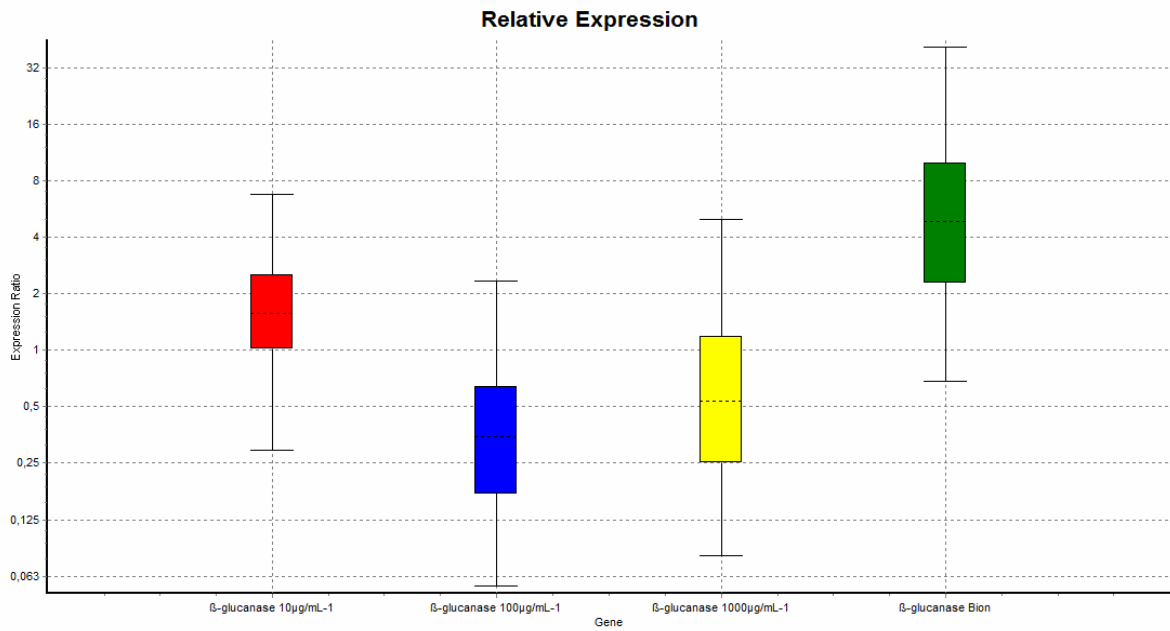


Figura 6 - Expressão relativa do gene *PR-2* (β -1,3 glucanase) em folhas de *Citrus sinensis* 15 dias após a aplicação dos produtos. A expressão relativa do gene foi calculada de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$. Os valores representam a média de três repetições biológicas para cada tratamento. Os tratamentos foram aplicados via foliar para a fração F4A, nas concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, e via solo acibenzolar-S-methyl (ASM) na dosagem de 200 mg/planta.

Tabela 1 - Frações obtidas a partir da cromatografia líquida a vácuo com solventes orgânicos em ordem de polaridade crescente.

| Frações | Volume | Solvente orgânico |
|----------------|---------------|--------------------------------------|
| F1A/F1B | 200ml/200ml | hexano |
| F2A/F2B | 200ml/200ml | hexano /diclorometano (1:1) |
| F3A/F2B | 200ml/200ml | diclorometano |
| F4A/F4B | 200ml/200ml | diclorometano/acetato de etila (1:1) |
| F5A/F5B | 200ml/200ml | acetato de etila |
| F6A/F6B | 200ml/200ml | acetato de etila/metanol (1:1), |
| F7A/F7B | 200ml/200ml | metanol |
| F8A/F8B | 200ml/200ml | Metanol/água destilada (1:1) |
| F9A/F9B | 200ml/200ml | água destilada |

Tabela 2 - Avaliação da presença de plantas cítricas com resultado positivo para *Ca. Liberibacter asiaticus* em teste de PCR convencional aos 120 e 240 dias após a inoculação. .

| Tratamentos | Preventivo Las+ | | Curativo Las+ | |
|-------------|-----------------|-----------|---------------|-----------|
| | DAI 120 | 240 | DAI 120 | 240 |
| Testemunha | 5 (71,4%) | 5 (71,4%) | 3 (42,8%) | 4 (57,1%) |
| 10 | 2 (28,5%) | 4 (57,1%) | 2 (28,8%) | 2 (28,8%) |
| 100 | 1 (14,2%) | 4 (57,4%) | 0 (0%) | 3 (42,8%) |
| 1000 | 2 (28,5%) | 5 (71,4%) | 3 (42,8%) | 3 (42,8%) |

DAI, dias após a inoculação ; Las,+ indica o número de plantas positivas para *Ca. L. asiaticus* na PCR e %, a porcentagem de plantas Las +. Todos os tratamentos continham sete plantas.

Tabela 3 - População estimada de *Ca. Liberibacter asiaticus* por PCR quantitativo (q-PCR) e número de células bacterianas expresso em Log₁₀.

| Avaliação após a inoculação (dias) | Preventivo | | Curativo | |
|---|-------------|------------------------|-------------|------------------------|
| | qPCR+/total | log ₁₀ ± EP | qPCR+/total | log ₁₀ ± EP |
| 120 | | | | |
| Testemunha | 5/7 | 4,28 ± 1,28b | 6/7 | 4,81 ± 1,63a |
| 10µg mL ⁻¹ | 5/7 | 4,19 ± 1,57b | 7/7 | 5,99 ± 0,82a |
| 100µg mL ⁻¹ | 4/7 | 5,29 ± 1,26b | 5/7 | 2,66 ± 0,11b |
| 1000µg mL ⁻¹ | 4/7 | 6,62 ± 0,77a | 7/7 | 5,16 ± 1,28a |
| 240 | | | | |
| Testemunha | 6/7 | 5,26 ± 1,54a | 5/7 | 6,10 ± 0,50a |
| 10µg mL ⁻¹ | 7/7 | 5,97 ± 1,34a | 5/7 | 4,62 ± 1,50a |
| 100µg mL ⁻¹ | 5/7 | 5,75 ± 1,58a | 6/7 | 4,71 ± 1,63a |
| 1000µg mL ⁻¹ | 7/7 | 5,76 ± 1,43a | 6/7 | 5,35 ± 1,43a |

As médias foram calculadas apenas para as amostras positiva (qPCR +) na reação em cadeia da polimerase quantitativa. Médias ($n=7$), valores seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes a $P \leq 0.05$ de acordo com o teste de *Dunnett*. Letra (a) indica maior população bacteriana e letra (b) menor população bacteriana.

ANEXOS

ANEXO A



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0803350-1 A2**

(22) Data de Depósito: 10/09/2008
(43) Data da Publicação: 15/06/2010
(RPI 2058)



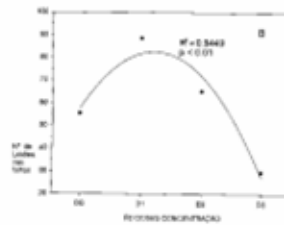
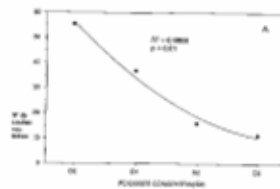
(51) *Int.Cl.:*
C12P 1/04
A01N 63/02
C12R 1/01

(54) **Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES ANTIBIÓTICAS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS CAUSADAS POR BACTÉRIAS EM PLANTAS**

(73) Titular(es): Universidade Estadual de Londrina

(72) Inventor(es): Galdino Andrade Filho

(57) **Resumo:** A presente invenção trata-se de um processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para controle de doenças causadas por bactérias em plantas, uma vez que as formas atuais de controle não atuam efetivamente nas doenças e podem contaminar o ambiente pelo uso de metais pesados. Diante disso, vários experimentos foram conduzidos no sentido de avaliar os resultados da ação antibiótica de compostos produzidos por um isolado de bactéria gram negativa no crescimento da *Xac* in vitro, e na formação de lesões em folhas de Plantas diversas, uma vez que oferecem controles mais efetivos no aparecimento de doenças biológicas, maior segurança com o meio ambiente e menor custo de produção.



Inclusão de processo de patente (20/11/2011)

Título: Processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para o controle do cancro cítrico.

Titular: Universidade Estadual de Londrina

Inventores: Galdino Andrade

João Carlos Palazzo de Mello

Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

Campo da Invenção

A presente invenção trata-se de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por bactérias Gram negativas compreendendo substâncias bioativas para controle microbiológico, em especial para controle de bactérias do gênero *Xanthomonas* spp. e para o agente causal do cancro cítrico *Xanthomonascitripv. citri* (sinônimo *X. axonopodispv. citri*) (Schaad et al., 2005), uma vez que as formas atuais de controle não atuam efetivamente na doença e ou podem contaminar o ambiente pelo uso de metal pesado.

A presente invenção descreve ainda um processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antimicrobianas, além de prover métodos de controle destes microrganismos.

Antecedentes da Invenção

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

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

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

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

Outra estratégia que pode ser utilizada no controle do cancro cítrico é o controle utilizando metabólitos bacterianos com atividade antibiótica, produzidos a partir de bactérias antagonistas, produtos já utilizados com sucesso em outras culturas (Kloepper et al., 1999). Estes microrganismos competem entre si inter e intra-especificamente dentro dos nichos nos quais vivem, sendo uma das formas de adquirirem maior competitividade (Andrade, 2004).

A presente invenção tem como proposta a produção e purificação de substâncias tendo como resultado a atividade antimicrobiana de compostos produzidos por isolados de bactérias Gram negativas no controle do crescimento da *Xcc* *in vitro*, e na formação de lesões de cancro cítrico em folhas de *Citrus* spp.

Diante disso a presente invenção difere dos outros produtos já existentes do mercado, visto ser um produto microbiano altamente ativo contra bactérias do gênero *Xanthomonas* em especial a *Xcc* e, além disso, o processo de obtenção dos compostos com atividade antimicrobiana é de simples e fácil execução. Sendo assim, os consumidores terão um produto mais eficiente, de baixo custo, altamente ativo e inócuo a saúde e ao ambiente.

A literatura patentária descreve alguns documentos relacionados à presente invenção.

O documento WO 99/63830 descreve um agente biológico e um método para inibir patógenos de plantas. Nesse documento é citado o uso de *Pseudomonasresinovorans* para o controle biológico de patógenos. Também é descrita a possibilidade de uma combinação biológica entre esse agente biológico e outro agente. Esses agentes biológicos realizam o controle dos patógenos competindo com os mesmos em seu habitat natural e podem ser utilizados em larga escala.

A presente invenção difere desse documento no tocante a não se tratar de um agente biológico, mas sim, de um produto semi-purificado do metabolismo microbiano usado para inibir patógenos de plantas.

Sumário da Invenção

Em primeiro aspecto, a presente invenção descreve o processo de produção, extração e semi-purificação de compostos antimicrobianos de bactérias Gram negativas além de descrever formas de controle microbiológico.

É, portanto um objeto da presente invenção um processo de produção, extração e semi-purificação de compostos antimicrobianos com atividade antimicrobiana compreendendo as etapas de:

- a) Preparo de um inóculo de bactérias gram-negativas e indução da produção de compostos antimicrobianos *in vitro* em meio líquido e em aerobiose;
- b) Extrair os compostos com atividade antimicrobiana com solvente orgânico;
- c) Fracionamento da fase orgânica diclorometano (FD) em uma coluna de gel de sílica;
- d) Refracionamento das frações obtidas em c) em uma coluna de gel de sílica.

- e) Formas de controle microbiológico com o uso das frações obtidas nesta invenção.

Descrição detalhada da invenção

Produção e extração das substâncias antibióticas

O inóculo utilizado para a produção de metabólitos secundários com atividade antibiótica foi obtido a partir de cultura de bactérias Gram negativas na fase de crescimento acelerado ou exponencial (fase log), com 10^8 UFC mL⁻¹ (D.O.= 0.9, λ = 590 nm), sendo retirada uma alíquota de 50 a 150 μ L desta suspensão e inoculada em caldo nutriente adicionado de cloreto de cobre a uma concentração cerca de 10 a cerca de 1000 mg/L, e incubada a uma temperatura cerca de 20°C a cerca de 37 °C durante cerca de 5 a cerca de 15 dias sob agitação mecânica em agitador horizontal com velocidade de cerca de 50 a cerca de 500 rpm. Após o cultivo, as células foram peletizadas por centrifugação (5.000 a 15.000 rpm por 5 a 60 min, a temperatura entre 2 e 10 °C). O sobrenadante livre de células foi lavados com diclorometano com cerca de 1 : 1 a cerca de 1 : 10 (v : v) por partição líquido-líquido em funil de separação. Para cada separação, este procedimento foi repetido cerca de 1 a cerca de 30 vezes, deixando em repouso por cerca de 1 a cerca de 30 min cada. A fase diclorometano (FD) obtida na partição foi concentrada em rotavapor a uma temperatura de cerca de 30 °C a cerca de 50 °C, em seguida, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada. Nesta modalidade, o composto antibiótico FD da presente invenção rende cerca 0.1 g a cerca de 0.5 g para cada 15 L de sobrenadante.

Purificação das substâncias antibióticas por cromatografia em coluna

A FD foi fracionada através de cromatografia em coluna de vidro (20 mm Φ x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de vácuo. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm), e como fases móveis solventes orgânicos com polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, metanol e água destilada na razão 1 : 1 (v : v) e água destilada. Para cada solvente foi utilizado um volume máximo de 500 mL. Nesta modalidade foram obtidas 6 frações: (F1) fração hexano; (F2) fração diclorometano; (F3) acetato de etila; (F4) metanol; (F5) metanol e água destilada e (F6) água destilada. As frações foram concentradas em rotavapor e congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

A fração F3 obtida (fração com maior atividade antibiótica monitoradas por bioautografia em cromatografia em camada delgada e em método de disco difusão) foi submetida a uma nova cromatografia em coluna.

Uma alíquota da fração F3 foi fracionada utilizando a mesma coluna e a mesma bomba de vácuo. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm), e como fases móveis foram utilizadas solventes orgânicos com polaridade crescente: (hexano (100; F3a), hexano/diclorometano (1 : 1; F3b) diclorometano (100; F3c), diclorometano/acetato de etila (1 : 1; F3d), acetato de etila (100; F3e), acetato de etila/metanol (1 : 1; F3f), metanol (100; F3g), metanol/água (1 : 1; F3h) e água (100; F3i). As frações foram concentradas em rotavapor e congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

Experimentos realizados

Ensaio in vitro

Para avaliar e quantificar a atividade e potencial das frações com atividade antibiótica foi utilizado a técnica de difusão em disco seguindo as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) onde foi quantificado o tamanho do halo de inibição formado. Os discos foram preparados com diferentes concentrações de cada fração (FD; F1; F2; F3; F4; F5; F6) nas concentrações 100, 1000 e 10.000 µg/disco e (F3a; F3b; F3c; F3d; F3e; F3f; F3g; F3h; F3i) nas concentrações 100 e 1000 µg/disco) para a bactéria *Xcc* cepa 306 (*Xcc* 306) e as concentrações 250 e 500 µg/disco para 59 **isolados clínicos multirresistentes de bactérias produtoras de carbapenemase**. Todos os experimentos foram realizados com três repetições em três experimentos distintos.

Depois de secar os discos com cada fração ou controle de solvente (solventes utilizados no processo de extração para cada fração) foram colocados na superfície do meio de cultura acrescido da suspensão de bactéria e foi incubado por 24 horas a 28 °C para a *Xcc* 306 e por 18 h a 37 °C para os isolados clínicos de KPC. Os halos formados foram mensurados em milímetros.

Ensaio in vivo

As plantas de *Citrus* foram cultivadas em vasos de 3 L com solo não estéril (Rhodic Ferralsol) (FAO, 1994) mantidos em casa de vegetação (28 °C/22 °C e 10 h/14 h dia/noite, umidade relativa de 80%). A cada 15 dias foram adicionados 150

mL de solução nutritiva de Hewitt para não leguminosas (Hewitt, 1966) e regadas conforme a necessidade com água de torneira.

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

O segundo experimento também foi em blocos casualizados e teve o seguinte desenho experimental: 2 tempos de aplicação (pré e pós), 4 concentrações da F3, 5 repetições (2 x 4 x 5, n = 50), e dois controles positivos com *Xcc* 306 e água destilada para o pré e pós-tratamento com 5 plantas cada. O procedimento realizado neste experimento foi o mesmo adotado no primeiro experimento, com exceção do composto antibiótico que foi a F3 com as seguintes concentrações (10.000, 1.000,

100, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O número de lesão dos experimentos foi determinado após 21 dias da aplicação. O número de lesão por folha foi avaliada a partir da contagem das lesões em 18 folhas coletadas de cada repetição por tratamento e os dados submetido à análise estatística por regressão ($p < 0.01$).

O terceiro experimento também foi em blocos casualizados com o seguinte desenho experimental: dois tempos de aplicação (pré e pós), três concentrações da fração F3d, cinco repetições, e dois controles (positivo com Xcc 306 e água destilada e negativo somente com água destilada com cinco plantas cada. O procedimento realizado neste experimento foi o mesmo adotado no primeiro experimento, com exceção do composto antibiótico que foi a F3d com as seguintes concentrações (1, 10, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O número de lesão dos experimentos foi determinado após 21 dias da aplicação. O número de lesão por folha foi avaliada a partir da contagem das lesões em 18 folhas coletadas de cada repetição por tratamento e os dados submetido à análise estatística por regressão ($p < 0.01$).

Resultados

Na avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar da FD e das frações F1; F2; F3; F4; F5 e F6, a FD apresentou halos de inibição frente a Xcc 306. No entanto somente a F3 mostrou ter efeito semelhante à FD formando halos de inibição de crescimento com diâmetro aproximados, 42 e 38.5 mm na concentração de 10.000 $\mu\text{g}/\text{disco}$. As frações F1, F2 e F4 apresentaram menor atividade antibiótica com halos de inibição de 13, 12.5 e 10 mm respectivamente. Na F1, a concentração 1000 $\mu\text{g}/\text{disco}$ apresentou o mesmo efeito encontrado na 10.000 $\mu\text{g}/\text{disco}$ (Tabela 1). A fração F3d apresentou uma alta atividade antibiótica contra a Xcc 306, com halos de

inibição com diâmetro de 42 e 38.5 mm nas concentrações de 1000 e 100 µg/disco (Tabela 2).

Nos ensaios para os isolados clínicos de cepas multi-resistentes de KPCs, a fração F3 apresentou uma boa atividade antibiótica contra 65% das cepas multi-resistentes testadas de KPC na concentração de 250 µg/disco, com halos em média de 12 mm de diâmetro, e 89% na concentração 500 µg/disco, com halos em média com 14 mm de diâmetro.

Nos três experimentos *in vivo* realizados, foi avaliado o efeito antibiótico na formação de lesão de cancro cítrico nas folhas.

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

No segundo experimento, onde foi aplicado a F3 obtida na CLV a partir do tratamento da FD com acetato de etila, no pré-tratamento, todas as concentrações diminuíram o número de lesão e a dose-efeito na regressão foi significativa ($r^2 = 0.8037$, $p < 0.01$). As plantas tratadas com a D1, D2 e D3 diminuíram em aproximadamente 65 % no número de lesão e as plantas tratadas com a D4 o

número de lesão foi reduzido em 92 %, quando comparado com as plantas controle (Figura 2A). As plantas tratadas com a F3 no pós-tratamento a correlação dose-efeito também foi significativa ($r^2 = 0.9938$, $p < 0.01$), onde todas as concentrações diminuíram o número de lesão, no entanto o efeito na formação de lesão foi diferente, quando comparada ao controle a D1 diminuiu em 42.4%, a D2 79,8%, a D3 87.7% e a mais efetiva foi a D4 com 93.5% (Figura 2B).

A FD na concentração D3 do pré-tratamento diminuiu aproximadamente 80% no número de lesões foliares, por outro lado, no pós-tratamento os efeitos observados foram diferentes. A D1 estimulou o número de lesões e a D2 não teve efeito tendo aproximadamente o mesmo número de lesões do controle. Mesmo a D3 que apresentou melhor controle, a sua eficiência diminuiu bastante, pois a redução no número de lesões foi somente de 30% em relação ao controle. Isto demonstra que a forma de tratamento com a FD tem efeitos diferentes no controle das lesões o que é reforçado pelo fato de ambos os modelos apresentarem diferenças significativas na correlação dose-efeito e um alto valor de regressão (r^2). Na F3 no pré-tratamento todas as doses tiveram um grande efeito inibitório no número de lesão, sendo a mais efetiva a menor dose a D4 e no pós-tratamento o efeito observado foi menor do que no pré-tratamento, sugerindo que apesar de não ocorrer o estímulo na formação de lesão como na FD, o efeito observado foi menor do que no pré-tratamento. Isto significa que o tempo de aplicação é um importante fator na relação dose-efeito.

Portanto, atividade das substâncias antibióticas produzida pela cepa LV tem efeito inibitório na formação de lesões foliares do cancro cítrico. Este efeito é um resultado bastante importante na obtenção de novos produtos industriais para o controle efetivo das bactérias fitopatogênicas causadas por bactérias em citros, diminuindo assim, os prejuízos causados por estes microrganismos na citricultura mundial.

Tabela 1: Avaliação da ação antibiótica por difusão em ágar da fase diclorometano (FD), fração hexano (F1), fração diclorometano (F2), fração acetato de etila (F3), fração metanol (F4), fração metanol e água (F5) e fração água (F6), frente à *Xcc306*

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

(-) sem formação de halos de inibição

Tabela 2: Avaliação da atividade antibiótica das frações obtidas por CLV, por difusão em agar frente à *Xcc* 306.

| Amostras | Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Diâmetro do halo (mm) |
|----------|--|-----------------------|
| F3a | 100 | - |
| | 1000 | - |
| F3b | 100 | - |
| | 1000 | - |
| F3c | 100 | - |
| | 1000 | - |
| F3d | 100 | 35 |
| | 1000 | 42 |
| F3e | 100 | - |
| | 1000 | - |
| F3f | 100 | - |
| | 1000 | - |
| F3g | 100 | - |
| | 1000 | - |
| F3h | 100 | - |
| | 1000 | - |
| F3i | 100 | - |
| | 1000 | - |

F3a- Extraído com hexano (100), F3b- Extraído com hexano/diclorometano (1:1;), F3c- Extraído com diclorometano (100), F3d- Extraído com diclorometano/acetato de etila (1:1), F3e- Extraído com acetato de etila (100), F3f- Extraído com acetato de etila/metanol (1:1), F3g- Extraído com metanol (100), F3h- Extraído com metanol/água (1:1), F3i- Extraído com água (100). (-) sem formação de halos de inibição.

FIGURA 1

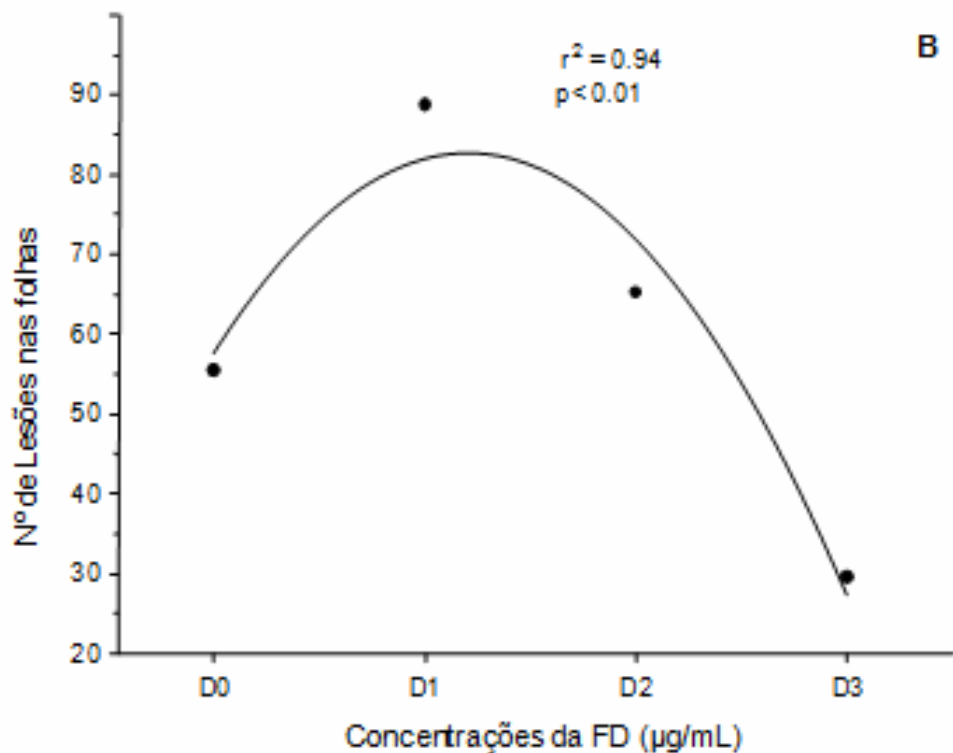
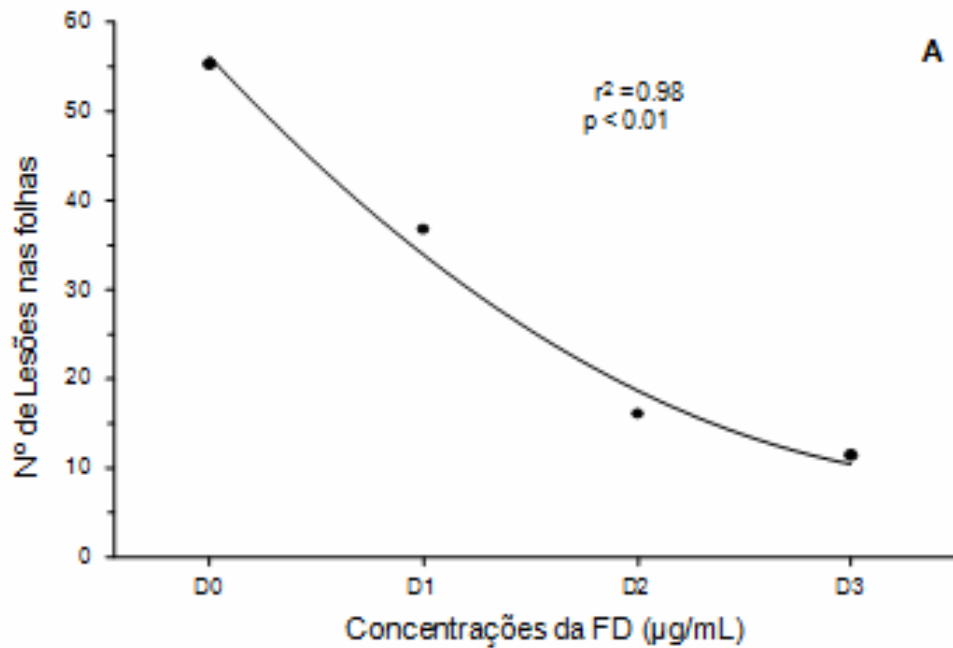


Figura 1: Regressão ($p < 0.01$, $n = 40$) dose-efeito da aplicação de três doses da fase diclorometano (D0 = água destilada, D1 = $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, D2 = $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, D3 = $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *X. citripv. citricepa* 306 em plantas de *Citrus sinensis* cv. Valência após 21 dias da aplicação. (A) Pré-tratamento. (B) Pós-tratamento.

FIGURA 2

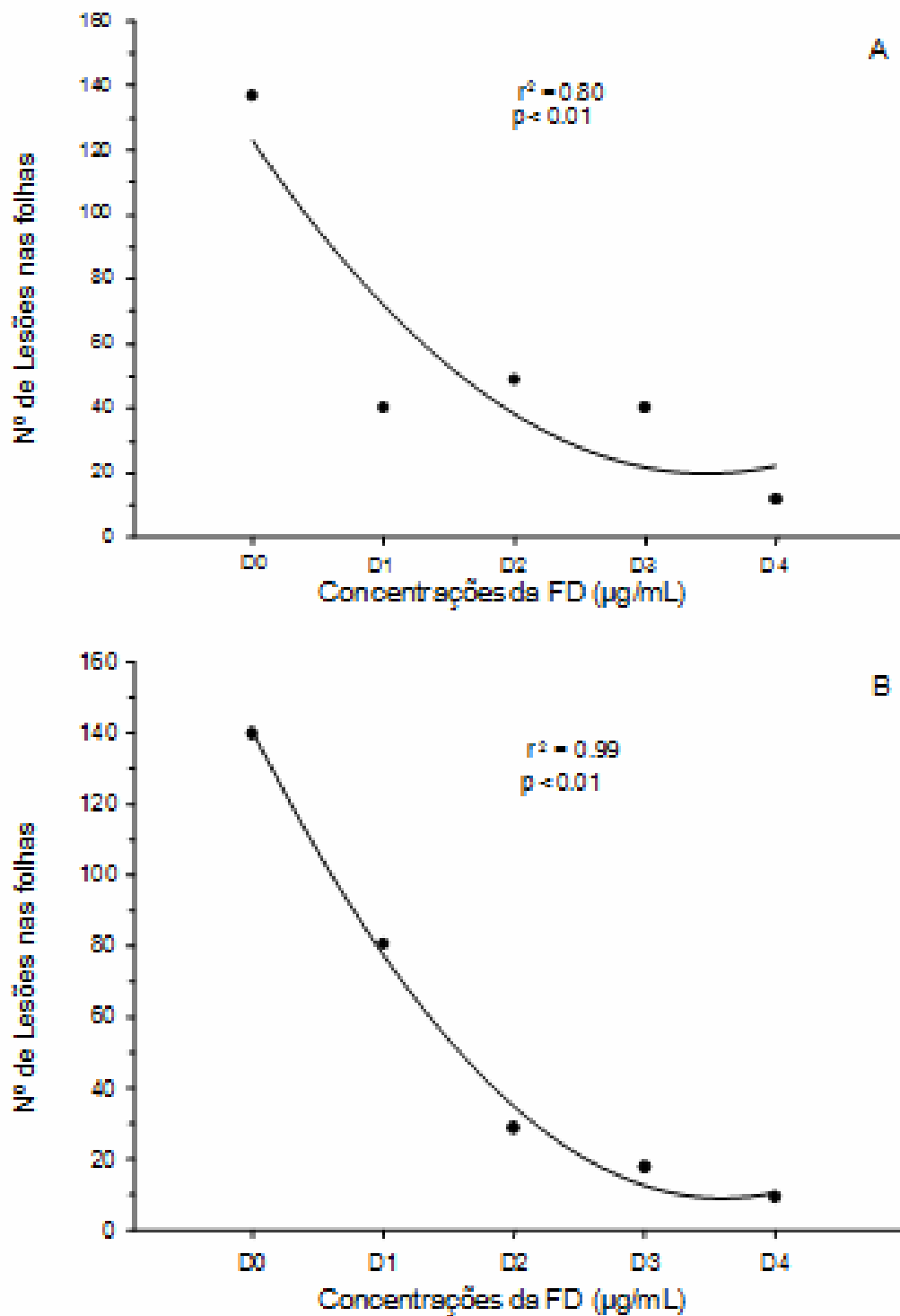


Figura 2: Regressão ($p < 0.01$, $n = 50$) dose-efeito da aplicação de quatro doses da fração F3 obtida a partir do tratamento da fase FD com acetato de etila (D0=água destilada, D1=10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D2=1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D3=100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D4=10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *X. citripv. citricepa* 306 em plantas de *Citrus sinensis* cv. Valência após 21 dias de aplicação. (A) Pré-tratamento, (B) Pós-tratamento.

FIGURA 3

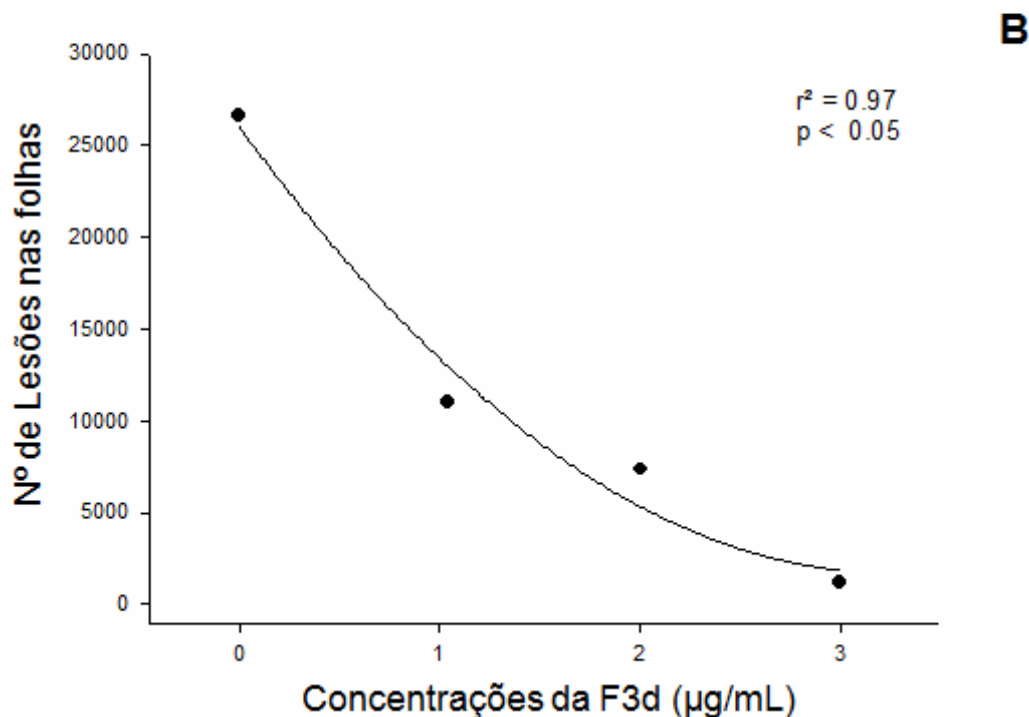
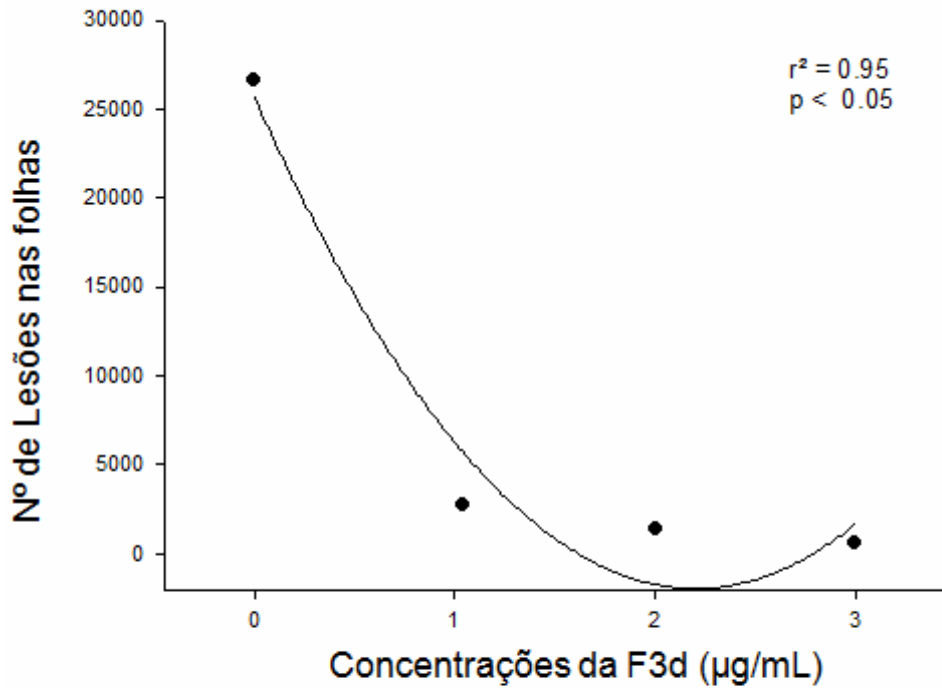


Figura 3: Regressão ($p < 0.01$, $n = 50$) dose-efeito da aplicação de três doses da fração F3d obtida a partir do fracionamento da facção F3 com acetato de etila/diclorometano 1:1 (v:v) onde (D0=água destilada, D1=1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D2=10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, D3=100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sobre o número de lesões foliares de cancro cítrico causado pela *X. citripv. citricepa* 306 em plantas de *Citrussinensis* cv. Valência após 21 dias de aplicação. (A) Pré-tratamento, (B) Pós-tratamento.

ANEXO B

Biological Control 56 (2011) 125–131



Contents lists available at ScienceDirect

Biological Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybcon

Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain

Admilton Gonçalves de Oliveira^a, Leticia Sayuri Murate^a, Flavia Regina Spago^a, Lucilene de Paula Lopes^a, Jamile Priscila de Oliveira Beranger^a, Juca Abramo Barrera San Martin^c, Marco Antonio Nogueira^a, João Carlos Palazzo de Mello^b, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade^c, Galdino Andrade^{a,*}

^a Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brazil

^b Departamento de Farmácia e Farmacologia, Laboratório de Produtos Fitoterápicos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, CEP 87020-900, Brazil

^c Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Microscopia e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86051-990, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2010

Accepted 19 October 2010

Available online 30 October 2010

Keywords:

Citriculture
Biological control
Citrus canker
Antibiosis
Ultrastructure

ABSTRACT

In this work, we evaluated the antibiotic activity of metabolites produced by the *Pseudomonas* sp. LV strain and their effects on the cell morphology of the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain (Xcc 306), which causes citrus canker lesions. The LV strain was cultivated, centrifuged, a cell-free supernatant was treated with dichloromethane and then concentrated, frozen in liquid nitrogen and lyophilized. The dichloromethane phase (DP) was fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) using six organic solvents with a crescent polarity. The antibiotic activity of the DP and all the fractions from VLC were tested against Xcc 306 and only the F3 fraction showed antimicrobial activity. The antibiotic activity of F3 was determined by minimum inhibitory concentration and the action on the cell morphology of Xcc 306 carried out in glass tubes with cell suspensions plus F3 solution sampled at three different times (one, three and six hours). The effects were analyzed by electron microscopy. Both the DP and F3 showed antibiotic activity against Xcc 306 in *in vitro* experiments. Electron microscopy showed that the F3 fraction completely disrupted the cell integrity after six hours. In a greenhouse experiment, the DP and F3 fraction (highly effective in *in vitro* experiments), reduced the formation of lesions by approximately 80% and 94%, respectively.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Citrus canker caused by *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc) is an important disease in citriculture in all producing countries (Stall and Civerolo, 1991; Kimati and Bergamin Filho, 1995; Gottwald et al., 2002). The symptoms consist of erumpent lesions on fruit, leaves and young stems, reducing fruit quality and production.

The control of bacterial pathogens is a serious problem in citriculture, and the management strategies include the use of disease-free seedlings, resistant cultivars, windbreaks to hinder inoculum dispersal, and bactericides containing copper (Schubert and Sun, 2003). But, these strategies are not always effective, especially when the environmental conditions are optimal for disease dissemination or inoculum density is high (Sahin and Miller, 1996).

The challenge is find a new control method which increases the effectiveness of citrus canker control in the orange orchard. At the moment, some alternatives methods should be named as follow, a

systemic acquired resistance inducers (van Loon et al., 1998), which has been used effectively against a number of bacterial plant diseases (Louws et al., 2001; Maxson-Stein et al., 2002; Pradhanang et al., 2005). Some compounds have already been tested but were not effective against citrus canker (Graham and Leite, 2004), thus, further studies are needed with new compounds.

Another strategy is the use of biological control agents, including antagonistic bacteria (Arya and Parashar, 2002; Wulff et al., 2002; Byrne et al., 2005), plant growth-promoting bacteria (Ji et al., 2006) and bacteriophages (Balogh et al., 2003, 2008), methods that were successfully used in the control of several pathogens and are also promising candidates for control of citrus canker. Studies of biological control on citrus canker are still in preliminary stages using many antagonistic bacteria strains such as *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola* and *Bacillus subtilis* isolated from citrus phylloplane were showed antagonistic effect *in vitro* against canker pathogen (Goto et al., 1979; Ota, 1983; Kalita et al., 1996). However, further studies needs to be performed in order to find an effective antagonist bacteria or antibiotic compounds produced by its secondary metabolism with an effective ability to control citrus canker.

* Corresponding author. Address: Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Brazil. Fax: +55 433371 4791.

E-mail address: andraged@uel.br (G. Andrade).