

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA TESE
EFETUADA PELO CANDIDATO CELSO EDUARDO BENEDETTI E

APROVADA PELA COMISSÃO JULGADORA

UNICAMP, 12 de março de 1991
Jaqueline Rodrigues de Oliveira

ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS
DE MEMBRANA DE *Pseudomonas avenae* E
Pseudomonas rubrilineans
PATOGENICAS A GRAMÍNEAS.

CELSO EDUARDO BENEDETTI

Orientador: Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
a obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas na área de Biologia Vegetal.

Universidade Estadual de Campinas
Campinas, SP - Brasil
1991

B434a

13591/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA VITAL

AGRADECIMENTOS

Ao Mestre, Professor Avelino Rodrigues de Oliveira, pelo convívio durante esses anos, pela sua dedicação, paciência e franqueza com que transmitiu seus ensinamentos; pela inestimável orientação que a mim representou a base para poder prosseguir.

A todos da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Inst. Biológico, em especial a Júlio Rodrigues Neto, Irene M.G. de Almeida, Valdemar A. Malavolta Jr. e Luis O.S. Beriam, pelo fornecimento das culturas, auxílio nos experimentos, revisão do trabalho e principalmente pela orientação nos meus primeiros passos em fitobacteriologia.

Aos Professores Wanderley Dias da Silveira, Luis Gonzaga Santoro e Tomamasa Yano, pelas valiosas sugestões, apoio e revisão desta tese.

Aos colegas de laboratório, Luis G. Vettorazzi e Maria T. de Paula, pela confecção das fotos; José L. Donato, Robert W.M. Sablowski, Sergio H. Seike e Ary Correia Jr., pelo dia-a-dia, incentivo e discussão dos experimentos.

A todos os docentes, funcionários e alunos do Depto. de Bioquímica, pela utilização de seus laboratórios, equipamentos, pelo apoio e amizade.

Aos Professores do Depto. de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos na área, utilização de equipamentos, avaliação e crítica desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Estadual de Campinas, pela concessão de bolsa de estudos.

Aos meus pais, irmãs e amigos, pelo persistente incentivo, por acreditarem em mim.

RESUMO

Culturas de *Pseudomonas avenae* (MANNS, 1909) e *Pseudomonas rubrilineans* [(LEE et al, 1925) STAPP, 1928], provenientes de diferentes regiões e oriundas de milho, leosinte, arroz e cana-de-açúcar, foram comparadas através da análise eletroforética de proteínas totais e de membrana, em gel de poliacrilamida-SDS (EGPA-SDS). Testes para verificar a sensibilidade das culturas a antibióticos e avaliar a produção de bacteriocinas também foram realizados visando a comparação dos isolados.

A análise eletroforética das proteínas da fração de membrana revelou diferenças nos perfis de proteínas de baixo peso molecular, entre 24.000 e 14.000 . O agrupamento das culturas bacterianas feito apenas com base nos perfis de proteínas de baixo peso molecular foi semelhante ao agrupamento obtido através da análise numérica dos densitogramas desses perfis. Através desses dados verificou-se uma possível relação entre perfis de proteínas e hospedeira de origem das culturas bacterianas.

Através da análise eletroforética das proteínas totais da bactéria, não foi possível a diferenciação dos isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans*. Além disso, as

diferenças observadas nos padrões de bandas de baixo peso molecular das proteínas de membrana não são observadas nos perfis de proteínas totais.

Culturas de *P. avenae* e *P. rubrilineans* também não diferiram quanto à sensibilidade aos antibióticos ampicilina, tetraciclina, streptomicina, cloranfenicol e kanamicina, em diferentes concentrações.

O teste de produção de bacteriocina mostrou culturas de *P. avenae* produtoras e culturas de *P. rubrilineans* indicadoras dessa substância.

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem sinonímia entre culturas de *P. avenae* e *P. rubrilineans*. Entretanto, a análise das frações de proteínas de membrana mostram grupos de isolados distintos originários de milho e cana-de-açúcar, como também, algumas culturas de *P. avenae* e *P. rubrilineans* apresentam características distintas, tanto no padrão de proteínas de membrana, como na produção de bacteriocina ou em testes de patogenicidade. Discutiu-se a necessidade ainda do emprego de outros critérios de análise taxonômica no estudo dessas bactérias, tais como a análise de fragmentos de restrição do DNA.

SUMMARY

Electrophoretical analysis (SDS-PAGE) of whole cell proteins and membrane fraction proteins were used to compare *Pseudomonas avenae* (MANNS, 1909) with *Pseudomonas rubrilineans* [(LEE et al, 1925) STAPP, 1928] strains from different hosts. Antibiotic sensitivity and bacteriocin production tests were also analysed.

The electrophoretical analysis of the membrane-fraction protein showed differences in low molecular weight protein profiles, between MW 24.000 and 14.000. Strains which were grouped by numerical analysis of protein profiles were similar to those based only on low molecular weight protein profiles. It was verified a possible relationship between protein profiles and the original host of strains.

No differences were observed between *P. avenae* and *P. rubrilineans* strains when the whole cell protein samples were compared. Moreover, the differences observed in low molecular weight proteins of the membrane fractions were not found in total protein profiles.

P. avenae and *P. rubrilineans* did not differ on sensitivity to ampicilin, tetracycline, streptomycin, chloramphenicol and kanamycin, in different concentrations.

The results of this work suggest synonymy of *P. avenae* and *P. rubrilineans* cultures, however, the analysis of membrane proteins have shown distinct strain groups from corn and sugarcane. Also, some *P. avenae* and *P. rubrilineans* strains showed distinct characteristics in bacteriocin production and host assay tests. The use of other techniques, such as restriction DNA profile, to improve the understanding of the taxonomic position of these bacteria is discussed.

CONTEÚDO

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	REVISÃO DA LITERATURA	06
2.1.	<i>Pseudomonas avenae</i>	06
2.2.	<i>Pseudomonas rubrilineans</i>	11
2.3.	Proteínas de membrana de fitobactérias, técnicas de extração e eletroforese	15
3.	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1.	Origem dos isolados	18
3.2.	Preparo das bactérias	20
3.3.	Ruptura das bactérias e obtenção de membranas	22
3.4.	Obtenção de proteínas de membrana ...	24
3.5.	Obtenção de proteínas de citosol ...	25
3.6.	Dosagem de proteínas	26
3.7.	Eletroforese de proteínas	26
3.8.	Teste de sensibilidade a antibióticos	30
3.9.	Produção de bacteriocinas	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.	CONCLUSÕES	64
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas avenae MANNS 1909 e *Pseudomonas rubrilineans* (LEE, PURDY, BARNUM & MARTIN 1925) STAPP 1928 fazem parte de um grupo de bactérias do tipo não fluorescente e patogênicas a gramíneas ("pseudomonadas graminícolas"). Essas espécies têm distribuição mundial (SHAKYA et al., 1985; BRADBURY, 1986) e ocorrem naturalmente em diversas gramíneas de importância econômica como milho (*Zea mays* L.) (JOHNSON et al., 1949), arroz (*Oryza sativa* L.) (GOTO & OHATA, 1961), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (HAYWARD, 1962), aveia (*Avena sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) (SCHAAD et al., 1980) e sorgo (*Sorghum vulgare* PERS.) (HALE & WILKIE, 1972), além de outras gramíneas forrageiras (TOMINAGA, 1971).

As plantas infectadas com esse grupo de bactérias apresentam sintomas característicos conhecidos como "moléstia das folhas" (leaf blight, leaf stripe, brown stripe) e "Estria Vermelha" (red stripe), moléstia da cana-de-açúcar. Além de estrias e manchas foliares que podem variar na cor e intensidade dependendo da hospedeira, as plantas também podem apresentar podridão do ápice e, em estágios mais avançados de infecção, a podridão do colmo, sintoma mais frequentemente observado em milho e cana-de-

açúcar. A severidade desses sintomas tem sido relacionada a vários fatores tais como: idade da planta associada a períodos quentes e chuvosos, além da estirpe da bactéria (SCHAAD *et al.*, 1980; AKHTAR, 1985).

No Brasil, não há relatos da ocorrência natural de *P. avenae* em culturas de gramíneas, porém há a possibilidade dessa espécie ter sido identificada como *P. rubrilineans*.

Pseudomonas rubrilineans foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1932 (in CAMINHA FILHO, 1936) causando estrias vermelhas em folhas e podridão de topo de plantas de cana-de-açúcar. Nos últimos anos, essa bactéria tem sido encontrada ocorrendo em regiões canavieiras dos Estados de São Paulo (BRIEGER, 1970; SANGUINO & CARVALHO, 1971), Paraná e Rio de Janeiro (ROBBS *et al.*, 1981).

O controle da Estria Vermelha tem sido feito principalmente através do plantio de variedades resistentes (MARTIN *et al.*, 1961; TOKESHI, 1980). Recentemente, THIND *et al.* (1984) descreveram um método de controle químico empregando pulverizações com combinações de estreptociclina, glicerol ou sulfato de cobre, com bons resultados em milho. Entretanto, o uso de variedades resistentes tem sido o método mais econômico e eficiente de controle da Estria Vermelha em cana-de-açúcar.

A caracterização dos isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* tem sido feita principalmente através de

testes bioquímicos e de patogenicidade (JOHNSON *et al.*, 1949; GOTO & STARR, 1971). Outros métodos têm sido utilizados empregando-se serologia (TOMINAGA, 1971; RODRIGUES NETO, 1984) e experimentos de reassociação de DNA (SCHAAD *et al.*, 1975) em análise comparativa de isolados. Os resultados desses trabalhos indicam um estreito relacionamento entre *P. avenae* e *P. rubrilineans*.

BRADBURY (1986) descreve que *P. avenae* difere de *P. rubrilineans* basicamente em dois caracteres bioquímicos: reação de oxidase e produção de gás sulfídrico, sendo *P. rubrilineans* positiva e *P. avenae* negativa para tais características. Isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* oriundos de várias hospedeiras foram testados para estas características bioquímicas, porém, nenhuma diferença foi observada entre os isolados que mostraram reagir positivamente a esses testes (J. RODRIGUES NETO e I.M.G. ALMEIDA, em comunicação pessoal).

Pseudomonas avenae e *P. rubrilineans* também diferem quanto às espécies de hospedeiras naturais (BRADBURY, 1986), entretanto, diferentes isolados dessas espécies têm apresentado reações similares quando inoculados artificialmente em diversas gramíneas.

Serologicamente, isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* não puderam ser distinguidos usando-se antígenos de superfície da bactéria, em testes de dupla-

difusão em gel de ágar (RODRIGUES NETO, 1984).

Diferentes metodologias têm sido empregadas ultimamente no auxílio de estudos de caracterização, diagnóstico e taxonomia de grupos de fitobactérias, como é o caso da análise de isoenzimas, plasmídios, estudo de restrição e homologia de DNA, resistência a drogas e tipagem por fagos (GREINER-MAI et al., 1988).

A análise eletroforética de proteínas (SEITER & JAY 1980; SANTOS & DIANESE, 1985) e lipopolissacarídeos (KRAUSS et al., 1988) de membrana tem também sido extensivamente utilizada nos estudos de caracterização e reestruturação de grupos de bactérias. KERSTERS & DE LEY (1975) agruparam diferentes espécies bacterianas através de análise numérica baseada nos padrões eletroforéticos de proteínas. CARLSON & VIDAVER (1982) revisaram a toxonomia de fitobactérias do gênero *Corynebacterium* usando eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-EGPA) de proteínas celulares. SANTOS & DIANESE (1985) observaram diferenças nos perfis eletroforéticos de proteínas de membrana de *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae* e *X. campestris* pv. *manihotis*. THAVEECHAI & SCHAAD (1986 a) estudando vários isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* verificaram que proteínas de membrana de *X. campestris* pv. *campestris* são distintas e portanto podem ser úteis para a identificação e taxonomia. Além disso, usando testes

imunoquímicos e SDS-EGPA, identificaram e caracterizaram um determinante antigênico na membrana de *X. campestris* pv. *campestris* responsável pela especificidade das subespécies (THAVEECHAI & SCHAAD, 1986 b)

A caracterização e diagnóstico de bactérias através de testes bioquímicos e fisiológicos como também através de ensaios de hospedeira são muitas vezes trabalhosos e de resultados demorados. No caso de *P. avenae* e *P. rubrilineans*, que são espécies relacionadas, há a necessidade do uso de vários desses testes nos trabalhos de identificação. Por outro lado, as técnicas que empregam a análise de compostos celulares têm auxiliado grandemente os trabalhos de caracterização e diagnóstico com a vantagem de serem testes relativamente simples, rápidos e seguros.

O objetivo desse trabalho foi poder caracterizar sete culturas de *P. avenae* e treze de *P. rubrilineans* provenientes de diferentes regiões e originárias de cana-de-açúcar, milho, teosinte e arroz através da análise eletroforética de proteínas de membrana. Testes de resistência a antibióticos, produção de bacteriocinas e a análise eletroforética de proteínas totais foram realizados visando a comparação dos isolados. Essas técnicas, uma vez padronizadas, poderiam ser seguramente utilizadas nos trabalhos de identificação e diagnóstico dessas bactérias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Pseudomonas avenae*

Pseudomonas avenae foi descrita primeiramente por MANNS em 1909 causando o crestamento em folhas de aveia (*Avena sativa*). Dez anos depois, ROSEN (1919) relatou uma bacteriose em folhas de capim-rabo-de-raposa (*Chaetochloa lutescens* STUN., sinônimo de *Setaria lutescens* [WEIG.] HUBB.) semelhante àquela descrita por MANNS em aveia, e considerou *P. avenae* como agente causal. Entretanto, observando alguns caracteres fisiológicos distintos naquela bactéria, propôs uma nova espécie, *Pseudomonas alboprecipitans* (ROSEN, 1922).

Até 1952, outros sinônimos de *P. avenae* foram descritos segundo BRADBURY (1986): *Phytomonas avenae* (MANNS) BERGEY et al 1930, *Phytomonas alboprecipitans* (ROSEN) BERGEY et al 1930, *Bacterium setariae* OKABE 1934, *Bacillus avenae* (MANNS) BURGVITS 1935, *Phytomonas setariae* (OKABE) BURKHOLDER 1939, *Pseudomonas setariae* (OKABE) SAVULESCU 1947, *Phytobacterium alboprecipitans* (ROSEN) MAGROU & PRÉVOT 1948 e *Chlorobacter setariae* (OKABE) PATEL & KURKARNI 1951.

Em 1949, *P. alboprecipitans* foi identificada ocorrendo naturalmente em milho (*Zea mays*), no sul dos Estados Unidos, causando lesões nas folhas e podridão do

ápice das plantas (JOHNSON *et al.*, 1949).

TOMINAGA (1968) verificou que *P. setariae* ocorre em várias gramíneas em condições naturais e não considerou a proposição de sinonímia entre *P. setariae* e *P. panici* sugerida por GOTO & OKABE em 1952 (GOTO & OKABE citados por TOMINAGA, 1968). Três anos mais tarde, o mesmo autor, estudando bacterioses de gramíneas forrageiras do Japão através de serologia e testes bioquímicos, colocou *P. setariae* como sinônimo de *P. alboprecipitans* (TOMINAGA 1971).

HALE & WILKIE (1972), através de testes bioquímicos, verificaram identidade entre *P. alboprecipitans* e *P. rubrilineans* num estudo comparativo entre várias espécies de *Pseudomonas* patogênicas ao sorgo (*Sorghum vulgare*) na Nova Zelândia.

Em testes serológicos de dupla-difusão em gel de agar realizados com várias espécies de *Pseudomonas* patogênicas a gramíneas, RODRIGUES NETO (1984) também verificou identidade entre isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans*.

SCHAAD *et al.* (1975) propuseram sinonímia entre *P. avenae* e *P. alboprecipitans* baseados em análises de porcentagens de guanina + citosina e experimentos de reassociação de DNA. Posteriormente, SUMNER e SCHAAD (1977) estudando alguns aspectos da epidemiologia e controle de

P. avenae em milho, verificaram que essa bactéria pode se manter no solo ou em folhas verdes de plantas infectadas durante vários dias. Alguns anos depois, SCHAAD *et al.* (1980) analisando a influência da temperatura e luz na severidade da doença das folhas (bacterial blight) do milho, aveia e trigo, observaram que a luz não tem efeito sobre o desenvolvimento das lesões, porém, a influência da temperatura no desenvolvimento do bacterial blight difere com a hospedeira.

Em 1983, SATO *et al.* descreveram a moléstia dos "seedlings" de arroz os quais apresentavam alongamento anormal ("bending symptoms") e estrias alongadas de cor marrom, sintomas similares àqueles observados por GOTO & OHATA (1961) em arroz. Em inoculações artificiais, os isolados obtidos dos "seedlings" infectados foram patogênicos ao milho, trigo, cevada, aveia, centeio e três tipos de "millet" (TSUCHIYA *et al.* 1983).

MATSUDA & SATO (1983), estudando o modo de infecção de *P. avenae* nos "seedlings" de arroz através de microscopia eletrônica, verificaram a bactéria na superfície dos coleótilos com "bending symptoms", nas câmaras subestomáticas e no aerênquima das bainhas das folhas.

SHAKYA *et al.* (1986) estudando a transmissão de *P. avenae* em arroz observaram também essa bactéria nas câmaras subestomáticas das folhas primárias, nas lacunas dos

coleoptilos, mas não no xilema e floema. O estudo do desenvolvimento dos sintomas nos "seedlings" a partir da germinação de sementes descascadas ou não revelou que *P. avenae* permanece na semente podendo estar localizada entre as glumas e o pericarpo ou no interior da semente.

SHAKYA *et al.* (1985), utilizando um método para detecção de *P. avenae* em "seedlings" de arroz, investigaram a presença dessa bactéria em diferentes lotes de sementes de arroz provenientes de vários países. Os autores salientaram a importância da detecção de *P. avenae* nas sementes, uma vez que a bactéria foi encontrada viável e mantendo sua patogenicidade em lotes de até oito anos armazenados a 5°C. Mostraram também que, embora não se tenha dados sobre grandes prejuízos em plantas adultas, os danos em "seedlings" não devem ser subestimados.

TOMINAGA *et al.* (1983) também relataram a ocorrência de *P. avenae* causando "brown stripe" em "seedlings" de arroz cultivada em casa de vegetação.

WELLS & HORNE (1983), analisando a ultraestrutura de *P. avenae*, observaram inclusões citoplasmáticas similares aos corpúsculos refratáveis (R-body) encontrados originalmente em *Paramecium aurelia* e posteriormente em espécies de *Caedibacter* (GIBSON *et al.*, 1987).

BIRD & GIBSON (1987), estudando "R-body" de *P. avenae* (isolado NCPPB 1011) verificaram que tais

estruturas são cilíndricas ocorrendo aos pares com cerca de 0.5µm de comprimento, têm composição protéica, podendo se "desenrolar" dependendo das características do meio ou pelo tratamento com diversas drogas. Como observado para outros grupos de bactérias que apresentam "R-body", *F. avenae* com "R-body" foi tóxica a plantas de milho. Esses autores então formularam a hipótese de que "R-body" pode conter uma toxina ou é essencial para a ação dessa toxina nas células sensíveis. Em análise eletroforética das preparações de "R-body" de *F. avenae* os mesmos autores encontraram três bandas protéicas de 50.000, 34.000 e 26.000. Estudos foram feitos com o objetivo de localizar o gene para síntese de "R-body" de *F. avenae*. Um plasmídeo contendo o gene para "R-body" de *Caedibacter taeniospirales* não hibridizou com o DNA de *F. avenae* em experimentos de southern blots, entretanto não foram encontrados plasmídios em *F. avenae*, sugerindo que as sequências de código para "R-body" devem ser cromossomais.

Posteriormente, GIBSON & WELLS (1988) isolaram uma toxina de *F. avenae*, liberada no meio de cultura, que causava efeitos específicos em plantas de milho. Usando a técnica de microscopia eletrônica aliada à marcação de anticorpos com ouro coloidal, esses autores verificaram que o antissoro produzido contra "R-body" reagiu com "R-body" no interior da bactéria mas não com a toxina isolada do meio de cultura. Anticorpos produzido contra essa toxina também não

reagiram com "R-body" no interior da célula, mas foram detectados na superfície da célula bacteriana.

TAKIKAWA et al. (1988) observaram *P. avenae* ocorrendo em plantas de chá (*Tea* sp) causando manchas foliares e necrose no parênquima.

2.2. *Pseudomonas rubrilineans*

A doença das folhas de cana-de-açúcar conhecida como Estria vermelha, causada por *P. rubrilineans*, foi descrita originalmente por LYON em 1922. Posteriormente, esta doença foi estudada por LEE & JENNINGS (1924) e, em 1925, LEE et al. classificaram o agente causal como *Phytomonas rubrilineans*.

STAPP (1928) reclassificou essa bactéria como *Pseudomonas rubrilineans* e STARR & BURKHOLDER (1942) incluíram-na no gênero *Xanthomonas*.

CAMINHA FILHO (1936) relatou pela primeira vez no Brasil essa bacteriose afetando plantas de cana-de-açúcar, e posteriormente, GRILLO (1938) descreveu algumas características culturais de *Phytomonas rubrilineans* além de resultados de inoculações experimentais com essa cultura em diferentes variedades de cana-de-açúcar.

MARTIN & WISMER (1961) apresentaram um histórico de "red stripe" em cana-de-açúcar, descrevendo sintomas em caules e folhas, características culturais do agente causal (*Xanthomonas rubrilineans*), hospedeiros alternativos, mecanismo de transmissão do patógeno, importância econômica e controle dessa moléstia.

HAYWARD (1962), através de estudos morfológicos e bioquímicos, verificou que essa bactéria pertencia ao gênero *Pseudomonas* e propôs a nomenclatura *Pseudomonas rubrilineans* (LEE et al.) Stapp.

BRIEGER (1970) e SANGUINO & CARVALHO (1971) citam casos de epidemias de estrias vermelhas causadas por *P. rubrilineans* em regiões canavieiras dos Estados de São Paulo e Paraná.

DANGE & PAYAK (1973), estudando várias culturas de *P. rubrilineans*, verificaram que elas são patogênicas ao milho, teosinte (*Zea mexicana* [SCHRAD.] REEV. & MANGEL.) e cana-de-açúcar. Posteriormente, os mesmos autores testaram a sensibilidade de diferentes isolados de *P. rubrilineans* a vários antibióticos e fungicidas, verificando que essa bactéria é sensível à terramicina e estreptociclina (DANGE & PAYAK, 1974).

AKIBA et al. (1976), estudando a reação de variedades de cana-de-açúcar à *P. rubrilineans*, concluíram que testes de resistência realizados em condições de casa-

de-vegetação podem ser empregados para a determinação de variedades resistentes.

FERNANDES (1979), dando continuidade ao trabalho de AKIBA *et al.* (1976), desenvolveu uma metodologia para estudo de variedades de cana-de-açúcar resistentes à *P. rubrilineans* padronizando condições de casa-de-vegetação para indução de sintomas da Estria Vermelha.

OSADA *et al.* (1978) isolaram bactérias de plantas de cana-de-açúcar com estrias vermelhas e as caracterizaram como *P. rubrilineans*.

ROBBS (1980) relatou a ocorrência natural de *P. rubrilineans* causando o crestamento em folhas de biri (*Canna indica* L.).

TOKESHI (1980) descreveu sobre "estrias vermelhas" no Brasil: etiologia, sintomatologia em hospedeiras e controle do patógeno, enfatizando sobre as condições de altas temperaturas, umidade relativa elevada e solos férteis como principais aspectos associados à ocorrência dessa moléstia.

VESMINSH *et al.* (1982), procurando conhecer possíveis hospedeiras naturais existentes em Cuba, que pudessem albergar o patógeno após a colheita da cana-de-açúcar, verificaram que *P. rubrilineans* foi patogênica às espécies *Cyperus rotundus* L. (tiririca), *Pennisetum purpureum* = *Pennisetum setosum* (SWARTZ) L.RITC.PERS. (capim-

oferecido), *Sorghum alnum* PARODI (sorgo negro), *Sorghum halepense* (L.) PERS. (capim-massambará), *Sorghum vulgare* e *Zea mays*.

RODRIGUES NETO (1984), estudando o relacionamento serológico entre espécies de pseudomonadas "graminícolas", verificou identidade entre os isolados de *P. rubrilineans* e *P. avenae* em testes de dupla-difusão em gel de agar.

AKHTAR & ASLAN (1986) observaram *P. rubrilineans* ocorrendo naturalmente em plantas de cana-de-açúcar de culturas do National Agricultural Research Centre - Paquistão, entre 1984 e 1985. Os autores consideraram ser a primeira identificação dessa bactéria no país. Testes de patogenicidade mostraram que entre nove cultivares comerciais de cana-de-açúcar testadas, quatro foram sensíveis à *P. rubrilineans*, e as demais moderadamente resistentes.

ALMEIDA *et al.* (1988), estudando a reação de variedades de cana-de-açúcar a isolados de *P. rubrilineans*, verificaram diferenças significativas no comportamento entre as variedades e também em relação aos isolados testados.

2.3. Proteínas de membrana de fitobactérias, técnicas de extração e eletroforese.

A maioria dos estudos sobre membranas de bactérias, incluindo a análise e caracterização de componentes (SCHNAITMAN, 1970a; AMES *et al.*, 1974; KROPINSKI *et al.*, 1978; PALVA & MAKELA, 1980; OSBORN & WU, 1980; NIKAIDO & VAARA, 1985), sistemas de transportes (DIMASI *et al.*, 1973; RAMOS *et al.*, 1976; HANCOCK & NIKAIDO, 1978; BRAUN, 1985), sítios receptores (CHAI *et al.*, 1982) e mecanismos diversos têm sido intensamente realizados com espécies de Enterobacteriaceae, principalmente *Escherichia coli* (LUGTENBERG & VAN ALPHEN, 1983; OVERBEEKE & LUGTENBERG, 1980) e *Salmonella typhimurium* (OSBORN *et al.*, 1972; HITCHCOCK & BROWN, 1983), e outras de importância médica como *P. aeruginosa* (MIZUNO & KAGEYAMA, 1978; HANCOCK & CAREY, 1979; HANCOCK *et al.*, 1981; DARVEAU & HANCOCK, 1983).

Por outro lado, os estudos sobre membranas de fitobactérias têm se limitado a trabalhos de caracterização de proteínas e lipopolissacarídeos (LPS), a maioria realizados principalmente com subespécies de *Xanthomonas campestris* (DIANESE & SCHAAD, 1982; MINSAVAGE & SCHAAD, 1983; SANTOS & DIANESE, 1985; THAVEECHAI & SCHAAD, 1986a, 1986b), algumas espécies de *Erwinia* (THURN & CHATTERJEE,

1981) e *Pseudomonas* (ANDERSON, 1980, 1984; ZANGE et al., 1985).

Estudos recentes vêm demonstrando o papel e a importância de certos componentes de membrana como LPS (WHATLEY et al., 1976; de WEGER et al., 1987a), proteínas (de WEGER et al., 1986, 1988), fímbrias e flagelos (de WEGER et al., 1987b) nas interações bactéria-planta.

Grande parte das técnicas descritas para obtenção de proteínas de membranas de bactérias gram-negativas baseiam-se nos trabalhos de SCHNAITMAN (1970a, b, 1971a, b). Tais técnicas empregam em geral a ruptura das células com lisozima-prensa de French ou lisozima-ultrassom (SANTOS & DIANESE, 1985), fracionamento ou não das membranas totais em membranas interna e externa através de centrifugação em gradiente de sacarose descontínuo, e solubilização de proteínas com detergente Triton X-100.

DIANESE (1986) descreve brevemente algumas variações de procedimentos de extração de proteínas de membrana de gram-negativas e gram-positivas.

Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS foi originalmente descrito por LAEMMLI (1970). Outras variações para sistema descontínuo dissociante têm sido introduzidas usando-se diferentes sistemas tamponantes como Tris-borato, e detergentes tais como deoxicolato de sódio, lubrol, sarcosil, triton X-100

além do uso de uréia como agente denaturante de proteínas.
HAMES & RICKWOOD (1982) apresentam uma excelente revisão
sobre os sistemas de eletroforese em poliacrilamida.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem dos isolados de *Pseudomonas avenae* e *P. rubrilineans* e condições de crescimento.

Os isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* utilizados neste estudo foram obtidos da coleção de culturas da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico-Est. Experimental de Campinas (IBSBF) (Tabela 1). Culturas liofilizadas foram reativadas pelo plaqueamento em meio nutriente agar (extrato de carne 3.0g, peptona 5.0g, NaCl 5.0g, bacto-agar 15.0g, água destilada, volume final 1 litro, pH 7.0) (Levine, 1954) e mantidas a 28°C por 72h. A partir de colônias isoladas, foram feitas suspensões em água destilada esterilizada para a inoculação dos meios de cultura. Para cada isolado foram inoculadas quatro placas de meio nutriente-agar as quais foram mantidas a 28°C durante 72h.

TABELA 1. Culturas de *Pseudomonas avenae* e *P. rubrilineans* utilizadas nos experimentos: código, origem e hospedeira.

Cultura recebida como	Código ^a	Código ^b	Hospedeira	Origem
<i>Pseudomonas avenae</i>	ICMP 3183	193	<i>Zea mays</i>	Est. Unidos
	ICMP 3186	194	<i>Zea mexicana</i>	Japão
	ICMP 3178	206	<i>Zea mays</i>	Japão
	C-138	449	<i>Zea mays</i>	Est. Unidos
	ICMP 3181	480	<i>Zea mexicana</i>	Japão
	ICMP 3960	481	<i>Oryza sativa</i>	Japão
	ICMP 7083	482	<i>Eleusine coracana</i>	Japão
<i>Pseudomonas rubrilineans</i>	ICMP 5811	77	<i>Zea mays</i>	Brasil
	ENA 643	176	<i>Zea mays</i>	Brasil
	ICMP 7460	178	<i>Canna indica</i>	Brasil
	F-3	179	<i>Saccharum officinarum</i>	Brasil
	ICMP 252	195	<i>Saccharum officinarum</i>	I. Maurícios.
	ICMP 3106	196	<i>Zea mays</i>	Índia
	JC-1	261	<i>Zea mays</i>	Brasil
	ICMP 255	296	<i>Saccharum officinarum</i>	Austrália
	ICMP 254	342	<i>Saccharum officinarum</i>	I. Reunião
	-	389	<i>Zea mays</i>	Brasil
	-	395	<i>Zea mays</i>	Brasil
	-	573	<i>Zea mays</i>	Brasil
	-	577	<i>Zea mays</i>	Brasil

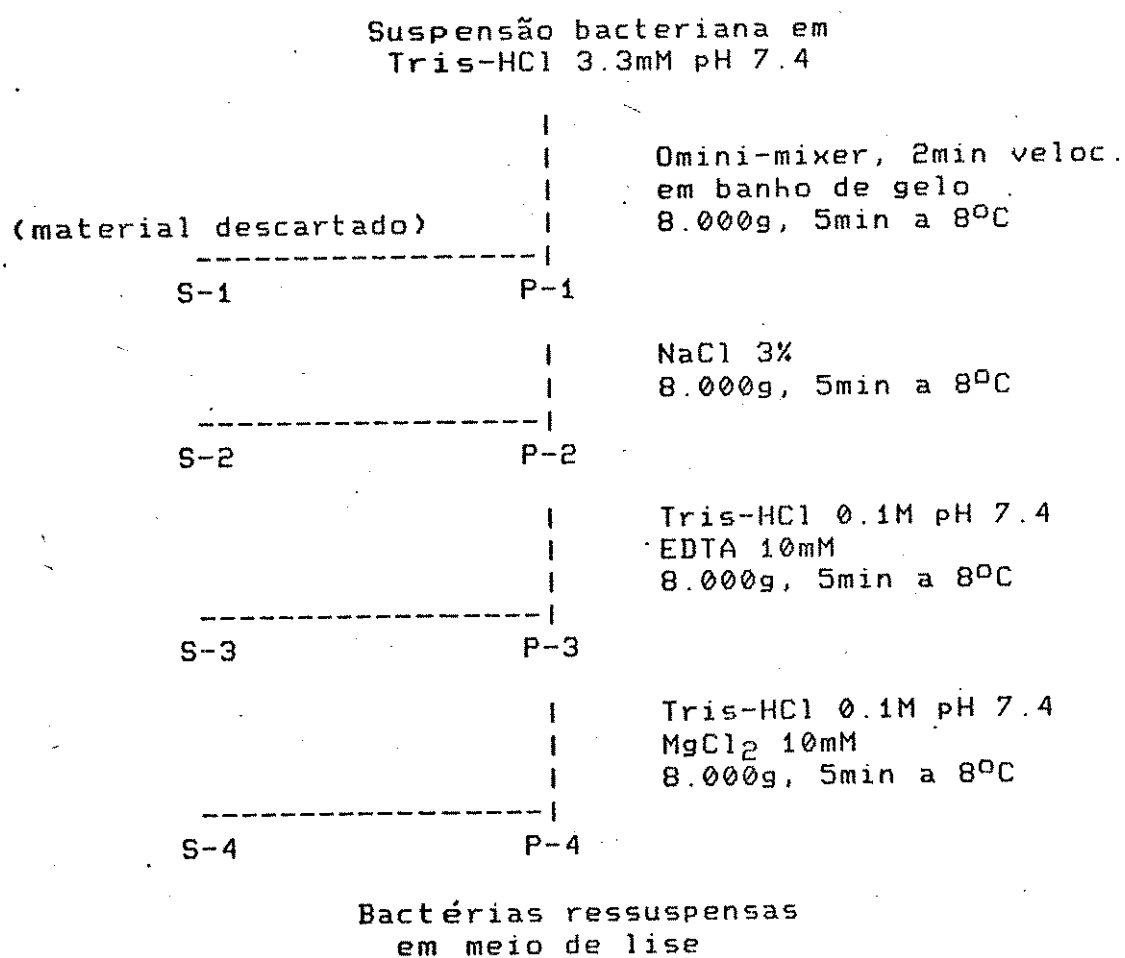
a. código das culturas recebidas de: ICMP- International Collection of Microorganisms from Plants; C- Dr Norman W. Schaad, University of Idaho, Moscow, USA; ENA- Dr. Charles F. Robbs, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; F- Dr. F. Akiba, Univers. Federal Rural do Rio de Janeiro; JC-1- Dr. Nilton L. Souza, F.C.A. Universidade Estadual Paulista/Botucatu.

b. código IBSBF

3.2. Preparo das bactérias.

Após o crescimento em meio sólido, as bactérias foram suspensas em tampão Tris-(hidroximetil)aminometano-HCl (Tris-HCl) 3.3mM pH 7.4. A suspensão obtida foi homogeneizada em omini-mixer (Sorvall) por 2min, velocidade 4, em banho de gelo e centrifugada a 8.000g por 5min a 8°C. O precipitado obtido (P-1) foi ressuspendido em solução salina (NaCl 3%). Centrifugou-se a suspensão a 8.000g por 5min a 8°C descartando-se o sobrenadante (S-2). Repetiu-se esta sequência usando-se as soluções tampão Tris-HCl 0.1M pH 7.4 contendo EDTA 10mM e Tris-HCl 0.1M pH 7.4 contendo MgCl₂ 10mM, respectivamente. O precipitado de bactérias (P-4) foi ressuspendido em tampão de lise (Tampão glicina 0.1M pH 9.2, lisozima 0.1mg/ml e sacarose 0.75M) (Esquema 1).

ESQUEMA 1. Preparo das bactérias



3.3. Ruptura das bactérias e obtenção de membranas totais.

A técnica de obtenção de membranas teve como base o trabalho de SANTOS & DIANESE (1985). As bactéria (P-4, Esquema 1) foram ressuspensas em tampão glicina 0.1M pH9.2 contendo lisozima 0.1mg/ml (Sigma L6876), sacarose 0.75M e mantidas em banho de gelo por 30min. Em seguida, foram aplicados seis ciclos de sonicação (20khz, 70 a 90 W) de 30s cada. A suspensão foi centrifugada a 8.000g por 5min a 8°C para remoção de células inteiras (P-1). O sobrenadante (S-1) contendo vesículas de membrana foi então centrifugado a 37.000g por 30min a 4°C. O sobrenadante (S-2) contendo proteínas de citosol foi coletado e o precipitado de membranas (P-2) ressuspendido em tampão glicina 10mM pH 9.2 contendo sacarose 75mM, gelado. A suspensão foi centrifugada a 37.000g por 30min a 4°C. O sobrenadante (S-3) foi descartado e o precipitado de membrana (P-3) ressuspendido em tampão Tris-HCl 3.3mM pH 7.4. A suspensão foi novamente centrifugada, descartando-se o sobrenadante (S-4). Membranas totais (P-4) foram mantidas a -20°C (Esquema 2).

ESQUEMA 2. Ruptura das bactérias e obtenção de membranas totais.

Bacterias lavadas

| Glicina 0.1M pH 9.2
| lisozima 0.1mg/ml
| sacarose 0.75M, 30min
| gelo

Sonicação

| 6 ciclos de 30s (20Khz,
| 70- 90 W)
| 8.000g, 5min a 8°C

P-1 S-1

(descartado) | 37.000g, 30min a 4°C

S-2 P-2 (vesículas de membrana)

(proteínas citosol) | Glicina 10mM pH 9.2
| sacarose 75mM
| 37.000g, 30min a 4°C

S-3 P-3

(descartado) | Tris-HCl 3.3mM pH 7.4
| 37.000g, 30min a 4°C

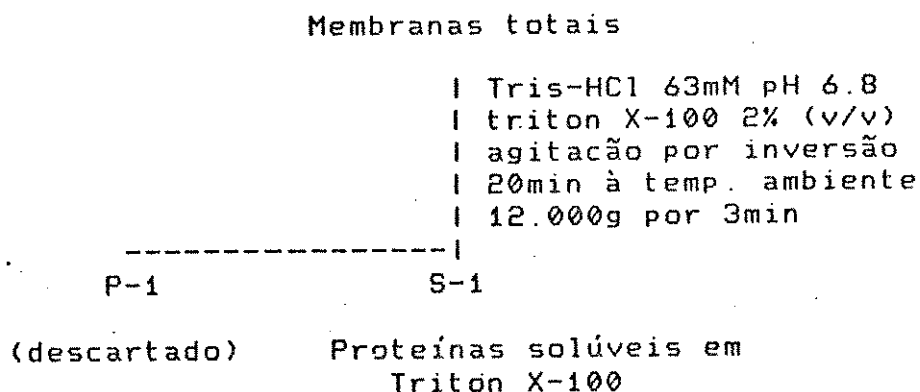
S-4 P-4

(descartado) Membranas Totais

3.4. Obtenção de proteínas de membrana.

A solubilização de proteínas de membrana foi feita segundo os trabalhos de SCHNAITMAN (1971a, b) com algumas modificações. Membranas totais (P-4, Esquema 2) foram ressuspendidas em volume mínimo de tampão Tris-HCl 63mM pH 6.8 contendo Triton X-100 2% (v/v). A suspensão foi agitada por inversão durante 20min em temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 12.000g por 3min. O sobrenadante (S-1) contendo proteínas solúveis em Triton X-100 foi coletado e o precipitado (P-1) descartado (Esquema 3).

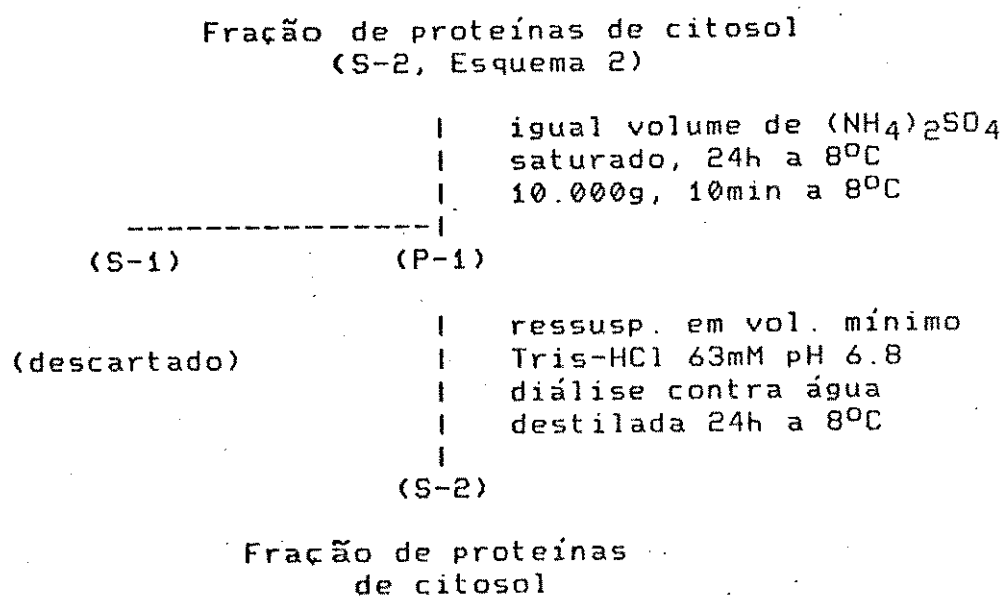
ESQUEMA 3. Obtenção de proteínas de membrana.



3.5. Obtenção de proteínas de citosol.

Ao sobrenadante S-2 (Esquema 4) contendo proteínas de citosol foi adicionado igual volume de solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80% a 25°C). A mistura foi mantida a 8°C durante 2h, o precipitado formado (P-1) foi recuperado por centrifugação, ressuscitado em volume mínimo de Tris-HCl 63mM pH 6.8 e dialisado contra água destilada por 24h a 8°C (Esquema 4).

ESQUEMA 4. Obtenção de proteínas de citosol.



3.6. Dosagem de proteínas.

A dosagem de proteínas das amostras foi feita segundo o "método de Lowry" modificado por HARTREE (1972), utilizando-se soroalbumina bovina como padrão.

3.7. Eletroforese de proteínas.

Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS foi realizada segundo os modelos de HAMES & RICKWOOD (1982) usando-se sistema descontínuo dissociante, de placa vertical (15cm X 12cm X 0.15cm).

3.7.1. Preparo dos géis.

Géis de resolução de concentração de acrilamida 10 e 12% foram preparados sob 1.5cm de gel de empacotamento (acrilamida 3.75%) misturando-se as soluções estoque nas proporções apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2- Soluções estoque e suas proporções usadas no preparo dos geis de eletroforese em sistema descontínuo dissociante.

soluções estoque	gel de empacotamento	gel de resolução		tampão cuba
		12%	10%	
acrilamida 30% + bisacr. 0.8%	2.5	12	10	-
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	5.0	-	-	-
Tris-HCl 3.0M pH 8.8	-	3.75	3.75	-
Tris 0.25M + Glicina 1.92M + SDS 1% pH 8.3	-	-	-	100
SDS 10%	0.2	0.3	0.3	-
Persulfato de amônio 3.0%	1.0	1.5	1.5	-
Água destil.	11.3	12.4	14.4	900
Temed (NNNN-te- trametiletileno- diamino)	0.015	0.015	0.015	-
volume final	20ml	30ml		1000ml

3.7.2. Preparo das amostras.

As frações de proteínas de membrana e de citosol foram fervidas durante 4min com tampão dissociante (Tris-HCl 63mM pH 6.8 contendo 2-beta-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, sacarose 10% e azul de bromofenol 0.001%) na proporção 1:1 (v/v). O mesmo tampão foi utilizado para ajustar a concentração de proteínas das amostras para 0.2 - 0.3mg/ml. As amostra foram distribuídas em alíquotas de 0.1ml e mantidas a -20°C. Amostras de proteínas totais da bactéria foram obtidas fervendo-se cerca de 0.2g de bactérias crescidas em meio nutriente-agar (LEVINE, 1954) a 28°C durante 72h, em 0.5ml de tampão de amostra durante 4min. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 15.000g por 2min e o sobrenadante contendo proteínas totais coletado e mantido a -20°C.

Amostras de proteínas conhecidas (MV-SDS-70 Sigma) foram utilizadas para a estimativa do peso molecular das proteínas de *P. avenae* e *P. rubrilineans*, segundo o método de SVASTI & PANIJAN (1977).

3.7.3. Condições de corrida.

Amostras com cerca de 2.0 - 3.0ug de proteínas foram aplicadas no gel. A eletroforese foi efetuada em temperatura ambiente com voltagem fixada em 100V (40mA) durante quatro horas, aproximadamente.

3.7.4. Coloração e secagem dos géis.

A coloração dos géis foi feita utilizando-se a técnica de coloração por prata para proteínas e ácidos nucleicos descrita por BLUM *et al* (1987). Os géis corados foram secos segundo a técnica de JUÀNG *et al* (1984).

3.7.5. Densitometria e análise de agrupamento.

Os géis de eletroforese foram analisados em densitômetro Ultrascan e a análise de agrupamento foi feita com o auxílio do programa Page.tax (JACKMAN & WHILEY, 1990).

3.8. Teste de sensibilidade a antibióticos.

Isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* (Tabela 1) foram comparados em termos do efeito de determinados antibióticos no crescimento bacteriano. Os antibióticos utilizados foram: ampicilina (Sigma A-9393), tetraciclina (Sigma T-3258), streptomicina (Sigma S-6501), kanamicina (Sigma K-1876) e cloranfenicol (Sigma C-0378).

3.8.1. Meios de crescimento.

Culturas de *P. avenae* e *P. rubrilineans* foram plaqueadas em meio nutriente-ágar (extrato de carne 2.5%, peptona 1.0%, NaCl 0.5%, bacto-ágar 1.5%) (KIRALY, 1974) e mantidas a 30°C durante 24h. A partir de colônias isoladas fez-se, para cada cultura, uma suspensão em água esterilizada (3ml) utilizada para a inoculação dos meios contendo antibiótico.

3.8.2. Meios contendo antibiótico.

Para cada antibiótico foram preparadas seis placas com meio nutriente-ágar (KIRALY, 1974) contendo antibiótico nas concentrações de 2, 20, 50, 100, 350 e 1000ug por ml de meio de cultura. Antibióticos em soluções estoque (streptomicina-água 20mg/ml, Kanamicina-água 25mg/ml, ampicilina-água 25mg/ml, tetraciclina-metanol 12.5mg/ml, e cloranfenicol-etanol 25mg/ml) foram adicionados aos meios (fundidos e mantidos em banho maria à 40°C) seguindo-se a série de diluições. Essas placas foram inoculadas com as suspensões de bactérias usando-se uma multi-alça. As placas inoculadas foram mantidas a 30°C e a atividade antibiótica foi avaliada 24h após a inoculação.

3.9. Produção de bacteriocina.

Um teste para verificar produção de bacteriocina foi empregado para os diferentes isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* onde se verificou o efeito de cada isolado sobre o crescimento dos demais.

3.9.1- Meios de crescimento e plaqueamento

Isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* (Tabela 1) foram cultivados inicialmente em 4ml de meio nutriente-líquido (KIRALY, 1974) a 30°C durante 24h, sob agitação. Uma amostra de *E. coli* indicadora de colicinas (K-12 RCW) foi cultivada nas mesmas condições, porém a 37°C. A partir das culturas em meio líquido, foram inoculados 21 placas contendo o mesmo meio sólido. Cada placa continha os 21 isolados, inoculados com o auxílio de uma multi-alça. Essas placas foram mantidas a 30°C por 24h e após esse período, as culturas foram mortas por exposição a vapor de clorofórmio durante 30min. O excesso de clorofórmio foi removido colocando-se as placas em estufa a 40°C por 1h. Em seguida, 21 tubos (um para cada isolado) contendo 4ml de meio nutriente-ágar (KIRALY, 1974) semi-sólido (0.7% de ágar), fundido e a 40°C, foram inoculados com 30ul de culturas indicadoras crescidas durante 24h sob agitação em 4ml de meio nutriente-líquido a 30°C. Cada meio semi-sólido fundido foi inoculado com uma cultura e vertido sobre a superfície de uma placa de forma a cobrir os 21 isolados mortos pelo clorofórmio. Após solidificação dos meios semi-sólidos, as placas foram mantidas a 30°C por 24h, quando então avaliou-se a presença de halo de inibição da cultura indicadora.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a análise e discussão dos resultados, adotou-se as seguintes abreviações: *P. avenae* (A), *P. rubrilineans* (R), arroz (ar), biri (bi), cana-de-açúcar (ca), *Eleusine coracana* (eleu), milho (mi) e teosinte (teo).

Os perfis eletroforéticos de proteínas da fração de membrana de *P. avenae* e *P. rubrilineans* são muito semelhantes, porém, foram observadas diferenças no padrão de bandas de baixo peso molecular, entre 24.000 e 15.000 (Figuras 1, 2 e 3). Isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* foram então agrupados com base nos perfis de proteínas de baixo peso molecular (Tabela 3). Entre os isolados de milho, tres grupos puderam ser distinguidos: I- os isolados Rmi 77, Rmi 389 e Ami 206 apresentaram uma banda intensa, mal resolvida, em torno de 22.000; II- os isolados Ami 193 e Ami 449 mostraram o mesmo padrão protéico porém, diferiram dos demais isolados de milho por apresentarem uma banda intensa de peso molecular médio de 18.900; o isolado Rmi 261 apresentou um perfil protéico semelhante, porém com uma banda mais intensa em torno de 18.400; III- os isolados Rmi 395, Rmi 573, Rmi 577, Ateo 194 e Ateo 480 apresentaram bandas maiores da ordem de 16.000 (Figuras 1, 2 e 3).

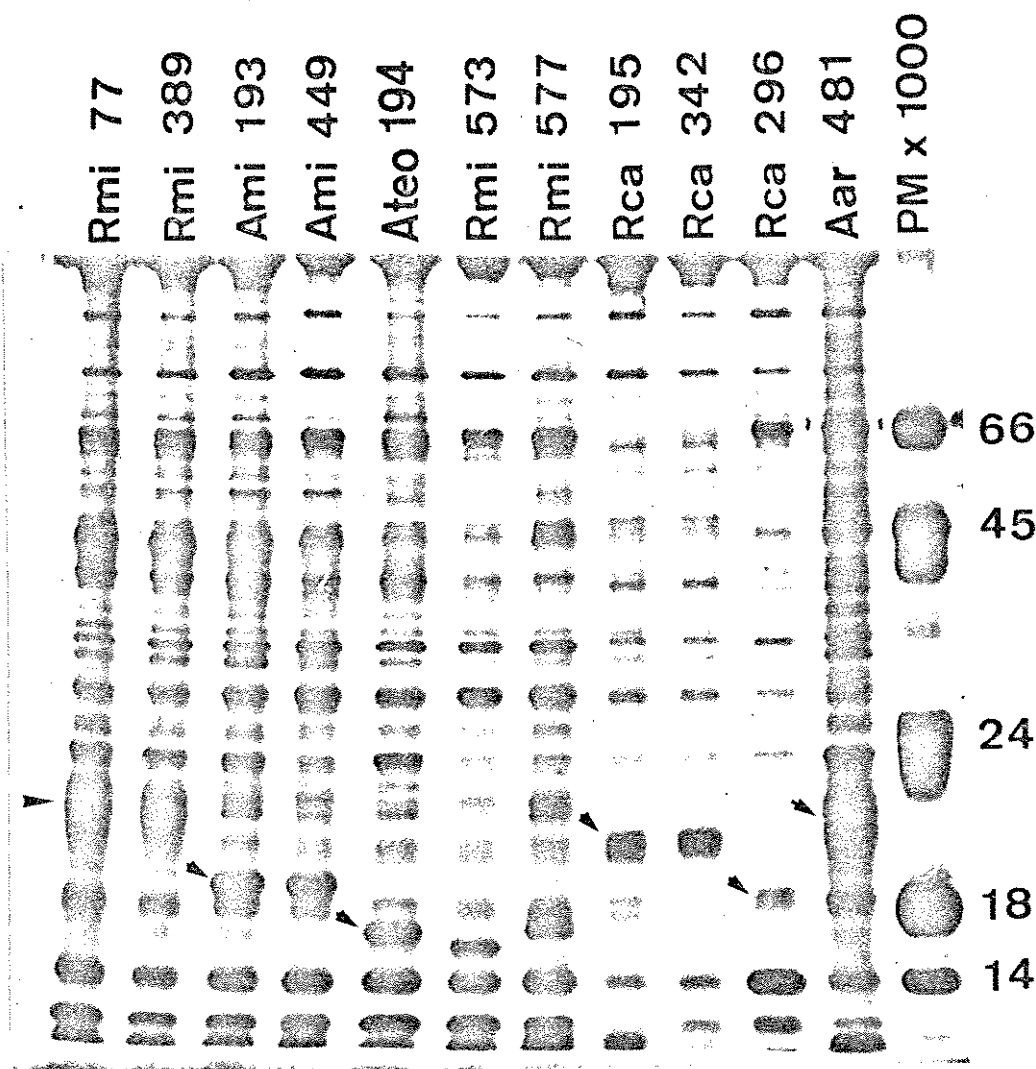


FIGURA 1. Padrões eletroforéticos de proteínas da fração de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Notam-se diferenças principalmente no padrão de bandas de baixo peso molecular: os isolados Rmi 77 e Rmi 389 diferem dos demais por apresentarem uma banda mais intensa de 22.300; o isolado Aar 481 apresenta uma banda mais intensa de 21.800; os isolados Ami 193 e Ami 449 mostram uma banda maior de 18.700; os isolados Ateo 194, Rmi 573 e Rmi 577 mostram padrões similares com bandas maiores de 16.300, 15.800 e 16.500, respectivamente; os isolados Rca 195 e Rca 342 diferem do isolado Rca 296 apresentando uma banda maior de 20.400.

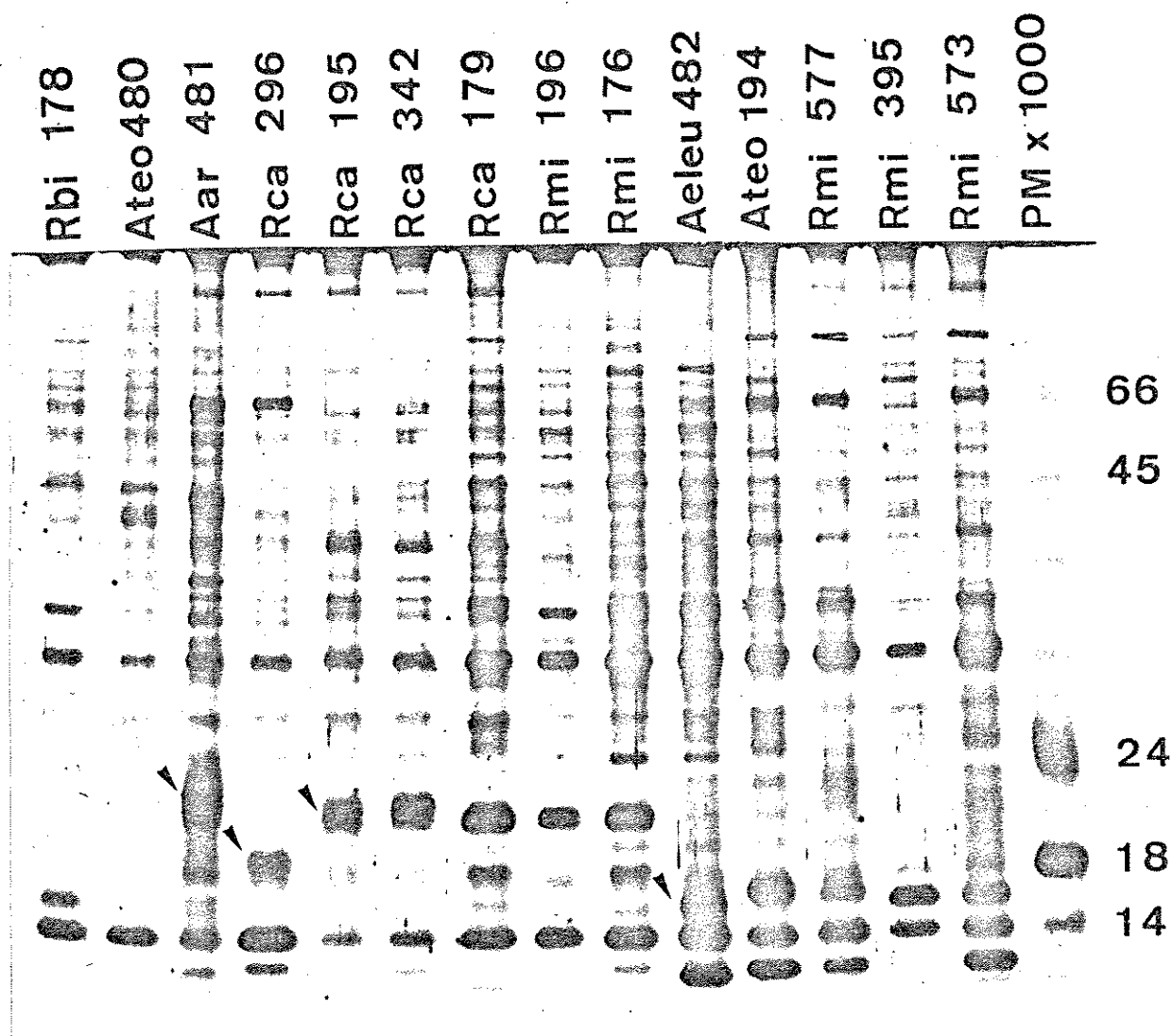


FIGURA 2. Padrões eletroforéticos de proteínas da fração de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Os isolados Rmi 573, Rmi 395, Rmi 577, Ateo 194 e Aeleeu 482 mostram bandas maiores de 16.000, 16.000, 16.200, 16.300 e 15.700 respectivamente; os isolados Rmi 176 e Rmi 196 apresentam perfis semelhantes aos dos isolados Rca 179, Rca 195 e Rca 342 os quais mostram bandas maiores da ordem de 20.000; o isolado Rca 296 mostra uma banda mais intensa de 18.600; o isolado Aar 481 apresenta uma banda mal resolvida de 21.200.

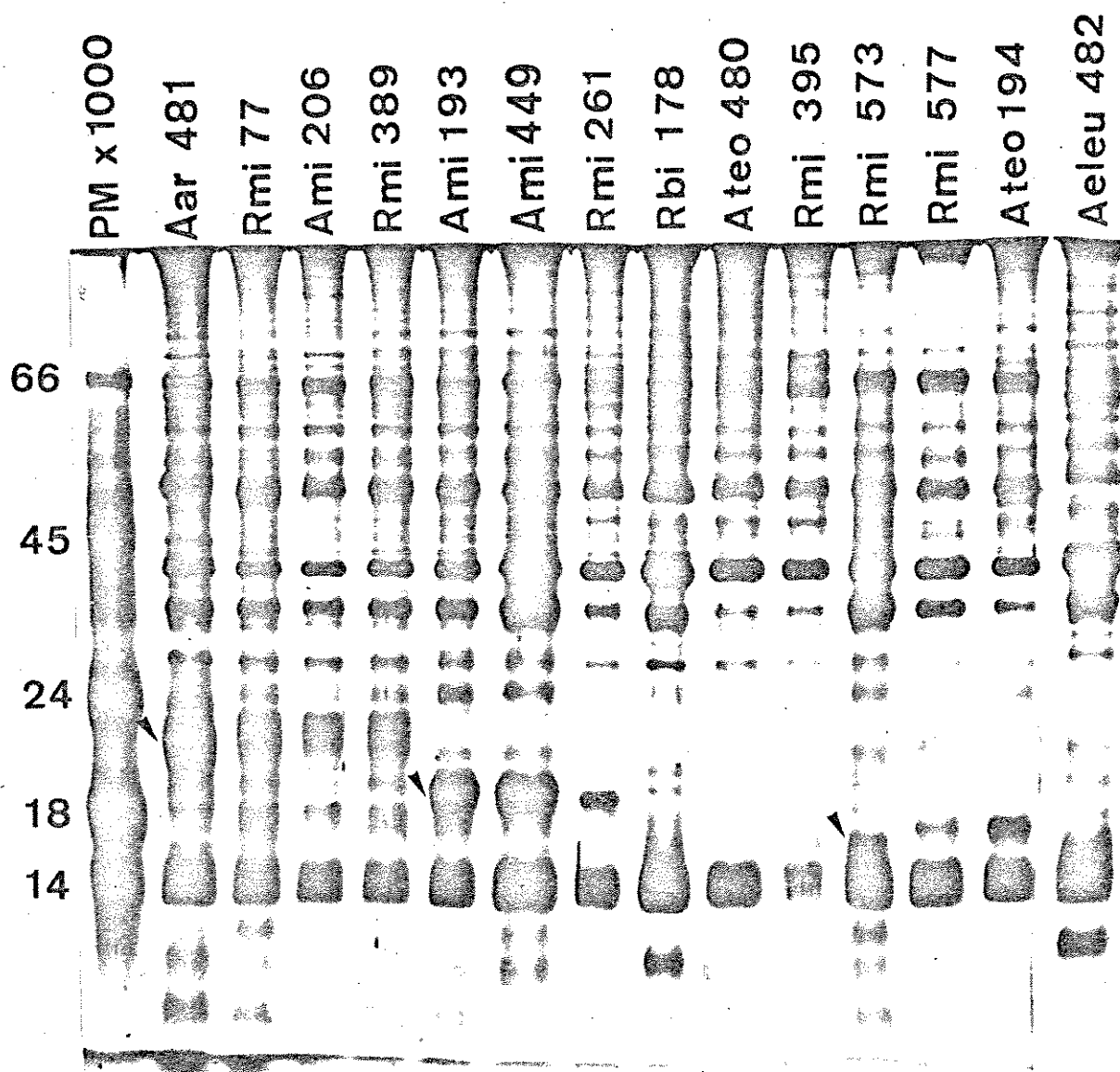


FIGURA 3. Padrões eletroforéticos de proteínas da fração de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Os isolados Rmi 77, Rmi 389, Ami 206 e Aar 481 apresentam perfis protéicos semelhantes mostrando uma banda maior da ordem de 22.000; os isolados Ami 193 e Rmi 449 apresentam o mesmo padrão com uma banda intensa de 19.000; os isolados Rmi 261, Rmi 573, Rmi 577, Ateo 194 e Aeleeu 482 mostram bandas distintas de 18.600, 16.000, 16.400, 16.400 e 15.600 respectivamente.

TABELA 3. Agrupamento dos isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* com base nos padrões eletroforéticos de proteínas de membrana de baixo peso molecular, entre 24.000 e 15.000.

Grupo	Cultura	Origem	Peso Molecular X 1000		
			M	D	n=4

milho					
I	Rmi 77	Brasil	22.2	0.2	
	Rmi 389	Brasil	22.3	0.3	
	Ami 206	Brasil	22.2	0.2	
II	Ami 193	EUA	18.9	0.2	
	Ami 449	EUA	18.9	0.2	
	Rmi 261	Brasil	18.6	0.1	
III	Ateo 194	Japão	16.3	0.2	
	Ateo 480	Japão	16.3	0.1	
	Rmi 577	Brasil	16.3	0.2	
	Rmi 573	Brasil	16.1	0.3	
	Rmi 395	Brasil	16.1	0.3	
	Rbi 178	Brasil	16.0	0.2	
	Aeleu 482	Japão	15.5	0.2	
cana-de-açúcar					
I	Rca 195	I. Maurícios	20.2	0.3	
	Rca 342	I. Reunião	20.2	0.3	
	Rca 179	Brasil	20.0	0.1	
	Rmi 176	Brasil	20.0	0.1	
	Rmi 196	Brasil	20.1	0.2	
	II	Rca 296	Austrália	18.6	0.2
arroz	Aar 481	Japão	21.7	0.3	

M- média; D- desvio padrão; n- graus de liberdade

Os isolados de cana-de-açúcar Rca 179, Rca 195 e Rca 342 mostraram o mesmo perfil eletroforético com bandas mais intensas em torno de 20.000. O isolado Rca 296 entretanto, apresentou um padrão protéico distinto, com banda de 20.000 em menor concentração e apresentando uma banda maior de peso médio de 18.600 (Figuras 1 e 2).

Dois isolados de milho, Rmi 176 e Rmi 196, apresentaram perfis protéicos semelhantes aos dos isolados Rca 179, Rca 195 e Rca 342, mostrando também uma banda intensa da ordem de 20.000 (Figura 2).

O isolado de arroz Aar 481 apresentou um perfil eletroforético similar ao dos isolados Rmi 77, Rmi 389 e Ami 206 com uma banda mais intensa em torno de 21.700 (Figuras 1 e 3).

Os isolados Ae1eu 482 e Rbi 178 apresentaram bandas distintas de menor peso entre 15.500 e 16.000 (Figuras 2 e 3).

A análise das frações contendo proteínas de citosol obtidas após a precipitação de membranas mostraram uma maior concentração de proteínas na faixa de 80.000 a 25.000. Da mesma forma que para proteínas de membrana, pequenas diferenças puderam ser observadas na intensidade de bandas de proteínas de baixo peso molecular (Figura 4).

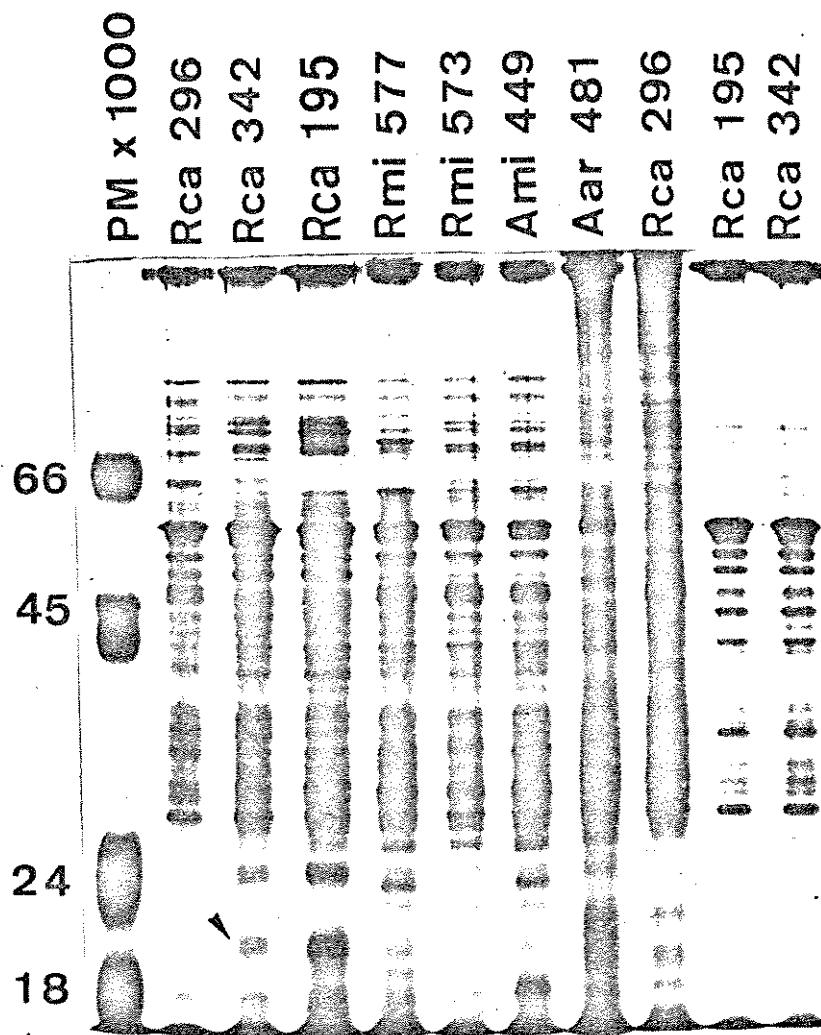


FIGURA 4. Padrões eletroforéticos de proteínas de citosol em gel de poliacrilamida 10%. Os isolados Rca 195 e Rca 342 apresentam o mesmo perfil protéico mostrando uma banda intensa de 20.000, mas não no material diluído 10X (amostras da ponta); o isolado Rca 296 é distinto dos demais isolados de cana no perfil de proteínas de baixo peso molecular.

Calculando-se os pesos moleculares dessas proteínas verificou-se que eles são correspondentes àqueles das proteínas da fração de membrana. Pensou-se a princípio que a fração de proteínas de citosol contém proteínas da fração de membrana. Supondo que certas proteínas de membrana ou de periplasma são sintetizadas em parte no citosol, elas poderiam ser encontradas nas duas frações. Entretanto, imagina-se que durante a sonicação das bactérias, as membranas são rompidas e muitos de seus constituintes se solubilizam. Tanto a fração de proteínas de citosol acabaria contendo proteínas da membrana, como também vesículas de membrana se formariam englobando material de citosol, mesmo diluindo-se esse material aplicando-se choque osmótico (lavagem das membranas). Existe, porém, a possibilidade de ter ocorrido proteólises que resultassem na formação desses peptídeos. Testou-se então o efeito de 150ug/ml do inibidor de serina-protease, "Phenylmethylsulphonylfluoride" (PMSF), nas preparações de membrana dos isolados Rmi 176 e Rmi 196 a partir da etapa de incubação das bactérias em meio de lise. Não se observaram diferenças nos perfis protéicos entre os tratamentos com e sem PMSF. Verificou-se a banda maior de 20.000 característica desses isolados (Figura 5). Este resultado sugere a não ocorrência de proteólise por serina protease, porém, não se pode descartar a possibilidade de proteólise nas amostras devido a outras enzimas.

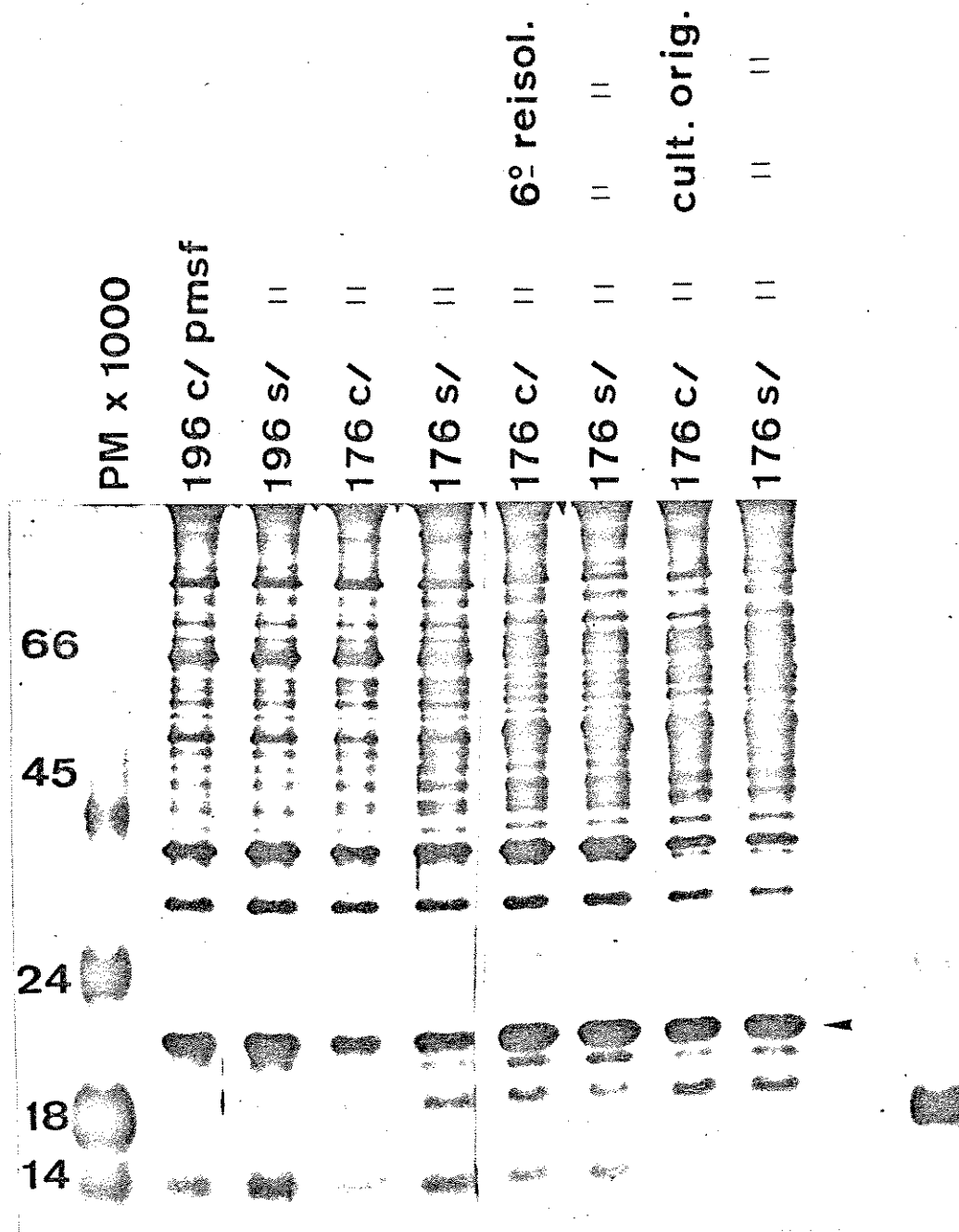


FIGURA 5. Padrões eletroforéticos de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Não se observam diferenças entre os tratamentos das amostras com e sem PMSF, tanto para o isolado Rmi 176 como para o Rmi 196. Não são observadas também diferenças nos perfis protéicos entre a cultura Rmi 176 original e a cultura Rmi 176 reisolada de cana-de-açúcar após sucessivas inoculações e reisolamentos nessa hospedeira. Nota-se a banda mais intensa de 20.000 característica desses isolados.

O agrupamento dos isolados com base nas proteínas entre 24.000 e 15.000 (Tabela 3) sugere uma relação entre os perfis protéicos de baixo peso molecular e a hospedeira de origem. Observa-se também que a maioria dos isolados que apresentam o mesmo perfil protéico são provenientes de mesma região ou localidade, por exemplo: isolados Rmi 77, Rmi 389 e Ami 206, Brasil; Ami 193 e Ami 449, Estados Unidos; Ateo 194 e Ateo 480, Japão; Rmi 395 e Rmi 573, Brasil; Rmi 176 e Rmi 196, Brasil; Rca 195 e Rca 342, Ilhas Maurício e ilhas Reunião. SANTOS & DIANESE (1985) separaram isolados de *X. campestris* pv *manihotis* e *X. campestris* pv *cassavae* provenientes de diferentes regiões analisando os perfis de proteínas de membrana, e verificaram que isolados de mesma localidade apresentavam perfis eletroforéticos semelhantes.

Pode ser observado que os isolados de milho apresentaram maior variação de padrões eletroforéticos em relação aos de cana-de-açúcar. Considerou-se que essa variação pudesse estar relacionada à grande heterogeneidade das plantas de milho.

RODRIGUES NETO (1984), verificou que padrões de reações serológicas obtidos para os isolados de cana (Rca 179, Rca 195 e Rca 342) são distintos daqueles observados para os isolados de milho, quando os testes são realizados com o antissoro produzido contra Rca 296.

Através de inoculações artificiais em plantas de milho doce verificou-se uma variação muito grande na sintomatologia causada pelos isolados provenientes de milho. Foi possível entretanto, observar uma tendência de agrupamento dos isolados Rmi 395, Rmi 389, Rmi 77, Ami 206, Ami 449, Rmi 176, Ateo 480, Rmi 193 e Rmi 261, os quais causaram sintomas mais severos como riscas por toda a folha, às vezes com podridão do ápice e retardamento do crescimento da planta.

Por outro lado, em ensaios de hospedeira utilizando-se clones de cana-de-açúcar, pode-se observar que os isolados Rca 179, Rca 195, Rca 342 e Rca 296 formam um grupo distinto pela severidade da sintomatologia observada nas plantas inoculadas. Além disso, verificou-se que o isolado Rca 296 é o mais virulento entre os isolados de cana-de-açúcar (IRENE M.G. ALMEIDA, 1989, comunicação pessoal). É possível, entretanto, que a grande variação observada na sintomatologia causada pelos diferentes isolados oriundos de milho seja devido à grande heterogeneidade genética das plantas de milho. Nota-se portanto, com base nos padrões de proteínas de baixo peso molecular, testes serológicos e ensaios de hospedeira que há, pelo menos, dois grupos de isolados distintos, os de milho e os de cana-de-açúcar, e que o isolado Rca 296 é distinto dos demais isolados de cana-de-açúcar.

A análise de agrupamentos ("Cluster analysis"), baseada nos perfis eletroforéticos de proteínas de membrana, revelou a média das porcentagens de similaridades entre os isolados. Os resultados dessa análise estão apresentados na forma de dendrogramas. Podem ser observados, no dendrograma correspondente ao gel da Figura 2 (Figura 6), três espécies de bactérias, uma vez que se considerou o valor de 60% de similaridade como média para organismos de mesma espécie (PETER J.H. JACKMAN, 1990, comunicação pessoal). Assim, os isolados Aeleu 482, Ateo 194, Rmi 573, Rmi 577 e Rmi 395 pertencem a mesma espécie; isolados Rca 179, Rca 195, Rca 342, Rmi 176 e Rmi 196 constituem uma outra espécie, notando-se contudo que o isolado Rca 179 está mais relacionado aos isolados de milho (Rmi 176 e Rmi 196) do que aos de cana (Rca 195 e Rca 342); isolados Ateo 480 e Rca 296 são de mesma espécie e formam um terceiro grupo de isolados distinto.

No dendrograma referente ao gel da figura 3 (Figura 7) verificaram-se três grupos de isolados distintos, correspondentes a espécies diferentes. Nessa análise observou-se novamente os isolados Ateo 194, Rmi 395, Rmi 573 e Rmi 577 como de mesma espécie, estando presentes no mesmo grupo os isolados Rmi 261, Ateo 480 e Rbi 178. Os isolados Ami 193 e Ami449 constituem uma outra espécie, assim como os isolados Aar 481, Rmi 77, Rmi 389 e Ami 206.

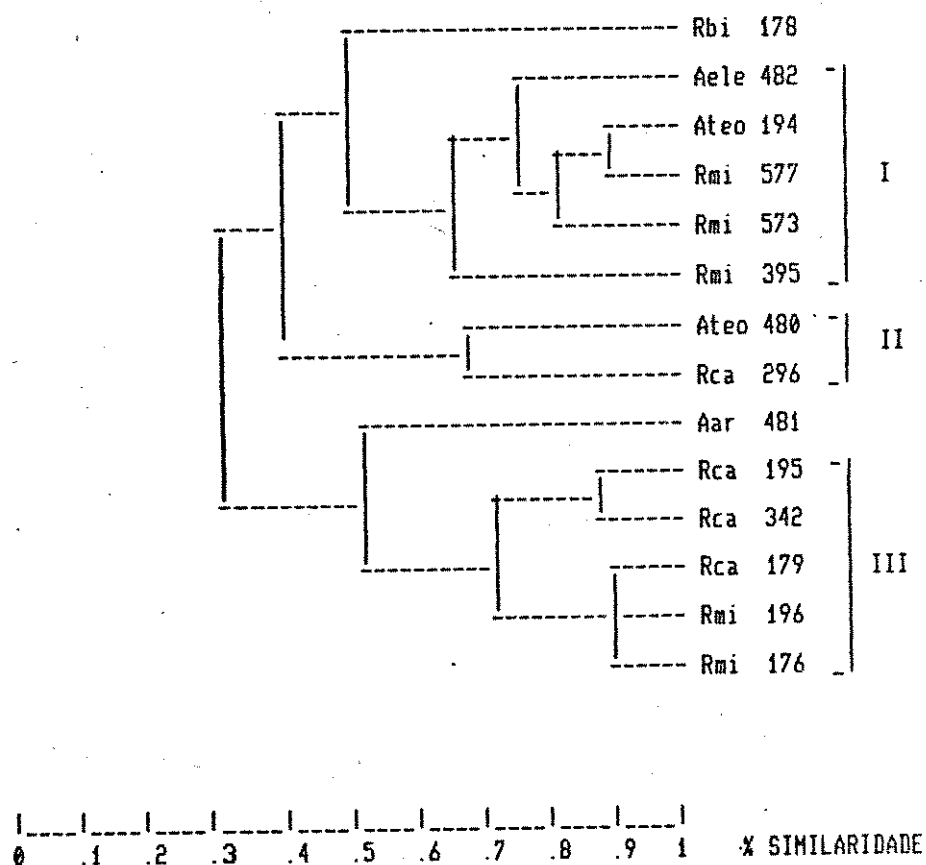


FIGURA 6. Dendrograma referente ao gel da Figura 2. Observam-se as porcentagens de similaridades entre os isolados de milho, cana-de-açúcar, arroz, teosinte, biri e *Eleusine*. Podem ser vistos três grupos de isolados distintos (I, II e III), correspondentes a espécies diferentes (porcentagens de similaridades abaixo de 60%).

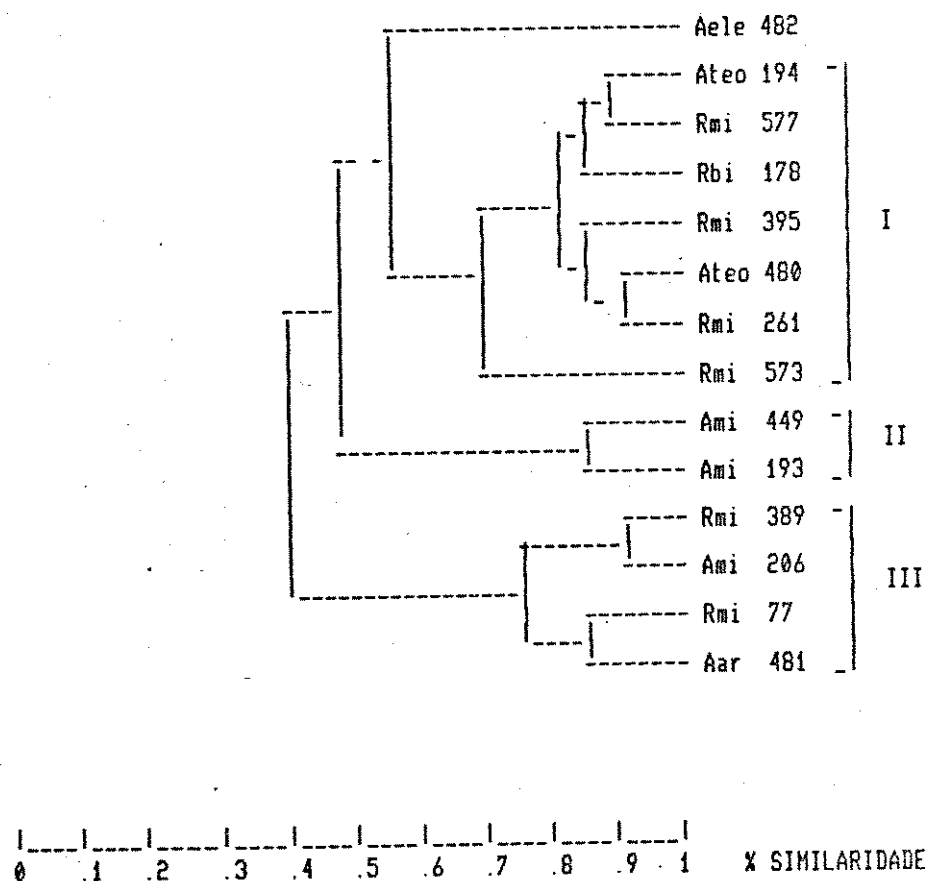


FIGURA 7. Dendrograma referente ao gel da **Figura 3.** Observam-se as porcentagens de similaridades entre os isolados de milho, cana-de-açúcar, arroz, teosinte, biri e *Eleusine*. Podem ser observados três grupos de isolados distintos (I, II e III), correspondentes a espécies diferentes (porcentagens de similaridades abaixo de 60%)

Nota-se na Figura 6 que os isolados Rbi 178 e Teo 480 estão relacionados ao grupo Ateo 194, Rmi 395, Rmi 573 e Rmi 577 com porcentagens de similaridades de 48% e 38%, respectivamente, ao passo que na Figura 7 eles estão incluídos nesse grupo com porcentagens acima de 75%. Verificou-se também que o isolado Aeleeu 482 está relacionado ao grupo Ateo 194, Rmi 395, Rmi 573 e Rmi 577 com porcentagens de similaridades de 74% (Figura 6) e 52% (Figura 7). Considerou-se que essas variações foram devidas ao fato desses isolados estarem nas extremidades do gel, onde os perfis protéicos não estão perfeitamente alinhados. Comparando-se contudo os resultados obtidos pela análise de "cluster" com aqueles da Tabela 3, verifica-se que o agrupamento de isolados baseado somente nos padrões de proteínas de baixo peso molecular corresponde ao da análise de "cluster". Isto seria um ótimo resultado se as porcentagens de similaridades entre esses grupos fossem maiores que 60%, uma vez que acreditamos estar trabalhando com isolados pertencentes a uma mesma espécie. De acordo com as porcentagens de similaridades obtidas para esses grupos, tem-se, pelo menos, quatro espécies diferentes. Há entretanto algumas razões para se acreditar que essas porcentagens estão abaixo do esperado. Sabe-se que a padronização rigorosa das condições de cultura e metodologia de preparo de amostra é essencial para se obter

reprodutibilidade de padrões eletroforéticos. JACKMAN & WHILEY (1990) consideram a reprodutibilidade de mobilidade de bandas o fator mais importante no uso de padrões de proteínas em taxonomia numérica. Nesse caso, deve-se levar em conta primeiramente os fatores que afetam a mobilidade das bandas, ou seja, fatores relacionados à separação de proteínas, no caso, condições de corrida e estrutura do gel. Outro aspecto refere-se ao preparo das amostras. Os géis que foram submetidos à análise densitométrica não apresentam requisitos básicos de um gel "ideal" para esse tipo de análise, pelo contrário: eles apresentam tamanhos diferentes, curvaturas nas corridas das extremidades, falhas e manchas de coloração, diferenças de concentração protéica entre amostras e, o mais importante, diferenças na resolução de bandas entre um gel e outro; isto provavelmente devido a diferenças na velocidade de polimerização que variou entre 3 a 10min. Alguns fatores ligados a isso, como temperatura e a deaeração dos géis, nunca foram controlados.

Com relação à metodologia de preparo de amostras, atenção deve ser dada à etapa de sonicação das bactérias. As frequências e potências aplicadas para ruptura das células podem variar entre uma preparação e outra devido as próprias características do aparelho.

Considerou-se portanto que variações no preparo de amostras e na confecção de géis poderiam explicar

porcentagens de similaridades entre isolados mais baixas do que realmente seriam.

Por outro lado, os dados obtidos pela análise de "cluster" reforçam a idéia de padrões protéicos relacionados com a hospedeira de origem. Outros resultados observados aqui também reforçam esta sugestão. Recentemente, várias culturas bacterianas foram isoladas a partir de folhas de plantas de cana-de-açúcar provenientes do interior do Estado de São Paulo, apresentando sintomas similares à Estria Vermelha (IRENE M.G. ALMEIDA & J. RODRIGUES NETO, 1989, comunicação pessoal). Proteínas de membrana foram extraídas dessas culturas e comparadas com as amostras de *P. rubrilineans* de cana-de-açúcar. Três das culturas testadas apresentaram perfis protéicos similares à de *Xanthomonas campestris*, porém, uma delas mostrou um perfil protéico semelhante aos das culturas Rca 179, Rca 195 e Rca 342 (Figura 8). Essa cultura, Rca 921, apresentou a banda de 20.000 mais intensa, característica dos isolados de cana.

THAVEECHAI & SCHAAD (1986a) encontraram correlação entre serovares de *X. campestris* pv *canpestris* e hospedeira de origem. Porém não encontraram relação entre tais serovares com sintomatologia em crucíferas, e esse é um dado interessante que será discutido adiante. Esses autores

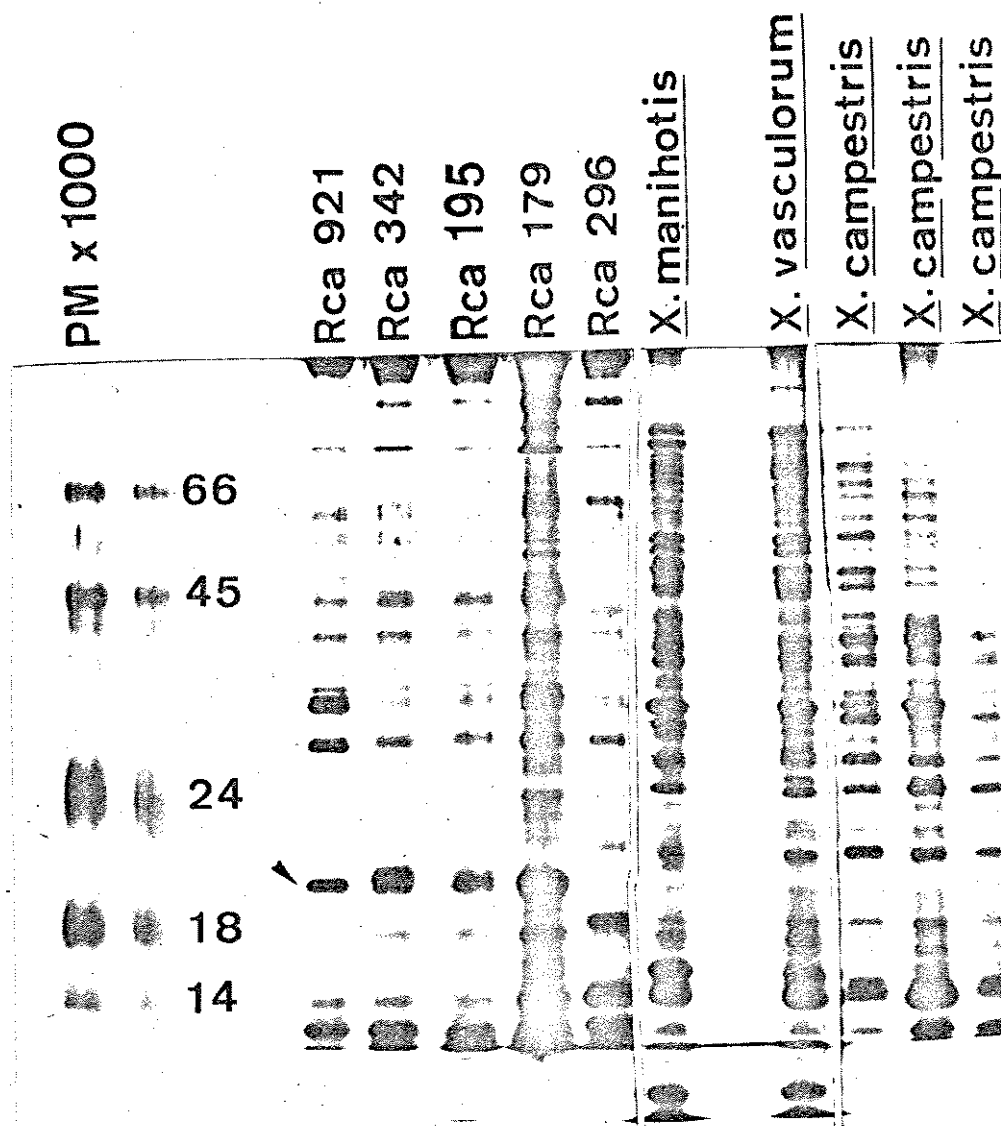


FIGURA 8. Padrões eletroforéticos de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Observa-se que a cultura 921 apresenta um perfil protéico semelhante ao dos isolados Rca 195, Rca 342, e Rca 179, mostrando a banda mais intensa de 20.000. Os demais isolados de cana-de-açúcar testados mostraram padrões protéicos característicos de *Xanthomonas campestris*.

verificaram também que as maiores diferenças entre patovares de *X. campestris* ocorrem entre proteínas de 23.000 a 34.000. Entretanto, num outro trabalho publicado no mesmo ano, THAVEECHAI & SCHAAD descreveram a existência de um imunógeno de membrana específico de *X. campestris* pv *campestris*. Esse imunógeno caracterizado mostrou ser um complexo açúcar-proteína de aproximadamente 2.000.000. Várias proteínas compõe o complexo, porém os autores consideram que somente as proteínas de alto peso molecular (100.000 e 125.000) estão associadas aos determinantes específicos de *X. campestris* pv *campestris* e que as proteínas de menor peso (44.000 e 23.400) estariam ligadas às reações serológicas inespecíficas.

Vários autores têm discutido a importância de constituintes de membrana na interação bactéria planta. GIBSON & WELLS (1988) encontraram uma toxina no meio de cultura produzida por *P. avenae* (isolado NCPPB 1011 = cultura Ami 193) que causou lesões em folhas de milho. Essa toxina foi posteriormente detectada na superfície da bactéria, sugerindo portanto ser um constituinte de membrana ou de periplasma.

Como já mencionado, THAVEECHAI & SCHAAD (1986a) não encontraram relação entre serovares de *X. campestris* pv *campestris* e sintomatologia em crucíferas. Os resultados observados aqui são semelhantes, uma vez que não se

verificou nenhuma relação entre perfis protéicos e sintomatologia em gramíneas. Entretanto, experimentos realizados no IBSBF/Campinas, mostraram que o isolado Aar 481 foi patogênico a plantas de cana-de-açúcar (var. IAC 51/205) à medida que foi reisolado e reinoculado sucessivas vezes nessa hospedeira. Verificou-se que o 6º reisolado da cultura Aar 481 em cana-de-açúcar foi mais patogênico a essa planta em relação a cultura Aar 481 original, produzindo sintomas nas folhas semelhantes àqueles produzidos por isolados de cana Rca 195, Rca 342 e Rca 296 (IRENE M.G. ALMEIDA, comunicação pessoal). Comparou-se então os perfis de proteínas do 6º reisolado da cultura Aar 481 com aqueles obtidos das culturas originais Aar 481 e Rca 296. Verificou-se que os perfis de proteínas das culturas Aar 481 e 6º reisolado em cana são diferentes (Figura 9). O cultura original Aar 481 mostrou a banda maior de 22.300, similar a dos isolados Rmi 77 e Rmi 389 (Figura 3). O 6º reisolado não apresentou essa banda. Esperava-se contudo que essa cultura apresentasse um perfil protéico semelhante ao da cultura Rca296. Entretanto, o 6º reisolado mostrou uma banda de 20.000 característica de isolados de cana. Esse resultado poderia sugerir uma relação entre padrão protéico e sintomatologia. Porém, as mudanças observadas tanto no padrão de proteínas do 6º reisolado, como também na sintomatologia causada por essa cultura em relação à cultura

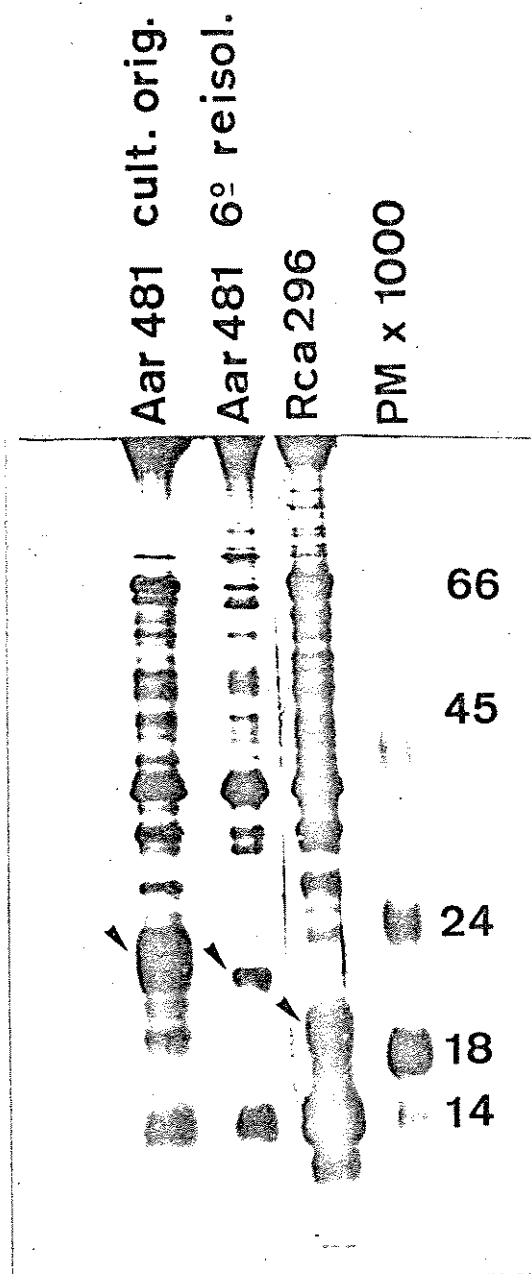


FIGURA 9. Padrões eletroforéticos de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 12%. O isolado Rca 296 apresenta a banda maior de 18.700. Os isolados Aar 481 mostram padrões protéicos diferentes: O isolado original apresenta a banda maior de 22.300 enquanto o 6º reisolado dessa cultura não mostra essa banda.

original, podem ter inúmeras razões. Deixando-se de lado possíveis artefatos, considerou-se a possibilidade de seleção de bactérias nessa hospedeira uma vez que foram feitas sucessivas inoculações a partir de bactérias reisoladas de locais da planta onde os sintomas eram agudos (IRENE M.G. ALMEIDA, 1988, dados não publicados). De forma semelhante, culturas bacterianas podem também perder sua patogenicidade quando mantidas por muito tempo em determinados meios de conservação ou após inúmeros repiques em meios de cultura. A idéia de seleção não explica contudo os resultados observados em experimentos com as culturas Rmi 176 e Rmi 261, também patogênicas à cana. Essas culturas foram igualmente inoculadas e reisoladas sucessivas vezes em plantas de cana-de-açúcar da mesma variedade. As plantas inoculadas com as culturas originais apresentaram a mesma sintomatologia daquelas inoculadas com os reisolados (IRENE M.G. ALMEIDA & J. RODRIGUES NETO, 1989, dados não publicados). Nenhuma diferença foi observada entre os padrões eletroforéticos de proteínas de membrana obtidas das culturas originais e reisolados, tanto para Rmi 176 (Figura 5) como para Rmi 261 (Figura 10).

Os resultados observados nos testes de sensibilidade a antibióticos mostraram que todas as culturas de *P. avenae* e *P. rubrilíneas* (Tabela 1) são resistentes à ampicilina em doses superiores a 350ug/ml, porém são



FIGURA 10. Padrões eletroforéticos de proteínas de membrana em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Não se observam diferenças entre as culturas Rmi 261, 1º e 6º reisolados, e a cultura Rmi 261 original. Nota-se a banda de 18.600 característica dessa cultura.

sensíveis à kanamicina (2ug/ml), tetraciclina (2ug/ml), cloranfenicol (20ug/ml) e streptomicina (20ug/ml), dados observados 24 e 48h após a inoculação dos meios. Além disso, não se observou nenhuma diferença no crescimento dos isolados nos meios contendo os diferentes antibióticos. Esse tipo de teste portanto, não poderia ser usado para a discriminação de isolados.

DANGE & PAYAKE (1973) verificaram que isolados de *P. rubrilineans* são sensíveis à terramicina (200ug/ml) e streptomicina (500ug/ml).

RANDHAWANA et al (1979) encontraram isolados de *P. rubrilineans* que são sensíveis à streptomicina em doses acima de 50ug/ml, dados observados 48h após a inoculação dos meios. Verificou-se aqui que tanto os isolados de *P. avenae* e *P. rubrilineans* foram sensíveis em doses acima de 20ug/ml dessa droga, após 24h da inoculação.

Os resultados dos testes de bacteriocinas mostram que a maioria dos isolados produtores dessas substâncias são de *P. avenae* (Ateo 480, Aar 481 e Aeleu 482) e que todas as culturas indicadoras são de *P. rubrilineans* de milho (Rmi 77, Rmi 176, Rmi 389 e Rmi 577) (Tabela 4).

TABELA 4. Culturas de *P. avenae* e *P. rubrilineans* indicadoras (I) e produtoras (P) de bacteriocinas (X indica formação de halo de inibição).

		<i>E. coli</i>							<i>P. rubrilineans</i>														
		PVI	K-12	193	194	286	449	480	481	482	77	176	178	179	195	196	261	296	342	389	395	573	577
P. a v e n a e	193																						
	194																						
	286																						
	449																						
	480											X											
	481																			X		X	
	482										X												
P. r u b r i l i n e a n s	77																						
	176																						
	178																						
	179																						
	195																						
	196																						
	261																						
	296																						
	342																						
	389											X											
	395																						
	573																						

Esse é um resultado interessante uma vez que, entre vários testes realizados para diferenciar *P. avenae* de *P. rubrilineans*, poucos deles mostram características exclusivas para uma das espécies.

WAKIMOTO *et al* (1986) verificaram que várias espécies de *Pseudomonas*, incluindo *P. avenae*, inibiram o crescimento de várias outras espécies de fitobactérias, e sugeriram que diferentes antibióticos podem estar envolvidos nessa atividade. KUNITAKI *et al* (1988) encontraram que

isolados de *P. avenae* H8201, H8203, H8205, H8206 e H8210 (código não encontrado nos catálogos de culturas de coleções internacionais) apresentam uma proteína com atividade antifúngica contra vários tipos de fungos e bactérias fitopatogênicas.

Os resultados observados aqui são contudo intrigantes, se for considerado *P. avenae* sinônimo de *P. rubrilineans*. É possível contudo que as características de produção e sensibilidade a bacteriocinas estejam ligadas à presença de plasmídios. Entretanto, algumas tentativas de extração de plasmídeos dos isolados Ateo 480, Aar 481, Aeleu 482, Rmi 77, Rmi 176, Rmi 261, Rmi 577, Rmi 389, Rca 195, Rca 342 e Rca 296 foram feitas utilizando-se a técnica de KADO & LIO (1981) porém, sem nenhum sucesso. BIRD & GIBSON (1987) não encontraram plasmídios no isolado NCPPB 1011 de *P. avenae* (Ami 193). Fica difícil portanto relacionar os resultados dos testes de bacteriocinas com os demais testes, por exemplo: o isolado Aar 481 é serologicamente relacionado ao isolado Rca 296, o qual não apresenta a característica de produção de bacteriocina naquelas condições; o isolado Rmi 196 apresenta o mesmo perfil protéico do isolado Rmi 176, mas difere na característica de indicador de bacteriocina.

CLAFLIN et al (1987), em um resumo de congresso, propuseram sinonímia entre *P. avenae* e *P. rubrilineans*, baseados em testes bioquímicos, imunoquímicos, ensaios de hospedeira e eletroforese de proteínas. Esses autores não encontraram diferenças nos perfis de proteínas celulares entre essas bactérias. Como não foi descrito no resumo que fração de proteínas havia sido analisada, supõem-se a fração de proteínas totais, uma vez que os isolados Ateo 480 e Aeieu 482 não diferiram dos isolados Rmi 176, Rmi 196, Rmi 389, Rmi 395, Rmi 573 e Rca 921 nos perfis de proteína totais obtidas com beta-mercaptoetanol e SDS, em gel de poliacrilamida-SDS 10% (Figura 11). Como também não se verificam diferenças entre os isolados de milho Ami 193, Rmi 77 e Rmi 577 dos de cana-de-açúcar Rca 179, Rca 296 e Rca 342, nas mesmas condições experimentais (Figura 12). É interessante observar porque os padrões de proteínas totais não apresentam as diferenças encontradas nos perfis de proteínas de membrana. Sabe-se contudo que a resolução de géis 10 e 12% de acrilamida são diferentes para uma mesma amostra de proteínas, entretanto, esperava-se obter padrões de proteínas totais contendo perfis de proteínas de membrana. As diferenças nos padrões de bandas de baixo peso molecular das amostras de membrana não são observadas nos perfis de proteínas totais, como também não são

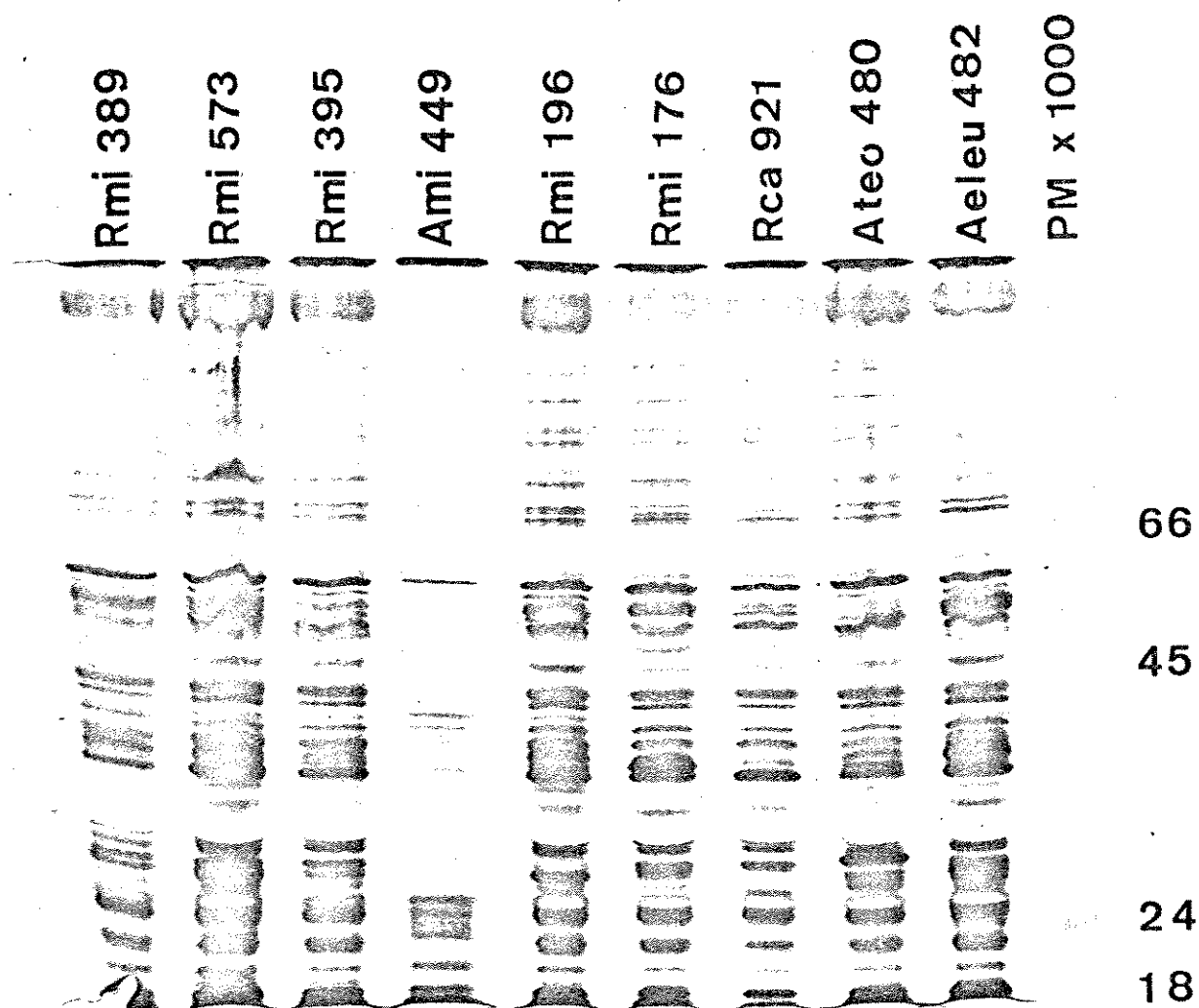


FIGURA 11. Eletroforese de proteínas totais da bactéria em gel de poliacrilamida-SDS 10%. Não se observam diferenças entre as culturas de *P. avenae* Ateo 480 e Aeleeu 482 e de *P. rubrilineans* Rmi 176, Rmi 196, Rmi 389, Rmi 395, Rmi 573 e Rca 921, obtidas com beta-mercaptoetanol-SDS.

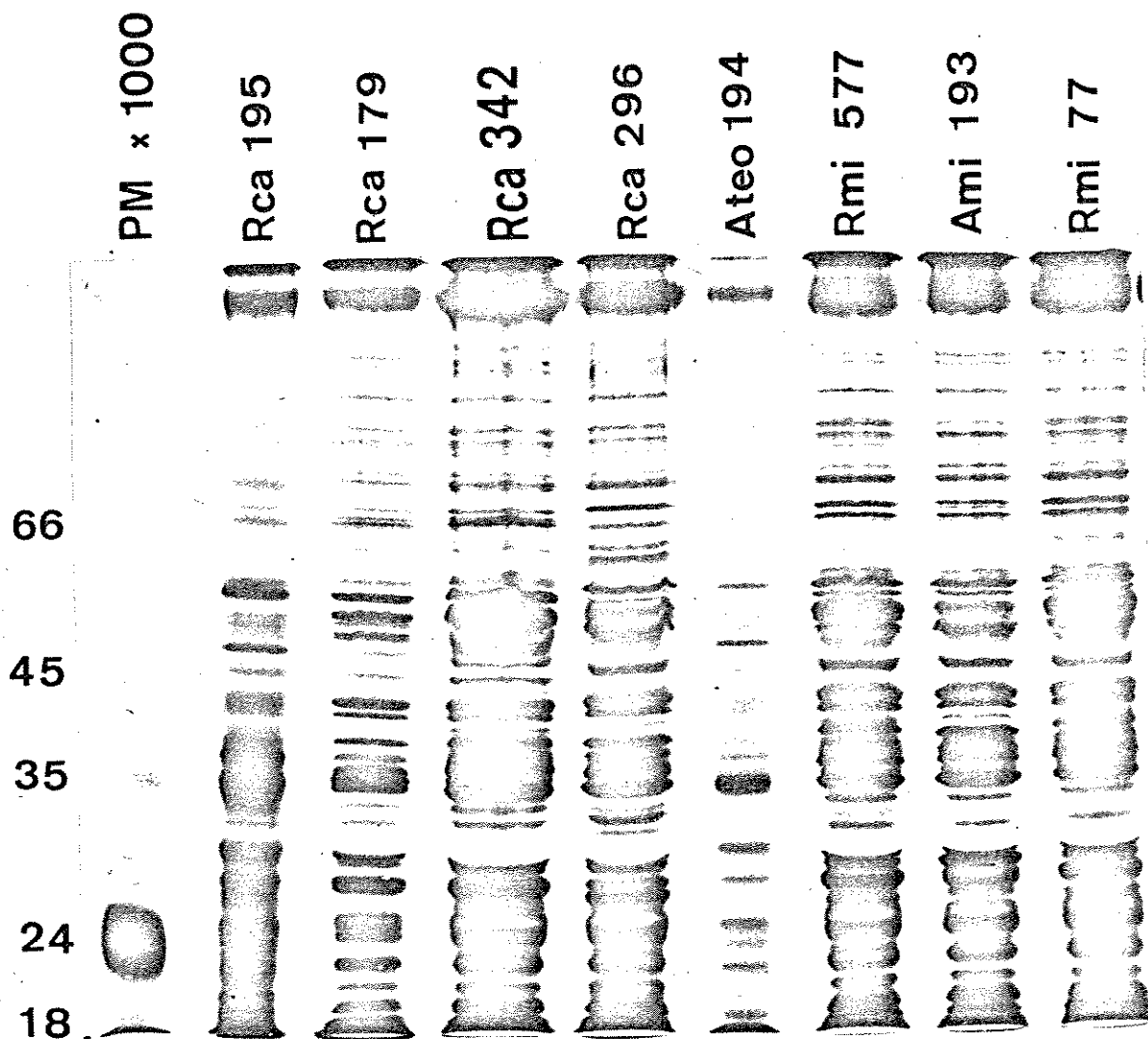


FIGURA 12. Eletroforese de proteínas totais da bactéria em gel de poliacrilamida-SDS 10%. Não se observam diferenças entre as culturas milho Ami 193, Rmi 77 e Rmi 577 das de cana-de-açúcar Rca 179, Rca 296 e Rca 342, obtidas com beta-mercaptoetanol-SDS.

encontrados os peptídeos de baixo peso molecular inferiores a 14.000, observados nas amostras de proteínas de membrana.

Outra diferença entre os dois tratamentos de preparo de amostras foi o uso de triton X-100 na solubilização de proteínas de membrana. Seria possível que triton X-100 solubilizasse diferentes proteínas em relação ao tratamento SDS-mercaptoetanol. Porém, em experimentos realizados em nosso laboratório onde foram comparadas amostras de proteínas de membrana de uma espécie de micoplasma obtidas com SDS-mercaptoetanol ou triton X-100, não se verificaram diferenças no padrão de bandas entre os dois tratamentos.

A sonicação da amostra para obtenção de membranas totais foi utilizada apenas no preparo de proteínas de membrana. Existem relatos e estudos sobre a utilização de ultrassom como catalizadores de reações químicas. É portanto possível a alteração da estrutura de proteínas quando submetidas ao tratamento com ultrassom.

Os resultados da análise de proteínas de membrana, testes de bacteriocinas, testes serológicos e ensaios de hospedeira mostram que *F. avenae* e *F. rubrilineans* são espécies relacionadas porém, indicam grupos de isolados distintos originários de milho e cana-de-açúcar. Além disso, mostram culturas como Aar 481, Aeleeu 482, Ateo 480 e Rca 296 que apresentaram características distintas, seja no perfil

de proteínas de membrana, na produção de bacteriocinas ou em ensaios de hospedeira. De acordo com esses resultados torna-se necessário ainda o emprego de outros critérios de análise para outras características taxonômicas como por exemplo, a análise de polimorfismo de fragmentos de restrição do DNA (RFLP), visando o melhor esclarecimento da posição taxonômica desse grupo de bactérias.

5. CONCLUSÕES

A análise eletroforética de proteínas totais da bactéria, como também o teste de sensibilidade a antibióticos, não permitem a diferenciação das culturas de *P. avenae* e *P. rubrilineans*.

Culturas de *P. avenae* e *P. rubrilineans* podem ser agrupadas com base nos perfis de proteínas de membrana de baixo peso molecular, entre 24.000 e 14.000.

Perfis de proteínas de membrana de culturas bacterianas oriundas de milho ou cana-de-açúcar sugerem uma relação entre proteínas de baixo peso molecular e hospedeira de origem dessas culturas.

De acordo com os resultados das eletroforeses de proteínas das frações de membrana, citosol e extrato total da bactéria, além de dados da literatura sobre testes serológicos e ensaios de hospedeira, considera-se sinonímia entre *P. avenae* e *P. rubrilineans*. Porém, os resultados do teste de bacteriocina mostram algumas culturas de *P. avenae* com características distintas de culturas de *P. rubrilineans*. Além disso, a análise de "clusters",

baseada nos perfis de proteínas de membrana, relaciona grupos de isolados oriundos de milho e cana-de-açúcar como pertencentes a espécies diferentes. Apesar das considerações feitas sobre a análise de "clusters", esses resultados deixam dúvidas quanto ao relacionamento entre as culturas de *P. avenae* e *P. rubrilineans*. Isto nos sugere o emprego de outras técnicas que permitam detectar, com maior precisão, a variabilidade existente entre essas culturas e o seu relacionamento.

Considerando-se *P. avenae* sinônimo de *P. rubrilineans*, eletroforese de proteínas de membrana poderá ser utilizada com segurança no diagnóstico e identificação das culturas oriundas de milho ou cana-de-açúcar.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, M.A., 1985. Effect of temperature and relative humidity on bacterial stripe and bacterial leaf blight of sorghum (*sorghum bicolor*). *Pak. J. Agric. Res.*, 6 (3) : 216-217.
- AKHTAR, M.A. & M. ASLAM, 1986. Resistance of sugarcane to bacterial red stripe, a new bacterial disease from Pakistan. *Trop. Pest. Manage.*, 32 (2) : 118-119.
- AKIBA, F.; A. SANGUINO & H. TOKESHI, 1976. Reação de 18 variedades de cana-de-açúcar a *Pseudomonas rubrilineans*. *Summa Phytopathol.*, 2 : 275-279.
- ALMEIDA, I.M.G.; J. RODRIGUES NETO & M.A. CARDELLI, 1988. Comportamento de variedades de cana-de-açúcar à estria vermelha causada por *Pseudomonas rubrilineans*. *Summa Phytopathol.*, 14 (3-4): 191-195.
- AMES, G.F.; E.N. SPUDICH & H. NIKAIDO, 1974. Proteins composition of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: effect of lipopolysaccharide mutations. *J. Bacteriol.*, 117 : 406-416.
- ANDERSON, A.J., 1980. Unique aspects of cell surface polysaccharide of *Pseudomonas phaseolicola* as demonstrated by bacteriophage specificity. *Can. J. Microbiol.*, 26 : 1422-1427.
- ANDERSON, A.J., 1984. Differences between lipopolysaccharide compositions of plant pathogenic and saprophytic *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48 : 31-35.
- BIRD, B. & I. GIBSON, 1987. Studies on R-bodies of *Pseudomonas avenae*. *Micron-Microsc. Acta*, 18 (3) : 187-191.
- BLUM, H.; H. BEIER & H.J. GROSS, 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8 : 93-99.
- BRADBURY, J.F., 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. C.A.B. International. Great Britain, p. 110-185.

- BRAUN, V., 1985. The unusual features of the ion transport systems of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.*, 10 : 75-78.
- BRIEGER, F.O., 1970. Studies on red stripe and eyespot in São Paulo, Brazil. *Sugarcane Pathologists Newsletter*, 5 : 31.
- CAMINHA FILHO, A., 1936. Doenças da cana-de-assucar no Brasil. In: *Anais da 1ª Reunião De Phytopathologistas Do Brasil*. p 192-196.
- CARLSON, R.R. & A.K. VIDAVER, 1982. Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32 : 315-326.
- CHAI, T.J.; V. WU & J. FOUNDS, 1982. Colicin A receptor: Role of two *Escherichia coli* outer membrane proteins (Ompf protein and Btu gene product) and lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 151 : 983-988.
- CLAFLIN, L.E. & B.A. RAMUNDO, 1987. Synonymy of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 and *Pseudomonas rubrilineans* Lee et al 1925. In: *Annual meeting of the American Phytopath. Soc., Cincinnati, august 2-6, 1987. Phytopathology*, 77 : 1766 (Abstract).
- DANGE, S.R.S. & M.M. PAYAK, 1973. The taxonomic position of the pathogen of red stripe of sugar cane. *Sugarcane Pathologists Newsletter*, 10 : 25-28.
- DANGE, S.R.S. & M.M. PAYAK, 1974. Sensitivity of *Pseudomonas rubrilineans* to antibiotics and fungicides. *Hind. Antibiot. Bull.*, 16 (2-3) : 89-92.
- DARVEAU, R.P. & R.E.W. HANCOCK, 1983. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J. Bacteriol.*, 155 : 831-838.
- deWEGER, L.A.; R. van BOXTEL; B. van der BURG; R.A. GRUTERS, F.P. GEELS; B. SCHIPPERS & B. LUGTENBERG, 1986. Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.*, 165 (2) : 585-594.

- deWEGER, L.A.; B. JANN; K. JANN & B. LUGTENBERG, 1987. Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* spp that stimulate plant growth: composition and use for strain identification. *J. Bacteriol.*, 169 (4) : 1441-1446.
- deWEGER, L.A.; C.I.M. van der VLUGT; A.H.M. WIJFJES; P.A.H. M. BAKKER; B. SCHIPPERS & B. LUGTENBERG, 1987. Flagela of a plant growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strains are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.*, 169 (6) : 2769-2773.
- deWEGER, L.A.; J.C.M. van ARENDONK; K. RECOURT; G.A.J.M. van der HOFSTAD; P.J. WEISBEEK & B. LUGTENBERG, 1988. Siderophore-mediated uptake of Fe³⁺ by the plant growth-stimulating *Pseudomonas putida* strain Wcs358 and by other rhizosphere microorganisms. *J. Bacteriol.*, 170 (10) : 4693-4698.
- DIANESE, J.C. & N.W. SCHAAD, 1982. Isolation and characterization of inner and outer membranes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology*, 72 : 1284-1289.
- DIANESE, J.C., 1986. Proteínas celulares na caracterização das bactérias fitopatogênicas. *Fitopatol. Bras.*, 11 (1) : 55-65.
- DIMASI, D.R.; J.C. WHITE; C.A. SCHNAITMAN & C. BRADBEER, 1973. Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*: Common receptor sites for vitamin B12 and E colicins on the outer membrane of the cell envelope. *J. Bacteriol.*, 115: 506-513.
- FERNANDES, E.R., 1979. Metodologia para testes de resistência varietal de cana-de-açúcar à *Pseudomonas rubrilineans* (Lee et al) Stapp em casa-de-vegetação. Piracicaba, ESALQ. 32p (Dissertação, Mestrado).
- GIBSON, I.; G. WILLIS; B. WELLS & G. BEDINGFIELD, 1987. Comparative studies on the R-bodies of certain bacteria. *Micron Microsc. Acta*, 18 : 291-296.
- GIBSON, I. & B. WELLS, 1988. The localization of the toxins produced by R-body containing bacteria. *Micron Microsc. Acta*, 19 (3) : 175-178.
- GOTO, K. & K. DHATA, 1961. Bacterial stripe of rice. *Coll. Agric. Natl. Taiwan Univ.*, special publication, nº 10 : 49-56.

- GOTO, M. & M.P. STARR, 1971. A comparative study of *Pseudomonas andropogonis*, *P. stizolobii* and *P. alboprecipitans*. *Ann. Phytopath. Soc. JPN.*, 37 : 233-241.
- GREINER-MAI, E.; F. KORN-WENDISCH & H.J. KUTZNER, 1988. Taxonomic revision of the genus *Saccharomonospora* and description of *Saccharomonospora glauca* sp. nov.. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 38 (4) : 398-405.
- GRILLO, H.V.S., 1938. On the red stripe of sugarcane in Brazil. In: Congress of the International Society of Sugar cane Technologists - Pathology Section, pg 427-430.
- HALE, C.N. & J.P. WILKIE, 1972. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. *N. Z. J. Agric. Res.*, 15 : 448-456.
- HAMES, B.D. & D. RICKWOOD, 1982. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. IRL Press Limited, England
- HANCOCK, R.E.W. & H. NIKAIDO, 1978. Outer membrane of gram-negative bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PA01 and use in reconstruction and definition of the permeability barrier. *J. Bacteriol.*, 136 : 381-390.
- HANCOCK, R.E.W. & A.M. CAREY, 1979. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat and 2beta-mercaptoethanol modifiable proteins. *J. Bacteriol.*, 140 : 902-910.
- HANCOCK, R.E.W.; R.T. IRVIN; J.W. COSTERTON & A.M. CAREY, 1981. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane: peptidoglycan-associated proteins. *J. Bacteriol.*, 145 : 628-631.
- HARTREE, E.F., 1972. Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48 : 422-427.
- HAYWARD, A.C., 1962. Studies on bacterial pathogens of sugarcane. II. Differentiation, taxonomy, and nomenclature of the bacteria causing red stripe and mottled stripe diseases. *Mauritius Sugar Ind. Res. Inst., Occas. Pap.*, 13 : 13-27.
- HITCHCOCK, P.J. & T.M. BROWN, 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained gels. *J. Bacteriol.*, 154 : 269-277.

- JACKMAN, P.J.H. & R.A. WHILEY, 1990. Microbial Systematics, Identification and Fingerprinting Based on Electrophoretic Analysis of Proteins. In: *Workshop of Microbial Systematics, Campinas 2-6 april, 1990*. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello".
- JOHNSON, A.G.; A.L. ROBERT & L. CASH, 1949. Bacterial leaf blight and stalk rot of corn. *J. Agric. Res.*, 78 (12) : 719-732.
- JUANG, R.H.; Y.D. CHANG; H.Y. SUNG & J.C. SU, 1984. Oven-drying method for polyacrylamide gel slab placked in cellophane sandwich. *Anal. Biochem.*, 141 : 348-350.
- KADO, C.I. & S.T. LIU, 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145 (3) : 1365-1373.
- KERSTERS, K. & J. DELEY, 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic proteins patterns. *J. Gen. Microbiol.*, 87 : 333-342.
- KIRALY, Z., Z. KLEMENT, F. SOLYMOSY & J. VOROS, 1974. Methods in Plant Pathology. Budapest, Elsevier Scientific Publishing. Co., 509p.
- KRAUS, J.H.; J. WECKESSER & H. MAYER, 1988. Electrophoresis analysis of lipopolysaccharides of purple nonsulfur bacteria. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 38 (2) : 157-163.
- KROPINSKI, A.M.; L.C. CHAN & F.H. MILAZO, 1978. The extraction and analysis of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO and three rough mutants. *Can. J. Microbiol.*, 25 : 390-398.
- KUNITAKE, S.; N. MATSUYAMA & S. WAKIMOTO, 1988. Production of proteinous Anti-fungal substance(s) by *Pseudomonas avenae* Manns. *Ann. Phytopath. Soc. JPN*, 54 : 640-642.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685.
- LEE, H.A. & W.C. JENNINGS, 1924. Bacterial red stripe disease of Tip canes. *Exp. Sta. Hawaiian Sugar Planters Assoc.*, circular no 42 : 1-4.

- LEE, H.A.; H.A. PURDY; C.C. BARNUM & J.P. MARTIN, 1925. A comparison of red stripe disease with bacterial diseases of sugarcane and other grasses. Red stripe disease studies. *Exper. Sta. H.S.P.A. Path. Dept.*, 64-74.
- LEVINE, M., 1954. An introduction to laboratory technique in bacteriology. New York, MacMillan Co., p. 68-69.
- LUGTENBERG, B., J. MEIJERS; R. PETER; P. van der HOEK & L. van ALPHEN, 1975. Electrophoretic resolution of the major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K12 into four bands. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, 58 : 254-258.
- LUGTENBERG, B. & L. van ALPHEN, 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochem. Biophys. Acta*, 737 : 51-115.
- LYON, H.L., 1922. A leaf disease of the tip canes. *Proc. Hawaiian Sugar Planters' Association*, 246.
- MANNS, T.F., 1909. The blade blight of oats. A bacterial disease. *Agric. Exp. Sta. Res. Bull.*, 210 : 91-167.
- MARTIN, J.P. & C.A. WISMER, 1961. Red stripe. In: MARTIN, J.P.; E.V. ABBOTT & C.C. HUGHES, eds. *Sugarcane diseases of the world*. Amsterdam, Elsevier Publishing Company. V.1, p. 109-126.
- MATSUDA, I. & Z. SATO, 1983. Bending symptoms of young rice seedlings grown in nursery flat caused by *Pseudomonas avenae*, the causal agent of the bacterial stripe of rice. III. Mode of infection. *Bull. Nat. Inst. of Agric. Sci., JPN.*, 38 : 161-168.
- MINSAVAGE, G.V. & N.W. SCHAAD, 1983. Characterization of membrane protein of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology*, 73 : 747-755.
- MIZUNO, T. & M. KAGEYAMA, 1978. Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.*, 84: 179-191.
- NIKAIDO, H. & M. VAARA, 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, 49 : 1-32.
- OSADA K. S.; L.F. ZAK & A.J. GALINDO, 1978. Estudio de la "raya roja" de la caña de azúcar. *Agrocienc.*, 34 : 17-29.

- OSBORN, M.J.; J.E. GANDER; E. PARIS & J. CARSON, 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*: isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chemistry*, 247 : 3962-3972.
- OSBORN, M.J. & H.P.C. WU, 1980. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 34 : 369-422.
- OVERBEEKE, N. & B. LUGTENBERG, 1980. Major outer membrane proteins of *Escherichia coli* strain of human origin. *J. Gen. Microbiol.*, 121 : 373-380.
- PALVA, E.T. & P.H. MAKELA, 1980. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Salmonella typhimurium* analysed by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur. J. Biochem.*, 107 : 137-143.
- RAMOS, S.; S. SCHUNDINER & H.R. KABACK, 1976. The electrophoretic gradient of protons and its relationship to active transport in *Escherichia coli* in membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73 : 1892-1896.
- RANDHAWA, P.S.; B.S., THIND & N. SINGH, 1979. *In vitro* evaluation of chemicals against *Erwinia chrysanthemi* corn pathotype and *Pseudomonas rubrilineans*. *Indian Phytopathol.*, 32 : 547-550.
- ROBBS, C.F., 1980. O crestamento bacteriano da *Canna indica* causada por uma estirpe de *Pseudomonas rubrilineans*. *Fitopatol. Bras.*, 5 (3) : 453-454. (Resumo).
- ROBBS, C.F.; J. RODRIGUES NETO; R.L.D. RIBEIRO & O. KIMURA, 1981. Annotated list of bacterial plant pathogens in Brazil. In: Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 5, Cali, Proceedings. Cali, CIAT, Colombia, p. 601-613.
- RODRIGUES NETO, J., 1984. Estudos serológicos em *Pseudomonas* spp não fluorescentes e patogênicas a gramíneas. Piracicaba, ESALQ. 64p. (Dissertação, Mestrado).
- 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.

- SANGUINO, A. & P.C.T. CARVALHO, 1971. Testes de resistência de variedades de cana-de-açúcar à mancha ocular [*Helminthosporium sacchari* (van Breda de Haan) Butler], estria vermelha (*Xanthomonas rubrilineans* (Lee et al) Starr et Burkh.), e podridão abacaxi [*Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes) Moreau]. *Rev. Soc. Bras. Fitop.*, 4 : 124-126.
- SANTOS, R.M.D.B. dos & J.C. DIANESE, 1985. Comparative membrane characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *cassavae* e *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Phytopathology*, 75 (5) : 581- 587.
- SATO, Z; Y. KAWAKUBO; A. SHIRATA; I. MATSUDA; Y. TSUCHIYA & H. DATE, 1983. Bending symptoms of young rice seedlings grown in nursery flat caused by *Pseudomonas avenae*, the causal agent of the bacterial stripe of rice. I. Symptoms, inoculation methods, factors affecting symptom appearance and varietal differences. *Bull. Inst. Agric. Sci., JPN.*, 38 : 149-159.
- SCHAAD, N.W.; C.I. KADO & D.R. SUMNER, 1975. Synonymy of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 and *Pseudomonas alboprecipitans* Rosen 1922. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 25 : 133-137.
- SCHAAD, N.W.; D.R. SUMNER & G.O. WARE, 1980. Influence of temperature and light on severity of bacterial blight of corn, oats, and wheat. *Plant Dis.*, 64 (5) : 481-483.
- SCHNAITMAN, C.A., 1970a. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 104 : 890-901.
- SCHNAITMAN, C.A., 1970b. Comparison of the envelope protein compositions of several gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 104 : 1404-1405.
- SCHNAITMAN, C.A., 1971a. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by triton X-100. *J. Bacteriol.*, 108 : 545-552.
- SCHNAITMAN, C.A., 1971b. Effect of ethylenediaminetetracetic acid, triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell wall of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 108 : 553-563.

- SEITER, J.A. & J.M. JAY, 1980. Application of polyacrylamide gel electrophoresis to the characterization and identification of *Arthrobacter* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 30 : 460-465.
- SHAKYA, D.D., F. VINTHER & S.B. MATHUR, 1985. World wide distribution of a bacterial stripe pathogen of rice identified as *Pseudomonas avenae*. *Phytopath. Z.*, 114 : 256-259.
- SHAKYA, D.D., H.S. CHUNG & F. VINTHER, 1986. Transmission of *Pseudomonas avenae*, the cause of bacterial stripe of rice. *J. Phytopathol.*, 116 : 92-96.
- STAPP, C., 1928. In: *Soravars Handb. Pflanzenk.*, 2 (5): 35, Berlin
- STARR, M.P. & W.H. BURKHOLDER, 1942. Lipolytic activity of phytopathogenic bacteria determined by means of spirit blue agar and its taxonomic significance. *Phytopathology*, 32 : 598-604.
- SVASTI, J. & B. PANIJPAN, 1977. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis, a simple explanation of why it works. *J. Chem. Educ.*, 54 (9) : 560-562.
- SUMNER, D.R. & N.W. SCHAAD, 1977. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of corn. *Phytopathology*, 67 : 1113-1118.
- TAKIKAWA, Y., Y. ANDO, E. HAMAYA, S. TSUYUMI & M. GOTO, 1988. Identification of the pathogen responsible for bacteriosis of the Tea plant occurred in 1985. *Ann. Phytopathol. Soc. JPN.*, 54 (2) : 224-228.
- THAVEECHAI, N. & N.W. SCHAAD, 1986a. Serological and electrophoretical analysis of a membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from Thailand. *Phytopathology*, 76 (2) : 139-147.
- THAVEECHAI, N. & N.W. SCHAAD, 1986b. Immunochemical characterization of a subspecies-specific antigenic determinant of a membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathology*, 76 (2) : 148-153.
- THIND, B.S., P.S. RANDHAWA & R.S. SONI, 1984. Chemical control of bacterial stalk rot (*Erwinia chrysanthemi* pv. *zea*) and leaf stripe (*Pseudomonas rubrilineans*) of maize. *Z. Pflanzenkr Pflanzenschutz*, 91 (4) : 424-430.

- THURN, K.K. & A.K. CHATTERJEE, 1981. Isolation and protein composition of the outer membrane of *Erwinia amylovora*. *Curr. Microbiol.*, 7 : 87-92.
- TOKESHI, H., 1980. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F. Coord. *Manual de Fitopatologia*, 2a ed., S. Paulo, Ed. Agronômica Ceres, v.2., p. 141-206.
- TOMINAGA, T., 1968. Brown stripe of bromegrasses and wheatgrasses caused by *Pseudomonas setariae* (Okabe) Savulescu. *Jap. J. Bacteriol.*, 23 : 176-183.
- TOMINAGA, T., 1971. Studies on the diseases of forage crops in Japan. II. Etiological studies on the bacterial diseases of forage crops in Japan. *Bull. Nat. Inst. Agric. Sci. JPN.*, 25 : 205-306.
- TOMINAGA, T., K. KIMURA & N. GOH, 1983. Bacterial brown stripe of rice in nursery box, caused by *Pseudomonas avenae*. *Ann. Phytopath. Soc. JPN.*, 49 (4) : 463-466.
- TSUCHIYA, Y., H. DATE, A. SHIRATA, I. MATSUDA & Z. SATO, 1983. Bending symptoms of young rice seedlings grown in nursery flat caused by *Pseudomonas avenae*, the causal agent of the bacterial stripe of rice. II. Identification of the causal bacteria. *Bull. Natl. Inst. Agric. Scien. JPN.*, 38 : 161-168.
- VESMINSH, G.E., A. CHINEA & M. CASTRO, 1982. Los hospederos del organismo causal de la raya roja bacteriana de la cana de azúcar. *Asoc. Tec. Azucar Cuba, la Habana*, 41 (6) : 32-37.
- WAKIMOTO, S., K. HIRAYAYAE, Y. TSUCHIYA, Y. KUSHIMA & N. FURUYA, 1986. Production of antibiotics by plant pathogenic pseudomonads. *Ann. Phytop. Soc. JPN.*, 52 (5) : 835-842.
- WELLS, B. & R.W. HORNE, 1983. The ultrastructure of *Pseudomonas avenae*. II. Intracellular refractile (R-body) structure. *Micron Microsc. Acta*, 14 : 329-344.
- WHATLEY, M.H., J.S. BODWIN, B. LIPPINCATT & J.A. LIPPINCATT, 1976. Role for *Agrobacterium* cell envelope lipopolysaccharide in infection site attachment. *Infect. Immunol.*, 13 : 1080-1083.

ZAMGE, S.E.; A.R.W. SMITH & R.C. HIGNETT, 1985. Composition of lipopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* of differing host specificity and virulence. *J. Gen. Microbiol.*, 131 : 1941-1950.