

SEROLOGIA E ELETROFORESE APLICADAS AO ESTUDO
DE *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, AGENTE
CAUSAL DA BACTERIOSE DO MARACUJAZEIRO
(*Passiflora* spp.)

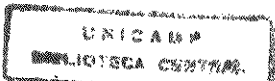
LUÍS OTÁVIO SAGGION BERIAM

Este exemplar corresponde à reação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Luís Otávio Saggion Beriam
e aprovada pela Comissão Julgadora
30/01/98

Tese apresentada ao Instituto de Biologia, da
Universidade Estadual de Campinas, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências Biológicas. Área de
concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof.Dr.Tomomasa Yano

CAMPINAS
1998



0813021

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	27545
V	34151
	395198
	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/06/98
N.º CPD	

CM-00112691-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Beriam, Luis Otávio Saggion

B431s Serologia e eletroforese aplicadas ao estudo de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, agente causal da bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* spp.) / Luis Otávio Saggion Beriam. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
65f.: ilus.

Orientador: Tomomasa Yano

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. *Xanthomonas campestris*. 2. *Passiflora*. 3. Sorologia.
4. Eletroforese. I. Yano, Tomomasa. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 30 de janeiro de 1998.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

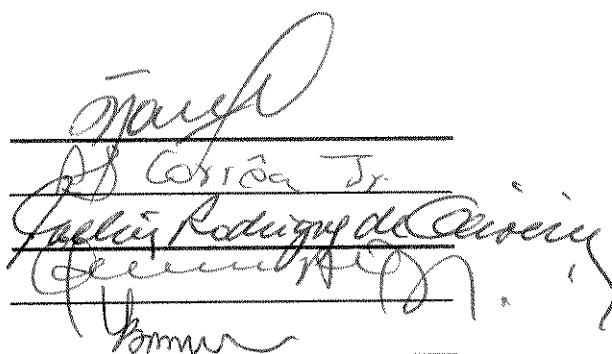
Prof. Dr. Tomomasa Yano (Orientador)

Prof. Dr. Ary Côrrea Jr.

Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira

Dr. Valdemar A. Malavolta Jr.

Prof^a.Dr^a.Yoko Bomura Rosato



Handwritten signatures of the five Titulares members of the Examining Board, each on a horizontal line. The signatures are: Tomomasa Yano, Ary Côrrea Jr., Avelino Rodrigues de Oliveira, Valdemar A. Malavolta Jr., and Yoko Bomura Rosato.

SUPLENTES:

Dr.Celso Eduardo Benedetti

Dr.Mauro Hideo Sugimori



Two horizontal lines for the Suplentes members, Dr. Celso Eduardo Benedetti and Dr. Mauro Hideo Sugimori.

Aos meus pais

LUIZ e VALI

À minha esposa

TERE

Às minhas filhas

CAROLINA,

CAMILA

e

ANA CLÁUDIA

DEDICO

INDICE

	página
Resumo	I
Summary	III
Esquemas, figuras, quadros e tabelas.	V
1.Introdução	01
2.Revisão da literatura	04
2.1.A bacteriose do maracujazeiro	04
2.1.1. Etiologia	04
2.1.2. Prejuízos causados e medidas de controle	09
2.1.3. Técnicas de identificação	13
2.1.3.1. Serologia	13
2.1.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato	19
3. Materiais e métodos	24
3.1. Linhagens bacterianas	24
3.2. Preparo de suspensões bacterianas (SB), suspensões bacterianas autoclavadas (SBA), complexo proteico das mem- branas (CPM), exopolissacarídeos (EPS) e glicoproteína (GP)	26
3.3. Preparo de antissoros e testes serológicos de dupla difusão em ágar	30
3.3.1. Análise estatística das reações serológicas com antígenos na forma de suspensão bacteriana	31
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS)	32
4. Resultados e Discussão	33
4.1. Serologia	33
4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS)	43
5. Conclusões	50
6. Referências bibliográficas	52
Apêndices	64

AGRADECIMENTOS

ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, orientador desse trabalho, pelo estímulo e principalmente pela amizade.

ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, meu pai científico, pela leitura dos originais, pelas críticas e excelentes sugestões e pela orientação sempre presente desde meu primeiro ano de universidade.

a Prof^a. Dr^a. Yoko Bomura Rosato, por permitir o uso das instalações do Laboratório de Genética de Microorganismos, pela orientação e constante estímulo e, acima de tudo, pela grande amizade e confiança.

ao Dr. Valdemar Afílio Malavolta Jr., pelo orientação, apoio, tremenda paciência, presentes não só durante o desenvolvimento deste trabalho, mas desde meu início na SBF.

ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, pelo estímulo que me vem dando desde 1989, pelo companheirismo, pela dedicação e pelos ensinamentos na Fitobacteriologia.

a Dra. Irene Maria Gatti de Almeida, pelo auxílio, não só neste trabalho, mas na labuta diária na SBF

Aos amigos e orientadores Henrique, Ed e Sandra, que sempre se mostraram extremamente solícitos, não só durante o desenvolvimento desse trabalho, mas ao longo destes últimos três anos.

À Tere, minha esposa, pelo carinho, pela extrema compreensão, pela “paciência de Jó” ao longo dos últimos dois anos.

A todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, colaboraram com este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* spp.), causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (XCP), é uma das principais moléstias desta cultura, sendo fator limitante para sua exploração comercial. Cinquenta e quatro linhagens de *X. c.* pv. *passiflorae* foram analisadas pelas técnicas de serologia, por meio de testes de dupla difusão em ágar e de eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS) de proteínas totais. Foram produzidos antissoros para duas linhagens de *X. c.* pv. *passiflorae* originárias de *Passiflora alata* (AS-XCP-444-*P.alata* e AS-XCP-1171-*P.alata*) e um antissoro para *X. c.* pv. *passiflorae* isolada de *P.edulis* (AS-XCP-748-*P.edulis*). Antígenos nas formas de suspensão bacteriana (SB), suspensão bacteriana autoclavada (SBA), exopolissacarídeos (EPS), complexo proteico das membranas (CPM) e glicoproteínas (GP) foram testados por dupla difusão em ágar com os três antissoros. As cinquenta e quatro linhagens foram submetidas à PAGE/SDS da fração SB. Para dez das linhagens testadas, as frações SBA, EPS, CPM e GP também foram submetidas à PAGE/SDS. Os resultados mostraram que os antígenos na forma de SB e CPM são os mais indicados para experimentos visando a diagnose de *X. c.* pv. *passiflorae* em material suspeito de infecção. Os antígenos na forma de SBA, EPS e GP não devem ser utilizados para diagnose de *X. c.* pv.

passiflorae mas, se purificados, podem ser utilizados em estudos visando a separação de *X. c.* pv. *passiflorae* em serogrupos. Os perfis de proteínas totais das frações SB apresentaram grande similaridade e também para a PAGE/SDS, SB e CPM foram as frações que revelaram os melhores resultados. Os perfis proteicos obtidos para *X. c.*pv. *passiflorae* foram comparados com perfis de *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferae*, *X. a.* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. vesicatoria*. Não foi possível detectar-se bandas que pudessem ser consideradas como marcadoras para o pv. *passiflorae*. As linhagens originárias de *P. alata* não são diferenciadas daquelas isoladas de *P. edulis* por nenhuma das técnicas utilizadas. Além disso, todas as linhagens testadas apresentam grande similaridade, independente do hospedeiro e localização geográfica de origem.

SUMMARY

The passion-fruit (*Passiflora* spp.) bacteriosis caused by *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* is the main disease of this culture, being a limit factor for its commercial exploitation. Fifty-four *X. c.* pv. *passiflorae* strains were analysed by serology through agar double diffusion tests (a.d.d) and by soluble proteins electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulphate (PAGE/SDS). Antisera were produced from two *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* strains of *P. alata* (AS-XCP-444 *P. alata* and AS-XCP-1171- *P. alata*) and one antiserum from a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* strain isolated from *P. edulis* (AS-XCP-748-*P. edulis*). Antigens in the forms of bacterial suspension (BS), autoclaved bacterial suspension (ABS), extracellular polysaccharides (EPS), membrane protein complex (MPC) and glycoprotein (GP) were tested by agar double diffusion with the three antisera. The BS fraction of the fifty-four strains were submitted to PAGE/SDS. Ten strains were also submitted to the ABS, EPS, MPC and GP to PAGE/SDS. The results showed that the BS and MPC antigens were the most indicated for the experiments aiming de *X. c.* pv. *passiflorae* diagnosis, in the material under suspicion of infection. The ABS, EPS and GP cannot be employed for *X. c.* pv. *passiflorae* diagnosis. However if purified, they can be used in studies aiming *X. c.* pv. *passiflorae* strain separation in serogroups. The profiles of soluble

proteins showed similarity as for PAGE/SDS, the BS and MPC fractions generated the best results. The profiles of soluble proteins from *X. c.* pv. *passiflorae* were compared with *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferae* Indicae, *X. a.* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X.vesicatoria*. However it was not possible to detect bands that could be used as a pattern to *X. c.* pv. *passiflorae*. The strains of *P. alata* and *P. edulis* could not be differed from each other by the above mentioned techniques. Furthermore, all the strains that were tested showed similarity, not depending upon host or geographical origin.

ESQUEMAS, FIGURAS, QUADROS E TABELAS

	página
ESQUEMA 1	Preparo das suspensões bacterianas (SB), suspensões bacterianas autoclavadas (SBA), complexo proteico das membranas (CPM), exopolissacarídeos (EPS) e glicoproteínas (GP).
	27
ESQUEMA 2	Testes serológicos de dupla difusão em ágar entre os antissoros AS-XCP-444- <i>P. alata</i> , AS-XCP-748- <i>P. edulis</i> e AS-XCP-1171- <i>P. alata</i> e antígenos de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> , na forma de suspensão bacteriana (SB), suspensão bacteriana autoclavada (SBA), complexo proteico das membranas (CPM), exopolissacarídeos (EPS) e glicoproteínas (GP).
	35
FIGURA 1	Dendrograma comparativo entre as linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> , em testes de dupla difusão em ágar com o antissoro AS-XCP-444- <i>P. alata</i> .
	40
FIGURA 2	Dendrograma comparativo entre as linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> , em testes de dupla difusão em ágar com o antissoro AS-XCP-748- <i>P. edulis</i> .
	41
FIGURA 3	Dendrograma comparativo entre as linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> , em testes de dupla difusão em ágar com o antissoro AS-XCP-1171- <i>P. alata</i> .
	42

FIGURA 4	Eletoforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato de algumas linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	44
FIGURA 5	Eletoforese comparativa em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato entre linhagens de <i>X. c.</i> pv. <i>passiflorae</i> e <i>X. c.</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i>	44
QUADRO 1	Plantas hospedeiras, origem e código das linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> utilizados nos estudos comparativos de serologia em testes de dupla difusão em ágar e eletoforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS).	25
QUADRO 2	Linhagens de <i>X. c.</i> pv. <i>passiflorae</i> utilizadas nos testes de dupla difusão em ágar, com as respectivas formas de antígeno: suspensão bacteriana (SB), suspensão bacteriana autoclavada (SBA), exopolissacarídeos (EPS), complejo proteico das membranas (CPM) e glicoproteínas (GP)	29
TABELA 1	Resultados dos testes serológicos de dupla difusão em ágar entre os antissoros AS-XCP-444- <i>P. alata</i> , AS-XCP-748- <i>P. edulis</i> e AS-XCP-1171- <i>P. alata</i> e as frações SB (Suspensão Bacteriana); SBA (Suspensão Bacteriana Autoclavada); CPM (Complejo Proteico das Membranas); EPS (Exopolissacarídeos) e GP (Glicoproteínas) de cinquenta e quatro linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i> .	34

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro possui um grande número de espécies, sendo o maracujazeiro roxo (*Passiflora edulis* SIMS.), o maracujazeiro amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* DEG) e o maracujazeiro doce (*Passiflora alata* AIT) as espécies exploradas comercialmente. Em nosso país esta cultura passou a apresentar grande importância econômica a partir do início da década de 80

A bacteriose ou mancha oleosa do maracujazeiro, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, foi descrita e caracterizada como uma nova moléstia por PEREIRA (1968), estando atualmente relatada em todos os Estados onde o maracujazeiro é cultivado com fins comerciais. É uma moléstia considerada limitante para a expansão desta cultura, principalmente por não poder ser controlada de maneira adequada por métodos químicos. Até o momento, a ocorrência de *X.c.pv.passiflorae* só foi relacionada no Brasil e na Austrália, sendo que neste último país há dados relacionados somente à ocorrência desta fitobacteriose. Por este motivo, as informações disponíveis na literatura relativas a este patógeno ainda são escassas, principalmente aquelas relacionadas à sua variabilidade, incluindo as características serológicas e eletroforéticas.

Plantas infectadas por *X. c. pv. passiflorae* mostram redução no período de exploração comercial, apresentando frutos de baixo valor ou impróprios para o consumo. A disseminação deste patógeno a longas distâncias ocorre principalmente pelo uso de sementes contaminadas, que normalmente não apresentam sintomas

visíveis. Estes fatos, aliados à inexistência de agrotóxicos eficientes registrados para o controle desta moléstia, aumentam ainda mais a sua importância.

Recentemente, VAUTERIN et al. (1995) desenvolveram estudos envolvendo a hibridação DNA-DNA, a utilização de diferentes fontes de carbono, e o perfil de proteínas totais, reclassificando as bactérias do gênero *Xanthomonas* de cinco para 20 espécies. Dentro dessa reclassificação, *X. c. pv. passiflorae* não foi enquadrada em nenhuma destas espécies, permanecendo como um patovar de *Xanthomonas* sp. Entretanto, esta proposta não foi aceita, permanecendo como patovar de *X. campestris* (YOUNG et al., 1996),

O conhecimento das características serológicas e dos perfis eletroforéticos das linhagens de *X. c. pv. passiflorae* pode propiciar melhor conhecimento da interação planta patógeno, auxiliando também nos exames em materiais ou em lotes de sementes suspeitos de infecção, permitindo uma diagnose mais rápida. Estas técnicas de identificação têm importância não somente do ponto de vista epidemiológico, mas principalmente no controle desta fitobacteriose, através emprego em trabalhos de indexação, permitindo a seleção de lotes de sementes isentos da bactéria.

Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se avaliar a variabilidade serológica e eletroforética de linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* isoladas de *Passiflora* sp., *P. edulis*, *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. alata*, provenientes de várias regiões do Brasil, englobando as principais regiões produtoras, através de reações de dupla difusão em ágar, com antígenos na forma de suspensões bacterianas (SB), suspensões bacterianas autoclavadas (SBA),

proteínas extraídas da membrana (complexo proteico da membrana - CPM), exopolissacarídeos (EPS) e glicoproteínas (GP) extraídas da cápsula bacteriana, e também por meio de perfis eletroforéticos de proteínas totais através, procurando caracterizar um padrão eletroforético para o patovar *passiflorae* e criar um banco de dados que possibilite a rápida identificação e classificação de linhagens de *X. c. pv. passiflorae*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 . A bacteriose do maracujazeiro

A bacteriose do maracujazeiro, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (Pereira 1969) Dye 1978, já foi relatada nos Estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo, e mais recentemente, como problema nesta cultura no Estado de Santa Catarina (MARQUES et al., 1994; PERUCH et al., 1997).

2.1.1. Etiologia

PEREIRA (1968) foi o pioneiro no desenvolvimento de trabalhos visando a identificação do agente etiológico dessa bacteriose. Para tanto, realizou experimentos relacionados às características morfológicas, bioquímicas, culturais, de patogenicidade, a sensibilidade à antibióticos, o que permitiu identificar o patógeno como *Xanthomonas passiflorae*, descrevendo, desta forma, uma nova

doença e uma nova espécie bacteriana. Posteriormente, este patógeno foi reclassificado por DYE (1978) como o patovar *passiflorae* de *X. campestris*.

Além de *X. c.* pv. *passiflorae*, outras bactérias podem afetar o maracujá, mas ainda não foram relatadas em nosso país, sendo que algumas podem apresentar sintomatologia similar àquela da mancha oleosa. De acordo com BRADBURY (1986) já foram relatadas como patogênicas nesta cultura as bactérias *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend 1907) Conn 1942), *P. syringae* pv. *syringae* Van Hall 1902, *P. viridiflava* (Burkholder 1930) Dowson 1939 e *P. syringae* pv. *passiflorae* (Reid 1938) Young, Dye & Wilkie 1978. JABUONSKI et al. (1986) também relacionaram *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, causando sintomas de podridão mole. Dessas bactérias, as mais importantes, pelos prejuízos ocasionados, são *Pseudomonas syringae* pv. *passiflorae*, observada na África do Sul, Austrália e Nova Zelândia e *X. c.* pv. *passiflorae*, assinalada na Austrália e no Brasil

Por ocasião da descrição deste patógeno e dos sintomas que ele ocasionava, PEREIRA (1968) relatou que nas folhas, o sintoma mais evidente consistiu em manchas pequenas, que sob condições favoráveis podem atingir um centímetro de diâmetro, delimitadas e circulares, raramente angulares. Apresentam coloração verde escura, anasarcadas, de aspecto oleoso e translúcidas, quando vistas contra a luz. Evoluindo, estas lesões podem ocasionar seca e queda das folhas. A partir das lesões foliares, a infecção pode se tornar sistêmica e atingir os ramos, que sofrem uma seca progressiva, acompanhada de escurecimento dos feixes vasculares. Esse tipo de infecção ocasiona crestamento foliar intenso,

popularmente conhecido como "água quente", e pode se originar tanto a partir de uma lesão angular, quanto pela penetração da bactéria em ferimentos ou aberturas naturais, tais como os estômatos ou hidatódios. Esse crestamento pode atingir grandes áreas, que se tornam pardacentas, translúcidas contra a luz e acompanhadas de escurecimento de pequenas porções das nervuras. Folhas que apresentam este tipo de sintoma desprendem-se facilmente dos ramos, resultando em desfolha intensa. Estudos em desenvolvimento sugerem a ação de uma toxina produzida pela bactéria como responsável pela indução desse tipo de sintoma (BERIAM, MALAVOLTA JR. & ROSATO, dados não publicados). Nos frutos, as lesões apresentam-se como áreas circulares ou irregulares, de cor verde escura a pardacenta (dependendo do estágio de desenvolvimento da lesão), oleosas, com margens bem definidas, tornando-os impróprios para a comercialização. Além da bacteriose do maracujazeiro, é comum detectar-se em plantas os fungos *Colletotrichum gloesporioides* Penz e *Septoria passiflorae* Lown, levando a um quadro sintomatológico denominado "morte precoce", que diminui o período de vida e de exploração comercial desta cultura. Em testes efetuados em casa-de-vegetação, somente *X. c. pv. passiflorae* ocasionou os sintomas acima descritos. Desta forma, a bacteriose do maracujazeiro desempenha fundamental papel na morte precoce do maracujazeiro (DIAS & TAKATSU, 1987,1990; MELLO & OLIVEIRA, 1987; KIMURA, KOSTLER & AKIBA, 1989).

Embora *P. syringae* pv. *passiflorae* ainda não tenha sido relatada em nosso país (BRADBURY, 1986), existe a possibilidade de introdução desse patógeno por meio de sementes ou mudas contaminadas, trazidas ilegalmente para o Brasil.

A partir dos relatos de PEREIRA (1968), outros estudos foram desenvolvidos com *X. c.pv. passiflorae*, relacionados à ocorrência, às medidas de controle, às características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, eletroforéticas e da interação planta-patógeno.

OLIVEIRA & MELLO (1987) efetuaram um levantamento na qualidade de sementes de frutos de maracujazeiro, através do plaqueamento em meio de Batata-Dextrose-Ágar e detectaram a presença de vários fitopatógenos, incluindo fungos e bactérias do gênero *Pseudomonas* e *X. c. pv. passiflorae*.

OLIVEIRA et al. (1988) observaram plantas de maracujazeiro amarelo apresentando amarelecimento das folhas e seca dos ramos e ponteiros, evoluindo para intensa desfolha e definhamento da planta. Testes de patogenicidade mostraram tratar-se de *X. c. pv. passiflorae*, com a característica de colonizar sistemicamente as plantas infectadas, o que já havia sido assinalado por PEREIRA (1968), com sintomas similares àqueles observados no campo.

ALMEIDA et al. (1994) descreveram, pela primeira vez, a ocorrência de linhagem não pigmentada de *X. c. pv. passiflorae*, em isolamento efetuado de material infectado proveniente de Vera Cruz, Estado de São Paulo. Testes bioquímicos, culturais, de patogenicidade e de eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato permitiram identificar essas linhagens com pertencentes ao patovar *passiflorae*.

PICCININ, MALAVOLTA JR. & PASCHOLATI (1995) desenvolveram experimentos visando determinar o efeito da concentração de inóculo e da temperatura (20 °C e 35 °C) na severidade de *X. c.pv. passiflorae*. Por meio da

inoculação artificial de suspensões bacterianas de diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 5×10^7 e 10^8 UFC/mL) pela técnica de aspersão, verificaram que o aumento no número de células bacterianas inoculadas provocou o aumento no número de lesões localizadas e sistêmicas, quando as plantas foram mantidas tanto nas temperaturas de 20°C como a 35°C . O período de latência nas plantas mantidas a 20°C foi ao redor de 15 dias, enquanto que naquelas plantas mantidas a 35°C , houve diminuição no período de latência, passando a ser de 7 dias, fator que pode explicar a maior ocorrência da doença em regiões de clima quente.

WENDELAND, UENO & LEITE JR. (1996) desenvolvendo trabalhos relacionados com a variabilidade de *X. c.pv. passiflorae*, empregando para tanto testes bioquímicos, fisiológicos e o perfil de proteínas totais por PAGE/SDS, verificaram que apenas uma das linhagens testadas apresentou perfil proteico distinto dos demais, não sendo evidenciada uma banda de 35,6 kDa, característica das demais linhagens, mostrando, entretanto, bandas de 39,2, 54,7 e 56,6, que não foram detectadas nas demais linhagens testadas.

TAHARA & ROSATO (1997) estudaram o efeito de extratos de plantas compatíveis e incompatíveis na expressão de proteínas específicas de *X. c. pv. passiflorae*. A determinação da cinética de proteínas produzidas em meios de cultura contendo extratos de folhas de maracujazeiro mostrou que, após 15 h de incubação neste meio de cultura, há expressão de proteínas com 20 e 50 kDa, não se detectando uma proteína de 29 kDa, concluindo que os extratos de folhas de maracujazeiro podem induzir ou reprimir a ação de alguns genes responsáveis pela expressão de proteínas específicas.

2.1.2. Prejuízos causados e medidas de controle

Foram desenvolvidos vários trabalhos visando a determinação do grau de suscetibilidade ou resistência de genótipos de maracujazeiro a bacteriose.

KURODA (1981) trabalhou com testes de patogenicidade de *X. c. pv. passiflorae*, por meio de inoculação em folhas novas de quatro espécies de maracujazeiro, através da inoculação por risca, concluindo que a espécie *Passiflora alata* é a mais suscetível; *P. edulis* f. *flavicarpa*, suscetível; *P. edulis*, progênie marmelo, medianamente resistente e *P. maliforme*, resistente.

RODRIGUES NETO, SUGIMORI & MALAVOLTA JR. (1984) relataram a ocorrência natural de *X. c. pv. passiflorae* em *Passiflora alata*. Esses autores realizaram experimentos visando determinar o comportamento de diversas espécies e variedades de *Passiflora* frente à bacteriose, através da inoculação artificial de suspensão bacteriana pela técnica de pontuações das folhas. Foram consideradas resistentes as espécies *P. molissima*, *P. cincinnata*, *P. foetida*, a introdução I. 48669 e o Maracujá Selvagem Grande. As espécies *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*, bem como o maracujá de Boi-Bahia "Vasconcelos" e o maracujá Peroba foram considerados suscetíveis. A espécie *P. quadrangularis* e as variedades de *P. alata* Guaçú, Goiás, EPAMIG 5, EPAMIG 6 e EPAMIG 7 foram classificadas como altamente suscetíveis.

ALMEIDA, MALAVOLTA JR. & RODRIGUES NETO (1992) desenvolveram estudos com o objetivo de se avaliar a ação de antibióticos contra sete linhagens de *X. c. pv. passiflorae*, com o uso dos seguintes produtos: Agrimicina (oxitetraciclina + estreptomicina), Agrimicina 500 (sulfato de cobre + oxitetraciclina), Hokko Kasumin (kasugamicina) e Mycoshield (oxitetraciclina). Tais antibióticos foram adicionados ao meio de Nutriente-Ágar, nas concentrações de 10, 100 e 1000 ppm e posteriormente distribuídos em placas de Petri, com o plaqueamento de 0,1mL da suspensão bacteriana de cada linhagem por placa. Todos os produtos foram eficientes na concentração de 100 ppm, exceto a kasugamicina, notando-se também a diminuição do tamanho das colônias com a utilização de oxitetraciclina, na concentração de 10 ppm.

O controle químico da bacteriose do maracujazeiro em condições de campo por meio de fungicidas (oxicloreto de cobre a 30% e a 50%, oxicloreto de cobre + maneb + zineb) só se mostrou eficiente quando aplicado quinzenalmente. Tentativas de poda de limpeza apresentaram resultados satisfatórios em alguns casos; em outros casos, foram prejudiciais (TORRES & PONTE, 1992).

MAKIMOTO et al. (1994) empregaram produtos com ação bactericida (calda bordalesa pré-fabricada, oxicloreto de cobre + mancozeb e sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina), obtendo controle da bacteriose do maracujazeiro, porém sem que tenha ocorrido incremento na produção.

PICCININ & PASCHOLATI (1995) desenvolveram trabalhos visando o controle biológico da bacteriose do maracujazeiro, utilizando como agente de biocontrole o fungo *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen. As suspensões

contendo as leveduras (25 mg/mL) foram aspergidas 24 horas antes e após a inoculação da bactéria (10^7 bactérias/mL). Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com leveduras diminuiu tanto o número de lesões localizadas como o de lesões sistêmicas. Além da diminuição do número de lesões, também houve aumento no período de latência, que passou de seis dias (plantas não tratadas) para 12 dias (plantas tratadas).

DIAS (1990) e DIAS & TAKATSTU (1990) desenvolveram trabalhos relacionados a "morte precoce" do maracujazeiro. Essa anomalia está caracterizada pela desfolha precoce intensa, murcha, seca dos ramos terminais e morte descendente. Pode eventualmente ocorrer recuperação da planta mas as brotações novas apresentam os mesmos problemas, com a consequente morte de planta. Esse quadro vem se tornando generalizado no Brasil, reduzindo drasticamente o período de cultivo comercial do maracujazeiro para menos de dois anos. Das plantas com sintomas de morte precoce foram isolados os fungos *C. gloesporioides* e *S. passiflorae*. Porém, quando além desse fungos, também era detectada a presença de *X. c. pv. passiflorae* o quadro sintomatológico também era mais severo, acarretando a morte da planta num período entre quatro meses a um ano após confirmação da infecção.

Segundo Takatsu (apud DIAS, 1990), a bacteriose do maracujazeiro é um das causas mais importantes da intensa desfolha de plantas em qualquer idade, seca de ramos e redução na produção do maracujá. A infecção ocorre com maior frequência através dos hidatódios, provocando grandes áreas murchas ou

necrosadas, aquosas no início. Posteriormente, há enegrecimento dos vasos, caracterizando uma forma típica de lesão vascular.

Apesar das tentativas de detecção de *X. c. pv. passiflorae* em sementes terem sido infrutíferas quando se empregou o plaqueamento direto em meio seletivo SX-Ágar. (DIAS, 1990), essa forma de transmissão foi comprovada através do plantio de sementes originárias de plantas severamente afetadas pela bacteriose. Além disso, o fato de se obter taxas de infecção entre 1,8% e 0,3 a 0,5% para sementes não tratadas e tratadas com hipoclorito de sódio, respectivamente, constitui uma indicação que as bactérias podem estar localizadas tanto na parte interna como na externa da semente (DIAS, 1990). BARBOSA et al. (1993) plantaram sementes originárias de frutos colhidos em Janaúba, Minas Gerais, em tubetes contendo vermiculita estéril. De um total de 200 sementes germinadas, apenas duas plantas se mostraram infectadas. Os testes de termoterapia indicaram a possibilidade do tratamento térmico de sementes de maracujazeiro infetadas pela bacteriose, efetuada a 50 °C, durante 15, 30 ou 45 min.

Os dados de DIAS (1990) E DIAS & TAKATSU (1990) relacionados a caracterização de linhagens de *X. c. pv. passiflorae* através de patogenicidade, testes bioquímicos, fisiológicos e culturais, sensibilidade a antibióticos, virulência das linhagens de *X. c. pv. passiflorae*, translocação da bactéria nos tecidos da planta hospedeira e transmissão via sementes permitiram concluir que: (a) a bacteriose do maracujazeiro é o fator mais importante do quadro de "morte precoce"; (b) as variações bioquímicas estão relacionadas com a produção de H₂S, amilase, utilização de alguns carboidratos; (c) as linhagens de *X. c. pv. passiflorae* não

puderam ser divididas em grupos ou raças, só o sendo em função da variabilidade de virulência observada entre as linhagens. Foram detectadas espécies altamente suscetíveis à esta bacteriose e algumas espécies com mais resistência; (d) a impossibilidade da detecção de bactérias em sementes empregando meios seletivos, só sendo comprovada pelo plantio de sementes originárias de frutos altamente infectados; (e) finalmente, a termoterapia pode ser uma alternativa promissora para controle da bacteriose do maracujazeiro. Concluíram ainda que o maracujá roxo é o mais resistente à bacteriose quando comparado ao maracujá amarelo.

2.1.3. Técnicas de identificação

Os trabalhos de caracterização de *X. c. pv. passiflorae* envolvem principalmente a bacteriologia clássica (testes bioquímicos e sintomatologia), não havendo, até o momento, nenhum trabalho em literatura relacionado à serologia aplicada à identificação e caracterização de *X. c. pv. passiflorae*. Entretanto, vêm sendo realizados trabalhos com eletroforese buscando principalmente avaliar diferenças ou similaridades entre linhagens de diferentes origens.

2.1.3.1. Serologia

A utilização de métodos serológicos aplicados ao estudo de fitobactérias constitui-se em uma técnica auxiliar na correta identificação desse importante grupo de fitopatógenos.

Há uma série de técnicas serológicas que podem ser utilizadas para a identificação de fitopatógenos, destacando-se aquelas que fazem uso de anticorpos não purificados, incluindo a microprecipitação, a aglutinação em meio líquido, a precipitação em gel de ágar, a imunoeletroforese e aquelas técnicas que utilizam anticorpos marcados, como a imunofluorescência (IF), o ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"), o "immunoblotting", as técnicas com marcação radioativa de anticorpos, etc (SCHAAD, 1976; HAMPTON, BALL & DE BOER, 1990; KLEMENT, RUDOLPH & SANDS, 1990; GOTO, 1992).

A escolha de antígenos bacterianos para a produção de antissoros específicos está relacionada com o tipo de estudo que se pretende desenvolver. Em fitobacteriologia, as formas de antígeno que são mais comumente utilizadas, tanto para a produção de antissoros (antígenos imunizantes) como para as reações serológicas (antígenos reagentes) podem ser divididos em células bacterianas totais (CB), células bacterianas fixadas pelo formol (CBF), células bacterianas fixadas pelo glutaraldeído (CBG), extratos bacterianos, constituídos basicamente por glicoproteínas (GP) extraídas da cápsula bacteriana, proteínas de membrana, como o complexo proteico da membrana (CPM) ou ainda os componentes bacterianos purificados, enquadrando-se nesse grupo os lipopolissacarídeos (LPS), os exopolissacarídeos (EPS) e os ribossomos (DIGAT & CAMBRA, 1976; THAVEECHAI & SCHAAD, 1986; HAMPTON, BALL & DE BOER, 1990).

Segundo SCHAAD (1976), uma das questões mais importantes na utilização de técnica serológica é a escolha do tipo de antígeno a ser utilizado. As vantagens em se produzir antissoros a partir de antígenos purificados está em se empregar esses antissoros em testes com extratos de plantas ou de suspensões bacterianas, minimizando dos riscos da ocorrência de reações inespecíficas, o que iria contra uma das principais e mais importantes características da serologia - a alta especificidade.

CHARUDATTAN, STALL & BATCHELOR (1973) separaram 72 linhagens de *Xanthomonas vesicatoria*¹ (ex Doidge 1920) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 em dois serotipos, por testes de dupla difusão em ágar, através do uso de suspensões bacterianas sonicadas, células bacterianas inteiras e células bacterianas autoclavadas como antígenos. Embora tenha sido possível a separação em dois serotipos, não foi observado relacionamento entre os dados de serologia e os de patogenicidade, visto que foram detectadas linhagens tanto de tomate como de pimentão nos dois serotipos.

DIGAT & CAMBRA (1976) desenvolveram trabalhos visando a detecção de raças de *Ralstonia solanacearum* Yabuuchi, Kosako, Yano, Hotta & Nishluchi 1995 (sin. *Pseudomonas solanacearum*, *Burkholderia solanacearum*). Através do uso de polissacarídeos extracelulares, antígenos somáticos e da fração GP, demonstraram que tanto o EPS como os antígenos somáticos diferenciam

¹ a classificação de *X. c. pv. vesicatoria* foi recentemente revista (VAUTERIN et al., 1995), sendo atualmente classificada como uma espécie - *X. vesicatoria*.

R.solanacearum de outras espécies bacterianas, porém a especificidade de raças de *R.solanacearum* só foi conseguida com a fração GP como antígeno imunizante.

YANO et al. (1979) caracterizaram serologicamente 15 linhagens de *Xanthomonas* spp. pela técnica de hemaglutinação passiva. Os resultados obtidos permitiram separar as linhagens empregadas em nove serotipos.

MASUDA (1980) desenvolveu metodologia para a detecção de *X. albilineans* (Ashby 1929) Dowson 1943 em extratos de vasos de colmos de cana-de-açúcar afetados pela escaldadura das folhas. Através de técnica serológica, foi possível revelar a presença de *X. albilineans* em cana-de-açúcar com infecção latente (ou seja, sem a manifestação de sintomas), através de reações de aglutinação em micropipetas, com antissoros preparados a partir de células inteiras. Segundo aquele autor, *X. albilineans* possui dois componentes antigênicos somáticos e, provavelmente, dois componentes de natureza exopolissacarídica.

SUGIMORI (1981) usando a técnica serológica de dupla difusão em ágar, comparou linhagens de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith 1901) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, 1995; *X. a.* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 e *X. a.* pv. *manihotis* (Bondar 1915) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995, com antissoros produzidos pela técnica do linfonódulo, diferenciando serologicamente esses três patovares. Os antígenos na forma de EPS foram os que apresentaram as reações mais específicas. Concluiu que a técnica serológica é importante na diagnose, identificação e taxonomia de bactérias do gênero *Xanthomonas*.

RODRIGUES NETO (1984) trabalhou com bactérias do gênero *Pseudomonas*, não fluorescentes, patogênicas às gramíneas. Empregou como antígenos imunizantes a fração GP e concluiu que essa fração pode ser útil na diferenciação de serotipos dessas bactérias. O autor ainda verificou a extrema similaridade no relacionamento serológico de *P. avenae* Manns 1909 e *P. rubrilineans* (Lee, Purdy, Barnum e Martin 1925) Stapp 1928, principalmente naquelas linhagens isoladas de milho. BENEDETTI (1991) comparou as espécies de *P. avenae* e *P. rubrilineans* originárias de diferentes hospedeiros, por eletroforese em gel de poliacrilamida, sugerindo a sinonímia entre essas espécies. O trabalho desenvolvido por BENEDETTI (1991) está de acordo com os dados de RODRIGUES NETO (1984) e os estudos de RAMUNDO & CLAFIN (1990), que comprovaram a sinonímia entre *P. avenae* e *P. rubrilineans*.

ALVAREZ, BENEDICT & MIZUMOTO (1985) desenvolveram estudos visando diferenciar *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel 1985) Dowson 1939, de outros patovares do grupamento "campestris". Para tanto, foram produzidos anticorpos monoclonais (AM) para linhagens de *X. c* pv. *campestris* originários de diferentes localidades. Através do emprego de AM as linhagens analisadas foram subdivididas em seis grupos. Concluíram que os AM permitem uma rápida identificação de linhagens de *X. c.* pv. *campestris*, podendo ser utilizados em estudos epidemiológicos da moléstia "podridão negra" das crucíferas.

THAVEECHAI & SCHAAD (1986) produziram antissoros para *X. c.* pv. *campestris* empregando como antígeno imunizante o CPM. A análise química dessas proteínas de membrana revelou que, além das proteínas, há nesse material

carboidratos e pequenas frações de EPS. A produção de antissoros para peptídeos purificados a partir do CPM, por gradiente de densidade em solução de sacarose e por eletroforese em gel de poliacrilamida, mostrou que esses antissoros só reagem com os antígenos homólogos, não reagindo com proteínas de membrana de outras fitobactérias. Concluíram que os determinantes antigênicos específicos para subespécies estão constituídos por peptídeos da membrana interna.

AZAD & SCHAAD (1988) determinaram as relações serológicas existentes entre linhagens de *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* (Jones, Johnson & Reddy 1917) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995, produzindo antissoros para linhagens dessa bactéria a partir do CPM. Através de testes de dupla difusão em ágar, demonstraram que o CPM apresenta determinantes antigênicos a nível infrasubespecífico e que a técnica de dupla difusão em ágar é confiável na correta identificação de *X. t.* pv. *translucens*.

SUGIMORI (1989) desenvolveu um estudo comparativo entre três linhagens apigmentadas de *Xanthomonas* [*X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel, Moniz & Kulkaarni 1948) Robbs, Ribeiro & Kimura 1974; *X. axonopodis* pv. *manihotis* e *X. a.* pv. *ricini* (Yoshii & Takimoto 1928) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995], separando esses patovares em serotipos diferentes, por reações de dupla difusão em ágar e a partir de antissoros produzidos a partir de células bacterianas inteiras.

VALARINI (1990) caracterizou serologicamente linhagens de *X. a.* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995, produtores e não produtores do pigmento melanina, através de reações de dupla difusão em ágar

com antissoros obtidos a partir de células bacterianas inteiras. O antissoro produzido para *X. a. pv. phaseoll* reagiu somente com os antígenos homólogos, ao passo que o antissoro produzido para aquelas linhagens produtoras de pigmento, além de reagir com o antígeno homólogo, também reagiu com *X. a. pv. phaseoll*. Aquele autor desenvolveu ensaios visando a detecção por serologia de *X. a. pv. phaseoll* em sementes de feijoeiro e concluiu que os testes de dupla difusão em ágar não são exequíveis para esse objetivo, dada a baixa concentração das bactérias nas sementes.

MARINGONI (1993) detectou variabilidade serológica entre linhagens de *X. a. pv. phaseoll* produtoras e não produtoras de melanina, em testes de dupla difusão em ágar. Através de antissoros obtidos a partir de células totais formalizadas, o autor verificou que antissoros para linhagens pigmentadas e não pigmentadas só reagiram com os respectivos antígenos homólogos.

2.1.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato

As proteínas extraídas de fitobactérias são importantes fontes de informação na caracterização, classificação e identificação desses microrganismos (KERSTERS, 1990).

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS) apresenta grande sensibilidade e vem sendo correntemente utilizada na caracterização de microrganismos. Através da PAGE/SDS é possível obter-se o

“eletroforegrama” ou a “impressão digital” de um determinado microrganismo e, a partir desse padrão, montar dendrogramas com o grau de relacionamento entre os organismos estudados. Pela PAGE/SDS é possível discriminar-se o grau de similaridade entre microrganismos de maneira análoga àquela obtida por experimentos de hibridização DNA-DNA (JACKMAN, 1985; KERSTERS, 1990). A análise dos resultados possibilita armazenar os perfis eletroforéticos de linhagens de referência em um banco de dados e compará-los com aqueles obtidos de microrganismos desconhecidos (M. GOODFELLOW, informação pessoal).

Há um grande número de trabalhos relacionados em literatura que fazem uso na PAGE/ SDS para a caracterização e identificação de fitobactérias.

HUISINGH & DURBIN (1967) realizaram estudos comparativos entre linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend 1907) Conn 1942, *A. radiobacter* e *A. rhizogenes* (Riker, Banfield, Wright, Keitt & Saggen 1930) Conn 1942. Através de PAGE/SDS detectaram a presença de padrões de proteínas similares dentro de uma mesma espécie e padrões diferentes entre as três espécies estudadas.

KERSTERS & DE LEY (1975) identificaram e agruparam várias bactérias por PAGE/SDS. Determinaram vários fatores que podem influir na reprodutibilidade da técnica, como as condições do crescimento bacteriano, o tempo de centrifugação na preparação de amostras e as condições nas quais se realiza a própria eletroforese.

BERIAM et al. (1992) estudaram comparativamente o perfil de proteínas de membranas de linhagens de *Agrobacterium* sp., originários de videira (*Vitis* sp.)

coletadas em São Paulo e Rio Grande do Norte, com linhagens de *A. tumefaciens* biovar 1 e *A. vitis* Ophel & Kerr 1990 por PAGE/SDS. Detectaram diferenças no perfil de proteínas, tanto inter como intraespecíficas.

MURRAY et al. (1990) caracterizaram por meio de eletroforese linhagens de *Erwinia carotovora* (Jones 1901) Bergey, Harrison, Hammer & Huntoon 1923, utilizando lipopolissacarídeos. Compararam os dados obtidos por PAGE/SDS com o sistema de separação das linhagens de *E. carotovora* por serologia. Concluíram haver correlação entre os dados obtidos por PAGE/SDS com a separação em serovares e sugerem não ser necessária a produção de antissoros específicos para os serovares, sendo que tal separação pode ser conseguida por PAGE/SDS.

NOGUEIRA et al. (1990) e NOGUEIRA (1991) caracterizaram linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster 1917) Young, Dye & Wilkie 1978, isoladas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.) utilizando PAGE/SDS, tanto de proteínas totais, como de proteínas extraídas de membranas. As linhagens provenientes de feijoeiro foram diferenciadas pela presença de uma banda proteica de 24kDa.

DRISTIG & DIANESE (1990) desenvolveram estudos dos biovars 1, 2 e 3 de *R. solanacearum* por meio de PAGE/SDS de proteínas de membranas. e verificaram que os biovars 1 e 3 apresentam uma banda proteica com 35-37 kDa, ausente nas linhagens do biovar 2.

BENEDETTI (1991) caracterizou linhagens de *P. avenae* e *P. rubrilineans*, procedentes de milho, teosinte, arroz e cana-de-açúcar, coletados em diferentes

regiões geográficas, por PAGE/SDS. As análises revelaram diferenças nos padrões de proteínas de membranas de baixo peso molecular.

WILLEMS et al. (1987) reclassificaram a espécie *Xanthomonas ampelina* para um novo gênero, *Xylophilus*, com uma única espécie, *X. ampelinus*, baseando-se em características enzimáticas, hibridação DNA-rRNA, composição de bases do DNA e PAGE/SDS de proteínas totais. Todas as linhagens de *X. ampelinus* mostraram padrões proteicos similares nas eletroforeses e segundo Kersters (apud WILLEMS et al., 1987), linhagens que possuem alto grau de similaridade de proteínas em eletroforese também apresentam alto grau de similaridade genômica.

BENEDETTI et al. (1990) compararam através de PAGE/SDS de proteínas totais, linhagens de *X. campestris* patogênicos à cana-de-açúcar com linhagens de *X. a. pv. vasculorum* (Cobb 1894) Vauterin, Hoste, Kersters e Swings 1995 e notaram semelhanças no perfil de proteínas entre os linhagens comparados.

VAUTERIN et al. (1991b) empregando 61 linhagens de diferentes procedências dividiram os patótipos de *X. a. pv. citri* (Hasse 1915) Vauterin, Hoste, Kersters e Swings 1995 em cinco grupos, baseados no perfil de proteínas totais detectados por PAGE/SDS.

VAUTERIN et al. (1991a) compararam 307 linhagens de *Xanthomonas* spp., englobando todas as espécies do gênero descritas na época. Concluíram que, quando a PAGE/SDS é usada em condições padronizadas apresenta valor na identificação de linhagens não caracterizadas ou novas dentro do gênero *Xanthomonas*.

RODRIGUES NETO et al. (1993) desenvolveram estudos comparativos com linhagens de *X. a. pv. citri*, utilizando 46 linhagens com ampla diversidade geográfica e com linhagens originárias de sete espécies cítricas, por PAGE/SDS. Os resultados mostraram a presença de bandas padrões para a espécie, além de uma banda característica, de alto peso molecular, para linhagens do patótipo A. Embora o perfil proteico das 35 linhagens estudadas do patótipo A seja homogêneo, os dados obtidos pelos autores permitem dividir o patótipo A em três sub-grupos.

RODRIGUES NETO et al. (1992) caracterizaram linhagens de *Xylella fastidiosa* Wells, Raju, Hung, Weisburg, Mandelco-Paul & Brenner 1987 por PAGE/SDS de proteínas totais. Extratos de proteínas de *X. fastidiosa* de citros, videira, *Ambrosia artemisia*, *Platanus occidentalis* e *Prunus salicina* foram comparados e os resultados indicaram que os padrões de proteínas totais foram similares para todas as linhagens

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.Linhagens bacterianas

Foram empregadas cinquenta e quatro linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (XCP) nos estudos serológicos e eletroforéticos deste trabalho, originárias de diferentes regiões geográficas do Brasil.

Plantas hospedeiras, origem e código das linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* utilizados neste estudo estão relacionados no QUADRO 1.

Para todos os experimentos desenvolvidos neste trabalho, as linhagens bacterianas foram cultivadas em placas de Petri, em meio Nutriente Ágar (NA), conforme LEVINE (1954), por um período de 48h, a temperatura de 28°C.

25.
QUADRO 1- Plantas hospedeiras, origem e código das linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* utilizados nos estudos comparativos de serologia em testes de dupla difusão em ágar e eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS)

PLANTA HOSPEDEIRA	ORIGEM	CÓDIGO-IBSBF ⁽¹⁾
<i>Passiflora alata</i>	Campinas, SP	428
<i>P. alata</i>	Campinas, SP	444 ⁽²⁾
<i>P. alata</i>	Campinas, SP	445
<i>P. alata</i>	Guaíçara, SP	658
<i>P. alata</i>	Indalatuba, SP	1171 ⁽²⁾
<i>P. alata</i>	Amoreira, PR	1257
<i>P. edulis</i>	Campinas, SP	120
<i>P. edulis</i>	Valinhos	121
<i>P. edulis</i>	Registro, SP	617
<i>P. edulis</i>	Propiá, PE	748 ⁽²⁾
<i>P. edulis</i>	Bragança Paulista, SP	777
<i>P. edulis</i>	Vera Cruz, SP	941
<i>P. edulis</i>	Vera Cruz, SP	960 ⁽³⁾
<i>P. edulis</i>	Tupã, SP	996
<i>P. edulis</i>	Tupã, SP	997
<i>P. edulis</i>	Vera Cruz, SP	1007 ⁽³⁾
<i>P. edulis</i>	Pilar do Sul-SP	1039
<i>P. edulis</i>	Paulínia-SP	1040
<i>P. edulis</i>	S. João Boa Vista-SP	1151
<i>P. edulis</i>	Jaguariuna-SP	1154
<i>P. edulis</i>	Dracena-SP	1166
<i>P. edulis</i>	Cosmópolis-SP	1168
<i>P. edulis</i>	Ouro Verde, SP	1239
<i>P. edulis</i>	Guaimbê-PR	1261
<i>P. edulis</i>	Itatiba, SP	1294
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Londrina, PR	1254
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Siqueira Campos, PR	1255
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Londrina, PR	1270
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Apucarana, PR	1271
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Marumbi, PR	1272
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Londrina, PR	1273
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Londrina, PR	1288
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Morretes, PR	8716 ⁽⁴⁾
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Londrina, PR	11330 ⁽⁴⁾
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Amoreira, PR	11342 ⁽⁴⁾
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Nova Esperança, PR	11407 ⁽⁴⁾
<i>Passiflora</i> sp.	Vargem Bonita, DF	1314
<i>Passiflora</i> sp.	Reserva G, DF	1315
<i>Passiflora</i> sp.	Brazlândia, DF	1316
<i>Passiflora</i> sp.	Feira de Santana, BA	1317
<i>Passiflora</i> sp.	Araguari, MG	1318
<i>Passiflora</i> sp.	Vargem Bonita, DF	1320
<i>Passiflora</i> sp.	Brazlândia, DF	1321
<i>Passiflora</i> sp.	Planaltina, DF	1322
<i>Passiflora</i> sp.	Serra do Ibiapaba, CE	1323
<i>Passiflora</i> sp.	Serra do Ibiapaba, CE	1324
<i>Passiflora</i> sp.	Brasília, DF	1325
<i>Passiflora</i> sp.	Ponte Alta, DF	1327
<i>Passiflora</i> sp.	Feira de Santana, BA	1328
<i>Passiflora</i> sp.	Serra do Ibiapaba, CE	1332
<i>Passiflora</i> sp.	beira de estrada, SE	1333
<i>Passiflora</i> sp.	Brasília, DF	AT-712 ⁽⁴⁾
<i>Passiflora</i> sp.	Brasília, DF	AT-717 ⁽⁴⁾
<i>Passiflora</i> sp.	Propiá, CE	AT-720 ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ IBSBF - Coleção de Culturas da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico

⁽²⁾ linhagens utilizadas no preparo de antissoros

⁽³⁾ linhagens apigmentadas

⁽⁴⁾ linhagens não incorporadas à Coleção de Culturas IBSBF

3.2.Preparo da suspensões bacterianas, suspensões bacterianas autoclavadas, complexo proteico das membranas, exopolissacarídeos e glicoproteínas

Foram preparadas suspensões bacterianas adicionando-se uma alçada do crescimento bacteriano em tubos de ensalo contendo 5 mL de água destilada. Em seguida, este material foi homogeneizado em agitador rotativo, por 3 min, a 25 °C. Parte desta preparação foi autoclavada a 121 °C, por 15 min e denominada suspensão bacteriana autoclavada (SBA) (ESQUEMA 1).

A preparação do complexo proteico da membrana (CPM) foi feita com algumas modificações introduzidas no método de THAVEECHAI & SCHAAD (1986). As células bacterianas de cada placa foram coletadas com alça de Drigalsky, em 2,5 mL de solução de cloreto de lítio (LiCl) 0,2M. Estas suspensões foram colocadas a 45 °C, por 180 min, com agitação constante (cerca de 250 r.p.m.). Em seguida, as suspensões foram submetidas a dois ciclos de centrifugação (12000g/15 min e 40000g/40 min-4°C). Os precipitados foram descartados (P-1 e P-2) e os líquidos sobrenadantes (LS-2) foram ultracentrifugados a 100000 g por 120 min. Os líquidos sobrenadantes (LS-3) foram descartados e os precipitados (P-3) ressuspensos em água destilada a 1/20 do volume original, constituindo o CPM (ESQUEMA 1).

A extração dos exopolissacarídeos foi baseada em metodologia proposta por DE BOER & SCHAAD (1990). O crescimento bacteriano foi coletado em 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH 7, agitado vigorosamente em agitador rotativo, por 1 min, a temperatura de 25 °C e em seguida centrifugado a 12000 g,

por 60 min. O precipitado (P-4) foi descartado e o líquido sobrenadante (LS-4) tratado com quatro volumes de acetona a -20°C . Este material foi mantido por 16 h a 8°C , sendo posteriormente centrifugado a 12000 g, por 30 min. Descartou-se o líquido sobrenadante (LS-5) e o precipitado (P-5) foi ressuspensionado em 200 μL de água destilada, constituindo a fração EPS (ESQUEMA 1).

As glicoproteínas da cápsula bacteriana (GP) foram extraídas seguindo metodologia descrita por DIGAT & CAMBRA (1976), com pequenas modificações. O crescimento bacteriano foi coletado com água destilada (2,5 mL/placa). Esta suspensão foi agitada (aproximadamente 250 r.p.m.) durante 30 min, a temperatura de 25°C . A suspensão foi centrifugada a 12000g, por 30 min, a 4°C . O líquido sobrenadante (LS-6) foi descartado e o precipitado (P-6) foi submetido a filtração em papel de filtro, ajustando-se o pH do filtrado para 7. Este filtrado foi tratado com igual volume de solução saturada de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ e mantido por 16 h a 8°C . Em seguida, o material foi centrifugado a 15000 g, por 30 min, a 4°C . O líquido sobrenadante (LS-7) foi descartado e o precipitado (P-7) ressuspensionado em 1/10 do volume original em água destilada, sendo posteriormente dialisado contra água destilada, por 48 h, constituindo-se na fração GP (ESQUEMA 1).

No QUADRO 2 estão relacionadas as linhagens utilizadas nos testes serológicos, com antígenos na forma de suspensão bacteriana (SB), suspensão bacteriana autoclavada (SBA), exopolissacarídeos (EPS), complexo proteico das membranas (CPM) e glicoproteínas (GP).

QUADRO 2 - Linhagens de *X.o.pv.pasiflorae* utilizadas nos testes de dupla difusão em ágar, com as respectivos antígenos: suspensão bacteriana (SB), suspensão bacteriana autoclavada (SBA), exopolissacarídeos (EPS), complexo proteico das membranas (CPM) e glicoproteínas (GP)

IBSBF	SB	SBA	EPS	CPM	GP
120					
121					
428					
444					
445					
617					
658					
748					
777					
941					
960					
996					
997					

IBSBF	SB	SBA	EPS	CPM	GP
1007					
1039					
1040					
1161					
1164					
1166					
1168					
1171					
1239					
1264					
1265					
1267					
1261					
1270					

IBSBF	SB	SBA	EPS	CPM	GP
1271					
1272					
1273					
1288					
1294					
1314					
1316					
1316					
1317					
1318					
1320					
1321					
1322					
1323					

IBSBF	SB	SBA	EPS	CPM	GP
1324					
1325					
1327					
1328					
1332					
1333					
AT-712					
AT-717					
AT-720					
I-8716					
I-11330					
I-11342					
I-11407					

antígenos utilizados

3.3. Preparo de antissoros e testes serológicos de dupla difusão em ágar

Linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* originárias de *P.alata* e *P.edulis* foram utilizados para a produção de antissoros e testes serológicos de dupla difusão em ágar.

Foram preparados antissoros para as linhagens IBSBF-444-*P.alata*, IBSBF-748-*P.edulis* e IBSBF-1171-*P.alata*, tendo sido codificados, respectivamente, como AS-XCP-444-*P.alata*, AS-XCP-748-*P.edulis* e AS-XCP-1171-*P.alata*.

Os antígenos para imunização foram preparados a partir do crescimento bacteriano nas condições anteriormente citadas. Após o crescimento, adicionou-se água destilada em uma placa de cada uma destas linhagens e o material foi homogeneizado durante 3 min em agitador rotativo de tubos. Essas suspensões foram utilizadas como antígeno no preparo de antissoros específicos.

O esquema de imunização dos antígenos via linfonódulo (OLIVEIRA, 1975) foi feito em coelhos pesando em média 2 kg. Antes da primeira injeção de antígeno, os animais foram sangrados para a obtenção do soro normal (SN), empregado como controle negativo das reações serológicas. O número de imunizações por animal foi variável, na dependência dos títulos dos antissoros obtidos, determinados por reações de dupla difusão em ágar. As sangrias foram efetuadas semanalmente, pela veia marginal da orelha (20 mL/sangria). Após a sangria, o sangue foi conservado a temperatura de 25 °C por 1 h e em seguida armazenado a 8 °C, por 16 h. Esse material foi então centrifugado (16000g/3 min), coletando-se os

antissoros, que foram armazenados em frascos plásticos, em volumes (200 μ L), a 20 °C.

Os testes de dupla difusão em ágar foram efetuados em lâminas de microscopia óptica. Em cada lâmina foram adicionados 3 mL de ágar fundente, a 1% em solução salina (NaCl 0,85%) contendo 0,02% de azida de sódio. Após a solidificação, as lâminas foram furadas seguindo-se protocolos previamente determinados. Antígenos e antissoros foram colocados nos respectivos orifícios. As lâminas foram mantidas a temperatura ambiente, até 72 h. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em solução salina (24 horas), desidratadas e coradas com negro de amido.

3.3.1. Análise estatística das reações serológicas com antígenos na forma de suspensão bacteriana

Os resultados das reações serológicas de dupla difusão em ágar entre antígenos na forma de suspensão bacteriana e os antissoros AS-XCP-444-*P.alata*, AS-XCP-748-*P.edulis* e AS-XCP-1171-*P.alata* foram analisados pelo programa NTSYS-pc, Versão 1.8 (Applied Biostatistic, Inc.), comparando as linhagens analisadas e gerando uma matriz de similaridade (SM, coeficiente "simple matching"). A partir destas matrizes, foram construídos dendrogramas representando as semelhanças entre as linhagens pelo UPGMA ("Unweighted pair-group using averages) de acordo com FANTINATTI (1997).

3.4..Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato (PAGE/SDS)

Linhagens de XCP cultivadas em NA por 48h a 28 °C foram submetidos a PAGE/SDS.

Alíquotas dos isolados de *X. c. pv. passiflorae*, retiradas diretamente de placas de cultura (cerca de 20 mg) foram homogeneizadas em tampão de amostra e submetidas a aquecimento a 100 °C, durante 5 min. Em seguida, esses materiais foram centrifugados a 16000 g, por 3 min. Os precipitados foram descartados e aos líquidos sobrenadantes foram adicionados iguais volumes do tampão de amostra. Os materiais assim preparados foram conservados a - 20°C, até serem utilizados nas eletroforeses (APÊNDICE 1)

As amostras para as eletroforeses, constituídas por proteínas totais (PT) foram distribuídas em géis na concentração de 10%, em placas verticais e submetidos a uma diferença de potencial de 140 V, por 150min, seguindo metodologia descrita por HAMES & RICKWOOD (1981). Após esse período, os géis foram fixados por 16 h, à temperatura de 25 °C. Em seguida, os géis foram corados por prata, seguindo a técnica descrita por BLUM, BEIER & GROSS (1987) (APÊNDICE 2).

Além das linhagens de XCP relacionadas no QUADRO 1, também foram submetidas à PAGE/SDS as linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP) (IBSBF-1152), *X. campestris* pv. *campestris* (XCC) (IBSBF-1160), *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (IBSBF-657 e 873) e *Xanthomonas vesicatoria* (XV) (IBSBF-1145) para fins comparativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Serologia

Os resultados dos testes de dupla difusão em ágar das cinquenta e quatro linhagens de *X. c.* pv. *passiflorae* utilizando-se os antissoros AS-XCP-444-*P. alata*, AS-XCP-748-*P. edulis* e AS-XCP-1171-*P. alata* podem ser observados na TABELA 1 e no ESQUEMA 2.

O número máximo de linhas de precipitação observado para todas as formas de antígenos testadas (SB, SBA, CPM, EPS e GP) foi três. Essas linhas, classificadas como linha "a", linha "b" e linha "c", expressam a posição dos arcos de precipitação (antígenos/antissoros) nos testes de dupla difusão em ágar (ESQUEMA 2).

Para os três antissoros utilizados, as frações que apresentaram os maiores percentuais de reações positivas foram SB e CPM. As frações SBA e GP foram as que mostraram os menores percentuais de reações positivas.

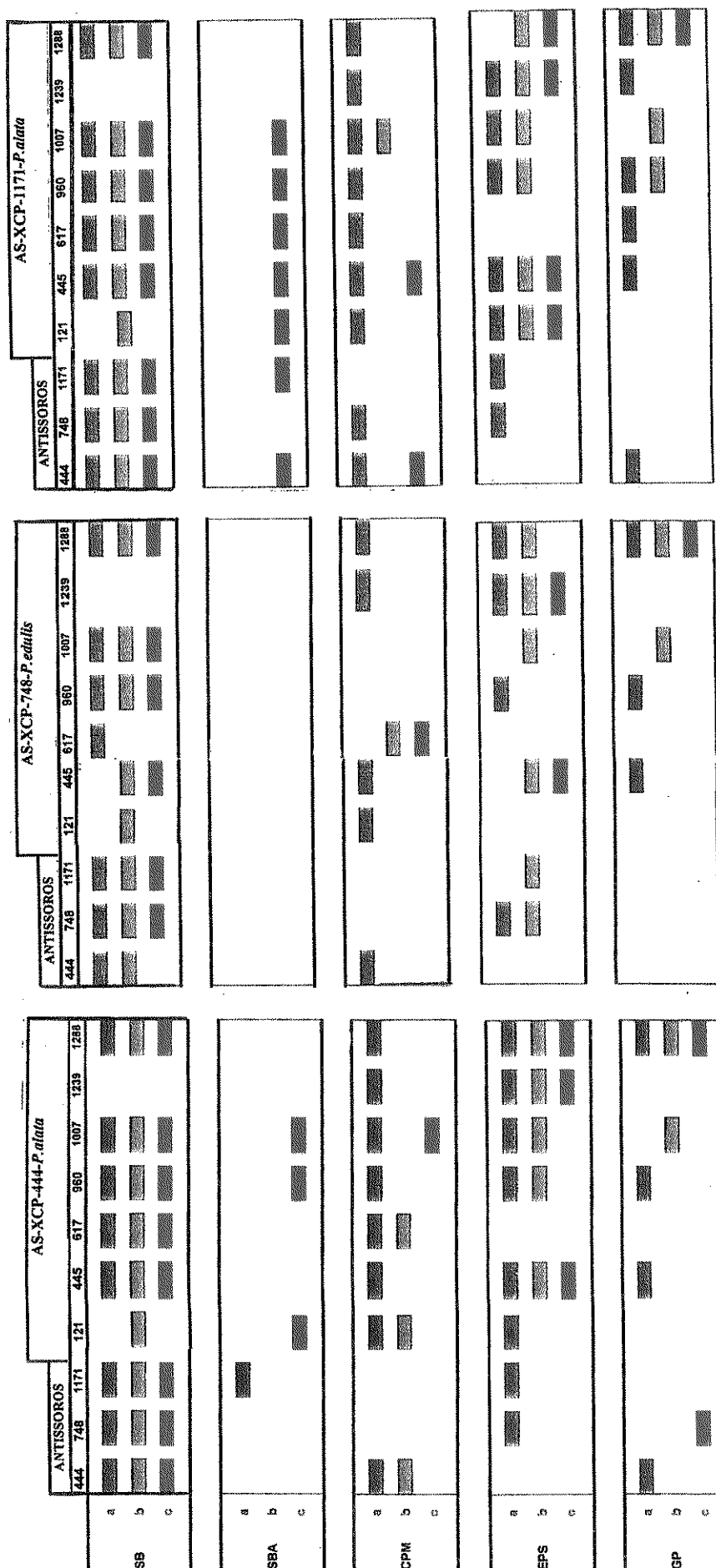
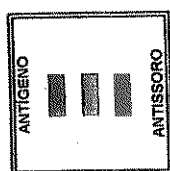
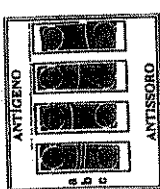
Os três antissoros testados foram produzidos a partir de antígenos na forma de suspensões bacterianas. Isto explica o alto percentual de reações positivas observado nas reações serológicas de dupla difusão em ágar com este tipo de antígeno. A análise da TABELA 1 mostra que nos antígenos do tipo SBA, nos extratos bacterianos (GP e CPM) ou ainda nos componentes bacterianos purificados

TABELA 1 Resultados dos testes serológicos de dupla difusão em ágar entre os antissoros AS-XCP-444-*P. alata*, AS-XCP-748-*P. edulis* e AS-XCP-1171-*P. alata* e as frações SB (suspensões bacterianas); SBA (suspensões bacterianas autoclavadas); CPM (complexo proteico da membranas); EPS (exopolissacarídeos) e GP (glicoproteínas) de cinquenta e quatro linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.¹

		AS-XCP-444	AS-XCP-748	AS-XCP-1171	% MÉDIA
SB	a	79,4	61,7	54,9	65,3
	b	88,1	72,8	82,8	81,2
	c	77,7	44,2	52,5	58,1
SBA	a	12,1	31,4	26,7	23,4
	b	0,0	10,0	5,5	5,2
	c	17,1	10,0	25,0	17,4
CPM	a	92,2	72,8	90,5	85,2
	b	35,0	33,6	35,7	34,8
	c	35,0	7,4	17,1	19,8
EPS	a	66,7	31,1	49,6	49,1
	b	43,0	41,1	45,8	43,3
	c	29,8	28,5	27,5	28,6
GP	a	30,0	30,0	50,0	36,6
	b	20,0	20,0	30,0	23,3
	c	20,0	10,0	10,0	13,3

¹ Resultados expressos em percentagens da linhas de precipitação "a", "b" e "c".

ESQUEMA 2 - Testes serológicos de dupla difusão em ágar entre os antissoros AS-XCP-444-*P. alata*, AS-XCP-748-*P. edulis*, e AS-XCP-1171-*P. alata* e antígenos de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, na forma de suspensão bacteriana (SB), suspensão bacteriana autoclavada (SBA), complexo proteico da membrana (CPM), exopolissacarídeos (EPS) e glicoproteínas (GP)



(EPS), as reações positivas foram detectadas em menor percentual. Para cada uma das formas de antígenos testadas (SB, SBA, EPS, CPM e GP) há seleção de antígenos diferentes, não só com relação à localização destes antígenos na célula bacteriana (antígenos flagelares, capsulares, da membrana), mas também com respeito às características químicas destes antígenos (proteínas, lipoproteínas, lipopolissacarídeos, glicoproteínas).

Para o AS-XCP-444-*P. alata* foi verificado que entre as três linhas de precipitação observadas, a linha de precipitação "b" foi detectada em 88,1% do linhagens testadas com antígenos na forma de SB. Já na fração CPM, o maior percentual de reações positivas foi detectado para a linha de precipitação "a", com 92,2% de reações positivas. Os testes com antígenos na forma de SBA foram os que apresentaram os menores percentuais de reações positivas, seguido por GP. Não foi detectado, em nenhuma das linhagens testadas para SBA, a linha de precipitação "b". Para os antígenos na forma de EPS e GP, as reações positivas foram principalmente com a linha de precipitação "a" (TABELA 1 e ESQUEMA 2).

Para o antissoro AS-XCP-748-*P. edulis*, dentre as três linhas de precipitação, a linha de precipitação "b" foi a detectada no maior número de linhagens bacterianas (72,8%), conforme a TABELA 1 e o ESQUEMA 2.

Para o AS-XCP-1171-*P. alata*, à. semelhança do que foi observado para o AS-XCP-444-*P. alata* e AS-XCP-748-*P. edulis*, na fração SB a linha de precipitação "b" foi a observada em maior percentual (82,8%). Para a fração CPM, o maior percentual de linhas positivas foi verificado para a linha de precipitação "a" (TABELA 1). As formas de antígenos que apresentaram os menores percentuais de reações positivas também foram SBA e GP.

A observação de TABELA 1 mostra que os maiores percentuais de reações positivas foram obtidos com o emprego de SB e CPM. Quando se analisa o total de reações positivas (linhas "a" + "b" + "c") entre os antígenos na forma de SB e CPM é verificado alto percentual de reações positivas para SB que é, em média, superior àquele observado para a fração CPM. Desta maneira, a comparação entre estas duas formas de antígeno (SB e CPM) deixa claro que a fração SB é a mais indicada para fins de identificação do agente causal, visto que, além de reagir com grande parte das linhagens de *X. c. pv. passiflorae*, é a que se obtém com maior facilidade e rapidez dentre as formas de antígeno testadas.

SCHAAD (1989) considera como um principais problemas da técnica de dupla difusão em ágar a dificuldade de se obter antissoros que reajam com um grande número de linhagens bacterianas dentro de um mesmo taxon. Entretanto, para *X. c. pv. passiflorae* os dados apresentados na TABELA 1 mostram que antissoros produzidos a partir de células totais (SB) são indicados para detecção de linhagens desta fitobactéria, uma vez que altos percentuais de resultados positivos foram obtidos nas reações de dupla difusão em ágar.

SCHAAD (1976) considera que uma das questões mais importantes na utilização de técnica serológica é a escolha do tipo de antígeno que deve ser utilizado para a produção de antissoros. As vantagens em se produzir antissoros a partir de antígenos purificados está em se empregar esses antissoros em testes com macerados de plantas ou de suspensões bacterianas, minimizando dos riscos da ocorrência de reações inespecíficas, o que iria contra uma das principais e mais importantes características da serologia - a alta especificidade. Como uma das principais finalidades desse trabalho foi utilizar os antissoros com fins de diagnóstico, a escolha da fração SB foi a mais indicada, visto reagir com grande números de linhagens de *X.c. pv. passiflorae*, sem ter apresentado reações positivas com macerados de plantas sadias. Entretanto, em decorrência da não identificação de algumas linhagens, mesmo que em pequeno número, os testes serológicos também com a fração CPM talvez possam minimizar este problema.

Testes de dupla difusão em ágar empregando-se tecido vegetal macerado, com sintomas característicos de *X.c. pv. passiflorae* e os três antissoros foram positivos. Tais resultados, confirmados por testes de patogenicidade, permitem concluir que a detecção e a confirmação da identidade desta bactéria em materiais suspeitos de infecção pode ser efetuada sem a necessidade do isolamento e purificação da do agente causal.

Os resultados obtidos também evidenciam que antígenos na forma de SBA, EPS e GP não são indicados para a identificação e/ou diagnose de *X. c. pv. passiflorae*, em testes de dupla difusão em ágar. Estas formas de antígeno, principalmente a fração SBA, apesar de não ter aplicabilidade na diagnose,

provavelmente possam ser úteis para experimentos visando a separação das linhagens desta fitobactéria em serogrupos.

Embora a fração CPM também apresente altos percentuais de reações positivas, reconhecendo grande parte das linhagens testadas, a sua utilização para fins de diagnóstico apresenta algumas desvantagens quando comparada a fração SB. Estas desvantagens relacionam-se principalmente a extração da fração CPM, que envolve isolamento, purificação e multiplicação de células bacterianas em larga escala. Além disso, a maior especificidade da fração CPM pode apresentar problemas, deixando de reconhecer algumas linhagens de *X.c.pv.passiflorae* e consequentemente, implicar em falsos resultados negativos.

A observação do ESQUEMA 2 também permite concluir que há diferenças entre os três antissoros testados, porém não foi possível separar as linhagens de *X. c. pv. passiflorae* isoladas de *P. edulis* daquelas provenientes de *P. alata* pelos testes de dupla difusão em ágar.

A análise estatística dos resultados dos testes de dupla difusão em ágar para os antígenos na forma de suspensão bacteriana pode ser observada nas FIGURAS 1, 2 e 3.

Os dendogramas de AS-XCP-444- *P. alata* e AS-XCP-1171- *P. alata* são semelhantes (FIGURAS 1 e 3). Ambos apresentam dois grupos com similaridades superiores a 65%. Quando as mesmas linhagens são comparadas utilizando-se o AS-XCP-748- *P. edulis* nota-se a presença de três grupos com similaridades superiores a 60% (FIGURA 2).

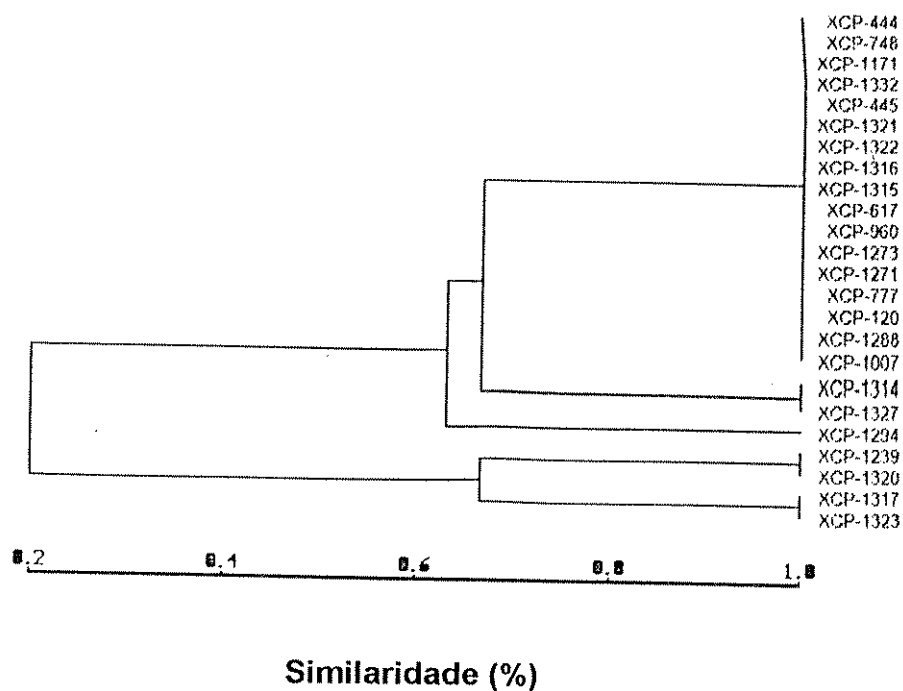


FIGURA 1 - Dendrograma comparativo entre linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em testes de dupla difusão em ágar com o antissoro AS- XCP-444- *P. alata* e antígenos na forma de suspensão bacteriana (SB).

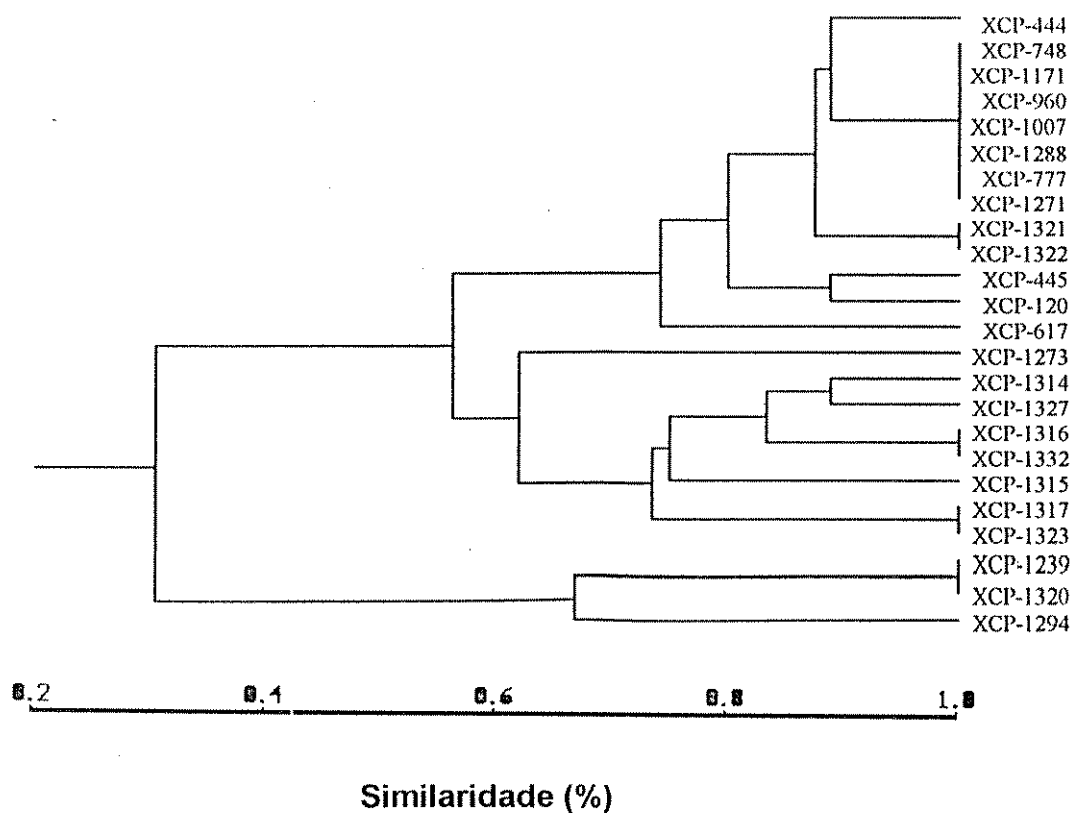


FIGURA 2 - Dendrograma comparativo entre linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em testes de dupla difusão em ágar com o antissoro AS- XCP-748- *P. edulis* e antígenos na forma de suspensão bacteriana (SB).

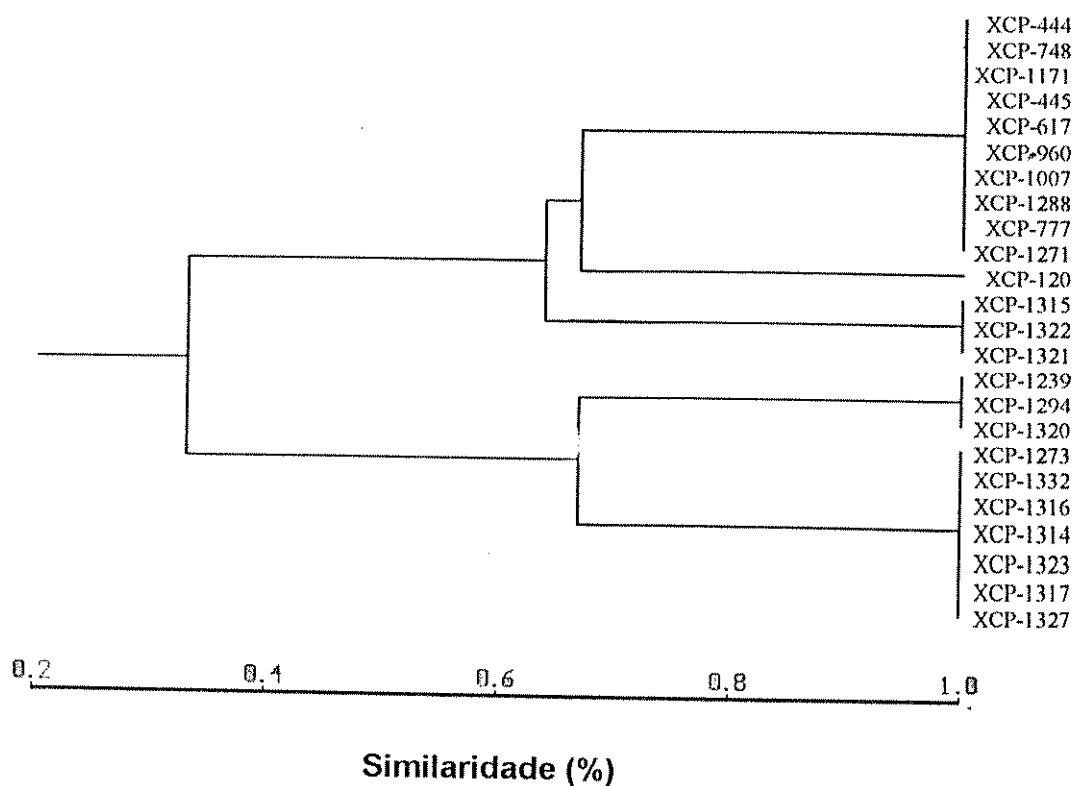


FIGURA 3 - Dendrograma comparativo entre linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em testes de dupla difusão em ágar com o antissoro AS- XCP-1171- *P. alata* e antígenos na forma de suspensão bacteriana (SB).

Os dados obtidos com as análises estatísticas usadas para a construção destes dendrogramas, embora permitam separar as linhagens testadas em vários grupos, não possibilitam diferenciar linhagens originárias de *P. alata* daquelas provenientes de *P. edulis*.

4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato(PAGE/SDS)

Foram analisadas cinquenta e quatro linhagens de *X. c. pv. passiflorae* através de PAGE/SDS de proteínas totais. Além das eletroforeses com proteínas solúveis, as frações SBA, EPS, CPM e GP das linhagens relacionadas no ESQUEMA 2 foram submetidas ao mesmo tipo de eletroforese, de maneira similar àquela descrita para as proteínas solúveis (fração SB).

A linhagem XCP-1320 apresentou duas bandas com pesos moleculares de 15 e 21 kDa, não observadas nas demais linhagens. A análise visual dos géis também mostrou que algumas linhagens (XCP-121, XCP-148, XCP-444, XCP-617 e XCP-1007) não apresentaram uma banda de 25 kDa, observada nas demais linhagens testadas.. Além disso, as linhagens XCP-960 e XCP-941 apresentaram uma banda de 28kDa, não observada nas demais linhagens testadas.

Nas linhagens XCP-AT-720, XCP-1322, XCP-8716, XCP-11323, XCP-120 e XCP-1288 verificou-se a presença de uma banda de 31,2 kDa (FIGURA 4).

A comparação do perfil eletroforético de proteínas totais das linhagens de *X. c. pv. passiflorae* com linhagens de *X. a. pv. mangiferaeindicae*, *X. a. pv. phaseoli*, *X. c. pv. campestris* e *X. vesicatoria* mostra algumas diferenças, porém não foi

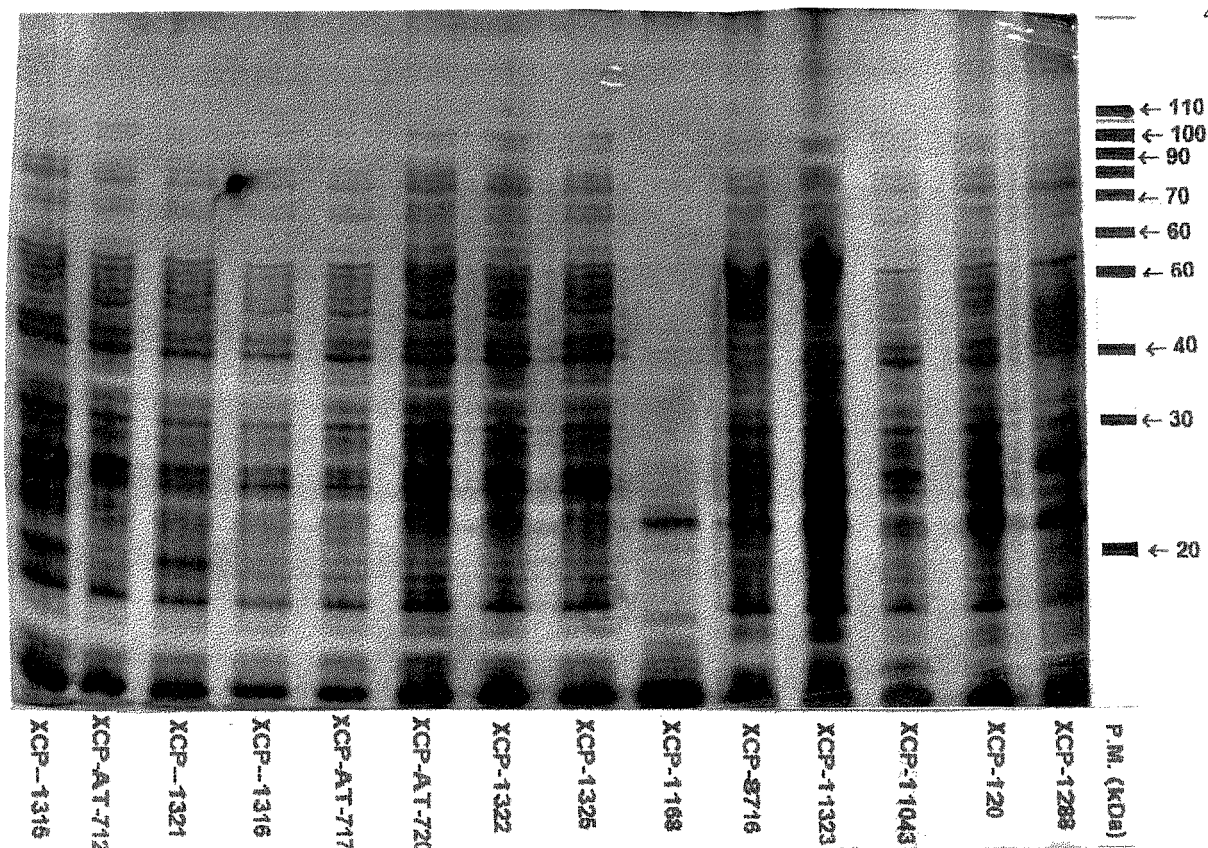


FIGURA 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato de algumas linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*.

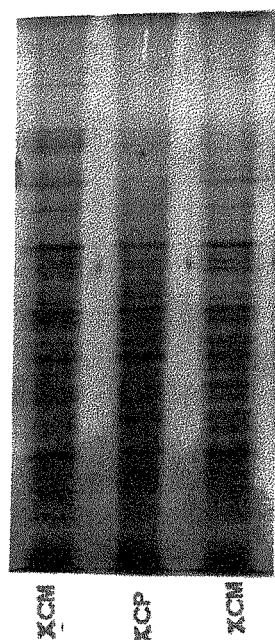


FIGURA 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato comparando uma linhagem de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (XCP) e duas linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (XCM)

possível detectar-se de maneira clara e precisa bandas que pudessem ser consideradas como marcadoras para *X. c. pv. passiflorae*. A observação entre as linhagens de *X. c. pv. passiflorae* e *X. a. pv. mangiferae* mostra um perfil de proteínas totais (SB) extremamente similar (FIGURA. 5).

WENDLAND, UENO & LEITE JR. (1996) desenvolveram trabalhos comparativos entre linhagens de *X. c. pv. passiflorae* e verificaram que uma das linhagens apresentava um perfil proteico diferente das demais, com a ausência de uma banda de 35,6 kDa e a presença de bandas de 39,2, 54,7 e 56,5 kDa, exclusivas desta linhagem. O perfil eletroforético determinado no presente trabalho para esta mesma linhagem não permitiu evidenciar tais diferenças.

Um dado interessante seria submeter linhagens de *X. c. pv. passiflorae* a PAGE/SDS de proteínas totais logo após o isolamento da bactéria da planta hospedeira e comparar estes perfis com aqueles obtidos com a partir de linhagens liofilizadas. Segundo TAHARA & ROSATO (1997), linhagens de *X. c. pv. passiflorae* cultivadas em meios de culturas contendo extrato de folhas de maracujazeiro podem expressar ou não certas proteínas. A comparação entre linhagens recém isoladas com aqueles mantidas sob liofilização pode dar indicativos se a indução ou repressão de genes também pode ocorrer "in vivo". Algumas linhagens de *X. c. pv. passiflorae* produzem substâncias fitotóxicas (BERIAM & MALAVOLTA JR. & ROSATO, dados não publicados), que quando inoculadas em folhas de maracujazeiro induzem sintomas similares àqueles produzidos nas inoculações com a própria bactéria.

A análise da fração SBA por PAGE/SDS mostrou que, embora algumas linhagens (XCP-444 e XCP-1171) tenham mostrado a presença de bandas após a coloração por prata, estas bandas foram difusas, sem definição, não permitindo a identificação de bandas individualizadas semelhantes àquelas observadas nos géis de SB. A autoclavagem das suspensões bacterianas (121 °C/20 min) provavelmente deva ter desnaturado as proteínas. Esta ausência de bandejamento está de acordo com o que foi observado nas reações serológicas. A fração SBA foi a que apresentou o menor número de reações positivas. Como sugerido por DE BOER & SCHAAD (1990), a possível explicação para este fato é que deva ter ocorrido seleção de antígenos, principalmente aqueles constituídos por carboidratos.

As análises das frações EPS por PAGE/SDS evidenciaram a presença de bandas, provavelmente resultantes da contaminação da fração EPS por proteínas durante o processo de extração, para as linhagens XCP-445, XCP-748, XCP-960, XCP-1171 e XCP-1239. Para a linhagem XCP-960 foram visualizadas bandas proteicas de baixo, médio e alto peso molecular, variando de 10 a 120 kDa.

As eletroforeses da fração CPM não apresentaram um padrão de bandejamento bem definido, inviabilizando qualquer tipo de análise. Os perfis de proteínas de membranas de outros patovares de *X. campestris* (*X. c.* pv. *campestris*, p.ex.) ou mesmo de outras espécies (*X. axonopodis* pv. *clitri*) mostram perfis proteicos bem definidos, com bandas entre 10 a 120 kDa, permitindo, inclusive, a diferenciação de patótipos dentro do patovar *clitri* de *X. axonopodis* (RODRIGUES NETO, BERIAM & OLIVEIRA, 1992). Embora as eletroforeses de CPM das linhagens de *X. c.* pv. *passiflorae* tenham sido realizadas

nas mesmas condições daquelas padronizadas para *X. c. pv. campestris* e *X. a. pv. citri*, provavelmente deva ter ocorrido desnaturação de proteínas das linhagens de *X. c. pv. passiflorae*, o que pode ter acarretado o bandeamento difuso observado.

A revelação dos géis de poliacrilamida por prata (BLUM, BEIER & GROSS, 1987) é extremamente sensível, detectando proteínas na ordem de nanogramas. Para as linhagens de *X. c. pv. campestris* e *X. a. pv. citri*, os perfis proteicos são revelados, em média, dentro de dez minutos, ao passo que para as linhagens de *X. c. pv. passiflorae* a revelação de algumas bandas só ocorreu após 20 min de tratamento na solução reveladora. Este é um dado adicional mostrando que as proteínas de membrana das linhagens de *X. c. pv. passiflorae* não devem ser armazenadas nas mesmas condições padronizadas para outras *Xanthomonas* (-20°C) quando o objetivo é a determinação do perfil eletroforético.

Nas eletroforeses das frações GP só se observaram bandas proteicas para as linhagens XCP-445 e XCP-1288. Quando estes resultados são comparados àqueles obtidos nos testes serológicos, observa-se que tanto o isolado XCP-445 como o isolado XCP-1288 apresentaram reações serológicas positivas com os três antissoros (AS-XCP-444-*P. alata*, AS-XCP-748-*P. edulis* e AS-XCP-1171-*P. alata*), conforme se observa no ESQUEMA 2.

As linhagem XCP-960 e XCP-1007 também reagiram com os três antissoros, mas quando XCP-960 foi submetida à PAGE/SDS não foi detectada nenhuma banda proteica. Embora a fração GP de XCP-1007 não tenha sido submetida à PAGE/SDS, a comparação dos dados de serologia e eletroforese da linhagem

XCP-960 com as demais estirpes são diferentes para a fração GP. Estas diferenças podem estar relacionadas ao fato destas duas estirpes serem apigmentadas.

A linhagem XCP-1261, incorporado à Coleção de Culturas IBSBF como *X. c. pv. passiflorae*, apresentou perfil de proteínas muito diferente quando comparado as demais linhagens testadas. Além disso, serologicamente não reagiu com nenhum dos três antissoros produzidos para *X.c.pv.passiflorae* e não apresentou patogenicidade quando inoculado artificialmente em plantas de *P.edulis*. Esses dados permitem afirmar que a linhagem XCP-1261 não pertence ao gênero *Xanthomonas*, demonstrando que tanto as reações de dupla difusão em ágar com a PAGE/SDS são técnicas que permitem a correta identificação de *X. c. pv. passiflorae*.

Os resultados de PAGE/SDS estão de acordo com os resultados obtidos nos padrões por PCR ("Polymerase Chain Reaction), que mostram grande similaridade entre as linhagens de *X. c. pv. passiflorae* (E.R.Gonçalves, comunicação pessoal).

Os resultados obtidos pelo estudo serológico e perfil eletroforético das linhagens de *X.c.pv.passiflorae* evidenciam que ambas as técnicas podem ser utilizadas na identificação desta fitobactéria. Dentre estas duas técnicas, os testes serológicos de dupla difusão em ágar com antissoros produzidos a partir de suspensões bacterianas apresentaram resultados rápidos e seguros. As técnicas serológicas de dupla difusão em ágar podem ser uma alternativa para a detecção de *X. c. pv. passiflorae* em lotes de sementes. Como sementes infectadas

constituem a principal forma de disseminação deste patógeno, a seleção de sementes sadias é uma importante medida visando o controle da bacteriose do maracujazeiro.

Os resultados obtidos por eletroforese mostram uma grande similaridade entre as linhagens testadas, mesmo entre aquelas originárias de diferentes hospedeiros, regiões produtoras ou mesmo de linhagens de *X. c. pv. passiflorae* causadoras de sintomas localizados ou sistêmicos. As pequenas diferenças observadas nos testes serológicos não permitem também a separação das linhagens empregadas em grupos serológicos nitidamente diferenciados.

Os dados obtidos neste trabalho sugerem também que as diferenças observadas na interação patógeno-hospedeiro relatadas por DIAS (1990) e OLIVEIRA et al. (1988) devem ser decorrentes principalmente de fatores climáticos ou pela variabilidade genética do hospedeiro ou mesmo da idade das folhas empregadas nos testes de patogenicidade e não da diferença em patogenicidade e virulência das linhagens testadas, permitindo inferir que materiais vegetais selecionados para resistência à mancha oleosa em uma região devem apresentar esta mesma característica em outras regiões onde eventualmente venham a ser cultivados.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem chegar as seguintes conclusões:

1. Das diferentes formas de antígenos de *X. c. pv. passiflorae* analisadas, a fração SB é a mais indicada para fins de diagnóstico da bacteriose do maracujazeiro, causada por *X. c. pv. passiflorae*, incluindo-se testes com tecido vegetal.
2. A fração CPM também pode ser utilizada com fins de diagnóstico, mas apresenta como principais desvantagens a necessidade do isolamento, purificação e posteriormente a extração do complexo proteico da membrana.
3. Os antígenos na forma de SBA, EPS e GP não são indicados para a identificação de *X. c. pv. passiflorae*, quando o principal objetivo é o diagnóstico.
4. Linhagens originárias de *P. alata* e *P. edulis* são serologicamente similares, não sendo possível diferenciá-las por testes de dupla difusão em ágar.

5. Em PAGE/SDS a utilização da fração SB é a que permite melhor caracterização das linhagens de *X. c. pv. passiflorae*.

6. As linhagens analisadas apresentaram grande similaridade, independente do hospedeiro e localização geográfica de origem.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JR., V. A.; RODRIGUES NETO, J. Ação de antibióticos "in vitro" contra *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 5, Instituto Biológico, São Paulo, SP. Resumos.1992. p.6.
- ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JR.; V. A.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM. L.O.S.. Ocorrência de estirpe não pigmentada de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. *Summa Phytopathologica*, v. 20, p. 47.1994.
- ALVAREZ, A. M.; BENEDICT, A. A.; MIZUMOTO, C. Y. Identification of xanthomonads and grouping of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with monoclonal antibodies. *Phytopathology*, v. 75, p.722-728. 1985.
- AZAD, H.; SCHAAD; N. W. Serological relationships among membrane proteins of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Phytopathology*, v. 78, p. 272-277.1988.

- BARBOSA, L. S.; ROMEIRO, R. S.; OLIVEIRA, J. R.; VIEIRA, J. M. ; SATURNINO, H. M. Detecção e quantificação de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em sementes de maracujá. *Fitopatol. bras.*, v. 18 (supl.), p. 270. 1993.
- BENEDETTI, C. E. Análise eletroforética de proteínas de membrana de *Pseudomonas avenae* e *Pseudomonas rubrilineans* patogênicas à gramíneas. Tese de Mestrado. UNICAMP, Campinas. 76p. 1991.
- BENEDETTI, C. E.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; OLIVEIRA, A. R. Eletroforese de proteínas na caracterização e diagnóstico de fitobactérias. *Summa Phytopathologica*, v. 17, p. 10. 1990.
- BERIAM, L. O. S.; ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.. Galha bacteriana (*Agrobacterium* sp.) em videira no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, v. 18, n.1, p.47.1992.
- BLUM, H.; BEIER, H. ; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, p.93-93. 1987.
- BRADBURY, J. F. *Guide of Plant Pathogenic Bacteria*. Farhan House, CAB International, 1986, 332p.
- CHARUDATTAN, R.; STALL, R. E.; BATCHELOR, D. L. Serotypes of *Xanthomonas vesicatoria* unrelated to its pathotypes. *Phytopathology*, v.63, p.1260-1265.1973.

- DE BOER, S. H.; SCHAAD, N. W. Preparation of antigens, bacteria. In: **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens**. APS Press: St.Paul, 1990. p.27-31.
- DIAS, S. M. Morte precoce do maracujazeiro amarelo (***Passiflora edulis* f. *flavicarpa***) causada por patógenos que afetam a parte aérea da planta. Tese de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília-DF.173p. 1990
- DIAS, S. C. ; TAKATSU, A. Ocorrência da bacteriose do maracujazeiro (***Passiflora* sp.**) causada por ***Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*** no Distrito Federal. **Fitopatol. bras.**, v. 12, p.140.1987.
- DIAS, S. C. ; TAKATSU, A. Morte precoce do maracujá amarelo (***Passiflora edulis* f. *flavicarpa***) associada a patógenos da parte aérea **Fitopatol. bras.**, v. 15, n. 2, p.126. 1990.
- DIGAT, B. ; CAMBRA, M. 1976. Specificity of antigens in ***Pseudomonas solanacearum*** E.F.Smith and application of serology for studying bacterial wilt. In: **Planning Conference and Workshop on the Ecology and Control of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum***. Raleigh, North Carolina.p. 38-57, 1976.

- DRISTIG, M. C. G.; DIANESE, J. C. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* biovars based on membran proteins patterns. *Phytopathology*, v. 80, p.641-646.1990.
- DYE, D. W. Genus IX *Xanthomonas* Dowson 1939. In: YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C.F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 21, p. 153-177. 1978.
- FANTINATTI, F. Diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de culturas agrícolas. Tese de Doutorado.UNICAMP, Campinas, 105p. 1997.
- GOTO, M. Fundamentals of bacterial plant pathology. San Diego,. Academic Press, 1992. 342p.
- HAMES, B. D. ; RICKWOOD, D. 1981. *Gel electrophoresis of proteins: a practical aproach*. IRL Press. Oxford.
- HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. *Serological methods for detection of viral and bacterial plant pathogens*. St.Paul, The American Phytopathological Society, 389 p.1990.

- HUISINGH, D.; DURBIN, R. D. Physical and physiological methods for differentiating among *Agrobacterium rhizogenes*, *A. tumefaciens* and *A. radiobacter*. *Phytopathology*, v. 57, p.922-933.1967.
- JACKMAN, P. J. H. Bacterial taxonomy based on eletrophoretic whole cell protein pattens. In: Goodfellow, M.; Minnikin, E.D. (Eds.) **Chemical methods in bacterial systematics**. London. Academic Press, p.115-128.1985.
- JABUONSKI, R.E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Avaliação da patogenicidade de bactérias do gênero *Erwinia* isoladas de batateira, tomateiro e de outras plantas hospedeiras. *Fitopatol. bras.*, v. 11, p. 587-597, 1986.
- KERSTERS, K. Polyacrilamide gel electrophoresis of bacterial proteins. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D. C (Eds.) **Methods in phytobacteriology**. Budapest. Akademiai Kiadó. p. 191-198.1990.
- KERSTERS, K.; DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic proteins patterns. *J. Gen. Microbiol.*, v.87, p. 33-342.1975.
- KIMURA, O.; KOSTLER, R. ; AKIBA, F. Estudos sobre os agentes do cretamento das folhas em maracujá no Estado do Rio de Janeiro. *Fitopatol. bras.*, v. 14, p.130. 1989.

KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D. C. **Methods In Phyto bacteriology.**

Budapest, Akademiái Kiado. 568 p. 1990.

KURODA, N. H. Avaliação do comportamento quanto a resistência de espécies e progênies de maracujazeiros a *Xanthomonas passiflorae* (Per.).

Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. (mimeografado).1981.

LEVINE, A. **An Introduction to laboratory technique in bacteriology.** New York.

The MacMillan Co. p. 68-79.1954.

MAKIMOTO, P.; MALAVOLTA JR., V. A.; RODRIGUES NETO, J. Controle

químico da bacteriose do maracujazeiro: resultados preliminares. In:

REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 7, Instituto Biológico, São Paulo,SP.1994. p.30.

MARINGONI, A. C. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith)

Dye em sementes de feijoeiro e consequências epidemiológicas. Tese de Doutorado. ESALQ/USP. Piracicaba, 132p. 1993.

MARQUES, A.B.A.; ROBBS, C.F.; BOITEUX, L.S.; PARENTE, P.M.G. **Índice de**

fitobacterioses assinaladas no Brasil. Brasília: EMBRAPA.

CENARGEN/SPI, 1994. 65p.

- MASUDA, Y. Aplicação da serologia na detecção de *Xanthomonas albilineans* em colmos de cana-de-açúcar. Tese de Doutorado. ESALQ/USP, Piracicaba. 107p. 1980.
- MELLO, S. C. M.; OLIVEIRA, M. Z. A. Ocorrência da bacteriose do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da Bahia. *Fitopatol. bras.*, v. 12, p.140.1987
- MURRAY, J.; FIXTER, L.; HAMILTON, I. D.; PIROMBELO, M. C. M.; QUINN, E. C.; GRAHAM, D. C. Serogroups of potato pathogenic *Erwinia carotovora* strains: identification by lipopolisaccharide electrophoresis patterns. *J.Appl.Microbiol*, v. 68, p. 231-240.1990.
- NOGUEIRA, P. A. Diversidade biológica da bactéria fitopatogênica *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 1991. 49p.
- NOGUEIRA, P. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; SILVEIRA, W. D.; OLIVEIRA, A. R. Caracterização de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* de diferentes hospedeiros através de análises eletroforéticas. *Fitopatol.bras.* v. 16, p..298.1990.
- OLIVEIRA, A. R. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção via linfonódulo. *Summa Phytopathologica*, v. 1, p.61-64. 1976.

- OLIVEIRA, G. H. N.; SUDO, S.; SILVA, J. R.; KIMURA, O. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* infectando vascularmente plantas de maracujazeiro (*P.edulis* f. *flavicarpa*). *Fitopatol. bras.*, v. 13, p.107, 1988.
- OLIVEIRA, M. Z. A.; MELLO, S. C. M. Microrganismos associados à sementes de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) na Bahia. *Fitopatol. bras.*, v. 12, p.154, 1987.
- PERUCH, L. A. M., SCHROEDER, A. L., BERTOLINI, E., CALVETTE, K. Ocorrência da mancha oleosa do maracujá no Estado de Santa Catarina. *Fitopatol. bras.*, v. 22 (supl), p.237.1997.
- PEREIRA, A. L. G. Contribuição ao estudo da etiologia da mancha oleosa da folha de maracujá (*Passiflora edulis* SIMS), causada por *Xanthomonas passiflorae* n.sp. Tese de Doutorado. ESALQ/USP. Piracicaba. 91p. 1968.
- PICCININ, E.; PASCHOLATI, S. F. Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha oleosa da folha do maracujazeiro causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. *Fitopatol. bras.*, v. 20 (supl.), p.340. 1995.
- PICCININ, E.; MALAVOLTA JR., V. A.; PASCHOLATI, S. F. Efeito da concentração de inóculo e da temperatura na severidade de *Xanthomonas*

campestris pv. *passiflorae* em folhas de maracujazeiro. **Fitopatol. bras.**, v. 20 (supl.), p.323 1995.

RAMUNDO, B. A.; CLAFLIN, L. E. Demonstration of synonymy between the plant pathogens *Pseudomonas avenae* and *Pseudomonas rubriligneans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 136, p.2029-2039.1990.

RODRIGUES NETO, J. Estudos serológicos em *Pseudomonas* spp. não fluorescentes e patogênicas à gramineas. Dissertação de Mestrado.ESALQ/USP. Piracicaba. 63p. 1984.

RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L. O. S.; KOMORI, N. Caracterização de isolados de *Xylella fastidiosa* de citros por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS. **Summa Phytopathologica**, v. 18, p. 46. 1992.

RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L. O. S.; OLIVEIRA, A. R. Estudo comparativo de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. citri através de eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS. **Fitopatol. bras.**, v. 18 (supl.), p. 295. 1993.

RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M. H.; MALAVOLTA JR.,V. A. Infecção natural em *Passiflora alata* AIT, por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, v. 10, p. 50.1984

SCHAAD, N. W. Serological identification of plant pathogenic bacteria. **Ann.Rev.Phytopthol.**, v.17, p.123-147.1979.

- SUGIMORI, M. H. Diferenciação serológica entre três patovares de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson aplicando a técnica do linfonódulo e da suspensão bacteriana. Dissertação de Mestrado. ESALQ/USP. Piracicaba. 63p. 1981.
- SUGIMORI, M. H. Caracterização serológica dos patovares brancos de *Xanthomonas campestris* e reação de mangueiras (*Mangifera Indica* L.) a *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeIndicae* (Patel, Moniz & Kulkarni, 1948) Robbs, Ribeiro e Kimura, 1974. Tese de Doutorado. ESALQ/USP. Piracicaba. 51p.1989.
- TAHARA, S. T; ROSATO, Y. B. Indução de proteínas específicas na interação de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* com hospedeiros compatíveis. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 43,1997, Goiânia, GO:Sociedade Brasileira de Genética, 1997. *Revista Brasileira de Genética*, v. 20 , n. 3 (supl.), p.283.
- THAVEECHAI, N. ; SCHAAD, N. W. Immunological characterization of a subspecies - specific antigenic determinant of a membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology*, v.76, p.:148-153. 1986.
- TORRES, F.; PONTE, J. J.. Estudo sobre o controle da bacteriose ou "morte precoce" (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) do maracujá amarelo..*Fitopatol. bras.*, v. 17, p.181. 1992.

- VALARINI, P. J. Método para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. Tese de Doutorado. ESALQ/USP. Piracicaba, 167p. 1990.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWING, S. J. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int.J.Syst.Bacteriol.*, v.45, p.472-489,1995.
- VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *J.Gen.Microbiol.*, v. 137, p.1677-1687. 1991a.
- VAUTERIN, L.; YANG, P.; HOSTE, B.; VANGANNEYT, M.; CIVEROLO, E. L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. citri by sodium dodecyl sulphate poliacrilamide gel electrophoresis of proteins, fatty acids analysis and DNA-DNA hidridization. *Int.J.Syst.Bacteriol.* v. 41, p. 535-543. 1991b.
- WENDLAND, A.; UENO, B.; LEITE JR., R. P. Avaliação da variabilidade de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* através de características fenotípicas e do perfil de proteínas totais por eletroforese. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. XIV, 1996, Curitiba: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1996. p. 324.

WILLEMS, A.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; BROECKE, L.; DEN, L. V.; DE LEY, J.

Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus,

Xylophilus gen.nov., as *Xylophilus ampellinus* (Panagopoulos 1969)

comb.nov. Int. J. Syst. Bacteriol., v. 37, p.422-430.1987.

YOUNG, J. M.; SADDLER, G. S.; TAKIKAWA, Y. et al.. Names of plant pathogenic

bacteria 1864-1995. Review of Plant Pathology, v.75, p.721-763, 1996.

YANO, T. ; PESTANA DE CASTRO, A. F. ; LAURETIS, J. A.; NAMEKATA, T.

Serological differentiation of bacteria belonging to the *Xanthomonas*

campestris group by indirect hemagglutination tests. An. Phytopath. Soc.

Japan, v. 45, p. 1 - 8. 1979.

APÊNDICE 1 Soluções para preparo do gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (PAGE/SDS) *

	GEIS (EM mL)	
	RESOLUÇÃO	EMPACOTAMENTO
tris-HCl 1,0M, pH 8,8	5,9	
tris-HCl 1,0M, pH 6,8		0,9
acrilamida/bisacrilamida (30g:0,8g)	5,0	0,9
água destilada	5,9	0,9
SDS a 10%	0,15µL	0,075µL
TEMED		
(N,N,N',N'tetrametiletlenodiamina)	0,02µL	0,02µL
solução de persulfato de amônio a 2,5%	1,5mL	0,75mL

* adaptado de HAMES & RICKWOOD (1981)

1. Tampão de Amostra

Tris-HCl 63mM pH 6.8, SDS 2,0%, 2 Beta -Mercaptoetanol 5,0% e
Sacarose 10%

2. Tampão do Reservatório 10X concentrado

Tris 0,25M, Glicina 1,92M, SDS 1%

APÊNDICE 2 Soluções e sequência para coloração dos géis de poliacrilamida com prata *

PROCEDIMENTOS	SOLUÇÕES
1. Fixação (mínimo de 1 h)	etanol a 50%, ácido acético 12% e formaldeído 75µL (,)
2. Lavagem do gel Lavar três vez/ 20min cada vez	etanol a 50% em água destilada
3. Tratamento com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) Manter o gel nesta solução por 1 min, com agitação constante.	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20mg/100mL de água destilada)
4. Lavagem do gel Lavar três vezes/20s cada vez.	água destilada
5. Tratamento com prata Manter o gel sob agitação constante por 20min	nitrito de prata (AgNO_3), a 0,2%, contendo 75µL de formaldeído, em água destilada.
6. Lavagem do gel	semelhante ao item 4
7. Líquido revelador O tempo de revelação é proporcional a quantidade de proteínas presentes no gel	carbonato de sódio a 6%, contendo 4mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2 mL da solução empregada no item 3) e 50µL de formaldeído, para um total de 100mL
8. Lavagem do gel	lavar duas vezes com água destilada, 20s/lavagem
9. Interrupção da reação	etanol a 50%, ácido acético 12% e formaldeído 75µL

* De acordo com BLUM, BEIER. & GROSS (1987)