ESTUDOS SEROLÓGICOS EM *Pseudomonas* SPP. NÃO-FLUORESCENTES E PATOGÊNICAS À GRAMÍNEAS

JÚLIO RODRIGUES NETO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. AVELINO R. OLIVEIRA

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro - 1984

À minha mãe Thomázia,

MINHA HOMENAGEM.

À minha esposa Sueli,

filhos Tatiana e Renê,

DEDICO.

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

O autor expressa os mais sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, e em particular:

- Ao Professor Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA, pela orientação, estímulo, revisão dos originais, e acima de tudo, pela sincera amizade.
- Ao DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ" e aos seus Professores, por possibilitarem a realização do Curso de Pós-Graduação.
- Ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq), pela concessão de Bolsa de Estudos durante parte do Curso de Pós-Graduação.
- Aos Professores e Pesquisadores: Drs. CHARLES F. ROBBS e FUJIO AKIBA, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Drs. DOUGLAS W. DYE e JOHN M. YOUNG, "Department of Scientific and Industrial Research", Nova Zelândia, Dr. NORMAN W. SCHAAD, da Universidade de Idaho (EUA), Dr. NILTON L. SOUZA, da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, pelo fornecimento de culturas bacterianas.
- Ao Pesquisador Científico MS MAURO H. SUGIMORI, pelo auxílio e incentivo.
- Ao Pesquisador Científico Dr. HIROSHI NAGAI, pelas traduções de trabalhos e textos em japonês.
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo apoio e incentivo.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. <i>Pseudomonas andropogonis</i>	4
2.2. <i>Pseudomonas avenae</i>	6
2.3. <i>Pseudomonas floridana</i>	8
2.4. <i>Pseudomonas rubrilineans</i>	9
2.5. <i>Pseudomonas rubrisubalbicans</i>	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. Culturas bacterianas e manutenção	12
3.2. Meios de cultura	12
3.3. Preparo dos antígenos para imunização	18
3.4. Preparo dos anti-soros	18
3.5. Preparo dos antígenos para as reações sero- lógicas	22
3.6. Testes serológicos	22
4. RESULTADOS	24
4.1. Reações serológicas obtidas com anti-soros produzidos para <i>Pseudomonas andropogonis</i>	25
4.1.1. Reações com antígenos homólogos	25
4.1.2. Reações com antígenos heterólogos.	27

Página

4.2. Reações serológicas obtidas com anti-soros produzidos para <i>Pseudomonas avenae</i>	27
4.2.1. Reações com antígenos homólogos	27
4.2.2. Reações com antígenos heterólogos	30
4.2.2.1. Reações com antígenos de <i>P. an</i> <i>dropogonis</i> e <i>P. floridana</i>	30
4.2.2.2. Reações com antígenos de <i>P. ru</i> <i>brilleanans</i>	30
4.2.2.3. Reações com antígenos de <i>P. ru</i> <i>brissubalbicans</i>	31
4.3. Reações serológicas com anti-soro produzi- do para <i>Pseudomonas floridana</i>	31
4.4. Reações serológicas obtidas com anti-soros produzidos para <i>Pseudomonas rubrilleanans</i>	31
4.4.1. Reações com antígenos homólogos	31
4.4.2. Reações com antígenos heterólogos	32
4.4.2.1. Reações com antígenos de <i>P. an</i> <i>dropogonis</i> e <i>P. floridana</i>	32
4.4.2.2. Reações com antígenos de <i>P. ave</i> <i>nae</i>	33
4.4.2.3. Reações com antígenos de <i>P. ru</i> <i>brissubalbicans</i>	33
4.5. Reações serológicas observadas com anti-so ros obtidos para <i>P. rubrisubalbicans</i>	34
4.5.1. Reações com antígenos homólogos	34
4.5.2. Reações com antígenos heterólogos	46
4.5.2.1. Reações com antígenos de <i>P. an</i> <i>dropogonis</i>	46
4.5.2.2. Reações com antígenos de <i>P. ave</i> <i>nae</i>	46
4.5.2.3. Reações com antígeno de <i>P. flo</i> <i>ridana</i>	46

	<u>Página</u>
4.5.2.4. Reações com antígenos de <i>P. rubrilineans</i>	46
5. DISCUSSÃO	49
5.1. Emprego e especificidade dos anti-soros. .	49
5.2. Reações serológicas	51
5.3. O problema de nomenclatura nos grupos <i>avenae-rubrilineans</i>	53
6. CONCLUSÕES.	55
7. LITERATURA CITADA	57

RESUMO

O relacionamento serológico entre cinco espécies de *Pseudomonas*, do tipo não-fluorescente e patogênicas a gramíneas, foi determinado por meio de testes de dupla-difusão em gel. As espécies estudadas foram *P. andropogonis*, *P. avenae*, *P. floridana*, *P. rubrilineans* e *P. rubrisubalbicans*, englobando um total de 32 culturas bacterianas.

Para os testes, catorze anti-soros foram obtidos através da imunização de coelhos via linfonóculo, com várias culturas das espécies mencionadas. A imunização foi efetuada por meio de injeção do antígeno na forma de células bacterianas inteiras e emulsionadas em adjuvante Freund incompleto, e para os testes de dupla-difusão, empregou-se antígenos compostos de glicoproteínas extraídas da cápsula bacteriana.

Os resultados dos testes serológicos mostram que os anti-soros obtidos contra *P. andropogonis* produziram reações altamente específicas, indicando que esta espécie bacteriana é distinta das demais, e a serologia pode ser empregada para a sua identificação. Reações específicas também ocorreram com uma estirpe individual de *P. rubrisubalbicans*.

O anti-soro produzido para *P. floridana*, a exemplo de *P. andropogonis*, reagiu apenas com a estirpe homóloga, sendo observado, entretanto, reações heterólogas entre antígeno de *P. floridana* e anti-soros de *Pseudomonas* spp.

Reações heterólogas e inespecíficas foram observadas também entre anti-soros e antígenos de *P. avenae* e *P. rubrilineans* contra *P. rubrisubalbicans*, provavelmente devido à existência de antígenos comuns para as células bacterianas destas espécies.

No caso particular das espécies *P. avenae* e *P. rubrilineans*, foram observadas reações de identidade completa e identidade parcial em reações cruzadas com os antígenos e anti-soros destas espécies, inclusive proporcionado a separação de serotipos, correlacionados com a patogenicidade dos isolados, e indicando, portanto, um estreito relacionamento serológico entre as estirpes do grupo *avenae-rubrilineans*, onde a possibilidade de sinonímia não deve ser excluída.

SUMMARY

Serological relationship between five species of non fluorescent pseudomonads pathogenic to "gramineas", was determined by double-diffusion in gel tests. The studied species were *P. andropogonis*, *P. avenae*, *P. floridana*, *P. rubrilineans* and *P. rubrisubalbicans*, and a number of thirty-two cultures was used.

Fourteen antisera were prepared by immunization of rabbits by intra lymph node technique, with antigens of the referred species. Immunization was performed by the injection of whole cells emulsified in incomplete Freund adjuvant. In the diffusion tests, the antigens used were glyco - protein extracts from bacterial capsule.

Results of serological tests showed that antisera obtained against *P. andropogonis* produced specific reactions against the homologous antigens, and this identifies this species as distinct from others, and the serology can be applied for its identification. Specific reaction also occurred with as individual strain of *P. rubrisubalbicans*..

Antiserum produced against *P. floridana* also reacted only with the homologous antigen, nevertheless the *P. floridana* antigen reacted with some *Pseudomonas* species antisera.

Heterologous and non-specific reactions were observed among *P. avenae* and *P. rubrilineans* antisera against *P. rubrisubalbicans* antigens, probably due common antigens found in these species. In the case of *P. avenae* and *P. rubrilineans* tests, complete and partial identity precipitation lines were observed among antisera and groups of antigens from these species, and the results show an apparent relation with pathogenicity, among the *avenae-rubrilineans* strains, and the possibility of synonymy can not be excluded.

1. INTRODUÇÃO

As gramíneas cultivadas, tais como a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), o milho (*Zea mays* L.), o sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) e o trigo (*Triticum aestivum* L.) entre outras, são básicas para a economia de vários países, uma vez que além do consumo, representam fontes de divisa através de exportação. No Brasil, destacam-se atualmente a cana-de-açúcar e o milho como as culturas de maior produção, tendo proporcionado ganhos reais da ordem de 14% no ano agrícola 81/82 (SÃO PAULO, 1982). Programas econômicos como o da utilização do álcool para combustível e a retirada gradual do subsídio ao trigo, estimulam o plantio daquelas gramíneas. Dados revelam que estas culturas vêm se expandindo a cada ano. De 1981 para 1982, no Estado de São Paulo, a cana-de-açúcar teve aumento em área plantada de 7,34%, com aumento de produção em 12,2% enquanto que o milho por sua vez, figura com aumento de 12,6% em área plantada e 23,3% em produção. É de se esperar, portanto, um crescimento contínuo da área plantada com gramíneas de modo geral, inclusive sorgo. Por outro lado, estas culturas podem ter a sua produção diminuída devido a vários fatores, entre estes, a incidência de agentes fitopatogênicos.

Assim, são mencionados ocorrendo naquelas culturas, bacterioses provocadas por espécies dos gêneros *Coryne-*

bacterium, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, constituindo -se a maioria em importantes problemas onde se cultivam gramíneas (BOEWE, 1960; TARR, 1962; TOKESHI, 1980). Dentre os patógenos bacterianos, adquirem especial importância as espécies do gênero *Pseudomonas*, integrantes de um grupamento homogêneo, as consideradas pseudomônadas "graminícolas", que são bactérias do tipo não-fluorescente e que acumulam o poli-B-hidroxibutirato (PHB) como material de reserva intracelular.

Deste grupamento fazem parte, entre outras, as espécies *Pseudomonas andropogonis* (Smith 1911) Stapp 1928, *Pseudomonas avenae* Manns 1909, *Pseudomonas floridana* (Bourne 1970) Bourne 1970, *Pseudomonas rubrilineans* (Lee, Purdy, Barnum e Martin 1925) Stapp 1928 e *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Christopher e Edgerton 1930) Krasil'nikov 1949. Em parte, estas espécies foram estudadas por GOTO e OHATA (1961), HAYWARD (1962), GOTO (1964), TOMINAGA (1971), GOTO e STARR (1971), HALE e WILKIE (1972) e SCHAAD et alii (1975), e nestes estudos, são evidentes as similaridades de certos caracteres fenotípicos e da ação patogênica daquelas bactérias a uma gama de gramíneas hospedeiras.

Dentre as pseudomônadas "graminícolas", verificou-se no país a ocorrência de *P. andropogonis*, *P. rubrilineans* e *P. rubrisubalbicans*, provocando moléstias em plantas de grande importância econômica (ROBBS et alii, 1981a).

Devido às características similares existentes entre os membros deste grupo, a identificação a nível de espécies requer o emprego de um certo número de testes bioquímicos e fisiológicos diferenciais (HALE e WILKIE, 1972; BRADBURY, 1967a, 1967b, 1973), alguns de resultados demorados ou trabalhosos. Por outro lado, a identificação de bactérias fitopatogênicas com a utilização de técnicas serológicas pode, em muitos casos, ser mais conveniente do que através do emprego dos testes bioquímicos ou de inoculações experimentais. Uma vez que a serologia tem-se mostrado efetiva tanto para o

diagnóstico de rotina bem como para estudos de relacionamento entre espécies bacterianas (TRIGALET et alii, 1978; SCHAAD, 1979), a presente pesquisa visa estudar a possibilidade da sua utilização para as pseudomônadas "graminícolas", através de: (i) sensibilidade de anti-soros para as espécies mencionadas; (ii) uso de antígenos externos (glicoproteínas) na obtenção de especificidade para diagnóstico e, (iii) uso de antígenos externos (glicoproteínas) para estudos do relacionamento a nível infra-específico entre as espécies citadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1, *Pseudomonas andropogonis* (Smith 1911) Stapp 1928.

- = *Bacterium andropogoni* Smith 1911.
- = *Phytomonas andropogoni* (Smith) Bergey et alii 1930
- = *Phytobacterium andropogoni* (Smith) Magrou e
Prevot 1948.
- = *Aplanobacter stizolobii* Wolf 1920.
- = *Bacterium stizolobii* (Wolf) McCulloch 1928.
- = *Phytomonas stizolobii* (Wolf) Bergey et alii 1930.
- = *Phytobacterium stizolobii* (Wolf) Magrou e Prevot
1948.
- = *Pseudomonas stizolobii* (Wolf) Stapp 1935.

SMITH e HEDGES (1905) descreveram primeiramente a moléstia causada por *Pseudomonas andropogonis* em sorgo vas-soura (*Sorghum bicolor* var. *technicum* Stapf.) nos Estados Uni-dos da América, cujos sintomas, naquele hospedeiro, são do ti-po manchas necróticas ou listras nas folhas.

Mais tarde, SMITH (1911) denomina o patógeno como *Bacterium andropogoni*, que é posteriormente colocado no gênero *Pseudomonas* Migula (ELLIOTT e SMITH, 1924; STAPP, 1928; ELLIOTT e SMITH, 1929).

P. andropogonis é de ocorrência generalizada em vários países (SUNDARAM, 1978), e além do sorgo, foi detectada provocando lesões necróticas em folhas e tecidos de inúmeras espécies de plantas, incluindo o milho (ULLSTRUP, 1960), milho doce (WEHLBURG, 1962), *Vicia sativa* L. (ALLEN et alii, 1970), *Mucuna deeringianum* (Bort.) Merrill e *Trifolium repens* L. (BURKHOLDER, 1957), *Vanda* sp. (OSHIRO et alii, 1964), *Bougainvillea* sp. (ROTHWELL e HAYWARD, 1964), *Coffea arabica* L. (RODRIGUES NETO et alii, 1981) e *Triplaris filipensis* Cham. (ROBBS et alii, 1981b).

Esta variedade de hospedeiros indica a ocorrência de estirpes com evidente especialização patogênica, o que sugere ser *P. andropogonis* uma espécie heterogênea. ROTHWELL e HAYWARD (1964) relatam que isolados de *bougainvillea* não infectam mucuna, enquanto que GOTO e STARR (1971) reportam que isolados de *bougainvillea* e mucuna não infectam trevo e milho. OSHIRO et alii (1964), realizando inoculações cruzadas com *P. andropogonis* isolado de *Vanda* sp., verificaram ser esta estirpe também patogênica ao milho e cana-de-açúcar, enquanto que ROBBS et alii (1981b) por sua vez, observaram que estirpes de *Triplaris* e *Coffea* não infectam *bougainvillea*, entretanto, ambas mostraram ação patogênica em sorgo, mucuna e milho.

Descrições do organismo denominado *P. stizolobii* efetuadas por ALLEN et alii (1970) e os estudos realizados por GOTO e STARR (1971), que examinaram comparativamente culturas de *P. andropogonis* e *P. stizolobii*, em seus caracteres bioquímicos e de patogenicidade, demonstram a sinonímia existente entre estas espécies.

NISHIYAMA et alii (1979), estudando uma bacteriose em Tulipa (*Tulipa gesneriana* L.) e após uma série de inoculações experimentais em diversas plantas, concluíram ser *Pseudomonas wodsi* (Smith 1911) Stevens 1925 sinônimo de *P. andropogonis*, hipótese esta, que se confirmada, concorrerá para o aumento da relação de hospedeiros desta espécie bacteriana.

Serologicamente, *P. andropogonis* foi analisada por TOMINAGA (1971), que verificou o não-relacionamento desta espécie com *P. alboprecipitans*, *P. glumae* e *P. setariae*.

2.1. *Pseudomonas avenae* Manns 1909.

- = *Bacillus avenae* Manns 1909.
- = *Phytomonas avenae* (Manns) Bergey et alii 1930.
- = *Bacterium alboprecipitans* Rosen 1922.
- = *Phytomonas alboprecipitans* (Rosen) Bergey et alii 1930.
- = *Phytobacterium alboprecipitans* (Rosen) Magrou e Prevot 1948.
- = *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen 1922.
- = *Bacterium setariae* Okabe 1934.
- = *Pseudomonas setariae* (Okabe) Savulescu 1947.

Descrita por MANNS (1909), causando crestamento em folhas de aveia (*Avena sativa* L.), *Pseudomonas avenae* mostrou ser patogênica através de inoculações experimentais, ao centeio (*Secale cereale* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), milho e trigo.

ROSEN (1919), verificando uma bacteriose em folhas de capim cauda-de-raposa (*Chaetochloa lutescens* = *Setaria lutescens* [Weigel] Hubb.), refere ser *P. avenae* o agente causal, porém, três anos mais tarde, aquele autor considera o patógeno distinto de *P. avenae*, denominando-o *Bacterium alboprecipitans*. Mediante inoculações artificiais, ROSEN (1922) verificou suscetibilidade a esta bactéria em várias gramíneas, incluindo aveia, centeio, cevada, milho e sorgo, nas quais a bactéria provocou desde pequenas manchas até listras e queima de bordos de folhas.

Posteriormente, JOHNSON et alii (1945, 1949) verificaram *P. alboprecipitans* ocorrendo naturalmente em milho,

causando sintomas de manchas foliares e podridão do colmo.

Além da aveia e milho, *P. avenae* (= *P. alboprecipitans* = *P. setariae*) foi verificada também ocorrendo naturalmente em arroz (*Oryza sativa* L.) por GOTO e OHATA (1961), em teosinte (*Zea mexicana* [Schrad.] Reeves e Mangelsd.), em *Bromus inermis* Leiss, *B. marginatus* N., *B. catharticus* V., *Agropyron intermedium* (Host.) Beauv. e *A. trichophorum* (Link.) Richt., por TOMINAGA (1971), e *Paspalum urvillei* Steud. (GITAITIS et alii, 1976).

Em suas descrições de bactérias fitopatogênicas, ELLIOTT (1930, 1951) mantém a espécie *P. alboprecipitans*, colocando *P. avenae* em sinonímia de *Pseudomonas coronofaciens* (Elliott 1920) Stevens 1925 (= *P. syringae* pv. *coronofaciens* [Elliott] Young et alii 1978), sendo que esta espécie é do tipo fluorescente (grupo Ia seg. LELLIOTT et alii, 1966), embora induza em aveia sintomatologia similar à descrita por MANNS (1909).

GOTO e OKABE (1952), examinando bactérias isoladas de paíço comum (*Panicum miliaceum* L.) e setária (*Setaria italica* Beauv.) coletadas no Japão, concluem que *Pseudomonas setariae* (Okabe 1934) Savulescu 1947 e *Pseudomonas panici-miliacei* (Ikata e Yamauchi 1931) Savulescu 1947 são sinônimos de *Pseudomonas panici* (Elliott 1923) Stapp 1928 (= *P. syringae* pv. *panici* [Elliott] Young et alii 1978), tendo aqueles autores considerado principalmente a patogenicidade a diversos hospedeiros. Posteriormente, GOTO e OHATA (1961), pesquisando uma cultura bacteriana isolada de folhas de arroz com sintomas de listras necróticas, indicam que a identidade da bactéria em questão é *P. setariae*, considerando-a distinta de *P. panici* em razão das características bioquímicas e de patogenicidade daquele organismo. Baseando-se igualmente nas propriedades bioquímicas, GOTO (1964) rejeita a colocação de *P. panici* no gênero *Xanthomonas* Dowson, e considera ainda *P. setariae* em sinonímia de *P. panici*.

TOMINAGA (1971) em seus estudos com pseudomonâdas patogênicas a gramíneas no Japão, empregando testes bioquímicos, de patogenicidade, e serologia com testes de precipitação e difusão em gel, conclui que *P. alboprecipitans* e *P. setariae* não são distinguíveis através dos seus caracteres bioquímicos e ainda, serologicamente estas espécies são relacionadas, possuindo o mesmo sistema antigênico, propondo *P. setariae* como sinônimo de *P. alboprecipitans*.

SCHAAD e SUMNER (1974) e SCHAAD et alii (1975), baseando-se em experimentos de reassociação em DNA e patogenicidade à aveia, centeio, cevada, milho e trigo, concluem ser *P. avenae* e *P. alboprecipitans* a mesma espécie, propondo a preservação de *P. avenae* por ser prioritária. Esta proposição, todavia, não é considerada por alguns autores (GITAITIS et alii, 1976, 1977 e 1981; SOUZA, 1980), uma vez que SCHAAD et alii (1975) não examinaram as culturas originais, consideradas inexistentes, tendo sido proposto, inclusive, nova cultura tipo para *P. avenae* (cultura ATCC 19860 = ICPB PA 117 = NCPPB 1011 = PDDCC 3183 = cultura 193 J.R. NETO).

2.3. *Pseudomonas floridana* (Bourne 1970) Bourne 1970.

BOURNE (1970a) verificou uma doença bacteriana em cana-de-açúcar ocorrendo na Flórida (EUA) com sintomas de listras ou riscas nas folhas, tendo isolado o agente causal que foi inicialmente enquadrado no gênero *Xanthomonas*, recebendo a denominação *Xanthomonas floridana* Bourne 1970. Logo após, HAYWARD (1970) contesta a designação genérica deste organismo, indicando ser o mesmo relacionado ao gênero *Pseudomonas* e ainda, semelhante à *Pseudomonas rubrisubalbicans*. BOURNE (1970b) reclassifica a bactéria, denominando-a *Pseudomonas floridana*.

Por outro lado, YOUNG et alii (1978) conferem a

esta espécie uma posição taxonômica ilegítima, uma vez que é antedatada por *Pseudomonas floridana* Humm 1946, uma espécie marinha.

BOURNE (1970a) relata que além do hospedeiro original (cana-de-açúcar), obteve sintomas em sorgo e *Erianthus* sp. através de inoculações artificiais com a bactéria isolada.

A ocorrência desta bacteriose em outras localidades não consta da literatura.

2.4. *Pseudomonas rubrilineans* (Lee, Purdy, Barnum e Martin 1925) Stapp 1928

= *Phytomonas rubrilineans* Lee et alii 1925.

= *Bacterium rubrilineans* (Lee et alii) Elliott 1930.

= *Xanthomonas rubrilineans* (Lee et alii) Starr e Burkholder 1942.

= *Xanthomonas rubrilineans* (Lee et alii) var. *indicus* Summanwar e Bhide 1962.

A moléstia (estrias vermelhas) provocada por *Pseudomonas rubrilineans* em folhas de cana-de-açúcar foi verificada primeiramente por LYON (1922) em canas da variedade Tip, no Hawai. Posteriormente, a doença foi investigada por LEE e JEENINGS (1924) que isolaram a bactéria causal, designada *Phytomonas rubrilineans* por LEE et alii (1925). A bactéria pode ocasionar também sintomas de podridão do colmo, de consequências econômicas mais graves do que as manchas foliares.

STAPP (1928) classifica a bactéria no gênero *Pseudomonas*, e alguns anos mais tarde, com o estabelecimento do gênero *Xanthomonas*, STARR e BURKHOLDER (1942) transferem o patógeno para aquele gênero, reconhecendo, entretanto, não

ser esta espécie uma *Xanthomonas* típica.

HAYARD (1962), estudando os caracteres bioquímicos dos patógenos bacterianos da cana-de-açúcar, retêm esta espécie no gênero *Pseudomonas*. Posteriormente, DYE (1963) e BRADBURY (1967a) concordam com a proposição daquele autor.

Além da cana-de-açúcar, *P. rubrilineans* foi verificada ocorrendo naturalmente em milho (ORIAN, 1957; ULLASA et alii, 1967); em *Paspalum nutans* Lam. e *P. paniculatum* L. (ORIAN, 1956), em *Pennisetum. thyphoides* (Burm.) Stapf. e Hubb. (SUMMANWAR e BHIDE, 1962), em teosinte (DANGE e PAYAK, 1973) e em *Canna indica* L. e *C. paniculata* Ruiz e Pavon (ROBBS, 1980), sendo que a distribuição geográfica da bactéria é generalizada.

DANGE e PAYAK (1973), estudando *P. rubrilineans* obtidos de milho e teosinte na Índia, observaram que estas estirpes não diferiam em bioquimismo e patogenicidade em milho, teosinte e cana-de-açúcar, quando comparados com isolados de cana-de-açúcar, entretanto, em presença de Fago oriundo de milho infectado, poderiam ser distinguidos 3 lisotipos, conforme a origem do hospedeiro: milho, teosinte e cana-de-açúcar.

BRADBURY (1973) relata ser *P. avenae* (= *P. albo precipitans*) uma espécie bacteriana de características muito similares à *P. rubrilineans*.

2.5. *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Christopher e Edgerton 1930) Krasil'nikov 1949.

= *Phytomonas rubrisubalbicans* Christopher e Edgerton 1930.

= *Bacterium rubrisubalbicans* (Christopher e Edgerton) Burgwitz 1935.

= *Xanthomonas rubrisubalbicans* (Christopher e Edgerton) Savulescu 1947.

Pseudomonas rubrisubalbicans é o agente causal da moléstia conhecida como estria mosqueada das folhas da cana-de-açúcar, reconhecida primeiramente no Estado da Luisiana (EUA). CHRISTOPHER e EDGERTON (1930) isolaram a bactéria denominando-a *Phytomonas rubrisubalbicans*, que é de ocorrência em vários países (TOKESHI, 1980), embora aparentemente sua distribuição seja menor do que *P. rubrilineans* (BRADBURY, 1967b).

Basicamente, *P. rubrisubalbicans* difere de *P. rubrilineans* pela utilização de malonato, não atividade lipolítica, pelo formato das células e número de flagelos, e os sintomas, cujas listras são mais claras e esparsas do que as estrias vermelhas da cana-de-açúcar.

A colocação de *P. rubrisubalbicans* neste gênero deve-se a HAYWARD (1962), uma vez que anteriormente era considerada do gênero *Xanthomonas*.

Além da cana-de-açúcar, *P. rubrisubalbicans* foi assinalada causando doença de sorgo (HALE e WILKIE, 1972) e em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* [Mart.] Ducke), ocorrendo neste caso em constante associação com uma *Xanthomonas* sp. (ROBBS, 1977).

DIGAT e CAMBRA (1976), testando anti-soro produzido com extratos de glicoproteínas para *P. solanacearum* (Smith) Smith, verificou ausência de reações em aglutinação e imunoflorescência com antígenos de *P. rubrisubalbicans* e *P. rubrilineans*, entre outras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Culturas bacterianas e manutenção

Trinta e duas culturas compreendendo cinco espécies bacterianas foram utilizadas neste estudo. As culturas foram obtidas através de isolamentos, em Coleções de Culturas e ou cedidas por fitobacteriologistas (TABELAS 1 a 4). As culturas bacterianas foram acondicionadas em ampolas de vidro e preservadas por meio de liofilização, segundo as técnicas descritas pela "New Zealand Reference Culture Collection of microorganisms" (1971), tendo-se utilizado como crioprotetor uma solução de sacarose a 10% e peptona a 10% esterilizadas separadamente e juntadas na proporção de 4:1 (v/v). Por ocasião dos testes, ampolas eram abertas, recuperando-se as culturas em meio de nutriente ágar ou YDC ("Yeast" - Dextrose - CaCO_3).

3.2. Meios de Cultura

Os meios utilizados para o isolamento e manutenção das culturas bem como para o preparo dos antígenos para imunização e para os testes serológicos foram os seguintes:

TABELA 1. Código, origem e referência das culturas de *Pseudomonas andropogonis* utilizadas nos experimentos.

Código J.R.Neto	Hospedeiro	Nome Vulgar	Origem	Estirpe
165	<i>Coffea arabica</i> L.	Café	Brasil	-
166	<i>Coffea arabica</i> L.	Café	Brasil	-
199	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	Sorgo	E.U.A.	PDDCC 2807 NCPPB 934 ATCC 23061
236	<i>Mucuna deeringianum</i> (Bort) Merrill.	Mucuna	Zimbave	PDDCC 3995 NCPPB 1024 ATCC 19309
237	<i>Bougainvillea</i> sp	Bougainvillea	Zimbave	PDDCC 3996 NCPPB 1130 ICPB PS 137
239	<i>Trifolium repens</i>	Trevo	Austrália	PDDCC 3377
396	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	Sorgo	Brasil	"

PDDCC = Plant Diseases Division Culture Collection, DSIR, Auckland, New Zealand.

NCPPB = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, England.

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

ICPB = International Collection of Phytopathogenic Bacteria, Davis, California, USA.

TABELA 2. Código, origem e referência das culturas de *Pseudomonas avenae* utilizadas nos experimentos.

Código J.R.Neto	Hospedeiro	Nome vulgar	Origem	Estirpe
193	<i>Zea mays</i>	Milho	EUA	PDDCC 3183 NCPBP 1011 ICPB PA 117 ATCC 19860
194	<i>Zea mexicana</i> (Scharad.) Reeves & Mangelsd.	Teosinte	Japão	PDDCC 3186
206	<i>Zea mays</i> L.	Milho	Japão	PDDCC 3178
447	<i>Zea mays</i> L.	Milho	EUA	N.W.Schaad C-26*
448	<i>Zea mays</i> L.	Milho	EUA	N.W.Schaad C-29
449	<i>Zea mays</i> L.	Milho	EUA	N.W.Schaad C-138
480	<i>Zea mexicana</i> (Scharad.) Reeves & Mangelsd.	Teosinte	Japão	PDDCC 3181
481	<i>Oryza sativa</i> L.	Arroz	Japão	PDDCC 3960 NCPBP 1392 ICPB PS 177 ATCC 19882
482	<i>Eleusine coracana</i> (L.) Gaertn.	Capim maxenim	Japão	PDDCC 7083

PDDCC = Plant Diseases Division Culture Collection, DSIR, Auckland, New Zealand
NCPBP = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, England.
ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.
ICPB = International Collection of Phytopathogenic Bacteria, Davis, California, USA.

* Dr. Norman W. Schaad, University of Idaho, Moscow, Idaho, USA.

TABELA 3. Código, origem e referência da cultura de *Pseudomonas floridana* e culturas de *Pseudomonas rubrisubalbicans*, utilizadas nos experimentos.

Código J.R.Neto	Hospedeiro	Nome Vulgar	Origem	Estirpe
<i>P. floridana</i>				
214	<i>Saccharum officinatum</i> L.	cana-de-açúcar	EUA	PDDCC 3112
<i>P. rubrisubalbicans</i>				
175	<i>Saccharum officinatum</i> L.	cana-de-açúcar	Sri Lanka	PDDCC 3109 NCPBP 1243
198	<i>Saccharum officinatum</i> L.	cana-de-açúcar	Ilhas Maurício	PDDCC 3108 NCPBP 520
235	<i>Zea mays</i> L. var. <i>rugosa</i> Bonaf.	Milho doce	EUA	PDDCC 2850 NCPBP 1864 ICPB PA 120

PDDCC = Plant Diseases Division Culture Collection, DSIR, Auckland, New Zealand.

NCPBP = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, England.

ICPB = International Collection of Phytopathogenic Bacteria, Davis, California, USA.

TABELA 4. Código, origem e referência das culturas de *Pseudomonas rubriligneans* utilizadas nos experimentos.

Código J.R.Neto	Hospedeiro	Nome vulgar	Origem	Estirpe
77	<i>Zea mays</i> L.	Milho	Brasil	-
176	<i>Zea mays</i> L.	Milho	Brasil	C.F.Robbs-ENA 643*
178	<i>Canna indica</i> L.	Biru	Brasil	C.F.Robbs-ENA 176
179	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Cana-de-açúcar	Brasil	F. Akiba - F-3**
195	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Cana-de-açúcar	Ilhas Maurício	PDDCC 252 NCPBP 360
196	<i>Zea mays</i> L.	Milho	Índia	PDDCC 3106
216	<i>Zea mays</i> L. var. <i>rugosa</i> Bonaf.	Milho doce	EUA	PDDCC 1656
261	<i>Zea mays</i> L.	Milho	Brasil	N.L.Souza JC-1***
296	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Cana-de-açúcar	Ilhas Maurício	PDDCC 255 NCPBP 931
342	<i>Saccharum officinarum</i> L.	Cana-de-açúcar	Reunião	PDDCC 254 NCPBP 920
389	<i>Zea mays</i> L.	Milho	Brasil	-
395	<i>Zea mays</i> L.	Milho	Brasil	-

PDDCC = Plant Diseases Division Culture Collection, DSIR, Auckland, New Zealand.

NCPBP = National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, England.

* = Dr. Charles F. Robbs, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ

** = Dr. F. Akiba, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

*** = Dr. Nilton L. Souza, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

Meio B de King (KING et alii, 1954), para o isolamento da bactéria:

Peptona	20,0 g
Glicerol	10,0 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

pH 7,2

Meio YDC (DYE, 1968), para repicagens e manutenção das culturas bacterianas:

Glicose	20,0 g
Extrato de levedo	10,0 g
CaCO ₃ precipitado	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

pH 7,0

Nutriente ágar (KIRALY et alii, 1974), utilizado para o preparo dos antígenos imunizantes e extração de glicoproteínas:

Peptona	10,0 g
Extrato de carne	25,0 g
NaCl	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 ml

pH 7,2

3.3. Preparo dos antígenos para imunização.

Os antígenos foram preparados a partir de bactérias cultivadas em nutriente ágar durante 24-48 h a 28°C. Após este período foi feita uma suspensão bacteriana (S-1) em água destilada estéril, com concentração ajustada para 50% de transmitância (560 nm) em espectrofotômetro Micronal B 295 II. Aliquota contendo 10 ml da suspensão bacteriana (S-2) a 50% T foi centrifugada à baixa rotação (3.500 rpm Centrífuga Fanem Mod. 205 N) durante 15 minutos, descartando-se o líquido sobrenadante (LS-1), e o sedimento (P-1), células bacterianas inteiras, foi emulsionado em 1,0 ml de adjuvante Freund incompleto, constituindo-se no antígeno para imunização (ESQUEMA 1).

As culturas bacterianas utilizadas, bem como os anti-soros obtidos, estão relacionados na TABELA 5, com os respectivos códigos.

3.4. Preparo dos anti-soros

Os coelhos foram imunizados através de injeção do antígeno nos linfonódulos das patas traseiras (OLIVEIRA 1975), com duas aplicações a intervalos de dez dias. Antes da primeira imunização, foi feita uma sangria de prova para obtenção de soro normal (SN).

Os anti-soros foram obtidos através de sangrias da veia marginal na orelha do coelho imunizado, realizadas no período compreendido entre o 18º e o 25º dias da primeira imunização (ESQUEMA 2). O sangue coletado foi deixado em repouso durante 24 h à temperatura de 4°C para separação do coágulo. Após, o soro foi centrifugado à 15.000 g (centrífuga Eppendorf 3200) para remoção das hemácias restantes, e acondicionado em ampolas de plástico, com adição de merthiolate 1:1000, e armazenado a -18°C até o momento do uso.

ESQUEMA 1. Preparo dos antígenos para imunização.

TABELA 5. Estirpes utilizadas para obtenção dos anti-soros e respectivos códigos.

ANTÍGENO	Hospedeiro	Código J.R. Neto	Código do anti-soro
<i>P. andropogonis</i>	Cafê	165	AS-Pan-165
	Cafê	166	AS-Pan-166
	Sorgo	199	AS-Pan-199
	Trevo	239	AS-Pan-239
<i>P. avenae</i>	Milho	193	AS-Pav-193
	Milho	194	AS-Pav-194
	Milho	206	AS-Pav-206
<i>P. floridana</i>	Cana-de-açúcar	214	AS-Pfl-214
<i>P. rubrilineans</i>	Milho	77	AS-Pru- 77
	Milho	176	AS-Pru-176
	Cana-de-açúcar	296	AS-Pru-296
<i>P. rubrisubalbicans</i>	Cana-de-açúcar	175	AS-Prb-175
	Cana-de-açúcar	198	AS-Prb-198
	Milho doce	235	AS-Prb-235

ESQUEMA 2. Imunização e sangrias para obtenção do soro normal (SN) e anti-soros (AS), de *Pseudomonas* spp.

3.5. Preparo dos antígenos para as reações serológicas.

Para as reações serológicas, foram utilizados antígenos na forma de glicoproteínas (GP) extraídas da cápsula bacteriana, de acordo com a técnica descrita por DIGAT e CAMBRA (1976) e DIGAT (1978), ligeiramente modificada.

As culturas de *Pseudomonas* spp. foram semeadas em placas de Petri contendo nutriente ágar, e cultivadas durante 24-48 h a 28°C, e após este período, 2 g (peso úmido) de células bacterianas foram coletadas e dispensadas em 20 ml de água destilada estéril. A suspensão resultante foi agitada durante 3 h (agitador horizontal a 300 evoluções/min), e centrifugada a 15.000 g durante 15 min. O precipitado (S-1) foi descartado, tendo o sobrenadante (LS-1) sido filtrado duas vezes em Erlenmeyer, e posteriormente foi adicionado igual volume de solução saturada de sulfato de amônio, permanecendo em repouso durante 12 h a 4°C. Após, a suspensão foi centrifugada a 20.000 g por 30 min, descartando-se o sobrenadante LS-2 e recolhendo-se o precipitado S-2 (glicoproteínas) em 10 ml de água destilada (metade do volume inicial), que foi dializado durante dois dias a 4°C contra água destilada com trocas periódicas, constituindo-se no antígeno GP (ESQUEMA 3).

3.6. Testes serológicos

Utilizou-se a técnica de dupla difusão em ágar (OUCHTERLONY, 1958), com o gel (ágar 1% + succinato de sódio 5% em água destilada, pH 7,0, com adição de solução de telurito de potássio a 0,01%) distribuído sobre lâminas de microscopia (2,5 x 7,5 cm). Os orifícios no gel foram feitos com auxílio de aparelho Furágar (LEITE e OLIVEIRA, 1975) e em vários modelos e diâmetros.

Anti-soros e antígenos foram distribuídos nos orifícios do gel por meio de pipeta de Pasteur.

ESQUEMA 3. Preparo dos antígenos (glicoproteínas) utilizados nas reações serológicas.

Pseudomonas spp. cultivadas em nutriente ágar.

4. RESULTADOS

Os anti-soros obtidos através de imunização de coelhos pela injeção de antígeno no linfonódulo, possibilitaram a realização de inúmeros testes, onde foram observados resultados distintos entre as diferentes espécies estudadas, tendo sido verificado, inclusive, uma diferenciação de grupos ou serotipos, a nível infra-específico.

A adição de succinato de sódio a 5% no ágar gel, proporcionou a formação de bandas de precipitação mais evidentes do que em preparações com o gel simples, e o seu emprego poderá ser de utilidade no preparo de testes serológicos de difusão em gel.

Cerca de 250 reações serológicas foram observadas entre os antígenos e anti-soros relacionados nas TABELAS 1 a 5, e cujos resultados ora apresentados, acham-se expressos nos QUADROS 1 a 7.

Para a análise dos testes de dupla-difusão, foi utilizada a seguinte notação, indicando o tipo de banda de precipitação e ligações formadas:

- + + = reação de identidade completa (bandas claras e intensas, com união das extremidades);
- + = reação de identidade, com formação de bandas de menor intensidade;
- |+| = reação de identidade parcial (idem notação anterior, com formação de esporão);
- (+) = presença de linhas de precipitação inespecíficas;
- = ausência de reação.

4.1. Reações serológicas obtidas com anti-soros produzidos para *Pseudomonas andropogonis*.

4.1.1. Reações com antígenos homólogos

Nas reações homólogas, que são apresentadas no QUADRO 1, verificou-se a formação de linhas de identidade completa com os anti-soros AS-Pan 165, AS-Pan 166 e AS-Pan 199 quando foram empregados os antígenos AT-165, AT-166, AT-199, AT-396 e AT-236, com exceção deste último em reação com o AS-Pan 199, onde ocorreu reação semelhante à verificada para o AT-237 e os anti-soros mencionados.

Por outro lado, nos testes onde foi empregado o AS-Pan 239 (oriundo de isolado de trevo), verificou-se reação apenas contra o AT-239 (estirpe homóloga), não ocorrendo reações com os demais antígenos de *P. andropogonis* (QUADRO 1).

Este fato, aliado a diferenças observadas nas reações com os anti-soros e antígenos restantes, indicam a possível ocorrência de grupos ou serotipos para esta espécie bacteriana. Um grupamento homogêneo é formado pelos antígenos AT-165, AT-166 (de isolados de cafeeiro), AT-199, AT-396 (de isolados de sorgo) e AT-236 (de mucuna).

QUADRO 1. Reações serológicas de dupla-difusão observadas entre antígenos e anti-soros obtidos para *Pseudomonas andropogonis*.

ANTÍGENOS		<i>Pseudomonas andropogonis</i>			
		ANTI-SOROS			
Hospe deiro	Código J.R.Neto	AS-Pan-165	S-Pan-166	AS-Pan-199	AS-Pan-239
Café	165	++	++	++	-
	166	++	++	++	-
Sorgo	199	++	++	++	-
	396	++	++	++	-
Mucuna	236	++	++	+	-
Bougain- villea	237	+	+	+	-
Trevo	239	-	-	-	++

++ = reação de identidade completa;

+ = reação de identidade, bandas de menor intensidade;

- = ausência de reação.

4.1.2. Reações com antígenos heterólogos

Nos testes efetuados com antígenos de diferentes espécies de *Pseudomonas*, os anti-soros de *P. andropogonis* revelaram alta especificidade, isto é, não foram observadas quaisquer reações em combinações heterólogas, indicando ser *P. andropogonis* uma espécie distinta das demais estudadas, nos moldes testados.

4.2. Reações serológicas obtidas com anti-soros produzidos para *Pseudomonas avenae*.

4.2.1. Reações com antígenos homólogos

Nas preparações de difusão em gel realizadas com os anti-soros de *P. avenae* AS-Pav 193, AS-Pav 194 e AS-Pav 206 e os antígenos homólogos relacionados na TABELA 2, foram observadas reações variadas.

Linhas de precipitação de identidade completa foram observadas em preparações dos AS-Pav 193, AS-Pav-194 e AS-Pav 206 contra os antígenos AT-193, AT-194, AT-206, AT-449 (todos oriundos de isolados de milho) e AT-480 (de teosinte). Nas preparações daqueles anti-soros contra o AT-481 (de isolado de arroz), verificou-se a formação de bandas de precipitação consideradas distintas das demais, e bandas de identidade parcial foram verificadas nas reações com os AT-447, AT-448 (ambos de milho) e AT-482 (de isolado de capim maxenim). Ausência de linhas de precipitação foram notadas em reações do AS-Pav 194 contra o AT-447 (QUADRO 2) e contra AT-448 (FIGURA 1).

QUADRO 2. Reações serológicas observadas entre antígenos e anti-soros obtidos por *Pseudomonas avenae*.

		<i>Pseudomonas avenae</i>		
ANTÍGENOS		ANTI-SOROS		
Hospe deiro	Código J.R.Neto	AS-Pav-193	AS-Pav-194	AS-Pav-206
Milho	193	+ +	+ +	+ +
Milho	194	+ +	+ +	+ +
Milho	206	+ +	+ +	+ +
Milho	447	[+]	-	[+]
Milho	448	[+]	-	[+]
Milho	449	+ +	+ +	+ +
Teosinte	480	+ +	+ +	+ +
Arroz	481	+	+	+
C. maxenin	482	[+]	[+]	[+]

+ + = reação de identidade completa;

+ = reação de identidade, bandas de menor intensidade;

[+] = reação de identidade

- = ausência parcial; de reação.

FIGURA 1. Reações observadas entre anti-soro e antígenos de *P. avenae*. Orifício central (E) contém anti-soro AS-Pav 194; Orifícios 1, 3 e 5 contêm AT-194; Orifícios 2, 4 e 6 contêm AT-448, AT-449 e AT-480, respectivamente.

4.2.2. Reações com antígenos heterólogos

4.2.2.1. Reações com antígenos de *P. andropogonis* e *P. floridana*.

Nos testes heterólogos, onde os anti-soros de *P. avenae* AS-Pav 193, AS-Pav 194 e AS-Pav 206 foram empregados em reações contra os antígenos de *P. andropogonis* relacionados na TABELA 1, e o antígeno AT-Pfl 214 de *P. floridana*, não foram observadas linhas de precipitação de qualquer tipo, o que sugere a inexistência de relacionamento destas espécies com *P. avenae*.

4.2.2.2. Reações com antígenos de *P. rubrilineans*.

Nas preparações envolvendo os anti-soros obtidos para *P. avenae* e antígenos de *P. rubrilineans*, bandas de precipitação foram verificadas em todos os testes, com a formação de linhas de identidade completa e identidade parcial, dependendo da origem do antígeno testado.

Nos testes, com poucas exceções, ocorreu uma uniformidade das reações quanto aos anti-soros. Deste modo, os anti-soros de *P. avenae* AS-Pav 193, AS-Pav 194 e AS-Pav 206, reagiram de modo similar com relação ao tipo de linha de precipitação formada, com os antígenos de *P. rubrilineans* seguintes: AT-77, AT-176, AT-196, AT-216, AT-261, AT-389 e AT-395, todos oriundos de isolados de milho, onde ocorreu reação de identidade completa (FIGURAS 2 e 3).

Por outro lado, nos testes efetuados com os anti-soros de *P. avenae* contra os antígenos de *P. rubrilineans* oriundos de cana-de-açúcar, foram produzidas bandas de menor intensidade, de identidade parcial, exceto nas reações entre AS-Pav 193 contra AT-195 e AT-296, e do AS-Pav-194 contra o AT-198 (de birú), expressos no QUADRO 3 e FIGURAS, 4, 5 e 6.

4.2.2.3. Reações com antígenos de *P. rubrisubalbicans*.

Nas reações dos anti-soros AS-Pav 193, AS-Pav 194 e AS-Pav 206 contra os antígenos de *P. rubrisubalbicans* AT-175, AT-198 e AT-235, foi observada banda de precipitação entre AS-Pav 193 e AT-175, indicando identidade parcial. Nos demais testes efetuados, foram verificados resultados negativos (QUADRO 3; FIGURA 7).

4.3. Reações serológicas com anti-soro produzido para *Pseudomonas floridana*.

O anti-soro AS-Pfl 214, produzido contra o único isolado disponível de *P. floridana*, reagiu somente com o AT-214, extraído da estirpe homóloga. Nas demais preparações, observou-se ausência de reações contra os antígenos das restantes espécies relacionadas neste trabalho.

4.4. Reações serológicas obtidas com anti-soros produzidos para *Pseudomonas rubrilineans*.

4.4.1. Reações com antígenos homólogos.

Os anti-soros preparados contra *P. rubrilineans* e codificados como AS-Pru 77, AS-Pru 176 e AS-Pru 296, quando testados com antígenos homólogos, produziram reações de modo distinto, isto é, os anti-soros AS-Pru 77 e AS-Pru 176 quando em combinações com os antígenos extraídos dos isolados de milho e birú (AT-77, AT-176, AT-178, AT-196, AT-216, AT-239 e AT-395) produziram bandas de precipitação de identidade completa, a exemplo do que foi observado com os anti-soros produzidos para *P. avenae* em reações com estes antígenos, o que po

de ser observado comparando-se os QUADROS 3 e 4.

Por outro lado, nos testes onde foram empregados os antígenos extraídos dos isolados de cana-de-açúcar, ou seja, AT-179, AT-195, AT-296 e AT-342, verificou-se a formação de bandas do tipo de identidade parcial (FIGURA 8).

O anti-soro AS-Pru 296 por sua vez, apresentou nas reações contra os antígenos homólogos, bandas de categoria diferente para os vários antígenos, com a formação de uma linha de precipitação mais fraca, de menor intensidade, exceto nos testes contra AT-216 e AT-261, onde ocorreu a formação de linhas do tipo intenso. Nos testes com AT-196 e AT-389, verificou-se a formação de esporão.

Com relação aos testes homólogos, verificou-se ainda, que os modelos das bandas de precipitação diferem realmente para os antígenos e anti-soros de milho e os de cana-de-açúcar, conforme demonstrado no QUADRO 4, podendo significar que estas estirpes não possuem um sistema antigênico homogêneo.

4.4.2. Reações com antígenos heterólogos.

4.4.2.1. Reações com antígenos de *P. andropogonis* e *P. floridana*.

Todos os testes efetuados com os anti-soros obtidos para *P. rubrilíneans* AS-Pru 77, AS-Pru 176 e AS-Pru 296, em combinações com os antígenos preparados com as estirpes de *P. andropogonis* e *P. floridana*, resultaram negativos.

4.4.2.2. Reações com antígenos de *P. avenae*.

Os anti-soros de *P. rubrilineans* quando testados contra antígenos de *P. avenae*, produziram linhas de identidade completa em combinações com os AT-193, AT-194, AT-206, AT-449, AT-480, AT-481 e AT-482 (FIGURAS 9 e 10) e reações de identidade parcial com o AT-447 e AT-448.

Estes resultados indicam reciprocidade antigênica entre os isolados de *P. avenae* e os anti-soros de *P. rubrilineans*.

Com relação ao AS-Pru 296, oriundo de isolado de cana-de-açúcar, nos testes efetuados contra antígenos de *P. avenae*, foram produzidas linhas de identidade completa com AT-481 (de isolado de arroz) e identidade parcial com os AT-193, AT-194, AT-206 e AT-449, não ocorrendo reação com os antígenos AT-447, AT-448 e AT-482. Quanto ao AT-480, foi observada em reação com o AS-Pru 296, a formação de linha de precipitação pouco visível, inespecífica. Os resultados destas reações estão sumariados no QUADRO 5.

4.4.2.3. Reações com antígenos de *P. rubrisubalbicans*.

Os anti-soros de *P. rubrilineans* AS-Pru 77 e AS-Pru 176, produziram reações do tipo de identidade parcial apenas contra o antígeno AT-175, não sendo observadas linhas nos testes efetuados contra os demais antígenos (QUADRO 5; FIGURA 11).

4.5. Reações serológicas observadas com anti-soros obtidos para *P. rubrisubalbicans*.

4.5.1. Reações com antígenos homólogos.

BAndas de precipitação de identidade completa foram verificadas entre os anti-soros AS-Prb 175 e AS-Prb 198 contra os anti-soros AT-195, AT-198 e AT-235 (reação de identidade parcial entre AS-Prb 198 e AT-235), sendo que o AS-Prb 235 apresentou reação apenas com o antígeno AT-235 (QUADRO 6).

QUADRO 3. Reações serológicas de dupla difusão observadas entre anti-soros obtidos para *Pseudomonas avenae* e antígenos de *Pseudomonas* spp.

ANTÍGENOS	<i>Pseudomonas</i> spp	ANTI-SOROS		
		<i>P. avenae</i>		
Hospedeiros	Código J.R.Netto	AS-Pav-193	AS-Pav-194	AS-Pav-206
<i>P. floridana</i>				
Cana-de-açúcar	214	-	-	-
<i>P. rubrilineans</i>				
Milho	77	++	++	++
Milho	176	++	++	++
Biru	178	[+]	++	[+]
Cana-de-açúcar	179	[+]	[+]	[+]
Cana-de-açúcar	195	++	[+]	[+]
Milho	196	++	++	++
Milho doce	216	++	++	++
Milho	261	++	++	++
Cana-de-açúcar	296	++	[+]	[+]
Cana-de-açúcar	342	[+]	[+]	[+]
Milho	389	++	++	++
Milho	395	++	++	++
<i>P. rubrisubalbicans</i>				
Cana-de-açúcar	175	[+]	-	-
Cana-de-açúcar	198	-	-	-
Milho doce	235	-	-	-

++ = reação de identidade completa;

[+] = reação de identidade parcial;

- = ausência de reação.

QUADRO 4. Reações serológicas de dupla difusão observadas entre antígenos e anti-soros obtidos para *Pseudomonas rubrilineans*.

<i>Pseudomonas rubrilineans</i>				
ANTÍGENOS		ANTI-SOROS		
Hospedeiro	Código J.R.Neto	AS-Pru-77	AS-Pru 176	AS-Pru-296
Milho	77	+ +	+ +	+
Milho	176	+ +	+ +	+
Biru	178	+ +	+ +	+
Cana-de-açúcar	179	[+]	[+]	+
Cana-de-açúcar	195	[+]	[+]	+
Milho	196	+ +	+ +	[+]
Milho doce	216	+ +	+ +	+ +
Milho	261	+ +	+ +	+ +
Cana-de-açúcar	296	[+]	[+]	+
Cana-de-açúcar	342	[+]	[+]	+
Milho	389	+ +	+ +	[+]
Milho	395	+ +	+ +	+

+ + = reação de identidade completa;

+ = reação de identidade com bandas de menor intensidade;

[+] = reação de identidade parcial.

FIGURA 2. Formação de bandas de identidade completa entre anti-soro de *P. avenae* (AS-Pav 206 = orifício central F) e antígenos de *P. rubrilineans* oriundos de milho : AT-196 (2), AT-389 (4) e AT-395 (6). Orifícios 1, 3 e 5 contêm AT-206 (*P. avenae*).

FIGURA 3. Reações de dupla difusão verificadas entre anti-soros de *P. avenae* (AS-Pav-193 e AS-Pav 194) e antígenos de *P. rubrilineans* obtidos de milho.

- A = Orifícios centrais: AS-Pav 193; orifícios 1 a 5, antígenos de *P. rubrilineans* AT-77, AT-176, AT-196, AT-216 e AT-395, respectivamente; orifícios 6 a 10, antígenos de *P. avenae* AT-193, AT-194, AT-206, AT-449 e AT-482, respectivamente.
- B = Orifícios centrais: AS-Pav 194; orifícios 1 a 5, antígenos de *P. avenae* AT-193, AT-194, AT-206, AT-449 e AT-284, respectivamente; orifícios 6 a 10, antígenos de *P. rubrilineans* AT-77, AT-176, AT-216 e AT-261, respectivamente.

FIGURA 4. Reações serológicas observadas entre anti-soro de *P. avenae* (AS-Pav 193) e antígenos de *P. rubrilíneans* obtidos de cana-de-açúcar. Orifícios centrais: AS-Pav 193; Orifícios 1 a 5; AT-193, AT-194, AT-206, AT-449 e AT-482 (todos de *P. avenae*); Orifícios 6 a 10: AT-178 (biru), AT-179, AT-195, AT-296 e AT-342, respectivamente (*P. rubrilíneans*)

FIGURA 5. Reações serológicas observadas com anti-soro de *P. avenae* (AS-Pav 194) e antígenos de *P. rubrilineans*, obtidos de cana-de-açúcar. Orifícios centrais: AS-Pav 194; Orifícios 1 a 5: AT-193, AT-194, AT-206, AT-446 e AT-480, respectivamente; Orifícios 6 a 10, *P. rubrilineans* AT-178 (biru), AT-179, AT-195, AT-296 e AT-342, respectivamente.

FIGURA 6. Reações observadas entre anti-soro de *P. avenae* e antígenos de *P. rubrilineans*. Orifício central (F) contém AS-Pav 206 (*P. avenae*); Orifício 1: AT-206; Orifícios 2, 3, 4, 5 e 6 contêm AT-178 (Biru), AT-179, AT-195, AT-296 e AT-342, respectivamente.

FIGURA 7. Ausência de reações entre anti-soro de *P. avenae* e antígenos de *P. rubrisubalbicans*. Orifício central (E) = AS-Pav 194; Orifícios externos 1, 3 e 5 contêm AT-194 (*P. avenae*); orifícios 2, 4, e 6, *P. rubrisubalbicans* AT-175, AT-198 e AT-235.

FIGUTA 8. Reações serológicas observadas entre antígenos e anti-soro (AS-Pru 77) de *P. rubrilineans*. Orifícios centrais: AS-Pru 77; Orifícios 1 a 5, isolados de milho AT-77, AT-176, AT-196, AT-389 e AT-395. Orifícios 6 a 10, isolados de biru (AT-178) e de cana-de-açúcar AT-195, AT-179, AT-296 e AT-342.

FIGURA 9. Reações de dupla difusão com anti-soros de *P. rubrilineans* (AS-Pru 77) e antígenos de *P. avenae* e *P. rubrilineans*. Orifícios centrais contêm AS-Pru 77; Orifícios 1 a 5, antígenos de *P. rubrilineans* AT-77, AT-176, AT-178, AT-296 e AT-342, respectivamente; Orifícios 6 a 10, antígenos de *P. avenae* AT-193, AT-194, AT-206, AT-449 e AT-480, respectivamente.

FIGURA 10. Reações de identidade completa entre anti-soro de *P. rubrilineans* AS-Pru 77 (orifício central A) e antígeno homólogo AT-77 (1) e anti-soros de *P. avenae* AT-193 (2), AT-194 (3), AT-449 (5) e AT-480 (6). Reação de identidade parcial ocorreu com AT-447 (4).

QUADRO 5. Reações serológicas de dupla difusão verificadas em experimentos com anti-soros obtidos para *Pseudomonas rubrilineans* e antígenos de *Pseudomonas* spp.

ANTÍGENOS	<i>Pseudomonas</i> spp	ANTI-SOROS			<i>P. rubrilineans</i>
		AS-Pru-77	AS-Pru-176	AS-Pru-296	
Hospedeiros	Código J.R.Neto				
<i>P. avenae</i>					
Milho	193	++	++	[+]	
Milho	194	++	++	[+]	
Milho	206	++	++	[+]	
Milho	447	[+]	[+]	-	
Milho	448	[+]	[+]	-	
Milho	449	++	++	[+]	
Teosinte	480	++	++	(+)	
Arroz	481	++	++	++	
Capim maxenim	482	++	++	-	
<i>P. floridana</i>					
Cana-de-açúcar	214	-	-	-	
<i>P. rubrisubalbicans</i>					
Cana-de-açúcar	175	[+]	[+]	-	
Cana-de-açúcar	198	-	-	-	
Milho doce	235	-	-	-	

++ = reação de identidade completa;
 [+] = reação de identidade parcial; linhas
 (+) = de precipitação inespecífica;
 - = ausência de reações.

QUADRO 6. Reações serológicas de dupla difusão observadas em experimentos com anti-soros e antígenos de *Pseudomonas rubrisubalbicans*.

<i>Pseudomonas rubrisubalbicans</i>				
ANTÍGENOS		ANTI-SOROS		
Hospedeiros	Código J.R.Neto	AS-Prb 175	AS-Prb 198	AS-Prb 235
Cana-de-açúcar	175	+ +	+ +	-
Cana-de-açúcar	198	+ +	+ +	-
Milho doce	235	+ +	+	+ +

+ + = reação de identidade completa;

+ = reação de identidade, com bandas de menor intensidade;

- = ausência de reação.

FIGURA 11. Ausência de reação em dupla difusão de anti-soro de *P. rubrilineans* (AS-Pru 296) e antígenos de *P. rubrisubalbicans*: Orifício central (C) = AS-Pru 296; Orifícios externos 1, 3 e 5 = AT-296; Orifícios 2, 4 e 6 contêm: AT-175, AT-198 e AT-235, respectivamente.

4.5.2. Reações com antígenos heterólogos

4.5.2.1. Reações com antígenos de *P. andropogonis*.

Não foram observadas reações entre anti-soros produzidos para *P. rubrisubalbicans* e antígenos de *P. andropogonis*, indicando o não-relacionamento serológico entre estas espécies.

4.5.2.2. Reações com antígenos de *P. avenae*.

O anti-soro AS-Prb 175 produziu bandas de precipitação de identidade parcial com os antígenos de *P. avenae* AT-193, AT-194, AT-206, AT-447, AT-448 e AT-480. Igual reação foi verificada entre anti-soro AS-Prb 198 e AT-448. Nos demais testes, bem como naqueles efetuados para o anti-soro AS-Prb 235, não foram observadas reações de qualquer natureza (QUADRO 7).

4.5.2.3. Reações com antígeno de *P. floridana*.

Foram verificadas reações inespecíficas, pouco nítidas, entre o AT-214 com os anti-soros AS-Prb 175 e AS-Prb 198 (QUADRO 7).

4.5.2.4. Reações com antígenos de *P. rubrilineans*.

A exemplo do que foi verificado para os antígenos de *P. avenae*, quando o anti-soro AS-Prb 175 foi colocado em combinação contra os antígenos de *P. rubrilineans*, as linhas de precipitação formadas foram do tipo de identidade parcial, para os seguintes: AT-77, AT-176, AT-196, AT-261, AT-

389 e AT-395. O anti-soro AS-Prb 198 reagiu somente com AT-196, enquanto que não foi observada reação em nenhum dos testes com o AS-Prb 235 e antígenos de *P. rubrilineans* (QUADRO 7).

QUADRO 7. Reações serológicas de dupla difusão observadas em experimentos com anti-soros obtidos para *P. rubrisubalbicans* e antígenos de *Pseudomonas* spp.

ANTÍGENOS <i>Pseudomonas</i> spp		ANTI-SOROS <i>P. rubrisubalbicans</i>		
Hospedeiros	Código J.R.Netto	AS-Prb 175	AS-Prb 198	AS-Prb 235
<i>P. avenae</i>				
Milho	193	[+]	-	-
Milho	194	[+]	-	-
Milho	206	[+]	-	-
Milho	447	[+]	-	-
Milho	448	[+]	[+]	-
Milho	449	[+]	-	-
Teosinte	480	[+]	-	-
Arroz	481	-	-	-
Capim maxenim	482	-	-	-
<i>P. floridana</i>				
Cana-de-açúcar	214	(+)	(+)	-
<i>P. rubrilineans</i>				
Milho	77	[+]	-	-
Milho	176	[+]	-	-
Biru	178	-	-	-
Cana-de-Açúcar	179	-	-	-
Cana-de-Açúcar	195	-	-	-
Milho	196	[+]	[+]	-
Milho doce	216	[+]	[+]	-
Milho	261	[+]	[+]	-
Cana-de-Açúcar	296	-	-	-
Cana-de-Açúcar	342	-	-	-
Milho	389	[+]	[+]	-
Milho	395	[+]	[+]	-

[+] = reação de identidade parcial;

(+) = formação de bandas de precipitação inespecífica;

- = ausência de reação.

5. DISCUSSÃO

5.1. Emprego e especificidade dos anti-soros

O interesse na utilização das técnicas serológicas para a identificação e classificação das fitobactérias tem aumentado gradativamente, e diversos relatos têm sido apresentados com a serologia aplicada a espécies do gênero *Pseudomonas*, principalmente para o grupo das espécies fluorescentes (FRIEDMAN, 1953; LOVREKOVICH e KLEMENT, 1963; COLÉNO, 1968; LUCAS e GROGAN, 1969; OTTA e ENGLISH, 1971; COLÉNO et alii, 1972).

No caso das pseudomonadas do grupamento não fluorescente, e com referência às espécies patogênicas à gramíneas, os relatos da utilização da serologia são restritos aos estudos de TOMINAGA (1971), que testou *P. andropogonis* e *P. alboprecipitans* (= *P. avenae*), e aos experimentos efetuados por SOUZA (1980) com *P. alboprecipitans* e *P. rubrilíneas*, para a identificação serológica de isolados de milho.

No presente trabalho, os testes serológicos foram idealizados com a finalidade de se avaliar o seu emprego na identificação de algumas das espécies de *Pseudomonas* do tipo não-fluorescente e que causam doenças em gramíneas.

Também foi propósito do trabalho, um estudo so-

bre o relacionamento serológico entre espécies, bem como, a nível infra-específico, e para tanto, foram utilizados como antígenos nas reações de dupla-difusão, as glicoproteínas extraídas da cápsula bacteriana.

Com relação à escolha de glicoproteínas como antígeno para os testes, deve-se aos estudos primeiramente realizados por DIGAT e CAMBRA (1976) com *Pseudomonas solana-cearum*, onde aqueles autores obtiveram reações altamente específicas contra outras espécies, e ainda, conseguiram definir diversos grupos serológicos entre os isolados daquela espécie bacteriana.

Os resultados ora relatados, confirmam através dos testes, a importância desta metodologia e sua utilidade na serologia, principalmente em razão de ter sido observado na maioria das vezes, a formação de uma única linha de precipitação, útil para a análise dos testes.

Por outro lado, os resultados dos experimentos reafirmam a técnica da dupla-difusão, como método válido para a separação de algumas das espécies estudadas, e uma vez que em alguns casos a identificação através da serologia é de maior conveniência, esta poderá ser empregada com segurança.

De modo geral, os anti-soros obtidos para o grupo de bactérias estudado, mostraram reações muito claras com os antígenos homólogos, e em algumas preparações heterólogas, as reações foram altamente específicas, como é o caso dos testes efetuados para *P. andropogonis*.

Foram igualmente observadas reações entre espécies, mesmo com a utilização de antígenos fracionados.

Os dados obtidos sugerem, também, que determinadas estirpes de bactérias, embora previamente consideradas como pertencendo a espécies diferentes, não podem ser diferenciadas pela serologia, e ainda, um estreito relacionamento entre espécies foi determinado em reações cruzadas.

5.2. Reações serológicas

Com relação aos resultados obtidos, *P. andropogonis* mostrou ser uma espécie muito distinta das demais estudadas. A avaliação dos resultados confirma as observações de TOMINAGA (1971), que em comparação desta espécie bacteriana com *P. alboprecipitans* e *P. setariae* (sinônimos de *P. avenae*) e *P. glumae*, verificou apenas reação de identidade com o antígeno homólogo.

Ainda, os resultados dos testes possibilitou uma separação de serotipos para *P. andropogonis*, e este fato provavelmente reflete a variabilidade patogênica desta espécie, o que é demonstrado na TABELA 1, e a ocorrência de outros grupos adicionais é muito provável, devido à larga faixa de hospedeiros desta espécie bacteriana.

Com referência aos resultados obtidos para a espécie *P. floridana*, fica evidente a especificidade do anti-soro AS-Pfl 214, que reagiu unicamente com o antígeno homólogo. Entretanto, algumas particularidades ocorreram com o antígeno AT-214, que reagiu de modo inespecífico com anti-soros de *P. rubrisubalbicans* (AS-Prb 175 e AS-Prb 198).

HAYWARD (1962) sugere ser *P. floridana*, uma espécie relacionada à *P. rubrisubalbicans*, porém, os resultados obtidos não demonstram serologicamente esta relação.

Os diferentes resultados obtidos com anti-soros e antígenos de *P. rubrisubalbicans*, indicam que cada estirpe deve possuir determinada característica antigênica, sugerindo que o emprego da serologia para a identificação desta espécie deve ser encarado com reservas, principalmente em razão das diferenças nas reações verificadas com o AS-Prb 175 e antígenos de *P. avenae* e *P. rubrilineans*, conforme demonstra o QUADRO 7.

Investigações adicionais devem ser realizadas

com *P. rubrisubalbicans* e as espécies mencionadas, empregando-se um maior número de isolados, a fim de ser esclarecida esta situação.

Por outro lado, avaliando-se os resultados dos testes efetuados com os antígenos de *P. avenae* e *P. rubrilineans* em reações cruzadas, verifica-se, primeiramente, um comportamento similar para estas espécies, embora algumas diferenças tenham ocorrido.

No caso dos experimentos envolvendo os anti-soros AS-Pav 193, AS-Pav 194 e AS-Pav 206 (*P. avenae*) e os anti-soros AS-Pru 77, AS-Pru 176 (*P. rubrilineans* obtidos de milho), diferenças foram notadas quanto aos resultados produzidos pelos anti-soros mencionados, nos testes efetuados contra os antígenos AT-481 e AT-482 (*P. avenae* isolados de arroz e capim maxenim, respectivamente). Provavelmente, esta diferença está relacionada com algum determinando antigênico presente nestas estirpes.

Reações semelhantes também foram observadas entre aqueles anti-soros e os antígenos de *P. rubrilineans*: AT-179, AT-195, AT-296 e AT-342, todos oriundos de isolados de cana-de-açúcar, onde foram verificadas linhas de precipitação de categoria diferente.

Estes resultados demonstram que os isolados de cana-de-açúcar formam um grupo distinto, e que podem ser identificados serologicamente com anti-soros produzidos para *P. avenae*, o que difere dos resultados obtidos por SOUZA (1980), que em testes de dupla-difusão caracterizou *P. alboprecipitans* (= *P. avenae*) não reagindo com *P. rubrilineans*.

Variabilidade entre os isolados de milho e de cana-de-açúcar em *P. rubrilineans* tem sido observadas, no que concerne à patogenicidade (ORIAN, 1957; SUMMANWAR e BHIDE, 1962; ROBBS, 1980) e lise por bacteriófagos (DANGE e PAYAK, 1973) e, à vista dos resultados, podemos considerar que os isolados de *P. rubrilineans* podem ser divididos em dois grupos, relacionados com a origem do hospedeiro.

Com relação à estirpe 481 de *P. avenae*, que foi isolada de arroz por K. Ohata, em 1955, e originalmente identificada como *P. setariae*, os resultados obtidos, de identidade parcial com anti-soros de *P. avenae* (e completa com *P. rubrilineans*), permitem confirmar os dados de TOMINAGA (1971), que, baseando-se em testes de patogenicidade e serológicos, colocou esta espécie em sinonímia de *P. avenae*.

Outrossim, verificando o comportamento das diferentes culturas de *P. avenae* e *P. rubrilineans* empregadas como antígeno e na obtenção de anti-soros, observa-se a existência de um estreito relacionamento entre estas espécies, principalmente em relação às estirpes isoladas de milho, que não foram distinguidas serologicamente.

5.3. O problema de nomenclaturas nos grupos *avenae-rubrilineans*.

Oito estirpes denominadas *P. avenae* e sete denominadas *P. rubrilineans* isoladas de milho, constituem um grupo uniforme nos termos serológicos aplicados: testes com antígenos na forma de glicoproteínas. Pelo mesmo critério, as quatro estirpes de *P. rubrilineans* isoladas de cana-de-açúcar, constituem um grupo distinto e podem representar um problema em termos de reconhecimento de espécies. As bandas de precipitação diferem realmente das obtidas para os isolados de milho, havendo, aparentemente, uma separação infra-específica.

Por outro lado, BRADBURY (1973), relata serem semelhantes nos caracteres bioquímicos as espécies *P. avenae* e *P. rubrilineans*, e nas propriedades utilizadas para a diferenciação destas espécies, ou seja, temperatura máxima de crescimento, oxidase, redução de nitrato e nitrito, hidrólise de amido, lipólise de "Tween 80" e utilização de tartarato e malonato, diferentes resultados têm sido obtidos por diferen-

tes autores, utilizando-se, inclusive, as mesmas culturas (DYE, 1963; HAYWARD, 1962; GOTO e STARR, 1971; SCHAAD et alii, 1975).

A não concordância de determinados caracteres bioquímicos para determinadas estirpes, relatadas naqueles trabalhos, sugere que a variabilidade nutricional destas espécies deve ser re-examinada, e a estandarização de métodos e técnicas bacteriológicas poderá concorrer para a uniformização dos resultados.

Estudos utilizando um grande número de culturas, analisando-se um grande número de caracteres, poderão esclarecer o tratamento taxonômico dado a estas espécies, cujas diferenças fenotípicas não são muito claras para justificar a separação, e a possibilidade de sinonímia entre *P. avenae* e *P. rubrilineans* não deve ser excluída.

6. CONCLUSOES

Dos resultados verificados no presente trabalho, as seguintes conclusões puderam ser obtidas:

6.1. O uso de antígenos na forma de glicoproteínas extraídas da cápsula bacteriana, propiciou a formação de bandas de precipitação definidas, útil na distinção dos tipos serológicos;

6.2. A serologia nos moldes testados pode ser empregada com segurança para a identificação de *P. andropogonis*;

6.3. Grupos ou serotipos foram estabelecidos para as espécies *P. andropogonis*, *P. avenae* e *P. rubrilineans*, inclusive relacionados com a origem do hospedeiro;

6.4. Serologicamente, o diagnóstico das espécies *P. floridana* e *P. rubrisubalbicans*, nos moldes testados, é inviável, devido a antígenos comuns presentes em algumas estirpes;

6.5. Igualmente, a serologia não pode ser aplicada para a diferenciação ou diagnóstico de *P. avenae* e *P. rubrilineans*, que são relacionadas serologicamente;

6.6. Investigações adicionais devem ser realizadas com as espécies *P. avenae* e *P. rubrilineans*, para um esclarecimento da posição taxonômica dada a estes organismos.

7. LITERATURA CITADA

- ALLEN, R.N., A.C. HAYWARD, W.J. HALLIDAY e J. FULCHER. 1970. Bacterial blight of *Vicia sativa*: aetiology of the disease and identification of the pathogen. Austr. J. Biol. Sci., 23:597-606.
- BOEWE, G.H. 1960. Diseases of wheat, oats, barley and rye. Circular 48. Illinois Natural History Survey, Ill., 157 p.
- BOURNE, B.A. 1970a. Studies on the bacterial red stripe disease of sugarcane in Florida. Sugarcane Pathologists' Newsletter, 4:27-33.
- BOURNE, B.A. 1970b. Supplemental notes on the causal bacterium of sugarcane red stripe disease in Florida. Sugarcane Pathologists' Newsletter, 5:40-42.
- BRADBURY, J.F. 1967a. *Pseudomonas rubrilineans*. Commonw. Mycol. Inst. Descr. Pathol. Fungi and Bacteria. N° 127.
- BRADBURY, J.F. 1967b. *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Commonw. Mycol. Inst. Descr. Pathol. Fungi and Bacteria. N° 128.
- BRADBURY, J.F. 1973. *Pseudomonas alboprecipitans*. Commonw. Mycol. Inst. Descr. Fungi and Bacteria, N° 371.

- BURKHOLDER, W.H. 1957. A bacterial disease of clover and velvet beans. Phytopathology, 47:48-50.
- CHRISTOPHER, W.N. e C.W. EDGERTON. 1930. Bacterial stripe disease of sugarcane in Louisiana. J. Agric. Res. 41:259
- COLÉNO, A. 1968. Intérêt des motifs antigéniques communs entre *Pseudomonas phaseolicola* (Burk.) Dowson et *Pseudomonas syringae* van Hall pour le typage de cette dernière espèce. C.R. Acad. Sc. Paris, 266:2516-2519.
- COLÉNO, A., M. NORMAND e M.R. BARZIC. 1972. A qualitative study on the antigens involved in the complement fixation reaction among some phytopathogenic *Pseudomonas*. Proc. 3rd Int. Conf. Pl. Path. Bact., Wageningen, Neth:143-150.
- DANGE, S.R.S. e M.M. PAYAK. 1973. The taxonomic position of the pathogen of red stripe of sugarcane. Sugarcane Pathologists' Newsletter, 10:25-28.
- DIGAT, B. 1978. Antigen specificity in *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. Proc. 4th Int. Conf. Pl. Path. Bact., Angers, France, :321-326.
- DIGAT, B. e M. CAMBRA. 1976. Specificity of antigens in *Pseudomonas solanacearum* (E.F.Smith) and application of serology for studying bacterial wilt. Proc. 1st Int. Plan. Conf. Workshop Ecol. Control Bact. Wilt Caused by *Pseudomonas solanacearum*, Raleigh, N.C., :38-57.
- DYE, D.W. 1963. Comparative study of the biochemical reaction of additional *Xanthomonas* spp. N.Z.J. Sci., 6:483-486.
- DYE, D.W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The "amylovora" group. N.Z.J. Sci., 11:590-607.
- ELLIOTT, C. 1930. Manual of Bacterial Plant Pathogens. Waverly Press. Inc., Baltimore, 349 p.

- ELLIOTT, C. 1951. Manual of Bacterial Plant Pathogens. Wal-
than, Mass., 186 p.
- ELLIOTT, C. e E.F. SMITH. 1924. A bacterial disease of broom
corn and sorghum. Phytopathology. 14:48 (Abstr.).
- ELLIOTT, C. e E.F. SMITH. 1929. A bacterial stripe of sor-
ghum. J. Agric. Res., 38:1-22.
- FRIEDMAN, B.A. 1953. Serological tests with some phytopatho-
genic species of *Pseudomonas*. Phytopathology, 43:412-
414.
- GITAITIS, R.D., D.A. SAMVELSON e J.O. STRANDBERG. 1981. Scan-
ning electron microscopy of the ingress and establishment
of *Pseudomonas alboprecipitans* in sweet corn leaves. Phy-
topathology, 71:171-175.
- GITAITIS, R.D., R.E. STALL e J.O. STRANDBERG. 1976. Oversea-
soning of *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen, causal agent
of bacterial leaf blight of corn. Proc. Am. Phytopath.
Soc. 3:257 (Abstr.).
- GITAITIS, R.D., R.E. STALL e J.O. STRANDBERG. 1977. Dissemi-
nation and survival of *Pseudomonas alboprecipitans* ascer-
tained by disease distribution. Phytopathology, 68:227-
231.
- GOTO, K. e K. OHATA. 1961. Bacterial stripe of rice. Cool.
Agric. Natl. Taiwan Univ., Special Publ. Nº. 10:49-56.
- GOTO, M. 1964. Nomenclature of the bacteria causing bacte-
rial leaf streak and bacterial stripe of rice. Rept. Fac.
Agric. Shizyoka Univ., 14:3-10.
- GOTO, M. e M.P. STARR. 1971. A comparative study of *Pseudo-
monas andropogonis*, *P. stizolobii* and *P. alboprecipitans*.
Ann. Phytopath. Soc. Japan, 37:233-241.

- GOTO, M. e N. OKABE. 1952. Studies on the causal organism of bacterial stripe disease of millet and the brown stripe disease of Italian millet. Rept. Fac. Agric. Shizuoka Univ., 2:15-24.
- HALE, C.N. e J. PAULA WILKIE. 1972. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. N.Z.J. Agric. Res., 15:448-456.
- HAYWARD, A.C. 1962. Studies on bacterial pathogens of sugar cane. II. Differentiation, taxonomy, and nomenclature of the bacteria causing red stripe and mottled stripe diseases. Mauritius Sugar Industry Research Institute, Occasional Paper N°. 13:13-27.
- HAYWARD, A.C. 1970. Comments on Dr. Bourne's article. Sugarcane Pathologists' Newsletter, 4:34-35.
- JOHNSON, A.G., A.L. ROBERT e L. CASH. 1945. Further studies on bacterial leaf blight and stalk rot of corn. Phytopathology. 35:486-487.
- JOHNSON, A.G., A.L. ROBERT e L. CASH. 1949. Bacterial leaf blight and stalk rot of corn. J. Agric. Res., 78:719-732.
- KING, E.O., M.K. WARD e D.E. RANEY. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med., 44:301-307.
- KIRALY, Z., Z. KLEMENT, F. SOLYMOSY e J. VÖRÖS. 1974. Methods in Plant Pathology. Budapest. Elsevier Scientific Publishing Co., 509 p.
- LEE, H.A., H.A. PURDY e C.C. BARNUN. 1925. A comparison of red stripe disease with bacterial diseases of sugarcane and other grasses. Red stripe disease studies. Exp. Sta. Hawaiian Sugar Planter's Assoc., :64-74.
- LEE, H.A. e W.C. JENNINGS. 1924. Bacterial red stripe disease of Tip canes. Exp. Sta. Hawaiian Sugar Planter's Assoc., Circular N°. 42:1-4.

- LEITE, A.F. e A.R. OLIVEIRA. 1975. Furagar. Summa Phytopathologica, 1:143-146.
- LELLIOTT, R.A., E. BILLING e A.C. HAYWARD. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. J. appl. Bact., 29:470-489.
- LOVREKOVICH, L. e Z. KLEMENT. 1963. Serological investigations of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas morsprunorum* strains. Phytopathol. Z., 47:19-24.
- LUCAS, L.T. e R.G. GROGAN. 1969. Serological variation and identification of *Pseudomonas lachrymans* and other phytopathogenic *Pseudomonas* nomenspecies. Phytopathology, 59:1908-1912.
- LYON, H.L. 1922. A leaf disease of the Tip canes. Proc. Hawaiian Sugar Planter's Association, pp. 246.
- MANNS, T.F. 1909. The blade blight of oats - a bacterial disease. Ohio Agric. Exp. Sta. Res. Bull., 210:91-167.
- NEW ZEALAND REFERENCE CULTURE COLLECTION OF MICRO-ORGANISMS 1971. NZ DSIR Information Series N°. 82, 10 p.
- NISHIYAMA, K., T. KUSABA, K. OHATA, K. NAHATA e A. EZUKA. 1979. Bacterial black rot of tulip caused by *Pseudomonas andropogonis*. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 45:668-674.
- OLIVEIRA, A.R. 1975. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonóculo. Summa Phytopathologica, 1:61-64.
- ORIAN, G. 1956. Occurrence of a disease similar to red stripe of sugarcane in Mauritius. Proc. 9th Congress Int. Soc. Sugar Cane Tech., :1042-1048.
- ORIAN, G. 1957. Plant Pathology Division. Rep. Dep. Agric. Mauritius, :90-93.

- OSHIRO, L.S., R.B. HINE e S. GOTO. 1964. The identification of *Pseudomonas andropogonis* as a cause of a firm rot disease in the terete vand orchid in Hawaii. Pl. Dis. Repr 48:736-740.
- OTTA, J.D. e H. ENGLISH. 1971. Serology and pathology of *Pseudomonas syringae*. Phytopathology, 61:443-452.
- OUCHTERLONY, D. 1958. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In: Progress in Allergy, 5:1-78.
- ROBBS, C.F. 1977. Uma doença bacteriana do guaranazeiro. Fitopatol. Bras., 2:99 (Resumo).
- ROBBS, C.F. 1980. O crestamento bacteriano da *Canna indica* causada por uma estirpe de *Pseudomonas rubrilineans*. Fitopatol. Bras., 5:453-454 (Resumo).
- ROBBS, C.F., J. RODRIGUES NETO, R. de L.D. RIBEIRO e O. KIMURA. 1981a. Annotated list of bacterial plant pathogens in Brazil. Proc. 5th Int. Conf. Pl. Path. Bact., Cali, Colombia, :601-613.
- ROBBS, C.F., J. RODRIGUES NETO, R. de L.D. RIBEIRO e O. KIMURA. 1981b. Bacterial leaf spot of ornamental *Triplaris* caused by *Pseudomonas andropogonis*. Proc. 5th Int. Conf. Pl. Path. Bact., Cali, Colombia, :54-58.
- RODRIGUES NETO, J., P. FIGUEIREDO, P.R. MARIOTTO e C.F. ROBBS. 1981. *Pseudomonas andropogonis* (Smith 1911) Stapp 1928, agente causal da "mancha escura bacteriana" em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Arq. Inst. Biol. São Paulo, 48:31-36.
- ROSEN, H.R. 1919. A preliminary note on a bacterial disease of foxtail. Science, 49:291.
- ROSEN, H.R. 1922. A bacterial disease of foxtail (*Chaetochloa lutescens*). Ann. Mo. Bot. Gard., 9:383-402.

- ROTHWELL, A. e A.C. HAYWARD. 1964. A bacterial disease of bougainvillea. Rhodesian J. Agric. Research, 2:97-99.
- SÃO PAULO. 1982. Secretaria da Agricultura. Coordenadoria da Pesquisa Agropecuária. Prognóstico I.E.A. 1982/83 255 p.
- SCHAAD, N.W. 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopathol., 17:123-147.
- SCHAAD, N.W., C.I. KADO e D.R. SUMMER. 1975. Synonymy of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 and *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen 1922. Int. J. Syst. Bacteriol., 25:133-137.
- SCHAAD, N.W. e D.R. SUMNER. 1974. A taxonomic study of *Pseudomonas avenae*. Proc. Am. Phytopath. Soc., 1:118 (Abstr.).
- SMITH, E.F. 1911. Bacteria in relation to plant diseases. II. Carnegie Inst., Washington DC, :63-64.
- SMITH, E.F. e F. HEDGES. 1905. Burrie's bacterial disease of broom corn. Science, 21:502-503.
- SOUZA, N.L. 1980. Reações de linhagens e cultivares de milho (*Zea mays* L.) a *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen. Piracicaba, ESALQ/USP, 65 p. (Dissertação de Mestrado).
- STAPP, C. 1928. Sorauer's Handb. Pflanzenkl. Berlin, 2:35.
- STARR, M.P. e W.H. BURKHOLDER. 1942. Lipolytic activity of phytopathogenic bacteria determined by means of spirit blue agar and its taxonomic significance. Phytopathology, 37:598-604.
- SUMMANWAR, A.S. e V.P. BHIDE. 1962. Bacterial red-stripe of sugarcane *Saccharum officinarum* caused by *X. rubrilineans* var. *indicus* in Maharashtra. Indian Jour. Sugarcane Res. Div., 6:65-68.

- SUNDARAM, N.V. 1978. Sorghum Diseases. A world review. Bacterial diseases. Proc. Int. Work. Sorghum Dis., Hyderabad, India, :385-390.
- TARR, S.A. 1962. Diseases of Sorghum Sudan Grass and Broom Corn. Commonw. Mycol. Inst., Kew., 380 p.
- TOKESHI, H. 1980. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F. (Coord.). Manual de Fitopatologia. Vol. II. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres Ltda. pp. 141-206.
- TOMINAGA, T. 1971. Studies on the diseases of forage crops in Japan. II. Etiological Studies on the bacterial of forage crops in Japan. Bull. Nat. Inst. Agric. Sciences Japan, 25:205-306.
- TRIGALET, A., R. SAMSON e A. COLÉNO. 1978. Problems related to the use of serology in phytobacteriology. Proc. 4th Int. Conf. Pl. Path. Bact., Angers, France, :271-288.
- ULLASA, B.A., Y.R. MEHTA, M.M. PAYAK e B.L. RENFRO. 1967. *Xanthomonas rubrilineans* on *Zea mays* in India. Indian Phytopathology, 20:77-78.
- ULLSTRUP, A.J. 1960. Bacterial stripe of corn. Phytopathology, 50:906-910.
- WEHLBURG, C. 1962. Bacterial leaf stripe of sweet corn. Pl. Dis. Repr., 46:98-99.
- YOUNG, J.M., D.W. DYE, J.F. BRADBURY, C.G. PANAGOPOULOS e C. F. ROBBS. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. N.Z.J. Agric. Res., 21:153-177.