

IVANETE TONOLE DA SILVA

**IMUNOGENICIDADE E ESPECIFICIDADE SOROLÓGICA DO
EXOPOLISSACARÍDEO CAPSULAR E LIPOPOLISSACARÍDEO DA
PAREDE CELULAR DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

IVANETE TONOLE DA SILVA

**IMUNOGENICIDADE E ESPECIFICIDADE SOROLÓGICA DO
EXOPOLISSACARÍDEO CAPSULAR E LIPOPOLISSACARÍDEO DA
PAREDE CELULAR DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2003.

Prof. José Mário da Silveira Mezencio
(Conselheiro)

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Conselheiro)

Prof^ª. Rosângela D'Arc de Lima Oliveira

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho

Prof. José Rogério de Oliveira
(Orientador)

A Deus.

A meus amados pais, Geraldo e Maria do Carmo.

Aos meus queridos irmãos, Ivan e Ivani.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em toda sua excelência, por acolher-me na graduação, e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro durante a execução deste trabalho.

Ao professor e amigo José Rogério de Oliveira, pela orientação e confiança desde a iniciação científica, pela paciência e pelo incentivo em todos os difíceis momentos.

Ao professor José Mario da Silveira Mezencio, pelos esclarecimentos científicos, pela paciência, pelas sugestões e pelo estímulo.

Aos professores Reginaldo da Silva Romeiro, Murilo Geraldo de Carvalho e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pelas críticas e sugestões que aperfeiçoaram o manuscrito.

À turma de Mestrado de 2001, em especial, Lylian, Aderlan e Leonardo, pelo companheirismo e agradável convívio.

Aos colegas de pós-graduação, professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia, especialmente, José Heleno Egídeo, Jesus Maciel Soares e José Divino Teixeira, pelas palavras de incentivo e agradável convívio.

Às “grandes” amigas: Maria Sueli Cardoso de Oliveira, Virgínia de Souza Álvares, Maria Neuza de Souza e Maria Raquel Silva, sempre dispostas a ajudar, pelo incansável estímulo e cumplicidade.

Aos amigos Fátima, Eduardo, Flavinha e Juninho, pelo carinho, pela torcida e pelo incentivo em todos os difíceis momentos.

A Marcos Vale, pelo amor, carinho, compreensão e inesgotável paciência... por estar sempre presente.

A meus pais e irmãos: Geraldo, Maria do Carmo, Ivan e Ivani, pelo referencial de dedicação, honestidade e perseverança, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

A todos de minha família e aos amigos que manifestaram seu apoio através de palavras, gestos e orações.

A Deus, princípio e fim de todas as coisas, pelo dom da vida, pela força e coragem, pelas oportunidades e por Seu amor incondicional.

BIOGRAFIA

IVANETE TONOLE DA SILVA, filha de Geraldo Alceno da Silva e Maria do Carmo Tonole da Silva, nasceu em 01 de dezembro de 1977, na cidade de Castelo, Espírito Santo.

Em março de 2001, graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais e, em abril de 2003, nesta mesma instituição, concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1 - Origem, preservação e obtenção das frações dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	9
2.1.1 - Extração do exopolissacarídeo capsular (EPS)	10
2.1.2 - Extração do lipopolissacarídeo da parede celular (LPS) ...	11
2.2 - Preparo do Imunógeno	11
2.2.1 - Preparo do adjuvante incompleto de Freund	12
2.3 - Imunização dos coelhos	12
2.4 - Obtenção do anti-soro policlonal	13
2.5 - Preparo do antígeno particulado (ANP)	13
2.6 - Preparo do antígeno solúvel (ANS)	13
2.7 - Determinação de título dos anti-soros policlonais	14
2.7.1 - Reação de aglutinação e precipitação em gota	14
2.7.1.1 - Reação de aglutinação em gota: anti-soro diluído com antígeno concentrado	14
2.7.1.2 - Reação de aglutinação em gota: anti-soro diluído com antígeno diluído	15
2.7.1.3 - Reação de precipitação em gota	15
2.7.2 - Teste de imunodifusão dupla Ouchterlony (IDD)	15
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	17

3.1 - Determinação de título dos anti-soros policlonais	17
3.1.1 - Reação de aglutinação e precipitação em gota	17
3.1.1.1 - Reação de aglutinação em gota: anti-soro diluído com antígeno concentrado	17
3.1.1.2 - Reação de aglutinação em gota: anti-soro diluído com antígeno diluído e reação de precipitação em gota	18
3.2 - Teste de imunodifusão dupla Ouchterlony (IDD)	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

RESUMO

SILVA, Ivanete Tonole da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2003.

Imunogenicidade e especificidade sorológica do exopolissacarídeo capsular e lipopolissacarídeo da parede celular de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Orientador: José Rogério de Oliveira. Conselheiros: Reginaldo da Silva Romeiro e José Mário da Silveira Mezencio.

Dois isolados, xcc1 e xcc2, de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foram utilizados para obtenção de duas frações celulares, o exopolissacarídeo capsular (EPS) e o lipopolissacarídeo da parede celular (LPS), objetivando avaliar a imunogenicidade (produção de anticorpos) e especificidade sorológica das mesmas. Após a obtenção do EPS e do LPS, respectivamente, pelo método de precipitação em etanol 95% e pelo método que consistiu na fervura seguida de extração com fenol 90%, foram imunizados coelhos da raça Nova Zelândia, com três meses de idade. Os anti-soros produzidos foram avaliados pelos testes de aglutinação, precipitação em gota e imunodifusão dupla de Ouchterlony (IDD). Verificou-se pelos testes de aglutinação e precipitação em gota baixos títulos, 1:16 e 1:32. O teste de IDD, além de mostrar-se mais sensível que o teste de aglutinação e precipitação em gota, constatou diferença antigênica entre os isolados xcc1 e xcc2, e entre as frações EPS e LPS da célula bacteriana. Diante dos baixos títulos obtidos, 1:16 a 1:64, concluiu-se que o EPS e o LPS de

X. campestris pv. *campestris*, utilizados na produção de anti-soro levaram à produção de pequena quantidade de anticorpos, nas condições em que os ensaios foram realizados.

ABSTRACT

SILVA, Ivanete Tonole da, M.S., Universidade Federal de Viçosa. July, 2003.
Immunogenicity and sorological especificity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* cell wall exopolysaccharide and lipopolysaccharide.
Advisor: José Rogério de Oliveira. Committee Members: Reginaldo da Silva Romeiro and José Mário da Silveira Mezencio.

Two *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates, xcc1 e xcc2, were used to obtain two cell fractions, exopolysaccharide (EPS) and cell wall lipopolysaccharide (LPS). Both of them were used to evaluate immunogenicity (antibody production) in New Zealand rabbits and serological specificity. The methods used were agglutination, precipitation and Ouchterlony Double Diffusion (ODD). Low titles were observed through agglutination and precipitation tests. ODD test was more sensitive than both agglutination and precipitation tests and antigenic differences between xcc1 e xcc2 isolates and between bacterial cell fractions EPS and LPS was found. The low titles showed that both *X. campestris* pv. *campestris* EPS and LPS were not good for antiserum production in the worked conditions.

1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel, 1895) Dowson 1939, é a principal doença das brassicáceas causando sérios prejuízos sob condições favoráveis de cultivo, altas temperaturas (25-35⁰C) e umidade (80-100%), especialmente em regiões de clima tropical e subtropical, durante as estações chuvosas (Schaad & Alvarez, 1993). No Brasil sua distribuição é generalizada, sendo encontrada em todas as regiões produtoras, em razão da bactéria ser transmitida por sementes e mudas contaminadas (Rodrigues Neto & Malavolta, 1995). Além das brássicas exploradas comercialmente, como repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), brócoli ou couve-brócolo (*B. oleracea* var. *italica*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), couve-chinesa ou acelga (*Brassica pekinensis*) e couve-de-bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera*), a bactéria infecta plantas de várias outras espécies de brássicas, inclusive, espécies silvestres comumente encontradas em campos de produção comercial ou de sementes (Young, 1969; Schaad & Dianese, 1981; Hayward, 1993; Filgueira, 2000).

Nos compêndios de fitobacteriologia, de acordo com Robbs & Rodrigues Neto (1993), menciona-se que a primeira descrição de uma bactéria que atualmente seria incluída no gênero *Xanthomonas* foi feita por Wakker, em 1881. As espécies do gênero apresentam ampla gama de hospedeiros, em 11 famílias de monocotiledôneas e 49 famílias de dicotiledôneas, abrangendo em torno de 70 e 170 gêneros, respectivamente (Hayward, 1993).

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são gram-negativas, com forma de bastonetes retos, medindo cerca de 0,4-0,7 x 0,7-1,6 μm e móveis por um único flagelo polar. São quimiorganotróficas, aeróbias estritas e não contêm inclusões visíveis de poli-beta-hidroxibutirato ou outros produtos de reserva. As colônias em ágar nutriente são lisas, circulares, apresentando crescimento mucoso; são usualmente amarelas, com algumas estirpes apigmentadas. Apresentam catalase positiva, oxidase negativa ou fraca e asparagina não é utilizada como única fonte de carbono e nitrogênio (Bradbury, 1986). Uma particularidade das espécies do gênero é a presença de pigmentos amarelos denominados xantomonadinas os quais são ésteres de arilpolieno bromados, não-hidrossolúveis, presentes na parede da célula bacteriana, com absorção máxima em metanol nos comprimentos de onda de 420, 440 e 468 nm (Krieg & Holt, 1984; Robbs & Rodrigues Neto, 1993; Romeiro, 1995; Schaad *et al.*, 2001). O pigmento permite distinguir espécies de *Xanthomonas* de outras bactérias produtoras de pigmentos amarelos, pertencentes a outros gêneros tais como *Clavibacter*, *Pantoea* e *Xylophilus* (Schaad *et al.*, 2001).

Os sintomas induzidos por *X. campestris* pv. *campestris* variam de acordo com a espécie hospedeira, cultivar, estágio de desenvolvimento da cultura, condição ambiente, assim como com o modo de penetração do patógeno na planta (Hayward, 1993; Rodrigues Neto & Malavolta, 1995). Com a penetração pelos hidatódios, aparece nos bordos das folhas um amarelecimento em forma de “V”, acompanhado de descoloração das nervuras, que se tornam escurecidas. Pelas nervuras, a bactéria atinge o caule da planta onde se observa o escurecimento dos vasos. Ocasionalmente, podem ocorrer lesões necróticas angulares, grosseiramente circulares ou irregulares e escuras, que correspondem à penetração da bactéria através dos estômatos ou ferimentos. Quando a infecção

resulta de sementes contaminadas, os sintomas são observados inicialmente nos cotilédones, que ficam com os bordos escurecidos. Posteriormente, a infecção se estende ao caule e raízes, havendo comprometimento do crescimento ou mesmo morte das plantas. O apodrecimento da medula é observado com frequência, como resultado da associação de *X. campestris* pv. *campestris* a microrganismos secundários, inclusive *Erwinia* sp. (Rodrigues Neto & Malavolta, 1995).

A bactéria pode estar presente no solo, onde sobrevive por curtos períodos, nos restos de cultura, nas sementes e nas espécies silvestres ou espontâneas, infectando-as ou sobrevivendo como epífitas. As sementes são, entretanto, a principal fonte de inóculo primário (Schaad & White, 1974; Schaad & Dianese, 1981; Schaad & Alvarez, 1993; Rodrigues Neto & Malavolta, 1995; Miller *et al.*, 2002). Além disso, são disseminadas por respingos d'água, aerossóis (Kuan *et al.*, 1982) e insetos (Willians, 1980).

Num programa de produção de sementes de brássicas, do ponto de vista sanitário, procura-se obter sementes livres da bactéria. Dessa forma, aliado às técnicas de manejo recomendadas aos campos de produção (Rodrigues Neto & Malavolta, 1995; Miller *et al.*, 2002), faz-se necessário o uso frequente de testes para a detecção de patógenos nas sementes. Segundo Schaad (1980) a tolerância estabelecida para *X. campestris* pv. *campestris* é de 0,03% para semeadura direta no campo, porém, para a produção de mudas a tolerância é zero. A ausência total é necessária pois sementes contaminadas podem originar mudas com infecção sistêmica, sem sintomas externos (Ignatov *et al.*, 1999), que atuam como fonte de inóculo, e este, aliado a irrigação por aspersão, tem grande impacto na taxa de disseminação do patógeno durante a produção de mudas (Roberts *et al.*, 1999).

Técnicas moleculares estão sendo aplicadas no desenvolvimento de métodos cada vez mais rápidos, sensíveis e específicos para a detecção e o diagnóstico de fitopatógenos (Batista, 1993), embora sejam inviáveis para uso de rotina em razão de seus elevados custos. Os testes sorológicos de microprecipitação, difusão dupla em agar, aglutinação, ELISA, “imuno-dot blot” e imunofluorescência, dentre outros, constituem métodos práticos e precisos para a detecção e a caracterização de um grande número de fitopatógenos bacterianos, fúngicos e virais (Daniels, 1994). Também permitem a determinação

do relacionamento taxonômico ou sorotípico de patógenos, a caracterização de epitopos e paratopos, a análise de produtos resultantes da tradução de ácidos nucleicos *in vitro* e a análise *in vivo* de constituintes relacionados com a patogênese (Hampton *et al.*, 1990).

Os métodos sorológicos, embora apresentem pequeno valor na classificação de bactérias, devido à grande diversidade imunogênica, têm papel importante nos estudos epidemiológicos e constituem ferramenta útil na rotina de um laboratório (Jones & Krieg, 1986), pois estão bem adaptados à detecção rápida e acurada de bactérias, principalmente aquelas isoladas de sementes (Azad & Schaad, 1988; Alvarez & Lou, 1985; Alvarez *et al.*, 1985).

Os antígenos (ou imunógenos) são moléculas, geralmente proteínas ou polissacarídeos, presentes em bactérias, fungos, vírus, protozoários, ou produtos destes organismos, bem como, qualquer outra macromolécula estranha, que quando introduzida em um animal levam a resposta imune específica (Itano, 2001; Daniels, 1994; Benacerraf & Unanue, 1986; Mernaugh *et al.*, 1990; Carpenter, 1975; Darnell *et al.*, 1990). Todavia, a substância estranha, para possuir propriedades antigênicas ou imunogênicas deve atender a certos requisitos básicos, como ser orgânica, de massa molecular maior que 12.000 - 15.000 Daltons, ser complexa dos pontos de vista estrutural e conformacional (moléculas grandes, mas simples, como amido e DNA, são imunógenos pobres) e, naturalmente, ser estranha ao organismo (Carpenter, 1975; Darnell *et al.*, 1990; Stanier *et al.*, 1986). Microrganismos como as bactérias são excelentes imunógenos, posto que são constituídos de inúmeras substâncias com as características supramencionadas (Romeiro, 2001).

Quando um imunógeno está em contato com o sistema imunológico do animal, receptores específicos de superfície celular tais como células apresentadoras do antígeno-APCs, linfócitos T auxiliares e citotóxicos e linfócitos B passam a atuar conjuntamente de maneira a estimular a produção dos anticorpos antígeno-específicos (Itano, 2001; Mernaugh *et al.*, 1990; Perham, 2001).

Anticorpos são formas solúveis de imunoglobulinas (Ig) produzidas pelos plasmócitos, em resposta a um estímulo imunogênico. Os anticorpos

produzidos contra um determinado antígeno podem, muitas vezes, interagir (através de diferentes ligações não covalentes, tais como pontes de hidrogênio, forças de Van Der Waals e interações hidrofóbicas) com antígenos diferentes devido à semelhança entre os epitopos (regiões presentes na estrutura de um antígeno, capazes de induzir a formação de anticorpos) presentes nessas moléculas, o que é conhecido como reação cruzada. Este fato é comumente observado em anticorpos produzidos contra fungos e bactérias, visto que, diferentes espécies desses organismos possuem epitopos idênticos, originando anticorpos semelhantes (Ball *et al.*, 1990; Almeida & Lima, 2001). De acordo com a população de anticorpos presentes no soro de um animal imunizado poderemos ter anti-soros policlonais ou monoclonais. Os policlonais consistem em populações de anticorpos que reagem com populações de epitopos e são obtidos imunizando um animal com um antígeno contendo diversos epitopos. Os monoclonais consistem em anticorpos que reagem com apenas um epitopo. São obtidos de linfócitos B individualizados e “imortalizados” pela fusão com uma célula de mieloma, cancerígena; com a capacidade de multiplicar-se indefinidamente (Hampton *et al.*, 1990).

Em face de sua complexidade, a célula bacteriana deve ser entendida e visualizada como um mosaico antigênico, pois, teoricamente, ela possui milhares de macromoléculas com propriedades antigênicas (Stainer *et al.*, 1986). Antígenos bacterianos podem ser de origem extra ou intracelular sendo constituídos bioquimicamente por proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos ou lipopolissacarídeos (De Boer & Schaad, 1990). Os imunógenos podem consistir de células inteiras, tratadas ou não-tratadas, de extratos ou outros compostos purificados como lipopolissacarídeos, ribossomos, etc (Azad & Schaad, 1988; Bouzar *et al.*, 1986; De Boer & Schaad, 1990; Friedman, 1953; Halk & De Boer, 1985; Lucas & Grogan, 1969; Schaad, 1976; Yakrus & Schaad, 1979).

Em se tratando de bacteriologia de plantas, todavia, interessam os antígenos existentes em maiores quantidades, localizados externamente à membrana citoplasmática bacteriana e que possuem, conseqüentemente, maior importância para estudos *in vitro*, como os antígenos presentes na cápsula e na

parede celular. Os flagelos, por sua inespecificidade como antígeno, possuem pouca importância (Stainer et al., 1986).

Polímeros orgânicos, sintetizados por muitas bactérias, são depositados externamente à célula bacteriana sob forma de uma camada amorfa, de espessura variável, denominada genericamente cápsula ou substância limosa. A cápsula de bactérias fitopatogênicas é, basicamente, de natureza polissacarídica (Stainer et al., 1986; Sutherland, 1977) e seu principal constituinte, o exopolissacarídeo capsular (EPS), possui propriedades antigênicas (antígenos capsulares ou k-antígenos). O exopolissacarídeo é constituído por repetidas unidades de um pentassacarídeo, que é composto por três moléculas de glicose, um grupo acetil e um ceto-piruvato ligados à duas moléculas de manose, respectivamente. Aos resíduos de glicose (ligações β -1,4; cadeia linear) liga-se o trissacarídeo (cadeia lateral) formado por duas moléculas de manose intercaladas por uma molécula de glicose (Sutherland, 1977 e 1993; Klement et al., 1990; Jann & Jann, 1977). A massa molecular do EPS varia com a espécie bacteriana, mas é sempre elevada. O EPS do isolado de *X. campestris* pv. *campestris* 646, por exemplo, tem massa molecular variando de 0,9 a $1,2 \times 10^6$ Daltons (Sutherland, 1993).

A parede celular das bactérias gram-negativas é constituída de pelo menos duas camadas distintas, denominadas camada externa e camada rígida. Na camada rígida, o peptoglicano é o principal componente, sendo o determinante da forma celular. A camada externa, por sua vez, possui estrutura mais complexa formada por macromoléculas lipopolissacarídicas (LPS), entre outras. O LPS é composto por basicamente três segmentos, ligados covalentemente: região externa (cadeia lateral "O"), região central e região lipídeo A. Cada um dos segmentos possui composição, biossíntese e funções biológicas diferentes. É na cadeia lateral "O" que se encontram as maiores variações em composição e estrutura, assumindo importante papel na caracterização da superfície celular bacteriana. Sendo assim, é a região responsável pelas propriedades imunogênicas (sorologicamente dominante) das células bacterianas (Sutherland, 1977; Sigee, 1993).

Segundo Swings *et al.* (1993), o LPS de dezessete patovares de *Xanthomonas campestris* é composto por ácido urônico, fosfato, glicose, manose,

ramnose e 2-ceto-3-deoxioctonato e heptose. Estudos da estrutura do LPS de *X. maltophila* confirmaram a presença de repetidas unidades de um tetrassacarídeo, polímero da cadeia lateral “O”, contendo três moléculas de ramnose e xilose ou 3-O-metilxilose. Os oligossacarídeos da região central apresentavam duas moléculas de D-glicose, uma de D-manose, uma de D-galactosamina, uma de ácido D-galacturônico e duas ou três moléculas de fosfato. Porém, não contém aldoheptose. A região lipídeo A de *X. campestris* pv. *citri* apresenta dissacarídeos com ligação β -1,6-glicosamina, estrutura que parece ser comum a muitas, mas não a todas, bactérias gram-negativas.

A sorologia aplicada à bacteriologia vegetal, segundo Link & Sharp (1927) e Goldsworthy (1928) (citados por Maringoni, 1997) foi iniciada por Zippel, em 1912, na Alemanha. Este autor demonstrou a correlação sorológica entre raças de *Rhizobium* encontradas em nódulos de ervilha (*Pisum sativum* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e entre trevo (*Trifolium pratense* L.) e fava (*Vicia fava* L.). Zippel também demonstrou que nódulos de *Rhizobium* em diferentes espécies de leguminosas eram constituídos de espécies diferentes de *Rhizobium*, pois puderam ser separadas através de testes de aglutinação e precipitação. Jensen (1918) demonstrou diferenças entre isolados de *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando teste de aglutinação (Jensen, 1918; citado por Schaad, 1979).

A primeira referência sobre o emprego da técnica sorológica na classificação das bactérias do gênero *Xanthomonas* deve-se a Saint John-Brooks *et al.* (1925), citado por Sugimori, 1981. Esses autores trabalharam com 39 isolados de gêneros e espécies diferentes. Obtiveram anti-soros para cada isolado e observaram a ocorrência de reações cruzadas em testes de precipitação. No entanto, conseguiram diferenciar 3 grupos sorológicos distintos, que eram as formas amarela, branca e fluorescente, entre as quais nunca ocorreram reações cruzadas. Também observaram que uma concentração adequada do anti-soro era muito importante para a identificação específica e segura da bactéria.

Schaad (1976), comparando e caracterizando imunologicamente ribossomos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, observou que a estrutura molecular dos ribossomos entre espécies bacterianas é diferente e, com isso,

podem ser utilizados para separar diferentes espécies de fitobactérias. Bouzar *et al.* (1986), testando anti-soros produzidos a partir de ribossomos purificados verificou a especificidade destes às espécies de *Agrobacterium* e *Rhizobium* permitindo a caracterização de um isolado desconhecido como pertencente ou não-pertencente a um dos dois gêneros. Segundo Thaveechai & Schaad (1984) nenhum dos imunógenos testados, células fixadas em glutaraldeído e formaldeído e extratos ribossomais e de ácido tricloroacético, apresentou especificidade suficiente para diferenciar *X. campestris* pv. *campestris* de outras espécies de *Xanthomonas*, em teste de imunofluorescência.

O estudo do relacionamento sorológico, utilizando proteínas da membrana como imunógenos, permitiu agrupar isolados de *Erwinia chrysantemi* em quatro sorovares (Yakrus & Schaad, 1979) e isolados de *X. campestris* pv. *translucens* em dois sorovares (Azad & Schaad, 1988), não havendo correlação entre hospedeiro de origem e sorovar. De acordo com Dianese & Schaad (1982) e Minsavage & Schaad (1983), as proteínas de membrana (constituídas por açúcares, proteínas e lipopolissacarídeos-LPS) de *X. campestris* pv. *campestris* caracterizam a espécie, sendo assim, importantes na identificação e taxonomia de *X. campestris* pv. *campestris* (Thaveechai & Schaad, 1986a e 1986b).

Wruck-Miguel (2001) analisando sorologicamente isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e tendo utilizado como imunógeno células bacterianas inteiras, não-tratadas e produtoras de grande quantidade de cápsula, constatou baixos títulos de aglutinação e de precipitação em gota para os anti-soros, produzidos em coelhos. Segundo o autor as células bacterianas comportaram-se como imunógenos fracos.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo, obter de células de *X. campestris* pv. *campestris* o exopolissacarídeo capsular (EPS) e o lipopolissacarídeo da parede celular (LPS) e avaliá-los quanto a produção de anticorpos (imunogenicidade) e especificidade sorológica.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e no Laboratório de Imunologia e Virologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, no período de abril de 2001 a abril de 2003.

2.1 - Origem, preservação e obtenção das frações dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram obtidos na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa-MG, preservados em meio de cultura YDC (yeast extract-dextrose-CaCO₃) (Wilson *et al.*, 1967) e em glicerina. Os isolados, xcc1 e xcc2, foram escolhidos pois em estudo do relacionamento sorológico entre isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, realizado por Wruck-Miguel (2001), verificou-se que o anti-soro originado do isolado xcc1 reconheceu 97% dos isolados testados. O anti-soro originado do isolado xcc2,

por sua vez, reconheceu apenas 57,5%. Os isolados xcc1 e xcc2 foram obtidos, respectivamente, de *Raphanus sativus* e *Brassica oleracea* var. *italica*.

Os isolados foram confirmados quanto à pureza e submetidos aos testes de Gram (Fahy & Persley, 1983) e patogenicidade para a confirmação da identidade, sendo então obtidas as frações exopolissacarídeo capsular (EPS) e lipopolissacarídeo da parede celular (LPS).

2.1.1 - Extração do Exopolissacarídeo Capsular (EPS)

O método adotado para extração do EPS foi utilizado por Ayers *et al.* (1979) e por Romeiro *et al.* (1981a) para *Erwinia amylovora*, por Athayde (1981) e Romeiro *et al.* (1982b) para *X. campestris* pv. *manihotis* e por Kimura (1996) para *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram inicialmente cultivados em meio líquido 523 de Kado & Heskett (1970), durante 36 horas a 28 ± 1 °C. Posteriormente, cada isolado foi semeado (alíquota de 100 µL) em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo o meio de Kelman (1954), sem o sal de tetrazólio, e incubadas a 28 ± 1 °C durante 48 horas. Para remoção das células bacterianas, foram escolhidas placas em que os isolados apresentaram crescimento uniforme, sem quaisquer contaminantes. A cada placa de Petri adicionaram-se 5 ml de solução salina tamponada (tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,0 em NaCl 0,85%) contendo 0,05% de azida sódica. As células bacterianas foram suspensas, com o auxílio de uma espátula de Drigalsky, tendo-se o cuidado de não ferir o meio de cultura. As células bacterianas foram sedimentadas a 10.000 g por 20 minutos (Sorvall RC5-B) e os sedimentos, reservados para posterior extração do LPS. Aos sobrenadantes, adicionou-se etanol 95% até atingir concentração final de 70% de etanol. As misturas foram incubadas por 12 horas a 4°C. Estas foram então submetidas à centrifugação a 10.000 g por 30 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 contendo 0,05% de azida sódica. O procedimento de precipitação com etanol 95% foi repetido para cada isolado de *X. campestris* pv. *campestris*. As misturas foram a seguir submetidas à

centrifugação a 10.000 g por 30 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em pequeno volume de EDTA 0,1 M, pH 7,0. Estas suspensões sofreram diálise contra água destilada (400 volumes) a 4^oC. Trocas de água em intervalos de 12 horas foram realizadas num período de 48 horas. Os produtos finais da diálise (preparação crua do EPS) foram armazenados em congelador a -18^oC até o momento de sua utilização.

2.1.2 - Extração do Lipopolissacarídeo da Parede Celular (LPS)

O método adotado para obtenção do LPS foi uma modificação do método de Jonhson & Perry (1976) realizado por Romeiro *et al.* (1982a; 1982b) para extração do lipopolissacarídeo de *X. campestris* pv. *manihotis*.

O sedimento obtido no procedimento de extração do EPS (ítem 2.1.1) foi ressuspense em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, contendo azida sódica a 0,05% (p/v). Posteriormente, as suspensões bacterianas foram fervidas por 30 minutos e transferidas para banho-maria a 70^oC. Adicionou-se a cada suspensão igual volume de fenol 90% (p/v), também a 70^oC. As misturas foram agitadas por 15 minutos e em seguida incubadas a 0^oC, por uma noite, sob agitação. As misturas foram, então, centrifugadas a 3.000 rpm, por 20 minutos a 4^oC. As fases fenólica e os sedimentos foram descartados e a fase aquosa pipetada. Estas, por sua vez, sofreram diálise contra água destilada (400 volumes) a 4^oC, até desaparecer o odor de fenol. Trocas de água em intervalos de 12 horas foram realizadas num período de 48 horas. Os produtos finais da diálise sofreram centrifugação a 54.500 g por 30 minutos. Os sedimentos foram descartados e o sobrenadante, consistindo a preparação crua do LPS, armazenado em congelador a -18^oC até o momento de sua utilização.

2.2 - Preparo do Imunógeno

As frações de EPS e LPS foram emulsificadas, para a primeira imunização, com o adjuvante completo de Freund (Difco) e, posteriormente, com o adjuvante incompleto de Freund (2^a e 3^a imunizações), na proporção de 1:1

(v:v). A emulsificação foi realizada com seringa de 3 ml, sem agulha. As misturas foram aspiradas e expiradas até que a emulsão apresentasse aspecto viscoso e denso, não se desfazendo quando em contato com a água.

2.2.1 - Preparo do adjuvante incompleto de Freund

Este adjuvante é composto por 10 ml de óleo mineral e 10 ml de lanolina. A lanolina foi fundida e colocada com o óleo mineral em um gral de porcelana previamente aquecido em estufa. A mistura depois de homogeneizada foi dividida em alíquotas e acondicionada em frascos limpos. O armazenamento do adjuvante foi feito em congelador a -18°C , sendo aquecido no momento de sua utilização.

2.3 - Imunização dos coelhos

Foi utilizado o método descrito por Mezencio (1981) e usado por Oliveira (1995) e Wruck-Miguel (2001), para imunização de coelhos machos de aproximadamente três meses de idade, da raça Nova Zelândia, os quais foram mantidos isolados e alimentados apropriadamente, no decorrer do experimento. Para cada fração bacteriana obtida dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram imunizados dois animais. Para se dispor do soro controle ou soro normal, foram coletados 10 ml de sangue de cada animal uma semana antes da primeira imunização. Os coelhos foram imobilizados e aplicou-se-lhes 0,5 ml do imunógeno, por via intramuscular, em cada coxa, totalizando 1,0 ml por animal. Foram imunizados oito animais. Após 15 dias repetiu-se o procedimento anterior constituindo, assim, a segunda imunização. Uma terceira imunização foi realizada 15 dias após a segunda, porém se aplicou 0,2 ml do imunógeno, via subcutânea, em três diferentes pontos do corpo do animal (dorsos do pescoço e da região lombar). O sangue dos coelhos imunizados foi coletado quinze dias após a última imunização.

2.4 - Obtenção do anti-soro policlonal

O sangue dos animais foi coletado efetuando-se uma pequena incisão longitudinal na veia marginal da orelha e o sangue recolhido em recipiente estéril. Os frascos com o sangue foram mantidos ao ambiente por uma hora e em seguida, em geladeira, por 4 horas. Com auxílio de um bastão de vidro estéril separou-se o coágulo e o soro, e este foi transferido para tubos e submetido a centrifugação por 15 minutos a 3.000 rpm, a 4°C. Descartou-se o sedimento e transferiu-se o sobrenadante para frascos esterilizados, com tampa, em alíquotas de aproximadamente 1,0 ml. Os frascos contendo o anti-soro policlonal foram armazenados em congelador a -18°C até o momento da utilização (Mezencio, 1981; Oliveira, 1995 e Wruck-Miguel, 2001).

2.5 - Preparo do antígeno particulado (ANP)

As células dos isolados xcc1 e xcc2 foram multiplicadas em meio sólido 523 de Kado & Heskett (1970), em placas de Petri e incubados a 28±1 °C por 48 horas. A seguir, as células bacterianas foram ressuspensas em solução salina tamponada (PBS – tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, em NaCl 0,85%) com o auxílio de uma espátula de Drigalsky, sendo filtradas em papel de filtro para remoção de fragmentos de meio e de aglomerados de células (Wruck-Miguel, 2001). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em fotômetro Leitz, modelo D, para OD₅₄₀ = 0,1. A seguir, diluiu-se 1:16 esta suspensão, em solução salina tamponada, pH 7,0.

2.6 - Preparo do antígeno solúvel (ANS)

Os isolados xcc1 e xcc2 foram cultivados e obtidos conforme descrito no item 2.5, exceto a diluição final na proporção de 1:16. Cada suspensão bacteriana sofreu cinco ciclos de congelamento-descongelamento e foi posteriormente fervida por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 g por 15 minutos. Coletou-se o sobrenadante, que foi transferindo para frascos com tampa, em

alíquotas de aproximadamente 1,0 ml. O antígeno foi então armazenado em congelador a -18°C até o momento da utilização.

2.7 - Determinação de título dos anti-soros policlonais

A determinação de título dos anti-soros foi realizada pelos métodos de aglutinação, precipitação em gota e imunodifusão dupla (Teste de Ouchterlony). Foram utilizadas as técnicas descritas por Romeiro (2001) e Romeiro & Fukuda (1983).

2.7.1 - Reação de aglutinação e precipitação em gota

2.7.1.1 - Reação de aglutinação em gota: anti-soro diluído com antígeno concentrado

Uma lâmina de polietileno (9 x 9 cm) quadriculada com caneta hidrográfica (quadrados de 1 x 1 cm) foi depositada no fundo úmido de uma placa de Petri. Pedacos de algodão umedecidos também foram depositados sobre o fundo da placa de modo a criar uma câmara úmida, evitando assim, a evaporação das gotas teste. Para o teste de aglutinação em gota diluiu-se em série o anti-soro de coelho, ou seja, adicionaram-se em cada cavidade de um microdiluidor 100 μL de solução salina tamponada, pH 7,0. A seguir, depositou-se 100 μL do anti-soro na primeira cavidade do microdiluidor. Homogeneizou-se a mistura anti-soro/salina, obtendo-se a diluição 1:2. Transferiu-se 100 μL da primeira cavidade do microdiluidor para a segunda e homogeneizou-se a mistura. Esta foi a diluição 1:4. Procedeu-se assim, sucessivamente, de modo a obter as diluições em série do anti-soro (1:2, 1:4,..., 1:16384). A cada diluição, no microdiluidor, adicionaram-se 100 μL do antígeno particulado (item 2.5). Homogeneizou-se a mistura, “caminhando” da maior para a menor diluição. Removeram-se com micropipeta 20 μL das respectivas diluições do anti-soro, depositando-as no respectivo quadrado feito na lâmina de polietileno, na placa de Petri. As placas foram então incubadas a 37°C .

2.7.1.2 - Reação de aglutinação em gota: anti-soro diluído com antígeno diluído

Neste procedimento, realizou-se uma nova diluição em série do anti-soro (item 2.7.1.1). Num outro microdiluidor, realizou-se uma diluição em série do antígeno particulado. Removeram-se com micropipeta 10 μ L das respectivas diluições do anti-soro depositando-as ao centro de cada quadrado na lâmina de polietileno. Cada diluição foi distribuída, na placa de Petri, de forma que cada diluição do anti-soro fosse cruzada com cada diluição do antígeno particulado (10 μ L). As placas foram então incubadas a 37⁰C .

2.7.1.3 – Reação de precipitação em gota

O teste de precipitação em gota foi executado de maneira idêntica ao descrito no item 2.7.1.2 porém, ao invés de antígeno particulado, foram utilizados o antígeno solúvel e as frações lipopolissacarídica (LPS) e exopolissacarídica (EPS) das células bacterianas.

Em ambos os procedimentos, descritos no item 2.7.1, eram feitos controle para o antígeno (antígeno + salina), para o anti-soro (anti-soro + salina) e para o soro-controle (soro controle + antígeno). Leituras foram realizadas após seis horas de incubação, à binocular estereoscópica com o menor aumento. A presença do precipitado indicou reação positiva. Foram realizadas duas repetições para cada diluição.

2.7.2 – Teste de Imunodifusão dupla Ouchterlony (IDD)

No método de imunodifusão dupla de Ouchterlony (Ouchterlony, 1968; citado por Bouzar & Moore, 1990) preparou-se, previamente, gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão salina borato, pH = 8,4 - 8,6 (Carpenter, 1975). O gel de agarose foi fundido em banho-maria a 48-50⁰C por 20 minutos e distribuído em placas de Petri (13 ml/placa).

Sobre o gel, confeccionou-se com auxílio de um furador próprio (contendo um orifício central e seis orifícios circundantes equidistantes entre si e igualmente distantes do orifício central, apresentando o mesmo diâmetro), orifícios que permitiram a distribuição dos reactantes anti-soro e antígenos, exceto os antígenos particulados, concentrados e/ou diluídos, sendo que, no orifício central foi colocado um dos reactantes e, nos circundantes, os reactantes homólogos ou heterólogos ou ainda, diferentes diluições destes. A placa de Petri, devidamente fechada, foi então mantida ao ambiente por 24 horas após o que, avaliou-se a formação de bandas de precipitação, característica de reação positiva entre antígeno e anticorpo.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação de título dos anti-soros policlonais

3.1.1 - Reação de aglutinação e precipitação em gota

3.1.1.1 - Reação de aglutinação: anti-soro diluído com antígeno concentrado

Neste caso, o título de aglutinação não foi observado, ou seja, não houve formação da malha antígeno-anticorpo quando se utilizou como antígeno suspensão bacteriana concentrada, item 2.5. Este fato, relatado por Carpenter (1975), ocorre em casos onde há excesso de antígeno (determinantes antigênicos) ou anticorpos.

3.1.1.2 - Reação de aglutinação: anti-soro diluído com antígeno diluído e reação de precipitação em gota

Ao contrário do resultado anterior, quando se utilizou suspensão bacteriana diluída (ANP xcc1 e ANP xcc2), verificou-se a formação da malha de aglutinação (título). Nesta situação o equilíbrio entre as concentrações antígeno-anticorpo permitiu a aglutinação destes e, conseqüentemente, a visualização da malha (Carpenter, 1975). De acordo com os títulos de aglutinação e precipitação em gota obtidos (tabela 1), foi observada diferença entre animais quanto à produção de anticorpos, confirmando o que é criteriosamente discutido por Ball *et al.* (1990).

Tabela 1: Títulos de aglutinação e precipitação dos anti-soros obtidos a partir de imunógenos de *X. campestris* pv. *campestris*.

Antígenos	Anti-soros											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
ANP xcc1	1:32	-	-	-	1:8	1:16	-	-	1:8	-	1:8	1:8
ANP xcc2	1:4	-	1:32	-	-	1:4	-	-	-	1:16	-	-
ANS xcc1	-	1:16	1:8	-	1:2	1:16	1:8	-	-	-	-	-
ANS xcc2	1:8	1:8	-	-	1:2	1:16	1:2	-	1:4	1:8	1:16	1:8
EPS xcc1	-	-	-	-	1:2	-	-	-	1:2	1:2	1:4	1:8
EPS xcc2	1:2	1:4	-	-	-	-	-	-	1:8	1:4	1:8	-
LPS xcc1	1:32	-	1:16	-	1:2	1:16	1:2	-	-	-	-	-
LPS xcc2	1:4	-	-	-	1:16	1:8	-	-	1:4	-	1:4	1:8

Legenda:

I e II = animais imunizados com exopolissacarídeo capsular do isolado xcc2.

III e IV = animais imunizados com lipopolissacarídeo da parede celular do isolado xcc2.

V e VI = animais imunizados com exopolissacarídeo capsular do isolado xcc1.

VII e VIII = animais imunizados com lipopolissacarídeo da parede celular do isolado xcc1.

IX e X = animais imunizados com suspensão bacteriana do isolado xcc1.

XI e XII = animais imunizados com suspensão bacteriana do isolado xcc2.

- resultado negativo

Os títulos dos anti-soros produzidos tanto contra células inteiras (Wruck-Miguel, 2001) como contra as frações EPS e LPS, de isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, apresentaram-se baixos (1:16 e 1:32) e inespecíficos, ou seja, anti-soro produzido contra o isolado xcc1 reconheceu antígeno proveniente do isolado xcc2 e vice-versa. Em se tratando de isolados pertencentes à mesma espécie e patovar o resultado era esperado, embora Wruck-Miguel (2001) tenha

encontrado um isolado de *X. campestris* pv. *campestris* que não foi reconhecido por anti-soros produzidos contra sete isolados do patógeno.

3.2 – Teste de imunodifusão dupla Ouchterlony (IDD)

Verificou-se na tabela 2, que o antígeno solúvel (ANS xcc1) e o lipopolissacarídeo da parede celular (LPS xcc1), obtidos do isolado xcc1, não reagiram com quaisquer anti-soros testados e que o antígeno solúvel (ANS xcc2) e o exopolissacarídeo capsular (EPS xcc2), obtidos do isolado xcc2, foram reconhecidos pelos mesmos anti-soros. Anti-soros produzidos contra a fração LPS, tanto do isolado xcc1 (VII e VIII) como do xcc2 (III e IV), não reconheceram quaisquer antígenos.

Tabela 2: Resultado do teste de IDD quando se utilizou como reactantes, antígeno e anti-soro concentrados.

Antígenos	Anti-soros											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
ANS xcc1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANS xcc2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
EPS xcc1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
EPS xcc2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LPS xcc1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LPS xcc2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

- resultado negativo, não houve formação da banda de precipitação.

+ formação de banda de precipitação entre os respectivos antígeno x anti-soro.

Os resultados dos testes de imunodifusão dupla de Ouchertelony (tabelas 2, 3, 4 e 5) permitem verificar que o isolado xcc2 mostrou-se mais imunogênico e específico que o isolado xcc1 e que a fração EPS mostrou-se mais imunogênica, havendo portanto, diferença antigênica entre isolados e entre frações de uma célula bacteriana. Thaveechai & Schaad (1984), comparando diferentes preparações imunogênicas (células fixadas em glutaraldeído e formaldeído e extratos ribossomais e de ácido tricloroacético) obtidas de isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, observaram que o anti-soro produzido contra extratos ribossomais, comparados em teste de IDD, apresentaram alta correlação entre sorovar e hospedeiro de origem. Com a análise sorológica e eletroforética

de proteínas de membrana de *X. campestris* pv. *campestris*, Thaveechai & Schaad (1986a) verificaram que o anti-soro produzido contra proteínas de membrana apresentou especificidade ao nível de subespécie, sendo tão ou mais específicas que os extratos ribossomais.

Tabela 3: Resultado do teste de IDD quando se utilizou como reactantes, antígeno concentrado e anti-soro diluído.

Antígenos	Anti-soros							
	I	II	V	VI	VIII	IX	X	XI
ANS xcc2	1:32	1:16	-	-	1:4	1:4	1:2	1:2
EPS xcc2	1:16	1:8	-	-	1:4	1:4	1:4	1:4
LPS xcc2	1:2	1:2	-	-	-	-	-	-
EPS xcc1	-	-	1:4	1:4	-	-	1:4	1:4

Tabela 4: Resultado do teste de IDD quando se utilizou como reactantes, antígeno diluído e anti-soro concentrado.

Antígenos	Anti-soros							
	I	II	V	VI	VIII	IX	X	XI
ANS xcc2	1:4	1:4	-	-	1:4	1:4	1:4	1:2
EPS xcc2	1:4	1:4	-	-	1:4	1:4	1:2	-
LPS xcc2	1:64	1:64	-	-	1:64	1:32	-	-
EPS xcc1	-	-	1:4	1:8	-	-	1:4	1:8

Tabela 5: Resultado do teste de IDD quando se utilizou como reactantes, antígeno e anti-soro diluídos.

Antígenos	Anti-soros							
	I	II	V	VI	VIII	IX	X	XI
ANS xcc2	1:8	1:8	-	-	1:8	-	-	-
EPS xcc2	1:4	1:4	-	-	-	-	-	-
LPS xcc2	1:4	1:4	-	-	-	-	-	-
EPS xcc1	-	-	-	1:8	-	-	-	-

O antígeno LPS xcc2 mostrou maior atividade de precipitação (maior título) em gel (tabela 4). Romeiro *et al.* (1982b) obtiveram o mesmo resultado quando examinaram a atividade de precipitação de extratos de LPS contra anti-soro produzido contra células inteiras de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*.

As diferenças observadas entre os testes de IDD e o teste de aglutinação e precipitação em gota refletem a baixa imunogenicidade, tanto das células inteiras quanto das respectivas frações. O IDD porém, mostrou-se mais sensível. Thaveechai & Schaad (1984) separaram isolados de *X. campestris* pv. *campestris* em quatro sorovares, utilizando IDD. Os sorovares A e B eram compostos por isolados de espécies de brassicaceas cultivadas; já os sorovares C e D, por isolados obtidos de espécies silvestres. Não foi possível, porém, a diferenciação destes quando se utilizou imunofluorescência indireta. Yakrus & Schaad (1979) verificaram que os antígenos de *E. crhyssanthemi* foram altamente específicos ao nível de espécie em teste de aglutinação sendo os isolados testados divididos em quatro sorovares por IDD.

Diante dos baixos títulos obtidos (1:16 a 1:64) concluímos que as frações EPS e LPS de *X. campestris* pv. *campestris* utilizadas na produção de anti-soro levaram à produção de pequena quantidade de anticorpos, nas condições em que os ensaios foram realizados. Por esta razão, em trabalhos futuros, testes como ELISA e “imuno-dot-blot”, mais sensíveis e específicos, constituir-se-ão importantes ferramentas de modo a obter resultados mais precisos, haja visto, a variabilidade na sensibilidade e especificidade dos diversos testes sorológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M.R. & LIMA, J.A.A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 186p. 2001.
- ALVAREZ, A.M. & LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Plant Disease**, 69:1082-1086, 1985.
- ALVAREZ, A.M., BENEDICT, A.A. & MIZUMOTO, C.Y. Identification of *Xanthomonas* and groupings of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains with monoclonal antibodies. **Phytopathology**, 75:722-728, 1985.
- ATHAYDE, J.T. **Virulência de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Berthet & Bondar 1915) Dye 1978 e atividade biológica do seu polissacarídeo capsular**. Imprensa Universitária, Viçosa-MG, UFV, Tese M.S., 36p. 1981.
- AYERS, A.R.; AYERS, S.B.; GOODMAN, R.N. Extracellular polysaccharide of *Erwinia amylovora*: a correlation with virulence. **Applied Environmental Microbiology**, 38:659-666, 1979.
- AZAD, H. & SCHAAD, N.W. Serological relationships among membrane proteins of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. **Phytopathology**, 78:272-277, 1988.
- BALL, E.M.; HAMPTON, R.O.; DE BOER, S.H. & SCHAAD, N.W. **Polyclonal antibodies**. In: Hampton, R.O., Ball, E.M. & De Boer, S.H. (Ed.). Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. St. Paul, MN, APS Press, 389p. 1990.

- BATISTA, M.F. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1:165-196, 1993.
- BENACERRAF, B. & UNANUE, E.R. 1986. **Immunologia**. 2^aed. Ed. Médica Panamericana S.A.: Buenos Aires, 240p.1986.
- BOUZAR, H. & MOORE, L.W. Ouchterlony double diffusion, plates: Bacteria. In: HAMPTON, R.O.; BALL, E.M. & DE BOER, S.H. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual**. Ed. St. Paul, MS, APS Press, 389p.1990.
- BOUZAR, H.; MOORE, L.W. & SCHAAD, N.W. Serological relationship between 50 S ribosomal subunits from strains of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. **Phytopathology**, 76:1265-1269, 1986.
- BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria** – CAB International : England, 332p. 1986.
- CARPENTER, P.L. **Imunology and serology**. 3^a ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Pennsylvania, 346p. 1975.
- DANIELS, J. Métodos imunológicos utilizados na diagnose de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 2:53-84, 1994.
- DARNELL, J., LODISH, H. & BALTIMORE, D. **Molecular cell biology**. 2^a ed. New York: Scientific American Books, 1105p. 1990.
- DE BOER, S.H. & SCHAAD, N.W. **Preparation of antigens, Bacteria**. In: Hampton, R.O., Ball, E.M. & De Boer, S.H. (Ed.). Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. St. Paul, MN, APS Press, 389p. 1990.
- DIANESE, J.C. & SCHAAD, N.W. Isolation and characterization of inner and outer membranes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, 72:1284-1289, 1982.
- FAHY, P.C. & PERSLEY, G.J. eds. **Plant bacterial diseases – a diagnostic guide**. Sidney, Academic Press, 393p. 1983.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa : UFV, 402p. 2000.
- FRIEDMAN, B.A. Serological tests with some phytopathogenic species of *Pseudomonas*. **Phytopathology**, 43:412-414, 1953.
- HALK, E.L. & DE BOER, S.H. Monoclonal antibodies in plant disease research. **Ann. Rev. Phytopathol.**, 23:321-350, 1985.
- HAMPTON, R.O.; BALL, E.M. & DE BOER, S.H. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual**. Ed. St. Paul, MS, APS Press, 389p.1990.

- HAYWARD, A.C. **The hosts *Xanthomonas***. In: SWINGS, J.G. & CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. Beltsville: USDA-ARS, 399p. 1993.
- IGNATOV, A.; KUGINUKI, Y. & HIDA, K. Vascular stem resistance to black rot of in *Brassica oleracea*. **Canadian Journal of Botany**, 77:442-446, 1999.
- ITANO, E.N. **Aspectos imunológicos: fisiologia da resposta immune**. p.13-26. In: ALMEIDA, A.M.R. & LIMA, J.A.A. Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 186p. 2001.
- JANN, K. & JANN, B. **Bacterial polysaccharide antigens**. In: SUTHERLAND, I.W. Surface carbohydrates of the prokaryotic cell. London. Academic Press, 472p. 1977.
- JOHNSON, K.G. & PERRY, M.B. Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides. **Canadian Journal of Microbiology**, 22:29-34, 1976.
- JONES, D. & KRIEG, N. **Serological and chemotaxonomy**. In: SNEATH, P.H.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E., HOLT, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v.2, 1986.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, 60:969-976, 1970.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solnacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology**, 44:693-395, 1954.
- KIMURA, O. **Fitoalexinas e resistência de pimentão (*Capsicum annum* L.) a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye**. Viçosa-MG, UFV, Tese M.S., 89p. 1996.
- KLEMENT, Z., RUDOLPH, K. & SANDS, D.C. **Methods in phytobacteriology**. Budapest: Akademiai Kiado, 568p. 1990.
- KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London, Williams & Wilkins, v.1, 660p. 1994.
- KUAN, T.-I.; MINSAVAGE, G.V. & SCHAAD, N.W. Airborne dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. (Abstr.) **Phytopathology**, 72:945, 1982.
- LUCAS, L.T. & GROGAN, R.G. Some properties of specific antigens of *Pseudomonas lachrymans* and other *Pseudomonas* nomenclatures, **Phytopathology**, 59:1913-1917, 1969.

- MARINGONI, A.C. In: KIMATI, H., AMORIN, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. & REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. v.2. Ceres. SP, 774p. 1997.
- MERNAUGH, R.L.; MERNAUGH, G.R. & KOVACS, G.R. **The immune response: antigens, antibodies, antigen-antibody interactions**. In: HAMPTON, R.O.; BALL, E.M. & DE BOER, S.H. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual. Ed. St. Paul, MS, APS Press, 389p. 1990.
- MEZENCIO, J.M.S. **Cinética da produção de anticorpos em coelhos e relacionamento antigênico entre estirpes de *Rhizobium japonicum***. Viçosa-MG, UFV, Tese M.S., 42p. 1981.
- MILLER, S.A.; SAHIN, F. & ROWE, R.C. **Black rot of Crucifers**. The Ohio State University. <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3125.html> , 2002.
- MINSAVAGE, G.V. & SCHAAD, N.W. Characterization of membrane proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, 73:747-755, 1983.
- OLIVEIRA, J.R. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro**. Viçosa-MG, UFV, Tese D.S., 98p. 1995.
- PARHAM, P. **O sistema imune**. Porto Alegre: Artmed Editora, 372p. 2001.
- ROBBS, C.F. & RODRIGUES NETO, J. Taxonomia de *Xanthomonas*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1:143-163, 1993.
- ROBERTS, S.J., HILTUNEN, L.H., HUNTER, P.J. & BROUGH, J. Transmission from seed to seedling and secondary spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in brassica transplants: effects of dose and watering regime. **European Journal of Plant Pathology**, 105:879-889, 1999.
- RODRIGUES NETO, J. & MALAVOLTA, JR. V.A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, 17(183):56-59, 1995.
- ROMEIRO, R.S. & FUKUDA, C. Métodos simples para determinação de título de aglutinação e/ou precipitação do anti-soro ou do antígeno. **Fitopatologia Brasileira**, 8:93-95, 1983.
- ROMEIRO, R.S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa, MG : UFV, 283p. 1995.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa-MG, UFV, 279p. 2001.
- ROMEIRO, R.S., ATHAYDE, J.T., FUKUDA, C. & BATISTA, U.G. Métodos para extração de lipopolissacarídeo de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Berthet e Bondar, 1915) Dye, 1978. **Revista Brasileira de Mandioca**, 1:47-53, 1982a.

- ROMEIRO, R.S., FUKUDA, C. & ATHAYDE, J.T. Cinética da produção de anticorpos por coelhos como resposta a diferentes planos de imunização com *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Revista Brasileira de Mandioca**, 1:1-6, 1982b.
- ROMEIRO, R.S., KARR, A.L. & GOODMAN, R.N. *Erwinia amylovora* cell wall receptors for apple agglutinin. **Physiological Plant Pathology**, 19:383-390, 1981a.
- ROMEIRO, R.S.; FUKUDA, C.; ATHAYDE, J.T & BATISTA, U.G. Métodos para extração de lipopolissacarídeos de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Berthet & Bondar, 1915) Dye, 1978. **Revista Brasileira de Mandioca**, 1:48-53, 1982.
- SCHAAD, N.W. & ALVAREZ, A. **The hosts of *Xanthomonas***. In: SWINGS, J.G. & CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. Beltsville: USDA-ARS, 399p. 1993.
- SCHAAD, N.W. & WHITE, W.C. Survival of *Xanthomonas campestris* in Soil. **Phytopathology**, 64:1518-1520, 1974.
- SCHAAD, N.W. Immunological comparison and characterization of ribosomes of *Xanthomonas vesicatoria*. **Phytopathology**, 66:770-776, 1976.
- SCHAAD, N.W. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. **Plant Disease**, 64:91-92, 1980.
- SCHAAD, N.W. Serological identification of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 17:123-147, 1979.
- SCHAAD, N.W., DIANESE, J.C. Cruciferous weeds as source of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. **Phytopathology**, 71:1215-1220, 1981.
- SCHAAD, N.W.; JONES, J.B. & LACY, G.H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B. & CHUN, W. (Eds). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul: The American Phytopathological Society, 373p. 2001.
- SIGEE, D.C. **Bacterial plant pathology cell and molecular aspects**. University Press: Cambridge, 325p. 1993.
- STAINER, R.Y., INGRAHAM, J.L., WHEELIS, M.L. & POINTER, R.R. **The microbial world**. 5^a ed. New Jersey: Prentice Hall, 689p. 1986.
- SUGIMORI, M.H. **Diferenciação serológica entre três patovares de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson aplicando a técnica do linfonódulo e da suspensão bacteriana**. Piracicaba-SP, ESALQ, Tese M.S., 63p. 1981.

- SUTHERLAND, I.W. **Surface carbohydrates of the prokaryotic cell.** London. Academic Press, 472p. 1977.
- SUTHERLAND, I.W. **Xanthan.** In: SWINGS, J. & CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. Chapman & Hall. 399p. 1993.
- SWINGS, J.G., VAUTERIN, L. & KERSTERS, K. **The bacterium *Xanthomonas*.** In: SWINGS, J. & CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. Chapman & Hall. 399p. 1993.
- THAVEECHAI, N. & SCHAAD, N.W. Comparasion of different immunogen preparations for serological identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, 74:1065-1070, 1984.
- THAVEECHAI, N. & SCHAAD, N.W. Immunochemical characterization of a subspecies-specific antigenic determinant of a membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, 76:148-153, 1986b.
- THAVEECHAI, N. & SCHAAD, N.W. Serological and electrophoretic analysis of a membrana protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from Thailand. **Phytopathology**, 76:139-147, 1986a.
- WILLIAMS, P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, 64:736-742, 1980.
- WILSON, E.E., ZEITOUN, F.M. & FREDRICKSON, D.L. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. **Phytopathology**, 57:618-621, 1967.
- WRUCK-MIGUEL, D.S. **Análises bioquímica, patogênica, sorológica e molecular de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** Viçosa-MG, UFV, Tese D.S., 62p. 2001.
- YAKRUS, M. & SCHAAD, N.W. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology**, 69:517-522, 1979.
- YOUNG, J.M. An alternative weed host for *Xanthomonas campestris*. **Plant Disease Reporter**. 53:820-821, 1969.