**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO
DE *Xanthomonas campestris*
EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum*
spp.), NOS ESTADOS DE
SÃO PAULO E PARANÁ**

MARIA LIGIA VEIGA CARVALHO

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. ERIC BALMER

**Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Uni-
versidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia,
Área de concentração: Fitopatologia.**

P I R A C I C A B A

**Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1991**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

C33l0 Carvalho, Maria Ligia Veiga
Ocorrência e caracterização de Xanthomonas
campestris em cana-de-açúcar (Saccharum spp.),
nos Estados de São Paulo e Paraná. Piracicaba, 1991.
76 p. illus.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica - Caracterização
2. Cana-de-açúcar - Doença - Resistência I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.61

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO
DE *Xanthomonas campestris*
EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum*
spp.) NOS ESTADOS DE
SÃO PAULO E PARANÁ**

MARIA LIGIA VEIGA CARVALHO

Aprovada em: 23.04.1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Eric Balmer

ESALQ/USP

Prof. Dr. Clélio Lima Salgado

ESALQ/USP

Dr. Mauro Hideo Sugimoto

INST. AGRONÔMICO CAMPINAS

Prof. Dr. Eric Balmer

Orientador

Para

minhas filhas

BEATRIZ e MARIANA,

alegria maior em

minha vida

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. ERIC BALMER , orientador desta dissertação, minha gratidão pelos conselhos e sugestões.

Ao Pesquisador Científico MS JULIO RODRIGUES NETO, do Instituto Biológico, pelo constante estímulo e sugestões apresentadas e pelas facilidades proporcionadas na execução dos trabalhos.

À Pesquisadora Científica MS IRENE MARIA GATTI DE ALMEIDA, do Instituto Biológico, pela inestimável e constante colaboração, durante a execução e redação do presente trabalho, mas, acima de tudo, por sua amizade sincera.

Ao DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ" que possibilitou a nossa participação no Curso de Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior- CAPES- pela concessão de Bolsa de Estudos durante o curso de Pós-Graduação.

Aos Pesquisadores Científicos MS VALDEMAR ATÍLIO MALAVOLTA JUNIOR e DENIZA A. PALAZZO, do Instituto Biológico, pelas sugestões e colaboração na revisão dos originais e pelo incentivo e apoio.

À Dr^a VICTÓRIA ROSSETTI pela valiosa orientação científica e estímulo pessoal recebidos no início da minha vida profissional.

À Pesquisadora Científica ERNA ELISABETH BACH, do Instituto Biológico, pela valiosa colaboração na realização dos testes serológicos.

Ao Dr. CÉSAR MARTINS CHAGAS, do Instituto Biológico, pelo importante auxílio na obtenção de fotomicrografias eletrônicas.

Ao colega SILVIO A. LOPES, pelo fornecimento de materiais de cana-de-açúcar, para isolamentos.

Ao Sr. SÉRGIO VIANNA, do Instituto Biológico, pela dedicação na obtenção de fotografias.

Ao Sr. WALTER GRAEBER, Chefe da Biblioteca do Instituto Biológico e demais funcionários, pelo valioso auxílio prestado.

A todos os Colegas e Funcionários da Seção de Doenças das Plantas Frutíferas do Instituto Biológico, pelo apoio e colaboração.

Aos Professores, Colegas do Curso de Pós-Graduação e Funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela amizade e incentivo.

A Srta. MOACIRA PERALLIS, pela dedicação e esmero no preparo dos originais.

A meu PAI, minha MÃE e IRMÃS, amigos insubstituíveis em todos os momentos de minha vida.

A meu ESPOSO e minha SOGRA, pelo incentivo, apoio e ajuda na realização de meus objetivos

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

Muito obrigada.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspectos gerais sobre a cultura da cana-de- açúcar.....	4
2.2. Aspectos gerais sobre o gênero <i>Xanthomonas</i> ..	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Culturas bacterianas	13
3.2. Meios de cultura	14
3.3. Isolamento do Patógeno	17
3.4. Caracterização do Patógeno	18
3.4.1. Características morfológicas	18
3.4.2. Características culturais	18
3.4.3. Características Bioquímicas e Fisioló- gicas	19
3.4.3.1. Relações com oxigênio.....	19
3.4.3.2. Utilização de compostos de carbono	20
3.4.3.3. Utilização de compostos nitro- genados	22
3.4.3.4. Decomposição de macromoléculas	23

3.4.3.5. Extração de xanthomonadina.....	24
3.4.3.6. Hipersensibilidade	24
3.4.3.7. Crescimento a 41°C.....	24
3.5. Serologia.....	25
3.5.1. Obtenção de antígeno imunizante.....	25
3.5.2. Obtenção de antissoro	26
3.5.3. Preparo dos antígenos para as reações serológicas.....	26
3.5.4. Testes serológicos	28
3.6. Testes de Patogenicidade.....	28
3.6.1. Inóculo utilizado	28
3.6.2. Substrato para manutenção das plantas	29
3.6.3. Técnicas de inoculação	29
3.6.4. Tipos de reações e comportamento de clones e variedade de cana-de-açúcar, frente ao patógeno, em condições de casa de vegetação.....	31
3.6.5. Comportamento de plantas de cana-de- açúcar, frente à diferentes bactérias em condições de casa de vegetação ...	32
3.6.6. Determinação de outros possíveis hos- pedeiros	33

4. RESULTADOS.....	35
4.1. Caracterização do Patógeno	35
4.1.1. Características morfológicas.....	35
4.1.2. Características culturais	35
4.1.3. Características Bioquímicas e Fisioló- gicas.....	37
4.1.3.1. Extração de xanthomonadina	37
4.1.3.2. Hipersensibilidade.....	41
4.1.3.3. Crescimento a 41°C	41
4.2. Testes serológicos	41
4.3. Testes de Patogenicidade	43
4.3.1. Técnicas de inoculação	43
4.3.2. Tipos de reação e comportamento de clones e variedade de cana-de-açúcar , frente ao patógeno, em condições de casa de vegetação	43
4.3.3. Comportamento de plantas de cana-de- açúcar, frente a diferentes bactérias em condições de casa de vegetação	51
4.3.4. Determinação de outros possíveis hos- pedeiros	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO
DE *Xanthomonas campestris*
EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum*
spp.), NOS ESTADOS DE
SÃO PAULO E PARANÁ

Autora: MARIA LIGIA VEIGA CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. ERIC BALMER

RESUMO

Este estudo objetivou caracterizar e identificar uma bactéria que vem ocasionando lesões foliares em cana-de-açúcar. Os sintomas observados, em campo, são semelhantes àqueles descritos para a doença Estria Vermelha, causada por *Pseudomonas rubrilineans*. Todavia, as colônias bacterianas isoladas a partir de materiais com estes sintomas não corresponderam às características daquele patógeno.

Foram, então, realizadas observações das características morfológicas, culturais, bioquímicas e fisiológicas das bactérias obtidas. A caracterização serológica foi feita através da técnica de dupla-difusão em ágar.

Em condições de casa de vegetação, utilizando-se quatro isolados da bactéria em estudo e plantas de cana-de-açúcar, avaliou-se três técnicas de inoculação: deposição do inóculo no cartucho, infiltração foliar e

infiltração no palmito. Os resultados mostraram que todos os métodos foram eficientes na reprodução de sintomas.

As reações de resistência caracterizaram-se por ausência de sintomas ou presença de pontos cloróticos isolados ou coalescentes, pequenas lesões necróticas avermelhadas circulares, circundadas por halos cloróticos podendo evoluir para lesões necróticas avermelhadas estreitas circundadas por regiões cloróticas; isoladas ou parcialmente coalescentes. Como reações de resistência moderada, foram consideradas a presença de pontos e lesões cloróticas estreitas e de lesões necróticas avermelhadas, estreitas e alongadas geralmente coalescentes mais longas e largas que as reações de resistência, podendo apresentar pontos ou pequenas áreas cloróticas associadas. As reações de suscetibilidade manifestaram-se pela coalescência de lesões necróticas avermelhadas, podendo atingir toda a largura do limbo foliar, geralmente com a presença de áreas cloróticas com pontos avermelhados associados.

Foi avaliado, em condições de casa de vegetação, o comportamento de plantas de cana-de-açúcar, quando inoculadas com *Pseudomonas rubrilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* e a bactéria em estudo. Os resultados mostraram que *P. rubrilineans* é mais exigente em umidade que as duas outras, necessitando, pelo menos, cinco dias de câmara úmida, após a inoculação, para o desen-

volvimento das lesões.

Não se observou diferenças significativas entre as reações das plantas às inoculações de *X.c. pv. vasculorum* e a bactéria em estudo. Foi determinada a patogenicidade de isolados destas duas bactérias em outras gramíneas de interesse econômico. Os dados obtidos mostraram que todos os isolados provocaram lesões foliares em plantas de milho, sorgo e aveia, mas não em plantas de trigo, em condições de casa de vegetação.

A análise dos resultados dos experimentos realizados permitiram caracterizar e identificar esta bactéria como pertencente ao gênero *Xanthomonas*, espécie *X. campestris*, sugerindo tratar-se do patovar *vasculorum*.

OCCURRENCE AND CHARACTERIZA-
TION OF *Xanthomonas*
campestris IN SUGARCANE
(*Saccharum* spp), IN THE STATES
OF SÃO PAULO AND PARANÁ

Author: MARIA LIGIA VEIGA CARVALHO

Adviser: Prof. Dr. ERIC BALMER

SUMMARY

The characterization and identification of a bacterium which cause lesions in sugarcane leaves was the object of this study. Symptoms observed in the field were similar to those described as Red Stripe, disease caused by *Pseudomonas rubrilineans*. However, the bacterial colonies isolated from sugarcane tissues with those symptoms did not correspond to that pathogen. Observations about morphological, cultural, biochemical and serological characteristics were made.

Sugarcane plants were evaluated by three inoculation methods: inoculum placed into the spindle, leaf infiltration with the bacterial suspension and injection of the suspension into the spindle.

The results showed that all the methods were efficient in reproducing the symptoms. Differences in the types of resistance and susceptibility reactions were detected and their frequency established when these plants were inoculated with bacterial isolates.

The resistance reactions were characterized by the absence of visible symptoms or by presence of isolated or coalescent chlorotic dots, and small, reddish, circular necrotic lesions surrounded by chlorotic halos; these lesions may become narrow and elongated, surrounded by chlorotic areas usually isolated or partially coalescent.

The moderate resistance reactions were characterized by presence of chlorotic areas containing reddish, circular necrotic lesions, or reddish, narrow and elongated necrotic lesions, usually coalescent, which are wider and longer than those observed on resistant plants and surrounded by chlorotic areas.

The susceptibility reactions comprised the coalescence of reddish, elongated necrotic lesions that can reach all the width of the leaf, usually with red-flecked chlorotic stripes.

The behavior of sugarcane plants when inoculated with *Pseudomonas rubriligneans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* and the bacterium studied was evaluated under greenhouse conditions. The results showed that *Pseudomonas rubriligneans* needs a period of high relative humidity longer than the two others, demanding at least 5 days in moist chamber, after inoculation, to develop lesions. No significant difference in the reaction was observed among the plants inoculated with *Xanthomonas*

campestris pv. *vasculorum* and with the bacterium in study. The pathogenicity of isolates of these two bacteria were established in other important crops of the "Gramineae" family. The data obtained under greenhouse conditions showed that all the isolates cause leaf lesions in corn, sorghum and oat plants but not in wheat plants. The analysis of the results allowed to characterize and identify this bacterium as belonging to genera *Xanthomonas*, species *X. campestris*. The possibility of belonging to the pathovar *vasculorum* could not be discarded.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar é um importante fator sócio-econômico, constituindo-se a base de três importantes agroindústrias: açúcar, álcool e aguardente.

O desenvolvimento de programa econômico utilizando o álcool como combustível, na tentativa de superação da atual crise mundial de energia, estimulou o plantio desta gramínea, sobretudo em fins da década de 1970 e início dos anos 80.

A expansão geográfica da cultura, a ampliação e modernização do parque industrial que mobilizou elevados recursos financeiros e o emprego maciço de mão de obra visou, obviamente, a máxima produção econômica. Todavia, esta produção é reduzida devido à vários fatores e entre estes, a incidência de fitopatógenos.

Entre os agentes fitopatogênicos, as bactérias causam graves problemas, sobretudo, devido às dificuldades de controle eficiente destes microrganismos.

Vários autores relatam bacterioses provocadas por representantes dos gêneros *Clavibacter*, *Erwinia*,

Pseudomonas e **Xanthomonas** causando doenças em cana-de-açúcar, constituindo-se a maioria em importantes problemas onde se cultiva esta gramínea (HUGHES, 1961; ANTOINE, 1965; TOKESHI, 1980; SANGUINO, 1987).

Dentro do gênero **Xanthomonas**, afetando plantas de cana-de-açúcar, no país, TOKESHI (1980), ROBBS et alii, (1982) e SANGUINO (1987) mencionaram a ocorrência de apenas uma espécie, **Xanthomonas albilineans** (Ashby) Dowson; agente causal da escaaldadura das folhas.

Entretanto, em 1988, isolamentos realizados a partir de folhas de cana-de-açúcar, mostrando sintomas semelhantes aos de Estria Vermelha, doença incitada por **Pseudomonas rubrilineans** (Lee, Purdy, Barnum & Martin) Stapp, resultaram em colônias viscosas, de coloração amarela, típicas do gênero **Xanthomonas** (ALMEIDA et alii, 1989).

Testes preliminares e comparação de sintomas permitiram distinguí-las de **X. albilineans**, fazendo crer tratar-se de um patógeno ainda não assinalado em nossas condições.

A constatação desta doença incidindo sobre variedades de cana-de-açúcar, nos Estados de São Paulo e Paraná, motivou o presente trabalho que teve como objetivos:

- Caracterização morfológica, cultural, bioquímica, fisiológica e serológica da bactéria isolada a partir de variedades de cana-de-açúcar.

- Determinação dos tipos de reações de resistência e suscetibilidade e o comportamento de plantas de cana-de-açúcar, frente ao patógeno, em condições de casa de vegetação.

- Determinação de possíveis hospedeiros, entre outras gramináceas de interesse econômico, através de inoculações experimentais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais sobre a cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L., pertence à família Gramineae, que inclui cerca de 5.000 espécies de plantas.

A origem e evolução desta cultura não são bem definidas, havendo entretanto um consenso de que seja originária da Índia, China ou do Arquipélago Malaio.

MACHADO JR. (1987) relata que a cana-de-açúcar não é conhecida em seu estado selvagem, provavelmente pela seleção realizada através dos tempos, pelo homem primitivo, dos materiais de melhor aspecto, maior teor de sacarose e menor quantidade de fibras.

Atualmente, a cana-de-açúcar é cultivada comercialmente em quase todos os países tropicais e subtropicais, principalmente, entre os paralelos 35°N e 35°S (ALFONSI et alii, 1987).

Em princípios do século XVI, esta cultura foi introduzida nas Américas pelos colonizadores portugueses e espanhóis. No Brasil, a cultura se estabeleceu, sobretudo, com algumas variedades de canas nobres com ele-

vados teores de sacarose mas altamente suscetíveis ao vírus do mosaico.

Esta virose foi introduzida no Brasil em 1920, através da importação das variedades javanesas, P.O.J., ocorrendo primeiro no Estado de São Paulo, de onde se disseminou para quase todas as regiões produtoras, causando enormes quedas na produção (BITANCOURT, 1939).

SANGUINO (1987) relata que, no Estado de São Paulo, surtos epidêmicos desta doença, na década de 1920, provocaram redução da produção de açúcar em 93% e a de álcool em 90%.

Com a produção de híbridos tolerantes ou resistentes ao mosaico, iniciou-se a substituição dos canaviais afetados com o plantio das novas variedades P.O.J., híbridas de *S. officinarum* L. com *S. spontaneum* L. Mant e *S. barberi* Jeswiet. Desta forma, por volta de 1930, segundo TOKESHI (1980), praticamente 93% dos canaviais paulistas eram resistentes ao vírus do mosaico.

Uma nova substituição das variedades foi iniciada em fins de 1947, determinada pela constatação do carvão da cana-de-açúcar em 1946, no município de Assis (SP). Esta doença, causada pelo fungo *Ustilago scitaminea* Sydow, provocou redução de até 70% da produção nas variedades mais suscetíveis (TOKESHI, 1980).

A necessidade de novas variedades, resisten-

tes às doenças prevalentes em cada região de cultivo de cana-de-açúcar, determinou a criação de programas de melhoramento genético. Nesses programas, procurou-se associar a resistência à patógenos com maior produtividade e adaptação a diferentes condições de clima e solo, bem como outros aspectos importantes para a produção.

O trabalho de melhoramento e introdução contínua de variedades foi um dos fatores que permitiu a expansão da cultura canavieira, elevando o Brasil à primeira posição na produção mundial de cana e álcool e a segunda de açúcar. O Estado de São Paulo ocupa lugar de destaque, tendo sido responsável por cerca de 42% da produção nacional de açúcar e 65,4% de álcool, na safra 89/90 (COPERSUCAR, 1990).

Todavia, para a obtenção do máximo rendimento nesta e em qualquer cultura, torna-se necessário o emprego de técnicas agrícolas modernas, dentre as quais o controle racional de pragas e doenças que, sob determinadas condições, podem reduzir drasticamente a produção.

Entre as bacterioses em cana, observadas no Brasil, SANGUINO (1987) relata: Escaldadura das Folhas, causada por *Xanthomonas albilineans*; Raquitismo da soqueira provocado por *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris); Estria Vermelha incitada por *Pseudomonas rubrilineans*.

TOKESHI (1980) e ROBBS et alii (1982) acrescentam Estria Mosqueada, causada por *Pseudomonas rubrisulbalbicans* (Christopher & Edg.) Sav.

HUGHES (1961) e RYAN et alii (1986) citam a ocorrência, na Austrália, da doença "Bacterial Mottle" (mosqueado bacteriano) incitada por *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* (Sabet), Victoria, Arboleda & Munõz.

Dentro do gênero *Xanthomonas*, BRADBURY (1986), relaciona, além de *X. albilineans*, outra espécie provocando doença em cana-de-açúcar, em vários países produtores inclusive no Brasil: *X. campestris* pv. *vasculorum* (Cobb) Dye.

HAYWARD (1962) relatou a ocorrência de uma *Xanthomonas* isolada de cana-de-açúcar, de Natal e Trinidad e realizou estudos comparativos incluindo 41 isolados de *X.c.* pv. *vasculorum*, de diferentes procedências. Os isolados de Natal e Trinidad mostraram-se mais ativos, bioquimicamente, que todos os isolados de *X.c.* pv. *vasculorum*, desenvolveram-se a 40-42°C e provocaram aparecimento de estrias foliares vermelhas, estreitas e descontínuas em variedade suscetível de cana-de-açúcar, mas sem produção de goma.

Mais recentemente, QHOBELA & CLAFLIN (1989) observaram, em plantas de cana-de-açúcar, a ocorrência de outra *Xanthomonas*, associada à *X.c.* pv. *vasculorum*, formando dois grupos com características distintas. Com base nas diferenças notadas, estes autores propuseram a deno-

minação de *X. officinarum* sp. nov., para o grupo que consideraram uma nova espécie. Entre as características desta nova espécie os autores relatam a patogenicidade à cana-de-açúcar, mas não ao milho e sorgo.

Draenert¹ mencionado por HUGHES (1961), publicou na Alemanha, em 1869, o primeiro relato de ocorrência de *X.c. pv. vasculorum* em cana-de-açúcar, com base em observações realizadas nas regiões produtoras da Bahia e Pernambuco.

Esta bactéria é citada na literatura internacional como agente causal de "Gumming Disease", "Maladie de la Gomme", "Cobb's disease of Sugar cane", "Gummosis of Sugarcane" (HUGHES, 1961; ANTOINE, 1965; BRADBURY, 1986).

De acordo com DANTAS (1960), esta doença teria ocorrido em canaviais de Pernambuco e Bahia, na segunda metade do século passado, com os nomes de "Doença da Cana", "Gomose da Caiana" e "Gomose bacilar". Neste trabalho, o autor comparou os artigos da época, com descrições dos sintomas e o comportamento de diferentes variedades àquela doença, com trabalhos posteriores realizados em outros países. Dado ao número de coincidências de informações, concluiu que, muito provavelmente, o agente da "Gumming disease" teria sido a causa da "Gomose da Caiana", que ocorreu em nosso país.

¹DRAENERT; F.M., 1869. Bericht über die Krankheit des Zuckerrohres. Zeitschrift für Parasitenkunde, Bd. I: 13-17

Todavia, BITANCOURT (1939) e TOKESHI (1980) consideraram muito difícil a comprovação científica da descrição, em virtude do relato basear-se apenas na sintomatologia da doença, não tendo sido confirmada através do isolamento do patógeno e preenchimento dos Postulados de Koch.

Cabe ressaltar que não tem sido assinalado nenhum caso novo da doença, no Brasil, desde aquela ocasião, há mais de um século.

2.2. Aspectos gerais sobre o gênero *Xanthomonas*.

Todas as espécies representantes deste gênero são consideradas, até o momento, como patógenos específicos de plantas, tendo sido somente isoladas de plantas vivas ou associadas à material vegetal, com exceção de *X. maltophilia*, espécie encontrada no solo, água e em material vegetal. A transferência de *Pseudomonas maltophilia*, para o gênero *Xanthomonas* foi proposta por SWINGS et alii (1983), com base na maior homologia DNA-rRNA de *P. maltophilia* com *Xanthomonas* que com *Pseudomonas*. Entretanto, SCHAAD (1988) não considera esta espécie, visto que este organismo é multiflagelado, não produz xanthomonadina, não forma colônias mucóides em meio com glicose e reduz nitrato a nitrito, características não encontradas entre as *Xanthomonas*.

Assim, dentro deste gênero, SKERMAN et alii (1980) e BRADBURY (1986), SCHAAD (1988) consideraram válidas cinco espécies:

Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson, 1939

Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson, 1943

Xanthomonas axonopodis Starr & Garces, 1950

Xanthomonas fragariae Kennedy & King, 1962

Xanthomonas ampelina Panagopoulos, 1969

Esta última espécie foi excluída deste gênero, sendo então reclassificada como **Xylophilus ampelinus**, em virtude de diferir de algumas características significativas do gênero **Xanthomonas** (WILLENS et alii, 1987).

Todas as espécies deste gênero apresentam as seguintes características: Gram-negativas, aeróbicas, bastonetiformes, um único flagelo polar, não reduz nitrato a nitrito, catalase positiva, oxidase negativa e, incapaz de utilizar asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio. São fracas produtoras de ácidos a partir de carboidratos e formam colônias mucóides, convexas, amarelas e brilhantes, nos meios NGA e YDC. A maioria produz grande quantidade de polissacarídeo extracelular, fonte de Xanthana, em meio contendo glucose. A maioria produz um pigmento amarelo, xanthomonadina, insolúvel em água e solúvel em éter de petróleo, metanol e benzeno. Este pigmento mostra, em espectrofotômetro, um pico de absorção máxima, em cerca de 445nm e geralmente apresenta dois picos secundários ("shoulders") nos comprimentos de onda cerca de

22nm abaixo e 25nm acima do pico máximo principal (STARR, 1983), enquanto SCHAAD (1988) define os comprimentos de onda 420, 441 e 468 nm, para os pigmentos extraídos com metanol.

A espécie *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, 1939, se destaca por incluir mais de 120 patovares descritos. O termo patovar foi proposto por DYE et alii (1980), e vem sendo utilizado para distinguir um ou um grupo de isolados com características iguais ou semelhantes, diferenciadas a nível infrasubespecífico, de outros isolados da mesma espécie ou subespécie, com base na patogenicidade a uma ou mais plantas hospedeiras.

O critério da determinação das espécies de *Xanthomonas* ser dependente da especialização ao hospedeiro foi questionado por STARR (1983) analisando trabalhos de vários pesquisadores. O autor observou que na maioria dos trabalhos de avaliação da patogenicidade, utiliza-se somente a mesma espécie de hospedeiro da qual a bactéria foi isolada sendo que poucos trabalhos incluem também algumas espécies botanicamente relacionadas mas nunca espécies botânicas não relacionadas.

Anteriormente, DYE (1962) já questionava a validade de classificação das espécies do gênero *Xanthomonas* baseada em especialização fitopatogênica visto que a gama de hospedeiros nunca foi completamente definida.

Dye¹, mencionado por STARR (1983), trabalhando com 20 diferentes espécies de *Xanthomonas* normalmente não patogênicas ao feijão, observou que os isolados adquiriram a habilidade de provocar doença, após passagens seriadas em plântulas de feijão sob condições de alta umidade. Através dos dados obtidos Dye concluiu que a especificidade ao hospedeiro não é uma característica estável, dentro do gênero *Xanthomonas*.

¹DYE, D.W. Host specificity in *Xanthomonas*. *Nature*, London, 182: 1813-14, 1958.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Culturas bacterianas

Foram utilizadas, nestes estudos, 6 culturas de *Xanthomonas campestris* obtidas através de isolamentos a partir de lesões em folhas de cana-de-açúcar (Tabela 1).

Essas culturas foram purificadas e preservadas através de liofilização, segundo as técnicas descritas pela NEW ZEALAND REFERENCE CULTURE COLLECTIONS OF MICROORGANISMS (1971). Como crioprotetor, foi utilizada uma solução de sacarose 10% e peptona a 10%, esterilizadas, separadamente e reunidas na proporção de 4:1 (v:v).

Estes isolados passaram a fazer parte do acervo da Coleção de Culturas da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico (IBSBF).

Para estudos comparativos, foram utilizadas 1 cultura de *P. rubrilineans*, 1 de *X. campestris* pv. *campestris* e 4 de *X. campestris* pv. *vasculorum*, cuja origem e procedência estão expressas na Tabela 2.

Tabela 1. Código e origem das culturas de *Xanthomonas campestris*, isoladas de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos do gênero *Saccharum*) utilizadas nos experimentos.

CÓDIGO IBSBF	VARIEDADE	ORIGEM
<hr/>		
656	SP 71-3501	Sertãozinho-SP
660	SP 70-1143	19 de Maio-PR
661	SP 70-1143	Sertãozinho-SP
665	SP 71-6180	Sertãozinho-SP
728	SP 71-3501	Piracicaba-SP
730	CP 50-28	19 de Maio-PR

3.2. Meios de cultura

Para os isolamentos, manutenção de culturas e obtenção de populações bacterianas foram utilizados os meios de cultura, cujas composições se seguem:

Tabela 2: Código, origem e referência das culturas bacterianas utilizadas nos experimentos

IBSBF	PATÓGENO	HOSPEDEIRO	ORIGEM	ESTIRPE
247	<u>Xanthomonas campestris</u> pv. <u>campestris</u>	<u>Brassica oleracea</u> var. <u>capitata</u>	Brasil	
342	<u>Pseudomonas rubrilineans</u>	<u>Saccharum officinarum</u>	Ilha Réunion	NCPPB 920
667	<u>X.c.</u> pv. <u>vasculorum</u>	<u>Roystonea regia</u>	Ilha Mauritius	NCPPB 187
668	<u>X.c.</u> pv. <u>vasculorum</u>	<u>Thysanolaena maxima</u>	Ilha Mauritius	NCPPB 893
695	<u>X.c.</u> pv. <u>vasculorum</u>	<u>S. officinarum</u>	Ilha Mauritius	ICMP 5757
696	<u>X.c.</u> pv. <u>vasculorum</u>	<u>S. officinarum</u>	Ilha Réunion	ICMP 362

NCPPB= National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden-England

ICMP= International Collection of Micro-organisms from Plants, Auckland-New Zealand

Nutriente Ágar (NA) (LEVINE, 1954), utiliza-
do nos isolamentos e manutenção de culturas:

Peptona.....	5,0g
Extrato de carne	3,0g
NaCl	5,0g
Ágar	15,0g
Água destilada.....	1.000ml
pH 7,0	

O meio líquido, caldo nutritivo (CN), tem a
mesma composição, excetuando-se o ágar.

DYGS (modificado) (RODRIGUES NETO et
alii, 1986), utilizado na obtenção de populações bacteria-
nas:

Dextrose	2,0g
Peptona	1,5g
Extrato de levedo	2,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ 7.H ₂ O	0,5g
Ácido glutâmico	1,5g
Ágar	18,0g
Água destilada	1000ml
pH 7,0	

As referências dos demais meios de cultura utilizados em testes específicos, estão relacionadas nos itens correspondentes.

3.3. Isolamento do Patógeno

As bactérias foram isoladas a partir de folhas de plantas de cana-de-açúcar com sintomas de riscas avermelhadas. Segmentos de folhas com estes sintomas foram, inicialmente, desinfestados superficialmente com algodão embebido em álcool e lavados com água destilada. Fragmentos do material foram, em seguida, observados ao microscópio óptico para visualização de fluxo bacteriano oriundo do tecido afetado.

Após a confirmação da presença de células bacterianas, fragmentos do tecido adjacente ao observado foram submetidos ao seguinte tratamento: imersão em álcool 95% por 1 minuto, transferência para solução de hipoclorito de sódio 5%, por 1 minuto e, finalmente, duas lavagens rápidas em água destilada estéril.

Em seguida os fragmentos foram macerados com cerca de 1ml de água destilada estéril e com uma alça de platina procedeu-se a semeadura em meio NA, sob forma de riscas (SINGLETON & SAINSBURY, 1981).

As placas sementeadas foram mantidas a 27°C, durante 72 horas, quando então puderam ser evidenciadas colônias isoladas.

3.4. Caracterização do Patógeno

3.4.1. Características morfológicas

Para o estudo morfológico foram feitas as seguintes observações: coloração de Gram, prova de motilidade em gota pendente e obtenção de fotomicrografias eletrônicas, para avaliação das dimensões celulares, localização e número de flagelos. Nestes testes, foram empregadas culturas incubadas por 72 horas, a 27°C, em meio DYGS.

3.4.2. Características culturais

Foram realizadas observações sobre o tipo de crescimento, forma e coloração das colônias, em meio sólido e em tubos contendo Caldo Nutritivo (CN). As incubações foram feitas a 27°C, por 72 horas.

3.4.3. Características Bioquímicas e Fisiológicas

O inóculo inicial, utilizado para a realização das provas bioquímicas e fisiológicas, foi obtido a partir de culturas desenvolvidas em meio DYGS, com 72 horas de incubação a 27°C. As exceções estão assinaladas nos itens correspondentes.

As avaliações para os diferentes testes foram feitas dentro dos períodos determinados para cada um deles, segundo sua especificidade. Os testes foram realizados com todos os isolados de *Xanthomonas campestris* constantes das Tabelas 1 e 2 .

3.4.3.1. Relações com Oxigênio

As relações dos isolados com o oxigênio foram observadas através dos seguintes testes:

- Produção de catalase

Adotou-se o método descrito por DYE (1962) para avaliar a presença de catalase, enzima que cataliza a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

- Oxidase de Kovacs

Este teste detecta a presença do citocromo C (Oxidase positiva) na cadeia respiratória, tendo sido empregado o método de KOVACS (1956) para esta observação.

3.4.3.2. Utilização de compostos de carbono

A avaliação da capacidade de utilização de determinados carboidratos pelos isolados foi realizada através de diferentes testes, conforme segue:

- Metabolismo oxidativo/fermentativo (O/F)

Foi utilizada a metodologia descrita por HUGH & LEIFSON (1953) para determinar o tipo de metabolismo envolvido na utilização da glicose: oxidativo ou fermentativo.

- Crescimento em meio de asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio

Foi utilizada a técnica descrita por STARR et alii (1943).

A inoculação no meio de asparagina foi feita a partir de cultura desenvolvida em NA. Para evitar que a presença de outros elementos, além da asparagina pudessem ser utilizados para crescimento da bactéria, foram feitas 4 transferências sucessivas, a intervalos de 5 dias. A prova de que a impossibilidade de crescimento da bactéria se deve à composição do meio e não à morte da bactéria foi realizada através de transferências paralelas para meio CN.

- Produção de ácidos a partir de carboidratos

Para este teste utilizou-se o meio básico de AYERS et alii (1919).

Os açúcares, na concentração final de 0,5%, esterilizados por filtração, foram adicionados, assepticamente, ao meio básico autoclavado e resfriado.

Avaliou-se a produção de ácidos a partir do metabolismo dos seguintes carboidratos: adonitol, arabinose, celobiose, dulcitol, frutose, galactose, glicerol, alfa-metil-D-glicoside, inositol, inulina, lactose, maltose, manitol, manose, rafinose, rarnnose, sacarose, salicina, sorbitol, trealose e xilose.

- Utilização de ácidos orgânicos

Para esta avaliação, utilizou-se o mesmo meio básico do sub-ítem anterior, acrescentando-se, na concentração final de 0,2%, os seguintes ácidos orgânicos na forma de sais de sódio: acetato, benzoato, citrato, malonato, oxalato, succinato e tartarato.

- Reação de Voges-Proskauer

Este teste objetivou detectar a presença de acetoina (acetilmetil-carbinol), substância formada a partir da fermentação da glicose.

Foi utilizado o meio líquido YS, ao qual foi adicionado glicose (0,5%) esterilizada por filtração, de acordo com DYE (1962). A detecção de acetoina no meio é feita acrescentando-se os reagentes alfa-naftol a 5% em álcool absoluto e KOH a 40%.

3.4.3.3. Utilização de compostos nitrogenados

Foram realizados os seguintes testes para avaliar a utilização de compostos nitrogenados.

- Produção de gás sulfídrico

Utilizou-se o YS líquido como meio básico, ao qual foi acrescentado 0,1% de cisteína-HCl, um dos meios recomendados por DYE (1962). A detecção do gás sulfídrico (H_2S) é feita pelo escurecimento de tiras de papel de filtro impregnadas com acetato de chumbo, suspensas sobre o meio.

- Produção de indol

Para o crescimento das culturas, por 5 dias, foi utilizado meio com triptona (DYE, 1962). A avaliação da produção de indol foi feita através da adição do reativo de Kovacs (LELLIOTT & STEAD, 1987).

- Redução de nitratos

Adotou-se, para este teste, o meio de cultura utilizado por DYE (1962) e após o período de incubação, foi adicionado o Reagente de Follet-Ratcliff (LELLIOTT & STEAD, 1987), para a verificação da presença de nitritos.

- Urease de Christensen

A atividade da urease, enzima que decompõe a uréia em amônia e dióxido de carbono, foi avaliada pelo método descrito por CHRISTENSEN (1946).

3.4.3.4. Decomposição de macromoléculas

A capacidade dos isolados em decompor macromoléculas foi determinada pelos testes:

- Hidrólise de amido

Foi utilizado o meio YNA, acrescido de 0,2% de amido solúvel, de acordo com FAHY & HAYWARD (1983). Para observação de presença de amilase, as placas foram cobertas com solução de lugol, 72 horas após o plaqueamento.

- Hidrólise de gelatina

A produção de gelatinase, enzima proteolítica, foi avaliada através do método relacionado por LELLIOTT & STEAD (1987).

- Hidrólise de Tween 80

A avaliação da atividade esteárica dos isolados foi feita com o método compilado por LELLIOTT & STEAD (1987).

3.4.3.5. Extração de xanthomonadina

Foi utilizada a metodologia descrita por IREY & STALL (1982) para a extração do pigmento xanthomonadina e seu espectro de absorção foi determinado com espectrofotômetro.

3.4.3.6. Hipersensibilidade

Foram efetuadas inoculações por infiltração, de suspensões bacterianas aquosas, com concentrações superiores a 10^8 UFC/ml, em folhas de fumo (KLEMENT et alii, 1964) da cultivar White Burley, para observação de reações de hipersensibilidade. Foram igualmente inoculadas folhas de tomateiro cultivar Santa Cruz (LELLIOTT & STEAD, 1987).

3.4.3.7. Crescimento a 41°C

Neste teste foi avaliada a capacidade de crescimento a 41°C, dos seguintes isolados: IB5BF 247, 342, 696 e 661 de *X. campestris* pv. *campestris*, *P. rubri-linenans*, *X. campestris* pv. *vasculorum* e *X. campestris* pv.

indeterminado, respectivamente. Utilizou-se meio YS líquido inoculado com as culturas e uma testemunha, não inoculada, incubadas por 7 dias em banho-maria (HAYWARD, 1962).

3.5. Serologia

3.5.1. Obtenção de antígeno imunizante

O isolado IBSEF 661, utilizado para a obtenção do antígeno, foi cultivado em placas de Petri, contendo meio DYGS. Após 72 horas, as colônias foram removidas com alça de Drigalsky e preparada suspensão aquosa (S-1), com concentração ajustada para 70% de transmitância (560nm) em espectrofotômetro. Aliquota de 10ml da suspensão bacteriana a 70% T (S-2) foi centrifugada a 4000g. por 20 minutos, descartando-se o líquido sobrenadante (LS-1). O sedimento (P) foi ressuspendido com 1ml de solução salina (NaCl 0,85%) estéril e emulsionado com 1ml de adjuvante de Freund completo, constituindo-se no antígeno para imunização (Figura 1).

3.5.2. Obtenção de antissoro

Para a produção de antissoro foi empregado um coelho da raça Nova Zelândia, pesando cerca de 3kg. Antes da imunização foi feita uma sangria para obtenção do soro normal (SN).

O coelho foi imunizado através de injeções de 0,5ml do antígeno em cada linfonódulo, em uma única aplicação (OLIVEIRA, 1975).

O antissoro foi obtido através de sangrias da veia marginal na orelha do coelho imunizado, realizadas nos 20º e 40º dias, após a imunização. O sangue coletado foi deixado em repouso durante 24 horas, à temperatura de 4°C., para a separação do coágulo. O soro foi, então, centrifugado a 3.000g, por 10 minutos, para remoção das hemácias restantes, acondicionado em frascos de vidro, com adição de Merthiolate 1:1000 e armazenado a -18°C.

3.5.3. Preparo dos antígenos para as reações serológicas

O cultivo dos isolados e preparação das suspensões bacterianas (S-1) seguiu a mesma técnica descrita no item 3.5.1.

Alíquotas de 10ml das suspensões bacterianas a 70% T (S-2) foram centrifugadas (4.000g/20 min.) e o sobrenadante (LS-1) eliminado. Ao precipitado (P) foi

Figura 1. Preparo de antígenos para imunização e para reações serológicas.

adicionado 1ml de ácido acético 0,03N e mantido em banho-maria fervente por 45 minutos, constituindo-se nos antígenos somáticos para as reações serológicas (NAMEKATA, 1971) (Figura 1).

3.5.4. Testes serológicos

O teste empregado foi o de dupla difusão em ágar (OUCHTERLONY, 1958), com o gel (ágar a 1% em tampão fosfato 0,01M, pH 7,2) distribuído em alíquotas de 5ml sobre lâminas de microscopia. Os orifícios no gel foram feitos com o aparelho Furagar (LEITE & OLIVEIRA, 1975), em vários modelos.

Antissoros e antígenos foram distribuídos nos orifícios do gel por meio de pipetas de Pasteur. As lâminas foram mantidas em placas de Petri, com algodão umidificado, até a observação dos resultados, após 4 dias.

3.6. Testes de Patogenicidade

3.6.1. Inóculo utilizado

A partir de culturas bacterianas, desenvolvidas em meio DYGS, por 72 horas a 27°C, foram preparadas suspensões aquosas e ajustadas em espectrofotômetro a uma leitura de 70% de transmitância em uma densidade óptica

(D0) 560nm, para a concentração aproximada de 10^8 Unidades Formadoras de Colônias/ml (UFC/ml).

3.6.2. Substrato para manutenção das plantas

As plantas utilizadas nos testes foram cultivadas em sacos plásticos com capacidade de 5 litros, contendo substrato constituído de uma mistura de esterco de curral, areia e solo argiloso, na proporção de 1:2:4, respectivamente.

3.6.3. Técnicas de inoculação

Utilizaram-se plantas de cana-de-açúcar (clone TUC71-7 x RB72454) e as inoculações foram feitas com os isolados IBSBF 660, 661, 728 e 730.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Estação Experimental de Campinas, do Instituto Biológico, com plantas de cerca de 90 dias após emergência.

Para cada isolado, empregaram-se 3 métodos de inoculação (utilizando-se 1 planta por vaso, com 3 repetições), a saber:

- a) deposição do inóculo no cartucho: 1,0ml de inóculo foi depositado com uma pipeta automática no interior do cartucho formado pelas folhas emergentes de cada planta.

- b) infiltração foliar: cerca de 1,0ml de inóculo foi injetado, através de seringa hipodérmica, munida de agulha 10x3, na região mediana de folhas jovens.
- c) infiltração no palmito: mesmo procedimento do método anterior, aplicado cerca de 5-10cm abaixo do ponto de emergência das folhas, com agulha 10x5.

Foram mantidas plantas controle, inoculadas com água destilada estéril.

O piso da casa de vegetação, sob as bancadas, neste e nos demais experimentos, continham serragem de madeira encharcada com água, para a manutenção de elevada umidade relativa do ar.

A avaliação final foi feita 15 dias após a inoculação e baseou-se na ocorrência de lesões em folhas, obedecendo ao seguinte critério de notas:

0 = ausência de sintomas visíveis

1 = pontos cloróticos, pequenas lesões necróticas avermelhadas com halos cloróticos; lesões necróticas avermelhadas estreitas e alongada isoladas ou parcialmente coalescentes.

2 = lesões necróticas avermelhadas, alongadas geralmente coalescentes, mais longas e largas que em 1 e circundada por áreas cloróticas.

3 = coalescência de lesões necróticas avermelhadas, alongadas, ocupando grandes porções do limbo foliar e circundadas por áreas cloróticas

3.6.4. Tipos de reações e comportamento de clones e variedades de cana-de-açúcar, frente ao patógeno, em condições de casa de vegetação

Neste ensaio foram empregados os clones NCo 310 x RB725147 e TUC71-7 x RB72454 (Programa de Melhoramento IAA/Planalsucar) e a variedade NA 56-79, com 6 repetições.

Foram utilizados os seguintes isolados IBSBF: 656, 660, 661, 728 e 730, além de *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum*, isolados 695 e 696, incluídos para efeito comparativo.

Foi adotado a infiltração no palmito, como método de inoculação, tendo as plantas controle recebido água destilada estéril. Após a inoculação, as plantas foram mantidas à temperatura ambiente, em casa de vegetação. As avaliações foram feitas 15 dias após as inoculações.

Tipos de reações

Este teste teve por finalidade detectar variações nos tipos de reações dos hospedeiros, caracteri-

zando através de sua manifestação, plantas resistentes, moderadamente resistentes e suscetíveis. As determinações foram feitas baseadas no critério de notas, definido no teste anterior.

Comportamento de clones e variedade

Foi avaliado também o comportamento dos clones e variedades frente aos diferentes isolados. Para tanto, utilizou-se o critério de notas descritos no sub-ítem anterior, considerando-se a média dos pontos das seis repetições para cada clone e/ou variedade. As notas 0 e 1 foram atribuídas a materiais considerados como resistentes, enquanto que as notas 2 e 3 foram atribuídas, respectivamente, a materiais moderadamente resistentes e suscetíveis.

Buscou-se, ainda, determinar a frequência dos tipos de reações nos materiais testados. Os parâmetros empregados foram as descrições dos sintomas de resistência, resistência moderada e suscetibilidade que se constituíram nos resultados do teste anterior.

3.6.5. Comportamento de plantas de cana-de-açúcar, frente a diferentes bactérias em condições de casa de vegetação

Este experimento visou comparar o comporta-

mento de plantas de cana-de-açúcar, frente a inoculação de *Pseudomonas rubrilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vascularum* e *Xanthomonas campestris* pv. indeterminado.

Adotou-se como método de inoculação a infiltração no palmito de plantas da variedade IAC51-205, com 90 dias de idade. A inoculação seguiu os procedimentos já descritos no item anterior. Utilizou-se os seguintes isolados IBSBF 342, 661 e 695.

As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, divididas em 2 lotes: com e sem cobertura com sacos plásticos transparentes, para formação de câmaras úmidas, com 3 repetições.

3.6.6. Determinação de outros possíveis hospedeiros

Neste experimento buscou-se avaliar o comportamento de outras gramíneas, de interesse comercial, em relação aos isolados IBSBF 656, 661 e 665 tendo sido incluído nestes testes um isolado de *X. campestris* pv. *vascularum* (IBSBF 695).

Os testes foram conduzidos em casa de vegetação e a inoculação seguiu o procedimento descrito no item 3.6.4.

Foram utilizadas 2 linhagens de milho (AG 106, M401), 2 cultivares de sorgo granífero (Contigração 111 e DK 64), 2 cultivares de trigo (Anahuac e BH 1146) e 1 cultivar de aveia (IAC 5). Foram inoculadas 10 plântulas

de cada material, com 35 dias após a semeadura.

A avaliação final foi realizada 10 dias após a inoculação, através da observação de presença de lesões foliares.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do Patógeno

4.1.1. Características Morfológicas

Através de observações ao microscópio óptico, as bactérias se mostraram na forma de bastonetes, com extremidades arredondadas, normalmente isoladas, móveis e Gram negativas.

As fotomicrografias eletrônicas evidenciaram a presença de um único flagelo polar, e as dimensões da bactéria foram avaliadas em 1,2-2,0 μm $\times$ 0,4-0,6 μm . (Figura 2).

4.1.2. Características Culturais

Placas com Nutriente Agar- As colônias das bactérias, observadas 48 horas após o plaqueamento, com o uso de microscópio estereoscópico, se apresentaram com formato circular, bordos inteiros e lisos, de coloração amarela, brilhantes, convexas e viscosas.

Figura 2. Fotomicrografia eletrônica da bactéria *Xanthomonas campestris*, obtida a partir de uma colônia experimental, constatatada negativamente com acetato de uranila 2% em solução aquosa. (Ampliação 23.473x).

Placas com meio DYGS - As colônias bacterianas apresentaram crescimento mais vigoroso mantendo, todavia, constantes as características de forma e coloração.

Caldo Nutritivo - Observou-se a formação de uma película, na superfície do meio, após 48-72 horas de cultivo e leve turvação no restante do meio.

4.1.3. Características Bioquímicas e Fisiológicas

Os resultados das provas bioquímicas e fisiológicas estão expressos na Tabela 3.

4.1.3.1.Extração de xanthomonadina

O pigmento amarelo, extraído dos isolados, foi identificado como xanthomonadina, através do espectro de absorção, com um pico principal e dois picos secundários ("shoulders") nos comprimentos de onda aproximados de 440, 420 e 460nm, respectivamente, para todos os isolados. A Tabela 4 apresenta valores de absorbância obtidos em espectrofotômetro, nos diferentes comprimentos de onda. A Figura 3 expressa o comportamento deste pigmento para o isolado 661.

Tabela 3. Características bioquímicas, fisiológicas e reações de hipersensibilidade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (X.c.c), *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* (X.c.v) e *Xanthomonas campestris* pv. indeterminado (X.c.i) do Brasil.

CARACTERISTICAS	X.c.c.	X.c.v.	X.c.i.
Relação com oxigênio			
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
Utilização de compostos de carbono			
Metabolismo oxidativo/fermentativo	0	0	0
Crescimento em meio de asparagina	-	-	-
Produção de ácidos a partir de:			
arabinose, frutose, galactose,	+	+	+
manose, celobiose, glicerol,	+	+	+
sacarose, trealose	+	+	+
salicina, inositol, dulcitol,	-	-	-
sorbitol, adonitol, inulina,	-	-	-
lactose, ramnose, rafinose,	-	-	-
alfa-metil-D-glicoside,	-	-	-
maltose, manitol	-	-	-
Utilização de ácidos orgânicos			
acetato, citrato, succinato	+	+	+
benzoato, malonato, oxalato,	-	-	-
tartarato	-	-	-
Produção de acetoina	-	-	-
Utilização de compostos nitrogenados			
Produção de H ₂ S a partir de cisteína	+	+	+
Produção de indol	-	-	-
Redução de nitrato a nitrito	-	-	-
Urease de Christensen	-	-	-
Decomposição de macromoléculas			
Hidrólise de Tween 80	+	+	+
Hidrólise de amido	+	+	+
Hidrólise de gelatina	-	-	-
Extração de xanthomonadina	+	+	+
Hipersensibilidade em fumo	-	-	-
Hipersensibilidade em tomate	+	+	+

0 = oxidativo; + = reação positiva; - = reação negativa

Tabela 4. Valores de absorvância obtidos, em espectrofotômetro, nos diferentes comprimentos de onda, para determinação do espectro de absorção do pigmento xanthomonadina, obtido a partir de cultura de *X. campestris*, isolada de cana-de-açúcar (isolado IBSBF 661).

Comprimento de onda (nm)	absorvância
400	0,265
405	0,285
410	0,320
415	0,345
420	0,355
425	0,375
430	0,390
435	0,405
440	0,410
445	0,405
450	0,385
455	0,365
460	0,350
465	0,335
470	0,305
475	0,265
480	0,220
485	0,170
490	0,130
495	0,100
500	0,075
505	0,055
510	0,040
515	0,030
520	0,025

Figura 3. Espectro de absorção do pigmento xanthomonadina extraído do isolado IB5BF 661. A determinação foi realizada com espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 400 até 520nm, com intervalos de 5nm.

4.1.3.2. Hipersensibilidade

As reações de hipersensibilidade em folhas de fumo foram caracterizadas como negativas, 24 horas após inoculação. Entretanto, observou-se reação positiva quando inoculadas em folíolos de tomateiro.

4.1.3.3. Crescimento a 41°C

Observou-se o crescimento apenas no meio inoculado com o isolado IBSBF 342- *P. rubrilineans*. Os demais isolados não cresceram a esta temperatura.

4.2. Testes serológicos

Os antissoros, obtidos através da imunização de coelho pela injeção de antígeno nos linfonódulos, possibilitaram a realização de vários testes, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Reações serológicas de dupla difusão observadas entre antígenos bacterianos (AG) e os antissoros (SN, AS-1) obtidos de coelho imunizado com o isolado IBSEF 661.

ANTÍGENOS			ANTISSIONOS ^(a)	
AG	HOSPEDEIROS	CODIGO IBSEF	AS-1	SN
P. rubrilineans				
1	cana-de-açúcar	342	-	-
X. campestris				
2	cana-de-açúcar	661	+	-
3	cana-de-açúcar	656	+	-
4	cana-de-açúcar	665	+	-
X.c. pv. vasculorum				
5	Roystonea regia	667	+	-
6	Thysanolaena maxima	668	+	-
7	cana-de-açúcar	695	+	-
8	cana-de-açúcar	696	+	-

(a) SN= soro normal; AS-1= antissoro obtido 40 dias após a imunização

+ = presença de linha de precipitação

- = ausência de linha de precipitação

4.3. Testes de Patogenicidade

4.3.1. Técnicas de inoculação

Os resultados deste experimento, confrontando diferentes métodos de inoculação, estão expressos na Tabela 6. Foi considerado o valor mais alto das notas das 3 repetições atribuído pela intensidade da doença.

4.3.2. Tipos de reação e comportamento de clones e variedade de cana-de-açúcar, frente ao patógeno, em condições de casa de vegetação

Por ocasião da avaliação, foram observadas plantas com diferentes tipos de reações permitindo a separação das plantas em 3 grupos, de acordo com as seguintes descrições:

- Reação de resistência (R)

Ausência de sintomas visíveis ou presença de pontos cloróticos isolados ou coalescentes, pequenas lesões necróticas avermelhadas circulares circundadas por halos cloróticos podendo evoluir para lesões necróticas avermelhadas estreitas, alongadas, circundadas por áreas cloróticas; geralmente isoladas ou parcialmente coalescentes (Figura 4).

Tabela 6. Intensidade de doença desenvolvida no clone TUC 71-7 x RB72454, por isolados de cana-de-açúcar, através de 3 métodos de inoculação.

INTENSIDADE DA DOENÇA ^(a)			
	Deposição	Infiltração	Infiltração
	no cartucho	foliar	no palmito
660	2	3	3
661	3	3	3
728	1	2	3
730	2	1	2
Testemunha	0	0	0

(a) Intensidade de doença: 0= ausência de sintomas;

1= pontos cloróticos, pequenas lesões necróticas avermelhadas estreitas e alongadas, isoladas ou parcialmente coalescentes.

2= lesões necróticas avermelhadas alongadas, geralmente coalescentes, mais longas e largas que em 1 e circundadas por áreas cloróticas.

3= coalescência de lesões necróticas avermelhadas, alongadas, ocupando grandes porções do limbo foliar e circundadas por áreas cloróticas.

- Reação de Resistência Moderada (RM)

Presença de áreas cloróticas com lesões necróticas avermelhadas circulares, lesões necróticas avermelhadas estreitas e alongadas geralmente coalescentes, mais longas e largas que nas plantas resistentes e circundadas por áreas cloróticas (Figura 5).

- Reação de Suscetibilidade (S)

Presença de coalescência de lesões necróticas avermelhadas alongadas e circundadas por áreas cloróticas, ocupando grandes porções do limbo foliar, geralmente com presença de áreas cloróticas com pontos avermelhados associados (Figura 6).

Os resultados da avaliação do comportamento dos materiais testados estão apresentados na Tabela 7. A frequência dos tipos de reações de resistência, resistência moderada e suscetibilidade mostrados pelos materiais estão apresentados na Tabela 8.

Figura 4. Reações de resistência em cana-de- açúcar, em condições de casa de vegetação.

Variedade: IAC51-205.

Figura 5. Reações de resistência moderada em cana-de-açúcar, em condições de casa de vegetação.
Variedade: IAC51-205.

Figura 6. Reação de suscetibilidade em cana-de-açúcar, em condições de casa de vegetação.

Variedade: IAC51-205

Tabela 7. Médias das notas atribuídas a 6 plantas dos clones e variedade de cana-de-açúcar, em condições de casa de vegetação, inoculados com 7 isolados de *Xanthomonas campestris**.

ISOLADOS	HOSPEDEIROS		
	NCo310 x	TUC71-7 x	NA56-79
	RB725147	RB72454	
656	2,0	2,1	1,3
660	1,5	2,5	1,6
661	2,1	2,6	2,0
728	1,1	1,8	1,0
730	1,6	2,3	1,8
695**	1,8	2,0	1,5
696**	2,0	2,5	1,8

* = 0 a 1,0= resistente; 1,1 a 2,0= moderadamente resistente; 2,1 a 3,0= suscetível

** = isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum*

Tabela 8. Frequência, em porcentagens, para os tipos de reações em plantas de cana-de-açúcar, em condições de casa de vegetação, frente a 7 isolados de Xanthomonas campestris.

ISOLADOS	NCo310 x RB725147			TUC71-7 x RB72454			NA56-79		
	**R	MR	S	R	MR	S	R	MR	S
656	16,7	66,6	16,7	16,7	66,6	16,7	66,6	33,4	0,0
660	50,0	50,0	0,0	0,0	50,0	50,0	33,3	50,0	16,7
661	16,7	50,0	33,3	0,0	33,3	66,7	33,3	33,3	33,4
728	83,3	16,7	0,0	16,7	83,3	0,0	100,0	0,0	0,0
730	33,3	66,7	0,0	16,7	33,3	50,0	33,3	50,0	16,7
695*	33,3	50,0	16,7	16,7	66,6	16,7	0,0	50,0	50,0
696*	16,7	66,6	16,7	0,0	50,0	50,0	50,0	16,7	33,23

* isolados de Xanthomonas campestris pv. vasculorum

** Reações das plantas

R= Resistente, MR= Moderadamente resistente e S= Suscetível

4.3.3. Comportamento de plantas de cana-de-açúcar, frente a diferentes bactérias em condições de casa de vegetação

Observou-se que as plantas inoculadas com *Pseudomonas rubrilineans*, mantidas em câmara úmida por 5 dias, mostraram lesões foliares enquanto que aquelas mantidas sem cobertura não manifestaram sintomas.

Não foram constatadas diferenças significativas entre as lesões de plantas mantidas com e sem cobertura, quando inoculadas com isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* e *Xanthomonas campestris* pv. indeterminado.

As lesões incitadas por *P. rubrilineans* mostraram-se de coloração vermelho mais escuro e mais estreitas que aquelas incitadas por *X.c.* pv. *vasculorum* ou *X. campestris* pv. indeterminado.

As lesões provocadas pelas duas *Xanthomonas* foram muito semelhantes em tamanho, forma e cor, podendo ser distinguidas das lesões provocadas por *P. rubrilineans*, em inoculações experimentais.

4.3.4. Determinação de outros possíveis hospedeiros

Os resultados mostraram que, nas condições do experimento, apenas as plantas de trigo, nas duas cultivares testadas, não manifestaram sintomas fo-

liares (Tabela 9).

Observou-se, todavia, que as lesões foliares diferiram em forma e coloração, variando de acordo com a espécie do hospedeiro, mantendo, dentro das espécies, o mesmo padrão para todos os isolados, conforme descrição que se segue:

- Plantas de milho: Presença de anasarca, descoloração do tecido.
- Plantas de sorgo: Presença de listras vermelhas escuras, coalescentes podendo atingir toda a largura do limbo.
- Plantas de aveia: Presença de lesões cor de palha, localizadas ao redor do ponto de inoculação.

Foram feitos reisolamentos a partir dos materiais com sintomas, recuperando-se bactérias com as mesmas características culturais das inoculadas.

Tabela 9. Patogenicidade de isolados de bactérias obtidas de cana-de-açúcar, inoculadas em outras gramíneas.

HOSPEDEIROS	I S O L A D O S				TESTEMUNHA
	656	661	665	695	
Avela IAC 5	+	+	+	+	-
Milho M 401	+	+	+	+	-
Milho AG 106	+	+	+	+	-
Sorgo "DK 64"	+	+	+	+	-
Sorgo "Contigração"	+	+	+	+	-
Trigo "Anahuac"	-	-	-	-	-
Trigo "BH 1146"	-	-	-	-	-

(+) = Presença de lesões foliares

(-) = Ausência de lesões foliares

5. DISCUSSÃO

A bactéria objeto deste estudo, isolada de cana-de-açúcar, quando analisada morfolologicamente, apresentou dimensões variando entre 1,2-2,0 μm $\times$ 0,5-0,7 μm obtidas a partir de fotomicrografias eletrônicas. Estes valores diferem, parcialmente, dos relatados para o gênero *Xanthomonas* por BRADBURY (1986) que menciona 0,7-1,6 μm $\times$ 0,4-0,7 μm . Entretanto, estas diferenças não devem ser consideradas significativas, podendo ser decorrentes das técnicas utilizadas na preparação dos materiais e na própria medição. Os demais caracteres morfológicos, considerados neste trabalho, estão de acordo com os padrões relacionados pelo mesmo autor.

As características culturais em meio sólido, tais como forma e coloração das colônias, correspondem àquelas descritas na literatura pertinente. O crescimento em caldo nutritivo, não referido na literatura, mostrou a formação de uma película na superfície do meio após 48-72 horas de cultivo a 27°C, apresentando o restante do meio, ligeira turvação.

A coloração amarela das colônias, que pode ser observada em quase todas *Xanthomonas*, pode ser também notada em algumas espécies de *Erwinia* e *Clavibacter*. Entretanto, estas espécies podem ser diferenciadas através de algumas características. Assim, espécies de *Erwinia* apresentam metabolismo fermentativo, são peritricas e seu pigmento é carotenóide. As espécies de *Clavibacter* são Gram positivas, frequentemente imóveis, seus pigmentos são carotenóides e apresentam polimorfismo ou dimorfismo coccus-bastonete. A bactéria estudada mostrou-se Gram negativa, móvel, em forma de bastonete com um único flagelo polar, metabolismo oxidativo e com produção do pigmento xanthomonadina, características que a diferem das demais e inserindo-a no gênero *Xanthomonas*.

Dentro deste gênero, vários autores relatam a ocorrência de *X. albilineans* e *X.c. pv. vasculorum* incitando doenças na cultura da cana-de-açúcar (HUGHES, 1961; ANTOINE, 1965; TOKESHI, 1980 e BRADBURY, 1986). A diferenciação entre a bactéria estudada e *X. albilineans* foi obtida através da observação do seu hábito de crescimento em NA e da sua capacidade de produção de ácidos a partir de determinados carboidratos. Os resultados mostraram que os isolados testados desenvolveram colônias em NA em cerca de 48 horas, a 27°C.

Os testes de utilização de carboidratos mostraram a produção de ácidos a partir de meios contendo arabinose, frutose, trealose e celobiose. A literatura

sobre *X. albilineans* nos informa que esta espécie não cresce satisfatoriamente em NA e que não é capaz de metabolizar os açúcares citados. A comparação dos resultados com os dados obtidos na literatura, possibilitaram concluir que a bactéria estudada é *Xanthomonas campestris* (MOFFETT & CROFT, 1983; BRADBURY, 1986 e SCHAAD, 1988).

Nos testes para avaliar a capacidade dos isolados de *X. campestris* em metabolizar determinados carboidratos, foi detectada a produção de ácidos quando ao meio foram adicionados, além dos anteriormente citados, os seguintes açúcares: galactose, manose, glicerol e sacarose. A reação de produção de ácidos foi negativa para os seguintes carboidratos: adonitol, dulcitol, inositol, inulina, ramnose, salicina, sorbitol, alfa-metil-D- glicosídeo, lactose, maltose, manitol e rafinose. Os resultados negativos dos sete primeiros açúcares relacionados foram ratificados por DYE (1962), MOFFETT & CROFT (1983), BRADBURY (1986). A metabolização dos demais açúcares citados pode variar com os isolados testados (DYE, 1962). Os resultados dos testes de utilização de ácidos orgânicos mostraram reações positivas para acetato, citrato, succinato e negativo para benzoato, malonato, oxalato e tartarato, dados que coincidem com os relatados por DYE (1962).

A avaliação da produção de amilase foi feita através da cobertura das culturas, crescidas em placas de Petri, com solução de lugol. A presença de halos não coloridos demonstrou que todos os isolados de *X. campestris*

foram capazes de produzir amilase e consequentemente hidrolizar amido. DYE (1962), trabalhando com 59 isolados de *Xanthomonas*, observou que os resultados dos testes de hidrólise de amido variaram desde reações bem definidas, formando grandes áreas hidrolizadas até ausência de reações ao redor ou abaixo das colônias. Com estes resultados o autor concluiu que a capacidade de hidrolizar amido não deve ser considerada com característica genérica de *Xanthomonas*.

Os resultados dos testes de hidrólise de gelatina mostraram que não ocorreu liquefação da gelatina, em avaliação realizada 10 dias após a semeadura no meio.

DYE (1962) observou que a maioria das 59 culturas de *Xanthomonas* com as quais trabalhou hidrolizou gelatina numa taxa moderada e que alguns isolados o fizeram tão fraca e vagarosamente que numa avaliação, após 7 dias, estas reações seriam consideradas negativas. O autor não conseguiu demonstrar hidrólise de gelatina em 5 dos 9 isolados de *X. campestris* pv. *vasculorum*. Baseado nestes resultados considerou que o teste de hidrólise de gelatina não é adequado como característica determinativa do gênero *Xanthomonas* e/ou de suas espécies.

Esta conclusão difere de BRADBURY (1986) que relaciona a hidrólise de amido e gelatina como características fundamentais na identificação de *X. campestris* pv. *vasculorum*.

Não foi observado crescimento dos isolados em meio de asparagina como única fonte de carbono e nitro-

gênio. BRADBURY (1984) considera esta como característica determinativa para *Xanthomonas* visto que, neste gênero, a asparagina pode servir como fonte de nitrogênio, se houver fornecimento de glicose, mas não serve como fonte simultânea de carbono e nitrogênio, como ocorre com muitas *Pseudomonas* e *Erwinia*.

A incapacidade de crescimento a 41°C indica que os isolados de *X. campestris* de cana-de-açúcar do Brasil diferem das culturas da mesma espécie obtidas de Natal e Trinidad relatadas por HAYWARD (1962), que se desenvolvem nesta temperatura.

O pigmento xanthomonadina extraído dos isolados testados apresentou o mesmo espectro de absorção descrito por LELLIOTT & STEAD (1987). A presença deste pigmento é considerada característica importante para o gênero *Xanthomonas* e STARR (1983) ressalta que pigmentos com espectro de absorção semelhantes são raros ou inexistentes em outras bactérias.

Os testes de hipersensibilidade em folhas de fumo resultaram negativos, enquanto as infiltrações em folíolos de tomateiro mostraram reações de necrose intensa dos tecidos em 24 horas, típicas reações de hipersensibilidade. Estes resultados estão de acordo com LELLIOTT & STEAD (1987) que relatam que nem todos os patovares de *X. campestris* induzem reação de hipersensibilidade em folhas de fumo e aqueles que o fazem, somente apresentam resultados confiáveis se as plantas forem mantidas em condi-

ções especiais de temperatura, antes e após inoculação. Estes autores recomendam a utilização de plantas de tomate e pimentão nos testes de hipersensibilidade para *Xanthomonas*.

Assim, os resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos mostraram que esta bactéria possui as seguintes características: catalase positiva, oxidase negativa, metabolismo oxidativo, não produz acetoina, urease e indol, produz H_2S a partir de cisteína, não reduz nitrato a nitrito, hidroliza Tween 80 e amido, não hidroliza gelatina, não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, não cresce a 41°C, produz o pigmento xanthomonadina, não provoca reação de hipersensibilidade em folhas de fumo mas sim em folhas de tomateiro. Estas características foram comuns a todos os isolados testados de *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *vasculorum* e da *X. campestris* em estudo, ou seja, não foi possível distingui-las a nível subespecífico.

Os resultados dos testes serológicos mostraram a formação de linhas de precipitação com o antissoro AS-1, quando foram empregados os antígenos AG-2, AG-3 e AG-4, provenientes, respectivamente, das culturas IBSEF 661, 656 e 665 de *X. campestris* isoladas de cana-de-açúcar.

Os antígenos obtidos dos isolados IBSEF 667, 668, 695 e 696 de *X.c.* pv. *vasculorum* reagiram igualmente com o antissoro AS-1. O método utilizado não permitiu

observar eventuais diferenças decorrentes da diversidade dos isolados , quanto aos hospedeiros e/ou procedência..

Não ocorreu formação de linha de precipitação do antissoro com o antígeno obtido de **Pseudomonas rubilineans**.

Nos testes para definição da metodologia de inoculação mais adequada, os resultados mostraram que todos os métodos permitiram a reprodução de sintomas, não tendo sido detectada grande diferença nos resultados. Entretanto, o método de infiltração no palmito foi adotado para os demais experimentos, visto tratar-se de uma técnica simples além de possibilitar bom rendimento e melhor padronização do inóculo. O método de deposição de inóculo no cartucho com auxílio de pipeta foi dificultado em virtude de, em muitas plantas, o cartucho formado pelas folhas emergentes não comportar a quantidade de inóculo, tendo ocorrido extravasamento de parte da suspensão..

A inoculação por infiltração foliar não foi adequada pela dificuldade em se manter a quantidade de inóculo padronizada, por perda de material..

A detecção de diferentes tipos de reações de resistência ou suscetibilidade em plantas jovens de cana-de-açúcar foi conseguida em casa de vegetação, com a inoculação de suspensão bacteriana na concentração aproximada de 10^8 UFC/ml, infiltrada no palmito. Esta metodologia permite rápida avaliação das reações de diferentes materiais ao patógeno..

Os diferentes tipos de reações observadas variaram desde aparecimento de pontos cloróticos isolados ou coalescentes, pequenas lesões necróticas avermelhadas circulares com halos cloróticos que podem evoluir para lesões necróticas avermelhadas estreitas e alongadas circundadas por regiões cloróticas isoladas ou parcialmente coalescentes, reação de resistência, até coalescência de lesões necróticas avermelhadas podendo atingir toda a largura do limbo foliar, geralmente com presença de áreas cloróticas com pontos avermelhados, reação de suscetibilidade.

Os vários tipos de reações são facilmente distinguíveis, podendo ser utilizados como critério de avaliação de resistência. Cabe ressaltar que neste experimento, em que foram incluídos para efeito comparativo 2 isolados de *X. campestris* pv. *vasculorum*, os resultados mostraram que as lesões provocadas por esta bactéria não diferiram daquelas incitadas pelos isolados da bactéria objeto deste estudo. As variações nos tipos de reações de resistência ou suscetibilidade foram igualmente observadas nas plantas inoculadas com *X.c.* pv. *vasculorum*.

A frequência dos tipos de reações foi calculada e os resultados permitiram relacionar a variedade NA 56-79 e os clones NCo310 x RB725147 e TUC71-7 x RB 72454, em ordem decrescente de resistência.

O comportamento das plantas de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes bactérias foi avaliado utilizando-se a variedade IAC51-205, considerada suscetível à Estria Vermelha, incitada por *P. rubrilineans* (TOKESHI, 1980; DIB NUNES JR., 1987). Todavia, os sintomas provocados por esta bactéria, manifestaram-se sob a forma de listras vermelhas estreitas, sem coalescência, somente quando as plantas foram mantidas em câmara úmida por 5 dias. As plantas inoculadas com os isolados de *X.c. pv. vasculorum* e da bactéria estudada, mostraram sintomas semelhantes entre si, expressos por lesões necróticas avermelhadas coalescentes, independente da manutenção em câmara úmida.

Nas avaliações do comportamento de outras gramíneas frente a bactéria estudada e diferentes isolados de *X.c. pv. vasculorum*, os resultados mostraram que as lesões foliares diferiram em forma e coloração, variando de acordo com a espécie do hospedeiro, mantendo, entretanto, dentro das espécies, um padrão constante para todos os isolados.

As bactérias inoculadas provocaram lesões foliares em plantas de milho, sorgo e aveia e apenas as duas cultivares de trigo testadas não manifestaram sintomas foliares.

Estes resultados permitem distinguir estes isolados estudados dos de *X. officinarum* sp. nov., uma nova espécie proposta por QHOBELA & CLAFLIN (1989), consi-

derando que esta nova espécie não é patogênica a milho e sorgo. Vários autores relataram que isolados de *X.c. pv. vasculorum* são patogênicos a sorgo e milho, sendo este último considerado hospedeiro natural (HUGHES, 1939 e 1961; ORIAN, 1939 e BRADBURY, 1986). A literatura consultada não faz menção a reações para *Xanthomonas campestris pv. vasculorum*, em aveia ou trigo.

Deve ser ressaltado o fato de que, nas condições dos experimentos, em nenhuma ocasião foi observada a exsudação de goma. A produção de goma, entretanto, é dependente da suscetibilidade do hospedeiro, estirpe da bactéria envolvida e sobretudo de fatores climáticos.

RICAUD (1969) mencionou que o comportamento de variedade de cana-de-açúcar tolerante a *X.c. pv. vasculorum* pode variar de ano para ano e em diferentes zonas climáticas por flutuações de fatores ambientais, especialmente chuva, umidade, temperatura e velocidade dos ventos. Alto nível de infecção poderia ser esperado com ocorrência de chuvas acima do normal e ventos fortes durante a fase de crescimento seguida de umidade e temperatura abaixo dos níveis normais na época de maturação.

THOMSON (1958) já relatava que a disseminação do patógeno e o subsequente efeito da doença estavam intimamente relacionados com as condições climáticas. Os sintomas, dependendo, sobretudo, das condições de umidade, manifestavam-se de forma crônica, com ocorrência de lesões

foliares ou aguda, com produção de goma nos colmos, além de listras nas folhas. O autor observou que em regiões de unidade mais elevada, ocorria, com maior frequência, a forma aguda da doença.

ANTOINE (1969) relatou a presença de duas estirpes de *X. campestris* pv. *vasculorum*, ocorrendo nas Ilhas Réunion e Mauritius. A segunda estirpe teria ocorrido em 1958 na Ilha Réunion, e em Mauritius no ano de 1964, sob forma epidêmica, causando o reaparecimento de clorose foliar como expressão de infecção sistêmica, sintoma que havia sido encontrado no passado mas que aparentemente havia desaparecido. As duas epidemias desenvolveram-se após a ocorrência de ciclones, tanto em Réunion quanto em Mauritius.

Mais recentemente, AUTREY et alii (1987) mostraram o efeito de uma nova estirpe do patógeno, denominada raça 3, reduzindo o crescimento das plantas e a produção de açúcar pelos danos foliares e infecção sistêmica, em duas variedades estudadas.

Desta forma, fica notório que *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* pode causar sintomas foliares que podem ou não evoluírem para infecção sistêmica, dependendo da suscetibilidade do hospedeiro, raça ou estirpe da bactéria envolvida e de condições ambientais adequadas.

Os resultados obtidos neste estudo caracterizam e identificam a bactéria isolada de cana-de-açúcar

como sendo *Xanthomonas campestris*. O comportamento de diferentes hospedeiros frente a esta bactéria e a *X.c. pv. vasculorum* foi extremamente semelhante, sendo ainda difícil a diferenciação dos sintomas por elas incitados.

Considerando que a espécie *Xanthomonas campestris*, agrupa mais de 120 patovares descritos, e que a definição do patovar é baseada na patogenicidade dos isolados a um ou mais hospedeiros, os dados obtidos sugerem que, a nível de patovar, a bactéria objeto deste estudo seja *Xanthomonas campestris pv. vasculorum*.

Todavia, estudos comparativos adicionais utilizando maior número de isolados e diferentes técnicas serológicas e eletroforéticas, poderão esclarecer com maior segurança a posição taxonômica desta bactéria.

4. CONCLUSÕES

Dos resultados verificados no presente trabalho, as seguintes conclusões puderam ser obtidas:

1. O agente causal isolado de lesões foliares em cana-de-açúcar e caracterizado neste estudo é a bactéria *Xanthomonas campestris*, sugerindo tratar-se do patovar *vasculorum*.

2. A metodologia de inoculação utilizada, infiltração de suspensão bacteriana na concentração aproximada de 10^8 UFC/ml no palmito de plantas jovens de cana-de-açúcar permite detectar diferentes tipos de reação ao patógeno, em condições de casa de vegetação.

3. Variedades e clones de cana-de-açúcar, quando inoculados com *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum*, exibem diferentes tipos de reações que variam desde suscetíveis a resistentes.

4. As reações de resistência caracterizam-se por ausência de sintomas visíveis ou pela presença de pontos cloróticos isolados ou coalescentes, pequenas lesões necróticas avermelhadas circundadas por halos cloróticos que podem evoluir para lesões necróticas avermelhadas, estreitas e alongadas circundadas por regiões cloróticas isoladas ou parcialmente coalescentes.

Reações de resistência moderada se manifestam pela presença de áreas cloróticas com lesões necróticas avermelhadas, circulares, lesões necróticas avermelhadas estreitas e alongadas, geralmente coalescentes, mais longas e largas que nas plantas resistentes e circundadas por áreas cloróticas.

As reações de suscetibilidade apresentam coalescência de lesões necróticas avermelhadas alongadas e circundadas por áreas cloróticas, ocupando grandes porções do limbo foliar, geralmente com presença de áreas cloróticas com pontos avermelhados associados.

5. A inoculação de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* incitam o aparecimento de lesões foliares em plântulas de milho, sorgo e aveia, mas não em plantas de trigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFONSI, R.R.; PEDRO JR., M.J.; BRUNINI, O.; BARBIERI, V.
Condições climáticas para a cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B., coord. *Cana-de-açúcar. cultivo e utilização*. Campinas, Fundação Cargill, 1987. v.1, p. 42-55.
- ALMEIDA, I.M.G.; CARVALHO, M.L.V.; RODRIGUES NETO, J.
Nova doença bacteriana em cana-de-açúcar ocorrendo nos Estados de São Paulo e Paraná. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 12., Araras, 1989. Resumos. *Summa Phytopathologica*, Jaguariuna, 15 (1): 19, 1989.
- ANTOINE, R. Cane diseases. MAURITIUS SUGAR INDUSTRY RESEARCH INSTITUTE. Annual Report 1964. Reudit, MSIRI, 1965. p. 49-56.
- ANTOINE, R. The two gumming diseases of sugarcane. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 13., Taiwan, 1968. Proceedings. Taiwan. ISSCT, 1969. p. 1171-1179.

- AUTREY, L.J.C.; DHAYAN, S.; SULLIVAN, S. Effect of race 3 of gumming disease pathogen on growth and yield in two sugarcane varieties. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 19., Jakarta, 1986. Abstracts. Jakarta, ISSCT, 1987. p. 103-4.
- AYERS, S.H.; RUPP, P. & JOHNSON, W.T. A study of the alkali-forming bacteria in milk. U.S. Department of Agriculture Information Bulletin, (782), 1919.
- BITANCOURT, A.A. Diseases of the sugarcane in Brazil. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 6., Baton Rouge, 1938. Proceedings. Baton Rouge, ISSCT, 1939. p. 187-193.
- BRADBURY, J.F. Genus II. *Xanthomonas* Dowson, 1939. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G; ed. *Bergey's Manual of Systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v.1., p. 199-210.
- BRADBURY, J.F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Kew , England, C.A.B. International Mycological Institute , 1986. 332p.
- CHRISTENSEN, W.B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *Journal of Bacteriology*, Washington, 56: 461-466, 1946.

COPERSUCAR.. Agroindustria canavieira: um perfil. São Paulo, 1990. 28p..

DANTAS, B. Contribuição para a história da "gomose" da cana-de-açúcar em Pernambuco e no Brasil. Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Nordeste, Recife, (11): 3-17, 1960..

DIB NUNES JR., M.S. Variedades de cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B., coord. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas, Fundação Cargill, 1987. v.1, p. 187-259..

DYE, D.W. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. New Zealand Journal of Science, Wellington, 5 (4): 393-416, 1962..

DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOTT, R.A.; SCHROTH, M.N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. Review of Plant Pathology, Farnham Royal, 59(4): 154-168, 1980..

FAHY, P.C. & HAYWARD, A.C. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: FAHY, P.C. & PERSLEY, J.G., ed. Plant bacterial diseases: a diagnostic guide. London, Academic Press, 1983. p. 337-374..

HAYWARD, A.C. Studies on bacterial pathogens of sugar cane I. Differentiation of isolates of *Xanthomonas vasculorum*, with notes on an undescribed *Xanthomonas* sp. from sugar cane in Natal and Trinidad. Mauritius Sugar Industry Research Institute. Occasional Paper no 13, 12p. 1962.

HUGH, R., & LEIFSON, E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, Washington, 66: 24-6, 1953.

HUGHES, C.G. Alternate hosts of *Bacterium vasculorum*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 6., Baton Rouge, 1938. Proceedings. Baton Rouge, ISSCT, 1939. p. 430-437.

HUGHES, C.G. Gummy disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V.; HUGHES, C.G., ed. *Sugar-cane diseases of the world*. Amsterdam, Elsevier, 1961. v. 1, p. 54-76.

IREY, M.S. & STALL, R.E. Value of xanthomonadins for identification of pigmented *Xanthomonas campestris* pathovars. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5., Cali, 1981. Proceedings. Cali, CIAT, 1982. p. 85-95.

KLEMENT, Z.; FARKAS, G.L.; LOVREKOVICH, L. Hipersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, St. Paul, 54: 474-477, 1964.

KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, London, 178: 703, 1956. [Abstract].

LEITE A.F. & OLIVEIRA, A.R. Furagar. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1(2): 143-146, 1975.

LELLIOTT, R.A. & STEAD, D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Oxford, Blackwell, 1987. 216 p. (Methods in Plant Pathology, 2).

LEVINE, M. An introduction to laboratory technique in bacteriology. New York, Mac Millan, 1954. p.68-79.

MACHADO JR., G.R. Melhoramento da cana-de-açúcar: In: PARANHOS, S.B., coord. *Cana-de açúcar. cultivo e utilização*. Campinas, Fundação Cargill, 1987. v.1, p.165-186.

MOFFETT, M.L. & CROFT, B.J. *Xanthomonas*. In: FAHY, P.C. & PERSLEY, J.G. ed. *Plant bacterial diseases: a diagnostic guide*. London, Academic Press, 1983. p. 189-222.

NAMEKATA, T. Estudos comparativos entre *Xanthomonas citri* [Hasse] Dow., agente causal do cancro cítrico e *Xanthomonas campestris* [Hasse] Dow. n.f. sp. *aurantifolia*, agente causal da "cancrose do limoeiro galego". Piracicaba, 1971. 65p. (Doutorado- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

NEW ZEALAND REFERENCE CULTURE COLLECTION OF MICRO-ORGANISMS. New Zealand Department of Scientific and Industrial Research Information Series, Wellington, (82):1-10, 1971.

OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonóculo. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 1: 61-64, 1975.

ORIAN, G. Natural hosts of *Bacterium vasculorum* (Cobb) Gr. Smith in Mauritius. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 6., Baton Rouge, 1938. *Proceedings*. Baton Rouge, ISSCT, 1939. p. 437-447.

OUCHTERLONY, D. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progress in Allergy*, Basel, 5: 1-78, 1958.

QHOBELA, M. & CLAFLIN, L.E. *Xanthomonas officinarum* sp. nov., a second organism involved in sugarcane gumming disease In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY, Virginia, 1989. *Proceedings. Phytopathology*, St. Paul, 79 (10): 1191, 1989.

RICAUD, C. Investigations on the systematic infection of gumming disease. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 13., Taiwan, 1968. *Proceedings. Taiwan, ISSCT, 1969.* p. 1158-1169.

ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J.; RIBEIRO, R. da L.D.; KIMURA, O. Annotated list of bacterial plant pathogens in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5., Cali, 1981. *Proceedings. Cali, CIAT, 1982.* p. 601-613.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 8., Campinas, 1986. *Resumos. Summa Phytopathologica*, Piracicaba, 12(1,2): 16, 1986.

RYAN, C.C.; MARNEY, T.S.; HAYWARD, A.C. Symptom variation in bacterial mottle. *Sugar cane*, W. Glamorgan, (5): 5-6, 1986.

SANGUINO, A. Principais moléstias da cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B., coord. *Cana-de-açúcar: cultivo e utilização*. Campinas, Fundação Cargill, 1987. v.2, p. 738-757.

SCHAAD, N.W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2.ed. St. Paul, Minn. APS Press, 1988. 164p.

SINGLETON, P. & SAINSBURY, D. *Introduction to bacteria*. John Wiley, 1981, 167p.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, 30: 225- 420, 1980.

STARR, M.P. The genus *Xanthomonas*. In: STARR, M.P., ed. *Phytopathogenic bacteria*. New York, Springer-Verlag, 1983. p. 742-763.

STARR, M.P.; WEISS, J.E.; KLEIN, H.P.; SISSELMAN, C.B.

Growth of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagin medium. *Phytopathology*, St. Paul, 33: 314-318, 1943.

SWINGS, J.; DEVOS, P.; VANDEN MOOTER, M.; DELEY, J.

Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* Hugh (1981) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, 33: 409-413, 1983.

THOMSON, G.M. The Diseases of Sugarcane in Natal. Experiment Station of the South African Sugar Association. Bulletin (9), 1958.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F., coord. *Manual de fitopatologia*. 2. ed. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres. 1980. v.2, p. 141-206.

WILLENS, A.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; VAN DEN BROECKE,

L.; DE LEY, J. Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov., as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, 37 (4): 422-430, 1987.