CARACTERIZAÇÃO SEROLÓGICA DE ISOLADOS BRANCOS DE *Xanthomonas campestris* E REAÇÃO DE MANGUEIRAS (*Mangifera indica* L.) A *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (PATEL, MONIZ & KULKARNI, 1948) ROBBS, RIBEIRO & KIMURA, 1974.

MAURO HIDEO SUGIMORI
Engenheiro Agrônomo

ORIENTADOR: PROF^º DR. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
DEZEMBRO - 1988

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

S947c Sugimori, Mauro Hideo
Caracterização serológica de isolados brancos de
Xanthomonas campestris e reação de mangueiras (Man-
gifera indica L.) a Xanthomonas campestris pv. man-
giferaeindicae (Patel, Moniz & Kulkarni, 1948) Robbs,
Ribeiro & Kimura, 1974. Piracicaba, 1988.
51p. ilus.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica - Serologia 2. Mancha
angular em manga 3. Manga - Doença I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.441

CARACTERIZAÇÃO SEROLÓGICA DE ISOLADOS BRANCOS DE *Xanthomonas campestris* E REAÇÃO DE MANGUEIRAS (*Mangifera indica* L.) A *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (PATEL, MONIZ & KULKARNI, 1948) ROBBS, RIBEIRO & KIMURA, 1974.

MAURO HIDEO SUGIMORI

Aprovada em: 25 de agosto de 1989

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Clélio Lima Salgado	ESALQ/USP
Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
Prof. Dr. Chukichi Kurozawa	FCA/UNESP
Prof. Dr. Modesto Barreto	FCAV/UNESP
Dr. Osvaldo Paradela Filho	IAC/CPA

Prof. Dr. Clélio Lima Salgado
Orientador Substituto

À minha mãe MINEKO ("in memorian")

MINHA GRATIDÃO

À minha esposa SADAE,
filhos MAURÍCIO e
DENISE,
meu pai e irmã.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O nosso sincero agradecimento a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho e em particular:

Ao Instituto Agronômico de Campinas, por possibilitar a realização do Curso de Pós-graduação e do trabalho de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de pesquisa concedida.

Ao Prof^o Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, pela orientação, incentivo, apoio e revisão dos originais.

Ao Pesquisador Científico Dr. Osvaldo Paradela Filho, pelas sugestões, incentivo, apoio e correção dos originais.

Ao Pesquisador Científico MS Ivan José Antunes Ribeiro, chefe da Seção de Microbiologia Fitotécnica, pelo auxílio, incentivo e apoio para realização do trabalho.

Ao Pesquisador Científico Dr. Sérgio Almeida de Moraes, pelas sugestões e revisão dos originais.

Ao Pesquisador Científico MS Júlio Rodrigues Neto, pelo auxílio e incentivo.

À técnica de laboratório Maria José Adami Romero, pelo auxílio prestado.

À estagiária Angela Jacintho de Lima, pelo auxílio prestado.

À escriturária Sueli Maria Tonin Fahl, pela datilografia dos originais.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização do Curso de Pós-graduação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Meios de cultura.....	10
3.2. Isolamento das bactérias e manutenção das cul- turas.....	11
3.3. Preparo dos antígenos imunizantes.....	13
3.4. Obtenção do anti-soro.....	13
3.5. Preparo do antígeno para as reações serológi- cas.....	15
3.6. Testes serológicos.....	17
3.7. Variedades de mangueiras utilizadas na inocu- lação	18
3.8. Preparo do inóculo.....	23
3.9. Método de inoculação e avaliação dos sintomas.	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Reações serológicas homólogas e heterólogas...	25
4.1.1. Reações homólogas.....	26
4.1.2. Reações heterólogas.....	32
4.1.3. Reações heterólogas entre AS-5182 e an- tígenos de bactérias isoladas de man- gueiras da região de Lins	34
4.2. Testes de inoculação em variedades de manguei- ras.....	38
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Preparo do antígeno imunizante.....	14
2 - Imunização e sangrias para obtenção dos anti-soros (AS) e soro normal (SN) de <i>Xanthomonas campestris</i> pvs.....	16
3 - <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> . Antígeno AT-5182 em reação com seu anti-soro homólogo AS-5182.....	28
4 - <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> . Antígeno AT-2833 em reação com seu anti-soro homólogo AS-2833...	29
5 - <i>X. campestris</i> pv. <i>ricini</i> . Antígeno AT-5548 em reação com seu anti-soro homólogo AS-5548...	30
6 - Reação do antígeno AT-5182 de <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> com os anti-soros de <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> e <i>X. campestris</i> pv. <i>ricini</i>	33
7 - Sintoma apresentado pela variedade Jasmim aos 45 dias após a inoculação com <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	41
8 - Sintoma apresentado pela variedade Bourbon aos 45 dias após a inoculação com <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 - Código, origem e hospedeiro dos isolados apigmentados de <i>Xanthomonas campestris</i> utilizados.	12
2 - Reações homólogas de dupla difusão entre os antígenos de <i>X.campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> , <i>X.campestris</i> pv. <i>manihotis</i> e <i>X.campestris</i> pv. <i>ricini</i> , com seus respectivos anti-soros	31
3 - Reações homólogas e heterólogas entre antígenos e anti-soros de <i>X.campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> , <i>X.campestris</i> pv. <i>manihotis</i> e <i>X. campestris</i> pv. <i>ricini</i>	35
4 - Reações heterólogas entre os antígenos de diferentes isolados de <i>X.campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> e os anti-soros dos patovares de <i>X.campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> , <i>X.campestris</i> pv. <i>manihotis</i> e <i>X.campestris</i> pv. <i>ricini</i>	37
5 - Reação de variedades de mangueiras poliembrionicas e monoembrionicas inoculadas com <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> pelo método das agulhas múltiplas	39

CARACTERIZAÇÃO SEROLÓGICA DE ISOLADOS BRANCOS DE *Xanthomonas campestris* E REAÇÃO DE MANGUEIRAS (*Mangifera indica* L.) A *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (PATEL, MONIZ & KULKARNI, 1948) ROBBS, RIBEIRO & KIMURA, 1974.

Autor: MAURO HIDEO SUGIMORI

Orientador: PROFº DR. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA

RESUMO

Um estudo comparativo com três patovares brancos de *Xanthomonas campestris* foi realizado para verificar se pertenciam ao mesmo grupo serológico. Os patovares estudados foram: *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e *Xanthomonas campestris* pv. *ricini*.

Foram efetuadas inoculações artificiais de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* em dezessete variedades de mangueira, usando a técnica das agulhas múltiplas, para identificar fonte de resistência genética. Os sintomas foram avaliados aos 15, 30 e 45 dias após a inoculadas com uma escala de 1 a 5.

A técnica serológica usada mostrou que pode ser usada eficientemente para diferenciar os patovares. O meio MJA-1 (cicloheximida, bacto-agar e água) usado, confirmam sua

alta especificidade e eficiência, permitindo a formação de bandas de precipitação bem visíveis e definidas. O estudo comparativo mostrou que os três patovares de *Xanthomonas campestris* pertencem a serotipos diferentes, pois as reações homólogas entre os antígenos (AT) e anti-soros (AS) foram positivas e as heterólogas foram negativas. As linhas de precipitação de cada AT e AS homólogas mostraram características específicas, com três linhas para *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, duas linhas para *X. campestris* pv. *ricini* e uma linha para *X. campestris* pv. *manihotis*.

A inoculação das dezessete variedades de manga com *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* mostrou que somente a 'Jasmim' apresentou moderada suscetibilidade, enquanto as outras variedades foram suscetíveis ou altamente suscetíveis. Assim, nenhuma variedade pode ser indicada como fonte de resistência ao patógeno.

SEROLOGICAL CHARACTERIZATION OF WHITE PATOVARS OF *Xanthomonas campestris* AND REACTIONS OF MANGO TREES (*Mangifera indica* L.) INOCULATED WITH *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (PATEL, MONIZ & KULKARNI, 1948) ROBBS; RIBEIRO & KIMURA, 1974.

Author: MAURO HIDEO SUGIMORI

Adviser: PROF^o DR. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA

SUMMARY

A comparative study with three pathovars white of *Xanthomonas campestris* was carried out to verify if they belong to the same serological group. The following pathovars were studied: *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* and *Xanthomonas campestris* pv. *ricini*.

Artificial inoculation *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* on seventeen mango varieties, using multiple needle technic was also carried out looking for genetic resistance. The symptoms were evaluated 15, 30 and 45 days after inoculation with a 1 to 5 scale.

The employed serological technic showed that it can be used efficiently to differentiate the bacterial pathovars. The MJA-1 medium (cycloheximide, Bacto-Agar and

water) used was highly dpecific and efficient in the formation of clear and well defined bands of precipitation. The serological comparative study showed that the three pathovars of *X. campestris* belong to different serotypes, because the homologous reactions between its antigen (AT) and antisera (AS) were positive and the heterologous were negative. The precipitation lines of each AT and AS homologous showed specific characteristics, with three lines for *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, two lines for *X. campestris* pv. *ricini* and one line for *X. campestris* pv. *manihotis*.

The inoculation of seventeen mango varieties with *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* showed that only the 'Jasmim' presented a moderated susceptibility, being the other varieties susceptible or highly susceptible. Thus, none of the varieties can be indicated as a source of resistance to the pathogen.

1. INTRODUÇÃO

A manga é uma fruta de clima tropical, que no Brasil, apresenta grande importância econômica para o mercado interno e externo. Todas as variedades plantadas atualmente pertencem a espécie *Mangifera indica* L., sendo o gênero composto por 41 espécies distribuídas principalmente pela Indo-Malaia, Malásia, Ilha de Sunda e Península Oriental (MANICA, 1981).

Os principais Estados produtores de manga no Brasil são: Ceará, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Piauí e Pernambuco (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1983). No ano de 1979, o país exportou 679 toneladas de manga, tendo o seu mercado interno consumido aproximadamente 10% da quantidade exportada, ou seja, 71 toneladas. Para se ter uma idéia do consumo mundial de manga basta dizer que os grandes produtores e exportadores desta fruta, que são Mali (África Central), Índia, África do Sul, México e Quênia, comercializaram durante esse mesmo período um volume de 11.300 toneladas. Percentualmente, o volume exportado pelo Brasil ficou ao redor de 6% do volume mundial exportado (SCHON, 1983).

Os maiores importadores de manga produzida no Brasil são os países da Europa que têm preferência por fru-

tos não fibrosos, de cor roxa ou avermelhada com peso variando entre 300 e 500 gramas. Esta preferência faz com que as variedades americanas Haden e Tommy Atkins, que são as mais cultivadas no Estado de São Paulo, tenham mercado importador garantido, em detrimento das variedades Rosa, Espada, etc., que encontram dificuldades para serem colocadas nesse mercado consumidor (SCHON,1983).

A presença de frutas manchadas, principalmente devido a ataques de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, e seu posterior apodrecimento, em lotes destinados à exportação tem impedido o fechamento de contratos nesta área, dificultando a consolidação da posição brasileira no mercado mundial (SCHON,1983). Portanto para conseguir uma melhor posição o Brasil precisa aplicar maiores recursos no controle dessa e de outras doenças.

Atualmente uma outra doença revestiu-se de grande importância no Estado de São Paulo devido às proporções que os danos vem alcançando. Trata-se da mancha angular causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel, Moniz & Kulkarni,1948), Robbs, Ribeiro & Kimura,1974. Essa moléstia, caracterizada por lesões necróticas nas folhas, ramos, inflorescência e frutos, está se constituindo em sério problema para a expansão dessa fruteira, chegando a ser limitante em certas áreas do Estado onde condições extremamente favoráveis à bactéria podem inutilizar toda a produção (RIBEIRO et alii,1987).

As características morfológicas apresentadas por essa bactéria são similares a outras duas bactérias : *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Arthaud-Berthet, 1912) Dye, 1978 e *Xanthomonas campestris* pv. *ricini* (Yoshi & Takimoto, 1928) Dye, 1978, diferindo apenas quanto aos hospedeiros que são a mandioca e a mamona, respectivamente. Por essa razão, a identificação da bactéria a nível de espécie requer o estudo e o emprego de um grande número de testes bioquímicos e fisiológicos que sejam diferenciais (Dye et alii, 1980).

Todavia, o emprego de técnicas serológicas para a identificação de bactérias fitopatogênicas tem sido muito importante e conveniente quando comparado com o uso dos testes bioquímicos tradicionais. Além disso, as técnicas serológicas têm demonstrado grande segurança e rapidez, quando se utiliza anti-soros específicos, bactérias intactas (inteiras) em suspensão e relacionamento em nível intra-específico.

Esse trabalho foi realizado com a finalidade de estudar comparativamente a nível serológico, os três patógenos apigmentados de *X. campestris*, ou sejam, *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. campestris* pv. *manihotis* e *X. campestris* pv. *ricini* e verificar a possibilidade de se obter uma fonte de resistência ao patógeno que afeta a mandeieira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

PATEL et alii(1948) descreveram pela primeira vez uma doença bacteriana afetando folhas de mangueiras que apresentavam um sintoma semelhante à mancha angular. Verificaram também que essa bactéria tinha a capacidade de afetar folhas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.).

Estudando a taxonomia da bactéria isolada da mangueira e baseando-se unicamente, na coloração branca apresentada pelo patógeno, PATEL et alii(1948) identificaram-na como *Pseudomonas mangiferaeindicae*. Posteriormente, essa denominação foi confirmada por BREED et alii(1957), em função das recomendações do código internacional de nomenclatura bacteriológica.

Na África do Sul, STEYN et alii(1974) isolaram de mangueira uma bactéria com coloração branca que causava manchas escuras nas folhas. Para a identificação da espécie da bactéria, os autores a compararam com um isolado de *Erwinia mangiferaeindicae*, dois isolados de *Pseudomonas mangiferaeindicae*, e um isolado de uma bactéria de coloração amarela, obtida de lesões velhas de frutos de mangueira. Devido à semelhança encontrada entre a cultura bacteriana em estudo e os dois isolados conhecidos de *Pseudomonas* os autores a iden

tificaram como sendo *Pseudomonas mangiferaeindicae*. Concluíram ainda, que essa bactéria era responsável pela mancha bacteriana que estava ocorrendo nas mangueiras da África do Sul, Índia e Paquistão.

No Brasil, essa doença foi constatada pela primeira vez por ROBBS(1955) que encontrou a bactéria afetando folhas de mangueiras e ocorrendo de forma esporádica em folhas de cajueiro. Segundo esse autor, a doença manifesta-se principalmente nas folhas, causando em plantas suscetíveis danos comparáveis aos da antracnose, com a seguinte sintomatologia: "Os primeiros sintomas apresentam-se em forma de minúsculos pontos de coloração verde clara ou amarelada, em cujo centro desenvolve-se uma área de cor castanha. Por vezes podem ser envoltas por um halo de tecido mais claro e a medida que desenvolvem, tendem para formas poligonais, com bordos verde escuro, dando a impressão que o tecido afetado está embebido em água. Quando em fase final, as lesões apresentam-se com uma coloração castanha escura, às vezes negra, porém sempre delimitadas pelas ramificações da nervura do limbo foliar, podendo sob condições especiais, afetar as nervuras das folhas, escurecendo toda a área necrosada."

Segundo ROBBS et alii(1974) essa bactéria pode ocorrer na natureza apresentando colônias com coloração amarela ou branca, sendo que a estirpe branca é sempre mais agressiva na região sudeste. Esses mesmos autores estudaram comparativamente os caracteres morfológicos, culturais e

bioquímicos de várias espécies fitopatogênicas de *Pseudomonas* que ocorrem no Brasil. Os resultados evidenciaram de forma clara, que *Pseudomonas mangiferaeindicae* não possui relação com as bactérias do grupo das *Pseudomonas*, pela incapacidade de utilizar em meio de cultura sintético, a asparagina, como única fonte de carbono e nitrogênio. Na realidade trata-se de uma bactéria do gênero *Xanthomonas*, que apresenta colônias com coloração branca, característica essa já apresentada por outras bactérias pertencentes a esse mesmo gênero. Como conclusão, a redescrição da estirpe branca é apresentada na seguinte forma: *Xanthomonas campestris* (Pammel, 1985) Dowson, 1939 f. sp. *mangiferaeindicae* (Patel et alii, 1948) NOV. COMB. 1974, no caso de ser reconhecido o esquema proposto por LELLIOT (1972) para a taxonomia do gênero *Xanthomonas*. Mais tarde YOUNG et alii (1978) reestudaram o gênero e propuseram a denominação patovar, passando a estirpe branca para *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* NOV. COMB.

Mais recentemente RIBEIRO et alii (1987), estudando a mesma doença da mangueira, observaram que o patógeno pode infectar todas as partes da planta, desde folhas até frutos em desenvolvimento, causando lesões de coloração par-do amarelada, com exsudação de goma. Quando infecta o fruto ainda jovem pode ocorrer a mumificação do mesmo que continua ou não preso à planta. A mumificação e queda dos frutos são fatores que contribuem para reduzir a produção (KISHUM,

1981). Esse autor observou que o máximo de queda dos frutos ocorria quando os mesmos tinham a idade de 30 a 60 dias.

Por outro lado, os frutos que chegam até a colheita apresentam-se com manchas necróticas na superfície ficando inutilizados para exportação, com rápido apodrecimento pós colheita.

Outro aspecto relevante desta doença, está relacionado à distribuição geográfica do seu agente, pois segundo ROBBS et alii (1981) ocorre uma predominância da estirpe branca na região sudeste, enquanto a estirpe amarela predomina na região nordeste. Como existe uma diferença de agressividade entre as estirpes, o transporte de mudas de uma região para outra, deveria ter maior controle fitossanitário para impedir ou dificultar a disseminação desses diferentes tipos de patógenos.

A resistência de mangueiras a *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* foi relatada apenas por MAYERS et alii (1988).

Esses autores avaliando 23 cultivares para a resistência de folhas e frutos à bacteriose, verificaram que os cultivares ou seleções Carabao, Sensation, Nam Dok Mai, Early Gold e Carried, apresentam resistência foliar e de frutos muito boa; Glenn, Davis Haden, Edward, Florigon, apresentam bons níveis de resistência foliar, mas se mostram suscetíveis à bacteriose no fruto. Já os demais cultivares, incluindo a maioria das seleções Kensington Pride, Keitt, Zill,

Irwin e Tommy Atkins mostraram alta suscetibilidade tanto à infecção em folhas como em frutos.

Os trabalhos pioneiros no estudo dos patógenos de planta aplicando-se técnicas serológicas foram iniciados a partir do começo deste século.

LINK & SHARP (1927) e GOLDSWORTHY (1928) relatam que as técnicas serológicas aplicadas às fitobactérias foram iniciados por ZIPFEL (1912)², na Alemanha. Porém, a primeira citação sobre a utilização destas técnicas para a classificação de bactérias foi atribuída a John-Brooks et alii¹, segundo NAMEKATA (1969).

FANG et alii (1950) relatam em seu trabalho que conseguiram diferenciar serologicamente quatro serotipos de *Xanthomonas campestris*.

MORTON (1965) menciona que o uso desta técnica agiliza a detecção de bactérias fitopatogênicas, prevenindo a sua disseminação para áreas isentas do patógeno, baseando-se no fato de que só os sintomas, muitas vezes são indefinidos.

OUCHTERLONY (1958) idealizou o método de dupla difusão em agar, onde as reações serológicas eram realizadas em um meio agarizado sobre um lâmina de microscopia. SHEKHAWAT & CHAKRAVARTI (1977) empregaram a técnica de dupla di-

¹ JOHN-BROOKS, R.S.; NAIN, K. & RHODES, M. The investigation of phytopathogenic bacteria by serological and biochemical methods. Journal of Pathological Bacteria, 28:203-209, 1925.

² ZIPFEL, H. Beiträge zur Morphologie und Biologie der Knöllchenbakterien der Leguminosen. Centralbl. Bakt. 32 II:97-137. 1912

fusão em serologia para diferenciar várias espécies fitopatológicas de *Xanthomonas*. Recentemente, SUGIMORI et alii (1986) desenvolveram um novo meio específico para a realização das reações serológicas, denominado MJA-1, que demonstrou ser muito mais eficiente que o original.

LEITE & OLIVEIRA (1975) idealizaram um aparelho para facilitar a realização de orifício (pocinhos) no meio agarizado colocado em lâmina de microscopia, que chamaram de FURAGAR. Este equipamento consta de uma matriz vasadora com diâmetro e distâncias tangenciais conhecidas, que perfuram o meio de forma padronizada e uniforme, sobre pressão manual.

CARDOSO & OLIVEIRA (1974) utilizaram pela primeira vez a técnica de imunização animal via intraganglionar (linfonódulo) empregando fungos patogênicos. Posteriormente, OLIVEIRA et alii (1977) empregaram essa mesma técnica para a bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, conseguindo detectar a sua presença mesmo em mistura com várias espécies de fitobactérias.

SUGIMORI et alii (1978) e BACH et alii (1978) empregaram a mesma técnica de injeção no linfonódulo para obtenção do anti-soro e conseguiram as mesmas reações serológicas altamente específicas em preparações homólogas, trabalhando com *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral, Teixeira & Pinheiro, 1956) Young, Dye & Wilkie, 1978 e *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse, 1915) Dye, 1978, respectivamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no laboratório e casa-de-vegetação da Seção de Microbiologia Fitotécnica, do Instituto Agronômico de Campinas.

3.1. Meios de cultura

Os seguintes meios de cultura foram utilizados para o isolamento, a manutenção das culturas bacterianas e o preparo dos antígenos empregados na imunização e para a realização dos testes serológicos:

Meio de Batata-Dextrose-Agar(BDA)

Batata	200g
Dextrose	30g
Agar	20g
Água(volume completado para 1L)	

Meio MJA-1 (SUGIMORI et alii,1986)

Cicloheximida	- 0,3g
Bacto-Agar(Difco)	- 15g
Água	- 1 litro
pH	5,0 - 5,5

3.2. Isolamento das bactérias e manutenção das culturas

Foram efetuados isolamentos a partir de material de mangueira doente, originário das regiões de Lins (Tabela 1). Esses isolamentos foram realizados através do processo tradicional, ou seja, parte do tecido infectado foi retirada da planta, desinfestada com hipoclorito de sódio durante um minuto, macerada em água esterilizada e, posteriormente, com o auxílio de uma alça de platina, a suspensão foi riscada em placa de Petri contendo o meio de cultura BDA. As cultura bacterianas que se desenvolveram nessas placas foram transferidas para tubo de cultura contendo o mesmo meio inclinado.

Após 3 repicagens sucessivas para a purificação dos isolados, as culturas de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* foram transferidas para tubos de ensaio contendo o meio de cultura BDA ligeiramente inclinado. Depois do desenvolvimento da cultura, colocou-se óleo mineral neutro esterilizado nos tubos, cobrindo as colônias, para sua preservação. As outras duas culturas de *X. campestris* pv. *manihotis* (SMF-2833) e *X. campestris* pv. *ricini* (SMF-5548), respectivamente de mandioca e mamoneira (Tabela 1), utilizadas neste trabalho estavam mantidas na bacterioteca da Seção de Microbiologia Fitotécnica.

Tabela 1. Código, origem e hospedeiro dos isolados brancos de *Xanthomonas campestris* utilizados.

CÓDIGO SMF ⁽¹⁾	ORIGEM	HOSPEDEIRO
2833	IAC ⁽²⁾	MANDIOCA
5182	LINS	MANGUEIRA
5182-1	LINS	MANGUEIRA
5182-1RF	LINS	MANGUEIRA
5268	SABINO	MANGUEIRA
5268-R	SABINO	MANGUEIRA
5285-A	LINS	MANGUEIRA
5285-B	LINS	MANGUEIRA
5548	IB ⁽³⁾	MAMONEIRA

(1) SMF = Seção de Microbiologia Fitotécnica, IAC.

(2) Retirado da bacterioteca da Seção de Microbiologia Fitotécnica, IAC.

(3) Isolado I.B.nº 313/89 cedido pelo Pesquisador Científico Júlio Rodrigues Neto, Instituto Biológico de São Paulo.

3.3. Preparo dos antígenos imunizantes

Os antígenos utilizados para imunização dos animais foram obtidos de culturas puras das bactérias cultivadas em meio BDA durante 24-48 horas à temperatura de 28°C. Após esse período de crescimento foram preparadas suspensões bacterianas em água esterilizada, ajustando-se a concentração para 10% de transmitância em fotocolorímetro Bauch & Lomb, modelo Spectronic 20, com comprimento de onda de 560nm (S-1).

A seguir uma alíquota de 3ml dessa suspensão bacteriana foi centrifugada a 10.000g, durante 3 minutos em centrífuga modelo Spin II. O centrifugado resultante (S-2), constituía-se de um líquido sobrenadante (L S), que era eliminado, e um sedimento (P-1) composto de células bacterianas intactas. Essas células bacterianas foram emulsionadas e homogeneizadas com a adição de 0,5ml de adjuvante Freund completo, constituindo-se assim no antígeno imunizante (Figura 1).

3.4. Obtenção do anti-soro

O animal empregado para a obtenção do anti-soro foi o coelho, com pesos acima de 2,5kg. A imunização foi realizada através de injeção dos antígenos, previamente preparados, no gânglio poplíteo (linfonódulo existente na coxa traseira do animal), segundo técnica de OLIVEIRA(1975). Uma

Figura 1. Preparo do antígeno imunizante.

segunda injeção foi aplicada no gânglio da outra coxa 15 dias após a primeira aplicação.

Antes de se iniciar a imunização, o animal foi submetido a uma sangria para obtenção do soro normal(SN), a ser utilizado como testemunha nos testes serológicos.

Para a obtenção do anti-soro foram feitas várias sangrias na veia marginal que circunda a orelha do coelho. Estas sangrias foram iniciadas 10 dias após a aplicação da primeira injeção com o antígeno (Figura 2). O sangue era coletado em becker, deixado em repouso à temperatura ambiente durante 4 horas e em seguida mantido por 20 horas a temperatura de 4°C, para permitir a separação da parte sólida da parte líquida. Após a separação, o anti-soro foi centrifugado a 10.000g durante 3 minutos em centrífuga Spin-II, para favorecer a remoção das partes sólidas restantes. Finalmente, o anti-soro foi colocado em ampolas plásticas de 10ml, onde adicionava-se merthiolate a 1:10.000, sendo então armazenado em congelador a -18°C.

3.5. Preparo do antígeno para as reações serológicas

Para a realização das reações serológicas foram empregados antígenos na forma de suspensão de células bacterianas intactas, em água esterilizada. Optou-se por esta técnica, por ser mais simples e de fácil execução e manuseio.

Figura 2. Imunização e sangrias para obtenção do soro normal (SN) e dos anti-soros (AS) de *Xanthomonas campestris* pvs.

Os isolados de *Xanthomonas campestris* pvs. foram cultivados em tubo de ensaio contendo o meio BDA inclinado, durante 24-48 horas a 28°C. Após o crescimento da colônia adicionou-se água esterilizada nos tubos e com o auxílio de um bastão de vidro foi feita a suspensão bacteriana. Em seguida, com o auxílio de um fotocolorímetro Bauch & Lomb modelo Spectronic 20, com comprimento de onda de 560nm, ajustou-se a concentração da suspensão para a transmitância de 15%.

3.6. Testes serológicos

Para a realização dos testes serológicos, foi utilizada a técnica de dupla difusão em agar (OUCHTERLONY, 1958). A técnica original consistia da distribuição de 2,5ml do meio agarizado por lâmina de microscopia, conseqüentemente era necessário a introdução de um chumaço de algodão úmido, para que não ocorresse a secagem do meio agarizado colocado sobre a lâmina. Essa técnica foi modificada pela distribuição de 4ml do meio agarizado MJA-1 (SUGIMORI et alii, 1986) sobre lâminas de microscopia, que possibilitou também a eliminação do algodão umedecido. Os orifícios no agar das lâminas foram feitos com o auxílio do aparelho furagar (LEITE & OLIVEIRA, 1975), utilizando-se um modelo de 6 vasadores laterais dispostos de forma hexagonal e um vasador central. O diâmetro dos vasadores era de 2,5mm para o orifício externo e 3,5mm para o orifício central, com uma distância tangencial de 4,0mm.

Antígenos e anti-soros foram colocados nos orifícios do agar com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, até o seu completo preenchimento. Os antígenos tomaram as posições 1,3,5, laterais, e os anti-soros o orifício central.

Foram realizadas 5 leituras de cada lâmina, no intervalo de 72 horas.

Para a leitura dos testes de dupla difusão, utilizou-se o seguinte critério para indicação das bandas de precipitação em reação nos testes homólogos e heterólogos:

- = ausência de reação.
- + = reação positiva com uma linha de precipitação.
- ++ = reação positiva com duas linhas de precipitação.
- +++ = reação positiva com três linhas de precipitação.

3.7. Variedades de mangueiras utilizadas na inoculação

Foram inoculadas 17 variedades de mangueiras, coletadas da coleção da Estação Experimental de Tietê, do Instituto Agrônomo de Campinas, sendo 12 poliembrionicas: Bourbon, Carabao, Coquinho, Família, Itamarati, Jasmim, Manga D'Água, Maracanã, Maçãzinha, Pele de moça, Torrinha e Ubã e 5 variedades americanas monoembrionicas originárias da Flórida (USA): Haden, Irwin, Pope, Tommy Atkins e Zill.

Vinte sementes de cada variedade foram semeadas em vasos de barro com 5kg de uma mistura contendo 80% do composto formado de solo mais esterco curtido e 20% de areia grossa. As sementes foram semeadas sem os endocarpos na posição horizontal e cobertas superficialmente com solo.

As características das variedades de mangueira utilizadas são, de acordo com SIMÃO, 1955, SIMÃO, 1971; SAMPAIO, 1980; DONADIO et alii, 1982, as seguintes:

Bourbon

Originária da Ilha Bourbon, árvore de porte

médio, bem enfolhada; limbo foliar plano, base arredondada , ápice mucronado, lustrosa, cor verde, nervura saliente na página inferior. Panícula verde avermelhada, ereta, ramificada e flores aglomeradas. Carço médio, oblongo, medindo 9,4x3,3x2,3cm. Fruto grande, oblongo-alongado, formando quase um S, pesando 240 a 340g, medindo 12x6,9x6,6cm, base e ápice arredondados, casca lisa e grossa, cor verde amarelada, polpa sucrosa e amarela pouco intensa.

Coquinho

Origem desconhecida , árvore rústica, vigorosa de porte médio para pequeno, é também conhecida pelos nomes de Côco, Tucumã e Manquita na Amazônia e Manquito ou Manguiha no Nordeste; carço pequeno, fruto pequeno, oval, coloração variando do verde ao vermelho-vivo; polpa amarela e cheia de fibras. Muito usada como porta-enxerto, pois produz plantas com copa pequena.

Família

Originária de uma mangueira do Estado do Pará, árvore de porte médio e crescimento lento; limbo foliar plano, lustroso, base acuneada-arredondada, ápice curto, cor esverdinhada; panícula vermelha-escura, ereta, ramificada e flores meio aglomeradas; carço grande, oblongo-alongado, medindo 10x6,4x2,6cm e fibroso; fruto grande, oblongo-arredondado pesando de 750 a 1120g, base suleada, ápice arredondado,

casca lisa, cor verde amarelada, firme, com fibras moles e cor amarela.

Jasmim

Originária da Ilha de Itamaracá, Pernambuco. Árvore de porte médio, bem enfolhada; limbo foliar plano, base acuneada-arredondada, com ápice mucronado, macia, pouco lustrosa, nervura saliente na face inferior. Panícula vermelha, ramificada, flores meio aglomeradas e delicadas. Carço pequeno, ovado e fibroso medindo 6,2x3x1,6cm. Fruto pequeno, ovado, pesando 100 a 150g, medindo 7,5x5,5x3,5cm, base inclinada, ápice arredondado, casca fina, cor verde amarelada, polpa firme, poucas fibras finas e cor amarelada.

Maçãzinha ou Maça

Originária da Ilha de Itaparica, Bahia, árvore de porte pequeno, crescimento lento; limbo foliar plano, com algumas ondulações, base acuneada, ápice mucronado curto, brilhante, cor verde, nervura pouco saliente na página inferior. Carço médio, ovalado-oblíquo, fibroso, medindo 5,7 x 4,2x1,8cm. Fruto médio, ovalado-cordiforme, pesando 200 a 275g, medindo 7,2x7,8x6,3cm, base do ápice arredondada, casca lisa, cor verde, polpa aquosa e cor amarela.

Ubã

Cultivar originário de Minas Gerais. Árvore vigorosa, produtiva e tardia; carço pequeno, afilado, e usa-

dos como cavalo. Fruto pequeno, oblongo oval, peso médio de 150g, cor amarelada; polpa com fibras curtas, succulenta e amarelada.

Haden

Árvore de porte médio e crescimento lento; limbo foliar plano, base acuneada-arredondada, ápice acuminado, grossa, meio lustrosa, cor verde, nervura saliente só na face inferior. Panícula vermelha, ereta, ramificada e flores aglomeradas. Carço grande, oblongo, fibroso, medindo 8x4,4x2cm. Fruto grande, ovado-cordiforme, pesando 420 a 450g medindo 12x11x9cm, base e ápice arredondados, casca grossa, cor amarelo-rosada, polpa firme e cor amarelo-laranja. Uma das principais variedades comerciais do Brasil.

Irwin

Árvore de porte médio a pequeno e compacta; carço de tamanho pequeno a médio. Fruto de tamanho médio com até 13cm de comprimento, peso médio de 340g, forma oblonga e comprida lateralmente, cor amarelo-laranja e polpa sem fibras.

Pope

Árvore de porte pequeno a médio; carço perfaz cerca de 8% do peso total do fruto. Fruto grande, cordiforme, bico saliente, cor vermelha-arroxeadada e peso médio de 400g; polpa sem fibra e amarela.

Tommy Atkins

Árvore de porte alto, copa densa e arredondada; caroço pequeno e fruto muito grande, oval-oblonga, ápice largo e arredondado e base levemente saliente, cor amarelo-alaranjado; casca lisa, brilhante e grossa, polpa firme com fibras finas e abundantes e cor amarelo médio a escuro. Juntamente com a 'Haden' constituem as principais variedades comerciais brasileiras.

Zill

Árvore de porte alto, formato cônico; limbo foliar de coloração verde-clara; caroço perfaz cerca de 9% do peso do fruto. Fruto médio, ovalado, bico saliente, peso médio de 340g e cor amarelada recoberta por manchas vermelho-arroxeadas, polpa sucosa e sem fibras.

Carabao, Itamarati, Manga D'água, Maracanã, Pele de Moça e Torrinha

Não se encontrou na literatura consultada referências sobre essas variedades. Com exceção da Carabao que é uma variedade introduzida, as demais foram selecionadas dentro do Brasil, as quais não apresentam maior interesse comercial para produção de frutas. Apresentam, porém, muito interesse nos trabalhos de obtenção de novos porta-enxertos.

3.8. Preparo do inóculo

Nas inoculações das variedades de mangueira foi utilizado o isolado SMF-5182 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, selecionado entre os demais em testes preliminares de patogenicidade.

O isolado utilizado foi cultivado em meio de cultura BDA durante 48 horas à temperatura de 28°C. Após esse período de crescimento, as bactérias foram suspensas em água esterilizada e a concentração da suspensão ajustada para apresentar 50% de transmitância (T) em fotocolorímetro Bauch & Lomb, modelo Spectronic 20, com comprimento de onda de 560nm. Essa porcentagem de transmitância, corresponde a uma concentração aproximada de 4.10^6 células bacterianas/ml de suspensão.

3.9. Método de inoculação e avaliação dos sintomas

As inoculações foram realizadas com o emprego da técnica de agulhas múltiplas idealizada por ANDRUS(1948) e modificada por POMPEU & CROWDER(1973). Para aplicação desta técnica utilizou-se um inoculador, que consta de cerca de 20 agulhas colocadas de forma equidistante e montadas em um bloco de acrílico, circular, com aproximadamente 2 cm de diâmetro.

O método de inoculação constou do seguinte: uma

esponja de nylon do tipo utilizado em cozinha, é embebida na suspensão bacteriana. Em seguida coloca-se a esponja em contato com a face inferior da folha a ser inoculada, aplica-se o inoculador em cima da folha perfurando-a e fazendo com que penetre na esponja embebida com a suspensão bacteriana. Ao retirar o inoculador, as agulhas impregnadas com bactérias realizam a inoculação nos orifícios provocados na folha.

Para a inoculação das variedades monoembriônicas foram utilizadas 20 plantas, sendo inoculadas 4 folhas por planta.

Para a inoculação das variedades poliembriônicas foram utilizadas aproximadamente 60 plantas oriundas de 20 sementes (média de 3 plantas por semente) sendo inoculadas 4 folhas por planta.

As plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação sem o uso de câmara úmida. A leitura dos sintomas foi efetuada aos 15, 30 e 45 dias após a inoculação, adotando-se o seguinte critério de notas:

- 1 - sem sintoma na área inoculada-imune
- 2 - encharcamento no ponto de inoculação-resistente
- 3 - encharcamento até 20% em torno dos pontos de inoculação-moderadamente resistente
- 4 - encharcamento e/ou necrose da área inoculada-suscetível
- 5 - encharcamento, necrose e encarquilhamento da folha e aparecimento de sintomas fora da área inoculada-altamente suscetível

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Reações serológicas homólogas e heterólogas

O meio de cultura MJA-1, empregado nos testes de dupla difusão em agar, proporcionou a formação de bandas específicas e evidentes, demonstrando a sua grande sensibilidade nas reações e confirmando os resultados obtidos por SUGIMORI et alii(1986).

Foram realizadas cerca de 800 reações serológicas entre os antígenos e anti-soros homólogos e heterólogos dos 3 patovares de *Xanthomonas campestris* estudados, tendo sido observado resultados distintos entre eles. O AS-2833 de *X. campestris* pv. *manihotis* apresentou sempre reações com uma linha de precipitação, o AS-5548 de *X. campestris* pv. *ricini* apresentou sempre reações de duas linhas de precipitação e o AS-5182 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* apresentou sempre reações com três linhas de precipitação.

O emprego de técnicas serológicas na identificação de bactérias fitopatogênicas, tem aumentado muito nos últimos anos em face da demanda de informações nesse ramo da ciência.

A técnica de imunização via intraganglionar foi

idealizada por CARDOSO & OLIVEIRA(1974), para a obtenção de anti-soro a partir de antígenos provenientes de fungos fitopatogênicos. Utilizando essa mesma técnica para a realização das reações serológicas em fitobactérias, OLIVEIRA et alii (1977) obtiveram excelentes resultados trabalhando com *Xanthomonas albilineans*(Ashby) Dowson.

CARDOSO & OLIVEIRA(1974) utilizaram ainda um agente emulsificante (adjuvante completo de Freund), para proteger o agente patogênico, envolvendo-o durante a formação do anti-soro.

Essa técnica também foi utilizada por BACH et alii(1978) para a obtenção de anti-soro específico para *Xanthomonas campestris* pv. *citri*(Hasse,1975) Dye,1978, e por SUGIMORI et alii(1978) para obtenção de anti-soro específico para *Pseudomonas garcae*.

No presente trabalho, o emprego do agente emulsificante, associado ao método de imunização através de injeção no linfonóculo, confirmou a grande eficiência para se obter anti-soro específico, o que foi demonstrado com a presença de anticorpos logo após a realização da primeira injeção.

4.1.1. Reações homólogas

As reações serológicas de dupla difusão em agar basearam-se nos trabalhos de OUCHTERLONY(1958), sendo

substituído o meio agarizado pelo meio MJA-1, desenvolvido por SUGIMORI et alii (1986). Esse meio, que também é agarizado, além de mais simples, mostrou-se mais eficiente em permitir nas reações o aparecimento de linhas de precipitação mais evidentes e definidas.

Os resultados obtidos em reações serológicas homólogas com antígenos constituídos de células intactas em água esterilizada, demonstraram que somente é possível o aparecimento de reações positivas quando os antígenos (AT) e os anti-soros (AS) são homólogos. Assim, o AT-5182 reagiu positivamente com o seu AS-5182, apresentando três linhas de precipitação, sendo duas linhas bem visíveis e definidas e uma terceira linha mais fraca e pouco visível (Figura 3).

Com relação ao AT-2833 em reação homóloga com o seu AS-2833, apresentou uma única linha de precipitação bem visível e definida (Figura 4), o mesmo aconteceu com o AT-5548 contra o seu AS-5548, que apresentou duas linhas de precipitação visíveis e definidas (Figura 5).

Na Tabela 2 estão reunidos os resultados das reações homólogas entre os antígenos dos 3 patovares das bactérias estudadas, e seus respectivos anti-soros.

As linhas de precipitação de cada AT e As homólogos são características específicas individuais, não tendo nenhuma semelhança com outras reações homólogas; dessa forma, conseguiu-se a caracterização serológica dos três patovares de *X. campestris*.

Figura 3. *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. Antígeno AT-5182 em reação com seu anti-soro homólogo AS-5182. T - antígeno e S - anti-soro.

Figura 4. *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Antígeno AT-2833 em reação com seu anti-soro homólogo AS-2833.
T - antígeno e S - anti-soro.

Figura 5. *Xanthomonas campestris* pv. *ricini*. Antígeno AT-5548 em reação com seu anti-soro homólogo AS-5548.
T - antígeno e S - anti-soro.

Tabela 2. Reações homólogas de dupla difusão entre os antígenos de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. campestris* pv. *manihotis* e *X. campestris* pv. *ricini*, com seus respectivos anti-soros.

	AS-5182	AS-2833	AS-5548
AT-5182	+++ ¹		
AT-2833		+	
AT-5548			++

(1)

+ = 1 linha de precipitação
 ++ = 2 linhas de precipitação
 +++ = 3 linhas de precipitação

4.1.2. Reações heterólogas

Foram realizados dois tipos de testes heterólogos com os antígenos e anti-soros dos três patovares em estudo. No primeiro teste o antígeno AT-5182 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* foi utilizado para reagir com os anti-soros de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (S_2), *X. campestris* pv. *manihotis* (S_1) e *X. campestris* pv. *ricini* (S_3).

No outro tipo de teste, o anti-soro AS-5182 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* foi colocado para reagir com os antígenos AT-5182, AT-2833 e AT-5548, das três bactérias em estudo.

Também o antígeno AT-2833 de *X. campestris* pv. *manihotis* foi colocado para reagir com os anti-soros de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. campestris* pv. *manihotis* e *X. campestris* pv. *ricini*.

O anti-soro de *X. campestris* pv. *manihotis* também foi colocado para reagir com os antígenos AT-5182, AT-2833 e AT-5548-

Finalmente, o antígeno AT-5548 de *X. campestris* pv. *ricini* foi colocado para reagir com os anti-soros de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. campestris* pv. *manihotis* e *X. campestris* pv. *ricini*. Em todos os testes realizados os resultados mostraram que os antígenos somente reagiram com os seus anti-soros homólogos, não apresentando nenhum tipo de reação quando realizados com antígenos e anti-soros heterólogos.

Figura 6. Reação do antígeno AT-5182 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* com os anti-soros de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (S_2), *X. campestris* pv. *manihotis* (S_1) e *X. campestris* pv. *ricini* (S_3).

Também o teste onde o anti-soro de *X. campestris* pv. *ricini* foi colocado para reagir com os antígenos AT-5182, AT-2833 e AT-5548 mostrou que os anti-soro somente reagiu com o seu antígeno homólogo (AT-5548), não apresentando nenhum tipo de reação com os outros antígenos estudados.

A Tabela 3 mostra um resumo dos resultados das reações homólogas entre antígenos e anti-soros das 3 bactérias em estudo e também, estão os resultados das reações heterólogas entre os anti-soros das mesmas bactérias, contra seus respectivos antígenos.

Esses dois tipos de reações foram realizadas para se determinar com segurança a ausência de reações positivas entre os antígenos e anti-soros heterólogos, reforçando sobremaneira os resultados das reações homólogas e demonstrando ainda que os três patovares de *Xanthomonas campestris* não apresentaram características serológicas comuns, sendo, portanto, pertencentes a serotipos distintos.

4.1.3. Reações heterólogas entre AS-5182 e antígenos de bactérias isoladas de mangueiras da região de Lins

Os resultados das reações entre o anti-soro AS-5182 de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* e os antígenos de vários isolados de mangueiras da região de Lins, coincidiram com aqueles encontrados em reações homólogas para o antígeno e anti-soro de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Tabela 5).

Tabela 3. Reações homólogas e heterólogas entre antígenos e anti-soros de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. campestris* pv. *manihotis* e *X. campestris* pv. *ricini*.

	AS-5182	AS-2833	AS-5548
AT-5182	+++ ⁽¹⁾	-	-
AT- 2833	-	+	-
AT-5548	-	-	++

(1)

+ = reação positiva, onde cada sinal(+) significa uma linha de precipitação.

- = ausência de reação.

Os resultados encontrados confirmaram aqueles das reações homólogas (Tabela 2) ou seja, as reações apresentaram as mesmas 3 linhas de precipitação, indicando que os isolados obtidos de diferentes regiões, tratam-se do mesmo patovar de *X. campestris*.

Os antígenos dos isolados das bactérias obtidas de mangueiras de diferentes regiões, não reagiram com os anti-soros AS-2833 e AS-5548 de *X. campestris* pv. *manihotis* e *X. campestris* pv. *ricini*, respectivamente (Tabela 4).

Pelos resultados obtidos podemos observar que, serologicamente, as bactérias estudadas apresentaram características antigênicas comuns e próximas, mostrando tratar-se do mesmo serotipo.

Tabela 4. Reações heterólogas entre os antígenos de diferentes isolados de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* e os anti-soros dos patovares de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. campestris* pv. *manihoti* e *X. campestris* pv. *ricini*.

	AS-5182	AS-2833	AS-5548
AT-5182-1	+++ ⁽¹⁾	-	-
AT-5182-1RF	+++	-	-
AT-5268	+++	-	-
AT-5268-R	+++	-	-
AT-5285-A	+++	-	-
AT-5285-B	+++	-	-
AT-5182 (Test.)	+++	-	-

(1)

+ = reação positiva, onde cada sinal (+) significa uma linha de precipitação.

- = ausência de reação.

4.2. Testes de inoculação em variedades de mangueira

As avaliações dos sintomas apresentados pelas folhas inoculadas pelo método das agulhas múltiplas encontram-se na Tabela 5.

O método de inoculação de mangueiras com a utilização da técnica das agulhas múltiplas, mostrou-se simples, prático e eficiente, para ser empregado em trabalhos de seleção de plantas resistentes à bacteriose. Esta técnica proporciona uma área na qual as diferenças de sintomas ou quantidade de destruição dos tecidos inoculados pode ser usada como uma medida do grau de resistência (POMPEU & CROWDER, 1973).

Nas avaliações dos sintomas não se verificou variações entre plantas de variedades monoembriônicas ou poliembrionicas (nas quais foram inoculadas 3 plantas por semente), quanto a reação à bacteriose. Observou-se, no entanto, haver uma diferença entre as variedades com relação a velocidade com que os sintomas se desenvolveram. Variedades como Carabao, Coquinho, Família, Itamarati, Maracanã, Maçã-zinha, Pele de Moça, Torrinha, Ubá e Pope, apresentaram um menor desenvolvimento dos sintomas 15 após a inoculação. As variedades Bourbon, Manga D'água, Haden, Irwin, Tommy Atkins e Zill apresentaram um desenvolvimento maior dos sintomas, nessa mesma época, mostrando maior suscetibilidade a doença quando comparada às demais.

Tabela 5. Reação de variedades de mangueiras poliembrionicas e monoembrionicas, inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, pelo método das agulhas múltiplas.

VARIEDADES	DIAS APÓS A INOCULAÇÃO		
	15	30	45
Bourbon	3 ⁽²⁾	4	5
Carabao	2	3	5
Coquinho	2	3	5
Família	2	3	5
Itamarati	2	3	5
Jasmim	1	2	4
Manga d'Água	3	4	5
Maracanã	2	3	5
Maçãzinha	2	3	5
Pele de Moça	2	3	5
Torrinha	2	3	5
Ubá	2	3	5
Haden ⁽¹⁾	3	4	5
Irwin ⁽¹⁾	3	4	5
Tommy Atkins ⁽¹⁾	3	4	5
Zill ⁽¹⁾	3	4	5
Pope ⁽¹⁾	2	3	5

(1) Variedades monoembrionicas.

(2) Avaliação através de escala variando de 1 a 5.

A evolução dos sintomas aos 30 e 45 dias após a inoculação, mostrou que com exceção da 'Jasmim', todas as variedades estudadas apresentaram praticamente o mesmo resultado de suscetibilidade ao patógeno (Figuras 7 e 8).

A variedade Jasmim se destacou das demais variedades pelo fato de aos 15 dias não ter apresentado qualquer desenvolvimento de sintomas, o que só foi ocorrer aos 30 dias após a inoculação. Todavia, aos 45 dias após a inoculação os sintomas já eram evidentes (Figura 7).

Outro aspecto diferencial da variedade Jasmim relaciona-se com a manutenção das folhas inoculadas. Enquanto a 'Jasmim' reteve as suas folhas, todas as demais derubaram as folhas inoculadas 45-50 dias após a inoculação.

A resistência de mangueiras a *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* foi relatada recentemente por MAYERS et alii(1988). Dos cultivares apontados como resistentes por aqueles autores, verificou-se que apenas 'Carabao' encontrase entre os avaliados neste trabalho, porém comportando-se como suscetível. Como a procedência dessa variedade não é bem definida, não é possível se fazer comparações entre os resultados, pois pode se tratar de materiais distintos. Já, a alta suscetibilidade observada para as variedades Zill, Irwin e Tommy Atkins à bacteriose, confirma os resultados de MAYERS et alii(1988).

Como a bacteriose da mangueira é uma doença que assumiu grande importância recentemente (RIBEIRO et alii

Figura 7. Sintoma apresentado pela variedade Jasmim aos 45 dias após a inoculação com *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*.

Figura 8. Sintoma apresentado pela variedade Bourbon aos 45 dias após a inoculação com *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*.

1987), fica evidente a necessidade de se procurar fontes de resistência ao agente dessa doença, uma vez que pelos resultados obtidos, as variedades estudadas ou são suscetíveis ou apresentam níveis de resistência insatisfatórios para serem utilizadas como fonte de resistência em um programa de melhoramento.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser tiradas:

- 1 - Os testes serológicos dos três patovares de *X.campestris* mostraram que as reações homólogas entre AT e AS foram positivas e as reações heterológicas foram negativas, constituindo-se assim em serotipos distintos e pertencendo a grupos serológicos diferentes.
- 2 - As linhas de precipitação de cada AT e AS homólogos mostraram características específicas, sendo de três linhas para *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, de duas linhas para *X. campestris* pv. *ricini* e de uma linha para *X.cam-*
tris pv. *manihotis*, podendo ser usadas como características para separar os 3 patovares.
- 3 - Apesar da 'Jasmim' ter mostrado uma moderada suscetibilidade, nenhuma das variedades de mangueira avaliadas pode ser indicada como fonte de resistência ao agente da bacteriose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRUS, C.F. A method for testing beans for resistance to bacterial blights. Phytopathology, Lancaster, 38:757-759, 1948.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de Janeiro, IBGE, V. 44, 1983.
- BACH, E.E.; ALBA, A.P.C.; PEREIRA, A.L.G.; ZAGATTO, A.G. & ROSSETI, V. Serological studies of *Xanthomonas citri* (Hassen) Dowson. Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, 45(4):229-236, 1978.
- BREED, R.S.; MURRAY, E.G.D. & SMITH, N.R. Bergey's manual of determinative bacteriology. 7ed. Baltimore. The Williams and Williams Co., 1957. 1094p.
- CARDOSO, R.M.G. & OLIVEIRA, A.R. Injeções intraganglionares no preparo de anti-soros específicos para *Ceratocystis paradoxa* (Dade) C. Moreau. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 7, Brasília, 1974. Resumos.

- DONADIO, L.C.; SOARES, N.B.; MORAES, L.G. de; XAVIER, N. J. D.; SCALOP, E.J. & PIZA Jr., C.T. Características de algumas variedades de mangueira cultivadas no Estado de São Paulo. Campinas, CATI, 1982. 16p. (CATI, Boletim Técnico 171).
- DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C.; LELLIOT, 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, 59:153-168, 1980.
- FANG, C.T.; ALLEN, O.N.; RIKER, A. & DIKSON, J.G. The pathogenic, physiological and serological reactions of the four species of *Xanthomonas translucens*. Phytopathology, St. Paul, 40:44-64, 1950.
- GOLDSWORTHY, M.G. The production of agglutinins by phytopathogenic bacteria. Phytopathology, St. Paul, 18:277-288, 1928.
- KISHUM, R. Loss in mango fruit due to bacterial canker *Xanthomonas mangiferaeindicae*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5, Cali, 1981. Proceedings. p.181-184.

- LEITE, A.F. & OLIVEIRA, A.R. Furagar. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 1:143-146, 1975.
- LELLIOT, R.A. The Genus *Xanthomonas*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 3, Wageningen, 1972. Proceedings. p.269-272.
- LINK, G.K.K. & SHARP, C.G. Correlation of host and serological specificity of *Bacterium campestre*, *Bact. flaccum-faciens*, *Bact. phaseoli* and *Bact. phaseoli sojense*. Botanical Gazette, Chicago, 83:145-160, 1927.
- MANICA, I. Fruticultura Tropical - 2.Manga. São Paulo, Ceres. 1981. 135p.
- MAYERS, P.E.; WHILEY, A.W.; HUTTON, D.G. & SARANAH, J. Integrated control of bacterial black spot (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*) of mango. 1. Evaluation of 23 cultivars of mango for foliar and fruit resistance to bacterial black spot under orchard conditions at Childers, south east Queensland. Maroochy Horticultural Research Station, Queensland, 1988. p.100-101. (Report nº 5).
- MORTON, D.J. Comparisons of three serological procedures for identifying *Xanthomonas* in pepper leaves. Phytopatholo -

gy, St. Paul, 55:421-424, 1965.

NAMEKATA, T. Serologia aplicada ao estudo de bactérias fitopatogênicas. In: SIMPÓSIOS: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, III, Campinas, 1969. p.96 - 102.

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

OLIVEIRA, A.R.; NAKAMURA, T.; LIU, H.P. & SUGIMORI, M.H. Serological tests applied to leaf scald disease of sugarcane. In: INTERNATIONAL SOC. SUGAR CANE TECHNOLOGY, I. , São Paulo, 1977. Proceedings. p.459-468.

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

PATEL, M.K.; MONIZ, L. & KULKARNI, Y.S. *Pseudomonas mangiferae-indicae*, pathogenic on mango. Indian Phytopathology, New Delhi, 1:147-152, 1948.

POMPEU, A.S. & CROWDER, L.V. Methods of inoculation and bacterial concentrations of *Xanthomonas phaseoli* Dows. for the inheritance of disease reactions in *Phaseolus vulgaris*

L. crosses(dry beans), under growth chamber conditions.
Ciência e Cultura, São Paulo, 25(11):1078-1081, 1973.

RIBEIRO, I.J.A.; SUGIMORI, M.H.; PIZA Jr., C.T.; PIZA, S. M.
T.; SOARES, N.B. & KAWATE, R. Severidade de *Xanthomonas*
campestris pv. *mangiferaeindicae*(Patel et alii,1948)Robbs,
Ribeiro & Kimura,1974 em mangueiras no Estado de São Pau-
lo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campi -
nas, 1987. Resumo. p.55.

ROBBS, C.F. Algumas bactérias fitopatogênicas do Distrito
Federal. Agronomia, Rio de Janeiro, 14(2):148-150, 1955.

ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D. & KIMURA, O. Sobre a posição
taxonômica de *Pseudomonas mangiferaeindicae* Patel et alii
1948, agente causal da "mancha bacteriana" das folhas de
mangueira. Arquivos da Universidade Federal Rural, Rio
de Janeiro, 4(1):11-14, 1974.

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

SAMPAIO, J.M.M. Características gerais de alguns cultivares
e tipos de mangueiras no Brasil. In: DONADIO, L.C., ed.

SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGUEIRA, 1 , Jaboticabal. F.C.A.V./UNESP, 1980. Anais. p.35-50.

SCHON, J. A Exportação de Manga - Aspectos gerais. Anuário do Forum Paulista de Fruticultura, Jaboticabal, 1983. p.92-93.

SHEKHAWAT, P.S. & CHAKRAVARTI, B.P. Serological tests of find out antigenic differences among isolates of *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson and some other phytopathogenic bacteria. Current Science, Bangarole, 46:46-47, 1977.

SIMÃO, S. Contribuição para caracterização de algumas variedades de mangueira (*Mangifera indica* L.). Piracicaba, 1955. 95p. (Livre docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

SIMÃO, S. Manual de Fruticultura. Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, 1971. 530p.

STEYN, P.L.; VILJOEN, N.M. & KOTZE, J.M. The causal organism of bacterial black spot of mangoes. Phytopathology, St. Paul, 64:1400-1404, 1974.

SUGIMORI, M.H.; OLIVEIRA, A.R.; NAKAMURA, T. & RODRIGUES NETO, J. Anti-soro para *Pseudomonas garcae* (Amaral et alii) preparados pela técnica de injeção no linfonódulo. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 4(1):7, 1978. (Resumo).

SUGIMORI, M.H.; RODRIGUES NETO, J. & OLIVEIRA, A.R. Novo meio de reação para testes serológicos de dupla difusão em agar com antígenos de fitobactérias. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 12:33, 1986. (Resumo).

YOUNG, J.M.; DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; PANAGOPOULOS, C.G. & ROBBS, C.F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research, Wellington, 21:153-177, 1978.