APLICAÇÃO DA SEROLOGIA NA DETECÇÃO DE *Xanthomonas albilineans* EM COLMOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

YODIRO MASUDA

Orientador: Prof. Dr. HASIME TOKESHI

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
Novembro, 1980

A meus pais
e irmãos
minha homenagem

À
Iracema,
Francisco e Gabriel,
dedico.

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

Durante a execução do presente trabalho o autor teve o privilégio de se relacionar com diversas pessoas, de quem sempre recebeu colaborações, palavras de estímulo e amizade. A estas pessoas o autor expressa sua gratidão.

O autor expressa seus agradecimentos especiais:

Ao Professor Dr. HASIME TOKESHI, pela valiosa orientação e revisão dos originais;

Ao Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz, à Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Campus de Botucatu e ao IAA/PLANALSUCAR, pelas facilidades oferecidas na execução deste trabalho;

Ao Engº Agrº Dr. SIZUO MATSUOKA, pelo fornecimento de materiais, revisão dos originais e sugestões;

Aos Engºs Agrºs Dr. ÁLVARO SANGUINO, Dr. ANTONIO LIMA G. PEREIRA, MS FUJIO AKIBA, MS SHINOBU SUDO e MS TOMOMASA YANO, pelo fornecimento de materiais;

Aos Professores Dr. AUGUSTO FERREIRA DA EIRA, Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA, Dr. CHUKICHI KUKOZAWA, Dr. HIROSHI KIMATI e Engº Agrº Dr. TOSHIHIKO HINO, pelas sugestões e colaborações prestadas;

À Fitopatologista MS MARINEIDE MENDONÇA AGUILLEIRA, pela revisão dos originais e sugestões;

Aos Engºs Agrºs CLÁUDIO ROBERTO DAL PICCOLO e MARIA DE LOURDES REIS DUARTE, pelas colaborações prestadas;

À Srta. ROSELI A. CRESSONI e Sr. EDSON A. BERTOLINI, pelos trabalhos datilográficos;

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela colaboração nos trabalhos de laboratório e campo.

R E S U M O

Aplicação da serologia na detecção de *Xanthomonas albilineans* em colmos de cana-de-açúcar.

Yodiro Masuda e Hasime Tokeshi

O experimento de inoculação de diversas concentrações de *Xanthomonas albilineans*, em cana-de-açúcar, cultivar NA56-79, mostrou que a concentração aproximada de 8×10^2 células/ml é suficiente para induzir sintoma de escaldadura-das-folhas. Observou-se ainda que o número de plantas com sintomas da doença aumenta linearmente com o aumento da concentração da bactéria.

Foram preparados antissoros contra as bactérias *Erwinia herbicola* (Eh), XRS (bactéria isolada de colmo com sintoma de raquitismo-da-soqueira), *Xanthomonas campestris* patotipo *campestris* (Xc) e *X. albilineans* (Xa). Foram ainda preparados extratos de exopolissacarídeos dessas bactérias e de diversos isolados de bactérias fitopatogênicas.

Reações homólogas e heterólogas realizadas com esses antissoros mostraram que: a) o antissoro de Eh é específico para seu homólogo em reações de microaglutinação em placas, enquanto que em testes de dupla difusão em gel-agar esse antissoro reagiu fracamente com alguns isolados de patotipos de *X. campestris*; b) o antissoro de XRS reage especificamente com seus antígenos homólogos. Essa bactéria aparentemente não possui exopolissacarídeos porém, possui componentes antigênicos externos termolábeis e solúveis em salina; c) o antissoro de Xc reagiu com células intactas de 8 patotipos de *X. campestris* nos testes de dupla difusão em gel-agar e/ou teste de microaglutinação em placas, mas não reagiu com exopolissacarí-

deos dessas bactérias. Os antígenos responsáveis pelas reações com células intactas são, provavelmente, termolábeis; d) a bactéria *X. albilineans* provavelmente possui dois componentes antigênicos somáticos e dois componentes antigênicos de natureza exopolissacarídica; e) o antissoro de Xa reagiu, dentre as bactérias testadas, somente com patotipos de *X. campestris*, não reagindo com isolados de outros gêneros bacterianos.

Foram estudados 3 métodos de extração de *X. albilineans*, diretamente do colmo de cana-de-açúcar, para detecção dessa bactéria por métodos serológicos: a) preparação de extrato de xilema, baseada na passagem de água através do xilema, por meio de vácuo; b) preparação de extrato de nós, que consiste na maceração, por pressão, de porções de nós, por meio de um extrator manual e c) preparação de extrato de vasos, baseada na maceração de vasos descoloridos retirados da região dos nós. Destes métodos somente o de preparação de extrato de vasos apresentou resultados positivos, na detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar com infecção latente.

Foi desenvolvida uma metodologia para se detectar a presença de *X. albilineans* em extratos de vasos de colmos afetados pela escaldadura-das-folhas. Esta metodologia consiste em se processar a reação de aglutinação em micropipetas. Este método de extração de vasos, aliado ao método de aglutinação em micropipeta, permite a detecção de infecção latente, de *X. albilineans*, em colmos de cana-de-açúcar, principalmente quando estes apresentam vasos descoloridos.

S U M M A R Y

Application of serology for detecting *Xanthomonas albilineans* in sugarcane stalks.

Yodiro Masuda e Hasime Tokeshi

An inoculation experiment carried out with several concentrations of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane stalks, cultivar NA56-79, has shown that a concentration of approximately 8×10^2 cells/ml is sufficient to induce leaf scald symptoms. Furthermore, the number of plants with disease symptoms increases directly with the increase in bacterial concentration.

Antisera were prepared against *Erwinia herbicola* (Eh), XRS (bacteria isolated from sugarcane stalk with ratoon stunting disease), *Xanthomonas campestris* (Xc) and *X. albilineans* (Xa). Polysaccharide extracts were prepared from isolates of several plant pathogenic bacteria.

Homologous and heterologous reactions carried out with the antisera produced, have shown that: a) the antiserum against Eh is specific to its homologous in microagglutination tests, whereas in agar double diffusion test this antiserum reacts slightly with some isolates of nomenclatures of the *X. campestris* group; b) the antiserum against XRS reacts specifically to its homologous antigens. Apparently, this bacterium does not produce polysaccharides but produces external antigenic substances that are soluble in saline and thermolabile; c) the antiserum against Xc reacted with whole cells of 8 isolates of nomenclatures of the *X. campestris* group in agar double diffusion test, but did not react with polysaccharides of those isolates. The antigens responsible

for these reactions are probably thermolabile; d) Apparently, *X. albilineans* has two somatic antigens and two antigenic substances in the polysaccharide extracts; e) The antiserum against Xa reacted, among the isolates tested, only with some isolates of nomenclature species of the *X. campestris* group. It did not react with bacteria belonging to other genera.

Three methods of *X. albilineans* extractions, directly from sugarcane stalks, were studied for the detection of this bacterium by serological means: a) xylem extract preparation, based on the flux of water through the xylem, obtained with the aid of a vacuum equipment; b) node extract preparation, by the maceration of pieces of nodal tissues, with the aid of a manual extractor; and c) vessel extract preparation, based on the macerations of discolored vessels taken from the nodal region of the stalk. Only the latter method presented positive results in the detection of *X. albilineans* in sugarcane stalks.

A method to assay the presence of the bacteria in vessel extracts was developed, utilizing micropipettes for the agglutination tests. The method of vessel extract preparation allied to the method of agglutination in micropipette allow the detection of latent infection of *X. albilineans* in sugarcane stalks, mainly when the vessels show discoloration.

This method has the advantage of utilizing a very small amount of antiserum for each test.

Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Escaldadura-das-folhas da cana-de-açúcar	3
2.2. Serologia	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Isolados utilizados e experimentos de inoculação de <i>Xanthomonas albilineans</i> em cana-de-açúcar	16
3.1.1. Teste de patogenicidade do isolado Xa em plantas do cultivar NA56-79	17
3.1.2. Determinação da infectividade do isolado Xa em diferentes concentrações de inóculo	19
3.2. Preparo de antígenos e antissoros	20
3.2.1. Preparo de antígenos para obtenção de antissoros	20
3.2.2. Preparo de antígenos para reações serológicas	21
3.2.2.1. Maceração de células bacterianas	22
3.2.2.2. Preparo de extratos de exopolissacarídeos	22
3.3. Preparo de antissoros	23
3.4. Métodos serológicos	24
3.4.1. Teste de dupla difusão em gel-agar em lâmina	24
3.4.2. Teste de microaglutinação em placa ou em lâmina escavada	25
3.4.3. Teste de aglutinação em micropipeta	26
3.5. Testes serológicos para caracterização dos antissoros	27

3.5.1. Testes serológicos de reação cruzada entre antígenos macerados dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar	27
3.5.2. Reação cruzada entre antígenos constituídos de extrato de exopolissacarídeos dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar	27
3.5.3. Reação cruzada entre antígenos constituídos de células intactas dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar	28
3.5.4. Reação dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com extratos de exopolissacarídeos de diversos patotipos de <i>X. campestris</i> ..	28
3.5.5. Reação dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com células intactas de diversos patotipos de <i>X. campestris</i> , pelo método de dupla difusão em gel-agar	28
3.5.6. Reações homólogas entre diferentes concentrações dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de microaglutinação em placas	29
3.5.7. Titulação do antissoro AXa pelo método de microaglutinação em placas	29
3.5.8. Reações cruzadas entre antígenos constituídos de células intactas dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos exopolissacarídeos com os antisso-	

	Página
ros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de microaglutinação em placas	30
3.5.9. Reações dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com antígenos constituídos de células intactas e seus respectivos exopolissacarídeos de diversos isolados de bactérias fitopatogênicas, pelo método de microaglutinação em placas	30
3.6. Métodos de preparação de extratos de cana-de-açúcar para detecção de <i>X. albilineans</i> por métodos serológicos	31
3.6.1. Preparação de extrato de xilema pelo método da passagem de um fluxo de água através do colmo da cana-de-açúcar	31
3.6.2. Preparação de extrato de nós, através da maceração de nós de colmos de cana-de-açúcar	32
3.6.3. Preparação de extrato de vasos, através da maceração de vasos de xilema de cana-de-açúcar	33
3.7. Testes serológicos para detecção de <i>X. albilineans</i> em colmos de cana-de-açúcar	34
3.7.1. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de cana-de-açúcar, pelo método de microaglutinação em placas	34
3.7.1.1. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extrato de xilema do cultivar CP45-184, pelo método de microaglutinação em placas	34
3.7.1.2. Detecção de bactérias em extrato de xilema do cultivar CP45-184, enriquecido por incubação por 3 dias, pelo método de microaglutinação em pla	

	Página
cas	35
3.7.1.3. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extrato de xilema do cultivar CP45-184, concentrado por <u>cen</u> trifugação, pelo método de <u>mi</u> croaglutinação em placas	35
3.7.1.4. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de xilema dos cultivares IAC52-326 e Co740, pelo método de microaglutinação em placas	36
3.7.1.5. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de nós dos cultivares IAC52-326 e Co740, pelo método de microaglutinação em placas	37
3.7.1.6. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de nós e em extratos de xilema do cultivar CB41-76, pelo método de microaglutinação em placas	37
3.7.2. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de cana-de-açúcar, pelo método de <u>mi</u> croaglutinação em lâmina escavada	38
3.7.2.1. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos do cultivar CB41-76, pelo método de <u>mi</u> croaglutinação em lâmina escavada	39
3.7.2.2. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos dos <u>cultiva</u> res Co740 e CB41-76, pelo método de microaglutinação em lâmina escavada	39

3.7.2.3. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos de diversos cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de microaglutinação em lâmina escavada	40
3.7.3. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta	40
3.7.3.1. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos de cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta	42
3.7.3.2. Comparação da reatividade de diversas diluições de <i>X. albilineans</i> obtida em cultura pura e diluições de extrato de vasos de plantas com sintoma de escaldadura-das-folhas	42
3.7.3.3. Efeito da filtração de extratos de vasos nas reações serológicas para detecção de <i>X. albilineans</i> , pelo método de aglutinação em micropipeta	43
3.7.3.4. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos de diversos cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta	44
3.7.3.5. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos de diferentes amostras de cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta..	44

3.7.3.6. Detecção de <i>X. albilineans</i> em colmos de cana-de-açúcar com sintoma de estrias brancas nas folhas	45
3.7.3.7. Detecção de <i>X. albilineans</i> em amostras coletadas no experimento de inoculação de diversas concentrações da bactéria no cultivar NA56-79	47
4. RESULTADOS	49
4.1. Experimentos de inoculação de <i>X. albilineans</i> em cana-de-açúcar	49
4.1.1. Teste de patogenicidade do isolado Xa em plantas do cultivar NA56-79	49
4.1.2. Determinação da infectividade do <u>isola</u> do Xa em diferentes concentrações de inóculo	50
4.2. Testes serológicos para caracterização dos antissoros	53
4.2.1. Teste de reação cruzada entre antígenos macerados dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar	53
4.2.2. Teste de reação cruzada entre antígenos constituídos de extratos de exopolissacarídeos dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar	53
4.2.3. Teste de reação cruzada entre antígenos constituídos de células intactas dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e os antissoros AXRS, AXc e AXa, pelo método	

	Página
de dupla difusão em gel-agar	55
4.2.4. Reação dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com extratos de exopolissacarídeos de diversos patotipos de <i>X. campestris</i> , pelo método de dupla difusão em gel-agar	55
4.2.5. Reação dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com células intactas de diversos patotipos de <i>X. campestris</i> , pelo método de dupla difusão em gel-agar	58
4.2.6. Reações homólogas entre diferentes concentrações dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de microaglutinação em placas	58
4.2.7. Titulação do antissoro AXa pelo método de microaglutinação em placas	62
4.2.8. Reações dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com antígenos constituídos de células intactas e seus respectivos exopolissacarídeos de diversos isolados de bactérias fitopatogênicas, pelo método de microaglutinação em placas	62
4.3. Testes serológicos para detecção de <i>X. albilineans</i> em colmos de cana-de-açúcar	64
4.3.1. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de xilema e extratos de nós de cana-de-açúcar, pelo método de microaglutinação em placas	64
4.3.2. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de cana-de-açúcar pelo método de microaglutinação em lâmina escavada	67
4.3.2.1. Reação de extratos de vasos do cultivar CB41-76 (com sin-	

tomas de escaldadura nas fo- lhas) e cultivar Co740 (inocu- lada com bactéria XRS) com os antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa pelo método de microaglu- tinação em lâmina escavada	67
4.3.2.2. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos de diversos cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de microaglutina- ção em lâmina escavada	68
4.3.3. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de cana-de-açúcar, pelo método de aglu- tinação em micropipeta	70
4.3.3.1. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos do cultivar CB68-69, pelo método de aglu- tinação em micropipeta	70
4.3.3.2. Comparação da reatividade do antissoro de <i>X. albilineans</i> (AXa) com diluições da bacté- ria homóloga obtidas de cultu- ra pura e com diluições de ex- trato de vasos de planta com escaldadura-das-folhas	71
4.3.3.3. Efeito da filtragem de extra- tos de vasos nas reações sero- lógicas para detecção de <i>X.</i> <i>albilineans</i> , pelo método de aglutinação em micropipeta	73
4.3.3.4. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos de diversos cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em	

	Página
micropipeta	74
4.3.3.5. Detecção de <i>X. albilineans</i> em extratos de vasos de 17 amostras de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta	75
4.3.3.6. Detecção de <i>X. albilineans</i> em colmos de cana-de-açúcar com sintoma de estrias brancas nas folhas	76
4.3.3.7. Detecção de <i>X. albilineans</i> em amostras coletadas no experimento de inoculação de diversas concentrações da bactéria no cultivar NA56-79	78
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÕES	100
7. LITERATURA CITADA	103

1. INTRODUÇÃO

Até a década de 70 a cultura da cana-de-açúcar desenvolveu-se em diferentes regiões do país, constituindo verdadeiros polos açucareiros. Com a crise internacional do petróleo, o Brasil, com sua imensa área continental, deu início ao Programa Nacional do Alcool - PROÁLCOOL, com o objetivo de substituir o petróleo pelo álcool como fonte de energia carburante. A cana-de-açúcar despontou como a alternativa mais viável para servir como matéria prima para a produção do etanol, devido à tecnologia desenvolvida ao longo dos anos e às próprias características da cultura.

Com a implantação do PROÁLCOOL houve a necessidade de se expandir rapidamente os horizontes da cultura para novas áreas, incluindo áreas distantes das tradicionais, com a ocupação de extensas áreas de cerrado.

Com a brusca expansão da cultura a demanda de mudas, para plantio nas novas áreas, sofreu conseqüentemente um brusco aumento. Com isto, a utilização de canaviais comerciais como fonte de mudas tornou-se prática rotineira, trazendo conseqüências bastante graves no que diz respeito à sanidade dos novos canaviais implantados.

A escaldadura-das-folhas causada pela bactéria

Xanthomonas albilineans, ocorria nos canaviais das áreas tradicionais de forma endêmica, sendo poucas as áreas onde a doença ocorria com mais intensidade.

Entretanto, em algumas das novas unidades produtoras de álcool a escaldadura-das-folhas tem aparecido de forma epidêmica, causando graves prejuízos. Um dos fatores que tem concorrido para o aparecimento dessas epidemias tem sido a dificuldade de se diagnosticar corretamente a doença. Os fenômenos de latência e recuperação de sintomas têm sido relatados com frequência por diversos pesquisadores, que têm mostrado que plantas aparentemente saudáveis são portadoras de *X. albilineans*. Com a grande demanda de mudas que se verifica atualmente, há necessidade de se produzir mudas com alto grau de sanidade, em grande quantidade, para se evitar problemas nas novas áreas de expansão. Para tanto é necessário desenvolver-se um método rápido e seguro de se diagnosticar escaldadura-das-folhas em seu estado de latência.

Pesquisas realizadas com diversas doenças bacterianas tem demonstrado que métodos serológicos são bastante sensíveis na detecção de vírus e bactérias em extratos de plantas. LÉOVILLE e COLÉNO (1977) desenvolveram um método de detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar através da imunofluorescência indireta. Este método, apesar de bastante sensível, é de difícil aplicação no Brasil, devido à necessidade de equipamentos altamente sofisticados e de uma técnica bastante elaborada por parte dos responsáveis pela condução dos testes.

O presente trabalho teve como objetivo principal, desenvolver um método simples e sensível de se detectar escaldadura-das-folhas em colmos de cana-de-açúcar, pela aplicação de técnicas serológicas. Ao longo do presente trabalho, estudou-se ainda aspectos relativos aos antissoros produzidos e testes de inoculação da bactéria *X. albilineans* em cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Escaldadura-das-folhas de cana-de-açúcar

A escaldadura-das-folhas de cana-de-açúcar tem sido constatada em quase todos os centros produtores desta cultura (MARTIN E ROBINSON, 1961; e EGAN, 1971a).

A doença é causada por uma bactéria, que foi isolada pela primeira vez por Groenewege, em Java, em 1915 (ARRUDA, 1944). Inicialmente a bactéria foi classificada como sendo *Bacterium vasculorum* (Cobb). Depois desta data recebeu outras denominações até que DOWSON (1943) classificou-a como *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, binômio esse até hoje utilizado.

ARRUDA (1944), estudando esta doença, concluiu que *Xanthomonas albilineans* foi introduzida no Brasil em 1929, com a importação do cultivar Badila, da Austrália. Ainda segundo este autor, a primeira constatação dessa doença no país foi feita em Piracicaba-SP e municípios vizinhos, tendo sido também observada em Campos-RJ.

Apesar de DANTAS (1958) ter concluído que a escaldadura das folhas era responsável por prejuízos da ordem

de 20% nos canaviais do Nordeste do Brasil e CARVALHO (1963) e GALLI *et alii* (1968) afirmarem ser esta bacteriose a mais séria da cultura no Estado de São Paulo, esta doença tem sido pouco estudada no Brasil. Os programas de melhoramento de cana-de-açúcar têm, nos últimos anos, incluído a resistência à escaldadura-das-folhas como um fator importante na seleção de novos cultivares (PLANALSUCAR, 1975).

Os sintomas da doença podem manifestar-se em duas fases distintas. A fase considerada crônica, caracteriza-se pelo aparecimento de estrias finas, esbranquiçadas, nas folhas e bainhas; folhas eretas e enroladas com seca das pontas; e um abundante desenvolvimento de brotos laterais, normalmente no sentido de baixo para cima. A fase aguda caracteriza-se pela repentina murcha e morte das plantas afetadas, como se a planta sofresse por falta d'água. Na maioria das vezes esses sintomas não são precedidos por qualquer sintoma característico da fase crônica. Internamente, quando se corta os colmos no sentido longitudinal, pode-se observar descoloração vascular, de cor avermelhada, principalmente na região dos nós. Os sintomas internos são mais visíveis em colmos com sintomas da fase crônica, aparecendo nos colmos com sintomas da fase aguda, somente nos casos em que houver formação de brotos laterais. Uma descrição detalhada dos sintomas dessa doença é apresentada por MARTIN e ROBINSON (1961).

A transmissão da bactéria ocorre, segundo MARTIN e ROBINSON (1961), principalmente através do plantio de toletes infetados e dos facões de corte. Segundo esses autores, há diversos relatos autênticos mostrando que o patógeno tem sido transportado de um país para outro nos toletes. No Brasil, o serviço de quarentena do IAA/PLANALSUCAR em Anhembí-SP detectou a ocorrência de escaldadura-das-folhas no cultivar Tuc69-109, importado da Argentina (PLANALSUCAR, 1977).

Wilbrink (1920) e North (1926) foram, segundo MARTIN e ROBINSON (1961), os primeiros pesquisadores a provar que *X. albilineans* é facilmente transmitida por facões de

corte, o que tem sido confirmado por diversos autores. Durante a colheita da cana-de-açúcar o patógeno é transmitido de touceiras doentes para touceiras sadias através dos facões, uma vez que, um facão contaminado pode transmitir a bactéria para várias touceiras, o que explica a ocorrência de maior incidência da doença nas soqueiras subsequentes. AKIBA (1978), estudando a capacidade de sobrevivência da bactéria, observou que esta pode permanecer viável na lâmina do facão por até 6 dias.

A grande eficiência de transmissão pelo facão de corte está provavelmente ligada ao fato, constatado por ANTOINE e RICAUD (1961) e RICAUD e PAULO (1970), de que a base do colmo é a região onde se verifica a maior concentração da bactéria.

Um fenômeno bastante comum em escaldadura-das-folhas é a latência, isto é, apesar de infetada pela bactéria, a planta não manifesta sintomas visíveis (ARRUDA, 1944; MARTIN e ROBINSON, 1961). Segundo EGAN (1971a) isto dificulta bastante o serviço de quarentena, pois a planta apesar de portadora da bactéria não mostra sintomas da doença por longos períodos, podendo passar despercebida e ser liberada pelo quarentenário. Este fenômeno explica o fato frequentemente observado em canaviais onde a doença causa prejuízos consideráveis em alguns anos e não em outros. EGAN (1971b) afirma que a importância da doença está correlacionada com a variação de condições ambientes de um ano para outro.

Estudando a epidemiologia da escaldadura-das-folhas em Queensland, PERSLEY (1973) concluiu que o aparecimento dos sintomas externos está condicionado ao "stress" provocado pela temperatura e regime de água, e que o outono seco e o frio antecipado do inverno favorecem tal manifestação durante o inverno e primavera.

No Brasil, segundo ARRUDA (1944), as epifitotias ocorrem quando, após um período chuvoso, sobrevem a seca, principalmente no inverno. Segundo o autor, sob essas condi-

ções, as bactérias multiplicam-se nos meses de maior precipitação e, com a paralização do desenvolvimento vegetativo devido ao frio e seca, a manifestação de sintomas é favorecida.

Por outro lado, DANTAS (1958) e MARTIN e ROBINSON (1961) chamam a atenção para o fato de que a manifestação dos sintomas pode estar ligada também à própria resistência da planta. Segundo os autores, cultivares resistentes ou tolerantes podem ser portadores da bactéria mas não mostram sintomas da doença, constituindo-se em perigosas fontes de inóculo para cultivares suscetíveis. KOIKE (1971) corrobora esta opinião ao afirmar que nos testes de avaliação de resistência varietal no Havaí, há necessidade de se procurar sintomas de descoloração vascular nos cultivares que não mostram sintomas externos, pois a bactéria pode estar viável internamente.

AKIBA (1978), em experimentos de inoculação de diversos cultivares de cana-de-açúcar, com diferentes concentrações de *X. albilineans*, concluiu que os sintomas de descoloração dos feixes vasculares são observáveis uniformemente nos cultivares suscetíveis o que possibilita a avaliação quantitativa da resistência varietal, a níveis comparáveis aos obtidos em condições de campo. Todavia, NORSE (1973) chama a atenção para o fato de que na interpretação dos resultados de inoculação, através de sintomas internos, deve-se levar em consideração que *X. albilineans* não é o único patógeno causador de descoloração vascular em cana-de-açúcar. RICAUD (1974) cita a podridão do colmo causada por *Fusarium* sp, a podridão vermelha, a gomose, a escaldadura, as estrias cloróticas e o raquitismo-da-soqueira como sendo doenças que causam descoloração de vasos. O autor ressalta que as duas primeiras apresentam um tipo de descoloração de vasos facilmente distinguíveis das demais, por apresentarem uma coloração mais intensa. Nas demais doenças citadas a possibilidade de confusão de sintomas internos é maior, com a ressalva de que no caso do raquitismo-da-soqueira a descoloração é restrita à região de inserção das folhas nos nós, enquanto que nas outras a descolo-

ração estende-se para os internódios. SUDO (1980), constatou que *Erwinia Herbicola* e *Pseudomonas rubrisubalbicans* também podem causar descoloração vascular semelhante ao sintoma de raquitismo-da-soqueira e aventa a hipótese de que esta doença seja causada não por uma bactéria, mas sim por um complexo de bactérias.

Um outro fenômeno bastante comum em escaldadura-das-folhas é a recuperação de sintomas. ARRUDA (1944) observou que cultivares com resistência de campo mostraram, inicialmente, uma alta porcentagem de infecção, mas recuperaram-se rapidamente e os sintomas desapareceram. KOIKE (1965) observou que dois cultivares classificados como resistentes, mostraram sintomas fracos da doença 3 semanas após a inoculação, mas os sintomas tinham praticamente desaparecido ao final de 6 semanas, enquanto que dois cultivares moderadamente suscetíveis mostraram sintomas severos da doença somente nas folhas inoculadas, sendo que as folhas novas, não inoculadas apresentaram-se sem sintomas.

Devido aos fenômenos como o da manifestação de sintomas diretamente na fase aguda, o da ausência de sintomas em plantas tolerantes e o da recuperação de sintomas, a diagnose da doença no campo é muitas vezes difícil, principalmente quando se deseja fazer um levantamento de incidência da bacteriose. Além disso, a utilização de herbicida e amadurecedor à base de glifosato, nos canaviais, vem dificultar ainda mais a diagnose, pois, o trabalho de DAL PICCOLO *et alii* (1980) demonstrou claramente que estes produtos induzem, em cana-de-açúcar, sintomas foliares semelhantes aos da fase crônica da escaldadura-das-folhas.

Esta dificuldade de diagnose se torna ainda mais importante quando se considera que um dos principais métodos de controle, além da resistência varietal, é a utilização de mudas sadias obtidas através de plantios de viveiros onde se faz constantes inspeções e eliminação (roguing) das plantas doentes (ARRUDA, 1944; MARTIN e ROBINSON, 1961).

Em muitos casos, o método mais seguro de diagnóstico é o de isolamento e identificação do patógeno em cultura o que exige tempo e trabalho especializado.

O isolamento de *X. albilineans* apresenta algumas dificuldades devido ao crescimento lento da bactéria e suas exigências nutricionais. Segundo AKIBA (1978), o meio de cultura mais utilizado tem sido o meio de Wilbrink. Este meio foi modificado por BELL e CONTRELL-DORMER (1932) e AKIBA (1978) introduziu novas modificações, denominando-o meio de Wilbrink (W-2). Com este meio, AKIBA (1978) conseguiu melhores resultados nos isolamentos, com tempo de incubação menor, uma vez que este meio de cultura proporciona uma multiplicação mais rápida da bactéria.

O método de isolamento também tem sido fator de insucesso no isolamento da bactéria. ARRUDA (1944) descreveu um método indireto de isolamento, PERSLEY (1972) desenvolveu uma técnica para isolar a bactéria através de um meio seletivo, e DEAN (1974) um método de isolamento em que a bactéria é obtida por exsudação da mesma, do tecido para a água. AKIBA (1978), modificou o método de DEAN (1974), localizando, por meio de um artifício de iluminação no microscópio composto, o ponto de exsudação da bactéria no tecido, facilitando assim a retirada da suspensão bacteriana através de pipetas de Pasteur. MASUDA e TOKESHI (1978) modificaram o método de AKIBA (1978), fazendo as observações do exsudato em microscópio estereoscópico, facilitando ainda mais o manuseio do material.

A reprodução dos sintomas de escaldadura-das-folhas através de inoculações artificiais tem sido estudada com bastante empenho em alguns centros de pesquisa visando, principalmente, desenvolver métodos que permitam resultados satisfatórios em testes de resistência à doença. Assim, BELL (1935), MARTIN e CARPENTER (1935), WIEHE (1951), ANTOINE e RICAUD (1961), KOIKE (1965), STEINDL (1965), EGAN (1968) e NORSE (1973) desenvolveram métodos de inoculação com essa finalidade. AKIBA (1978) comparou alguns métodos, incluindo métodos

utilizadas em outras culturas, e concluiu que o método mais eficiente, entre os testados, foi o da injeção da bactéria no palmito. O local da injeção que apresentou resultados mais satisfatórios foi aproximadamente 5 cm acima do meristema apical.

2.2. Serologia

Estudos de processos imunológicos tiveram grande desenvolvimento inicial principalmente na medicina humana e veterinária. Os métodos serológicos encontraram larga aplicação na fitopatologia, principalmente nos estudos de vírus e bactérias (SHATTOCK, 1955; WETTER, 1965; OLIVEIRA *et alii*, 1976; van REGENMORTEL, 1979; SCHAAD, 1979). No estudo de fungos, a aplicação desses métodos tem sido em menor intensidade (FIGUEIREDO, 1972).

Segundo SCHAAD (1979), o primeiro trabalho sobre a aplicação da serologia para identificação de bactérias fitopatogênicas foi publicado por Jensen em 1918, mostrando que um isolado de *Agrobacterium tumefaciens* da Dinamarca podia ser diferenciado de um isolado de *A. tumefaciens* dos Estados Unidos, através de testes de aglutinação. Desde então, numerosos trabalhos têm sido realizados utilizando-se diferentes técnicas serológicas para o estudo de bactérias fitopatogênicas.

Os testes de aglutinação com antissoros preparados a partir de células vivas ou mortas com formol tornaram-se muito populares na década de 1930, e continuam sendo bastante utilizados nos dias de hoje entre os pesquisadores que trabalham na identificação de bactérias patogênicas a plantas. Estas técnicas eram consideradas específicas e foram sugeridas para diferenciação e identificação de diversas espécies de bactérias (SCHAAD, 1979).

ELROD e BRAUN (1947a), ELROD e BRAUN (1947b) e BERGQUIST e ELROD (1948) mostraram que antígenos somáticos ("O") das células produziam antissoros ("O") mais específicos do que antígenos preparados com células intactas. MUSHIN *et alii* (1958) chegaram à mesma conclusão. Os autores, utilizando antissoros "O", observaram que suspensões de células vivas de vários organismos não apresentaram qualquer reação com antissoro homólogo, provavelmente devido a um bloqueio dos antígenos de superfície. Apesar de observarem um aumento de especificidade em reações de antígenos "O" e antissoros "O", os autores observaram alguns casos de aglutinação cruzada entre bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, devido a presença de antígenos comuns. Testes de absorção de antissoros com antígenos heterólogos mostraram a presença de antígenos específicos.

FANG (1950), trabalhando com isolados de 5 *formae specialis* de *Xanthomonas translucens*, observou que antígenos preparados com bactérias cultivadas em meio sem açúcares, para evitar a formação de substâncias mucoides, produziram antissoros não específicos a nível de *formae specialis*, uma vez que houve reação cruzada entre quase todas as culturas com exceção da *formae specialis phleipratensis* que mostrou pouca ou nenhuma reação com isolados de *formae specialis hordei*. A nível de espécie os antissoros das *formae specialis* de *X. translucens* não mostraram nenhuma reação com *X. holcicola*, *X. campestris* e *X. phaseolus v. sojensis*.

Segundo SCHAAD (1979), Stapp, em 1937, observou que 6 isolados de *Pseudomonas pisi* e um isolado de *P. phaseolicola* e *P. tabaci* aglutinaram e não puderam ser distinguidos por testes de aglutinação em que os antissoros foram preparados com células bacterianas fervidas. No entanto, estas espécies puderam ser identificadas por testes de precipitação em tubo. Os testes de precipitação foram largamente utilizados na bacteriologia médica mas não na fitopatologia.

No entanto, o método de dupla difusão em agar

desenvolvido por Ouchterlony em 1948, que é na realidade um método de precipitação, foi largamente utilizado por fitopatologistas (SCHAAD, 1979). Este autor, cita uma série extensa de trabalhos em que o método foi utilizado na identificação e diferenciação de bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Erwinia*.

YAKRUS e SCHAAD (1979) utilizaram um complexo proteico extraído de membranas de células de *Erwinia chrysanthemi* como antígeno. Os autores utilizaram os métodos de aglutinação e dupla difusão em agar e concluíram que o primeiro método foi útil somente para distinguir *E. chrysanthemi* de outras espécies de *Erwinia* spp, enquanto que o segundo método possibilitou a separação de 27 isolados de *E. chrysanthemi* em 4 sorotipos. Os autores observaram ainda que não houve correlação entre os sorotipos e os hospedeiros dos isolados.

A técnica de conjugar substâncias fluorescentes a anticorpos, sob luz ultravioleta, para demonstrar combinações específicas de antígenos de células bacterianas com esses anticorpos foi desenvolvida por Coons e seus colaboradores (CAMPBELL *et alii*, 1970). Basicamente existem três maneiras de se demonstrar essas combinações antígeno-anticorpo através de substâncias fluorescentes:

- a) Método direto para detecção de antígenos em que a substância fluorescente é conjugada diretamente ao anticorpo específico e este é colocado para reagir com o antígeno;
- b) Método indireto de detecção de antígenos em que antígeno e anticorpo são postos a reagir e posteriormente procede-se reação do anticorpo com anticorpos anti-gamaglobulina fluorescentes;
- c) Método de detecção anticorpos em que estes são postos a reagir com antígenos específicos e posteriormente com anticorpos fluorescentes específicos (CAMPBELL *et alii*, 1970).

Em fitopatologia os dois primeiros métodos são utilizados uma vez que o terceiro método é utilizado em imunologia animal.

Segundo SCHAAD (1979), a aplicação da imuno-fluorescência para identificação de bactéria em plantas foi sugerida por Paton em 1943, mas o método recebeu maiores atenções somente após o trabalho de MORTON (1965), que mostrou a vantagem do método em relação à aglutinação e floculação na bentonita.

YANO (1976) utilizou o método de hemaglutinação indireta para estudos serológicos com diversos isolados de patótipos de *Xanthomonas campestris*. Este método, que utiliza hemácias de carneiro sensibilizadas com antígenos para posterior reação com os antissoros tem sido bastante utilizado na classificação de microorganismos de interesse médico e veterinário, mas não tem sido utilizado em bactérias fitopatogênicas.

As técnicas serológicas apresentam, frequentemente, resultados contraditórios. SCHAAD (1979) apresenta uma série de exemplos em que essas contradições são aparentes. O autor preconiza a necessidade de uma maior padronização de métodos para se obter resultados mais constantes e comparáveis, pois, devido à sensibilidade dos métodos serológicos, uma pequena mudança pode acarretar grandes diferenças de resultados. O autor afirma que os testes de aglutinação, imunofluorescência ou de dupla difusão podem ser utilizados para identificação de bactérias, desde que os métodos sejam utilizados apropriadamente. Os testes de aglutinação são rápidos e de fácil condução, porém inadequados para distinguir bactérias com propriedades imunogênicas muito próximas, a não ser que se utilize os testes de absorção cruzada. Os testes de dupla difusão são de fácil condução e alta sensibilidade, sendo ideais para distinguir bactérias com propriedades imunogênicas próximas mas somente quando se utiliza antígenos difusíveis em agar. A imunofluorescência também é muito sensível e rápida porém requer equipamentos muito caros. Portanto, na escolha de um determinado método de teste deve-se considerar o objetivo final a ser alcançado, pois nem sempre o teste mais específico é o

melhor para determinadas situações. A esse respeito o autor faz a seguinte observação: o antissoro será empregado para; a) detectar diferenças entre determinantes antigênicos ou antígenos com moléculas similares; b) demonstrar relações entre diferentes espécies, ou c) diagnosticar doenças. Para o primeiro caso o antissoro deve ter o máximo de especificidade, para o segundo o máximo de reação cruzada e para o terceiro uma combinação de alta concentração de anticorpos e alta especificidade.

A serologia tem sido aplicada com maior frequência para a identificação e classificação de bactérias utilizando-se organismos cultivados em meios de culturas. No que diz respeito à aplicação das técnicas imunológicas e nos estudos estritamente taxonômicos existe um consenso geral de que a serologia não deve substituir outras técnicas bacteriológicas mas pode ser muito útil como instrumento adicional para a caracterização de espécies de bactérias fitopatogênicas (MUSHIN *et alii*, 1959; SHATTOCK, 1955; SCHAAD, 1979).

Por outro lado, a importância da utilização da serologia como instrumento de identificação rápida de bactérias com a finalidade de diagnosticar doenças tem sido enfatizada (MUSHIN *et alii*, 1959; MORTON, 1964a; MORTON, 1964b; GRAHAM, 1964; GUTHRIE *et alii*, 1965; JENKINS *et alii*, 1966; HALE, 1972; FRENCH *et alii*, 1978; SCHAAD, 1979).

Vários autores, utilizando diferentes técnicas serológicas têm obtido resultados positivos na diagnose de doenças.

GRAHAM (1963), utilizando o método de aglutinação, conseguiu detectar a presença de *Erwinia atroseptica* em extratos de tubérculos de batatinha. O mesmo método foi utilizado para detectar: *Xanthomonas vesicatoria* em folhas de pimentão (MORTON, 1964c; MORTON, 1965); *Pseudomonas phaseolicola* isolada de folhas de vagens e caules de feijão (GUTHRIE *et alii*, 1965); *Corynebacterium insidiosum* isolada de alfafa (HALE, 1972) e a bactéria causadora do raquitismo-da-soqueira em

exsudatos de colmo de cana-de-açúcar (GILLASPIE, 1978).

A dupla difusão em agar foi utilizada por JENKINS *et alii* (1966) para diagnosticar *Pseudomonas solanacearum* em extratos de amendoim.

A técnica da imunofluorescência foi utilizada para detectar: *Xanthomonas vesicatoria* em folhas de pimentão (MORTON, 1964b e MORTON, 1965); *Pseudomonas phaseolicola* em lotes de sementes de feijão (COLÉNO, 1968); *Erwinia amylovora* em flores de pereira (THOMSON e SCHROTH, 1976); bactéria causadora de "phony peach" ("rickettsialike bacterium", RLB), em extratos de raízes de pessegueiro e ameixeira selvagem (FRENCH *et alii*, 1978) e *Xanthomonas campestris* isolada de crucíferas (SCHAAD, 1978).

Poucos são os trabalhos de serologia realizados com *Xanthomonas albilineans*.

OLIVEIRA *et alii* (1977) produziram antissoro contra *X. albilineans* pelo método de injeção de suspensão bacteriana no linfonódulo de coelhos. Os autores procederam à titulação do antissoro pelo método de microaglutinação em placas, obtendo reação positiva em 45 minutos. Em testes de reação cruzada com outras bactérias, observaram que o antissoro produzido reagiu fracamente com *Pseudomonas rubrilineans*, mas somente após 18 horas de reação. Testes de dupla difusão em agar realizados com extratos de exopolissacarídeos homólogos e heterólogos apresentaram reação positiva somente com antígeno no homólogo.

RICAUD *et alii* (1977) compararam métodos serológicos e métodos de inoculação para detectar infecção latente de escaldadura-das-folhas de cana-de-açúcar. Pequenos pedaços de tecido, da parte basal do colmo, foram embebidos em água para permitir a exsudação da bactéria. A bactéria foi concentrada por meio de centrifugação e ressuspensa em salina tampoadade (pH 7,0). A suspensão assim obtida foi inoculada em plantas sadias e testadas serologicamente através de microaglutinações em placas escavadas. Os testes serológicos não apresen

taram sensibilidade suficiente para detectar a bactéria em colmos com infecção latente uma vez que, em alguns casos, extratos de colmos sem sintomas da doença, apresentaram resultados negativos nos testes de microaglutinação, mas quando inoculados em plantas sadias, estas mostraram sintomas da doença. Em extratos de colmos com sintoma de escaldadura-das-folhas os testes serológicos apresentaram reação positiva em 32 dos 35 colmos testados.

LÉOVILLE e COLÉNO (1976), utilizando o método de imunofluorescência indireta, conseguiram detectar *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar com infecção latente, mostrando que este método é bastante sensível.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados utilizados e experimentos de inoculação de *Xanthomonas albilineans* em cana-de-açúcar

O isolamento de *X. albilineans*, isolado Xa, foi feito seguindo-se a técnica preconizada por AKIBA (1978).

A caracterização das culturas dos isolados Xa foi feita através de observações sobre o aspecto da cultura, motilidade das bactérias, testes com meios diferenciais segundo DYE (1962) e DYE (1966) e teste de patogenicidade.

O isolamento da bactéria associada ao raquitismo-da-soqueira, isolado XRS, foi realizado pelo Engº Agrº MS Fujio Akiba, que classificou-a como sendo pertencente ao gênero *Xanthomonas*. TOKESHI *et alii* (1974) classificaram este mesmo isolado como sendo uma estirpe de *X. albilineans* e mostraram a possibilidade desta bactéria ser o agente causal do raquitismo-da-soqueira.

O isolado de *Erwinia herbicola*, isolado Eh, foi cedido pelo Engº Agrº MS Shinobu Sudo.

Os isolados de patotipos de *X. campestris* foram obtidos através do Engº Agrº MS Tomomasa Yano, com exceção

dos patotipos IBBF 105 e IBBF 168 que juntamente com os isolados de *Pseudomonas* spp foram cedidos pelo Engº Agrº Dr. Antonio Lima G. Pereira.

Os dados referentes a estes isolados são apresentados na Tabela 1.

3.1.1. Teste de patogenicidade do isolado Xa em plantas do cultivar NA56-79.

O teste de patogenicidade foi realizado segundo o método de inoculação utilizado por AKIBA (1978) que consiste em injetar uma suspensão bacteriana na região pouco acima do meristema apical da cana-de-açúcar.

A concentração de bactérias utilizada foi calibrada pela escala de McFarland tubo nº 3 (CAMPBELL *et alii*, 1970) e que no espectrofotometro Bauch-Lomb a 625 nm apresenta 60% de transmitância, o que equivale a 8×10^8 células/ml para a bactéria *X. albilineans*, segundo AKIBA (1978).

As plantas testes, do cultivar NA56-79 foram cultivadas a partir de gemas individualizadas, previamente tratadas com o fungicida Benomyl a 0,5%. Os colmos utilizados na obtenção das gemas individualizadas provinham de viveiro cultivado a partir de gemas tratadas termicamente no Centro Tecnológico da COPERSUCAR, em Piracicaba-SP.

Para a injeção da suspensão bacteriana nas plantas foram usadas seringas hipodérmicas e agulhas com abertura lateral. Em cada planta injetou-se aproximadamente 1,0 ml de suspensão (AKIBA, 1978).

As plantas foram inoculadas cerca de 40 dias após a emergência dos brotos. Antes da inoculação as folhas foram cortadas, com tesoura flambada, logo acima do vértice foliar.

A bactéria foi inoculada em 20 plantas e 20

Tabela 1. Relação dos isolados utilizados. Dados sobre designação, hospedeiro e procedências.

ISOLADOS	DESIGNAÇÃO ORIGINAL	HOSPEDEIRO	PROCEDENCIA	DESIGNAÇÃO DOS ISOLADOS NO TEXTO
<i>Xanthomonas albilineans</i> (Ashby) Dowson	XCP44-101	Cana-de-Açúcar (<i>Saccharum</i> sp c. CP44-101)	Piracicaba-SP	Xa
<i>Erwinia herbicola</i>	C-1	Cana-de-Açúcar (<i>Saccharum</i> sp c. IACS2-326)	Piracicaba-SP	Eh
<i>Xanthomonas</i> sp	XVRS	Cana-de-Açúcar (<i>Saccharum</i> sp c. CP44-101)	Piracicaba-SP	XRS
<i>Xanthomonas campestris</i>				
patotipos: <i>campestris</i> Pammel	2110	Repolho (<i>Brassica oleracea</i> var. capitata Lour.)	Piracicaba-SP	Xc
<i>campestris</i> Pammel	ENA-903	Mostarda (<i>Brassica nigra</i> Koch)	Bangu-RJ	ca-903
<i>cucurbitae</i> Bryan	ENA-2173	Melão (<i>Cucumis melo</i> L.)	Presidente Prudente-SP	ca-2173
<i>dieffenbachiae</i> McCulloch & Pirone	IB-140	Antúrio (<i>Anthurium</i> sp)	Registro-SP	dl-140
<i>esculenti</i> Rangaswami & Eswaran	ENA-568	Quiabeiro (<i>Hibiscus esculentum</i> L.)	Santa Cruz-RJ	es-568
<i>glycines</i> Nakano	ENA-2076	Soja (<i>Glycine max</i> Mer.)	Uberlândia-MG	gl-2076
<i>hederas</i> Arnaud	ENA-2170	Hera (<i>Hedera helix</i> L.)	Poços de Caldas-MG	he-2170
<i>malvacearum</i> Erw. Smith	ENA-2216	Algodoeiro (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Campinas-SP	ma-2216
<i>manihotis</i> Arthaud-Berthet & Bordar	ENA-975	Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz.)	Itaquai-RJ	mh-975
<i>manihotis</i> Arthaud-Berthet & Bordar	IBRF-105	Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz.)	-	mh-105
<i>mangiferae</i> Indicae Patel et alii	ENA-2097	Mangueira (<i>Mangifera indica</i> L.)	Quaratiba-RJ	ml-2097
<i>passiflora</i>	CTHAF-168	Mamão-de-Feijão (<i>Passiflora edulis</i> L.)	-	pa-168
<i>phaseoli</i> Smith	ENA-2099	Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Papucaia-RJ	ph-2099
<i>ricini</i> Yoshii & Takimoto	ENA-779	Mamoeira (<i>Ricinus communis</i> L.)	Urua-RJ	ri-779
<i>vesicatoria</i> Doidge	ENA-76	Tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i> ; ill)	Campinas-SP	ve-76
<i>vesicatoria</i> Doidge	ENA-792	Plântão (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Flórida-EUA	ve-792
<i>vesicatoria</i> Doidge	ENA-2201	Beringela (<i>Solanum melongena</i> L.)	Itapetica da Serra-SP	ve-2201
<i>vitifera</i> Brown	ENA-2008	Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Itaquai-RJ	vi-2008
<i>Pseudomonas chichori</i>	IBRF-127	-	-	pc-127
<i>Pseudomonas garosae</i>	IBRF-153	-	-	pg-153
<i>Pseudomonas tomato</i>	IBRF-147	-	-	pc-147

plantas injetadas com água destilada e esterilizada serviram de controle.

As avaliações dos resultados da inoculação foram feitas observando-se os sintomas externos e internos.

As avaliações dos sintomas externos nas folhas, foram realizadas aos 13, 30 e 45 dias após a inoculação e a avaliação final dos sintomas internos na região dos nós foi realizada 90 dias após a inoculação.

A presença de bactéria nas folhas foi detectada pelo método descrito por MASUDA e TOKESHI (1978).

Para se observar o sintoma interno, foram feitos cortes sucessivos no colmo, procurando-se observar após cada corte, a presença de vasos descoloridos.

3.1.2. Determinação de infectividade do isolado Xa em diferentes concentrações de inóculo.

Para se determinar a concentração mínima de *X. albilineans* necessária para induzir o aparecimento de sintomas de escaldadura em cana-de-açúcar, plantas do cultivar NA56-79 foram inoculadas com diversas concentrações de células bacterianas. Foram preparadas 8 concentrações de células de *X. albilineans* pelo método de diluição em série, de razão 10, partindo-se de uma concentração inicial equivalente ao tubo nº 3 da escala de McFarland (aproximadamente 8×10^8 células/ml).

Para obtenção das plantas teste, utilizou-se o mesmo método de plantio e material da mesma procedência do teste anterior.

Para cada concentração de inóculo, foram plantadas 40 gemas individualizadas, dispostas em 2 caixas de madeira contendo solo esterilizado e as plantas controle foram injetadas com água destilada e esterilizada.

O método de inoculação foi o mesmo utilizado no teste de patogenicidade e as avaliações dos resultados foram realizadas aos 15, 22, 32 e 120 dias após a inoculação, sendo as três iniciais baseadas somente no sintoma externo de escaladura nas folhas e a última baseada no sintoma interno, nos vasos da região dos nós do colmo.

Além da avaliação visual dos sintomas, algumas plantas do experimento foram coletadas para serem testadas se rologicamente para verificação da presença de *X. albilineans* nos vasos.

O teste serológico é descrito posteriormente no item 3.7.3.7.

3.2. Preparo de antígenos e antissoros

Foram preparados antissoros contra os isolados Xa, XRS, Xc e Eh inoculando-se cada um de *per si*, em coelhos pesando em média 2,50 kg, com suspensões bacterianas com aproximadamente 8×10^8 células/ml.

3.2.1. Preparo de antígenos para obtenção de antissoros

Para a preparação dos antígenos, as bactérias foram todas cultivadas em meio líquido de Wilbrink (W-2), sob constante agitação. Para cada isolado foram utilizados 5 frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio de cultura. Após o desenvolvimento da cultura, procedeu-se a centrifugação do meio a 3.000 g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o precipitado em salina tamponada estéril, pH 7,2. Este procedimento foi repetido 2 vezes, com a finalidade de eliminar resíduos de meio de cultura. Obteve-

se uma suspensão bastante concentrada de células bacterianas, que serviu como suspensão estoque.

A partir das suspensões estoques, foram preparadas diluições das bactérias, calibrando-se a concentração no espectrofotometro para transmitância equivalente ao tubo nº 3 da escala de McFarland. Ao antígeno assim preparado adicionou-se merthiolate (etilmercuritiosalicilato de sódio) a 1% na proporção de 1:100 (v/v) e a conservação foi feita em congelador a -10°C . As suspensões de células bacterianas (aproximadamente 8×10^8 células/ml) foram misturadas, na proporção de 1:1, com adjuvante incompleto de Freund promovendo-se a seguir a emulsificação das misturas, com auxílio de seringas hipodérmicas (KIMATI, 1975).

O controle da pureza das culturas bacterianas foi efetuado transferindo-se amostras de culturas dos frascos Erlenmeyer para o meio de Wilbrink (W-2) sólido em placas de Petri. Nas referidas placas não se observou crescimento de colônias estranhas à da espécie cultivada, indicando que as culturas eram puras.

O adjuvante incompleto de Freund foi preparado misturando-se 15 ml de Arlacel A (Mannide monooleate, Nakarai Chemicals Ltd), com 85 ml de óleo mineral (óleo Nujol). Após homogeneização da mistura esta foi distribuída em ampolas de vidro (5,0 ml/ampola) e em seguida esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização as ampolas foram seladas, com auxílio de um maçarico.

3.2.2. Preparo de antígenos para reações serológicas

Para as reações serológicas foram utilizados antígenos constituídos de células bacterianas intactas, macerados de células bacterianas ou extratos de exopolissacarídeos. O preparo de células bacterianas intactas foi feito de acordo

com o descrito em 3.2.1.

3.2.2.1. Maceração de células bacterianas

Os antígenos para reações serológicas de dupla difusão em gel-agar, foram preparados através da maceração de suspensão bacteriana na concentração de aproximadamente 8×10^8 células/ml. Para a maceração das células bacterianas congelou-se a suspensão bacteriana em almofariz, pela adição de nitrogênio líquido, seguindo-se trituração vigorosa. O controle do grau de rompimento das células bacterianas foi feito ao microscópio, colorindo-se as células com fucsina básica, de tempo em tempo, até que se tornasse difícil a observação de células bacterianas intactas.

Após a maceração a suspensão foi centrifugada a 3.000 g por 10 minutos, utilizando-se o sobrenadante nos testes serológicos. Ao antígeno assim preparado foi adicionado merthiolate a 1% na proporção de 1:100 (v/v) e a conservação foi feita em congelador a -10°C .

Para os testes de aglutinação, os antígenos utilizados foram suspensões de bactérias na concentração aproximadamente de 8×10^8 células/ml, ou suas diluições.

3.2.2.2. Preparo de extratos de exopolissacarídeos

Extratos de exopolissacarídeos de 15 culturas de diferentes patotipos de *X. campestris* e dos isolados Xa, XRS e Eh foram preparadas seguindo-se o método utilizado por YANO (1976), modificado.

As bactérias foram cultivadas em frascos Erlen-

meyer contendo 150 ml de meio líquido de Wilbrink (W-2), durante 72 horas, sob agitação constante. Após este período as culturas foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 50 ml de soro fisiológico estéril para ressuspender as células bacterianas. As suspensões resultantes foram colocadas em banho-maria a 56°C (durante 90 minutos). Durante este período as suspensões foram frequentemente agitadas manualmente. A seguir as suspensões passaram a ser agitadas com auxílio de um agitador magnético por 10 minutos. Em seguida procedeu-se nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos para promover a sedimentação de células bacterianas. Ao sobrenadante de cada suspensão, extratos de exopolissacarídeos, foi adicionado 0,5 ml de merthiolate a 1%. O extrato assim obtido foi conservado em congelador a -10°C.

3.3. Preparo de antissoros

As suspensões bacterianas emulsionadas foram, cada uma de per si, injetadas em coelhos. Foram feitas 2 inoculações por semana, num total de 6 aplicações, na região próxima ao linfonóculo. A técnica de injeção utilizada foi a desenvolvida por OLIVEIRA (1975). O volume de material injetado, preparado de acordo com o descrito no item 3.2.1., variou de 1,0 a 1,5 ml/aplicação.

Antes da primeira injeção de antígeno, foram feitas sangrias nos coelhos para o preparo do soro normal, seguindo-se sangrias semanais. Todas as sangrias foram feitas na orelha do coelho, com exceção da final que foi por punção cardíaca, uma semana após a última injeção, segundo técnica preconizada por CAMPBELL *et alii* (1970).

O sangue coletado foi deixado para coagular durante uma noite, em geladeira e depois centrifugado a 3.000 g.

A porção soro (sobrenadante) foi adicionado merthiolate a 1%. O soro foi distribuído em frascos com capacidade para 5,0 ml e conservado em congelador a -10°C .

Foram obtidos antissoros contra os isolados Eh, XRS, Xc e Xa. Doravante esses antissoros serão referidos respectivamente como, AEh, AXRS, AXc e AXa.

3.4. Métodos serológicos

Os antissoros preparados foram caracterizados quanto ao seu título, reações com os antígenos homólogos e heterólogos, utilizando-se os métodos de dupla difusão em gel-agar e microaglutinação em placas (CAMPBELL *et alii*, 1970).

3.4.1. Teste de dupla difusão em gel-agar em lâmina

O meio gel utilizado foi 1% de agar (Noble agar Difco), em solução salina tamponada ($\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{K}_2\text{PO}_4$ 0,01M), com pH 7,2 e 0,01% de merthiolate.

A distribuição dos orifícios foi de um hexágono inscrito num círculo de 1,25 cm de diâmetro, sendo os orifícios de diâmetro aproximado de 0,25 cm. Os orifícios foram feitos com o aparelho Furagar (mod. Aflaro) desenvolvido por LEITE e OLIVEIRA (1975).

Os antígenos utilizados nestes testes foram preparados por maceração de células bacterianas, conforme descrito no item 3.2.2.1.

Os resultados dos testes de dupla difusão, em lâminas, foram registrados em protocolos preparados para essa finalidade, contendo desenho esquemático de uma lâmina com distribuição hexagonal dos furos. O registro foi feito procu-

rando-se reproduzir nos protocolos, as posições relativas e a intensidade das linhas de reação.

3.4.2. Teste de microaglutinação em placa ou em lâmina escavada

Os testes de microaglutinação foram feitos em placas de Petri ou em lâminas escavadas, segundo método de van SLOGTEREN (1955).

A microprecipitina diferencia-se da microaglutinação pelo fato de que na microprecipitina o antígeno utilizado é molecular enquanto que na microaglutinação o antígeno é particulado.

Em placas de Petri, o método de microaglutinação consiste basicamente em se revestir o fundo interno da placa com uma substância hidrofóbica para que as gotas de antígeno e antissoro não se espalhem sobre a placa. A substância utilizada nos testes foi o Formvar diluído a 0,5% em dicloro-etileno. Após a secagem do Formvar, foi desenhado com lápis cera, um quadrado de 6,3 x 6,3 cm, sendo este subdividido em 81 partes de tal maneira que cada subdivisão constituiu-se em um quadrado de 7,0 x 7,0 mm.

Este quadriculado permitiu que se pudesse testar ao mesmo tempo combinações de várias diluições de antígeno e antissoro. Em cada um destes quadrados menores foram colocados, com auxílio de pipetas de Pasteur, uma gota de antissoro e 1 gota de antígeno, em diluições conhecidas.

Como controle, todas as diluições de antígeno e antissoro foram combinadas com salina tamponada e além disso, todas as diluições do antígeno foram combinadas com soro normal. Para evitar a evaporação das gotas de antígeno e antissoro, uma quantidade de vaselina líquida, suficiente para cobrir as gotas, foi vertida sobre a placa. A placa foi deixada

a temperatura ambiente do laboratório para que se processasse a reação. As avaliações foram realizadas a tempos determinados, para se observar o tempo de reação.

A reação se caracterizou pela formação de um precipitado de aspecto opaco que pode ser visto ao microscópio estereoscópico após determinado tempo enquanto que, na ausência de reação o antígeno permanece em suspensão no antissoro.

3.4.3. Teste de aglutinação em micropipeta

O método de precipitação em tubos ("Ring Test"), descrito por CAMPBELL *et alii* (1970) consiste em se colocar em tubos uma quantidade de antissoro e sobrepor uma quantidade de antígeno de tal maneira que formem duas camadas distintas. Na região de contacto destas camadas ocorre uma difusão entre as camadas misturando o antígeno e o antissoro sendo que a reação de precipitação forma um anel na área onde os dois reagentes se encontram em concentrações ideais.

Para os testes foi introduzida uma modificação que consistiu em se fazer o teste de aglutinação em micropipetas de Pasteur. As micropipetas foram preparadas com tubos de vidro com diâmetro interno de aproximadamente 1-2 mm. A pipeta foi transformada em micro-conta-gotas para provocar a sucção das gotas de antígeno e antissoro. Inicialmente uma pequena quantidade de antígeno foi succionada para o interior da micropipeta e a seguir succionou-se lentamente uma pequena quantidade de antissoro, de tal forma que se formassem duas camadas distintas em contacto entre si. As micropipetas foram mantidas na posição vertical, espetando-as em suporte de cera assentada sobre uma base de madeira numerada de tal forma que cada micropipeta pudesse ser identificada por um número. Cada base tinha capacidade para 25 micropipetas.

Os testes foram feitos em temperatura ambiente de laboratório, e a avaliação dos resultados foi realizada observando-se as micropipetas sob o microscópio estereoscópico com aumentos que variavam de 20 a 50x.

3.5. Testes serológicos para caracterização dos antissoros

Diversos testes foram conduzidos com o objetivo de se obter informações sobre a especificidade dos antissoros, utilizando-se diferentes métodos serológicos.

3.5.1. Testes serológicos de reação cruzada entre antígenos macerados dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros, AEh, AXRS, AXc e AXa pelo método de dupla difusão em gel-agar

Os antígenos foram preparados por maceração de células em nitrogênio líquido, como descrito no item 3.2.2.1.

Cada antissoro foi posto a reagir tanto com seu antígeno homólogo como com os 3 antígenos heterólogos.

3.5.2. Reação cruzada entre antígenos constituídos de extrato de exopolissacarídeos dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar

Os antígenos, extratos de exopolissacarídeos dos isolados, foram preparados como descrito no item 3.2.2.2.

O método serológico utilizado foi o de dupla difusão em agar descrito no item 3.4.1.

- 3.5.3. Reação cruzada entre antígenos constituídos de células intactas dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros, AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar

Os antígenos utilizados foram células intactas dos isolados.

O método de dupla difusão em agar descrito no item 3.4.1. foi o empregado.

- 3.5.4. Reação dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com extratos de exopolissacarídeos de diversos patótipos de *X. campestris*

Foram utilizados os isolados de diversos patótipos de *X. campestris* constantes da Tabela 1.

A extração dos exopolissacarídeos foi como o descrito no item 3.2.2.2.

Foi empregado o método de dupla difusão em agar descrito no item 3.4.1.

- 3.5.5. Reação dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com células intactas de diversos patótipos de *X. campestris*, pelo método de dupla difusão gel-agar

Este teste foi semelhante ao descrito no item

3.5.4., com a diferença que os antígenos utilizados foram células intactas no lugar de células maceradas.

3.5.6. Reações homólogas entre diferentes concentrações dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de microaglutinação em placas

Utilizando-se o método de microaglutinação em placas descrito no item 3.4.2., testou-se a reatividade de diferentes concentrações de antígeno e antissoros dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa. Os antígenos foram todos calibrados no espectrofotometro para 60% de transmitância (comprimento de onda de 625 mm), para em seguida proceder-se às diluições, em salina tamponada, por fatores de $2(2^{-n})$, n variando de 1 a 7. A diluição dos antissoros obedeceu à mesma metodologia. A avaliação dos resultados foi realizada 1 hora após o início da reação.

3.5.7. Titulação do antissoro AXa pelo método de microaglutinação em placas

Para a titulação do antissoro AXa foi utilizado o método de microaglutinação em placas de Petri descrito no item 3.4.2. A diluição do antissoro foi realizada de $2(2^{-n})$, n variando de 1 a 12. Esta metodologia baseou-se nos trabalhos de FIGUEIREDO (1972) e de KIMATI (1975). Como reação controle utilizou-se soro normal e salina tamponada.

O antígeno utilizado neste teste foi uma suspensão de bactérias intactas do isolado Xa, calibrando-se a concentração no espectrofotometro para 60% de transmitância.

As avaliações dos resultados foram realizadas aos 15', 30', 45', 1 h e 12 hs, com a finalidade de se determinar o tempo de reação.

3.5.8. Reações cruzadas entre antígenos constituídos de células intactas dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos exopolissacarídeos com os antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa pelo método de microaglutinação em placas

Utilizando-se o método de microaglutinação em placas, descrito no item 3.4.2., colocou-se os antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa e seus respectivos exopolissacarídeos para reagirem com seus respectivos antígenos homólogos e também com os antígenos heterólogos, para se verificar a possibilidade de reações cruzadas entre esses antígenos e antissoros.

3.5.9. Reações dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com antígenos constituídos de células intactas e seus respectivos exopolissacarídeos de diversos isolados de bactérias fitopatogênicas pelo método de microaglutinação em placas

O método de microaglutinação em placas está descrito no item 3.4.2. e o método de extração de exopolissacarídeos das células bacterianas no item 3.2.2.2.

As reações foram realizadas com o antissoro concentrado e os antígenos de células intactas foram calibrados em espectrofotometro para 60% de transmitância. Os antígenos constituídos de exopolissacarídeos não foram padronizados, utilizando-se a suspensão obtida como descrito no item

3.2.2.2.

Como controle de reação foi utilizado o soro normal.

As avaliações dos resultados foram realizadas aos 45 minutos e 3 horas após o início das reações.

3.6. Métodos de preparação de extratos de cana-de-açúcar para detecção de *X. albilineans* por métodos serológicos

Diversos métodos de preparação de extratos de cana-de-açúcar foram testados para se determinar a melhor maneira de se detectar *X. albilineans* nos colmos, pelos métodos serológicos.

3.6.1. Preparação de extrato de xilema pelo método da passagem de um fluxo de água através do colmo da cana-de-açúcar

Este método foi utilizado por VALARINI (1978) para medir vazão dos vasos de xilema de colmos de cana-de-açúcar. Esse autor desenvolveu uma aparelhagem para comparar a vazão dos vasos de xilema dos colmos sadios com a vazão de colmos afetados pelo raquitismo-da-soqueira.

Utilizando-se esta aparelhagem, procurou-se passar 30-40 ml de água destilada esterilizada através dos vasos do xilema, por meio de vácuo controlado (30 mm de Hg), com o intuito de se extrair as células bacterianas contidas nos vasos. A água após passar por uma secção de colmo de cana-de-açúcar, contendo dois nós e um entrenô, foi coletada em um tubo de cultura esterilizado. O extrato assim obtido, doravante denominado extrato de xilema, foi submetido a testes serológicos.

cos para se detectar a presença de *X. albilineans*. Diversos colmos, de diferentes cultivares, com e sem sintomas de escaladura foram testados.

3.6.2. Preparação de extrato de nós, através da maceração de nós de colmos de cana-de-açúcar

Os extratos de nós foram preparados seguindo-se a seguinte metodologia: inicialmente os colmos foram lavados externamente com água corrente, após o que foram cortados em toletes contendo 1 a 2 nós. Os toletes foram flambados com álcool e a seguir descascados, procurando-se sempre flambar a lâmina do canivete após cada corte. Do tolete descascado retirou-se, o mais assepticamente possível, a seção correspondente ao nó, que foi macerado em um espremedor manual de cana (MATSUOKA, 1972), previamente flambado.

Os extratos de nós assim obtidos foram colocados em tubos de cultura esterilizados. Em cada tubo foram misturados sucos de vários nós de um mesmo colmo. Foram preparados extratos de nós de um colmo sadio do cultivar IAC52-326 e de três colmos de cada cultivar, Co740 e IAC52-326, apresentando sintomas de descoloração de vasos. Estas amostras foram coletadas, respectivamente, do tratamento testemunha e do inoculado com *X. albilineans* de um experimento realizado pelo Engº Agrº Alonso K. Dodson na Estação Central-Sul do IAA/PLA-NALSUCAR, em Araras-SP.

O teste serológico utilizado foi o de microaglutinação descrito no item 3.4.2., em que os antígenos foram diluídos até 1:6 enquanto que o antissoro AXa foi utilizado somente na forma concentrada.

3.6.3. Preparação de extrato de vasos, através da maceração de vasos de xilema de cana-de-açúcar

No ítem 3.6.1. denominou-se de extrato de xilema a água coletada no tubo de cultura após passagem através do colmo, por meio de vácuo.

O extrato obtido pelo método abaixo também seria um extrato de xilema (vasos descoloridos), porém para que se possa diferenciar os tipos de extrato, denominar-se-á de extrato de vasos aquele obtido pelo processo descrito a seguir.

Para se obter extratos de vasos descoloridos procedeu-se da seguinte forma: os colmos foram previamente lavados para se eliminar resíduos aderentes à casca. A seguir procedeu-se cortes sucessivos do colmo no sentido longitudinal, com um canivete sempre flambado a cada corte. A cada corte observou-se a superfície exposta para se detectar a presença de vasos descoloridos, principalmente na região dos nós. Uma vez localizados, pequenos pedaços delgados de tecido, contendo uma porção do vaso descolorido, foram retirados e colocados na parte côncava de uma lâmina escavada onde se adicionou 2 a 3 gotas de água destilada estéril. Nos casos de plantas saudáveis em que não se encontrou vasos descoloridos, os pedaços de tecido contendo vasos normais, foram retirados ao acaso, da região do nó.

Procedeu-se então a maceração destes tecidos, com bastão de vidro. Após a maceração, o extrato foi utilizado em testes serológicos de aglutinação em micropipetas, como descrito no ítem 3.4.3., ou na própria lâmina escavada.

Para o teste na lâmina escavada, as partículas maiores de tecido foram cuidadosamente retiradas, e a seguir foi adicionado o antissoro na lâmina. Para se evitar a evaporação excessiva do extrato e do antissoro, os bordos de uma lamínula foram untadas com silicone cobrindo-se com ela a ca-

vidade da lâmina. A observação da reação de aglutinação foi realizada periodicamente ao microscópio estereoscópico.

3.7. Testes serológicos para detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar

Os métodos serológicos foram testados para detecção de *X. albilineans* nos extratos obtidos pelos diferentes processos descritos no item 3.6.

3.7.1. Detecção de *X. albilineans* em extratos de cana-de-açúcar pelo método de microaglutinação em placas

O método de microaglutinação em placas, descrito no item 3.4.2., foi utilizado para verificar a possibilidade de se detectar *X. albilineans* em extratos de xilema e extratos de nós de diferentes cultivares obtidos através dos métodos descritos nos itens 3.6.1. e 3.6.2., respectivamente.

3.7.1.1. Detecção de *X. albilineans* em extrato de xilema do cultivar CP45-184 pelo método de microaglutinação em placas

De quatro colmos de cana-de-açúcar do cultivar CP45-184, apresentando sintomas de descoloração vascular na região dos nós, foi obtido o extrato de xilema pelo método descrito em 3.6.1.

O extrato assim obtido foi diretamente utiliza-

do em testes serológicos, pelo método de microaglutinação em placas de Petri, com o objetivo de se detectar a presença de *X. albilineans* ou da bactéria XRS. Para tanto utilizou-se os antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa.

Como controle de reação positiva e negativa os antissoros foram postos a reagir com antígenos homólogos e heterólogos provenientes de culturas puras.

3.7.1.2. Detecção de bactérias em extrato de xilema do cultivar CP45-184, enriquecido por incubação por 3 dias, pelo método de microaglutinação em placas

Aproximadamente 5,0 ml do extrato obtido no item 3.7.1.1. foram deixados nos tubos, à temperatura ambiente por 3 dias para se verificar um possível aumento na população das bactérias. Após este período de incubação os extratos apresentavam-se turvos, indicando que houve um crescimento da população bacteriana.

Os extratos, após o período de incubação, foram filtrados em filtro Millipore, com poros de 3.000 nm, resultando filtrados de baixa turbidez.

Os extratos assim obtidos foram testados serologicamente pelo mesmo método descrito no item 3.4.2.

3.7.1.3. Detecção de *X. albilineans* em extrato de xilema do cultivar CP45-184, concentrado por centrifugação pelo método de microaglutinação em placas

Alíquotas de 20,0 ml dos extratos de xilema des

critos no item 3.7.1.1. foram centrifugados a 3.000 g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. A seguir os precipitados foram ressuspensos em 2,0 ml de salina tamponada.

Estas suspensões foram submetidas a reações serológicas com os antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, com o objetivo de se detectar a presença de bactérias (XRS e *X. albilineans*) nos extratos. Como controle de reação positiva e negativa os antissoros foram postos a reagir com bactérias intactas de seus homólogos e heterólogos.

O método utilizado foi o de microaglutinação em placas descrito no item 3.4.2.

3.7.1.4. Detecção de *X. albilineans* em extratos de xilema dos cultivares IAC52-326 e Co740, pelo método de microaglutinação em placas

Foram obtidos extratos de xilema, pelo método descrito no item 3.6.1., de colmos de cana-de-açúcar provenientes de um experimento conduzido pelo Engº Agrº Alonso K. Dodson, na Estação Central-Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP. Estas plantas haviam sido inoculadas de acordo com os tratamentos abaixo relacionados, mas apresentavam infecção latente de escaldadura-das-folhas, por ocasião da coleta dos materiais.

- A. IAC52-326 - inoculado com *X. albilineans* e a bactéria XRS.
- B. IAC52-326 - inoculado com caldo bruto de colmos com sintomas de raquitismo-da-soqueira.
- C. Co740 - testemunha não inoculada.
- D. Co740 - inoculado com *X. albilineans*.
- E. Co740 - inoculado com caldo bruto de colmos com sintomas de raquitismo-da-soqueira.

De cada tratamento foram obtidos extratos de xilema de cinco colmos diferentes e analisados quanto a presença de *X. albilineans* e da bactéria XRS, pelo método serológico empregado no item 3.7.1.3.

3.7.1.5. Detecção de *X. albilineans* em extratos de nós dos cultivares IAC52-326 e Co740, pelo método de microaglutinação em placas

Foram preparados extratos de nós seguindo-se a metodologia descrita no item 3.6.2.

As amostras utilizadas nos testes foram:

- a) um colmo sadio do cultivar IAC52-326, e
- b) três colmos do cultivar IAC52-326 e três do cultivar Co740, apresentando sintomas de descoloração de vasos. Estas amostras foram coletadas dos tratamentos, respectivamente, testemunha e inoculado com *X. albilineans* de um experimento conduzido pelo Eng^o Agr^o Alonso K. Dodson na Estação Central-Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP.

O teste serológico utilizado foi o de microaglutinação em placas descrito no item 3.4.2. O antissoro utilizado foi o AXa.

3.7.1.6. Detecção de *X. albilineans* em extratos de nós e em extratos de xilema do cultivar CB41-76 pelo método de microaglutinação em placas

Para este teste foram preparados extratos de nós e extrato de xilema do cultivar CB41-76, com e sem sinto-

ma de escaldadura-das-folhas, pelos métodos descritos, respectivamente, em 3.6.2. e 3.6.1.

Os extratos de nós foram utilizados diretamente nos testes, como caldo propriamente dito, e também concentrado por centrifugação a 3.000 g por 10 minutos, sendo o centrifugado ressuspenso em salina tamponada, de tal forma que houve uma concentração do precipitado em aproximadamente 5 vezes (10 ml do caldo:2 ml da suspensão). Uma alíquota desta suspensão concentrada foi utilizada no teste serológico enquanto o restante foi filtrado em filtro Millipore, com poros de 3.000 nm.

Os extratos de xilema receberam os mesmos tratamentos acima descritos.

O teste serológico utilizado foi o de microaglutinação e os antissoros utilizados foram AEh, AXRS, AXc e AXa.

Como controle, os antissoros foram postos a reagir com seus homólogos, além das reações com soro normal e salina tamponada.

3.7.2. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de cana-de-açúcar pelo método de microaglutinação em lâmina escavada

O método de microaglutinação em lâmina escavada foi utilizado para detectar *X. albilineans* em extratos de vasos de diversos cultivares de cana-de-açúcar.

Procurou-se detectar *X. albilineans* em extratos de vasos de cana-de-açúcar, obtidos pelo método de maceração em lâmina escavada, descrito no item 3.4.2. Foram realizados três testes de microaglutinação em que as reações entre antígeno e antissoro foram realizadas na própria lâmina utilizada para maceração dos vasos.

3.7.2.1. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos do cultivar CB41-76, pelo método de microaglutinação em lâmina escavada

Obteve-se 10 lâminas escavadas com extratos de vasos de um colmo do cultivar CB41-76 com sintoma de escaldadura-das-folhas, coletado na Estação Central-Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP. Em cada lâmina colocou-se uma gota de soro. Os antissoros utilizados foram AEh, AXRS, AXc e AXa além do soro normal. Foram feitas duas repetições para cada soro.

Como padrões de reações positiva e negativa foram feitas reações, em lâmina escavada, utilizando bactérias intactas do isolado Xa.

A avaliação dos resultados foi realizada por 2 pessoas, separadamente, 1 hora após o início da reação. As lâminas foram codificadas de tal forma que sua identificação foi feita somente por um número.

3.7.2.2. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos dos cultivares Co740 e CB41-76, pelo método de microaglutinação em lâmina escavada

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no ítem 3.7.2.1. Os extratos de vasos foram obtidos de um colmo do cultivar Co740 inoculado com a bactéria XRS e um colmo do cultivar CB41-76 com sintoma de escaldadura-das-folhas. Estes colmos foram coletados na Estação Central-Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP.

3.7.2.3. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de diversos cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de microaglutinação em lâmina escavada

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.7.2.1., utilizando-se somente o antissoro AXa e soro normal.

Os colmos de cana-de-açúcar foram coletados na Estação Central-Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP, pelo Engº Agrº Dr. Sizuo Matsuoka que forneceu as informações constantes na Tabela 2. Cada amostra constou de 3 colmos.

Inicialmente, foram utilizados 2 colmos de cada amostra (Teste I), sendo retirado, de cada colmo, um extrato de vasos. A avaliação dos resultados foi realizada como descrito no item 3.7.2.1.

O teste foi repetido (Teste II), sendo que as amostras de nºs 2, 8 e 10 não foram incluídas. Neste teste foi utilizado o colmo remanescente da amostra, sendo que para cada colmo, foram preparadas 3 repetições. Neste teste a avaliação foi realizada somente por uma pessoa.

3.7.3. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta

As amostras utilizadas nos testes foram as mesmas utilizadas no item 3.7.2.3.

O teste de aglutinação em micropipetas está descrito no item 3.4.3.

Tabela 2. Relação de 10 amostras de colmos de cana-de-açúcar e suas respectivas caracterizações^a.

Nº DA AMOSTRA	CULTIVAR	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA
01	CB68-69	Colmos com sintomas de escaldadura nas folhas.
02	CB68-69	Colmos sem sintoma de escaldadura nas folhas, provenientes de touceiras com plantas com sintomas.
03	CB68-69	Colmos de touceiras aparentemente saudias.
04	Tuc519	Colmos de touceiras aparentemente saudias.
05	Tuc519	Colmos sem sintoma de escaldadura nas folhas, provenientes de touceiras com plantas com sintomas.
06	IANE48-21	Colmos sem sintoma de escaldadura nas folhas, provenientes de touceiras inicialmente inoculadas com caldo bruto de colmos com sintomas de raquitismo-da-soqueira.
07	IANE48-21	Colmos com sintomas internos de infecção por <i>Fusarium</i> sp.
08	IANE48-21	Colmos de touceiras aparentemente saudias.
09	CB41-76	Colmos com sintomas de escaldadura nas folhas.
10	CB50-41	Colmos sem sintoma de escaldadura nas folhas, provenientes de touceiras inicialmente inoculadas com caldo bruto de colmos com sintomas de raquitismo-da-soqueira.

^a - As amostras e suas respectivas caracterizações foram fornecidas pelo Engº Agrº Dr. Sizuo Matsuoka, do IAA/PLANAL SUCAR, ARARAS-SP.

3.7.3.1. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta

Os extratos de vasos foram obtidos seguindo-se a metodologia descrita no ítem 3.6.3.

Foram utilizados 2 colmos do cultivar CB68-69 com sintoma de escaldadura-das-folhas e 1 colmo do cultivar IANE48-21 e 1 colmo do cultivar CB50-41, ambos sem sintomas de escaldadura-das-folhas (amostras nºs 1, 8 e 10 da Tabela 2).

Para os testes de aglutinação em micropipetas, descrito no ítem 3.4.3., foi utilizado o antissoro AXa além do soro normal.

A avaliação dos resultados foi realizada por duas pessoas separadamente, e com as micropipetas codificadas de tal forma que cada uma era identificada apenas por um número.

3.7.3.2. Comparação da reatividade de diversas diluições de *X. albilineans* obtida em cultura pura e diluições de extrato de vasos de plantas com sintoma de escaldadura-das-folhas

Neste teste as diluições de *X. albilineans*, obtida em cultura pura, foram preparadas utilizando-se como diluente, caldo de cana-de-açúcar filtrado em Millipore, com poros de 3.000 nm, proveniente de colmos do cultivar CB68-69 sem sintoma de escaldadura. A concentração mais elevada a partir da qual foram feitas as diluições) foi obtida centrifugan

do-se a 12.000 g por 10 minutos, 15 ml de uma suspensão do isolado Xa, em salina tamponada, contendo aproximadamente 8×10^8 células/ml. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em igual quantidade de caldo filtrado.

A concentração mais elevada de extrato de vasos foi obtida macerando-se vasos descoloridos de colmos do cultivar CB68-69, com sintoma de escaldadura, de acordo com o descrito no item 3.6.3. As diluições dos extratos de vasos foram igualmente obtidas utilizando-se o caldo filtrado como diluente.

As diluições foram feitas por fatores de $2(2^{-n})$, n variando de 1 a 5.

Foi utilizado o antissoro AXa para detecção de *X. albilineans* e o soro normal para controle de reação. Um outro controle de reação foi um extrato de vasos de colmos sem sintoma da doença.

O teste serológico utilizado foi o de aglutinação em micropipetas, descrito no 3.4.3.

A codificação das micropipetas e a avaliação dos resultados foram realizadas da mesma forma que em 3.7.3.1.

O teste foi repetido para confirmação dos resultados obtidos.

3.7.3.3. Efeito da filtragem de extratos de vasos nas reações serológicas para detecção de *X. albilineans* pelo método de aglutinação em micropipeta

Neste teste foram utilizados colmos do cultivar CB68-69 com e sem sintoma de escaldadura-das-folhas. O método de obtenção do extrato de vasos está descrito no item 3.4.3.

A filtragem do extrato foi feita em filtro Mil-

membrana com poros de 3.000 nm.

O método serológico utilizado foi o de aglutinação em micropipetas, sendo que os extratos foram postos a reagir com o antissoro AXa e soro normal.

Foram feitas 3 repetições para cada tratamento.

A codificação das micropipetas e a avaliação dos resultados foram realizados como descrito no item 3.7.3.1.

3.7.3.4. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de diversos cultivares de cana-de-açúcar pelo método de aglutinação em micropipeta

Este teste foi uma repetição do teste descrito em 3.7.2.3., com a diferença que o teste serológico utilizado foi o de aglutinação em micropipetas e não em lâminas escavadas.

A codificação das micropipetas e a avaliação dos resultados foram realizados como descrito no item 3.7.3.1.

O teste foi repetido para confirmação de resultados.

3.7.3.5. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de diferentes amostras de cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta

As 17 amostras utilizadas neste teste foram coletadas pelo Engº Agrº Dr. Sizuo Matsuoka da Estação Central-Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP. O material foi enviado ao laboratório codificado, sendo cada amostra identificada somen

te por um número. A codificação do material ficou de posse do Dr. Sizuo Matsuoka que revelou o nome dos cultivares e as respectivas caracterizações do material coletado, somente após o envio dos resultados dos testes serológicos. Os colmos foram enviados ao laboratório na forma de toletes, sem folhas, de tal forma que o responsável pelo teste desconhecia qualquer sintoma externo do material. Cada amostra era composta de 3 toletes de um mesmo colmo.

Foram realizados 3 testes, utilizando-se em cada um, toletes diferentes de uma mesma amostra. A lista de amostras e suas respectivas caracterizações realizadas pelo Engº Agrº Dr. Sizuo Matsuoka constam da Tabela 3.

O método de obtenção de antígeno foi o de maceração de vasos descrito no item 3.6.3.

Durante a obtenção do extrato de vasos, foram feitas anotações com respeito aos sintomas internos nos colmos. Estas anotações foram feitas a cada vez que se fez um teste.

O método serológico empregado foi o de aglutinação em micropipetas descrito no item 3.4.3. O antissoro utilizado foi o antissoro AXa.

Cada teste constou de 5 repetições para cada tolete testado. As micropipetas foram codificadas e avaliadas por duas pessoas independentemente.

3.7.3.6. Detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar com sintoma de estrias brancas nas folhas

O material para este teste foi enviado pelo Engº Agrº Dr. Álvaro Sanguino, do Centro Tecnológico da COPER SUCAR, Piracicaba-SP. As nove plantas enviadas foram, previamente codificadas de tal forma que somente a pessoa que as co

Tabela 3. Relação de 17 amostras de colmos de cana-de-açúcar e suas respectivas caracterizações^a.

Nº DA AMOSTRA	CULTIVAR	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA
1	CB41-76	Retirada de viveiro terciário originário de colmos inicialmente tratados em água aquecida a 50,5°C por 2 horas.
2	CB49-260	Retirada de viveiro terciário originário de colmos inicialmente tratados em água aquecida a 50,5°C por 3 horas.
3	IAC52-326	Idem anterior.
4	CB41-76	Retirada de viveiro terciário originário de colmos inicialmente inoculados com caldo bruto de colmos com raquitismo-da-soqueira. Amostra com sintomas internos da doença.
5	IAC52-326	Idem anterior.
6	CB49-260	Idem anterior.
7	M202/46	Amostra retirada de touceira com sintomas de escaldadura-das-folhas. O colmo amostrado não apresentavam sintomas da doença nas folhas.
8	M202/46	Colmo com sintoma de escaldadura-das-folhas, tanto foliar como interno. Sintomas recentes.
9	M202/46	Idem anterior. Sintomas antigos.
10	Q61	Colmo com sintoma interno de escaldadura-das-folhas.
11	Q61	Colmo sem sintoma, provenientes de touceira com sintomas de escaldadura-das-folhas.
12	Q61	Colmo de touceiras sem sintoma de escaldadura-das-folhas.
13	IANE55-16	Colmo com brotações laterais com sintomas de escaldadura-das-folhas.
14	IANE55-16	Colmo com brotações laterais sem sintoma de escaldadura-das-folhas.
15	IANE55-16*	Colmo de touceira sem sintoma de escaldadura-das-folhas.
16	IANE55-16	Colmo com sintomas causados por <i>Fusarium</i> sp.
17	Não identificada	Colmo com sintomas causados por <i>Fusarium</i> sp.

a) As amostras e suas respectivas caracterizações foram fornecidas pelo Engº Agrº Dr. Sizuo Matsuoka da Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP.

letou e codificou saberia identificá-las no futuro.

Das 9 plantas, 5 apresentavam sintomas, nas folhas, considerados típicos de escaldadura.

A obtenção do antígeno e o método serológico empregado foram os mesmos utilizados no teste anterior. O antissoro utilizado foi o AXa.

Foram realizadas 5 repetições para cada amostra.

3.7.3.7. Detecção de *X. albilineans* em amostras coletadas no experimento de inoculação de diversas concentrações da bactéria no cultivar NA56-79

As amostras foram coletadas do experimento descrito no ítem 3.1.2.

De cada tratamento foram retiradas, ao acaso, 5 plantas que mostravam sintomas de estrias de escaldadura-das-folhas por ocasião da 3ª avaliação com exceção das plantas do tratamento testemunha e de 3 plantas do tratamento inoculado com 8×10^8 células/ml, que não mostraram sintomas nas folhas. Os sintomas internos foram observados por ocasião da avaliação final. Além dessas amostras foram retiradas 11 plantas, ao acaso (dos três tratamentos mais concentrados), que não apresentaram sintomas nas folhas durante o experimento e 6 plantas que apresentaram o fenômeno de recuperação de sintomas durante o decorrer do experimento.

De cada colmo amostrado foram preparados 3 extratos de vasos, separadamente, seguindo-se a metodologia descrita no ítem 3.6.3. Cada extrato foi posto a reagir com o antissoro AXa em micropipetas diferentes, seguindo-se a metodologia descrita no ítem 3.4.3. Desta forma obteve-se 3 repetições para cada amostra.

Cada micropipeta foi codificada de tal forma

que era identificada somente por um número, sendo a avaliação realizada por duas pessoas, separadamente, aproximadamente 12 horas após o início da reação.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos de inoculação de *X. albilineans* em cana-de-açúcar

4.1.1. Teste de patogenicidade do isolado Xa em plantas do cultivar NA56-79

Das 20 plantas do cultivar NA56-79 inoculadas com o isolado Xa, 19 mostraram sintoma característico de escaaldadura-das-folhas, enquanto que nas 20 plantas controle o sintoma não foi observado. Em duas das plantas inoculadas, observou-se o fenômeno de recuperação, isto é, o sintoma na folha foi observado alguns dias após a inoculação da bactéria, mas por ocasião da leitura final as folhas estavam sem sintoma da doença. Entretanto, quando se procedeu a avaliação dos sintomas internos, na região dos nós, todos os colmos apresentaram descoloração vascular.

Todas as folhas com estrias de escaaldadura, observadas ao microscópio estereoscópico pelo método descrito por MASUDA e TOKESHI (1978), mostraram fluxo de bactérias dos

vasos para a água destilada.

4.1.2. Determinação da infectividade do isolado Xa em diferentes concentrações de inóculo

Pela observação da Tabela 4 verifica-se que mesmo na menor concentração testada, a bactéria foi capaz de induzir sintomas de escaldadura-das-folhas de cana-de-açúcar.

O número de plantas com sintoma de escaldadura-das-folhas aumentou linearmente com o aumento logarítmico da concentração de bactéria inoculada, como mostra a Fig. 1.

Algumas plantas mostraram o fenômeno de recuperação de sintoma caracterizado pelo fato de apresentarem sintoma de estrias nas folhas nas avaliações iniciais e apresentarem-se sem sintoma da doença em avaliações posteriores.

Deve-se ainda ressaltar o fato de que várias plantas inoculadas não apresentaram sintomas nas folhas mas apresentaram sintoma de descoloração vascular na avaliação final.

Por outro lado, observou-se que em algumas plantas que apresentaram sintoma de estrias nas folhas, não foi possível detectar-se sintoma de descoloração de vasos.

Os resultados do teste serológico realizado com material coletado neste experimento são apresentados posteriormente no item 4.3.3.7.

A avaliação final do experimento foi realizada somente com base nos sintomas internos pelo fato da maioria das folhas que apresentaram sintoma de estrias nas primeiras avaliações estarem secas por ocasião desta avaliação.

Tabela 4. Inoculação de diversas concentrações de *X. albilineans* no cultivar NA56-79.

CONCENTRAÇÕES	Nº DE PLANTAS INOCULADAS	NÚMERO DE PLANTAS COM SINTOMAS EXTERNOS NAS AVALIAÇÕES			Nº PLANTAS COM RECUPERAÇÃO DE SINTOMAS	Nº PLANTAS COM SINTOMAS INTERMEDIÁRIOS (AVALIAÇÃO FINAL)
		1ª	2ª	3ª		
Testemunha	40	0	0	0	0	0
8 x 10 ¹	40	1	2	2	0	11
8 x 10 ²	40	4	6	7	1	7
8 x 10 ³	40	5	10	11	2	23
8 x 10 ⁴	40	10	16	18	3	18
8 x 10 ⁵	40	17	22	24	2	27
8 x 10 ⁶	40	13	22	24	1	28
8 x 10 ⁷	40	25	29	33	1	32
8 x 10 ⁸	40	26	30	29	3	30

Fig.1. Relação entre a concentração de inóculo de *X. albilineans* e o número de plantas com sintomas nas folhas, observadas 45 dias após a inoculação, no cultivar NA56-79

4.2. Testes serológicos para caracterização dos antissoros

4.2.1. Teste de reação cruzada entre antígenos macerados dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar

Quando os antissoros foram postos a reagir com seus antígenos homólogos e heterólogos obtidos por maceração de células bacterianas, observou-se que o antissoro AEh foi o que apresentou maior número de linhas de reação (6 linhas) em presença de seu homólogo, apresentando ainda 2 linhas fracas, de reação com o antígeno Xc. Por outro lado, o antissoro AXc apresentou 3 linhas de reação com seu antígeno homólogo e apenas uma linha de reação com o antígeno Eh. Os antissoros AXRS e AXa apresentaram maior especificidade, reagindo apenas com os respectivos homólogos, sendo que o primeiro antissoro apresentou 4 linhas de reação e o segundo apenas 3 linhas. As posições e intensidades relativas das linhas formadas podem ser observadas no protocolo apresentado na Fig. 2.

4.2.2. Teste de reação cruzada entre antígenos constituídos de extratos de exopolissacarídeos dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar

Neste teste observou-se que os antissoros mostraram-se específicos aos exopolissacarídeos das bactérias homólogas, não reagindo portanto, com exopolissacarídeos de bactérias heterólogas. O antissoro AXRS não reagiu com nenhum

TESTES SEROLÓGICOS DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL-AGAR

Data: 09/08/76

Antígenos: Células maceradas		Antissoros	
A - AXa		1) AEh	4) AXa
B - XRS		2) AXRS	
C - Xc		3) AXc	
D - Eh		agar: 1% tampão: fosfato pH: 7,2 temperatura(s): ambiente tempo reação: 36 hs.	

Fig. 2. Reações homólogas e heterólogas de células maceradas de *E. herbicola* (Eh), XRS, *X. campestris* patotipo *campestris* (Xc) e *X. albilineans* (Xa) com seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa.

dos antígenos testados, inclusive seu homólogo. As posições e intensidades relativas das linhas formadas podem ser observadas no protocolo apresentado na Fig. 3.

4.2.3. Teste de reação cruzada entre antígenos constituídos de células intactas dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e os antissoros AXRS, AXc e AXa, pelo método de dupla difusão em gel-agar

Este teste mostrou especificidade de reação dos antissoros AXRS e AXa e reação cruzada do antissoro AXc que reagiu com seu homólogo e com o antígeno heterólogo Eh.

As posições e intensidades relativas das linhas formadas podem ser observadas no protocolo apresentado na Fig. 4.

4.2.4. Reação dos antissoros AEh, AXRS e AXa com extratos de exopolissacarídeos de diversos patótipos de *X. campestris*, pelo método de dupla difusão em gel-agar

Neste teste observou-se uma grande reatividade do isolado ve-792 que apresentou linha de reação com todos os antissoros testados.

Além dessa reação os antissoros AEh e AXRS reagiram somente com antígenos homólogos.

O antissoro AXRS reagiu com os antígenos ca-903, ri-779 e cu-2173, além da reação com seu homólogo.

O antissoro AXa reagiu com os antígenos he-2170 e ma-2216, além das reações com seus homólogos.

As posições e intensidades relativas das linhas

TESTES SEROLÓGICOS DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL-AGAR

Data: 16/08/76

Antígenos: Exopolissacarídeos		Antissoros	
A - Xa		1) AEh	
B - XRS		2) AXRS	
C - Xc		3) AXc	
D - Eh		4) AXa	
		agar: 1%	
		tampão: fosfato	
		pH: 7,2	
		temperatura(s): ambiente	
		tempo reação: 36 hs.

Fig. 3. Reações homólogas e heterólogas entre extratos de exopolissacarídeos de *E. herbicola* (Eh), XRS, *X. campestris* patotipo *campestris* (Xc) e *X. albilineans* (Xa) com os antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa.

TESTES SEROLÓGICOS DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL-AGAR

Data: 16/08/76

Antígenos: Células intactas		Antissoros	
I - Xa		1) AXRS	
J - XRS		2) AXc	
K - Xc		3) AXa	
L - Eh		agar: 1% tampão: fosfato pH: 7,2 temperatura(s): ambiente tempo reação: 36 hs.	

Fig.4. Reações homólogas e heterólogas entre células intactas de *E. herbicola* (Eh), XRS, *X. campestris* patotipo *campestris* (Xc) e *X. albilineans* (Xa) com os antissoros AXRS, AXc e AXa.

formadas podem ser observadas no protocolo apresentado na Fig. 5.

4.2.5. Reação dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com células intactas de diversos patótipos de *X. campetris*, pelo método de dupla difusão em gel-agar

O antissoro AXRS mostrou-se específico reagindo somente com seu antígeno homólogo.

O antissoro AEh apresentou reações fracas com os antígenos ve-76, ri-779, mh-975, vi-2008 e mi-2097 além de forte reação com seu antígeno homólogo macerado.

O antissoro AXc reagiu com os antígenos ve-76, di-140, es-568, ri-779, ca-903, gl-2076, mi-2097, ph-2099 e he-2170, em diferentes intensidades e número de linhas de reação.

O antissoro AXa reagiu com os antígenos ve-76 (reação fraca), he-2170 (reação forte) e com seu homólogo macerado (reação forte).

As posições e intensidades relativas das linhas formadas podem ser observadas no protocolo apresentado na Fig. 6.

4.2.6. Reações homólogas entre diferentes concentrações dos isolados Eh, XRS, Xc e Xa e seus respectivos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa, pelo método de microaglutinação em placas

Ao tempo de reação de 1 hora todos os antissoros reagiram com seus respectivos antígenos concentrados até

TESTES SEROLÓGICOS DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL-AGAR

Data: 25/08/76

Antígenos: Extratos de Exopolissacarídeos ve-76 ma-2216 di-140 Xa es-568 XRS ri-779 Xc ve-792 Eh ca-903 mh-975 Células intactas vi-2008 A - Eh gl-2076 B - Xa mi-2097 C - XRS ph-2099 D - Xc he-2170 cu-2173 ve-2201	Antissoros 1) AEh 2) AXRS 3) AXc 4) AXa agar: 1% tampão: fosfato pH: 7,2 temperatura(s): ambiente tempo reação: 48 hs.

Fig. 5. Reação dos antissoros de *E. herbicola* (AEh), XRS (AXRS), *X. campestris* patotipo *campestris* (AXc) e *X. albilineans* (AXa) com extratos de exopolissacarídeos de diversos patotipos de *X. campestris*.

(continua)

TESTES SEROLÓGICOS DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL-AGAR

Data: 25/08/76

Antígenos: Extratos de Exopolissacarídeos	Antissoros
ve-76 ma-2216 di-140 Xa es-568 XRS ri-779 Xc ve-792 Eh ca-903 mh-975 Células intactas vi-2008 A - Eh gl-2076 B - Xa mi-2097 C - XRS ph-2099 D - Xc he-2170 cu-2173 ve-2201	1) AEh 2) AXRS 3) AXc 4) AXa
	agar: 1% tampão: fosfato pH: 7,2 temperatura(s): ambiente tempo reação: 48 hs.
76 O O 903 975 O O 2170 O 40 O 792 2008 O O 2099 O 568 O 779 2076 O O 2097	2173 O O XRS Xc O O D 2173 O O Xa Eh O O OC 2201 O O 2216 A O O B
O O O O O O O O O O O O O O	O O O O O O O O O O O O O O
O O O O O O O O O O O O O O	O O O O O O O O O O O O O O

Fig. 5. (continuação) Reação dos antissoros de *E. herbicola* (AEh), XRS (AXRS), *X. campestris* patotipo *campestris* (AXc) e *X. albilineans* (AXa) com extratos de exopolissacarídeos de diversos patotipos de *X. campestris*.

TESTES SEROLÓGICOS DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL-AGAR

Data: 24/08/76

Antígenos:		Antissoros	
Células intactas		A - AEh	
ve-76		B - AXRS	
di-140		C - AXc	
es-568	Células maceradas	D - AXa	
ri-779	Eh		
ve-792			
ca-903	XRS		
mh-975	Xa		
vi-2008		agar: 1%	
gl-2076		tampão: fosfato	
mi-2097		pH: 7,2	
ph-2099		temperatura(s): ambiente	
he-2170		tempo reação: 48 hs.	
cu-2173			
ve-2201			
ma-2216			

Fig. 6. Reações entre os antissoros de *E. herbicola* (AEh), XRS (AXRS), *X. campestris* patotipo *campestris* (AXc), e *X. albilineans* (AXa) com células intactas de diversos patotipos de *X. campestris*.

a diluição máxima testada que foi de 1:64.

Com relação à diluição dos antígenos observuu-se que poucas diluições foram suficientes para eliminar as reações. Assim sendo, para o isolado Eh, a diluição máxima em que se observou reação positiva foi de 1:4; 1:2 para o isolado XRS, 1:8 para o isolado Xc e 1:4 para o isolado Xa.

4.2.7. Titulação do antissoro AXa pelo método de micro-aglutinação em placas

O título do antissoro AXa foi de 1:1024.

O tempo de reação necessário para se proceder a avaliação dos resultados deve ser em torno de 45 minutos uma vez que nas leituras realizadas 15 minutos após o início da reação não foi possível distinguir-se reação positiva e, aos 30 minutos observou-se reações positivas somente nas concentrações do antissoro acima de 1:8 enquanto que nas demais diluições observou-se apenas indícios de reações positivas nas diluições até 1:32. Aos 45 minutos as reações já se completaram sendo que o título máximo obtido nesse tempo não é aumentado pelo prolongamento no tempo de reação, como mostra a Tabela 5.

4.2.8. Reações dos antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa com antígenos constituídos de células intactas e seus respectivos exopolissacarídeos de diversos isolados de bactérias fitopatogênicas, pelo método de microaglutinação em placas

Os resultados dos testes descritos nos itens 3.5.8. e 3.5.9. são apresentados em conjunto.

Tabela 5. Titulação do antissoro de *X. albilineans* (AXa) e tempo de reação.

TEMPO	DILUIÇÕES DO ANTISORO AXa											
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048 SN SAL
15'	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30'	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
45'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12 hs	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

SN = Soro normal; SAL = Salina tamponada; + = reação positiva; - = reação negativa;
 + = Início de formação de precipitado visível.

Os antissoros AEh e AXRS mostraram-se específicos, reagindo somente com seus homólogos, sendo que o antissoro AXRS reagiu somente com seu homólogo constituído de células intactas.

O antissoro AXc apresentou reação cruzada apenas em presença de células intactas dos isolados ve-76, ve-972, vi-2008 e ph-2099, além das reações homólogas (isolados Xc e ca-903). Após 3 horas observou-se reações positivas adicionais com os isolados es-568, ri-779 e he-2170.

O antissoro AXa apresentou reações cruzadas em presença de células intactas dos isolados he-2170 e ma-2216. Em presença de exopolissacarídeos, apresentou reações cruzadas com os isolados ve-972, he-2170 e ma-2216. Reação positiva adicional foi observada com exopolissacarídeos do isolado mi-2097, 3 horas após o início da reação.

Os resultados do teste são apresentados na Tabela 6.

4.3. Testes serológicos para detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar

4.3.1. Detecção de *X. albilineans* em extratos de xilema e extratos de nós de cana-de-açúcar, pelo método de microaglutinação em placas

Os testes descritos nos itens 3.7.1.1. a 3.7.1.6. apresentaram resultados considerados negativos, razão pela qual são apresentados agrupados, com algumas observações pertinentes a cada método de preparação de extratos.

Os extratos de xilema não apresentaram qualquer tipo de reação quando postos a reagir com os antissoros testados, mesmo quando o extrato foi concentrado por centrifugação

Tabela 6. Reações de antissoros de *E. herthiae* (AEh), XRS (AXRS), *X. campestris* (AXc) e *X. shilligiana* (AXa) com antígenos de diversos isolados de bactérias fitopatogênicas, constituídos de células intactas e seus reagentes exopolissacarídeos, pelo método de microaglutinação em placas.

ISOLADOS ^a	ANTÍGENOS	ANTISSOROS			
		AEh	AXRS	AXc	AXa
Eh	Células intactas	+	-	-	-
	Exopolissacarídeo	+	-	-	-
XRS	Células intactas	-	+	-	-
	Exopolissacarídeo	-	-	-	-
Xc	Células intactas	-	-	+	-
	Exopolissacarídeo	-	-	+	-
Xa	Células intactas	-	-	-	+
	Exopolissacarídeo	-	-	-	+
Ca-903	Células intactas	-	-	+	-
	Exopolissacarídeo	-	-	+	-
cu-2173	Células intactas	-	-	-	-
	Exopolissacarídeo	-	-	-	-
dl-140	Células intactas	-	-	-	-
	Exopolissacarídeo	-	-	-	-
es-568	Células intactas	-	-	+	-
	Exopolissacarídeo	-	-	-	-
gl-2076	Células intactas	-	-	-	-
	Exopolissacarídeo	-	-	-	-
he-2170	Células intactas	-	-	+	+
	Exopolissacarídeo	-	-	-	-
ma-2216	Células intactas	-	-	-	+
	Exopolissacarídeo	-	-	-	+
mh-105	Células intactas	-	-	-	-
	Exopolissacarídeo	-	-	-	-

continua

continuação

ISOLADOS ^a	ANTÍGENOS	ANTÍSSOROS				SN
		Aeh	AXRS	AXc	AXa	
mh-975	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	-	-	-
ml-2097	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	-	-	-
ps-168	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	-	-	-
ph-2099	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	+	-	-
ri-779	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	++	-	-
ve-76	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	+	-	-
ve-792	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	+	-	-
ve-2201	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	-	-	-
vi-2008	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	+	-	-
Pc-127	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	-	-	-
Pc-147	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	-	-	-
Pg-153	Células intactas Exopolissacarídeo	-	-	-	-	-

^a = Identidade dos isolados na Tabela 1.

+

++ = Reação positiva 45 minutos após o início da reação; - = Reação negativa

++ = Reação positiva 3 horas após o início da reação.

ou deixado incubado por 3 dias, na tentativa de se aumentar a população de bactéria. Neste último caso, houve o crescimento de bactérias, verificado pela turbidez do extrato, mas os tes serológicos realizados mostraram resultados negativos.

Por outro lado, os extratos de nos apresentaram a formação de precipitados finos, tanto nas reações dos extratos com os antissoros como com o soro normal e salina, não sendo possível distinguir-se diferenças de reações. A filtração dos extratos de nos em filtro Millipore com poros de 3.000 nm eliminou o aparecimento desses precipitados, tornando os resultados negativos.

4.3.2. Detecção de *X. albilineans* em extratos de cana-de-açúcar pelo método de microaglutinação em lâmina escavada

Os resultados dos três testes realizados com extratos de vasos de cana-de-açúcar, pelo método de microaglutinação em lâmina escavada são apresentados a seguir.

4.3.2.1. Reação de extratos de vasos do cultivar CB41-76 (com sintomas de escaldadura nas folhas) e cultivar Co740 (inoculada com bactéria XRS) com os antissoros AEh, AXRS, AXc e AXa pelo método de microaglutinação em lâmina escavada

Os resultados dos testes descritos em 3.7.2.1. e 3.7.2.2. são apresentados resumidamente na Tabela 7.

Tabela 7. Reação de extratos de vasos de cana-de-açúcar do cultivar CB41-76 (com sintoma de escaldadura-das-folhas) e do cultivar Co740 (inoculado com a bactéria XRS) com diferentes antissoros e soro normal.

ANTÍGENOS	ANTISSOROS				
	AEh	AXRS	AXc	AXa	SN
Extrato de vaso CB41-76	-	-	-	+	-
Extrato de vaso Co740	-	-	-	-	-
<i>X. albilineans</i> (Xa)	-	-	-	+	-

+ = Reação positiva; - = Reação negativa; SN = Soro normal.

Como se pode ver, na Tabela 7, o extrato de vasos do cultivar CB41-76 reagiu somente com o antissoro AXa, o que demonstra a presença de *X. albilineans* neste extrato, enquanto que o extrato de Co740 não reagiu com nenhum dos antissoros testados.

Deve-se ressaltar que em ambos os testes, a avaliação foi realizada por 2 pessoas, separadamente, com resultados plenamente concordantes.

4.3.2.2. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de diversos cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de microaglutinação em lâmina escavada

Os resultados do teste descrito no item 3.7.2.3. são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Reação de extratos de vasos de 5 cultivares de cana-de-açúcar com o antissoro *X. albilineans* (AXa).

AMOSTRA ^a	CULTIVAR	TESTES				
		I ^b		II ^c		
		COLMO 1	COLMO 2	COLMO 3		
1	CB68-69	+	+	+	+	+
2	CB68-69	-	+	Não Testada		
3	CB68-69	-	-	-	-	-
4	Tuc519	-	+	+	-	-
5	Tuc519	-	-	+	+	-
6	IANE48-21	-	-	-	-	-
7	IANE48-21	+	+	+	-	-
8	IANE48-21	-	-	Não Testada		
9	CB41-76	+	+	+	+	+
10	CB50-41	-	-	Não Testada		

+ = Reação positiva; - = Reação negativa

^a = Características das amostras estão descritas na Tabela 2.

^b = Os resultados de dois avaliadores são apresentados em conjunto pois houve concordância de avaliação no Teste I.

^c = Avaliação realizada somente por uma pessoa.

Como se pode observar na Tabela 8, houve variação de reação entre colmos de uma mesma amostra em alguns casos. Amostras do cultivar Tuc519 apresentaram maiores variações, tanto em colmos da amostra nº 4 como nos colmos da amostra nº 5 enquanto que no cultivar IANE48-21, houve somente uma discrepância na amostra nº 7.

4.3.3. Detecção de *X. albilineans* em extratos de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta

4.3.3.1. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos do cultivar CB68-69, pelo método de aglutinação em micropipeta

Os resultados do teste descrito no item 3.7.3.1. são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Detecção de *X. albilineans* em extrato de vasos do cultivar CB68-69, pelo método de aglutinação em micropipetas.

CULTIVAR	SINTOMA ^a	SORO	REPETIÇÕES					
			I		II		III	
IANE48-21	sem	AXa	-	-	-	-	-	-
		SN	-	-	-	-	-	-
CB68-69	com	AXa	+	+	+	+	+	+
		SN	-	-	-	-	-	-
CB68-69	com	AXa	+	+	+	+	+	+
		SN	-	-	-	-	-	-
CB50-41	sem	AXa	-	-	-	-	-	-
		SN	-	-	-	-	-	-

^a = Sintoma de escaldadura-das-folhas

AXa = Antissoro do isolado Xa

SN = Soro normal

Como se pode observar na Tabela 9, somente os extratos de vasos de colmos com sintoma de escaldadura reagiram positivamente com o antissoro AXa e soro normal não reagiu com nenhum dos extratos testados, o que mostra a viabilidade do método para se detectar *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar.

4.3.3.2. Comparação da reatividade do antissoro de *X. albilineans* (AXa) com diluições da bactéria homóloga obtidas de cultura pura e com diluições de extrato de vasos de planta com escaldadura-das-folhas

Os resultados do teste descrito no item 3.7.3.2. são apresentados na Tabela 10.

Observou-se reações positivas somente até a diluição 1:2, com antígeno obtido de cultura pura, mostrando que o método de aglutinação em micropipeta é sensível para concentrações acima de $\approx 4 \times 10^8$ células/ml. Por outro lado, reações positivas foram observadas até a diluição 1:16 do extrato de vasos, mostrando que a quantidade de bactérias nesta diluição deveria ser de aproximadamente 4×10^8 células/ml.

Tabela 10. Reatividade do antissoro de *X. albilineans* (AXa) com diluições da bactéria homóloga, obtida de cultura pura e com diluições de extratos de vasos de planta com escaldadura-das-folhas.

ANTÍGENOS	DILUIÇÕES DA BACTÉRIA E DO EXTRATO	AVALIADORES					
		I		II			
		AXa	SN	AXa	SN		
Caldo + Bactéria	8x10 ⁸ células/ml	+	+	+	-	-	-
	1:2	-	-	+	-	-	-
	1:4	-	-	-	-	-	-
	1:8	-	-	-	-	-	-
	1:16	-	-	-	-	-	-
	1:32	-	-	-	-	-	-
Extrato de va- so de planta com escaldadu- ra-das-folhas	1:1	+	+	+	-	-	-
	1:2	+	+	+	-	-	-
	1:4	+	+	+	-	-	-
	1:8	+	+	+	-	-	-
	1:16	+	+	-	-	-	-
	1:32	+	+	+	-	-	-
Controle Sadio		-	-	-	-	-	-

+ = Reação positiva; - = Reação negativa; + = Reação duvidosa

• SN = Soro normal

4.3.3.3. Efeito da filtração de extratos de vasos nas reações serológicas para detecção de *X. albilineans*, pelo método de aglutinação em micropipeta

Neste teste não se observou efeito significativo da filtração nas reações serológicas, uma vez que o antissoro reagiu tanto com o extrato filtrado de colmo com sintoma, como com o não filtrado. Por outro lado, não se verificou nenhuma reação positiva com o extrato de colmo sem sintoma. O soro normal não reagiu com nenhum dos extratos. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Efeito da filtração de extrato de vasos nas reações serológicas para detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar.

CULTIVAR	SINTOMA	TRATAMENTO	ANTIS SORO AXa	SORO NORMAL
CB68-69	com ^a	Filtrado	+ ^b + +	- - -
		Não Filtrado	+ + +	- - -
CB68-69	sem	Filtrado	- - -	- - -
		Não Filtrado	- - -	- - -

^a = Com sintoma de escaldadura-das-folhas

^b = Resultado conjunto de 2 avaliadores

+ = Reação positiva

- = Reação negativa

4.3.3.4. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de diversos cultivares de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta

Os resultados dos dois testes descritos no item 3.7.3.4. são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipeta.

AMOSTRA ^a Nº	CULTIVAR	TESTES					
		I			II		
		COLMOS			COLMOS		
		1	2	3	1	2	3
1	CB68-69	+	+	+	+	+	+
2	CB68-69	-	-	-	-	-	-
4	Tuc519	-	+	+	-	<u>+</u>	+
5	Tuc519	+	-	+	-	+	+
6	IANE48-21	<u>+</u>	<u>+</u>	-	-	<u>+</u>	-
7	IANE48-21	-	-	-	+	+	+
9	CB41-76	+	+	+	+	+	+

^a = Os sintomas observados nas amostras testadas estão descritos na Tabela 2.

+

+ = Observações dos 2 avaliadores, discordantes.

Como se pode observar na Tabela 12, os resulta-

dos foram uniformes em algumas amostras como no caso dos cultivares CB41-76 e CB68-69 ambos com sintoma de escaldadura-das-folhas e para CB68-69 sem sintomas da doença. Nas outras amostras observou-se discrepâncias de resultados tanto no que diz respeito a diferenças entre colmos como diferenças entre um e outro avaliador.

Esta discrepância de resultados será abordada no capítulo de discussões.

4.3.3.5. Detecção de *X. albilineans* em extratos de vasos de 17 amostras de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micro pipeta

Na Tabela 13, são apresentados os resultados dos três testes realizados com amostras de cana-de-açúcar coletadas na Estação Central-Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP.

Nas amostras testadas, detectou-se a presença de *X. albilineans* em toletes das amostras nºs 7, 8, 9, 13 e 17. Na amostra nº 7 detectou-se a bactéria somente no primeiro teste, enquanto que nas amostras nºs 8, 13 e 17 ocorreram reações positivas em dois dos três testes e na amostra nº 9 a bactéria estava presente em todos os toletes testados.

Nestes testes ocorreram casos em que se observou reação positiva em somente uma repetição entre as 5 repetições de cada teste, como se pode observar na Tabela 12. Nestes casos considerou-se, na diagnose final, que o tolete em questão não era portador da bactéria.

Observou-se que em alguns casos, principalmente quando a ponta da micropipeta era um pouco mais grossa, que partículas do macerado era succionados em maior quantidade podendo causar certa confusão na avaliação dos resultados.

Tabela 13. Detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar, pelo método de aglutinação em micropipetas.

AMOSTRA ^a Nº	TESTES			TOTAL	DIAGNOSE FINAL
	I	II	III		
1	0/5 ^b	0/5	0/5	0/15	-
2	1/5	1/5	0/5	2/15	-
3	1/5	0/5	0/5	1/15	-
4	0/5	0/5	0/5	0/15	-
5	0/5	0/5	0/5	0/15	-
6	0/5	0/5	0/5	0/15	-
7	5/5	0/5	1/5	6/15	+
8	5/5	0/5	4/5	9/15	+
9	5/5	5/5	5/5	15/15	+
10	1/5	0/5	0/5	1/15	-
11	0/5	0/5	0/5	0/15	-
12	0/5	0/5	0/5	0/15	-
13	0/5	4/5	5/5	9/15	+
14	0/5	0/5	0/5	0/15	-
15	0/5	0/5	0/5	0/15	-
16	0/5	0/5	0/5	0/15	-
17	0/5	5/5	5/5	10/15	+

^a = As características das amostras estão descritas na Tabela 3.

^b = Numerador indica número de reações positivas e denominador o número de amostras examinadas.

+ = Diagnose positiva; - = Diagnose negativa.

4.3.3.6. Detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar com sintoma de estrias brancas nas folhas

Os resultados deste teste, apresentados na Tabela 14, mostraram que somente as amostras nºs 6 e 7 eram portadoras da *X. albilineans*. Deve-se ressaltar que os resultados dos 2 avaliadores não foram uniformes. Um dos avaliadores registrou resultados positivos em todas as 5 repetições, para as 2 amostras acima, enquanto que o outro avaliador registrou as reações como sendo duvidosas. Houve concordância quanto as amostras com reações negativas.

Para a amostra nº 2 o primeiro avaliador regis-

Tabela 14. Detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar com sintoma de estrias brancas nas folhas^a.

AMOSTRA Nº	AVALIADOR I					AVALIADOR II					DIAGNOSE FINAL
	REPETIÇÕES					REPETIÇÕES					
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	<u>+</u>	<u>+</u>	+	+	-	-	-	<u>+</u>	-	<u>+</u>
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	-	+
7	+	+	+	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	-	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a = Amostras fornecidas pelo Engº Agrº Dr. Álvaro Sanguino, do Centro Tecnológico da COPERSUCAR, Piracicaba-SP.

+ = Reação positiva; - = Reação negativa; + = Reação duvidosa.

trou duas repetições como sendo reações positivas e as demais como sendo reações negativas enquanto que o segundo avaliador registrou somente uma repetição como sendo de reação duvidosa e as demais negativas.

Extratos dos demais colmos deram resultados negativos.

O teste não foi repetido pelo fato das amostras serem constituídas de plantas jovens em que os colmos eram muito pequenos, não havendo material para um segundo teste.

Os resultados obtidos foram enviados ao Engº Agrº Dr. Álvaro Sanguino que confirmou os resultados dos testes, pois das amostras enviadas somente as de nº 6 e 7 eram

comprovadamente infetadas por escaldadura-das-folhas. As demais amostras com sintomas de estrias brancas nas folhas eram plantas afetadas pelo herbicida Roundup. Segundo o autor da coleta desses materiais, a amostra de nº 1 apresentava sintoma de infecção por *Fusarium* sp enquanto as de nºs 3, 4 e 5 foram injetadas com caldo bruto de colmos com sintomas de raquitismo-da-soqueira.

4.3.3.7. Detecção de *X. albilineans* em amostras coletadas no experimento de inoculação de diversas concentrações da bactéria no cultivar NA56-79

Os resultados obtidos no teste são apresentados nas Tabelas 15 e 16.

Como se pode observar na Tabela 15, todos os extratos das plantas do tratamento testemunha e as 3 plantas do tratamento 8×10^1 , que não mostraram sintomas da doença, apresentaram resultados serológicos negativos. Todos os extratos de amostras que apresentavam sintomas externos e internos da doença apresentaram resultados positivos no teste serológico, com exceção da amostra nº 1 do tratamento 8×10^3 , em que um dos avaliadores registrou 2 repetições como sendo de reação duvidosa enquanto o outro avaliador registrou todas as repetições como sendo negativas. Outros dois casos que suscitaram dúvidas foram as amostras nºs 32 e 13 dos tratamentos 8×10^4 e 8×10^5 , respectivamente, em que houve discrepâncias entre os dois avaliadores. Nas amostras com sintomas externos, porém sem manifestação de sintomas internos ou com sintomas internos de pouca intensidade, os resultados foram negativos. Na diagnose final, foram considerados como resultados positivos, de detecção da bactéria nos extratos, somente aqueles em que pelo menos uma das repetições foi registrada

Tabela 15. Detecção de *X. albiflamma* em amostras coletadas no experimento de inoculação de diversas concentrações da bactéria no cultivar NA56-79, pelo método de aglutinação em micropipetas.

TRATAMENTO	PLANTAS Nº	SINTOMA EXTERNO	SINTOMA INTERNO	AVALIADOR I REPETIÇÕES			AVALIADOR II REPETIÇÕES			DIAGNOSE FINAL
				I	II	III	I	II	III	
Testemunha	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^1	08	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	09	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^2	06	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	27	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	35	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^3	01	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	02	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	07	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+

continua

CONTINUAÇÃO

TRATAMENTO	PLANTAS Nº	SINTOMA EXTERNO	SINTOMA INTERNO	AVALIADOR I REPETIÇÕES			AVALIADOR II REPETIÇÕES			DIAGNÓSTICO FINAL
				I	II	III	I	II	III	
8×10^4	06	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	32	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	36	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	38	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8×10^5	02	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	08	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	13	+	+	+	+	-	+	-	-	+
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8×10^6	06	+	-	-	+	+	-	-	-	+
	16	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	24	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	33	+	+	+	+	-	+	+	-	+
8×10^7	13	+	+	+	+	-	+	+	-	+
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	38	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8×10^8	06	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	12	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = sintoma ou reação positiva; - = sintoma ou reação negativa; ± = sintoma ou reação duvidosa.

Tabela 16. Detecção de *X. albilineans* em amostras coletadas no experimento de inoculação de diversas concentrações da bactéria no cultivar NA56-79, pelo método de aglutinação em micropipetas (material com recuperação de sintomas nas folhas e escapes).

CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO	PLANTAS Nº	SINTOMA EXTERNO	SINTOMA INTERNO	AVALIADOR I REPETIÇÕES			AVALIADOR II REPETIÇÕES			DIAGNOSE FINAL
				I	II	III	I	II	III	
8×10^2	07	R	+	+	+	+	+	+	+	+
8×10^2	23	R	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^3	39	R	+	+	+	+	+	+	+	+
8×10^4	40	R	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^5	33	R	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^6	38	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8×10^7	06	R	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^7	09	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8×10^7	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^7	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^7	25	-	-	±	-	±	-	-	-	-
8×10^7	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^8	01	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8×10^8	08	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8×10^8	10	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8×10^8	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8×10^8	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = sintoma ou reação positiva; - = sintoma ou reação negativa; ± = reação duvidosa; R = plantas com recuperação de sintomas.

como sendo de reação positiva pelos dois avaliadores.

No grupo de plantas inoculadas, que não apresentaram sintomas de escaldadura nas folhas (Tabela 16), detectou-se a bactéria em todas as plantas com sintomas internos visíveis, com exceção da planta nº 1 do tratamento inoculado com 8×10^8 células/ml. Entre as 6 plantas que apresentaram o fenômeno de recuperação de sintomas, 3 (sem sintomas internos) apresentaram resultados serológicos negativos enquanto que 3 apresentaram resultados positivos, sendo que uma das plantas não apresentava sintoma interno.

Deve-se ressaltar ainda que, em diversas oportunidades os dois avaliadores manifestaram dúvidas quanto às suas avaliações, pois a intensidade de reação é proporcional à concentração de bactéria no extrato de vasos.

5. DISCUSSÃO

Os dois testes de inoculação realizados, confirmaram a ocorrência dos fenômenos de latência relatados por ARRUDA (1944), MARTIN e ROBINSON (1961) e EGAN (1971a) e o de recuperação de sintomas observados por BELL (1935) e KOIKE (1965). Constatou-se ainda que algumas plantas que apresentaram sintomas nas folhas, não apresentaram sintomas internos nos feixes vasculares, o que pode ser atribuído a um fator de resistência da planta. AKIBA (1978) observou que é possível proceder-se avaliações de nível de resistência à escaldadura-das-folhas através do número de feixes vasculares descoloridos. A recuperação de sintomas também é, provavelmente, um fenômeno de resistência da planta pois dos 13 casos observados no segundo experimento, em somente 4 casos as plantas apresentavam sintoma interno, sendo 3 desses casos observados no tratamento com o inóculo mais concentrado. A presença da bactéria nos vasos descoloridos foi detectada por métodos serolôgicos, enquanto que em plantas sem sintomas internos não foi possível detectar-se a presença do patógeno, com exceção de um caso.

Os resultados do teste de inoculação com diferentes concentrações de inóculo mostraram que a bactéria X.

albilineans é capaz de causar infecção em concentrações de até 8×10^1 células/ml. Esses resultados não concordam com os obtidos por RICAUD *et alii* (1977) que afirmaram que limiar de concentração de *X. albilineans* para obtenção de sintomas de escaldadura nas folhas está em torno de 10^8 a 10^{10} células/ml. Esta divergência de resultados se deve provavelmente a: a) diferenças de métodos de inoculação; b) diferença de cultivares utilizados; e c) diferença na patogenicidade dos isolados utilizados. Observou-se uma relação direta entre número de plantas com sintomas de estrias nas folhas e concentração de inóculo (Fig. 1). Esta relação não é tão nítida no que diz respeito ao número de plantas com sintomas internos no colmo. Enquanto, nas concentrações mais altas o número de plantas com os dois tipos de sintomas se equivalem, nas concentrações mais altas o número de plantas com os dois tipos de sintomas se equivalem, nas concentrações mais baixas o número de plantas com sintomas internos é maior (Tabela 4). AKIBA (1978), também observou fato semelhante, e com base nisto preconizou o método de avaliação de resistência varietal através de sintomas internos ao invés de sintomas externos, utilizando a concentração de inóculo de 8×10^5 células/ml. Por este método pode-se detectar os cultivares tolerantes que são portadores do patógeno internamente mas não mostram sintomas externos. Este método apresenta o inconveniente de que outros patógenos além de *X. albilineans* são capazes de produzir sintomas de descoloração vascular (RICAUD, 1974; NORSE, 1978 e SUDO, 1980). A serologia poderá constituir-se em um importante instrumento para eliminar este tipo de obstáculo, pois, com o uso de antissoro específico contra *X. albilineans* poder-se-á distinguir a descoloração de vasos causada por este patógeno, das descolorações causadas por outros agentes.

Os testes serológicos de dupla difusão em agar mostraram que o antissoro AEh, preparado contra *Erwinia herbicola* possuía um grande número de anticorpos, demonstrado pelo aparecimento de 6 linhas de reação (Fig. 2) com o antígeno ho

mólogo macerado. Estes anticorpos eram na grande maioria antígenos somáticos, pois no teste com exopolissacarídeos (Fig. 3) somente uma linha de reação foi observada. Quanto à reatividade desse antissoro com outras bactérias observou-se reações heterólogas, nos testes de dupla difusão em agar, com 6 isolados de patotipos de *X. campestris*, porém, em reações bastante fracas (Fig. 6), a se considerar pela intensidade das linhas de reação. Nos testes de microaglutinação em placas o antissoro AEh mostrou-se bastante específico reagindo somente com seu homólogo, o que vem reforçar a idéia de que os antígenos responsáveis pelas reações cruzadas na dupla difusão em gel-agar eram de pouca reatividade, pois não foram capazes de aglutinar células inteiras. Uma reação bastante atípica observada, ocorreu com o exopolissacarídeo do patotipo ve-792 que apresentou forte reação com o antissoro AEh, mas nos demais testes este patotipo não reagiu com este antissoro. Este fato ocorreu com todos os antissoros testados, não se encontrando uma explicação para o fato.

O antissoro AXRS apresentou 4 linhas de reação no teste de dupla difusão em agar com antígeno homólogo macerado (Fig. 2), não apresentando nenhuma reação com o exopolissacarídeo homólogo (Fig. 3), porém com células homólogas intactas (Fig. 4) apresentou 2 linhas de reação. Isto mostra que os antígenos responsáveis por estas duas reações são solúveis em salina e termolábeis. Nos testes de microaglutinação esse antissoro mostrou-se específico reagindo somente com seu homólogo constituído de células intactas, não reagindo com seu exopolissacarídeo homólogo, confirmando os testes de dupla difusão em gel-agar. Essa bactéria não possui cápsula, constituída de exopolissacarídeos porém, possui dois componentes antigênicos solúveis em salina e termolábeis.

O antissoro AXc apresentou 3 linhas de reação com seu homólogo macerado, observando-se ainda uma linha de reação com o heterólogo Eh macerado (Fig. 2), e somente uma linha com homólogos de células intactas (Fig. 3) ou extrato

de exopolissacarídeo (Fig. 4). No teste com células intactas observou-se novamente a ocorrência de reação heteróloga com o isolado Eh, o que não aconteceu no teste com o extrato de exopolissacarídeo. Isto mostra que este antígeno heterólogo é termolábil.

Como era de se esperar, o antissoro AXc apresentou o maior número de reações heterólogas, pois os antígenos testados, patotipos de *X. campestris* são mais relacionados com o isolado Xc (*X. campestris* patotipo *campestris*) do que os outros isolados utilizados para produção de antissoros. Algumas discrepâncias de resultados foram observadas entre os testes de dupla difusão em gel-agar e microaglutinação em placas como, por exemplo, a reação positiva dos exopolissacarídeos dos patotipos ri-779, ve-972 e cu-2173 no teste de dupla difusão (Fig. 5) e a ausência de reações de exopolissacarídeos desses patotipos no teste de microaglutinação. Diversos patotipos reagiram positivamente com o antissoro AXc, no teste de dupla difusão e/ou no teste de microaglutinação, quando os antígenos eram constituídos de células intactas. Entretanto, extratos de exopolissacarídeos desses patotipos não reagiram com o mesmo antissoro indicando que os antígenos responsáveis pelas reações com células intactas são provavelmente termolábeis. YANO (1980), que utilizou o método de hemaglutinação passiva com antígenos constituídos de exopolissacarídeos de patotipos de *X. campestris*, mostrou que o patotipo *campestris* constitui-se num serotipo isolado, isto é, só mostrou reações com isolados do mesmo patotipo. Os resultados obtidos nos testes com exopolissacarídeos, pelo método de microaglutinação em placas confirmaram esta observação. Por outro lado, os testes com extratos de exopolissacarídeos não confirmaram as observações realizadas, por ELROD e BRAUN (1947a), de que a camada mucoide é comum a diversos membros do gênero *Xanthomonas*, sendo responsável por diversas reações cruzadas. Nos resultados obtidos no presente trabalho, o extrato de exopolissacarídeo do isolado Xc não apresentou reação cruzada no

teste de microaglutinação em placas.

O antissoro AXa apresentou 3 linhas visíveis de reação no teste de dupla difusão em gel-agar, quando se utilizou células maceradas de seu homólogo (Fig. 2) e apenas uma linha de reação quando os antígenos foram extrato de exopolissacarídeos (Fig. 3) e células intactas (Fig. 4). No entanto, observa-se que, possivelmente, o extrato de exopolissacarídeo desta bactéria é constituído de dois componentes antigênicos. A Fig. 5 ilustra o aparecimento de 2 linhas de reação, enquanto na Fig. 3 se observa uma linha forte, onde as duas linhas podem estar superpostas. Nas Figuras 2 e 6 duas linhas mais próximas ao poço, onde se colocou o antígeno homólogo macerado, são formadas por antígenos somáticos, pois estas linhas não aparecem nas reações com células intactas ou extrato de exopolissacarídeo do isolado Xa.

O antissoro AXa reagiu com alguns antígenos heterólogos do patotipo de *X. campestris*, tanto nos testes de dupla difusão em gel-agar, como nos testes de microaglutinação em placa. O isolado he-2170 reagiu com esse antissoro em todos os testes enquanto o ma-2216 não reagiu no teste de dupla difusão com antígenos constituídos de células intactas. O antissoro AXa não reagiu com qualquer dos isolados de outro gênero de bactéria, atendo-se somente a reações cruzadas com membros do gênero *Xanthomonas*.

RICAUD *et alii* (1977) observaram que antissoros preparados contra *X. albilineans* apresentaram uma fraca reação, não específica, com um isolado de *X. campestris* patotipo *nigromaculans*, mas não reagiram com outros 4 isolados de bactérias fitopatogênicas. OLIVEIRA *et alii* (1977) observaram em teste de microaglutinação que antissoro de *X. albilineans* reagiu com *Pseudomonas rubrilineans* somente após 18 horas de reação, concluindo que as duas bactérias são pouco relacionadas serologicamente. Outras bactérias testadas apresentaram resultados negativos.

A ocorrência dessas reações cruzadas não elimi-

na a possibilidade de se detectar *X. albilineans*, sem interferências indesejáveis, em colmos de cana-de-açúcar, uma vez que as chances de se encontrar essas bactérias associadas à cana-de-açúcar é mínima, pois esses patótipos são bastante específicos a determinados hospedeiros, com exceção de *P. rubrilineans*. O fato de OLIVEIRA *et alii* (1977) terem observado que esta bactéria reage fracamente com antissoro de *X. albilineans* (somente 18 horas após o início da reação) e o fato de que esta bactéria é encontrada mais comumente nas folhas e na região apical da cana-de-açúcar (MARTIN e WISMER, 1961), mostram que mesmo este patógeno não deverá interferir na detecção de *X. albilineans* em colmos. SCHAAD (1978) estudando um método de detecção de *X. campestris* patotipo *campestris*, em sementes de repolho, observou que o antissoro produzido contra ribossomas 70-S dessa bactéria, apresentava reação cruzada com alguns isolados de *X. campestris* patotipo *vesicatoria*. O autor mostrou, no entanto, que os testes serológicos aplicados em bactérias isoladas de sementes de repolho foram específicos para o patotipo *campestris* e explicou essa especificidade baseado no fato de que a possibilidade de se isolar o patotipo *vesicatoria* de sementes de repolho é extremamente baixa devido à especificidade desse patotipo a seu hospedeiro.

Com relação à titulação dos antissoros, não houve preocupação em se verificar a diluição máxima em que ainda se verifica reação, para todos os antissoros. Isto foi feito somente para o antissoro AXa que apresentou reação até a diluição de 1:1024 em um teste de microaglutinação em placas. OLIVEIRA *et alii* (1977) obtiveram um antissoro contra *X. albilineans* que reagiu somente até a diluição 1:256 enquanto que RICAUD *et alii* (1977) observaram reação até a diluição de 1:2560 em testes de aglutinação em tubos e somente 1:20 em testes de microaglutinação. Esta baixa sensibilidade dos testes de microaglutinação observada por RICAUD *et alii* (1977) não foi observada no presente trabalho e no trabalho de OLIVEIRA *et alii* (1977). O título mais baixo (1:256) obtido por

esses autores, em relação ao título obtido com o antissoro AXa é provavelmente devido a diferença de esquemas de preparação dos antissoros e não à pouca sensibilidade do método de microaglutinação. Enquanto neste trabalho adotou-se o esquema de 2 injeções semanais (total de 6 injeções) na região do linfonóduo do coelho e obtenção do soro 1 semana após a última injeção, OLIVEIRA *et alii* (1977) utilizaram o esquema de somente uma injeção e obtenção do antissoro após 2 semanas. LÉO VILLE e COLÉNO (1976) produziram antissoro contra *X. albilineans* utilizando um esquema em que aplicaram um total de 11 injeções intravenosas e uma subcutânea num período de 6 semanas, obtendo o antissoro 10 dias após a última injeção. Os autores não apresentam, no entanto, o título obtido no antissoro produzido. O motivo de RICAUD *et alii* (1977) terem conseguido reação positiva somente até a diluição 1:20 no teste de microaglutinação deve-se, provavelmente, ao fato de que esses autores realizaram a avaliação dos resultados 3-5 minutos após o início da reação, enquanto que neste trabalho (Tabela 5) observou-se que são necessários 45 minutos para se ter uma boa confiabilidade nos resultados. GUTHRIE *et alii* (1965), com *Pseudomonas phaseolicola* e OLIVEIRA *et alii* (1977) com *X. albilineans*, obtiveram resultados semelhantes ao do presente trabalho.

No teste de diluições de antígenos e antissoros observou-se que, enquanto os antissoros podem ser bastante diluídos, todos os antissoros reagiram positivamente até a diluição 1:64, os antígenos, se diluídos, perdem a reatividade serológica. O limiar de reatividade dos antígenos com os respectivos antissoros é em torno de 10^8 células/ml, para os isolados testados. RICAUD *et alii* (1977) afirmaram que nos testes de aglutinação por eles realizados, concentrações de *X. albilineans* abaixo de 10^{17} células/ml deixaram de reagir com o antissoro. OLIVEIRA *et alii* (1977) por outro lado, afirmaram que a diluição máxima em que ainda se observou aglutinação foi em suspensão com 75% de transmitância utilizando fil-

tro de 578 nm, sendo a concentração ideal uma suspensão com 50% T. Os autores não apresentaram essas concentrações em número de células/ml. Segundo AKIBA (1978), uma suspensão de *X. albilineans* que apresente 60% de transmitância, utilizando filtro de 625 nm, contém 8×10^8 células/ml. Portanto, as concentrações utilizadas por OLIVEIRA *et alii* (1977) variaram, provavelmente, entre 10^7 a 10^9 células/ml. Essa discrepância de resultados pode ser também atribuída ao fato de que RICAUD *et alii* (1977) avaliaram os resultados dos testes precocemente (3-5 minutos após o início da reação).

Na diagnose de doenças bacterianas através de métodos serológicos, duas estratégias têm sido utilizadas. A primeira é aquela que inicialmente isola o patógeno em meio de cultura para depois detectar a presença do patógeno entre os microorganismos isolados, utilizando para tanto um antissoro específico contra a bactéria em estudo (GUTHRIE *et alii*, 1965; HALE, 1971 e SCHAAD, 1979). A segunda é aquela que procura detectar a presença da bactéria diretamente em extratos de tecidos da planta (MORTON, 1964a; MORTON, 1964b; MORTON, 1964c; MORTON, 1965; JENKINS *et alii*, 1966; LÉOVILLE e COLÉNO, 1976; RICAUD *et alii*, 1977 e GILLASPIE, 1978) com a utilização de antissoro específico à bactéria a ser detectada.

No presente trabalho procurou-se desenvolver um método de detecção de *X. albilineans* através da segunda estratégia apresentada. O crescimento lento desta bactéria em meio de cultura (PERSLEY, 1973; DEAN, 1974 e AKIBA, 1978) faz com que seu isolamento seja bastante difícil, permitindo a contaminação do meio de cultura por outras bactérias de crescimento mais rápido, principalmente quando se tenta isolar este organismo de colmos, onde a população de bactérias como *Erwinia herbicola*, ocorrem em níveis populacionais elevados na região vascular (VALDEBENITO SANHUEZA, 1979; e SUDO, 1980). Este fato, portanto, contribuiria bastante para dificultar a aplicação de testes de aglutinação, pois OLIVEIRA *et alii* (1977) observaram que antissoro contra *X. albilineans* leva pelo menos

5 horas para reagir com a bactéria quando esta se encontra em suspensão com outras bactérias enquanto que, em suspensão pura, a reação se dá em 45 minutos.

Dos métodos testados para extração da bactéria, diretamente do colmo da cana-de-açúcar, apenas o processo de extrato de vasos apresentou resultados positivos. A metodologia aplicada para a obtenção de extratos de xilema não apresentou resultados positivos, provavelmente porque no método de fluxo de água através dos vasos, utilizada por VALARINI (1978), a água passa pelos vasos funcionais não passando pelos vasos obstruídos pela doença, o que faz com que o arrastamento de *X. albilineans* pelo fluxo de água seja mínimo, a tal ponto que, mesmo a tentativa de se concentrar a bactéria através de uma centrifugação resultou em insucesso. A tentativa de se elevar a população da bactéria através da incubação do extrato também resultou em resultados negativos provavelmente devido ao crescimento de bactérias contaminantes e à baixa taxa de crescimento de *X. albilineans*. Os extratos de nós também apresentaram resultados serológicos negativos devido à formação de precipitados finos, tanto nas reações com o antissoro Xa como com o soro normal e salina. O método empregado para obtenção de extratos de nós provocou o rompimento das células do parenquima resultando em uma suspensão com alta concentração de partículas celulares, responsáveis pela precipitação inespecífica. RICAUD *et alii* (1977) testaram os métodos de homogeneização de tecidos, extração de caldo por pressão e exsudação da bactéria de tecidos cortados do colmo para a água e optaram pelo último método, devido à interferência de partículas celulares, presentes nos extratos obtidos nos processos anteriores, nos testes de microaglutinação.

A tentativa de se filtrar o extrato de nós em filtro Millipore com poros de 3.000 nm baseou-se no fato de que a bactéria possui, segundo AKIBA (1978), dimensões reduzidas (600-1.000 nm de comprimento e 250-300 nm de largura). Desta forma conseguiu-se eliminar as partículas celulares, mas

a concentração de bactéria no filtrado não foi suficiente para apresentar reação serológica visível. Na Tabela 11, verifica-se que a filtragem de extrato de vasos de colmos com sintomas de escaldadura não afetou significativamente o resultado serológico. O extrato filtrado de nós apresentou resultados negativos, provavelmente devido ao fato de que a alta concentração de partículas celulares provocaram a rápida diminuição dos poros do filtro, permitindo a passagem da água, mas não da bactéria. Por outro lado, os extratos de vasos, por possuírem quantidades de partículas celulares bem menores, não afetaram a passagem da bactéria pelos poros.

Os extratos de vasos apresentaram resultados serológicos positivos, tanto nos testes de microaglutinação em placas como nos de aglutinação em micropipetas.

O método de preparação de extratos de vasos mostrou-se bastante eficiente, pois concentrações de bactérias obtidas em meio de cultura, abaixo de 2×10^8 e 4×10^8 deixaram de reagir com o antissoro AXa (item 4.2.6. e e Tabela 10, respectivamente), enquanto que com o extrato de vasos, obtido de planta com sintoma de escaldadura-das-folhas, observou-se reações positivas até a diluição de 1:16 (Tabela 10).

Os resultados dos diversos testes com extratos de vasos mostram que, quando estes são obtidos de plantas com sintomas de escaldadura-das-folhas, a reação é nítida, não causando nenhuma dúvida nos avaliadores. O extrato de vasos reagiu somente com o antissoro AXa (Tabela 7), mostrando que a reação é específica. Por outro lado, extratos de vasos de colmos sem sintomas de escaldadura-das-folhas apresentaram resultados negativos na maioria dos testes. Os casos em que houve discrepâncias entre sintomas observados e resultados de testes serológicos serão discutidos a seguir.

Comparando-se os resultados das Tabelas 8 e 12, observa-se que na amostra nº 2 o colmo 2 apresentou resultado positivo no teste em lâmina escavada e resultados negativos nos testes com micropipetas. Na amostra nº 5 o colmo 3 apre-

sentou resultados positivos em todos os testes, enquanto os colmos 1 e 2 apresentaram resultados negativos no teste em lâmina escavada e resultados discrepantes nos testes com micropipetas. Resultados semelhantes foram observados nas amostras nºs 4 e 7.

Nas amostras nºs 2 e 5 (colmos sem sintomas, de touceiras afetadas) e nº 4 (colmos com sintomas), provavelmente a população de bactérias nos vasos era baixa, sendo que poucos vasos estavam afetados. Como os testes foram feitos sem repetições para cada colmo, os resultados negativos podem ser atribuídos, ao acaso, isto é, as chances de se obter extrato de vasos com concentração bacteriana suficiente para uma reação positiva, foram diminuídas. Na amostra nº 7, a frequência de resultados positivos indicam que os colmos estavam com infecção latente de escaldadura-das-folhas, embora a anotação de sintomas na amostra, realizada pelo Engº Agrº Dr. Sizu Matsuo, os colmos mostravam apenas sintomas de infecção por *Fusarium* sp.

A diagnose de escaldadura-das-folhas, realizada por meio de teste de aglutinação em micropipeta, em 17 amostras de colmos de cana-de-açúcar pode ser considerada bastante satisfatória. Comparando-se os resultados apresentados na Tabela 13 e as anotações de sintomas constantes na Tabela 3, observa-se que houve coincidência quanto aos resultados negativos esperados, com exceção da amostra nº 17, que apresentou resultados serológicos positivos em 2 dos 3 testes realizados, enquanto na anotação de sintomas visuais, por ocasião da coleta das amostras, haviam sido observados apenas sintomas causados por *Fusarium* sp. Devido à alta frequência de resultados positivos (10 repetições positivas em 15 realizadas) pode-se considerar que esta amostra era portadora de *X. albilineans*, sem sintomas de escaldadura-das-folhas. Provavelmente, os sintomas internos causados pela bactéria foram confundidos com aqueles causados pelo fungo.

Quanto aos resultados positivos esperados, hou-

ve coincidência total no que diz respeito às amostras de nºs 8, 9 e 13 pois elas mostravam, por ocasião da coleta, sintomas externos da doença. A amostra nº 10 deveria apresentar resultados positivos nos testes serológicos, pois apresentavam sintomas internos de escaldadura-das-folhas, por ocasião da coleta. Contudo, os resultados dos testes realizados foram negativos e as anotações, realizadas por ocasião da preparação dos extratos de vasos, indicam ausência de sintomas nos nós. Não se tem para o caso, uma explicação para esta falha nos testes serológicos, pois segundo o autor da coleta do material, a amostra foi retirada de uma touceira afetada, com sintoma agudo da doença (comunicação pessoal). Com relação às amostras de nºs 7 e 11 (colmos sem sintoma, coletados de touceiras afetadas) os resultados podem ser considerados normais. Neste caso, a amostra nº 7 apesar de não mostrar sintoma na folha, estava afetada e a concentração da bactéria em nível suficiente para ser detectada nos testes serológicos, enquanto a amostra nº 11 não estava infetada, ou então, a concentração da bactéria nos vasos ainda era muito baixa para ser detectada nos testes.

As discrepâncias de resultados de um teste para outro, observadas nas amostras nºs 7, 8, 13 e 17, devem-se ao método de preparação das repetições de cada teste. Nestes testes foi preparada, de cada amostra, uma quantidade de extrato de vasos suficiente para 5 repetições, razão porque os resultados das repetições de cada teste são bastante uniformes, tanto negativos (0/5) ou positivos (5/5 ou 4/5). Isto indica que o preparo do extrato é crítico para o sucesso do teste, pois se o extrato é retirado de somente um local do colmo, como nestes testes, há possibilidade de se escolher um local onde a bactéria não está presente em concentração suficiente para resultar em aglutinação visível. Portanto, para maior segurança no teste deve-se aumentar o número de extratos preparados de cada amostra, diminuindo-se o número de repetições de cada extrato preparado.

A avaliação dos resultados, realizada por 2 pessoas independentemente, aumenta a segurança do teste, pois erros ou dúvidas de um avaliador podem ser sanadas pelo outro avaliador, chegando-se a um consenso quanto ao diagnóstico final. Este fato está bem claro no teste apresentado na Tabela 14. Um dos avaliadores anotou as reações das amostras nºs 6 e 7 como sendo duvidosas, enquanto o outro avaliador anotou todas as reações como sendo positivas, chegando-se ao consenso de que estas duas amostras estavam afetadas pela escaldadura-das-folhas. Esta diagnose foi confirmada pelo autor da coleta das amostras, Engº Agrº Dr. Álvaro Sanguino. No caso da amostra nº 2, devido às discrepâncias, a diagnose final foi que havia dúvidas quanto à presença ou ausência de *X. albilineans* na amostra. Segundo o autor da coleta dessas amostras, a planta nº 2 estava afetada pelo herbicida Roundup, mas no entanto não poderia afirmar com segurança que esta planta não estivesse também afetada pela escaldadura-das-folhas, pois o material foi coletado em condições de campo. Infelizmente não foi possível repetir o teste devido à exiguidade do material enviado.

Nos testes realizados com material coletado do experimento de inoculação com diversas concentrações da bactéria, o teste de aglutinação em micropipetas mostrou-se bastante sensível para amostras com sintomas internos (Tabelas 15 e 16). Das 37 plantas com sintoma de escaldadura-das-folhas na 3ª avaliação, 27 mostraram sintomas internos nos vasos e resultados serológicos positivos. Outras 3 plantas que apresentavam sintomas internos visíveis, não apresentaram resultados positivos, sendo que uma delas apresentou resultado totalmente negativo e 2 com diagnose duvidosa, devido a discrepâncias entre avaliadores (Tabela 15).

Das 17 plantas que não mostravam sintomas foliares, por ocasião da 3ª avaliação (Tabela 16), 7 plantas apresentavam sintomas internos visíveis, e destas, somente uma não apresentou resultado serológico positivo e 6 plantas com

recuperação de sintomas foliares, apenas 2 apresentavam sintomas internos, sendo a bactéria detectada serologicamente nos extratos de seus vasos. Como se pode observar por esses resultados, é muito importante que, na preparação dos extratos se procure os vasos que estão descoloridos, pois assim as chances de se detectar a bactéria é muito maior. Portanto, para se preparar o extrato deve-se procurar sempre os vasos descoloridos na região do nó do colmo, mesmo que esta descoloração seja aparentemente causada por outro patógeno, pois os sintomas internos de escaldadura podem ser confundidos com aqueles causados por outros patógenos. Somente um caso, em que se anotou ausência de sintoma interno, resultou em teste serológico positivo e, assim mesmo, em apenas uma das 3 repetições. Neste caso o sintoma de descoloração de vaso pode ter passado despercebido por ocasião da preparação do extrato.

Os resultados obtidos demonstram que o teste de aglutinação em micropipeta, aliado ao método de preparação do extrato de vasos, é bastante sensível, podendo-se detectar a presença de bactéria em plantas sem sintomas externos aparentes.

RICAUD *et alii* (1977) utilizaram o método de microaglutinação em placas escavadas para detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar. Os autores conseguiram resultados positivos somente em plantas com sintomas externos visíveis, não conseguindo detectar a bactéria em colmos com infecção latente. Esses autores prepararam o extrato para os testes serológicos, cortando finas camadas de tecido no sentido transversal ao colmo, incluindo a região dos entre-nós e dos nós. Este material cortado foi colocado em água destilada, por 2 horas, na proporção 1:1, para que as bactérias exsudassem do tecido para a água. Após este período, procedeu-se a uma filtração em gaze para eliminação do tecido e em seguida o filtrado foi centrifugado a 2.000 g por 1 minuto para eliminação de partículas celulares. A seguir o sobrenadante foi novamente centrifugado, 20.000 g por 20 minutos, sendo o sedi-

mento ressuspensão em 1-2 ml de salina tamponada. Essa suspensão foi utilizada no teste de microaglutinação.

A maior sensibilidade observada nos testes do presente trabalho se deve, provavelmente, ao fato de que os extratos foram preparados principalmente com tecidos vasculares (sempre que possível, de vasos descoloridos), onde a concentração da bactéria é maior e, além disso, esses tecidos eram macerados ao invés de se deixar que as bactérias simplesmente exsudassem para a água. Com isso, conseguiu-se maior extração de bactérias dos tecidos. O problema da interferência de partículas de tecidos nos testes, foi contornado fazendo-se micropipetas com pontas bem finas, impedindo assim a passagem de partículas maiores que pudessem interferir na avaliação dos resultados. A ponta da micropipeta serviu portanto como um filtro. Outro fator que deve ter contribuído para contornar o problema foi a colocação das micropipetas na posição vertical, espetadas em uma camada de cera, o que servia também para obstruir a ponta. Com isso, partículas de tecido que eventualmente passassem pela ponta da micropipeta, precipitavam rapidamente, depositando-se na parte inferior. Os flocos de aglutinação, no entanto, permaneciam suspensos na camada do antissoro facilitando a avaliação. Em algumas oportunidades, durante o manuseio da micropipeta, as partículas de tecidos eram ressuspensas no líquido, provocando interferência na avaliação de resultados. Nos casos em que a concentração de bactérias era bastante alta, a reação de aglutinação se processava na região de separação das camadas antígeno-antissoro, formando um floco único a separar as duas camadas. O método de aglutinação em lâmina escavada, apesar de mostrar boa sensibilidade de reação, apresenta um inconveniente. As partículas de tecidos depositam-se no fundo, frequentemente dificultando a avaliação dos resultados.

A utilização do teste de aglutinação em micropipetas solucionou um dos grandes problemas do teste de aglutinação em tubos. Enquanto este requer de 2 a 4 ml de extrato

de plantas e antissoro, a micropipeta reduziu este volume para 0,02 a 0,05 ml tornando viável a sua aplicação em larga escala.

O teste de aglutinação em micropipeta foi aplicado em condições práticas de levantamento, do nível de infecção de escaudadura-das-folhas, na Estação Experimental Central-Nordeste, em Rio Largo-AL, em 1977. O levantamento foi realizado em campos de multiplicação de 13 clones RB, desenvolvidos pela instituição. Dos 13 clones, 2 que apresentavam sintomas externos no campo sendo este diagnóstico plenamente confirmado nos testes serológicos. O laudo final indicou que três clones, RB7096, RB70141 e RB70194 estavam contaminados, apresentando de 10 a 20% de colmos com infecção latente, sendo que o clone RB7096 apresentava descoloração vascular evidente na base do colmo, em maior intensidade do que nas demais. No ano seguinte este clone mostrou sintomas externos de escaudadura-das-folhas e foi eliminado. O clone RB70141, em condições extremamente favoráveis à doença, ocasionalmente exibe sintomas externos de escaudadura-das-folhas.

O comportamento destes 2 clones até o presente, indicam que eles são realmente tolerantes à esta doença apresentando infecção latente e confirmando as conclusões obtidas em 1977.

LÉOVILLE e COLÉNO (1976) utilizaram o método de imunofluorescência indireta para detectar *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar. Com tal método os autores conseguiram detectar a bactéria em colmos sem sintomas externos. Esse método é, aparentemente, mais sensível do que o desenvolvido no presente trabalho, mas apresenta a desvantagem de requerer um equipamento bastante sofisticado (microscópio de imunofluorescência) para as condições dos institutos de pesquisa do país, exigindo ainda uma técnica bastante elaborada. O método desenvolvido no presente trabalho, por outro lado, é bastante simples e requer apenas um microscópio estereoscópico (uma pessoa treinada pode efetuar a avaliação do teste até com uma

lupa manual com aumento de 20-25X), equipamento esse comumente encontrado nos institutos de pesquisa.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem formular as seguintes conclusões:

- a) a concentração de *Xanthomonas albilineans* de aproximadamente, 8×10 células/ml é suficiente para induzir sintomas de escaldadura-das-folhas no cultivar NA56-79;
- b) o número de plantas com sintomas de escaldadura-das-folhas, no cultivar NA56-79, é diretamente proporcional ao logaritmo da concentração de *X. albilineans* inoculada;
- c) o método de preparação de extrato de vasos, desenvolvido no presente trabalho, apresenta boa eficiência na extração de *X. albilineans*, diretamente do colmo de cana-de-açúcar;
- d) os métodos de preparação de extrato de xilema e extrato de nós, estudados no presente trabalho, apresentaram resultados negativos na detecção de *X. albilineans* em colmos de cana-de-açúcar;
- e) o método de aglutinação em micropipeta, desenvolvido no presente trabalho, apresenta boa sensibilidade nas reações serológicas com extratos de vasos de colmos afetados pela escaldadura-das-folhas;
- f) o método de aglutinação em micropipeta, aliado ao método de preparação de extratos de vasos, permite a detecção de

infecção latente em colmos de cana-de-açúcar, afetados pela bactéria *X. albilineans*, principalmente quando ocorre a presença de vasos descoloridos. Para maior segurança nos resultados dos testes de aglutinação em micropipeta, deve-se preparar diferentes extratos de vasos de um mesmo colmo a ser testado. Desta forma aumentam-se as chances de se obter extratos com concentração bacteriana suficiente para que ocorra reação de aglutinação visível. Sempre que possível, a avaliação de resultados deve ser realizada por 2 pessoas independentemente, de tal forma que, erros ou dúvidas de um dos avaliadores possam ser sanados pelo outro, chegando-se a um consenso quanto à diagnose final;

- g) o antissoro de *Erwinia herbicola* (AEh) reage especificamente com antígenos homólogos, em testes de microaglutinação em placas. Células intactas dos patotipos de *X. campestris*; *vesicatoria* (ve-76), *ricini* (ri-779), *manihotis* (mh-975), *vitians* (vi-2008) e *mangiferaeindicae* (mi-2097), reagem fracamente com o AEh, em teste de dupla difusão em gel-agar. Por outro lado, extratos de exopolissacarídeos dessas bactérias não reagem com esse mesmo antissoro, mostrando que provavelmente, os componentes antigênicos responsáveis por essas reações são termolábeis;
- h) o antissoro da bactéria XRS (AXRS) reage especificamente com antígenos homólogos, em testes de microaglutinação em placas. Em testes de dupla difusão em gel-agar e em teste de microaglutinação, o extrato de exopolissacarídeo dessa bactéria não reage com seu antissoro homólogo. Essa bactéria não possui exopolissacarídeos, porém possui dois componentes antigênicos termolábeis;
- i) o antissoro de *Xanthomonas campestris* patotipo *campestris* (AXc) reage com células intactas dos patotipos *vesicatoria* (ve-76), *dieffenbachiae* (di-140), *esculentum* (es-568), *manihotis* (mh-975), *vitians* (vi-2008), *glycines* (gl-2076), *mangiferaeindicae* (mi-2097) e *phaseoli* (ph-2099), nos testes de dupla difusão em gel-agar e/ou testes de microaglu-

tinação em placas, mas não reagem com exopolissacarídeos dessas bactérias. Os antígenos responsáveis por essas reações são, provavelmente, termolábeis;

- j) a bactéria *X. albilineans* possui dois componentes antigênicos somáticos e provavelmente dois componentes de natureza exopolissacarídica. O antissoro de *X. albilineans* reage com antígenos heterólogos (patótipos de *X. campestris*), mas não reage com nenhuma das bactérias testadas, pertencentes a outro gênero.

7. LITERATURA CITADA

- AKIBA, F., 1978. Isolamento, inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas albilineans* e avaliação de resistência à escaldadura-das-folhas em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 97p. (Dissertação de Mestrado).
- ANTOINE, R. e C. RICAUD, 1961. Cane diseases; a method for inoculating leaf scald in field trials. Ann. Rep. Mauritius Sugar Ind. Res. Inst., Port Louis. p. 55-56.
- ARRUDA, S.C., 1944. A escaldadura-das-folhas, doença da cana-de-açúcar, nova no Brasil. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 15:141-199.
- BELL, A.F., 1935. Disease resistance trials in Queensland. *In*: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 5, Brisbane. Proceedings. p. 72-80.
- BELL, A.F. e W. CONTRELL-DORMER, 1932. An improved method for isolation of leaf scald organism. *In*: Congress of International Society of Sugar Cane Technologists, 4. Proceedings. p. 72-80.

- BERGQUIST, K.R. e R.P. ELROD, 1948. The somatic antigens of the genus *Agrobacterium*. Proc.S.D. Acad.Sci., 27:104.
- CAMPBELL, D.H.; J.S. GARVEY; N.E. CREMER e D.H. SUSSDORF, 1970. Methods in immunology. 2. ed. New York, W.A. Benjamin. 454p.
- CARVALHO, P.C.T., 1963. Doenças do colmo da cana-de-açúcar. Doenças das folhas de cana-de-açúcar. Curso de Especialização - Pós-graduação. Depto. Fitopatologia, ESALQ, Piracicaba-SP., p. 23-58.
- COLÉNO, A., 1968. Utilization de la technique d'immunofluorescence pour le depistage de *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh) Dowson dans les lots de semences contaminées. Acad. D'Agric. De France Comptes Rendus des Seances, Paris, 54:1016-1020.
- DAL PICCOLO, C.R.; S. MATSUOKA e Y. MASUDA, 1980. Translocação do herbicida "Roundup" pelo tolete de cana-de-açúcar e sintomas colaterais causados. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 95:200-207.
- DANTAS, B., 1958. A escaldadura-das-folhas de cana-de-açúcar. (Publicação nº 7), Comissão de Combate às Pragas de Cana-de-Açúcar no Estado de Pernambuco. Recife, 9p.
- DEAN, J.L., 1974. A method for isolating *Xanthomonas albilineans* from sugarcane leaves. Plant Dis. Reprtr. Washington, 58:439-441.
- DOWSON, W.J., 1943. On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. Trans Brit. Mycol. Soc., 26:4-14.

- DYE, D.W., 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. N.Z.J. Sci., Wellington, 5:393-416.
- DYE, D.W., 1966. A comparative study of some atypical *Xanthomonas*. N.Z.J. Sci., Wellington, 9:843-854.
- EGAN, B.T., 1968. Evaluation of the aluminum-cap method for leaf scald disease resistance testing in Queensland. Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, Taiwan. Proceedings. p. 1153-1158.
- EGAN, B.T., 1971a. Leaf scald disease - introduction. *In*: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 14, New Orleans. Proceedings. p. 906-931.
- EGAN, B.T., 1971b. The decline of leaf scald as a major disease in Northern Queensland. *In*: Conference of the Queensland Society of Sugarcane Technologists, 38. Proceedings. p. 157-161.
- ELROD, R.P. e A.C. BRAUN, 1947a. Serological studies of the genus *Xanthomonas*. I. Cross-agglutination relationship. J. Bacteriol., Washington, 53:509-518.
- ELROD, R.P. e A.C. BRAUN, 1947b. Serological studies of the genus *Xanthomonas*. II. *Xanthomonas translucens* group. J. Bacteriol., Washington, 53:519-524.
- FANG, C.T.; O.N. ALLEN; A. RIKER e J.G. DIKSON, 1950. The pathogenic, physiological and serological reactions of the four species of *Xanthomonas translucens*. Phytopathology, St. Paul, 40:44-64.

FIGUEIREDO, M.B., 1972. Estudos fisiológicos e sorológicos sobre o fungo *Aschochyta phaseolorum* Sac. e sobre a doença por ele causada em berinjela (*Solanum melongena*) e em outras plantas cultivadas. Piracicaba, ESALQ/USP, 130p. (Tese de Doutorado).

FRENCH, W.J.; D.L. STASSI e N.W. SCHAAD, 1978. The use of immunofluorescence for the identification of phony peach bacterium. Phytopathology, St. Paul, 68:1106-1108.

GALLI, F.; H. TOKESHI; P.C.T. CARVALHO; E. BALMER; H. KIMATI; C.O.N. CARDOSO e C.L. SALGADO, 1968. Manual de Fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 640p.

GILLASPIE JR., A.G., 1978. Ratoon stunting disease of sugarcane: serology. Phytopathology, St. Paul, 68:529-532.

GRAHAM, D.C., 1963. Serological diagnosis of potato blackleg and tuber soft rot. Plant Pathol., London, 12:142-144.

GRAHAM, D.C., 1964. Taxonomy of the soft rot coliform bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. Palo Alto, 2:13-42.

GUTHRIE, J.W.; D.M. HUBER e H.S. FENWICK, 1965. Serological detection of halo blight. Plant Dis. Reprtr., Washington, 49:297-299.

HALE, C.N., 1972. Rapid identification methods for *Corynebacterium insidiosum* (McCulloch, 1925) Jensen, 1934. N.Z.J. Agric. Res., Wellington, 15:149-154.

JENKINS JR., S.F.; D.J. MORTON e P.D. DUKES, 1966. Distinguishing *Pseudomonas solanacearum* infections from other peanut wilt diseases by the use of serological techniques.

Plant Dis. Repr., Washington, 50:836-838.

KIMATI, H., 1975. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. (Sensu ARX, 1957). Piracicaba, ESALQ/USP, 103p. (Tese de Livre Docência).

KOIKE, H., 1965. The aluminum-cap method for testing sugar cane varieties against leaf scald disease. Phytopathology, St. Paul, 55:317-319.

KOIKE, H., 1971. Testing sugarcane varieties for leaf scald disease resistance. In: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 14, New Orleans. Proceedings. p. 909-919.

LEITE, A.F. e A.R. OLIVEIRA, 1975. Furagar. Summa Phytopathologica, Piracicaba-SP, 1:143-144.

LÉOVILLE, F. e A. COLÉNO, 1976. Détection de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, agent de l'échaudure de la canne a sucre dans des boutures contaminées. Ann. Phytopathol., Versailles, 8:233-236.

MARTIN, J.P. e C.A. WISMER, 1961. Red stripe. In: MARTIN, J.P., E.V. ABBOTT e C.G. HUGHES, Ed. Sugarcane diseases of the world. New York, Elsevier. p. 109-126.

MARTIN, J.P. e G.W. CARPENTER, 1935. Testing cane varieties for disease resistance in Hawaii. In: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 5. Proceedings. p. 519-521.

MARTIN, J.P. e P.E. ROBINSON, 1961. Leaf scald. In: MARTIN, J.P., E.V. ABBOTT e C.G. HUGHES, Ed. Sugarcane diseases of the world. New York, Elsevier. p. 79-107.

- MASUDA, Y. e H. TOKESHI, 1978. A useful method for diagnosis and isolation of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, causal agent of leaf scald in sugarcane. Sugarcane Pathologists' Newsletter, Réduit, 20:22.
- MATSUOKA, S., 1972. Raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar: diagnose da moléstia e estudos sobre o seu agente causal. Piracicaba, ESALQ/USP, 77p. (Tese de Doutorado).
- MORTON, D.J., 1964a. A microagglutination test for identifying *Xanthomonas vesicatoria* in pepper leaf lesions. Phytopathology, St. Paul, 54:625.
- MORTON, D.J., 1964b. Use of antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate in ultraviolet examinations of pepper leaf sap for *Xanthomonas vesicatoria*. Phytopathology, St. Paul, 54:902.
- MORTON, D.J., 1964c. Detecting *Xanthomonas vesicatoria* in *Capsicum frutescens* leaves by bentonite flocculation. Phytopathology, St. Paul, 54:1037.
- MORTON, D.J., 1965. Comparisons of three serological procedures for identifying *Xanthomonas vesicatoria* in pepper leaves. Phytopathology, St. Paul, 55:421.
- MUSHIN, R.; J. NAYLOR e N. LAHOVARY, 1959. Studies on plant pathogenic bacteria. II. Serology. Aust. J. Biol. Sci., Victoria, 12:233-246.
- NORSE, D., 1973. A quantitative inoculation technique for screening sugarcane varieties for resistance to leaf scald. Plant Dis. Repr., Washington, 57:582-583.

- OLIVEIRA, A.R., 1975. Considerações sobre antíssoros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. Summa Phytopathologica, Piracicaba-SP, 1:61-64.
- OLIVEIRA, A.R.; A.P.C. ALBA e M.B. FIGUEIREDO, 1976. Serologia aplicada ao estudo dos vírus de plantas. Summa Phytopathologica, Piracicaba-SP, 2:69-96.
- OLIVEIRA, A.R.; T. NAKAMURA; H.P. LIU e M.H. SUGIMORI, 1977. Serological tests applied to leaf scald disease of sugarcane. Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 16, São Paulo. Proceedings. p. 459-468.
- PERSLEY, G.J., 1973. Epiphytology of leaf scald in the Central District of Queensland. Sugarcane Pathologists' Newsletter, 10:30-31.
- PLANALSUCAR, 1975. Relatório Anual, Estações Experimentais. Piracicaba-SP, 80p.
- PLANALSUCAR, 1977. Relatório Anual, Estações Experimentais. Rio de Janeiro, 100p.
- RICAUD, C., 1974. Problems in the diagnosis of ratoon stunting disease. In: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 15, Durban. Proceedings, 241-249.
- RICAUD, C. e M.E. PAULO, 1970. Leaf scald. Ann. Rep. Mauritius Sug. Ind. Res. Inst., Port Louis. p. 87-92.
- RICAUD, C.; S. SULLIVAN; S. FELIX e P. FERRÊ, 1977. Comparison of serological and inoculation methods for detecting latent infection of leaf scald. Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 16, São Paulo. Proceedings. p. 439-448.

- SCHAAD, N.W., 1978. Use of direct and indirect immunofluorescence tests for identification of *Xanthomonas campestris*. Phytopathology, St. Paul, 68:249-252.
- SCHAAD, N.W., 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopathol., Palo Alto, 17:123-147.
- SHATTOCK, P.M.F., 1955. The use of serology in the classification of micro-organism. J. Gen. Microbiol., New York, 12:367-374.
- STEINDL, D.R.L., 1965. Testing sugarcane varieties for disease resistance at the Bureau Pathology Farm, Queensland. In: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 12, San Juan, Proceedings, p. 1133-1137.
- SUDO, S., 1980. Bacterias associadas ao raquitismo das soqueiras da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) e avaliação do capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) como indicadora. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 86p. (Dissertação de Mestrado).
- THOMSON, S.V. e M.N. SCHROTH, 1976. The use of immunofluorescent staining for rapid detection of epiphytic *Erwinia amylovora* on healthy pear blossoms. Proc. Am. Phytopathol. Soc., 3:321.
- TOKESHI, H.; A. SANGUINO e F. AKIBA, 1974. *Xanthomonas albilineans*, provável agente causal de raquitismo-da-soqueira e escaldadura de cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 84:564-576.
- VALARINI, P.J., 1978. Avaliação da resistência ao raquitismo da soqueira pelo método da vazão de água em colmos de cana-de-açúcar. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 78p. (Dissertação de

Mestrado)..

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M., 1979. Relações entre *Xanthomonas albilineans*, *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas* sp. em cana-de-açúcar. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 77p. (Dissertação de Mestrado).

VAN REGENMORTEL, M.H.V., 1978. Applications of plant virus serology. Ann. Rev. Phytopathol., Palo Alto, 16:57-81.

VAN SLOGTEREN, D.H.M., 1955. Serological micro reactions with plant viruses under parafin oil. Proc. of Potato Virus Dis., Lisse. p. 51-54.

WETTER, C., 1965. Serology in virus disease diagnosis. Ann. Rev. Phytopathol., Palo Alto, 3:19-42.

WIEHE, P.O., 1961. Leaf scald and chlorotic streak, two sugarcane diseases occuring in British Guiana. Lect. Brit. Guia. Sug. Prod. Ass. p. 27-33.

YAKRUS, M. e N.W. SCHAAD, 1979. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysantemi*. Phytopathology, St. Paul, 69:517-522.

YANO, T., 1976. Estudo bacteriológico e serológico de algumas amostras pertencentes a vários patotipos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. Campinas-SP, UNICAMP, 65p. (Tese de Mestrado).