

Diferenciação de bactérias do gênero *Pseudomonas* patogênicas ao cafeeiro por técnicas serológicas

Differentiation of bacteria of the genus Pseudomonas pathogenic to coffee by serological techniques

Luis Otavio Saggion Beriam^{1*}, Flavia Rodrigues Alves Patrício¹, Karen Wolf Maciel¹, Lucas Mateus Rivero Rodrigues¹, Irene Maria Gatti de Almeida^{1†}

RESUMO: Há várias bactérias que causam problemas para o cafeeiro, incluindo *Pseudomonas cichorii*, *P. syringae* pv. *garcae*, *P. syringae* pv. *tabaci*, *Burkholderia andropogonis* e *Xylella fastidiosa*, todas elas já descritas no Brasil. Tentativas de diferenciar essas bactérias por testes serológicos de dupla difusão em ágar (dda), com antissoros produzidos contra células íntegras de *P. s.* pv. *garcae*, mostraram reações cruzadas, principalmente entre *P. s.* pv. *garcae* e *P. s.* pv. *tabaci*. Dessa forma, foram produzidos antissoros contra *P. s.* pv. *garcae* (linhagem patotipo IBSBF-248 — Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico — IBSBF), obtidos por meio de imunizações de coelhos com antígenos de proteínas do complexo proteico da membrana (CPM). Esses antissoros foram testados por dupla difusão em agarose (dda) contra diversas formas de antígenos extraídos de *P. cichorii*, *P. s.* pv. *garcae* e *P. s.* pv. *tabaci* [células autoclavadas, células tratadas com formol, exopolissacarídeos (EPS), glicoproteínas (GP) da cápsula bacteriana, proteínas de membrana e suspensão bacteriana (SB) em NaCl 0,85%]. Os resultados mostraram que, dependendo do antígeno e do meio suporte da dupla difusão (com ou sem MgCl₂ e/ou azul de tripano), os antissoros reagem somente com *P. s.* pv. *garcae*. Desse modo, esses antígenos podem ser usados para a rápida diagnose da mancha aureolada do cafeeiro nos testes de dda.

PALAVRAS-CHAVE: mancha aureolada; *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*; serologia.

ABSTRACT: Some bacterial diseases have been described causing problems in coffee, whose causal agents are *Pseudomonas cichorii*, *P. syringae* pv. *garcae*, *P. s.* pv. *tabaci* and *Burkholderia andropogonis*, all of them also occurring in Brazil. Attempts to differentiate these bacteria by double diffusion agar (dda) technique with antisera produced against whole cells of *P. s.* pv. *garcae* showed cross-reactions, especially among *P. s.* pv. *garcae* and *P. s.* pv. *tabaci*. Thus, antisera were produced against *P. s.* pv. *garcae* (pathotype strain IBSBF-248 — Phytobacteria Culture Collection of Instituto Biológico — IBSBF), using rabbit immunizations with antigens of the protein complex of membranes. These antisera were tested against different kind of antigens (autoclaved cells, cells treated with formaldehyde, capsule polysaccharides, glycoproteins, bacterial membrane proteins and bacterial suspension in 0.85% NaCl) extracted from *P. cichorii*, *P. s.* pv. *garcae* and *P. s.* pv. *tabaci*. The results showed that depending on the kind of antigen and the medium used in the double diffusion test (with or without MgCl₂ and/or trypan blue), the antiserum reacted only with *P. s.* pv. *garcae*. Thus, these antigens may be used as an auxiliary tool in the rapid diagnosis of bacterial halo blight of coffee in the double diffusion test.

KEYWORDS: bacterial leaf blight; *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*; serology.

¹Instituto Biológico de São Paulo – São Paulo (SP), Brasil.

*Autor correspondente: beriam@biologico.sp.gov.br

[†]In Memoriam

Recebido em: 16/09/2016. Aceito em: 07/07/2017

INTRODUÇÃO

Existem descritas na literatura várias bactérias que causam problemas em cafeeiro (*Coffea arabica* L. e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner) e que já foram assinaladas no Brasil, incluindo *Burkholderia andropogonis*, *P. syringae* pv. *garcae*, *P. s.* pv. *tabaci*, *Pseudomonas cichorii* e *Xylella fastidiosa* (MALAVOLTA *et al.*, 2008; BERIAM *et al.*, 2016). Entre elas, *P. syringae* pv. *garcae* é a que atualmente vem sendo detectada em maior número, causando os principais prejuízos à cultura (ALMEIDA *et al.*, 2013). Essa bactéria é o agente causal da “mancha aureolada do cafeeiro”, descrita em nosso país em 1956 (AMARAL *et al.*, 1956). Entre os sintomas originados pelo patógeno, os principais e característicos da doença consistem em manchas necróticas nas folhas, circundadas por halos cloróticos. Esses sintomas também podem ser ocasionados por outros patógenos do cafeeiro, como fungos e outras fitobactérias, entre elas *P. cichorii*, causadora do “crestamento bacteriano das folhas” (ROBBS *et al.*, 1974), *B. andropogonis*, agente causal da “mancha escura bacteriana” (RODRIGUES NETO *et al.*, 1981), e *P. s.* pv. *tabaci*, responsável pelo surgimento da “mancha bacteriana” (DESTÉFANO *et al.*, 2010).

Das bactérias citadas, a diferenciação das espécies, e especialmente de patovares de *Pseudomonas*, nem sempre é simples e não deve ser baseada na sintomatologia apresentada pelo cafeeiro. A melhor forma de diferenciá-las é pelo isolamento em meios de cultura, testes de patogenicidade e alguns testes bioquímicos e fisiológicos, como o LOPAT e a utilização de L-trigoneline, L (+) tartarato e lactato, bem como a produção de peptato liase. Esses quatro últimos testes permitem diferenciar os patovares *garcae* e *tabaci* de *P. syringae* (YOUNG; TRIGGS, 1994). Os testes bioquímicos apresentam um fator limitante, demandando ca. de 30 dias para a obtenção dos resultados, além de não serem exequíveis para um grande número de amostras. Uma das alternativas para diferenciar essas espécies/patovares são os testes serológicos, mediante a produção de antissoros específicos.

Pelo exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar um método serológico eficaz para a diferenciação de isolados de *Pseudomonas* patogênicas ao cafeeiro, com antissoros produzidos por intermédio de células bacterianas íntegras e também do chamado “complexo proteico da membrana (CPM)”, por meio da técnica de dda, em diferentes meios para a dupla difusão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho (Tabela 1) pertencem à Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) e estão conservadas sob liofilização e/ou ultracongelamento (-80°C). Todas as linhagens foram recuperadas

em meio de cultura nutriente ágar (NA) e mantidas em estufa bacteriológica por 48 horas a 28°C. Durante o desenvolvimento do estudo, as linhagens foram preservadas em suspensão em água destilada esterilizada.

Preparo de antígenos

Para o preparo das diferentes formas de antígeno, as linhagens bacterianas foram cultivadas em placas de Petri com meio NA,

Tabela 1. Linhagens de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico.

Nº linhagem IBSBF	Origem			Ano de isolamento
	Cidade	Estado	País	
65	Jaú	SP	Brasil	1976
75	Pirajú	SP	Brasil	1978
152	Ouro Fino	MG	Brasil	1978
158	Campinas	SP	Brasil	1978
248 ^p	Garça	SP	Brasil	1958
249			Quênia	1962
1.293	Guaxupé	MG	Brasil	1997
1.372	Cristais Paulista	SP	Brasil	1998
1.373	São João da Boa Vista	SP	Brasil	1998
1.664	Serra Negra	SP	Brasil	2001
2.212	Franca	SP	Brasil	2005
2.511	Patrocínio	MG	Brasil	2007
2.840	Caconde	SP	Brasil	2009
2.841	Águas da Prata	SP	Brasil	2009
2.883			Quênia	1973
2.996	Monte Santo de Minas	MG	Brasil	2008
2.998	Carmo de Minas	MG	Brasil	2008
2.999	Serra Negra	SP	Brasil	2008
3.005	Altinópolis	SP	Brasil	2008
3.015	Garça	SP	Brasil	2008
3.019	São Sebastião da Gramma	SP	Brasil	2009
3.022	Bragança Paulista	SP	Brasil	2009
3.024	Serra do Salitre	MG	Brasil	2011
3.031	Varginha	MG	Brasil	2009
3.032	Albertina	SP	Brasil	2009
3.037			Quênia	1972
3.046	Divinolândia	SP	Brasil	2009
3.049	Andradas	MG	Brasil	2009
3.065	Unai	MG	Brasil	2010

^pLinhagem patotipo.

por 48 horas a 28°C, e os respectivos antígenos, armazenados em congelador, a -20°C.

Foram utilizadas seis formas diferentes de antígenos:

- Suspensão bacteriana (SB), em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%);
- Antígenos autoclavados por 120 minutos a 121°C, obtidos por meio de uma SB;
- Antígenos tratados pelo formol, obtidos por intermédio da SB em solução salina, tratada com o mesmo volume de salina formalizada (NaCl 0,85% + 0,6% de formol). As suspensões foram mantidas por 48 horas em temperatura ambiente, centrifugadas (10.000 g/10 min), com os precipitados ressuspendidos em salina formalizada a 0,3% de formol;
- Fração de exopolissacarídeos (EPS), extraída do crescimento bacteriano ressuspendido em tampão fosfato salino (PBS). Essas suspensões foram homogeneizadas em vórtex, em temperatura ambiente, por 1 min e, em seguida, centrifugadas (12.000 g/60 min). Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes tratados com quatro volumes de acetona a -20°C, armazenados por 12 horas a 8°C, sendo em seguida centrifugadas (12.000 g/60 min). Os sobrenadantes foram descartados, e os precipitados ressuspendidos em água destilada esterilizada. Para as quatro diferentes formas de antígenos descritas, foi utilizada a proporção de 30 mg de peso fresco do crescimento bacteriano para 1.000 µL dos respectivos diluentes (solução salina, tampão fosfato de sódio, salina formalizada), de acordo com a metodologia de DE BOER; SCHAAD (1990);
- CPM, extraído de acordo com a metodologia descrita por THAVEECHAI; SCHAAD (1986). O crescimento bacteriano em meio NA foi coletado com alça de Drigalski em uma solução de cloreto de lítio (LiCl) 0,2 M, e a suspensão resultante foi mantida sob agitação de 250 rpm, ao longo de 3 horas, a 45°C. A suspensão foi centrifugada a 12.000 g, por 15 min, a 4°C, descartando os precipitados, e os sobrenadantes foram novamente centrifugados a 30.000 g, por 30 minutos, a 4°C. Os precipitados foram descartados, e os sobrenadantes, centrifugados a 100.000 g por 2 horas a 4°C. Os precipitados foram ressuspendidos em 1/100 do volume original, em água destilada esterilizada, constituindo a fração do CPM, armazenada a -20°C;
- Fração glicoproteica, extraída de acordo com DIGAT; CAMBRA (1976). As glicoproteínas (GP) foram extraídas da seguinte forma: o crescimento bacteriano foi coletado com alça de Drigalski em água destilada e mantido sob agitação de 250 rpm/180 min por 2 horas. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 15 min/5.000 g, a 4°C, descartando os precipitados, e os sobrenadantes foram novamente centrifugados (15 min/10.000 g/4°C). Os sobrenadantes resultantes dessa última centrifugação foram tratados com solução saturada de sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄ (v/v)]. Esse material foi mantido em temperatura de 8°C por 16 horas e posteriormente centrifugado

por 45 min/15.000 g/4°C. Os sobrenadantes foram descartados, e os precipitados, ressuspendidos em 1/100 do volume original em água destilada e submetidos à diálise contra água destilada, para extração do (NH₄)₂SO₄.

Produção de antissoros e testes serológicos

Para obtenção dos antissoros, a linhagem patotipo de *P. s. pv. garcae* (IBSBF 248^{pv}) foi cultivada em meio NA, por 48 horas, a 28°C. Em seguida, as colônias obtidas foram coletadas e ressuspendidas em tampão fosfato salino 0,01 M, pH 7 (ca. 10⁹ UFC.mL⁻¹/escala de McFarland) e lavadas três vezes nesse mesmo tampão, por centrifugação (10.000 g/3 min). O precipitado final foi ressuspendido em 200 µL de PBS, com adição de 200 µL de adjuvante completo de Freund. Essas suspensões foram utilizadas para imunização de coelhos da raça Nova Zelândia, com peso aproximado de 2,5 kg. Antes das imunizações, os animais foram submetidos ao processo de sangria para obtenção dos soros normais, utilizados como controle negativo das reações serológicas. Os animais foram imunizados via linfonódulo (OLIVEIRA, 1975), com duas injeções de antígenos emulsificados com igual volume de adjuvante completo de Freund, com intervalos de 15 dias entre as imunizações, com sangrias semanais. Além dos antissoros produzidos contra célula total, também foram produzidos antissoros contra CPM (linhagem IBSBF 248), segundo metodologia descrita. Os procedimentos para a produção de antissoros foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (Protocolo nº 116/11).

Foi realizado previamente teste de dda para a determinação da melhor concentração do antígeno e antissor para os testes serológicos, utilizando-se os antígenos nas concentrações de 7,5, 15, 30 e 60 mg.mL⁻¹ de peso fresco do crescimento bacteriano em NA (48 horas a 28°C), suspensos em solução salina esterilizada.

O relacionamento serológico entre as diversas linhagens bacterianas previamente selecionadas (Tabela 1) foi efetuado com teste de dda, com os seguintes meios:

- Agarose a 1%, contendo 0,02% de azida de sódio;
- Agarose a 1%, contendo 0,02% de azida de sódio, 2% de cloreto de magnésio e 0,5 mL de uma solução de azul tripano a 1%;
- Agarose a 1%, contendo 0,02% de azida de sódio e 2% de cloreto de magnésio;
- Agarose a 1%, contendo 0,02% de azida de sódio e 0,5 mL de uma solução de azul tripano a 1%.

Em todos os casos, a agarose foi dissolvida em solução salina. Os testes serológicos foram conduzidos segundo protocolos previamente determinados (BERIAM *et al.*, 1998).

Os antissoros produzidos contra *P. syringae* *pv. garcae* também foram testados por dda para outras fitobactérias patogênicas

ao cafeeiro, relacionadas na Tabela 2, utilizando-se as mesmas formas de antígenos (SB, SB autoclavada, GP, CPM, antígenos tratados com formol e EPS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de dda das 28 linhagens de *P. s. pv. garcae* e das demais bactérias patogênicas ao cafeeiro (*B. andropogonis*, *P. cichorii* e *P. s. pv. tabaci*) contra os antissoros produzidos contra células totais (AS-248-144) e contra o CPM (AS-248-145) podem ser visualizados nas Tabelas 3 e 4.

No teste para a determinação da concentração ótima do antígeno e do antissoro, o antissoro sem diluição apresentou os melhores resultados. Já para os antígenos, a SB na concentração de 30 mg.mL⁻¹ se mostrou mais eficiente. SUGIMORI *et al.* (1978) já haviam obtido antissoro para *P. s. pv. garcae* com o uso da mesma técnica, porém este estudo foi mais amplo, porque incluiu um número maior de isolados e diferentes formas de antígenos. Para estudos com outros patossistemas, também foram desenvolvidos antissoros para fins de diagnose de fitobactérias (SILVEIRA *et al.*, 2002).

A análise da Tabela 3 evidencia que tanto os antígenos na forma de SB como os do CPM são os mais indicados para trabalhos objetivando a diagnose de *P. syringae* *pv. garcae*, uma vez que os antissoros produzidos contra células totais reconheceram todas as 28 linhagens de *P. syringae* *pv. garcae* testadas. Essas duas formas de antígenos já foram apontadas como as mais indicadas para experimentos visando à diagnose de outras fitobacterioses, como *Xanthomonas axonopodis* *pv. passiflorae*, agente causal da “mancha oleosa” do maracujazeiro (BERIAM *et al.*, 1998). As grandes vantagens da utilização de antígenos na forma de SB consistem na rapidez e na facilidade de sua obtenção.

Foram desenvolvidos alguns experimentos utilizando macerados de plantas de cafeeiro infectadas artificialmente com *P. s. pv. garcae* extraídos em tampão fosfato 0,01 M, pH 7. Na dependência da quantidade de células bacterianas presentes na área lesionada, também foi possível, em alguns casos, a detecção de *P. s. pv. garcae* diretamente do material vegetal. Esses

experimentos deverão ser repetidos com um maior número de amostras. Há ainda a alternativa de se proceder a um incremento no número de células bacterianas, por meio do crescimento bacteriano em meio líquido proveniente de pequenas porções de tecido vegetal com sintomas colocadas nesse meio, e utilizar esse material como antígeno reagente nos testes de dda.

Embora os antígenos na forma de CPM e GP tenham reagido positivamente com praticamente todas as linhagens testadas (Tabela 3), esses antígenos não são os mais indicados para fins de diagnose, por demandarem um tempo maior para extração (mínimo de dez dias), enquanto os antígenos na forma de SB são obtidos do crescimento bacteriano em um período de 72 a 96 horas. Uma alternativa é produzir, além de antissoros contra o CPM, também antissoros contra a fração glicoproteína. Em ambos os casos, os antígenos imunizantes são mais específicos, o que, provavelmente, possibilita a diminuição ou mesmo a eliminação das reações cruzadas, principalmente entre linhagens pertencentes a diferentes espécies.

As demais formas de antígeno (formol, EPS e material autoclavado) não são indicadas para trabalhos visando à diagnose, uma vez que o número de linhagens reconhecidas foi baixo — 35,7% para o formol, 78,6% para EPS e 32,1% para os antígenos autoclavados. Dessa forma, é possível a ocorrência de resultados não confiáveis (tanto falsos negativos como falsos positivos). Tais formas de antígenos podem apresentar algum interesse no desenvolvimento de trabalhos com vistas ao estudo de eventuais serotipos ou variantes serológicas de *P. s. pv. garcae*, a exemplo do que acontece com outras fitobactérias (OTTA; ENGLISH, 1971). Os estudos relacionados a eventuais serotipos devem envolver um número maior de isolados. Com o número de linhagens testadas no presente trabalho, não foi possível afirmar que as diferentes reações serológicas ocorridas são decorrentes da presença de serotipos.

Os antígenos na forma de EPS só apresentaram reações positivas com algumas linhagens de *P. s. pv. garcae* (Tabela 3), sendo um indicativo de que essa forma de antígeno talvez pudesse ser utilizada na diferenciação de eventuais serotipos de *P. s. pv. garcae*. A desvantagem dessa forma de antígeno é não apresentar reação positiva com todas as linhagens de *P. s. pv. garcae* testadas. Em trabalho de triagem em campo podem ocorrer

Tabela 2. Linhagens de bactérias fitopatogênicas que causam sintomas de manchas foliares em cafeeiros.

Nº da linhagem IBSBF	Patógeno bacteriano	Hospedeiro	Origem	Ano de isolamento
166	<i>Burkholderia andropogonis</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	1979
199 ^T	<i>Burkholderia andropogonis</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Estados Unidos	1959
587	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	1973
1.784 ^T	<i>Pseudomonas cichorii</i>	<i>Cichorium endivia</i>	Alemanha	1929
1.972 ^P	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hungria	1959
2.240	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	2005
2.241	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	2005
2.249	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tabaci</i>	<i>Coffea arabica</i>	Brasil	2005

IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico; ^TLinhagem tipo; ^PLinhagem patotipo.

Tabela 3. Testes serológicos entre os antissoros produzidos contra células totais (As-248-114) e contra proteínas de membrana (As-248-115) de *P. s. pv. garcae*.

Linhagens IBSBF	Antígenos/Antissoros											
	Suspensão		Formol		CPM		EPS		GP		AUTO	
	248 144	248 145	248 144	248 145	248 144	248 145	248 144	248 145	248 144/7	248 145/7	248 144	248 145
65	++	-	-	-	+	+	-	-	++	+	+	-
75	+	+	-	-	+	+	+	-	++	+	-	-
152	++	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
158	+++	++	-	+	+++	+++	+	+	+++	++	+	+
248	+	++	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
249	+	+	+	+	++	-	-	+	-	+	-	-
1.293	++	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
1.372	++	++	+	+	++	+	-	+	+	+	+	+
1.373	++	+	-	-	++	++	+	+	+	+		-
1.664	+++	+	-	+	+	++	-	-	+	+	ND	
2.212	++		+	+	++	++	+	+	-	+	+	-
2.511	+++	+	-	(+)	+	+	+	+	++	+	+	-
2.840	+++	++	-	-	++	+	-	-	+	+		-
2.841	+++	++	-	-	+	+	+	+	+	+	?	?
2.883	+++	+	-	-	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND
2.996	+++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	?	?
2.999	++	+	-	-	++	+	-	-	+	+	-	-
3.005	+	++	+	+	++	+	+	+	+	+	-	-
3.015	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
3.019	+	++	-	-	++	+	-	-	++	+	-	-
3.022	++	+	-	-	++	++	+	+	?	?	-	-
3.024	++	+	-	-	+++	++	+	+	+	+	-	-
3.031	++	+	-	-	+	++	+	+	+	+	-	-
3.032	ND	ND	-	-	++	ND	+	+d	ND	ND	ND	ND
3.037	+++	+	-	-	+++	++	+	+	?	?	?	?
3.046	+++	+	-	-	++	++	+	(+)	+	+	-	-
3.049	+++	++	-	-	++	++	(+)	+	++	(+)	+	-
3.065	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico; ND: não determinado; ?: resultado duvidoso; CPM: complexo proteico da membrana; EPS: exopolissacarídeos; GP: glicoproteínas; AUTO: autoclavado.

Tabela 4. Relacionamento serológico entre linhagens de bactérias patogênicas ao cafeeiro.

IBSBF	Antígenos/Antissoros											
	Suspensão		Formol		CPM		EPS		GP		AUTO	
	248* 144	248 145	248 144	248 145								
166	++	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
199	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
587	++	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
1.784	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.972	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2.240	+++	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2.241	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2.249	+++	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2.996	+++	++	-	+	++	+			?	+	+	+

IBSBF: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico; *antissoros; CPM: complexo proteico da membrana; EPS: exopolissacarídeos; GP: glicoproteínas; AUTO: autoclavado.

escapes dos resultados, com falsos negativos. Mais uma vez, seria interessante testar um número maior de linhagens bacterianas.

O relacionamento serológico entre os antissoros produzidos contra células totais (AS-248-144) e o CPM com as demais bactérias patogênicas ao cafeeiro (*B. andropogonis* (ISBBF-166 e IBSBF-199), *P. cichorii* (IBSBF-587 e IBSBF-1784) e *P. s. pv. tabaci* (IBSBF-2240, IBSBF-2241 e IBSBF-2249) (Tabela 4) mostraram que, quando as SBs são empregadas como antígenos e se utiliza como meio de reação agarose em solução salina e azida de sódio, há reações cruzadas entre os antissoros contra célula total e os antígenos de todas as linhagens, o que inviabiliza a adoção desse teste para esse meio de reação. Com relação aos antissoros para células totais, reações cruzadas entre *P. s. pv. garcae* e *P. s. pv. tabaci* já eram esperadas, visto se tratarem de patovares de uma mesma espécie bacteriana, que apresentam uma série de determinantes antigênicos comuns, responsáveis pelas reações cruzadas.

A utilização de diferentes meios suportes para as reações de dupla difusão está sumarizada na Tabela 5. Os meios 2 e 4 contendo, além de agarose, NaCl e NaN₃, MgCl₂ 2% + azul de tripano

(solução a 0,1% em água) em 100 mL de meio básico e azul de tripano (solução a 0,1% em água) em 100 mL de meio básico, respectivamente, foram os mais específicos quando testados com as diferentes formas de antígenos contra os antissoros produzidos com base no CPM. A combinação entre o antissoro produzido contra proteínas de membrana e o meio 4 de dupla difusão foi a mais específica. Só houve uma reação cruzada entre AS-248-145 e uma linhagem de *B. andropogonis* (Tabela 5). Essa reação só ocorreu com uma das linhagens testadas de *B. andropogonis*, mas não impede que esse antissoro seja utilizado para a separação dos dois isolados de *P. syringae* patogênicos ao cafeeiro — *garcae* e *tabaci*, que são os mais difíceis de serem separados por outros testes comumente utilizados na identificação de fitobactérias. Além disso, morfologicamente, *B. andropogonis* e *P. s. pv. garcae* são completamente diferentes e separadas com relativa facilidade.

Dessa maneira, de acordo com os resultados obtidos, a combinação de antígenos na forma de SB com o meio suporte contendo azul de tripano poderá ser empregada para diagnose da mancha aureolada do cafeeiro.

Tabela 5. Relacionamento serológico entre antissoros contra *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e demais bactérias patogênicas ao cafeeiro em diferentes meios de dupla difusão.

		Meio 1 ¹		Meio 2		Meio 3		Meio 4	
		AS-248 ² 144	AS-248 ³ 145	AS-248 144	AS-248 145	AS-248 144	AS-248 145	AS-248 144	AS-248 145
166	SUSP. ⁴	-	-	-	-	-	-	+	-
	GP	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPM	+	-	+	-	+	(+)	+	-
199	SUSP.	-	-	-	-	-	-	-	-
	GP	+	-	-	-	-	-	-	-
	CPM	+	+	+	-	+	+	+	+
2.240	SUSP.	-	-	+	-	-	-	+	-
	GP	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPM	+	-	+	-	-	-	-	-
2.241	SUSP.	+	+	-	-	-	-	-	-
	GP	+	-	+	-	+	-	+	-
	CPM	+	-	+	-	+	-	+	-
2.249	SUSP.	+	-	+	-	+	-	+	-
	GP	+	-	+	-	+	-	+	-
	CPM	+	-	+	-	+	-	+	-
1.784	SUSP.	-	-	-	-	-	-	-	-
	GP	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPM	-	-	-	-	-	-	-	-
1.972	SUSP.	+	-	-	-	-	-	+	-
	GP	+	-	-	-	+	-	+	-
	CPM	+	-	+	-	+	-	+	-
3.005	SUSP.	+	+	+	+	+	+	+	+
	GP	+	+	+	+	+	+	+	+
	CPM	+	+	+	+	+	+	+	+

¹Meio 1 - agarose 1% + NaCl 0,85% + NaN₃ 0,02%; Meio 2 - agarose 1% + NaCl 0,85% + NaN₃ 0,02% + MgCl₂ 2% + azul de tripano (solução a 0,1% em água) (1 mL. 100 mL⁻¹); Meio 3 - agarose 1% + NaCl 0,85% + NaN₃ 0,02% + MgCl₂ 2%; Meio 4 - agarose 1% + NaCl 0,85% + NaN₃ 0,02% + azul de tripano (solução a 0,1 % em água) (1 mL. 100 mL⁻¹); ²antissoro contra célula total; ³antissoro contra complexo proteico da membrana; ⁴formas de antígenos: suspensão bacteriana (SUSP); glicoproteínas (GP); complexo proteico da membrana (CPM).

Convém salientar que os maiores problemas com reações cruzadas ocorrem entre *P. s. pv. garcae*, *P. s. pv. tabaci* e *P. cichorii*. Morfologicamente, *P. s. pv. garcae* e *B. andropogonis* são facilmente diferenciáveis em meio de cultura, além do fato de *B. andropogonis* não ser fluorescente sob luz ultravioleta quando cultivada em meio B de King, enquanto *P. s. pv. garcae* o é. O mesmo não ocorre para *P. s. pv. garcae*, *P. s. pv. tabaci* nem *P. cichorii*. Há outras características que, aliadas aos resultados dos testes serológicos, também podem auxiliar e até mesmo corroborar a identificação de *P. s. pv. garcae*. A diferenciação entre as espécies *P. cichorii* e *P. syringae* é feita com relativa facilidade pelos testes LOPAT (LELLIOTT *et al.*, 1966).

De forma geral, *P. s. pv. tabaci* apresenta fluorescência em meio B de King mais pronunciada quando comparada à fluorescência de *P. s. pv. garcae*, mas essa característica não é suficiente para separar ambas. Os testes com alguns sais de ácidos orgânicos e alguns carboidratos auxiliam na separação dos isolados das duas bactérias, mas, como já comentado, demandam longo período de tempo.

Os dados obtidos com as linhagens utilizadas, quando testadas em dupla difusão com o antissoro produzido contra proteínas de membranas (AS-248-145) com o meio 4, apontam uma alternativa para a diagnose rápida e segura de *P. s. pv. garcae*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, I.M.G.; MACIEL, K.M.; BERIAM, L.O.S.; RODRIGUES, L.M.R.; DESTÉFANO, S.A.L.; RODRIGUES NETO, J.; PATRÍCIO, F.R.A. Increase in incidence of bacterial halo blight (*Pseudomonas syringae* p. *garcae*) in coffee producing areas in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 24., San José, Costa Rica. *Proceedings...* v.24, p.1080-1084, 2013.
- AMARAL, J.F.; TEIXEIRA, C.G.; PINHEIRO, E.D. O bactério causador da mancha aureolada do cafeeiro. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.23, p.151-155, 1956.
- BERIAM, L.O.S.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; ABRAMIDES, P.G. 2016. *Bactérias fitopatogênicas no Brasil – levantamento bibliográfico*. 2016. Disponível em: <<http://germo.apta.sp.gov.br/fitobacterias/index.asp>>. Acesso em: 04 set. 2016.
- BERIAM, L.O.S.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; ROSATO, Y.B.; YANO, T. Serologia aplicada ao estudo de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, agente causal da bacteriose do maracujazeiro. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.65, n.2, p.25-33, 1998.
- DE BOER, S.H.; SCHAAD, N.W. Preparation of antigen, bacteria. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S.H. *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. Estados Unidos: APS Press, 1990. p.27-31.
- DESTÉFANO, S.A.L.; RODRIGUES, L.M.; BERIAM, L.O.S.; PATRÍCIO, F.R.A.; THOMAZIELLO, R.A.; RODRIGUES NETO, J. Bacterial leaf spot of coffee caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Brazil. *Plant Pathology*, v.59, p. 1162-1163, 2010.
- DIGAT, B.; CAMBRA, M. Specificity of antigens in *Pseudomonas solanacearum* E. F. Sm. and application of serology for studying bacterial wilt. In: INTERNATIONAL PLANNING CONFERENCE AND WORKSHOP ON THE ECOLOGY AND CONTROL OF BACTERIAL WILT CAUSED BY *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM*, 1. SEQUEIRA L.; KELLMAN, A. (Eds.). *Proceedings...* Raleigh, North Carolina, 1976. p.18-24.
- LELLIOTT, R.A.; BILLING, R.A.; HAYWARD, A.C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, v.29, n.3, p. 470-489, 1966.
- MALAVOLTA JR., V.A.; BERIAM, L.O.S.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C.F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.34, supl. esp., p.1-88, 2008.
- OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção via linfonódulo. *Summa Phytopathologica*, v.1, p.61-64, 1975.
- OTTA, J.D.; ENGLISH, H. Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology*, v.61, p.443-452, 1971.
- ROBBS, C.F.; KIMURA, O.; RIBEIRO, R.L.D.; OYADOMARI, L.C. "Crestamento bacteriano das folhas": nova enfermidade do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) incitada por *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp. *Arquivos da Universidade Federal Rural*, Rio de Janeiro, v.4, n.2, p.1-5, 1974.
- RODRIGUES NETO, J.; FIGUEIREDO, P.; MARIOTTO, P.R.; ROBBS, C.F. *Pseudomonas andropogonis* (Smith, 1911) Stapp, 1928, agente causal da "mancha escura bacteriana" em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Arquivos do Instituto Biológico*, v.48, p.31-36, 1981.
- SILVEIRA, J.R.P.; CASTRO, L.A.S.; COUTO, M.E.O.; MARTINS, O.M.; BARNI, V. Produção de anti-soros para diagnose de pectobactérias causadoras de podridão mole em batata. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v.8, n.1, p.7-14, 2002.
- SUGIMORI, M.H.; OLIVEIRA, A.R.; NAKAMURA, T.; RODRIGUES NETO, J. Anti-soro para *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* preparados pela técnica de injeção no linfonódulo. *Summa Phytopathologica*, v.4, p.7, 1978.
- THAVEECHAI, N.; SCHAAD, N.W. 1986. Serological and electrophoretic analysis of a membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from Thailand. *Phytopathology*, v.76, n.2, p.139-147, 1986.
- YOUNG, J.M.; TRIGGS, C.M. Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* Van Hall 1902. *Journal of Applied Bacteriology*, v.77, p.195-207, 1994.