

DIFERENCIAÇÃO SEROLÓGICA ENTRE TRÊS PATOVARES
DE *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson
APLICANDO A TÉCNICA DO LINFONÓDULO E DA
SUSPENSÃO BACTERIANA

MAURO HIDEO SUGIMORI

Orientador: AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro, 1981

A meus pais,
minha irmã,
minha esposa
e meus filhos
Maurício
Denise

DEDICO.

A G R A D E C I M E N T O S

Nossos sinceros agradecimentos a todos que de algum modo contribuíram nas diferentes fases da realização do presente trabalho e em particular:-

- Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Departamento de Fitopatologia, por possibilitarem a realização do Curso de Pós-graduação e dessa pesquisa.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo, concedida durante a realização do curso.
- Professor Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, pelo auxílio, orientação, incentivo e revisão dos originais deste trabalho.
- Pesquisador Científico Dr. Osvaldo Paradela Filho, pelas sugestões, revisão dos originais e incentivo.
- Pesquisador Científico Dr. Jaciro Soave pelas sugestões e correção do "Summary".
- Pesquisador Científico Dr. Sérgio Almeida de Moraes pelas sugestões.
- Pesquisador Científico Júlio Rodrigues Neto pelo auxílio e incentivo.
- Estagiária Maria Adelaide Quaglio pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.
- Escriturária Maria Francisca da Silva e a Técnica de Laboratório Valdete Zorate dos Santos.

I N D I C E

	Página
RESUMO	iii
SUMMARY	iv
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Isolamento, purificação e conservação das bactérias	12
3.2. Preparo dos antígenos imunizantes	13
3.3. Preparo dos antissoros	14
3.4. Preparo dos antígenos para testes seroló- gicos	17
3.4.1. Suspensões bacterianas	17
3.4.2. Preparo dos extratos de exopolissa- carídeos	17
3.5. Testes serológicos	19
4 - RESULTADOS	22
4.1. Título dos antissoros	22
4.2. Testes com antissoros para <i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	23
4.2.1. Reações homólogas	25
4.2.2. Reações heterólogas	29
4.2.2.1. Antissoro <i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> (AS-Xmv-3139) contra o antígeno <i>X. campes-</i> <i>tris</i> pv. <i>manihotis</i> (AT-2833).	29

4.2.2.2. Antissoro <i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> (AS-Xmv-3139) contra o antígeno <i>X. campes-</i> <i>tris</i> pv. <i>phaseoli</i> (AT-3074).	32
4.3. Testes com antissoros para <i>X. campestris</i> pv. <i>manihoti</i>	32
4.3.1. Reações homólogas	36
4.3.2. Reações heterólogas	36
4.3.2.1. Antissoro <i>X. campestris</i> pv. <i>manihoti</i> (AS-Xm-2833) contra o antígeno <i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> (AT-3139)	36
4.2.2.2. Antissoro <i>X. campestris</i> pv. <i>manihoti</i> (AS-Xm-2833) contra o antígeno <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (AT-3074)	38
4.4. Testes com antissoros para <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	38
4.4.1. Reações homólogas	38
4.4.2. Reações heterólogas	41
4.4.2.1. Antissoro <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (AS-Xph-3074) contra o antígeno <i>X. campestris</i> pv. <i>malvacearum</i> (AT-3139)	41
4.4.2.2. Antissoro <i>X. campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> (AS-Xph-3074) contra o antígeno <i>X. campestris</i> pv. <i>manihoti</i> (AT-2833)	43
5 - DISCUSSÃO	44
6 - CONCLUSÕES	55
LITERATURA CITADA	57

DIFERENCIAÇÃO SEROLÓGICA ENTRE TRÊS PATOVARES
DE *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson
APLICANDO A TÉCNICA DO LINFONÓDULO E DA
SUSPENSÃO BACTERIANA

MAURO HIDEO SUGIMORI

Orientador: Avelino Rodrigues de Oliveira

RESUMO

Xanthomonas campestris pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* isoladas de algodão, mandioca e feijão, respectivamente, foram comparadas serologicamente. As bactérias cultivadas em BDA e incubadas a 28°C durante 48h, foram padronizadas fotometricamente a 50%T com filtro 578nm, emulsionadas em adjuvante completo FREUND e utilizadas como antígeno no preparo de antissoros específicos, através de duas injeções intraganglionares, intercaladas de 15 dias.

As suspensões bacterianas foram obtidas em água estéril, NaCl 0,85% e ácido acético 2%. Para extração do exopolissacarídeo dos isolados, utilizou-se solução fisiolôgi

ca estéril contendo 0,6% de formol neutro. Tanto as suspensões bacterianas como os extratos de exopolissacarídeos foram padronizadas a 5%T e utilizadas como antígeno para testes serológicos.

Injeções intraganglionares com antígenos concentrados produziram antissoros específicos logo após a realização das primeiras injeções.

Testes de dupla difusão em agar utilizados nas reações de antígenos e antissoros inter e intra-específicos, possibilitaram observar que *Xanthomonas campestris* patovares *malvacearum*, *manihotis* e *phaseoli* são serologicamente distintos. Nestes testes foram também observados o aparecimento de reações com uma, duas e até três linhas de precipitação, em cinco leituras num intervalo de 17 a 65h.

Os antígenos extraídos pela técnica do exopolissacarídeo apresentaram reações mais específicas, mostrando que essa técnica é mais eficiente, pois permite reações apenas com os homólogos.

Os resultados demonstraram a grande sensibilidade e viabilidade da técnica serológica como valioso instrumento auxiliar no emprego de diagnose, identificação e taxonomia das bactérias do gênero *Xanthomonas* estudadas.

SEROLOGICAL DIFFERENTIATION AMONG THREE
PATHOVARS OF *Xanthomonas campestris* (Pammel)
Dowson USING LYMPH NODE TECHNIQUE AND
BACTERIAL SUSPENSION

MAURO HIDEO SUGIMORI

Adviser: Avelino Rodrigues de Oliveira

SUMMARY

Xanthomonas campestris pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* isolated respectively from cotton, cassava and bean plants were serologically compared. The bacteria grown on PDA and incubated at 28°C during 48h were standardized in colorimeter at 50%T (578nm), emulsified in FREUND'S complete adjuvant and used as antigen in the preparation of specific antisera. Each rabbit received two antigen injections in the lymph node at 15 days interval.

Bacterial suspensions were obtained on sterile distilled water, 0,85% saline solution and 2% acetic acid. For exopolysaccharide extraction of the isolated sterile saline solution with 0,6% neutral formaldehyde was used. So

bacterial suspensions as exopolysaccharide extract were standardized in colorimeter at 5%T and used as antigen for serological tests.

Intra lymph node injections with concentrated antigens produced specific antisera after first injections.

Agar double diffusion tests used in inter and intra specific antigens and antisera showed that *patovars malvacearum, manihotis* and *phaseoli* of *Xanthomonas campestris* were serologically distinct. In these tests one, two and three precipitation lines were observed in a period of 65h.

Exopolysaccharide antigens showed more specific reactions and seems to be the most efficient technic allowing differentiation with homologous only.

The results demonstrated high sensibility and viability for serological technique as valuable auxiliary instrument in the diagnosis, identification and taxonomy of bacteria of the genus *Xanthomonas*.

1 - INTRODUÇÃO

A taxonomia das bactérias do gênero *Xanthomonas* que afetam culturas de interesse econômico é controversa, trabalhosa e demorada, não obstante o árduo esforço de alguns pesquisadores procurarem organizá-la de maneira simples e sintética. Recentemente, YOUNG et alii (1978) propuseram reunir em *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson as espécies próximas, levando em consideração as características bioquímicas, fisiológicas e de patogenicidade. Introduziram ainda o uso do termo patovar (pv) para identificar o hospedeiro.

A descoberta de que as bactérias quando injetadas em animais, induziam a formação de anticorpos, deu um grande impulso aos estudos de identificação das fitobactérias.

Isto induziu os pesquisadores a utilizarem a serologia como técnica auxiliar e complementar dentro do complexo. Devido a grande sensibilidade desta metodologia, aliada à técnica do linfonódulo para obtenção dos antissoros (OLIVEIRA, 1975) foram empregadas suspensões bacterianas, visando a aplicação prática dessas técnicas.

Foram analisados serologicamente os extratos de exopolissacarídeos e as suspensões bacterianas em água estéril, NaCl a 0,85% e ácido acético a 2%, como antígenos.

Este trabalho visa trazer uma contribuição à taxonomia desse gênero, dando ênfase a diferenciação serológica entre os isolados de bactérias do algodão (*Gossypium hirsutum* L.), da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

2 - REVISÃO DA LITERATURA

A bactéria *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson foi descrita pela primeira vez por PAMMEL (1895), como *Bacillus campestris* n.sp.; posteriormente, SMITH (1897) denominou-a de *Pseudomonas campestris* e *Bacterium campestre*; a seguir CHESTER (1897) denominou de *Bacterium campestris*; mais tarde, BERGEY et alii (1923) denominaram de *Phytomonas campestris*. Finalmente, DOWSON (1939) denominou de *Xanthomonas campestris*, principalmente pelo fato de produzir um pigmento amarelo, a xantofila.

Segundo considerações feitas por STARR (1959) as bactérias eram classificadas pelos fitopatologistas baseando-se principalmente na sintomatologia, mas essa técnica era

inadequada pelo fato de utilizar métodos empregados em micologia. Desta forma, muitas contribuições iniciais sobre as bactérias dadas pela caracterização da moléstia foram consideradas incompletas. Esse mesmo autor, fez uma revisão sobre a sistemática das bactérias, enfocando os problemas referentes ao gênero e espécies, emprego da serologia, utilização de bacteriófagos, metabolismo, citologia, etc.

STARR (1959) ainda criticou a tendência geral de se descobrir e descrever novas espécies com bases em dados incompletos, como também criticou os métodos usuais empregados para classificação das espécies, mencionando a falta de confiança dos pesquisadores. Por essa razão sugeriu a utilização simultânea de outros métodos tais como: a técnica serológica, patogenicidade em diversos hospedeiros, metabolismo do substrato e outros métodos modernos.

Os testes bioquímicos baseados no metabolismo das bactérias, com relação aos diferentes substratos empregados, vêm sendo utilizados desde há muito tempo, como o principal método de classificação das bactérias. No entanto, devido a evolução das pesquisas, muitos pesquisadores colocaram a sua validade em dúvida, quando empregados separadamente. Entretanto, HAGBORG (1942) em seu trabalho verificou que um isolado, após sucessivas repicagens em diferentes meios de culturas sintéticas, apresentava características bioquímicas diferentes. DYE (1962) estudando vários isolados de *Xanthomonas* fitopatogênicas, verificou que esses isolados se assemelhavam

do ponto de vista cultural, fisiológico e bioquímico. Portanto, os métodos empregados nesse estudo comparativo, não permitem uma diferenciação significativa.

WERNHAN (1948), trabalhando com 12 espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas*, demonstrou uma grande especificidade em relação aos hospedeiros. DYE (1958) realizou várias inoculações sucessivas com diversas espécies de *Xanthomonas*, em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e demonstrou o aparecimento de sintomas no hospedeiro, causados por patógenos classificados em espécies diferentes. Contudo, KLEMENT et alii (1964) e KLEMENT & GOODMAN (1967), trabalhando com o problema da hipersensibilidade, discordaram do resultado apresentado por DYE (1958).

O Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias e Vírus (1958) propôs o termo "forma specialis", para determinar o patógeno a nível infrasubespecífico.

Segundo YANO (1976), LAPAGE e colaboradores realizando uma revisão no Código Internacional de Bactérias, mantiveram a espécie *X. campestris* e propuseram que a indicação do patotipo viesse em seguida, como por exemplo: *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson f. sp. *vesicatoria* Doidge.

Recentemente, YOUNG et alii (1978) propuseram reunir em *X. campestris* as espécies próximas, empregando para isso o termo patovar para as espécies de bactérias fitopatogênicas a nível infrasubespecífico, como por exemplo: *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson pv. *malvacearum* (Smith) Young,

Dye, Bradbury, Panagopoulos e Robbs.

A serologia aplicada à bacteriologia vegetal, segundo LINK & SHARP (1927) e GOLDSWORTHY (1928) foi iniciada por ZIPFEL em 1912, na Alemanha. Este autor, demonstrou a correlação serológica entre as raças de *Rhizobium* encontradas em nódulos de ervilha (*Pisum sativum* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e entre trevo (*Trifolium pratense* L.) e fava (*Vicia faba* L.). ZIPFEL demonstrou também que nódulo de *Rhizobium* de espécies diferentes de leguminosas, provavelmente, são constituídos de espécies também diferentes de *Rhizobium*, pois puderam ser separadas através dos testes de aglutinação e precipitação.

A primeira referência sobre o emprego da técnica serológica na classificação das bactérias do gênero *Xanthomonas* deve-se a SAINT JOHN-BROOKS et alii (1925). Esses autores trabalharam com 39 isolados de gêneros e espécies diferentes. Obtiveram antissoros para cada isolado, e observaram a ocorrência de reações cruzadas em testes de precipitação. No entanto, conseguiram diferenciar 3 grupos serológicos distintos, que são as formas: amarela, branca e fluorescente, entre as quais nunca ocorreram reações cruzadas. Também observaram que uma concentração adequada do antissoro é muito importante para a identificação específica e segura da bactéria.

LINK & SHARP (1927) realizaram um trabalho sobre testes serológicos com *Bacterium campestre*, *Bact. phaseoli*, *Bact. phaseoli* var. *sojense* e *Bact. flaccumfaciens*, e

verificaram que *Bact. campestre* estava serologicamente muito relacionada com as outras bactérias do mesmo gênero e menos com *Bact. flaccumfaciens*. Observaram também que a especificidade biológica desta bactéria para com os seus hospedeiros, estava relacionada a especificidade serológica. Afirmaram ainda que o teste de aglutinação poderia ser usado para diferenciar as bactérias.

SHARP (1927), trabalhando com *Bact. flaccumfaciens*, *Bact. phaseoli* e *Bact. phaseoli* var. *sojense*, e empregando os testes de aglutinação e precipitação, concluiu que todas as espécies diferiam serologicamente.

LINK et alii (1929), trabalhando com bactérias de características morfológicas muito semelhantes e utilizando-se do teste de aglutinação, conseguiram diferenciar vários isolados, mas notaram a presença de reações cruzadas. Concluíram que, quando os testes de aglutinação não fossem suficientes para diferenciar os isolados, testes complementares com reações recíprocas poderiam diferenciar antigenicamente.

HORGAN (1931), trabalhando com *P. malvacearum*, estudou serologicamente várias raças e demonstrou a especificidade dos testes de aglutinação para identificar essas raças.

ELROD & BRAUN (1947a) através de seu trabalho, demonstraram pouca confiabilidade nos métodos empregados comumente para a classificação do gênero *Xanthomonas*, como também consideraram incompleta a serologia empregada na taxonomia dessa bactéria. Por essa razão, trabalharam com 36 isolados

de *Xanthomonas* entre espécies e sub-espécies, fizeram uma revisão da literatura sobre o assunto e ao mesmo tempo procuraram aperfeiçoar várias técnicas. Notaram, que eliminando-se previamente a mucilagem encontradas nas células bacterianas e utilizando a técnica de absorção, puderam determinar 5 serotipos: *X. vascularum*, *X. phaseoli*, *X. campestris*, *X. translucens* e *X. pruni*.

ELROD & BRAUN (1947b) estudando as relações serológicas das espécies e sub-espécies do grupo *X. translucens* em comparação com outras espécies do mesmo gênero, chegaram a conclusão de que esse grupo formava quatro sub-grupos serológicos, como também apresentavam uma pequena correlação entre patogenicidade e serotipo.

ELROD & BRAUN (1947c) em estudos anteriores, verificaram que o gênero *Xanthomonas* mostrou uma evidente divisibilidade antigênica entre suas espécies. Quando essas espécies individualizadas não podiam ser diferenciadas pelo processo comum de classificação usada em bacteriologia, empregavam a serologia para separar estes organismos. No mesmo trabalho, mostraram a existência de três outras divisões serológicas do gênero *Xanthomonas*, que são os grupos: *X. vascularum*, *X. phaseoli* e *X. campestris*. Usando exsudatos mucóides da célula bacteriana em testes de aglutinação, demonstraram a existência de um parentesco entre os grupos *vascularum* e *phaseoli*. Contudo, *X. vascularum* typus aglutinou o antissoro de *X. phaseoli*, mas a recíproca não foi observada.

WERNHAN (1948), trabalhando com *X. translucens*, não conseguiu relacionar patogenicidade e serótipo, ao passo que, FANG et alii (1950), que também trabalharam com *X. translucens*, conseguiram diferenciar quatro serotipos, concordando com os estudos de ELROD & BRAUN (1947b).

MUSHIN et alii (1959), usando diferentes técnicas serológicas no estudo de fitobactérias, chegaram a conclusão de que a serologia é de grande importância na sua classificação e identificação.

MORTON (1965) relata em seu trabalho a importância de se prevenir a disseminação da bactéria para outras áreas, baseando-se no fato de que os sintomas são algumas vezes indefinidos. Portanto, processos serológicos foram experimentados, para desenvolver maneiras rápidas de diagnose. O autor comenta ainda, que a aplicação dos processos serológicos para detectar infecções causadas por bactérias fitopatogênicas é relativamente pouco desenvolvido.

GRAHAM (1963) foi capaz de diagnosticar canela preta e podridão mole em batata pela adição de uma gota do antissoro específico em sucos do tubérculo, onde apareceu um precipitado floculante, indicando a presença da bactéria.

Várias espécies fitopatogênicas de *Xanthomonas* foram diferenciadas por SHEKHAWAT & CHAKRAVARTI (1977) empregando a técnica da dupla difusão.

A aplicabilidade do uso da imunodifusão para o estudo de variabilidade patogênica foi demonstrado por ORELLA

NA & WEBER (1971) trabalhando com *Xanthomonas cyamopsidis*.

Para a obtenção de antissoros vários métodos de injeção de antígenos são encontrados na literatura, tais como: intra-muscular, intra-venosa, intra-peritonal e subcutânea. Essas técnicas foram utilizadas por vários autores, desde os primeiros trabalhos realizados em serologia.

Recentemente, OLIVEIRA (1975) desenvolveu uma nova técnica de obtenção de antissoro através da injeção de antígeno, diretamente no linfonóduo do animal (gânglio poplíteo). Segundo o próprio autor, este método de injeção de antígeno no linfonóduo apresenta resposta mais rápida do que quaisquer outros esquemas aplicados para obtenção do antissoro. Posteriormente, muitos pesquisadores passaram a adotar esta técnica para obtenção de antissoros, devido a grande facilidade e rapidez, tanto para outras bactérias como para fungos, vírus e outros organismos patogênicos. AIROLDI (1973) trabalhou com levedura de cervejeiro; KIMATI (1975) trabalhou com *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Sensu ARX. 1957); BASTOS (1975) e LEMOS NETO (1975) trabalharam com *Schistosoma mansoni* Sambon (1907).

OLIVEIRA et alii (1977) trabalhando com *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, conseguiram detectar a presença dessa bactéria, mesmo em mistura com várias espécies de *Xanthomonas*. Empregaram os antissoros obtidos por via intraganglionar e obtiveram reações específicas com antissoros do quarto dia de sangria. O mesmo resultado foi encontrado

por SUGIMORI et alii (1978) trabalhando com *Pseudomonas syringae* (van Hall) pv. *garcae* (Amaral, Teixeira & Pinheiro) Young, Dye, Bradbury, Panagopoulos & Robbs, que obtiveram reações específicas a partir do quarto dia.

BACH et alii (1978) trabalharam com *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson pv. *citri* (Hasse) Young, Dye, Bradbury, Panagopoulos & Robbs, empregando a mesma técnica de injeção no linfonódulo e obtiveram reações serológicas altamente específicas com preparações homólogas de antígenos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento, purificação e conservação das bactérias

Os isolamentos das bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (IAC-3139), *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (IAC-2833) e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (IAC-3074) foram realizados de tecidos foliares com sintomas típicos. Com auxílio de uma tesoura, retiraram-se pequenos pedaços da área de transição. Estes foram em seguida, submetidos a um tratamento químico para desinfestação, através da imersão em álcool a 70% durante 1-2 min., posteriormente, foram transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio, na proporção de 2:1 (v/v) durante 1-2 min. e finalmente, lavados em água estéril. Posteriormente, os pedaços foliares foram

macerados em água estéril e plaqueados no meio de cultura contendo batata-dextrose-agar (BDA), pelo processo de riscas pa-
ralelas, com auxílio da alça de Drigalsky, colocandô-se a se-
guir numa estufa incubadora a 28°C durante 48h para cresci-
mento e individualização das colônias. Finalmente, as colô-
nias típicas das bactérias patogênicas foram repicadas para
tubos de ensaio contendo BDA, para a sua multiplicação, con-
servação e uso como antígeno.

3.2. Preparo dos antígenos imunizantes

Culturas das bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e *Xan-*
thomonas campestris pv. *phaseoli* utilizadas no preparo do an-
tígeno imunizante, foram cultivadas em BDA e incubadas a 28°C
durante 48h. Após o crescimento, colocou-se água estéril nos
tubos e as culturas foram removidas do substrato por raspagem,
mediante o emprego de um bastão de vidro esterilizado. Em se-
guida, a suspensão obtida foi padronizada fotometricamente a
50%T e 578nm (Fotoclorímetro Bauch & Lomb modelo Spectronic
20).

A suspensão bacteriana assim obtida foi centri-
fugada a 15.000g durante 10 min. (Centrífuga Eppendorf).
O sobrenadante (LS) foi eliminado. Ao precipitado (P) adicio-
nou-se 0,5ml de adjuvante completo FREUND (Difco) e em segui-

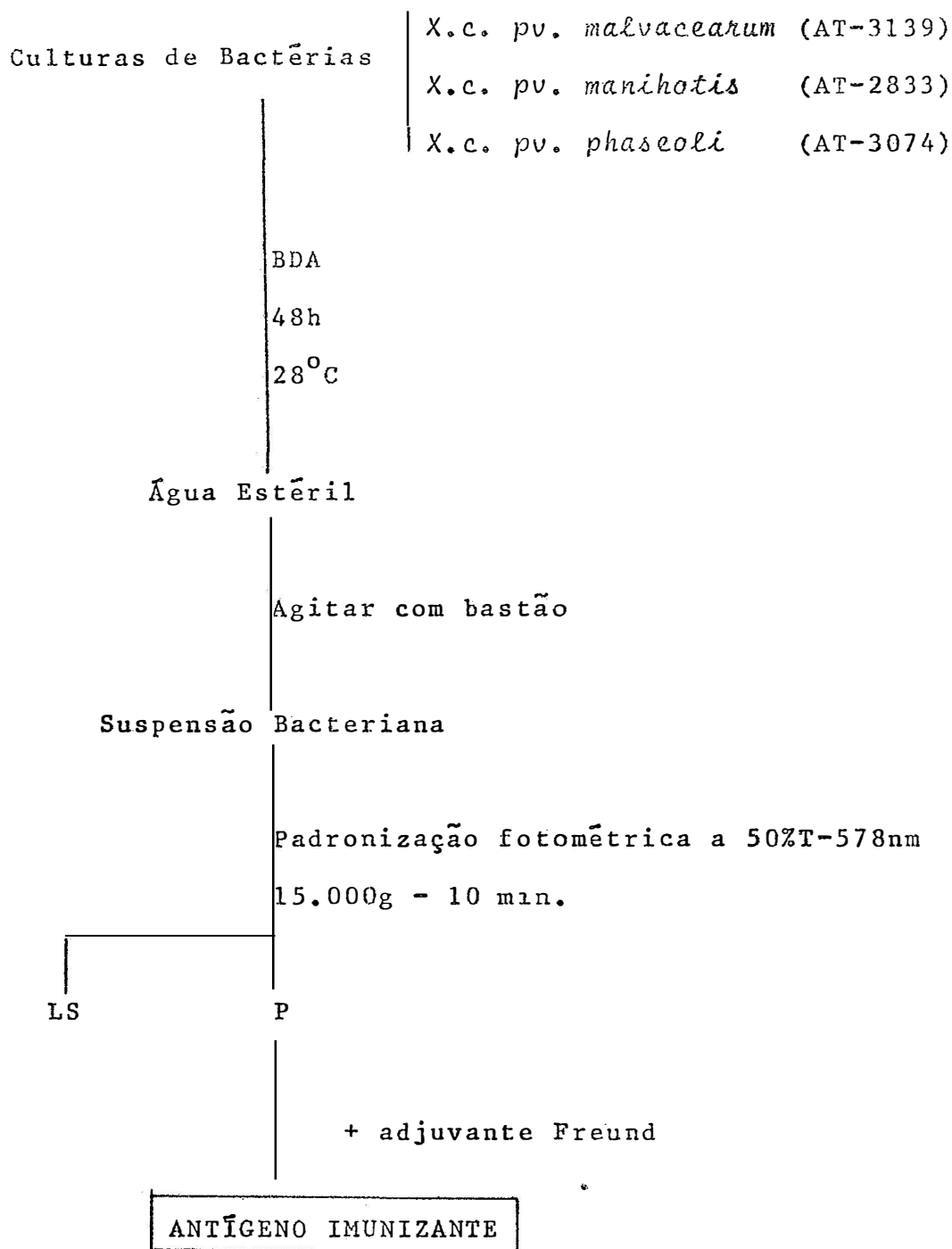
da homogeneizado. O produto resultante foi utilizado como antígeno imunizante (ESQUEMA 1).

3.3. Preparo dos antissoros

Coelhos pesando em média 2,5kg foram utilizados nas imunizações para obtenção dos antissoros. Antes da primeira injeção os animais foram submetidos a uma sangria prévia (15ml) para se obter o soro normal (SN), que foi conservado em congelador até a sua utilização como controle nas reações serológicas. Posteriormente, os animais receberam duas injeções no linfonóduo (OLIVEIRA, 1975) de 0,5 ml, dos antígenos AT-3139 (*X. campestris* pv. *malvacearum*), AT-2833 (*X. campestris* pv. *manihotis*) e AT-3074 (*X. campestris* pv. *phaseoli*), emulsionados com adjuvante completo FREUND (Difco), obedecendo um intervalo de 15 dias entre as mesmas.

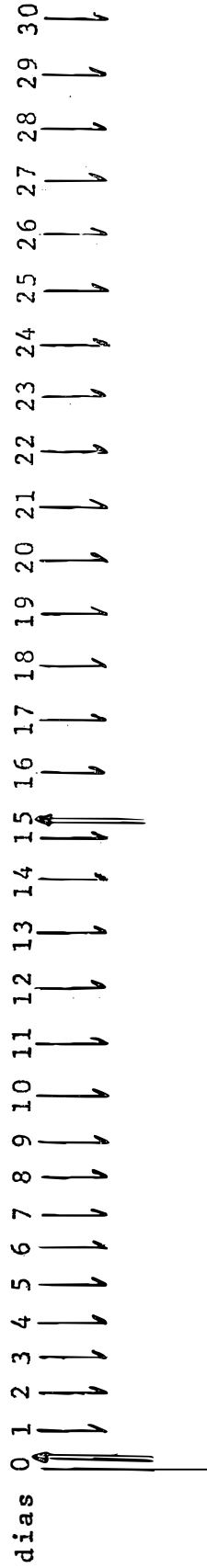
Os coelhos foram submetidos a sangrias diárias (10 a 15ml/dia) por um período de 30 dias (ESQUEMA 2). Após a realização das sangrias, procedeu-se o preparo dos antissoros e estes foram colocados em ampolas plásticas, adicionando-se em seguida, mertiolato na concentração de 1:10000 e conservados em congelador. Os códigos utilizados para identificação dos antissoros foram: AS-Xmv-3139 (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*); AS-Xm-2833 (*Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*) e AS-Xph-3074 (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*).

ESQUEMA 1. Preparo do antígeno imunizante das bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *X. campestris* pv. *manihotis* e *X. campestris* pv. *phaseoli*.



ESQUEMA 2. Imunizações e Sangrias Para Obtenção dos Antissoros.

X.campestris pv. *malvaceatum*, *X.campestris* pv. *manihotis* e *X.campestris* pv. *phaseoli*.



↑ - Injeções - Intra-linfonódulo

↓ - Sangrias (SN - AS)

3.4. Preparo dos antígenos para testes serológicos

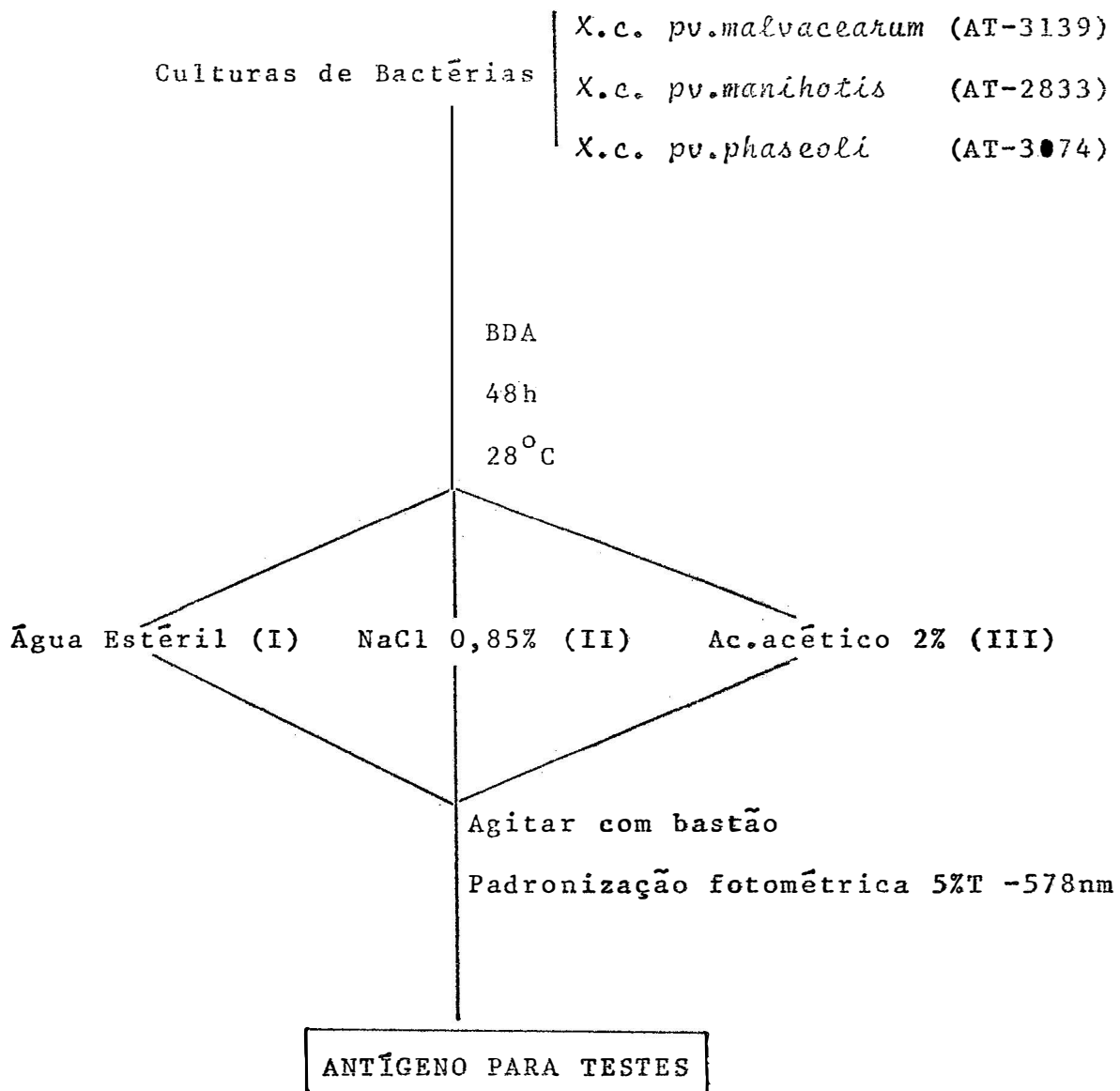
3.4.1. Suspensões bacterianas

Culturas puras das bactérias *Xanthomonas campestris* patovares *malvacearum*, *manihotis* e *phaseoli* repicadas para tubos de ensaio contendo o meio BDA foram incubadas a 28°C durante 48h. As bactérias foram removidas do substrato, por raspagem, mediante o emprego de um bastão de vidro. Posteriormente, foram feitas suspensões das bactérias em água esteril (I), solução salina a 0,85% (II) e ácido acético a 2% (III). Em seguida, as suspensões obtidas foram padronizadas fotometricamente a 5%T e 578nm (Fotocolorímetro Bauch & Lomb modelo Spectronic 20). O material padronizado foi empregado para a realização das reações serológicas. (ESQUEMA 3).

3.4.2. Preparo dos extratos de exopolissacarídeos

No preparo dos extratos de exopolissacarídeos, foi utilizado o método de CARTER & HYLTON (1974) descrito para a obtenção de exopolissacarídeo de *Corynebacterium equi* e modificado por YANO (1976). As bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* cultivadas em tubos de ensaio contendo o meio BDA foram incubadas a 28°C durante 48h.

ESQUEMA 3. Preparo do Antígeno Para Suspensões Bacterianas.

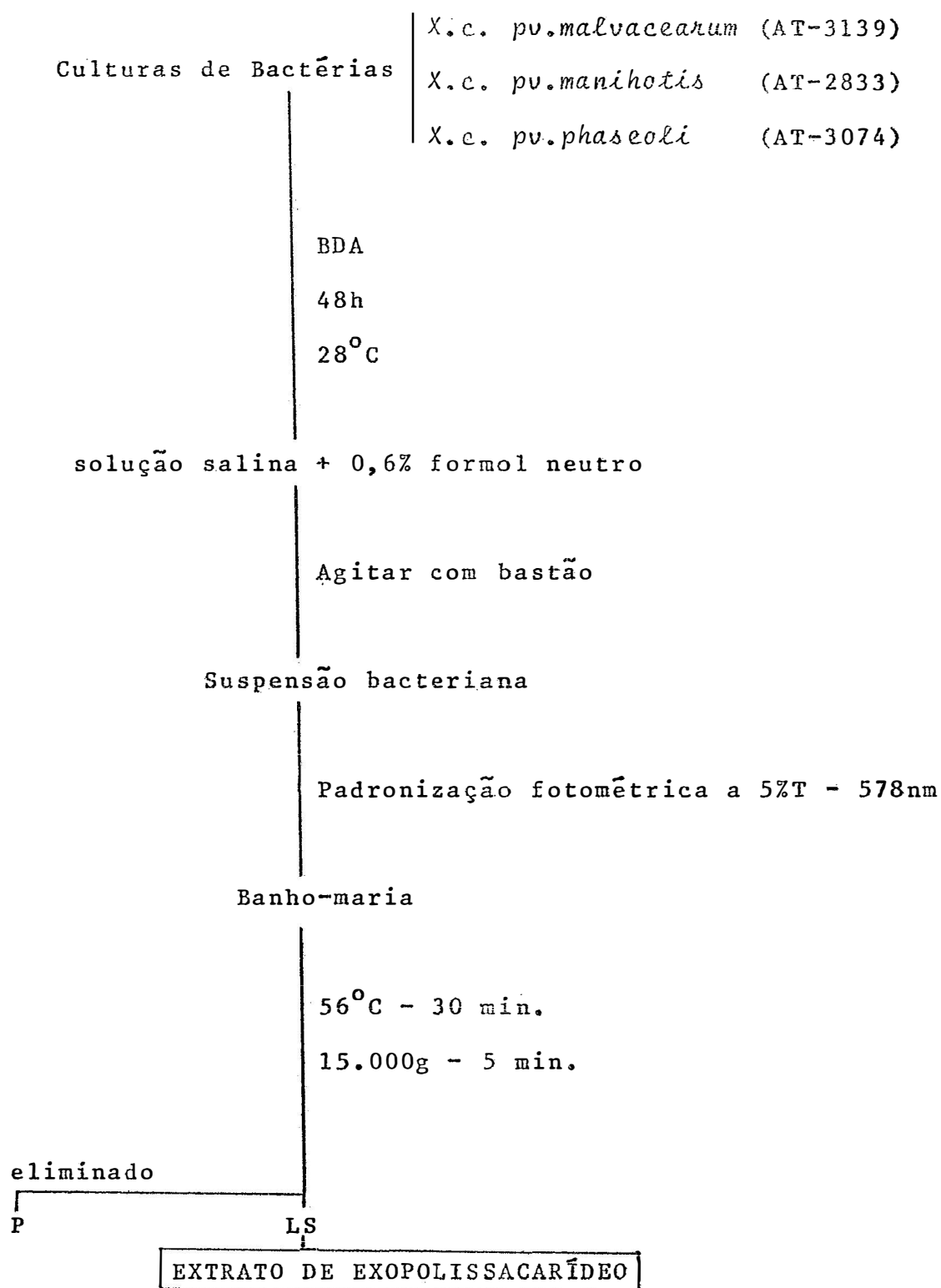


Após o desenvolvimento, para cada tubo que continha os diferentes patovares, foram colocados 5ml de solução fisiológica estéril contendo 0,6% de formol neutro. As colônias foram removidas do substrato por raspagem com auxílio de um bastão de vidro. Obteve-se assim uma suspensão bacteriana que foi padronizada fotometricamente a 5%T e 578nm (Fotocolorímetro Bauch & Lomb modelo Spectronic 20). Essa suspensão foi colocada em banho-maria sob agitação a 56°C durante 30 min. Em seguida, foi centrifugada a 15.000g durante 5 min., tempo suficiente para promover a sedimentação das células bacterianas. O precipitado (P) foi eliminado e o sobrenadante (LS) obtido, que é o extrato de exopolissacarídeo, foi conservado em congelador, adicionando-se antes o mertiolato na concentração de 1:10000 (ESQUEMA 4).

3.5. Testes serológicos

Os antígenos utilizados nas reações serológicas foram:- AT-3139 (*Gossypium hirsutum* L.) - Proced. Aguaí, AT-3074 (*Phaseolus vulgaris* L.) - Proced. Campinas e AT-2833 (*Manihot esculenta* Crantz) - Proced. Pindamonhangaba. Os testes serológicos foram realizados empregando-se a técnica de dupla difusão em gel-agar de OUCHTERLONY (1958) em lâminas e modificado por OLIVEIRA (1967). O esquema de distribuição dos orifícios da matriz sobre o meio agarizado foi de um hexa

ESQUEMA 4. Extração do exopolissacarídeo



gono, inscrito num círculo de 1,8cm de diâmetro, tendo os orifícios externos um diâmetro de 2,5mm, o orifício central 3,5mm de diâmetro e a distância tangencial de 4,0mm.

Para cada lâmina previamente limpa e desengordurada, foi distribuído de maneira uniforme 4,0ml do meio agarrizado. Após a solidificação efetuou-se os orifícios e colocou-se os antígenos e os antissoros para reagirem. Para todas as reações serológicas foram realizadas cinco leituras, com intervalos de 17; 24; 41; 48 e 65h.

4 - RESULTADOS

4.1. Título dos antissoros

Para obtenção dos títulos dos antissoros AS-Xmv-3139, AS-Xm-2833 e AS-Xph-3074 foi empregado o teste de dupla difusão em gel-agar, em combinação homóloga com os antígenos extraídos em água estéril. Esses testes foram realizados com o primeiro e o último antissoros que apresentaram reações positivas.

Para o antissoros AS-Xmv-3139 (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*) do décimo segundo dia de sangria após a primeira injeção de antígeno no linfonódulo, reagindo com AT homólogo AT-3139, o título foi de 1:1 e para o AS do

último dia de sangria após a segunda injeção, o título foi de 1:16. Para o antissoro AS-Xm-2833 (*Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*) do quinto dia de sangria após a primeira injeção do antígeno no linfonódulo, reagindo com o seu AT homólogo AT-2833, o título foi de 1:1, e para o AS do último dia de sangria após a segunda injeção, o título foi de 1:8. Para o antissoro AS-Xph-3074 (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) do oitavo dia de sangria após a primeira injeção de antígeno no linfonódulo, reagindo com AT homólogo AT-3074, o título foi de 1:1, e para o AS do último dia de sangria após a segunda injeção, o título foi de 1:16 (QUADRO 1).

4.2. Testes com antissoros para *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*

Para facilitar a interpretação dos testes serológicos de dupla difusão em agar, utilizamos as seguintes notações:-

- 1) Os antissoros obtidos após sangrias diárias, receberam um código fracionário. O numerador indica o dia da sangria e o denominador o número de injeções de antígeno.
- 2) As linhas de precipitação foram codificadas com as letras a (próxima ao orifício do antígeno), b (posição intermediária) e c (próxima ao orifício do antissoro).

QUADRO 1. Título dos antíssoros, em testes de dupla difusão em agar, em reação com antígenos homólogos extraídos em água estéril.

Antígeno	Sangrias	Diluição do Antíssoro						
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
AT-3139	12/1	+	-	-	-	-	-	-
	12/2	+	+	+	+	+	-	-
AT-2833	5/1	+	-	-	-	-	-	-
	7/2	+	+	+	+	-	-	-
AT-3074	8/1	+	-	-	-	-	-	-
	12/2	+	+	+	+	-	-	-

AT

	a
	b
	c

AS

Antissoros para *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum (AS-Xmv-3139) reagiram contra antígenos homólogos e heterólogos extraídos em água estéril (I), NaCl 0,85% (II) e ácido acético 2% (III). Reações com extratos de exopolissacarídeo (IV) foram observadas apenas nos testes contra antígenos homólogos (TABELA 1).

4.2.1. Reações homólogas

O AS-Xmv-3139 - 12/1 apresentou as primeiras reações positivas evidenciadas pela linha a de precipitação, para os AT-3139 extraídos em água estéril (I) e NaCl 0,85% (II) como também para o extrato de exopolissacarídeo (IV).

Além da linha a presente em todas as reações, observou-se o aparecimento das linhas b e c (FIGURA 1). O antígeno extraído em água estéril apresentou somente a linha a. O antígeno extraído em NaCl 0,85% apresentou além da linha a, uma consistente linha b a partir do antissoro 1/2. Exopolissacarídeos apresentaram além da linha a, a linha b nos antissoros 13/1; 14/1; 15/1; 1/2; 2/2 e 3/2, e a linha c nos antissoros 15/1 e 2/2 (FIGURA 2).

TABELA 1. Reação do AS-Xmv-3139 com o antígeno (AT) homólogos e heterólogos: I- Água estéril; II-NaCl 0,85%; III - Ácido acético 2% e IV - Exopolissacarídeo.

AS-Xmv-3139

SANGRIAS	AT-3139				AT-2833				AT-3074			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12/1	a	a	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-
13/1	a	a	-	ab	-	-	-	-	-	-	-	-
14/1	a	a	ab	ab	-	-	-	-	-	-	-	-
15/1	a	a	abc	abc	-	-	-	-	-	a	a	-
1/2	a	ab	abc	ab	a	-	-	-	-	a	a	-
2/2	a	ab	abc	abc	a	-	-	-	a	a	a	-
3/2	a	ab	abc	ab	a	-	-	-	a	a	a	-
4/2	a	ab	ab	a	a	-	-	-	a	a	a	-
5/2	a	ab	a	a	a	-	-	-	a	a	a	-
6/2	a	ab	a	a	a	-	-	-	a	a	a	-
7/2	a	ab	a	a	a	-	-	-	a	a	a	-
8/2	a	ab	a	a	a	-	-	-	a	a	a	-
9/2	a	ab	a	a	a	-	-	-	a	a	a	-
10/2	a	ab	a	a	a	-	-	-	a	a	a	-
11/2	a	ab	a	a	a	-	-	-	a	a	a	-
12/2	a	ab	a	a	a	-	-	-	a	a	a	-

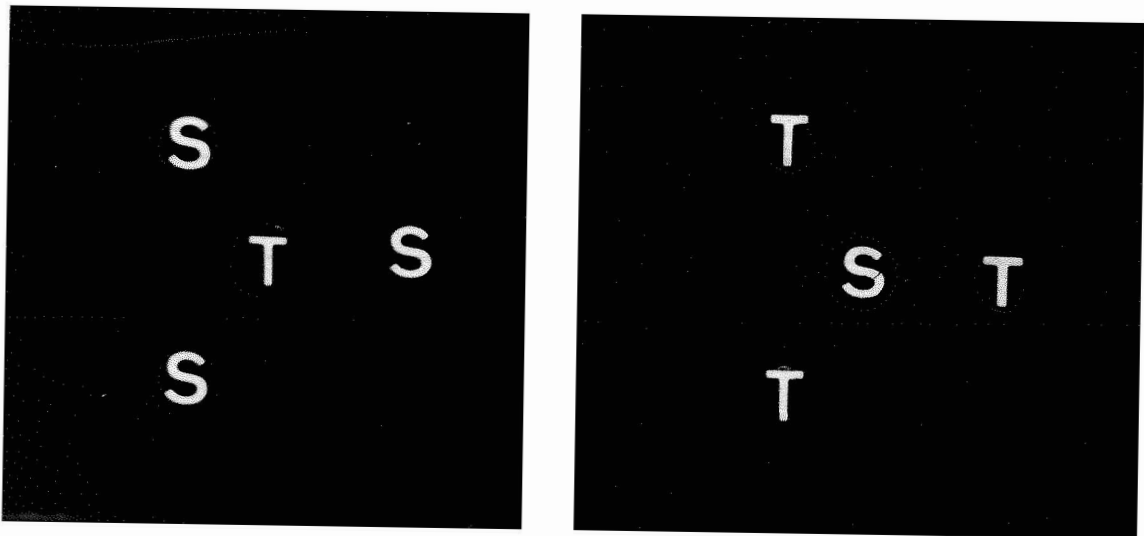


FIGURA 1 - Testes serológicos de dupla difusão em agar. Antígenos (AT-3139) extraídos em NaCl 0,85%. T = antígeno puro; S = antissoro puro. Aparecimento de 3 linhas de precipitação.

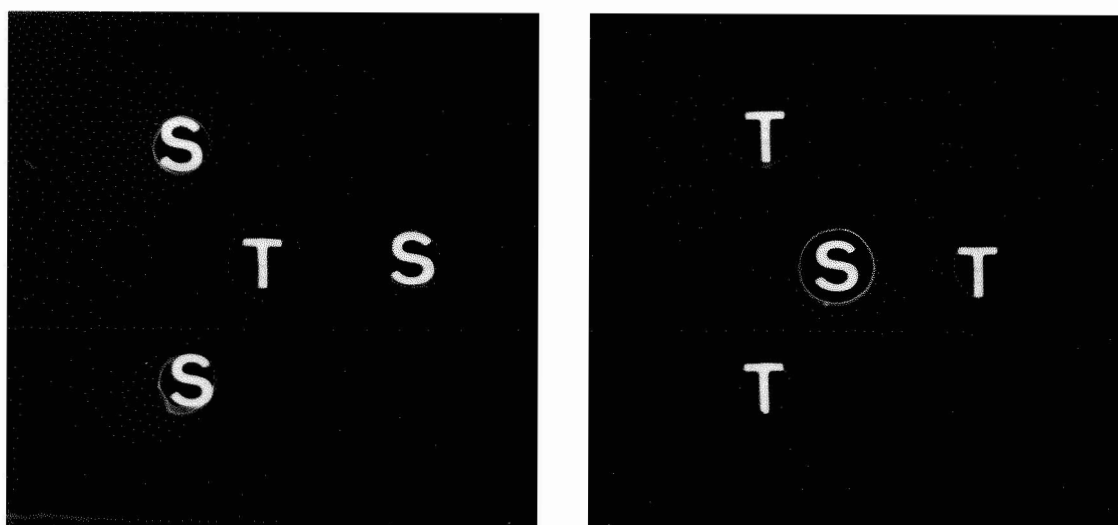


FIGURA 2 - Testes serológicos de dupla difusão em agar. Antígeno (AT-3139) extrato de exopolissacarídeo. T = antígeno puro; S = antissoro puro. Aparecimento de 3 linhas de precipitação.

O AS-Xmv-3139 - 14/1 apresentou a primeira reação positiva evidenciada pela linha a de precipitação, para o AT-3139 extraído em ácido acético 2% (III). Além da linha a presente em todas as reações, observou-se o aparecimento da linha b nos antissoros 14/1; 15/1; 1/2; 2/2; 3/2 e 4/2, e da linha c nos antissoros 15/1; 1/2; 2/2 e 3/2 (TABELA 1 e FIGURA 3).

4.2.2. Reações heterólogas

4.2.2.1. Antissoro *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (AS-Xmv-3139) contra o antígeno *Xanthomonas campestris* pv. *manihotidis* (AT-2833)

O AS-Xmv-3139 - 1/2 apresentou a primeira reação positiva evidenciada pela linha a de precipitação, para o AT-2833 extraído em água estéril (I). Este antígeno apresentou somente a linha a. Para os demais antígenos extraídos em NaCl 0,85% (II), ácido acético 2% (III) e extrato de exopolissacarídeo (IV) os antissoros apresentaram reações negativas (TABELA 1 e FIGURA 4).

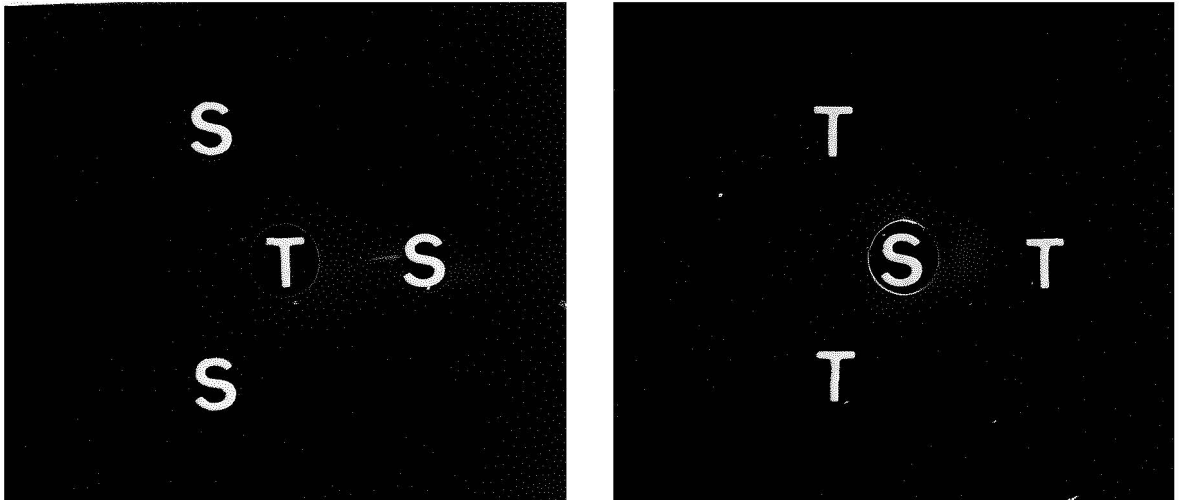


FIGURA 3 - Testes serológicos de dupla difusão em agar. Antígeno (AT-3139) extraído em ácido acético 2%. T = antígeno puro; S = antissoro puro. Aparecimento de 3 linhas de precipitação.

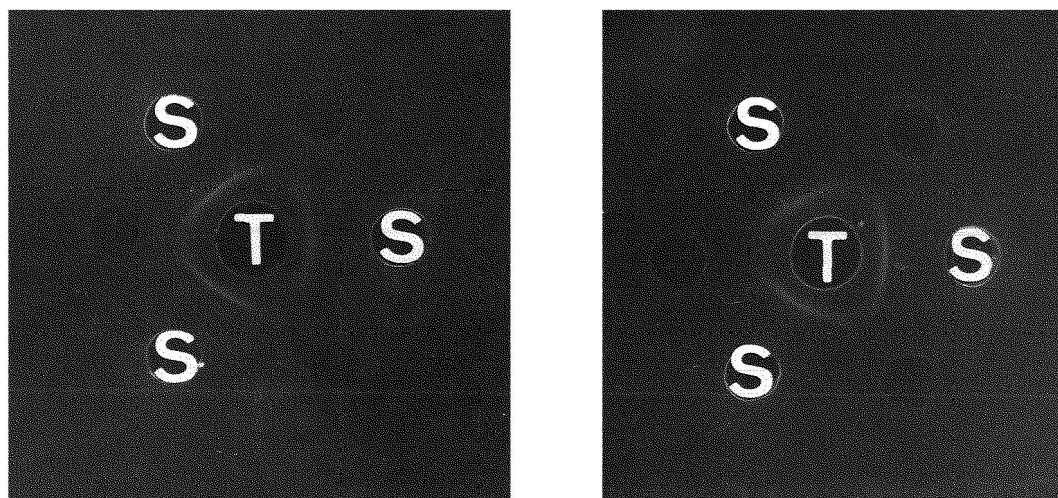


FIGURA 4 - Testes serológicos de dupla difusão em agar. Antígeno (AT-2833) extraído em água estéril. T = antígeno puro; S = antissoro puro. Aparecimento de 1 linha de precipitação.

4.2.2.2. Antissoro *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (AS-Xmv-3139) contra o antígeno *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (AT-3074)

Os AS-Xmv-3139 - 15/1 e 2/2 apresentaram as primeiras reações positivas evidenciadas pela linha a de precipitação, para os AT-3074 extraídos em água estéril (I), NaCl 0,85% (II) e ácido acético 2% (III). Estes antígenos apresentaram somente a linha a, sendo que, para o antígeno extraído em água estéril as reações se iniciaram a partir do antissoro 2/2 e para os antígenos extraídos em NaCl 0,85% e ácido acético 2% a partir do antissoro 15/1. Com o antígeno extrato de exopolissacarídeo (IV) os antissoros apresentaram reações negativas (TABELA 1 e FIGURA 5).

4.3. Testes com antissoros para *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*

Antissoros para *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (AS-Xm-2833) reagiram contra antígenos homólogos e heterólogos extraídos em água estéril (I), NaCl 0,85% (II) e ácido acético 2% (III). Reações com extratos de exopolissacarídeo (IV) foram observadas apenas nos testes contra antígenos homólogos (TABELA 2 e FIGURA 6).

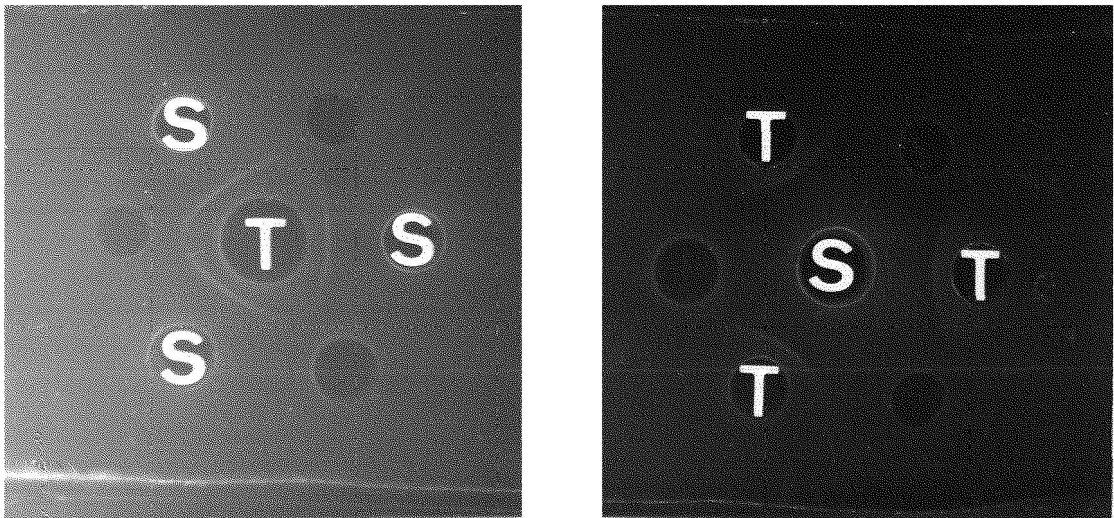


FIGURA 5 -- Testes serológicos de dupla difusão em agar. Antígeno (AT-3074) extraído em água estéril, NaCl 0,85% e ácido acético 2%. T = antígeno puro; S = antissoro puro. Aparecimento de 1 linha de precipitação.

TABELA 2. Reação do AS-Xm -2833 com o antígeno (AT) homólogos e heterólogos: I- Água estéril; II-NaCl 0,85%; III - Ácido acético 2% e IV - Exopolissacarídeo.

AS-Xm-2833

SANGRIAS	AT-2833				AT-3139				AT-3074			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5/1	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-
6/1	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-	-
7/1	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
8/1	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
9/1	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
10/1	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
11/1	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
12/1	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
13/1	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
14/1	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
15/1	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
1/2	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
2/2	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
3/2	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
4/2	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
5/2	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
6/2	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-
7/2	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-

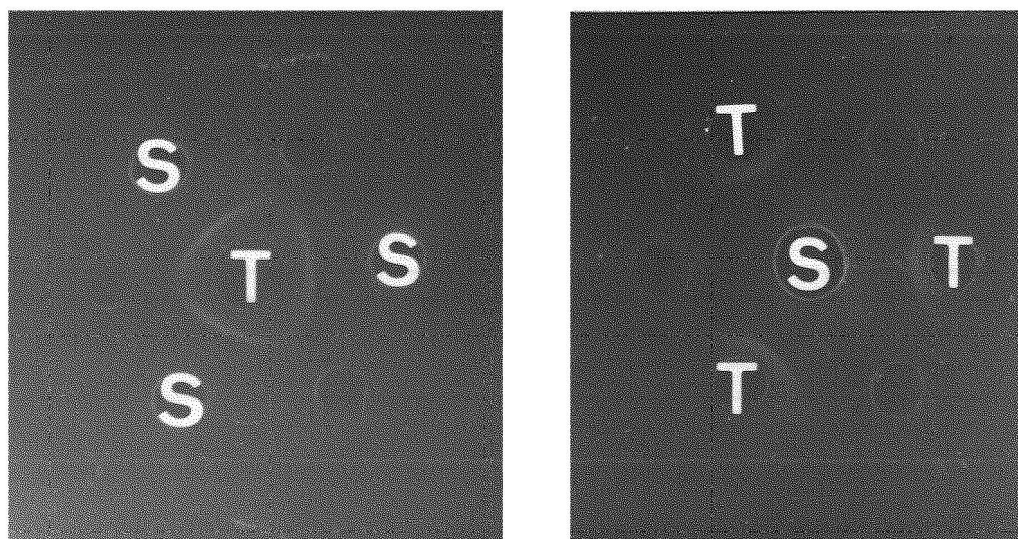


FIGURA 6 - Testes serológicos de dupla difusão em agar. Antígeno (AT-2833) extraído em água estéril, NaCl 0,85%, ácido acético 2% e extrato de exopolissacarídeo. T = antígeno puro; S = antissoro puro. Aparecimento de 1 linha de pre ci pi ta ç ã o.

4.3.1. Reações homólogas

O AS-Xm-2833 - 5/1 apresentou as primeiras reações positivas evidenciadas pela linha a de precipitação, para os AT-2833 extraídos em água estéril (I), NaCl 0,85% (II), ácido acético 2% (III) e também para o extrato de exopolissacarídeo (IV). Estes antígenos em reações com os antissoros apresentaram somente a linha a (TABELA 2 e FIGURA 6).

4.3.2. Reações heterólogas

4.3.2.1. Antissoro *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (AS-Xm-2833) contra o antígeno *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (AT-3139)

Os AS-Xm-2833 - 6/1 e 7/1 apresentaram as primeiras reações positivas evidenciadas pela linha a de precipitação, para os AT-3139 extraídos em água estéril (I) e NaCl 0,85% (II). Os antígenos extraídos em ácido acético 2% (III) e extrato de exopolissacarídeo (IV) não apresentaram reações positivas com os antissoros. Os antígenos extraídos em água estéril - 6/1 e NaCl 0,85% - 7/1 apresentaram somente a linha a em todas as reações (TABELA 2 e FIGURA 7).

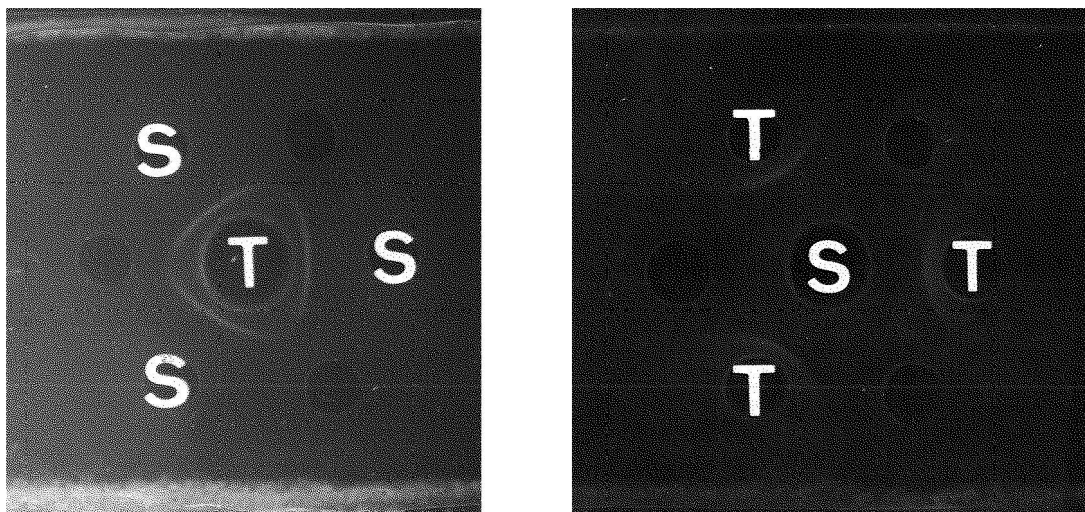


FIGURA 7 - Testes serológicos de dupla difusão em agar. Antígeno (AT-3139) extraído em água estéril e NaCl 0,85%. T = antígeno puro; S = antissoro puro. Aparecimento de 1 linha de precipitação.

4.3.2.2. Antissoro *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*
 (AS-Xm-2833) contra o antígeno *Xanthomonas cam-*
pestris pv. *phaseoli* (AT-3074)

O AS-Xm-2833, reagindo com os AT-3074 extraí-
 dos em água estéril (I), NaCl 0,85% (II), ácido acético 2%
 (III) e extrato de exopolissacarídeo (IV), não apresentaram
 reações positivas (TABELA 2).

4.4. Testes com antissoros para *Xanthomonas campestris*
pv. *phaseoli*

Antissoros para *Xanthomonas campestris* pv. pha
seoli (AS-Xph-3074) reagiram contra antígenos homólogos e he-
 terólogos extraídos em água estéril (I), NaCl 0,85% (II) e
 ácido acético 2% (III). Reações com extrato de exopolissaca-
 rídeo (IV) foram observadas apenas nos testes contra antígen-
 os homólogos (TABELA 3 e FIGURA 8).

4.4.1. Reações homólogas

O AS-Xph-3074 apresentou as primeiras reações
 positivas evidenciadas pela linha a de precipitação, para os
 AT-3074 extraídos em água estéril (I), NaCl 0,85% (II), ácido
 acético 2% (III) e extrato de exopolissacarídeo (IV).

TABELA 3. Reação do AS-Xph-3074 com o antígeno (AT) homólogos e heterólogos: I- Água estéril; II-NaCl 0,85%; III - Ácido acético 2% e IV - Exopolissacarídeo.

AS-Xph-3074

SANGRIAS	AT-3074				AT-3139				AT-2833			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
5/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8/1	a	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-
9/1	a	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-
10/1	a	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-
11/1	a	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-
12/1	a	a	-	-	a	a	-	-	a	-	-	-
13/1	a	a	-	a	a	a	-	-	a	-	-	-
14/1	a	a	-	a	a	a	-	-	a	-	-	-
15/1	a	a	-	a	a	a	-	-	a	-	-	-
1/2	a	a	-	a	a	a	-	-	a	-	-	-
2/2	a	a	-	a	a	a	-	-	a	-	-	-
3/2	a	a	-	a	a	a	-	-	a	-	-	-
4/2	a	a	a	ab	-	a	-	-	a	-	-	-
5/2	a	ab	a	ab	-	a	-	-	a	-	-	-
6/2	ab	ab	ab	ab	-	a	-	-	a	-	-	-
7/2	ab	ab	abc	ab	-	a	-	-	a	-	-	-
8/2	ab	ab	ab	ab	-	a	-	-	a	-	-	-
9/2	abc	abc	abc	ab	-	-	-	-	a	-	-	-
10/2	abc	abc	ab	ab	-	-	-	-	a	-	-	-
11/2	abc	ab	abc	ab	-	-	-	-	a	-	-	-
12/2	ab	ab	a	ab	-	-	-	-	a	-	-	-

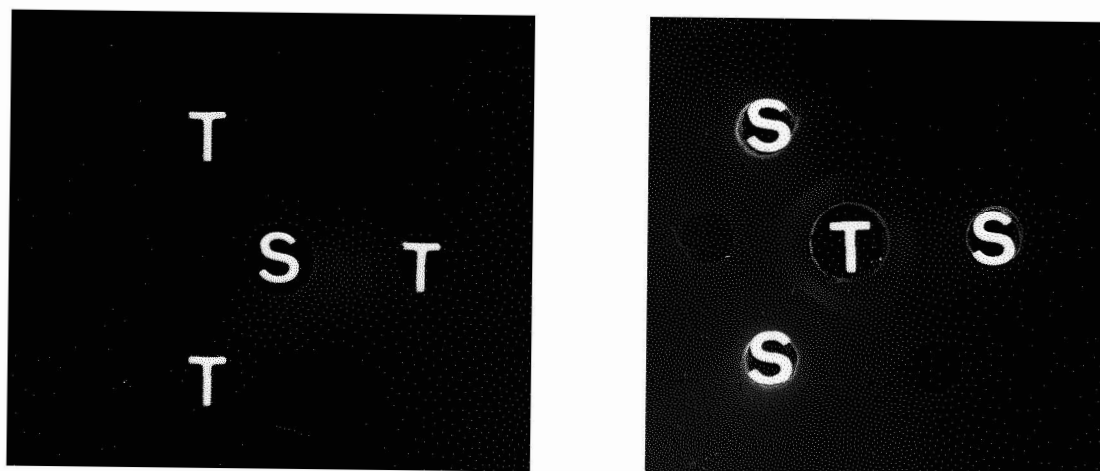


FIGURA 8 - Testes serológicos de dupla difusão em agar. Antissoro AS-Xph-3074 com antígeno (AT-3074) extraído em água estéril, NaCl 0,85% e ácido acético 2%. T = antígeno puro; S = antissoro puro. Aparecimento de 3 linhas de precipitação.

Além da linha a presente em todas as reações, observou-se o aparecimento das linhas b e c (FIGURA 8). O antígeno extraído em água estéril (I) apresentou a linha a a partir do antissoro 8/1, a linha b a partir do antissoro 6/2 e a linha c nos antissoros 9/2; 10/2 e 11/2. O antígeno extraído em NaCl 0,85% (II) apresentou a linha a a partir do antissoro 12/1, a linha b a partir do antissoro 5/2 e a linha c nos antissoros 9/2 e 10/2. O antígeno extraído em ácido acético 2% (III) apresentou a linha a a partir do antissoro 4/2, a linha b nos antissoros 6/2; 7/2; 8/2; 9/2; 10/2 e 11/2, e a linha c nos antissoros 7/2; 9/2 e 11/2. O antígeno extraído de exopolissacarídeo (IV) apresentou a linha a a partir do antissoro 13/1 e uma consistente linha b a partir do antissoro 4/2 (TABELA 3 e FIGURA 9).

4.4.2. Reações heterólogas

4.4.2.1. Antissoro *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (AS-Xph-3074) contra o antígeno *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (AT-3139)

O AS-Xph-3074 - 12/1 apresentou as primeiras reações positivas evidenciadas pela linha a de precipitação, para os AT-3139 extraídos em água estéril (I) e NaCl 0,85% (II). O antígeno extraído em água estéril apresentou somente

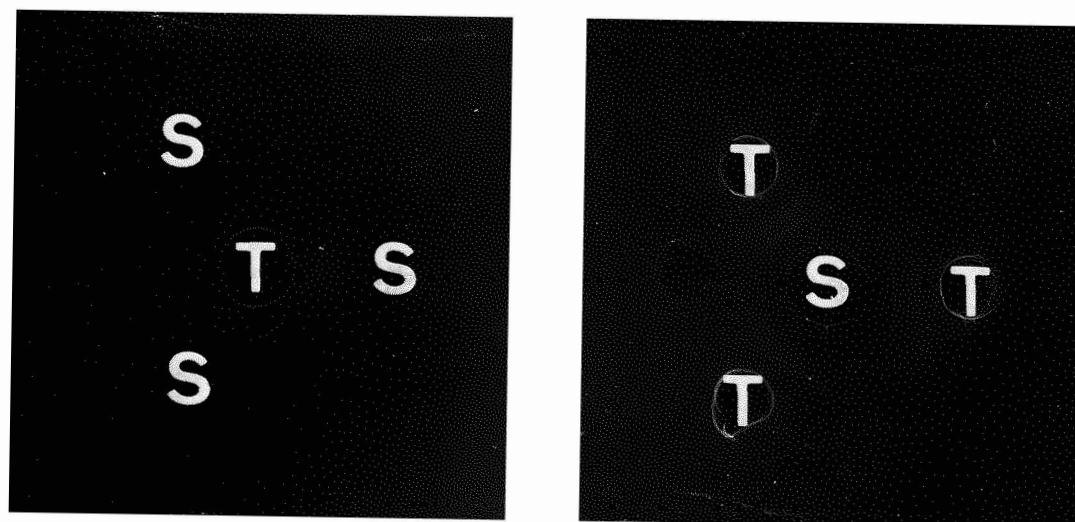


FIGURA 9 - Testes serológicos de dupla difusão em agar. Antígeno (AT-3074) extrato de exopolissacarídeo. T = antígeno puro; S = antissoro puro. Aparecimento de 2 linhas de precipitação.

a linha a nos antíssoros 12/1; 13/1; 14/1; 15/1; 1/2; 2/2 e 3/2. O antígeno extraído em NaCl 0,85% apresentou também somente a linha a a partir do antíssoro 12/1 ao 8/2. Os demais antígenos extraídos em ácido acético 2% (III) e extrato de exopolissacarídeo (IV) apresentaram reações negativas (TABELA 3).

4.4.2.2. Antíssoro *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (AS-Xph-3074) contra o antígeno *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (AT-2833)

O AS-Xph-3074 - 8/1 apresentou as primeiras reações positivas evidenciadas pela linha a de precipitação, para o AT-2833 extraído em água estéril (I). Este antígeno apresentou somente a linha a a partir do antíssoro 8/1. Os demais antígenos extraídos em NaCl 0,85% (II), ácido acético 2% (III) e extrato de exopolissacarídeo (IV) apresentaram reações negativas (TABELA 3).

5 - DISCUSSÃO

Os trabalhos apresentados por diversos pesquisadores com respeito a testes bioquímicos, caracteres culturais, morfológicos e fisiológicos, têm um valor relativo na separação das espécies e sub-espécies de bactérias, como foram comentados por STARR (1959) e demonstrados por HAGBORG (1942), FANG et alii (1950) e DYE (1962). No entanto, são da dos importantes para se determinar o gênero, de acôrdo com as características apresentadas.

As bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* podem ser classificadas como pertencentes ao mesmo gênero e a patovares diferentes, pois, a diferença entre os três patógenos é evidenciada quando se leva em

consideração a patogenicidade e os componentes antigênicos, que são específicos para os seus respectivos hospedeiros.

A taxonomia das bactérias do gênero *Xanthomonas* é muito controversa e a tendência atual é reduzir ao máximo o número de espécies, desde que, as pesquisas demonstrem essa necessidade. Assim sendo, YOUNG et alii (1978) propuseram em seu trabalho a designação "patovar", quando se verifica uma variação dentro da espécie de bactéria patogênica a nível infra-específico.

Realizando estudos sobre a taxonomia de bactérias do gênero *Xanthomonas*, vários pesquisadores demonstraram a dificuldade e a complexidade de classificá-las a nível de espécie. Assim sendo, ELROD & BRAUN (1947-a,b,c), empregando técnicas serológicas, determinaram cinco serotipos para o gênero *Xanthomonas*, contudo, os resultados obtidos pelos autores sugerem que as quantidades de antígeno e antissoro não foram convenientemente estudadas.

FANG et alii (1950), utilizando as técnicas serológicas demonstraram a possibilidade de diferenciar a maioria das formas especiais dentro do grupo *Xanthomonas translucens*.

A técnica que utiliza agentes emulsificantes, segundo MUSHIN et alii (1959), foi primeiramente descrita por ROSCHKA'S que trabalhou com bacilos da tuberculose, realizando a emulsão em temperatura ambiente. Posteriormente esta técnica foi modificada por FREUND et alii (1948).

A técnica de imunização de coelhos através do emprego de antígenos via intraganglionar foi utilizada pela primeira vez por CARDOSO & OLIVEIRA (1974) para antígenos fúngicos. OLIVEIRA et alii (1977), trabalhando com *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, utilizando a técnica de agentes emulsificantes e injeção de antígenos via intraganglionar para obtenção de antissoros específicos, conseguiram obter respostas altamente específicas nos antissoros do quarto dia, após a realização da primeira injeção.

Esta técnica foi também empregada para antígenos bacterianos por SUGIMORI et alii (1978), trabalhando com *Pseudomonas syringae* (van Hall) pv. *garcae* (Amaral, Teixeira e Pinheiro) Young, Dye, Bradbury, Panagopoulos e Robbs; e por BACH et alii (1978), trabalhando com *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson pv. *citri* (Hasse) Young, Dye, Bradbury, Panagopoulos e Robbs.

No presente trabalho foi empregada a técnica de agentes emulsificantes, combinada com o método de aplicação de injeções de antígeno no linfonódulo (gânglio poplíteo) do coelho, segundo OLIVEIRA (1975). Estas técnicas apresentaram grande eficiência na obtenção de antissoros específicos, pois, demonstraram a presença de anticorpos nos soros logo após a realização da primeira injeção de antígeno, como observa-se nas TABELAS 1, 2 e 3. Após a realização de injeções de antígenos no linfonódulo, os títulos máximos dos antissoros obtidos em reações homólogas, para os antígenos extraídos em

água estéril e em testes de dupla difusão em agar, não foram elevados, demonstrando especificidade para cada espécie (QUADRO 1).

Os testes serológicos de dupla difusão em agar demonstraram grande eficiência, pois, permitiram observar diferenças inter-específicas entre os isolados de algodão, mandioca e feijão.

Os resultados obtidos em combinações homólogas e heterólogas para os antígenos extraídos em água estéril, não permitiram detectar diferenças entre os isolados pelo fato de ocorrerem reações inter e intra-específicas, demonstrando que os antígenos nestas condições não apresentavam diferenças antigênicas entre os isolados. Para os antígenos extraídos em NaCl 0,85% as reações inter-específicas apareceram negativamente para os AS-Xph-3074 x AT-2833 e AS-Xmv-3139 x AT-2833 , apresentando já alguma diferença antigênica entre os isolados. Para os antígenos extraídos em ácido acético 2% a diferença antigênica foi maior, pois ocorreram reações com os homólogos e apenas com o AS-Xmv-3139 x AT-3074 heterólogo, mas essa reação inter-específica é perfeitamente explicável pelo fato de possuir o AT-3074 características morfológicas semelhantes ao AT-3139. Contudo, quando foram utilizados os extratos de exo polissacarídeo como antígeno as reações foram muito específicas, pois, os antígenos e antissoros apenas reagiram com os seus homólogos, demonstrando uma grande diferença antigênica entre os isolados e muita confiabilidade no método utilizado (QUADRO 2).

Quadro 2. Reações homólogos e heterólogos de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (3074), *X. campestris* pv. *malvacearum* (3139) e *X. campestris* pv. *manihoti* (2833) com antígenos extraídos em água destilada, NaCl 0,85%, ácido acético 2% e exopolissacarídeo e respectivos antissoros.

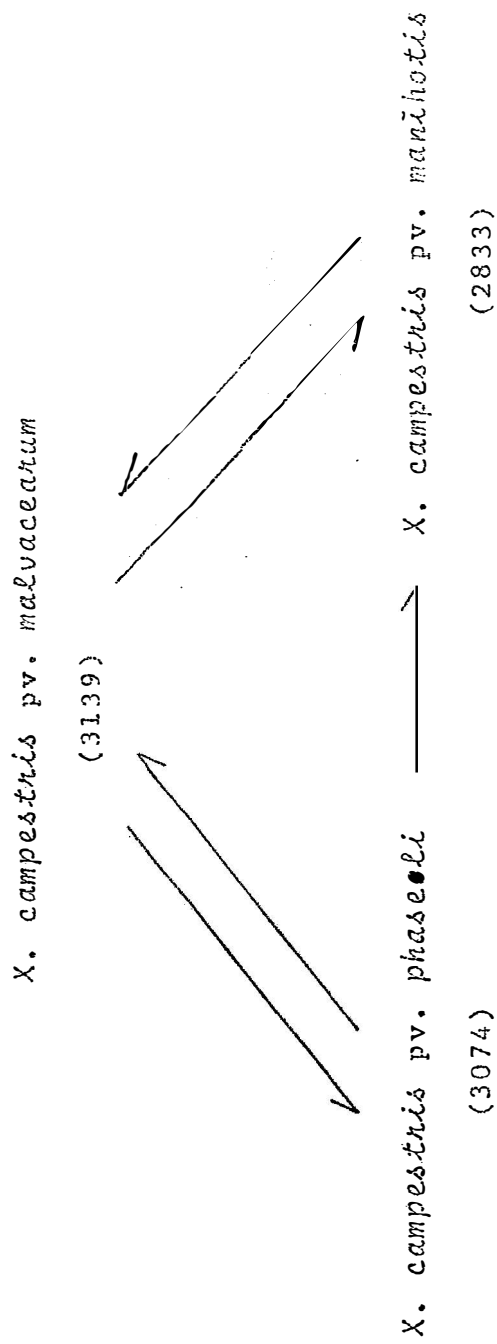
	Água destilada	NaCl 0,85%	Ac. acético 2%	Exopolissacarídeo
AT	3074 3139 2833	3074 3139 2833	3074 3139 2833	3074 3139 2833
AS				
3074	+	+	+	-
3139	+	+	+	+
2833	-	-	-	+

Foi observado também que o AS-Xm-2833 x AT-3074, em todos os casos apresentaram reações negativas, independentemente, do método de extração do antígeno.

Foi observado que os AS-Xmv-3139 e AS-Xph-3074 em reações homólogas apresentaram, além da linha a de precipitação, as linhas b e c, enquanto que os AS-Xm-2833 apresentaram apenas a linha a de precipitação.

Em reações inter-específicas com os antígenos extraídos em água estéril, os resultados demonstraram que os AT-3139 e AT-3074 apresentaram reações recíprocas, o mesmo acontecendo com AT-3139 e AT-2833, porém, entre os AT-2833 e AT-3074 as reações ocorreram num único sentido (ESQUEMA 5). Para os antígenos extraídos em NaCl 0,85% as reações recíprocas ocorreram apenas entre AT-3139 e AT-3074 e unidirecional de AT-2833 para AT-3139, enquanto que de AT-2833 para AT-3074 não houve reação (ESQUEMA 6). Para os antígenos extraídos em ácido acético 2% ocorreram apenas reação unidirecional de AT-3139 para AT-3074 (ESQUEMA 7). Com os extratos de exopolissacarídeo como antígeno os AT-3139, AT-2833 e AT-3074 não apresentaram nenhuma reação recíproca ou unidirecional (ESQUEMA 8). Observou-se também pelos resultados que AT-3139 possui características antigênicas mais próximas de AT-3074, do que de AT-2833, apesar das reações apresentadas. Por outro lado o AT-2833 em comparação com o AT-3074 mostrou que a relação serológica existente é menor, devido as diferenças morfológicas (ESQUEMA 9).

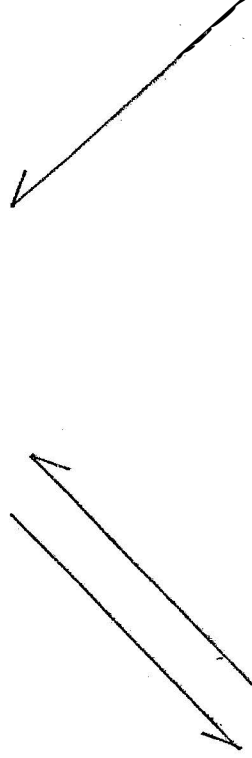
ESQUEMA 5. Antígenos extraídos em água estéril e os antissoros de *X. campestris* pv. *malvaceatum* (3139), *X. campestris* pv. *phaseoli* (3074) e *X. campestris* pv. *manihotis* (2833), respectivamente, mostrando reações de reciprocidade.



ESQUEMA 6. Antígenos extraídos em NaCl 0,85% e os respectivos antissoros, mostrando reações de reciprocidade de *X. campestris* pv. *malvacearum* (3139) com *X. campestris* pv. *phaseoli* (3074) e *X. campestris* pv. *manihotii* (2833)

X. campestris pv. *malvacearum*

(3139)



X. campestris pv. *phaseoli*

(3074)

X. campestris pv. *manihotii*

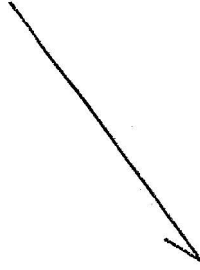
(2833)

ESQUEMA 7. Antígenos extraídos em ácido acético 2% e os respectivos antissoros, mostrando reações de reciprocidade apenas entre *X. campestris* pv. *malvacearum* (3139) e *X. campestris* pv. *phaseoli* (3074).

o

X. campestris pv. *malvacearum*

(3139)



X. campestris pv. *phaseoli*

(3074)

X. campestris pv. *manihotis*

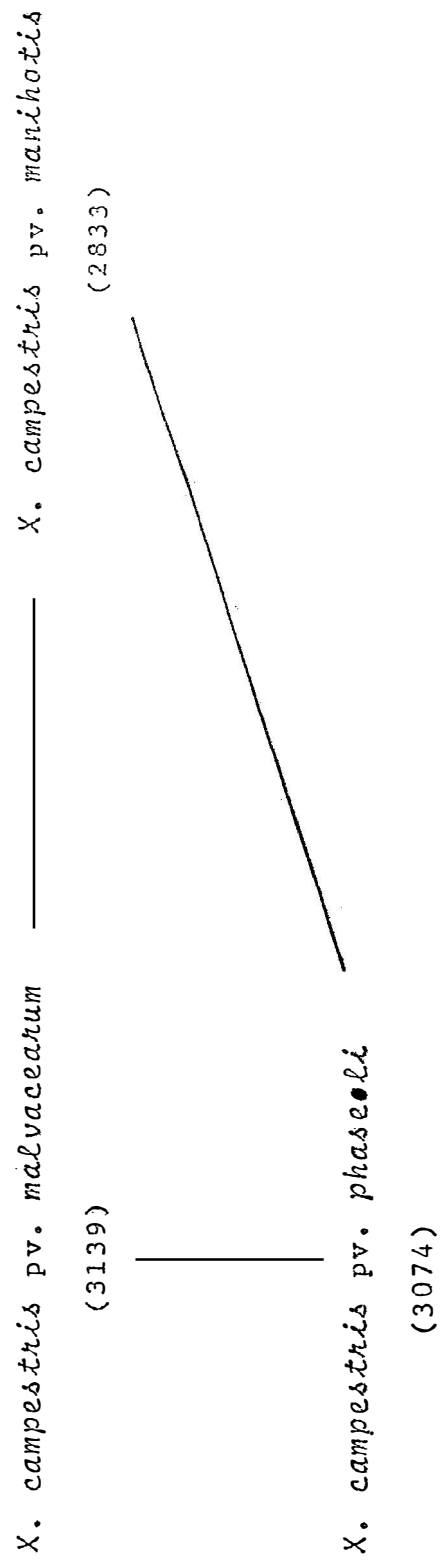
(2833)

ESQUEMA 8. Extratos de exopolissacarídeos utilizados como antígenos e os respectivos antissoros, não apresentaram reações de reciprocidade entre *X. campestris* pv. *malvacearum* (3139), *X. campestris* pv. *phaseoli* (3074) e *X. campestris* pv. *manihotis* (2833).

X. campestris pv. *malvacearum*
(3139)

X. campestris pv. *phaseoli* (3074) *X. campestris* pv. *manihotis* (2833)

ESQUEMA 9. Relações de parentesco serológico entre as bactérias *X. campestris* pv. *malvacearum* (3139), *X. campestris* pv. *phaseoli* (3074) e *X. campestris* pv. *manihotis* (2833).



6 - CONCLUSÕES

1. As técnicas serológicas podem ser empregadas com sucesso para diferenciar *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*.
2. A técnica do linfonódulo para obtenção de antissoros específicos e os testes serológicos realizados em dupla difusão em agar, demonstraram a possibilidade de se diferenciar os patovares de *Xanthomonas campestris*, logo após a aplicação da primeira injeção de antígeno, com grande eficiência.

3. A técnica da suspensão bacteriana com os antígenos extraídos em água estéril, NaCl 0,85% e ácido acético 2% podem ser empregada com restrições, devido a presença de reações inter e intra-específicos.

4. A técnica do exopolissacarídeo pode ser utilizada com sucesso, pois, demonstrou grande especificidade, reagindo apenas com os antígenos homólogos das bactérias estudadas.

LITERATURA CITADA

- AIROLDI, L.P.S., 1973. Purificação e propriedades de fosforilase de levedura de cervejeiro. Campinas, UNICAMP, 79 p. (Tese de Doutorado).
- BACH, E.E., A.P.C. ALBA, A.L.G. PEREIRA, A.G. ZAGATTO e V. ROSSETTI, 1978. Serological studies of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 45(4): 229-236.
- BASTOS, O.C., 1975. Estudo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens humana e silvestre do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Campinas, UNICAMP, 59p. (Dissertação de Mestrado).

- BERGEY, D.H., F.C. HARRISON, R.S. BREED, B.W. HAMMER e F.M. HUNTOON, 1923. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1st edition, Baltimore, U.S.A., Williams & Williams Co., 40 p.
- CARDOSO, R.M.G. e A.R. OLIVEIRA, 1974. Injeções intraganglionares no preparo de anti-soros específicos para *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau. In: VII Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Brasília. (Resumo).
- CARTER, G.R. e G.A. HYLTON, 1974. An indirect hemagglutination test for antibodies to *Corynebacterium equi*. Am. J. Vet. Res. Michigan, 35(11):1393-1395.
- CHESTER, F.D., 1897. A preliminary arrangement of the species of the genus *Bacterium*. Ann. Rept. Delaware Agr. Exp. Sta. 9:53-145.
- DOWSON, W.J., 1939. On the systematic position and generic names of the gram negative bacterial plant pathogens. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. II, 100:177-193.
- DYE, D.W., 1958. Host specificity in *Xanthomonas*. Nature, London, 182:1813-1814.
- DYE, D.W., 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. N. Z. J. Sci., Wellington, 5:399-416.

- ELROD, R.P. e A.C. BRAUN, 1947a. Serological studies of the genus *Xanthomonas*. I. Cross-agglutination relationships. J. Bact., Baltimore, 53:509-518.
- ELROD, R.P. e A.C. BRAUN, 1947b. Serological studies of the genus *Xanthomonas*. II. *Xanthomonas translucens* group. J. Bact., Baltimore, 53:519-624.
- ELROD, R.P. e A.C. BRAUN, 1947c. Serological studies of the genus *Xanthomonas*. III. *Xanthomonas vascularum* and *Xanthomonas phaseoli* groups, the intermediate position of *Xanthomonas campestris*. J. Bact., Baltimore, 54:349-357.
- FANG, C.T., O.N. ALLEN, A. RIKER e J.G. DIKSON, 1950. The pathogenic, physiological and serological reactions of the four species of *Xanthomonas translucens*. Phytopath., St. Paul, 40:44-64.
- FREUND, J., K.J. THOMSON, H.B. HOUGH, H.E. SOMMER e T.M. PISA NI, 1948. Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants. J. Immunol., Baltimore, 60:383-398.
- GOLDSWORTHY, M.G., 1928. The production of agglutinis by phytopathogenic bacteria. Phytopath., St. Paul, 18:277-288.
- GRAHAM, D.C., 1963. Serological diagnosis of potato blackleg and tuber soft rot. Plant Pathol., Harpenden, 12:142-144.

- HAGBORG, W.A.F., 1942. Classification revision in *Xanthomonas translucens* (J.J. & R.) Dowson. Can. J. Res., Ottawa, 20:312-326.
- HORGAN, E.S., 1931. The value of serological tests for the identification of *Pseudomonas malvacearum*. J. Bact., Baltimore, 22:287-293.
- International Code of Nomenclature of Bacteria and Viruses. Bacteriological Code 1958. Edited by the Editorial Board of the International Committee on Bacteriological Nomenclature. Ames, Iowa, U.S.A. The Iowa State University Press, 186 p.
- KIMATI, H., 1975. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Sensu ARX, 1957). Piracicaba, ESALQ/USP, 103 p. (Tese de Livre Docência).
- KLEMENT, Z., G.L. FARKAS e L. LOVREKOVICH, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopath., St. Paul, 54:474-477.
- KLEMENT, Z. e R.N. GOODMAN, 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Ann. Rev. Phytopath., Palo Alto, 5:17-44.
- LEMOS NETO, R.C., 1975. Estudo comparativo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens mineira e paulista do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Campinas, UNICAMP, 68 p. (Dissertação de Mestrado).

- LINK, G.K.K. e C.G. SHARP, 1927. Correlation of host and serological specificity of *Bacterium campestre*, *Bact. flaccumfaciens*, *Bact. phaseoli* and *Bact. phaseoli sojense*. Botan. Gaz., Chicago, 83:145-160.
- LINK, G.K.K., A.E. EDGECOMB e J. GORKIN, 1929. Further agglutination tests with phytopathogenic bacteria. Botan. Gaz., Chicago, 87:531-547.
- MORTON, D.J. 1965. Comparisons of three serological procedures for identifying *Xanthomonas* in pepper leaves. Phytopath., St. Paul, 55:421-424.
- MUSHIN, R., J. NAYLOR e N. NAHOVARY, 1959. Studies on plant pathogenic bacteria. II. Serology. Austr. J. Biol. Sci., Melbourne, 12:233-246.
- OLIVEIRA, A.R., 1967. Serologia aplicada ao estudo do vírus do anel do pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP, 40 p. (Tese de Doutorado).
- OLIVEIRA, A.R., 1975. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonóculo. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 1:61-64.
- OLIVEIRA, A.R., T. NAKAMURA, H.P. LIU e M.H. SUGIMORI, 1977. Serological tests applied to leaf scald disease of sugar cane. Proc. Intern. Soc. Sug. Cane Techn., 1:459-468.
- ORELLANA, R.G. e D.F. WEBER, 1971. Immunodiffusion analysis of isolates of *Xanthomonas cyamopsidis*. Appl. Microbiol., Baltimore, 22:622-624

- OUCHTERLONY, D., 1958. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: Progress in Allergy (D. Kallos ed) S. Karger, Basel, 5:1-78.
- PAHMEL, L.H., 1895. Bacteriosis of rutabaga (*Bacillus campestris* n. sp.). Bulletin of the Iowa State College Agriculture Experiment Station, Iowa, 27:130-134.
- SAINT JOHN BROOKS, R., K. NAIN e M. RHODES, 1925. The investigations of phytopathogenic bacteria by serological and biochemical methods. J. Path. Bact., 28:203-209.
- SCHAAD, N.W., 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopath., Palo Alto, 17:123-147.
- SHARP, C.G., 1927. Virulence, serological and other physiological studies of *Bacterium flaccumfaciens*, *Bact. phaseoli* and *Bact. phaseoli sojense*. Botan. Gaz., Chicago, 83:113-144.
- SHEKHAWAT, P.S. e B.P. CHAKRAVARTI, 1977. Serological tests of find out antigenic differences among isolates of *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson and some other phytopathogenic bacteria. Cur. Sci., Bangarole, 46:46-47.
- SMITH, E.F., 1897. A bacterial disease of cruciferous plants. Science, Washington, 5:963.
- STARR, M.P., 1959. Bacteria as plant pathogens. Ann. Rev. Microbiol., Palo Alto, 13:211-238.

- SUGIMORI, M.H., A.R. OLIVEIRA, T. NAKAMURA e J. RODRIGUES NETO. 1978. Anti-soro para *Pseudomonas garcae* (Amaral et alii) preparados pela técnica de injeção no linfonódu-
lo. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 4(1):7 (RESUMO).
- WERNHAN, C.C., 1948. The species value of pathogenicity in the genus *Xanthomonas*. Phytopath., St. Paul, 38:283-291.
- YANO, T., 1976. Estudo bacteriológico e sérológico de algumas amostras pertencentes a vários patotipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel)Dowson. Campinas, UNICAMP, 65 p. (Dissertação de Mestrado).
- YOUNG, J.M., D.W. DYE, J.F. BRADBURY, C.G. PANAGOPOULOS e C.F. ROBBS, 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N. Z. J. Agr. Res., Wellington, 21:153-177.