

ELIZABETH BIAGIONI PRESTES

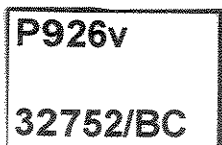


VARIABILIDADE BIOQUÍMICA, SOROLÓGICA E ELETROFORÉTICA
ENTRE ISOLADOS DE *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

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

CAMPINAS, SP

1997



ELIZABETH BIAGIONI PRESTES

VARIABILIDADE BIOQUÍMICA, SOROLÓGICA E ELETROFORÉTICA
ENTRE ISOLADOS DE *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

Este exemplar corresponde à resolução 11 da tese de Elizabeth Biagioni Prestes aprovada pela Comissão Julgadora.	04/12/97 <i>[Signature]</i>
--	--------------------------------

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

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano.

Co-orientador: Dr. Valdemar Atilio Malavolta Júnior.

CAMPINAS, SP

1997

7803445

CHAMADA:	
17/11/2000	
17/11/2000	
Ex.	
WBO BC/	32152
DC.	395/98
C	☐
D	☒
EÇO	R\$ 11,00
TA	27/10/98
CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Prestes, Elizabeth Biagioni

Variabilidade bioquímica, sorológica e eletroforética entre
isolados de *P.syringae* pv.*lachrymans* / Elizabeth Biagioni
Prestes. -- Campinas,SP:[s.n.],
1997.

56f. illus.

Orientador: Tomomasa Yano

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Bioquímica. 2. Sorologia. 3. Eletroforese. I. Yano,
Tomomasa. II. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de
Biologia. III. Título.

M-00105161-B

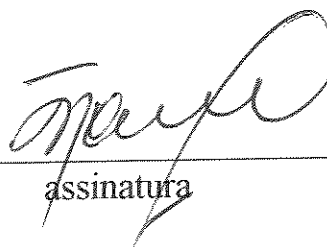
P925v

Campinas, 04 de dezembro de 1997

BANCA EXAMINADORA:

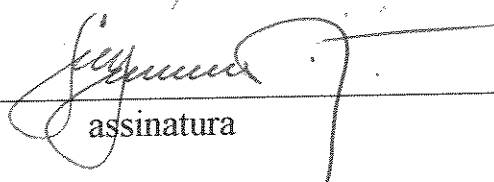
TITULARES:

Prof. Dr. Tomomasa Yano (orientador)



assinatura

Prof. Dr. Mauro Hideo Sugimori



assinatura

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza Tanaka



assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

assinatura

Aos meus avós (in memoriam),
MINHA HOMENAGEM.

Aos meus pais e irmão, com infinito amor,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, que acreditou em mim e me deu todo o apoio, estímulo e orientação necessários para a realização deste trabalho.

Ao Pesquisador Científico Dr. Valdemar Atilio Malavolta Junior, do Instituto Biológico, que tornou possível a realização deste trabalho, me acolhendo com suas orientações e apoio.

Aos pesquisadores científicos Mestres: Júlio Rodrigues Neto, Luís Otávio Saggion Beriam e Irene Maria Gatti de Almeida, do Instituto Biológico, pelo constante apoio, orientação e sugestões na realização deste trabalho.

Aos demais funcionários do Instituto Biológico que me ajudaram.

À Prof^a Dra. Lucila Costallat Ricci, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia, pelo firme apoio e sincera consideração, o que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), que possibilitou a minha participação no Curso de Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior -CAPES- pela concessão de Bolsa de Estudos durante o Curso de Pós-Graduação.

À Srta. Norma, funcionária da Biblioteca do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP, pela sincera amizade, carinho e apoio inestimáveis.

Ao meu irmão, meu eterno companheiro de todas as horas, pela total dedicação, apoio, paciência e carinho, que me deram força para a realização deste trabalho.

À minha mãe, pelo incessante apoio, carinho, compreensão e equilíbrio emocional, fundamentais para a continuidade deste estudo e pela valiosa colaboração durante a redação e revisão do presente trabalho.

Ao meu pai, pelos conselhos, incentivo e imprescindível apoio, que me confortaram e fortaleceram nas horas mais difíceis.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

ÍNDICE

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Diferenciação de espécies fitopatogênicas de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	4
2.2. O emprego do termo patovar.....	6
2.3. Aspectos gerais sobre <i>P. s. pv. lachrymans</i>	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Local dos experimentos.....	14
3.2. Meios de cultura e concentração de inóculo.....	14
3.3. Isolados bacterianos.....	14
3.4. Métodos de inoculação.....	15
3.5. Caracterização e confirmação de isolados a nível específico e infrasubespecífico.....	15
3.6. Sorologia.....	19
3.6.1. Obtenção do antígeno imunizante.....	19
3.6.2. Obtenção dos antissoros.....	20
3.6.3. Preparo dos antígenos para as reações sorológicas.....	20

3.6.4. Testes de dupla difusão em ágar.....	21
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (PAGE/SDS).....	21
3.7.1. Preparo das amostras.....	21
3.7.2. Preparo de gel de poliacrilamida.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Caracterização e confirmação de isolados a nível específico.....	23
4.2. Caracterização e confirmação de isolados a nível infrasubespecífico através de testes bioquímicos.....	25
4.3. Caracterização e confirmação de isolados a nível infrasubespecífico através de testes eletroforéticos e sorológicos.....	30
5. CONCLUSÕES.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
7. APÊNDICE.....	42
7.1. Meios de cultura utilizados.....	42
7.2. Tampões e géis utilizados.....	45
7.3. Coloração por prata.....	47

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1. Participação das hortaliças na Produção Agrícola do Brasil.....	1
TABELA 2. Número de acesso , identificação , ano e procedência dos isolados de <i>Pseudomonas syringae</i> utilizados.....	16
TABELA 3. Caracterização dos isolados a nível específico.....	24
TABELA 4. Caracterização dos isolados a nível infrasubespecífico.....	26
TABELA 5. Resultados dos testes sorológicos.....	34
FIGURA 1. Perfil eletroforético de proteínas totais de patovares de <i>Pseudomonas syringae</i> patogênicas ao pepino em gel de Poliacrilamida - SDS 10% corado com prata.....	31
FIGURA 2. Perfil eletroforético de proteínas totais de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> e de <i>Pseudomonas syringae</i> de patovares não determinados em gel de Poliacrilamida - SDS 10% corado com prata..	32

RESUMO

Este estudo objetivou a caracterização ou a confirmação do patovar de diversos isolados bacterianos patogênicos ao pepino, incorporados à Coleção de Culturas da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico (IBSBF) e caracterizados como *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *P. s.* pv. *syringae*, *P. s.* pv. *tabaci*, ou, então, apenas a nível genérico. Essa caracterização foi feita por testes bioquímicos, culturais, sorológicos e eletroforéticos.

Os resultados mostraram que apenas a utilização de testes bioquímicos e culturais podem ser insuficientes para a caracterização de patovares de bactérias patogênicas ao pepino, devido à variabilidade natural ocorrida entre os diferentes isolados.

O emprego de reações sorológicas de dupla difusão em ágar com antígeno autoclavado e a eletroforese de proteínas totais em gel de poliacrilamida PAGE/SDS não permitiram, também, a diferenciação a nível de patovar entre os isolados empregados neste estudo.

Os dados obtidos revelaram, ainda, que alguns isolados bacterianos possuem características que não permitem enquadrá-los em nenhum dos patovares de *Pseudomonas syringae* patogênicos ao pepino.

Os resultados mostraram também que o isolado 1258, que é a estirpe tipo do patovar *lachrymans*, possui características que diferem da descrição desse patovar, mostrando a necessidade de se redefinir uma outra estirpe como neopatotipo de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

ABSTRACT

The objective of this study was the characterization or the confirmation of the pathovar of several bacterial isolates from cucumber that were incorporated in the Coleção de Culturas da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico (IBSBF) and characterized as *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *P. s.* pv. *syringae*, *P. s.* pv. *tabaci* or simply as *Pseudomonas* sp. This characterization was made by biochemical, cultural, serological and electrophoretical tests.

The results showed that only biochemical and cultural tests can be insufficient for the characterization of the pathovars of cucumber pathogenic bacteria because of its natural variability.

The utilization of serological tests with agar double diffusion with heat-treated cells and the electrophoresis by PAGE/SDS with total proteins were not sufficient for the differentiation among the isolates tested in this study.

It was observed that some isolates have distinct characteristics of the pathovars of *Pseudomonas syringae* pathogenic to cucumber.

It was also possible to verify that the isolate 1258, the representative strain for the pathovar *lachrymans*, has different characteristics from the description of this pathovar, confirming the necessity of a redefinition of another strain as neopathotype for *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

1 - INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura de olerícolas, que inclui espécies de hortaliças, é considerada a segunda maior produção nacional em termos de valores, ocupando hoje uma área aproximada de 600 mil hectares (ha), produzindo 10 milhões de toneladas (t), num valor estimado em US\$ 2 bilhões. Como mostra a TABELA 1, a produção de hortaliças ocupa a quinta posição no “ranking” de produção agrícola nacional (MAKISHIMA, 1996), quando comparada com outras culturas de grande importância no país (cana-de-açúcar, milho, arroz, laranja, soja, mandioca, café, feijão, trigo).

TABELA 1. Participação das hortaliças na Produção Agrícola do Brasil*

Espécie	Área Colhida 1000 ha	Produção Obtida 1000 t	Valor da Produção Cr\$ 1.000.000
Cana	4210	260.887	1.471.693
Hortaliças	643 (10 ^o **)	9.828 (5 ^o)	1.040.785 (2 ^o)
Milho	13.063	23.624	1.001.780
Arroz	4.121	9.488	800.505
Laranja	893	2.556	713.883
Soja	9.616	14.937	728.082
Mandioca	1.944	25.537	707.792
Café	2.763	3.040	686.286
Feijão	5.433	2.744	441.758
Trigo	2.049	2.916	184.383

(*) Adaptado de MAKISHIMA, 1996.

(**) Posição em relação aos outros produtos

Especialmente nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, a produção de hortaliças constitui atividade importante para atender a grande procura desses produtos “*in natura*” e para a industrialização (CAMARGO, 1992). Entre as espécies de hortaliças, verifica-se que a cultura de pepino vem se expandindo a cada ano. Em 1991, a produção total no Estado de São Paulo foi de 39.602 t, em 1995, de 51.249 t, ocupando uma área de 1.325 ha e, em 1996, a produção aumentou para 61.650 t, em uma área de 1.594 ha, segundo dados obtidos no Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo (I.E.A.), sendo que o preço médio do pepino no Estado de São Paulo (CEAGESP), no ano de 1995, foi de R\$260,00/t. [CAMARGO F.º, W. P. **Comunicação informal**. 1996. (Av. Miguel Stéfano, 3900 - Água Funda, CEP 04301-903 São Paulo, SP Fax: 011- 2764062), Instituto de Economia Agrícola].

A produção de pepino é prejudicada por várias doenças, causadas por diferentes patógenos, que afetam a sua cultura, no Brasil. Das doenças, a mais importante e frequente é a bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith & Bryan) Young, Dye & Wilkie 1978, causando a mancha angular, embora a mancha bacteriana do pepino, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*; a podridão bacteriana, causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; o fogo selvagem, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e a murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, também ocorram em nosso país (MARQUES, ROBBS, BOITEUX et al., 1994). Os danos causados por *P. s.* pv. *lachrymans* são mais acentuados nas culturas de pepino, embora a bactéria possa infectar outras cucurbitáceas. Esses prejuízos ocorrem principalmente quando há ocorrência de chuvas prolongadas e temperaturas elevadas, podendo destruir completamente a cultura (GALLI, TOKESHI, CARVALHO et al., 1968;

PINTO, CRUZ FILHO, 1985). Muitos frutos desenvolvem-se deformados, reduzindo significativamente a safra desta cultura (DESSERT, BAKER, FOBES, 1982).

Nos últimos anos tem se observado a ocorrência de plantas de pepino com infecção bacteriana, caracterizadas por lesões angulares nas folhas. Alguns isolamentos, realizados a partir de materiais com essa sintomatologia, entretanto, resultaram em bactérias com características bioquímicas e culturais diferentes daquelas descritas para *P. s. pv. lachrymans*.

Em vista da importância econômica que a cultura do pepino representa para o Estado de São Paulo e em virtude dos prejuízos que os patógenos bacterianos vêm ocasionando, objetivou-se identificar e/ou confirmar a classificação desses isolados, mantidos na Coleção de Culturas da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico (IBSBF) e provenientes de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.), de fumo (*Nicotiana tabacum*) e de “lilac” (*Syringa vulgaris*), através de testes bioquímicos, culturais, de patogenicidade, sorológicos e eletroforéticos.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diferenciação de espécies fitopatogênicas de *Pseudomonas* fluorescentes

As bactérias fitopatogênicas do gênero *Pseudomonas* apresentam as seguintes características: são quimiorganotróficas com metabolismo respiratório, nunca fermentativo. O oxigênio é o aceptor de elétrons, mas algumas espécies podem desnitrificar usando o nitrato como um aceptor alternativo e respirar anaerobicamente. Catalase positiva, sendo a maioria oxidase positiva, mas alguns importantes patógenos de plantas são oxidase negativos. Não produzem xanthomonadina. A maioria não cresce em condições de pH 4,5 (BRADBURY, 1986; HOLT, KRIEG, SNEATH, 1994).

As *Pseudomonas* fitopatogênicas podem ser separadas em dois grandes grupos: aquelas que não produzem pigmento fluorescente em meio de cultura apropriado e as que produzem.

Atualmente, existem 19 espécies de *Pseudomonas* fitopatogênicas, onde 11 são fluorescentes. A *P. syringae*, que é fluorescente, abrange 51 patovares diferentes (YOUNG, SADDLER, TAKIKAWA et al., 1996).

As reações sorológicas, em adição a métodos de estudos morfológicos e bioquímicos, também são importantes para a identificação e classificação dos membros do gênero *Pseudomonas* (FRIEDMAN, 1953).

Dentre os testes sorológicos utilizados para se caracterizar a diferenciação entre cepas do mesmo organismo, o teste de dupla difusão em gel de ágar (DDA), desenvolvido por OUCHTERLONY (1958), tem sido considerado bastante eficiente (SCHAAD, 1979).

LELLIOTT, BILLING, HAYWARD (1966) propuseram o emprego de alguns testes para diferenciação das *Pseudomonas* fitopatogênicas fluorescentes, a nível específico. Dentre eles, os mais importantes são a produção de levan, o teste da oxidase, o teste de podridão da batata, a presença de arginina-dihidrolase e o teste da hipersensibilidade em folha de fumo (que formam os testes LOPAT). O levan ou polifrutose é uma substância encontrada na cápsula bacteriana, que é produzida pela enzima levan-sacarase. Esta enzima é sintetizada pela maioria das *Pseudomonas* fluorescentes que usam a sacarose como fonte de carbono, sendo o resultado positivo caracterizado por colônias que assumem a forma abobadada (FAHY, HAYWARD, 1983). No teste de oxidase, verifica-se a presença do citocromo C (oxidase positiva) na cadeia respiratória (LELLIOTT, STEAD, 1987); no teste da podridão mole em batata, é detectada a presença de enzimas que degradam substâncias pécticas da lamela média e parede celular, causando, assim, a podridão mole em batata, que é caracterizada pela decomposição do tecido inoculado (KLEMENT, 1990). A enzima arginina dihidrolase permite que certas *Pseudomonas* cresçam em condições anaeróbicas, utilizando a degradação da arginina para gerar ATP, envolvendo, assim, mudanças no pH do meio, sendo considerados positivos os isolados que ocasionam mudança na cor do meio de amarelo para róseo-avermelhado e, negativos, aqueles cuja cor não se altera (THORNLEY, 1960). As bactérias fitopatogênicas do gênero *Pseudomonas* geralmente induzem uma resposta de hipersensibilidade, quando inoculadas em tecido de planta não-hospedeira. Esse teste serve para diferenciar as bactérias patogênicas daquelas não patogênicas, sem a necessidade de inoculação em hospedeiro homólogo, e com resposta rápida. A reação de hipersensibilidade positiva é caracterizada por um rápido colapso e anasarca do tecido

inoculado em 24-48 horas, seguido de uma necrose seca e amarronzada do tecido anasarcado em até três dias (LELLIOTT, STEAD, 1987).

2.2. O emprego do termo patovar

Com a adoção, a partir de 1980, do termo patovar para a separação de bactérias a nível infrasubspecífico, a antiga espécie *P. lachrymans* foi reclassificada como um patovar de *P. syringae*.

O termo patovar é definido como a diferenciação de isolados, a nível infrasubspecífico, baseado na patogenicidade a uma ou mais de uma planta hospedeira (LAPAGE, SNEATH, LESSEL et al., 1975; YOUNG, DYE, BRADBURY et al., 1978; SNEATH, 1992). Patovar, portanto, é um taxon abaixo de subespécie, distinto de outros, pertencentes à mesma espécie ou subespécie, principalmente por características de patogenicidade, tanto na faixa de hospedeiros, como pela sintomatologia apresentada (BRADBURY, 1982).

Esta classificação em patovar não exclui reconhecimento de diferenças bioquímicas, sorológicas ou outras características além da patogenicidade, mas essas diferenças têm menor significância em comparação com a patogenicidade (DYE, BRADBURY, GOTO et al., 1980; YOUNG, BRADBURY, DAVIS et al., 1991), senão seriam suficientes para elevação do microrganismo à subespécie ou mesmo espécie (BRADBURY, 1982). A estirpe bacteriana sobre a qual foi baseada a criação do patovar é referida como patotipo ou estirpe tipo (DYE, BRADBURY, GOTO et al., 1980; YOUNG, DYE, BRADBURY et al., 1978; YOUNG, BRADBURY, DAVIS et al., 1991).

O termo patovar e o seu correto emprego tem implicações na prescrição de quarentena de plantas, bem como em introduções de materiais vegetais, estando associado à determinação da virulência do patógeno, à designação do patotipo e ao relacionamento com outras características infrasubespecíficas (ERCOLANI, 1987).

2.3. Aspectos gerais sobre *P. s. pv. lachrymans*

A mancha angular é conhecida nos Estados Unidos (E.U.A.), em cultura de pepino, desde o princípio do século (BURGUER, 1913), tendo sido o agente etiológico descrito por SMITH & BRYAN (1915). Posteriormente, esse patógeno passou por várias reclassificações, sendo atualmente designado como *P. s. pv. lachrymans* (Smith & Bryan) Young, Dye e Wilkie, 1978.

A primeira descrição da mancha angular, no Brasil, foi em 1962, em uma plantação de pepino em Piracicaba, Estado de São Paulo (TOKESHI, GALLI, 1962).

Geograficamente, a *P. s. pv. lachrymans* distribui-se pelos continentes africano, asiático, europeu e americano (BRADBURY, 1986). É um bacilo Gram negativo, com 0,8 x 1-2 μ , não formador de esporo, aeróbico, móvel com 1 a 5 flagelos polares e capsulada, que faz parte de um importante grupo das *Pseudomonas* fitopatogênicas.

Em meio nutriente ágar (NA), essa bactéria apresenta as seguintes características: colônias circulares, lisas, pouco elevadas, transparentes, brancas, brilhantes, com margens inteiras. Em NA, contendo 5% de sacarose, as colônias se tornam mucóides, brancas, abobadadas, indicando a formação de levan. É negativa quanto à reação de oxidase e quanto à atividade pectolítica em batata. Ácido é produzido de glicose, frutose, manose, galactose e arabinose, mas não o é de maltose, glicerol ou de salicina. Ácidos

málico e succínico são utilizados, mas não o láctico. O crescimento ocorre em meios contendo 3% de NaCl, mas não em 4%. A temperatura ótima de crescimento é de 25 a 27° C, sendo o máximo 35° C e o mínimo 1° C. Possui sensibilidade à estreptomicina e tetraciclina (BRADBURY, 1967; LELLIOTT, BILLING, HAYWARD, 1966).

Para a diferenciação a nível de patovar, segundo HILDEBRAND, SCHROTH, SANDS (1988), são realizados os testes quanto à utilização de betaína, adonitol, inositol, eritritol, L-tartarato, homoserine e D-tartarato. Segundo BRADBURY (1986), a bactéria objeto deste estudo utiliza como fonte de carbono para seu crescimento o eritritol, mesoinositol, D-sorbitol, L(+)tartarato, e não usa betaína, DL-homoserine, DL-lactato nem D(-) tartarato. SCORTICHINI, ROSSI (1995), entretanto, relataram que podem ocorrer diferenças bioquímicas entre isolados de *P. s. pv. lachrymans*, pois após diversos subcultivos em meio de cultura, tais isolados apresentaram características diferentes, quando comparados com os resultados obtidos antes desses repiques, uma vez que a célula bacteriana se adapta constantemente ao meio ambiente.

Esse patógeno ataca principalmente as folhas, ramos, pecíolos e frutos. Os sintomas podem variar, de acordo com a espécie e a variedade da cucurbitácea afetada. Nas folhas, manifesta-se através do aparecimento de pequenas áreas de tecido anasarcado, limitadas pelas nervuras, quando então adquirem a forma angular típica e tomam a cor bronze-amarronzada. Evoluindo os sintomas, o tecido necrosado torna-se de coloração cinza, e pode haver coalescência de várias manchas, produzindo então necrose de extensas áreas no limbo foliar (GALLI, TOKESHI, CARVALHO et al., 1968). Com o avanço da doença, a região com lesões foliares se desidrata e pode cair. Lesões no fruto frequentemente resultam em manchas e fendas, podendo liberar um exsudato bacteriano

de cor âmbar (DESSERT, BAKER, FOBES, 1982), como também nas hastes e pecíolos, observando-se manchas com a presença de exsudato bacteriano. Desenvolve-se a podridão no fruto se a bactéria penetrar profundamente (BRADBURY, 1967). Em trabalho realizado por POHRONEZNY, LARSEN, LEBEN (1978), verificou-se que as manchas na superfície dos frutos são resultantes de expansão lateral das lesões, causada pelo patógeno, após invasão sistêmica do fruto.

O principal veículo de disseminação do patógeno é constituído pelas sementes contaminadas, com os cotilédones se infectando durante a germinação. Em plantas e mudas, a penetração pode ocorrer através dos estômatos, hidatódios ou por ferimentos. Nos frutos, ela alcança a semente, instalando-se no tecido placentário e no funículo (BRADBURY, 1967). A penetração nas flores e a invasão sistêmica do fruto por *P. s. pv. lachrymans*, constituem possíveis mecanismos pelos quais a bactéria alcança e contamina a semente do pepino (POHRONEZNY, LARSEN, EMMATTY, 1977).

Além do pepino, segundo BRADBURY (1986), essa bactéria pode infectar, em condições naturais, diversas outras cucurbitáceas de importância econômica, destacando-se a abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), a melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), o melão (*Cucumis anquira* L., *C. melo* L., *C. melo* L. var. *inodorus*) e a abóbora (*Cucurbita maxima* Duchesne, *C. pepo* var. *meloepo* (L.) Alef., *C. pepo* L. var. *condensa*). Através de inoculações artificiais, de acordo com MULLIN, SCHENCK (1963), a bactéria pode infectar também outras plantas como tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e beterraba (*Beta vulgaris* L.).

Existem poucos dados, em literatura, descrevendo os prejuízos econômicos que *P. s. pv. lachrymans* ocasiona.

Na década de 60, a mancha angular foi a principal doença em cultura de pepino em Wisconsin, E.U.A. (WALKER, CHAND, WADE, 1963). Em 1963, causou considerável desfolha em diversos campos comerciais de cultura de melancia, no sul da Flórida, E.U.A., acarretando danos econômicos (HOPKINS, SCHENCK, 1972). Em melão, foi relatada em 1977 na Georgia (E.U.A.) e no ano seguinte, essa doença foi responsável pela destruição da maior parte dessa cultura (SOWELL JR., 1981). Em Israel, esta doença foi observada pela primeira vez durante o ano de 1963 (VOLCANI, 1964) e, posteriormente, tem sido detectada em cultivo de pepino em plasticultura, prática cultural que proporciona condições de umidade e de temperatura favoráveis para a infecção (KRITZMAN, ZUTRA, 1983).

A capacidade de sobrevivência de *P. s. pv. lachrymans* no solo, restos de plantas e na rizosfera de plantas não-hospedeiras, foi também estudada, tendo-se verificado que o patógeno é um pobre sobrevivente no solo sem irrigação. Entretanto, pode persistir por mais de noventa semanas em solo úmido, em restos de culturas infectadas (KRITZMAN, ZUTRA, 1983). A bactéria foi encontrada viável em folhas secas, após dois anos e meio (BRADBURY, 1967).

No campo, a disseminação se dá principalmente pela água das chuvas (TOKESHI, GALLI, 1962) ou água de irrigação e, provavelmente, por insetos vetores (JARVIS, NUTTALL, 1979). No manuseio da cultura também pode-se propagar a doença de uma planta a outra (BRADBURY, 1967; KRITZMAN, ZUTRA, 1983).

Como controle da doença, recomenda-se o uso de cultivares resistentes, rotação de cultura (não se cultivando cucurbitáceas na área por um período mínimo de dois anos) e sementes livres do patógeno. Em casa de vegetação, deve-se também controlar a umidade e a irrigação, para evitar a umidade excessiva nas folhas. Outras precauções que podem ser úteis, particularmente se a doença já estiver presente, são o controle de possíveis insetos vetores e o manuseio da cultura somente quando as plantas já estiverem secas (BRADBURY, 1967). O tratamento de sementes para a erradicação de bactérias fitopatogênicas geralmente não é completamente eficaz. Tratamentos com sais de cloro e antibiótico(s) podem ser utilizados para eliminar as bactérias da superfície das sementes, mas não são eficientes para erradicar as que estão no seu interior. Poucas sementes contaminadas podem se constituir em fonte de inóculo, provocando a contaminação do campo em pouco tempo, em condições ambientais favoráveis (LEBEN, 1983).

Uma diagnose correta é o primeiro passo para o estabelecimento de medidas racionais de controle. Além da caracterização através de testes bioquímicos, culturais e fisiológicos, podem ser também empregados testes sorológicos e eletroforéticos.

A técnica sorológica para identificação e classificação de *Pseudomonas* fitopatogênicas tem sido amplamente utilizada. Em estudos realizados por LUCAS, GROGAN (1969b), onde foram empregados 300 isolados de *P. s. pv. lachrymans*, as mesmas foram divididas nos sorotipos I, II e III. Em outros estudos, LUCAS, GROGAN (1969a) verificaram que os antígenos testados eram relativamente termo-estáveis e específicos desse patógeno, uma vez que, sob alta temperatura em água destilada esterilizada, houve a formação de um outro componente sororeativo, e o antígeno comum

foi eliminado. Além disso, a hidrólise parcial dos antígenos, por calor a 100° C por 10 minutos em ácido acético 0,1 N, causou quebra similar à produzida pela autoclave.

LUCAS, GROGAN (1969a) verificaram também que os antígenos de *P. syringae* pv. *lachrymans* isolados eram compostos de lipídios, peptídios e polissacarídeos, com propriedades similares às dos antígenos “O” de outras bactérias Gram-negativas, onde a porção polissacarídica é composta por diferentes monossacarídeos. Os antígenos específicos testados em seus estudos demonstraram ser similares aos antígenos “O” quanto às propriedades físicas, químicas e sorológicas.

O estudo das proteínas constitui uma fonte de informação de enorme potencial para a caracterização, classificação e identificação de microrganismos. A eletroforese de proteínas é uma técnica muito sensível, que fornece informações válidas quanto à similaridade ou diferença de cepas a nível específico, subespecífico e infrasubespecífico. A eletroforese com gel de poliacrilamida de proteínas solúveis de células bacterianas inteiras, em condições adequadas, permite a visualização de bandas que são características e únicas para cada cepa analisada (KERSTERS, 1990).

LUCAS, GROGAN (1969b), em seus estudos, buscaram avaliar as características de patogenicidade e sorológicas pertinentes a *P. s.* pv. *lachrymans*, separando-a em sorotipos diferentes; HOPKINS, SCHENK (1972) e GALLI, TOKESHI, CARVALHO et al. (1968) avaliaram as características de patogenicidade, bioquímicas e fisiológicas das *P. s.* pv. *lachrymans*; SCORTICHINI, ROSSI (1995) verificaram a adaptação da *P. s.* pv. *lachrymans*, dentre outras bactérias, no meio de cultura e sua influência na utilização de alguns carboidratos. Na literatura, porém, não foi encontrado um estudo que avaliasse *P. s.* pv. *lachrymans* nos aspectos bioquímicos, fisiológicos, culturais, eletroforéticos,

sorológicos e de patogenicidade como neste estudo, onde foi realizada uma análise abrangente dos isolados pressupostamente de *P. s. pv. lachrymans*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios e casa de vegetação da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico, localizados em Campinas, SP, sendo que a casa de vegetação não dispunha de controle de umidade e de temperatura.

3.2. Meios de cultura e concentração de inóculo

Empregou-se, para isolamento, manutenção e obtenção de populações bacterianas, o meio de cultura B de King (BK) (KING, WARD, RANEY, 1954) ou nutriente ágar (NA) (LEVINE, 1954).

A partir de colônias desenvolvidas em meio BK por 72 h a 27° C, foram preparadas suspensões bacterianas com água destilada esterilizada, com 65% de transmitância (T) e empregadas nos testes de confirmação de patogenicidade. A transmitância foi medida em aparelho de espectrofotômetro B295II Micronal (Engro), com comprimento de onda de 520 nanômetros.

3.3. Isolados bacterianos

Foram empregados 13 isolados bacterianos, provenientes de plantas de pepino apresentando sintomas de mancha angular, 7 deles caracterizados como *P. s. pv. lachrymans*. Os restantes, identificados apenas a nível genérico, mas apresentando algumas características (bioquímicas e culturais) não similares à *P. s. pv. lachrymans*. Além desses, foram empregados quatro isolados de *P. s. pv. tabaci*, sendo dois deles provenientes de pepino, o terceiro, de fumo e o quarto, originário de feijão. Foram também utilizados dois isolados de *P. s. pv. syringae*, sendo um deles obtido de “lilac” (lilás) e o outro, de tomate. Esses isolados, que estavam preservados por liofilização,

foram obtidos junto à Coleção de Culturas da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico (IBSBF), encontrando-se relacionados na TABELA 2, na qual se encontram as informações relativas ao número de acesso, classificação, ano de obtenção, origem e número de acesso a outras coleções, conforme RODRIGUES NETO (1995).

3.4. Métodos de inoculação

Foi empregado o método de inoculação por pulverização em folhas, sem pressão, até o ponto de escorrimento. As plantas ficaram sob condições de câmara úmida 24 horas antes da inoculação, permanecendo assim até 48 horas após inoculadas.

Para as inoculações, as plantas utilizadas foram semeadas em vasos plásticos de capacidade de 350 ml, contendo mistura de três partes de solo argiloso, uma parte de areia média e uma parte de esterco bovino curtido. As plantas utilizadas foram pepino verde comprido, da Agroflora Comercial.

As inoculações foram realizadas 50 dias após a semeadura.

3.5. Caracterização e confirmação de isolados a nível específico e infrasubespecífico

Além de testes de patogenicidade, foram realizados testes culturais, bioquímicos e fisiológicos com os isolados já relacionados na TABELA 2. Todos esses isolados eram provenientes de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.), excetuando-se os de número 375 (isolado de *Lycopersicon esculentum*), 451 (isolado de *Syringa vulgaris*), 761 (isolado de *Phaseolus vulgaris*) e o de número 765 (isolado de *Nicotiana tabacum*). Esses isolados foram plaqueados em meio BK e incubados por 72 horas a 27° C. A partir desses isolados, foram realizados cultivos, separadamente, nos diferentes meios de cultura e inoculações nas folhas de pepinos. As avaliações para os testes bioquímicos foram realizadas por um período de até 21 dias.

TABELA 2. Número de acesso, identificação, ano e procedência dos isolados de *Pseudomonas syringae* utilizados

nº acesso IBSBF*	Identificação	Ano	Procedência	Hospedeiro	nº acesso NCPB**
375	<i>P.s.pv.syringae</i>	1952	Iugoslávia	<i>L.esculentum</i>	878
451***	<i>P.s.pv.syringae</i>	1950	Inglaterra	<i>S. vulgaris</i>	281
600	<i>P.s.pv.lachrymans</i>	1986	Registro - SP	<i>C. sativus</i>	—
736	<i>P.s.pv.lachrymans</i>	1988	Anápolis - GO	<i>C. sativus</i>	—
757	<i>P.s.pv.tabaci</i>	NR	Jaguariúna - SP	<i>C. sativus</i>	—
758	<i>P.s.pv.tabaci</i>	NR	Jaguariúna - SP	<i>C. sativus</i>	—
761	<i>P.s.pv.tabaci</i>	1973	Brasil	<i>P. vulgaris</i>	2617
765***	<i>P.s.pv.tabaci</i>	NR	NR	<i>N. tabacum</i>	—
784	<i>P.s.pv.lachrymans</i>	1990	Jaguariúna - SP	<i>C. sativus</i>	—
961	<i>Pseudomonas</i> sp.	1992	Taguai - SP	<i>C. sativus</i>	—
1014	<i>Pseudomonas</i> sp.	1993	Indaiatuba - SP	<i>C. sativus</i>	—
1016	<i>Pseudomonas</i> sp.	1993	Indaiatuba - SP	<i>C. sativus</i>	—
1063	<i>Pseudomonas</i> sp.	1994	Indaiatuba - SP	<i>C. sativus</i>	—
1064	<i>Pseudomonas</i> sp.	1994	Indaiatuba - SP	<i>C. sativus</i>	—
1065	<i>Pseudomonas</i> sp.	1994	Indaiatuba - SP	<i>C. sativus</i>	—
1253	<i>P.s.pv.lachrymans</i>	1996	Sumaré - SP	<i>C. sativus</i>	—
1256	<i>P.s.pv.lachrymans</i>	NR	Inglaterra	<i>C. sativus</i>	3544
1258***	<i>P.s.pv.lachrymans</i>	1935	E.U.A.	<i>C. sativus</i>	537
1259	<i>P.s.pv.lachrymans</i>	1958	Hungria	<i>C. sativus</i>	1425

NR = não relacionado.

* Coleção de Culturas do Instituto Biológico, Seção de Bacteriologia Fitopatológica.

** National Collection of Plant Pathogenic Bacteria.

*** Estirpe tipo.

Como características culturais foram avaliados o tipo de crescimento, a forma, a coloração e a fluorescência das colônias em placas de Petri contendo meio BK. As incubações foram feitas a 27° C por 48-72 horas.

Levan: culturas de *Pseudomonas* foram semeadas em nutriente ágar, suplementado com 5% de sacarose e incubadas a 27° C (LELLIOTT, BILLING, HAYWARD, 1966), para se observar a produção ou não de levan, sendo considerado o resultado positivo quando as colônias assumiram a forma abobadada.

Teste da oxidase: foi empregado o método de Kovacs (KOVACS, 1956), que consistiu na embebição de tiras de papel de filtro Whatman nº 1 em solução aquosa de N, N dimetil - p - fenilenodiamina diidrocloreto a 1%. Espalhou-se, com o auxílio de alça de platina, o crescimento bacteriano com 48 horas sobre a região umedecida, sendo o resultado considerado positivo quando da ocorrência da cor púrpura sobre o papel de filtro, num intervalo de 5 a 10 segundos.

Podridão em batata: tubérculos de batata foram lavados em água e sabão; em seguida, expostos superficialmente ao álcool 70% e flambados. Os tubérculos foram descascados, seccionados na forma de discos e colocados em placas de Petri previamente esterilizadas (LELLIOTT, BILLING, HAYWARD, 1966). Esses discos de batata foram inoculados por picada, com culturas de *Pseudomonas* com 48 horas, crescidas em meio BK sólido, e colocadas para incubação a 27°C. Os resultados foram observados após 24 horas, verificando-se a ocorrência ou não de podridão mole, sendo o resultado considerado positivo quando houve decomposição do tecido inoculado.

Teste de arginina dihidrolase: culturas de 48 horas de idade foram transferidas, com fio de platina, para meio semi-sólido de Thornley, contido em tubos de ensaio. Para

cada isolado, foram utilizados dois tubos, sendo um deles coberto com óleo mineral esterilizado, a fim de propiciar condições de anaerobiose (THORNLEY, 1960). As avaliações foram realizadas num período de até dez dias, sendo considerado resultado positivo a mudança de cor do meio para róseo-avermelhado, tanto no tubo não coberto com óleo mineral, bem como no coberto.

Hipersensibilidade em folha de fumo: foram efetuadas inoculações por infiltração de suspensões bacterianas com concentrações de aproximadamente 10^8 UFC/ ml, em folhas de fumo (KLEMENT, FARKAS, LOVREKOVICH, 1964). Considerou-se o resultado positivo, quando da ocorrência de um rápido colapso e anasarca do tecido inoculado.

A verificação da utilização de carboidratos pelos diferentes isolados testados neste estudo foi efetuada empregando-se o teste da produção de ácidos a partir de carboidratos, onde se utilizou o meio básico de Ayers (AYERS, RUPP, JOHNSON, 1919), acrescentando-se assepticamente, os açúcares: adonitol, D(-)arabinose, celobiose, D-salicina, eritritol, glicerol, inulina, maltose, mesoinositol, D(-)sorbitol e trehalose, na concentração final de 0,5% . Estes testes são normalmente empregados para diferenciação de isolados de *P. syringae* a nível infrasubespecífico. A utilização do açúcar resulta na acidificação do meio, com a mudança do indicador para a cor amarela.

Da mesma maneira, o teste quanto à utilização de ácidos orgânicos e aminoácidos, também utilizou o meio básico de Ayers, acrescentando-se, na concentração final de 0,2% , os seguintes ácidos orgânicos, na forma de sais sódicos e aminoácidos: benzoato, D(-)tartarato, DL-lactato, gluconato, L(+) tartarato, malonato, succinato; betaína, DL-homoserine, L-glutamina, L-lisina, L-ornitina e L-valina. Neste teste, a utilização dos

compostos resulta na alcalinização do meio, sendo o resultado positivo visualizado quando o indicador muda para a cor azul.

A hidrólise da gelatina foi avaliada seguindo metodologia de LELLIOTT, STEAD (1987), onde o resultado foi considerado positivo quando o meio permaneceu líquido, mesmo após resfriado, indicando atividade enzimática.

Os testes realizados neste estudo foram escolhidos por estarem citados como diferenciais dos patovares relacionados por BRADBURY (1967, 1986), YOUNG, TRIGGS (1994) e HILDEBRAND, SCHROTH, SANDS (1988).

3.6. Sorologia

3.6.1. Obtenção do antígeno imunizante

Para a obtenção de antígenos foram utilizados, separadamente, os isolados 961 e 1258. A escolha desses isolados foi devido ao fato de o isolado 1258 ser a estirpe tipo de *P. s. pv. lachrymans*, e o isolado 961 não ter se enquadrado, em testes bioquímicos preliminares, como *P. s. pv. lachrymans*. Seguindo metodologia de DE BOER, SCHAAD (1990) com modificações, os isolados foram cultivados em meio BK e, após 72 horas, coletou-se uma alçada do crescimento bacteriano, que foi homogeneizado e lavado por três vezes com solução salina (NaCl a 0,85%) por centrifugação (14.000 g/ 3 min), ressuspensando-se o sedimento, até uma concentração próxima à 10^9 UFC/ml. Foram coletados 0,4 ml dessas suspensões e emulsionados com igual volume (0,4 ml) de adjuvante de Freund completo, constituindo-se no antígeno para a imunização.

3.6.2. Obtenção dos antissoros

Os antissoros (AS) foram obtidos de coelhos da raça Nova Zelândia, com peso aproximado de 2,5 Kg. Anteriormente à primeira imunização, foi realizada uma sangria para se obter o soro normal .

Os coelhos foram imunizados através de injeções de antígenos (conforme item 3.6.1), nas duas aplicações iniciais, via linfonódulo (OLIVEIRA, 1975). Posteriormente, foram realizadas quatro imunizações por via endovenosa na quantidade de 0,4 ml de suspensão 10^9 UFC/ml, mas sem o uso de adjuvante. Essas imunizações foram efetuadas em intervalos de quinze dias.

Os antissoros foram obtidos por sangrias na veia marginal da orelha, sendo o sangue coletado deixado à temperatura ambiente por uma hora para a separação do coágulo. O soro foi obtido pela centrifugação a 15.000 g por 3 min. e, após, acondicionado em tubos plásticos e mantidos a -20° C.

Foram também utilizados, para fins de comparação, antissoros dos isolados 375 (*P. s. pv. syringae*) e 761 (*P. s. pv. tabaci*), obtidos junto à soroteca da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico.

3.6.3. Preparo dos antígenos para as reações sorológicas

Os antígenos autoclavados dos 17 isolados empregados neste estudo foram preparados seguindo a técnica descrita por DE BOER, SCHAAD (1990), com modificações. As culturas bacterianas foram lavadas com tampão salina fosfatado (PBS) 0,01 M pH 7,2 e autoclavadas a 121° C por 20 minutos.

3.6.4. Testes de dupla difusão em ágar

O teste de dupla difusão em ágar (OUCHTERLONY, 1958) foi realizado em ágar a 1% em tampão fosfato 0,01M pH 7,2 e distribuído em alíquotas de 3 ml sobre lâminas de microscopia. Os antissoros e antígenos foram distribuídos nos orifícios feitos em lâmina, com o aparelho furágar (LEITE, OLIVEIRA, 1975) e as lâminas foram mantidas em câmara úmida até a observação dos resultados, com avaliação iniciada após 24 horas da realização dos testes, até se completarem 96 horas.

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

3.7.1. Preparo das amostras

Baseado na metodologia de JACKMAN (1985) com modificações, foi coletada uma alçada do crescimento bacteriano em BK (27°C/72 h), e após a pesagem, fez-se uma diluição com tampão de amostra, seguindo-se a proporção: 1 mg peso bacteriano / 7,5 µl tampão de amostra (APÊNDICE 7.2). A mistura homogeneizada foi fervida por 5 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 14.000 g por 6 minutos. Descartou-se o precipitado e o líquido sobrenadante foi armazenado a -20° C, até a ocasião dos testes.

3.7.2. Preparo de gel de poliacrilamida

As eletroforeses foram realizadas seguindo-se metodologia descrita por KERSTERS (1990), empregando-se o sistema descontínuo e denaturante. Foram utilizadas placas verticais, com gel na concentração de 10% (APÊNDICE 7.2). Após a polimerização, as amostras foram colocadas no gel, juntamente com um padrão de peso molecular SIGMA MW-SDS-70 (proteínas com 14, 18, 24, 34, 45 e 66 KDa) ou com o padrão de peso molecular BRL Protein Ladder (proteínas com 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 KDa). As corridas foram feitas a 140 V, por um período

aproximado de 150 min. Terminadas as corridas, os géis foram fixados numa solução de etanol a 50% e ácido acético a 12% e posteriormente corados pelo método da prata (BLUM, BEIER, GROSS, 1987), conforme consta no APÊNDICE 7.3.

Nas eletroforeses realizadas, foram utilizados os isolados já identificados como *P. s. pv. lachrymans*, os isolados de *Pseudomonas* não identificados, bem como isolados de *P.s. pv. syringae* e *P.s. pv. tabaci*, para fins de comparação.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização e confirmação de isolados a nível específico

Todos os isolados provenientes de pepino apresentaram patogenicidade ao hospedeiro homólogo, provocando sintomas típicos da mancha angular, similares àqueles descritos por TOKESHI, GALLI (1962) e por BRADBURY (1967, 1986), inicialmente como pequenas áreas de tecido anasarcado limitado pelas nervuras, e, evoluindo, adquirindo a forma angular. Essas lesões tornaram-se necróticas, e em alguns casos, desprenderam-se do limbo foliar.

Colônias de todos os isolados foram observadas ao microscópio estereoscópico, mostrando similaridade, apresentando formato circular, de bordos inteiros e lisos, de coloração creme-acinzentada. O isolado 1259, proveniente da Hungria, mostrou pequena diferença em relação aos demais quanto ao tempo de crescimento, com as colônias um pouco menores do que as demais. Embora haja relatos de ocorrências de colônias rugosas em *P. s. pv. lachrymans* (LUCAS, GROGAN, 1969c), essa característica não foi observada em nenhuma ocasião no desenvolver dos diferentes testes e repiques realizados com os isolados empregados neste trabalho.

Na TABELA 3, estão relacionados os resultados dos testes LOPAT e de fluorescência, efetuados com os dezessete isolados bacterianos empregados neste estudo, comparando-os com as informações sobre patógenos de pepino, pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

Por essa TABELA (3), verifica-se que todos os isolados empregados se classificaram como pertencentes à espécie *P. syringae*, de acordo com os testes LOPAT

TABELA 3. Caracterização dos isolados a nível específico - Testes LOPAT e de fluorescência

Características	Isolados 451,757,758,765 961, 1253, 1256, 1259	Isolados 600,736,784,1014,1016 1063,1064,1065,1258	<i>Pseudomonas cichorii*</i>	<i>Pseudomonas marginalis*</i>	<i>Pseudomonas syringae*</i>	<i>Pseudomonas viridiflava*</i>
Fluorescência**	+	-	+	+	+ ^v	+
Levan	+	+	-	+	+	-
Oxidase	-	-	+	+	-	-
Podridão em batata	-	-	-	+	-	+
Arginina dihidrolase	-	-	-	+	-	-
Hipersensibilidade em folha de fumo	+	+	+	-	+	+

+ positivo; - negativo; +^v variável.
(*) Dados obtidos em BRADBURY (1986).
(**) Fluorescência sob luz ultra violeta (UV) em meio BK.

(levan, oxidase, podridão de batata, arginina dihidrolase e hipersensibilidade em folha de fumo). Os isolados 451, 757, 758, 765, 961, 1253, 1256 e 1259 apresentaram fluorescência em meio BK, sob luz UV. A estirpe tipo de *P. s. pv. lachrymans* (isolado 1258) e diversas outras, porém, não apresentaram fluorescência naquelas condições. Essa característica de alguns isolados não apresentarem, ou apresentarem pouca fluorescência, é relatada para diversos patovares de *P. syringae* (LELLIOTT, BILLING, HAYWARD, 1966).

4.2. Caracterização e confirmação de isolados a nível infrasubespecífico através de testes bioquímicos

De acordo com BRADBURY (1986), outros patovares de *P. syringae*, além de *lachrymans*, podem infectar o pepino, em condições naturais, sendo eles os patovares *syringae* e *tabaci*, responsáveis por sintomas semelhantes aos de *P. s. pv. lachrymans* em folhas e frutos de pepino. Este fato, de mais de um patovar causar o mesmo tipo de sintoma, pode tornar necessário o emprego, para diferenciação a nível infrasubespecífico, ou seja, a caracterização do patovar, de testes bioquímicos, sorológicos e/ou eletroforéticos, complementares ao LOPAT. A *P. s. pv. tabaci* também pode ser diferenciada da *P. s. pv. lachrymans* pela reação das folhas de fumo empregadas nos testes de hipersensibilidade. Quando se inocula *P. s. pv. tabaci*, inicialmente, ocorre uma reação típica de hipersensibilidade, mas, com o decorrer do tempo, essa bactéria inicia a colonização dos tecidos, resultando em doença. Esta reação de patogenicidade, entretanto, se dá após 4 a 5 dias da inoculação.

Na TABELA 4, estão expressos os resultados dos testes de utilização de carboidratos, sais sódicos, aminoácidos e da hidrólise de gelatina.

TABELA 4. Caracterização dos isolados a nível infrassubspecífico

Características	Isolados												Pseudomonas			
	451	600	736 784	757,758 765	961	1014	1016	1063	1064	1065	1253 1259	1256	1258	<i>syringae</i> <i>pv. lachrymans</i> *	<i>syringae</i> <i>pv. syringae</i> *	<i>syringae</i> <i>pv. tabaci</i> *
Prod. ácido a partir de adonitol	NR	-	-	NR	-	-	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(-)arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
eritritol	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
glicérol	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	v
mesosulfito	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(-)sorbitol	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
D(+)-trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilização de benzoato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gluconato	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
DL-lactato	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	NR	-	-
malonato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
succinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(-)-tartarato	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	v-	-
L(+)-tartarato	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	v+
betaine	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
L-glutamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-homoserine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-lisina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-valina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise de gelatina	NR	+	-	NR	+	-	NR	+	-	-	+	+	-	+	+	+

+ positivo; - negativo; v variável; v+ variável com maioria positiva; NR não realizado.

(*) Dados obtidos em BRADBURY (1967, 1986); HILDEBRAND, SCHROTH, SANDS (1988); YOUNG, TRIGGS (1994).

Nessa TABELA (4), encontram-se também os testes para a diferenciação dos patovares *lachrymans*, *syringae* e *tabaci*, que infectam o pepino, verificando-se que os isolados apresentaram similaridade entre si quanto à utilização de adonitol, arabinose, celobiose, inulina, maltose, trehalose, benzoato, D(-)salicina, malonato, succinato, L-glutamina, DL-homoserine, L-ornitina e L-valina, ou seja, estes testes não são de utilidade para a separação entre os patovares de *P. s. pv. lachrymans*, *P. s. pv. tabaci* e *P. s. pv. syringae*. Quanto à hidrólise da gelatina houve variabilidade nos resultados, sendo esta uma característica que não deve ser utilizada para a caracterização da bactéria em questão, apesar de BRADBURY (1986) e HILDEBRAND, SCHROTH, SANDS (1988) afirmarem que a *P. s. pv. lachrymans* hidrolisa a gelatina.

Ainda pela TABELA 4 verifica-se, também, que o isolado 1258, apesar de ser designado estirpe tipo do patovar *lachrymans*, apresentou grandes diferenças em bioquimismo, com relação à descrição original desse patovar. Estes resultados estão de acordo com YOUNG, BRADBURY, DAVIS et al. (1991), que afirmam a necessidade de substituição desse isolado como o representante da estirpe tipo, devido à essa variabilidade. Outros isolados, como os de nº 1256 e 1259, recebidos de Coleção de Cultura do exterior como *P. s. pv. lachrymans*, também apresentaram diferenças bioquímicas da descrição desse patovar.

Segundo HILDEBRAND, SCHROTH, SANDS (1988), a *P. s. pv. lachrymans* não utiliza adonitol, betaína, DL-homoserine, D-tartarato e utiliza L-tartarato. Neste estudo os isolados 1063, 1064 e 1065 reproduziram tais resultados, perfazendo dados adicionais que os enquadrem ao patovar *lachrymans*.

Pela TABELA 4 verifica-se, ainda, que os isolados 1063, 1064 e 1065, empregados neste estudo, e que não haviam sido ainda caracterizados infrasubespecificamente, apresentaram resultados similares aos de *P. s. pv. lachrymans*. Os isolados 961, 1014 e 1016, no entanto, não se enquadraram nesta classificação.

Pequenas variações em resultados dos testes bioquímicos podem ser explicadas por diferenças no meio basal empregado, característica que pode interferir nos resultados (DYE, 1968), ou por alterações no comportamento do isolado, em decorrência de repiques, como observado por SCORTICHINI, ROSSI (1995).

Os isolados 961, 1014 e 1016 apresentaram comportamento bastante distinto do patovar *lachrymans* e do patovar *syringae*. O isolado 961 apresentou muitas características similares ao patovar *tabaci*, diferindo apenas quanto à produção de ácido a partir de mesoinositol e D(-)-sorbitol. O isolado 1016, porém, foi bastante diferente dos três patovares passíveis de infectarem o pepino. Inoculações em plantas de fumo com os isolados 961 e 1014, entretanto, produziram apenas reação de hipersensibilidade, não permitindo caracterizá-los como *P. s. pv. tabaci*. O isolado 1016 colonizou o tecido foliar do fumo, sem, entretanto, produzir sintomas característicos do fogo selvagem ou a produção de halo clorótico ao redor da área inoculada. Reisolamento e testes para caracterização confirmaram a patogenicidade do isolado 1016 em fumo.

Nos testes realizados por MISAGHI, GROGAN (1969) com 26 isolados de *P. s. pv. lachrymans*, 24 utilizaram o eritritol e o D-sorbitol, o que demonstra que tais características, embora em pequena porcentagem, podem apresentar variabilidade nos resultados.

Os isolados de nº 600, 736, 784 e 1253, embora já estivessem identificados como *P. s. pv. lachrymans*, também apresentaram variabilidade em algumas características. O isolado 600 apresentou resultado diferente quanto ao mesoinositol e D(-)sorbitol. Os isolados 736, 784 e 1253 apresentaram diferença quanto ao eritritol, mesoinositol, D(-)sorbitol e D(-)tartarato. Essa variabilidade de alguns isolados também foi observada por SCORTICHINI, ROSSI (1995), em seus estudos quanto ao inositol, sorbitol e gluconato, que afirmam em seu trabalho, que tal variação pode ocorrer devido ao crescimento bacteriano em meio de cultura (sofrendo sucessivos repiques), o que pode alterar a capacidade de utilização de carboidratos pela bactéria.

Essa variabilidade bioquímica entre os isolados pode tornar o emprego de testes bioquímicos insuficiente para caracterização do patovar.

A utilização do L(+) tartarato foi demonstrada pela maioria dos isolados testados, confirmando os dados de BRADBURY (1986).

Pela TABELA 4 verifica-se que os isolados empregados neste estudo apresentam variabilidade bioquímica, mesmo aqueles já anteriormente caracterizados como *P. s. pv. lachrymans*, inclusive os isolados 1256, 1258 (estirpe tipo) e 1259, provenientes de coleção de cultura do exterior. Ressalta-se, entretanto, que a estirpe tipo de *P. s. pv. lachrymans* já foi citada por J. M. Young (YOUNG, BRADBURY, DAVIS et al., 1991) como não representativa do patovar.

4.3. Caracterização e confirmação de isolados a nível infrasubespecífico através de testes eletroforéticos e sorológicos

Na FIGURA 1 estão apresentados os resultados dos perfis eletroforéticos comparativos entre isolados de *P. s. pv. syringae* (451), *P. s. pv. lachrymans* (1258), *P. s. pv. tabaci* (757, 758 e 765) e o isolado 961. Por essa FIGURA, verifica-se que as análises de proteínas totais por PAGE/SDS não permitiram a diferenciação entre os patovares citados, todos os três potencialmente patogênicos ao pepino. Foram observadas variações no perfil proteico entre esses três patovares, como também foram verificadas diferenças na intensidade de algumas bandas proteicas entre patovares de *P. s. pv. lachrymans*. Em nenhum dos patovares avaliados foi possível a detecção de banda(s) que pudesse(m) ser considerada(s) como bandas marcadoras para patovar.

Na FIGURA 2 estão apresentados os perfis eletroforéticos comparativos entre os isolados de *P. s. pv. lachrymans*, incluindo a estirpe tipo (1258), bem como todos isolados identificados apenas genericamente. Nessa FIGURA são observadas variações, tanto entre as estirpes caracterizadas como *P. s. pv. lachrymans*, como entre os isolados de *P. syringae* já anteriormente caracterizados apenas a nível genérico.

As diferenças detectadas entre e intra-patovar não foram suficientemente claras para possibilitar a separação das estirpes testadas em seus respectivos patovares. Há ainda que se considerar que variações no perfil de proteínas totais em PAGE/SDS podem ocorrer, principalmente como consequência de diferenças relacionadas à origem geográfica das estirpes, da metodologia de extração e do preparo das amostras. O isolado 1016, que apresentou patogenicidade ao fumo, não reagiu sorologicamente com nenhum

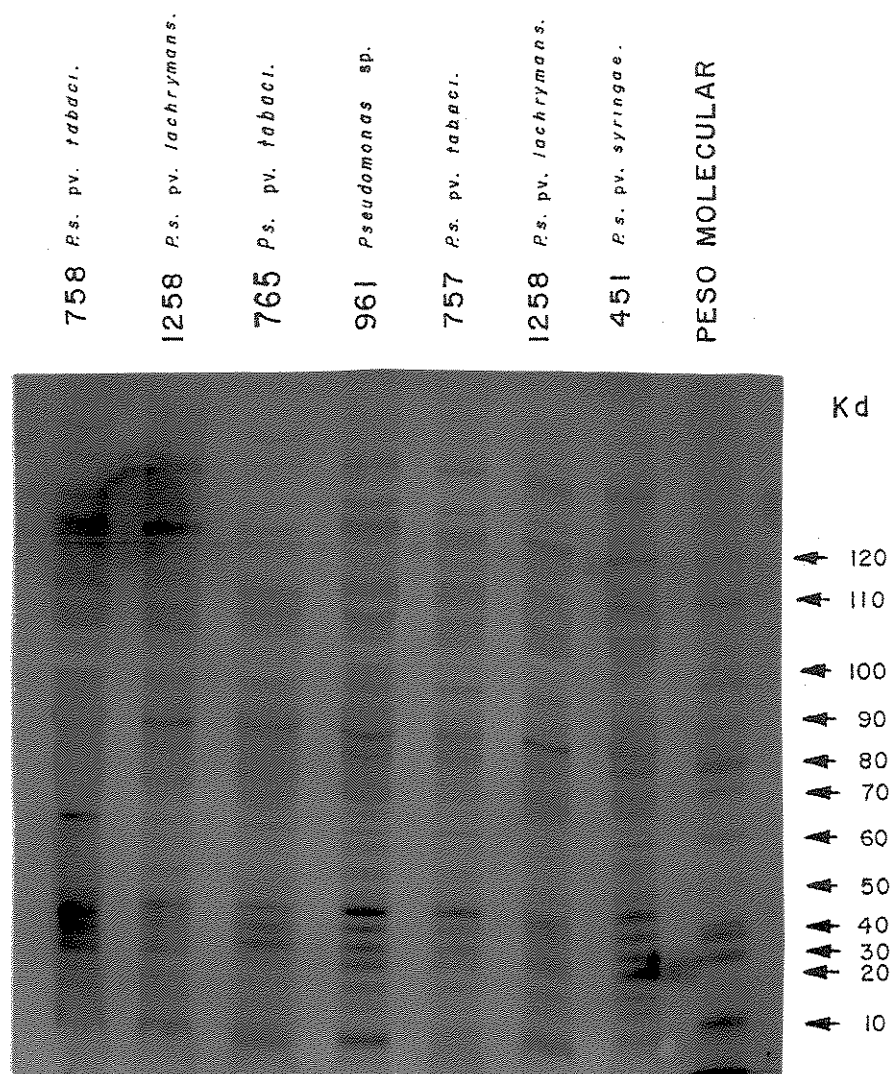


FIGURA 1 - Perfil eletroforético de proteínas totais de patovares de *Pseudomonas syringae* patogênicas ao pepino em gel de Poliacrilamida - SDS 10% corado com prata.

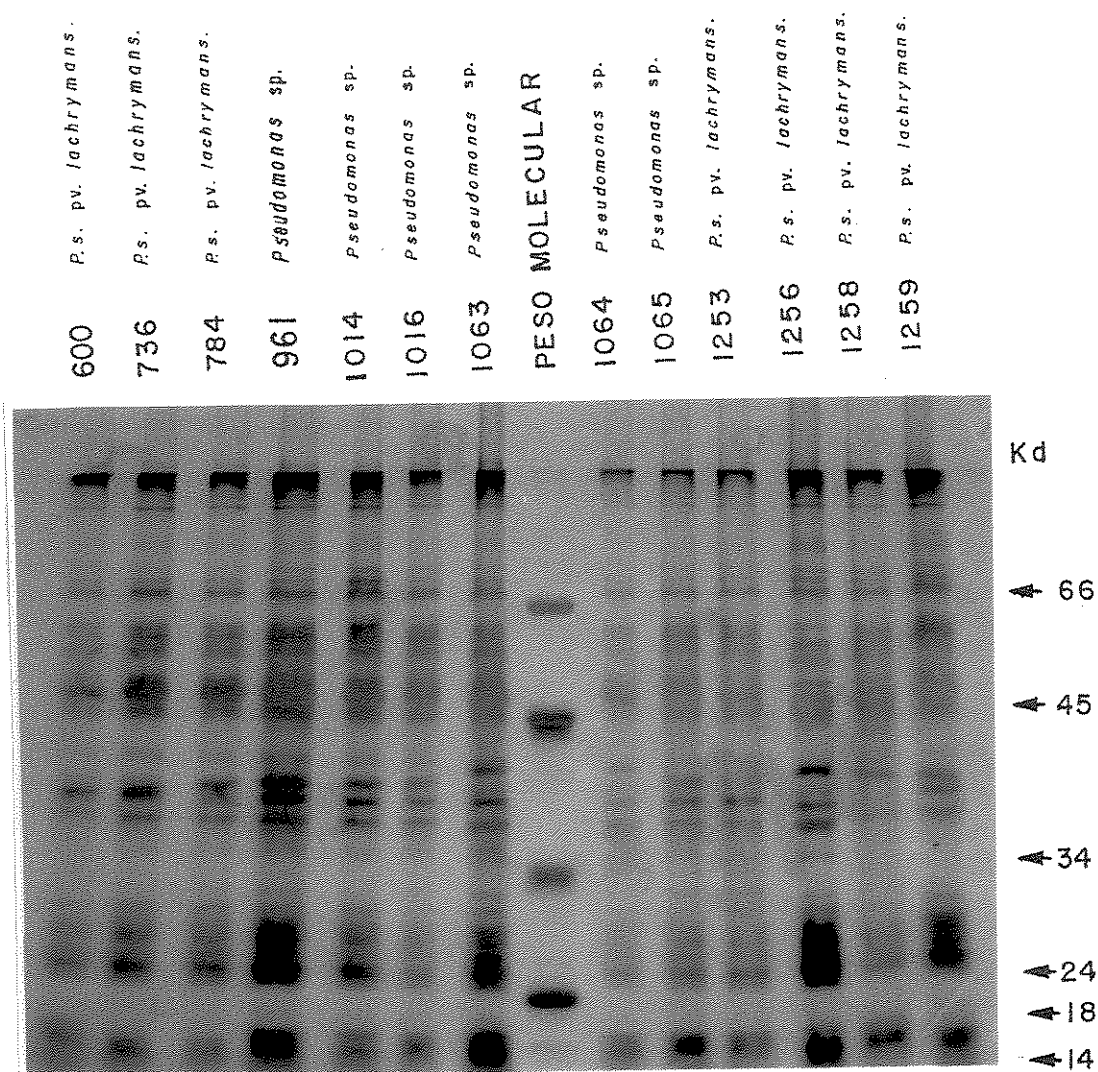


FIGURA 2 - Perfil eletroforético de proteínas totais de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e de *Pseudomonas syringae* patovares não determinados em gel de Poliacrilamida - SDS 10% corado com prata.

dos antissoros empregados, sugerindo, portanto, não se tratar do patovar *tabaci* ou então pertencer a outro sorogrupo.

Evidentemente que dentro de uma mesma espécie bacteriana - *Pseudomonas syringae*, o perfil de proteínas totais por PAGE/SDS deve apresentar alto grau de similaridade. Essa similaridade constitui uma explicação para a não diferenciação das estirpes testadas com o emprego de proteínas totais. Os dados obtidos nos testes eletroforéticos mostram que há a necessidade da extração de frações proteicas purificadas. Além disso, seria conveniente a análise de um maior número de isolados dos patovares *syringae* e *tabaci*.

Os resultados dos testes sorológicos de DDA (TABELA 5) entre os patovares de *P. syringae* patogênicos ao pepino (*lachrymans*, *syringae* e *tabaci*) e aqueles isolados identificados apenas especificamente, também não permitiram a separação de tais estirpes a níveis infra-específicos.

O antissoro 961 reagiu com os patovares *syringae* e *tabaci*, além da reação homóloga. O antissoro 1258 (estirpe tipo) reagiu com os isolados dos patovares *syringae* e *tabaci*, mas não reagiu com a estirpe 961.

Estes resultados mostram, também, que para testes sorológicos, seria conveniente a utilização de proteínas purificadas, extraídas da membrana bacteriana. Há dados na literatura (AZAD, SCHAAD, 1988) os quais mostram que proteínas do complexo proteico da membrana (CPM) podem ser utilizadas na diferenciação de patovares de *Xanthomonas translucens*. A extração de CPM dos isolados de *P. syringae* patogênicos ao pepino e dos outros patovares (*syringae* e *tabaci*), que também infectam plantas de pepino e a utilização dessas proteínas em testes sorológicos e PAGE/SDS, provavelmente

TABELA 5. Resultados dos testes sorológicos

Antígeno autoclavado	A n t i s s o r o			
	375	761	961	1258
451	-	-	+	+
600	-	-	-	+
736	-	-	-	+
757	-	+	+	+
758	-	+	+	-
765	-	+	-	-
784	-	-	-	+
961	-	-	+	-
1014	-	-	-	-
1016	-	-	-	-
1063	-	-	-	-
1064	-	-	-	-
1065	-	-	-	-
1253	-	-	-	+
1256	-	-	-	+
1258	+	-	-	+
1259	-	-	+	+

+ = presença de linha de precipitação.

- = ausência de linha de precipitação.

possam auxiliar na identificação daquelas estirpes de *P. syringae* originárias de pepino, cuja identificação a nível de patovar não seja possível por meio dos testes bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade.

Os dados de sorologia e PAGE/SDS, obtidos no presente trabalho, complementam-se e mostram que estirpes de *P. syringae* isoladas de pepino não são facilmente diferenciáveis, seja através de testes rotineiros, ou por meio de metodologias mais precisas. É oportuno registrar que, nos testes bioquímicos, para a diferenciação de patovares de *P. syringae* também foram observadas variações e a própria estirpe tipo de *P. s. pv. lachrymans* não foi enquadrada dentro do patovar *lachrymans*, quando se utilizou o sistema de diferenciação proposto por BRADBURY (1967, 1986); HILDEBRAND, SCHROTH, SANDS (1988) e YOUNG, TRIGGS (1994).

5 - CONCLUSÕES

Através da verificação dos resultados apresentados neste trabalho, puderam ser obtidas as seguintes conclusões:

- 1- Somente os testes bioquímicos podem ser insuficientes para a caracterização e confirmação do patovar dos isolados empregados.
- 2- A utilização de reações sorológicas de dupla difusão em ágar com antígenos autoclavados e a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (PAGE/SDS) de proteínas totais, não permitem a diferenciação entre os patovares *syringae*, *tabaci* e *lachrymans* de *Pseudomonas syringae*, todos patogênicos ao pepino.
- 3- Devido às diferenças entre os resultados obtidos com a estirpe tipo de *P. s. pv. lachrymans* e a descrição desse patovar, foi comprovada a necessidade de se redefinir uma outra estirpe como neopatotipo de *P. s. pv. lachrymans*.
- 4- Os resultados dos testes LOPAT permitiram a caracterização dos isolados 961, 1014 e 1016 dentro da espécie *Pseudomonas syringae*.
- 5- Os isolados 961, 1014 e 1016 não foram enquadrados em nenhum dos patovares conhecidos como patogênicos ao pepino.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYERS, S. H., RUPP, P., JOHNSON, W. T. A study of the alkali forming bacteria in milk. **U.S. Depart. Agric. Inform. Bull.**, n.782, 1919.
- AZAD, H., SCHAAD, N. W. Serological relationships among membrane proteins of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.3, p.272-277, 1988.
- BENEDETTI, C. E. Aplicação da técnica de eletroforese de proteínas na caracterização e taxonomia de fitobactérias. In: MALAVOLTA JR., V. A., BERIAM, L. O. S. **CURSO TEÓRICO PRÁTICO DE FITOBACTERIOLOGIA**, 1. Campinas: Instituto Biológico. Estação Experimental de Campinas. Seção de Bacteriologia Fitopatológica, 1992.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Deerfield Beach, v.8, p.93-99, 1987.
- BRADBURY, J. F. *Pseudomonas lachrymans*. **Common. Mycol. Inst. Descr. Pathol. Fungi and Bacteria**, Kew, n.124, 1967.
- _____. *Pseudomonas*. In: **Guide to Plant Pathogenic Bacteria**. Kew : CAB International Mycological Institute, 1986. p.110-111, 164.
- _____. The new bacterial nomenclature: what to do. **Trop. Pest Manag.**, London, v.28, n.1, p.42-44, 1982.
- BURGER, O. F. A bacterial rot of cucumber. **Phytopathology**, St. Paul, v.3, p.169-170, 1913.
- CAMARGO, L. S. **As hortaliças e seu cultivo**. 3.ed. Campinas : Fundação Cargill, 1992. 252p. (Técnica, n.6). p.1-5.
- CAMARGO FILHO, W. P. **Comunicação informal**. 1996. (Av. Miguel Stéfano, 3.900 - Água Funda, CEP:04.301-903 - São Paulo, SP - FAX: (011)276-4062). Instituto de Economia Agrícola.
- DE BOER, S. H., SCHAAD, N. W. Preparation of antigens, bacteria. In: HAMPTON, R., BALL, E., DE BOER, S. (Ed.). **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual**, APS Press.. St. Paul : The American Phytopathological Society, 1990. p.27-31.
- DESSERT, J. M., BAKER, L. R., FOBES, J. F. Inheritance of reaction to *Pseudomonas lachrymans* in pickling cucumber. **Euphytica**, Wageningen, v.31, p.847-855, 1982.

- DYE, D. W. A taxonomic study of the genus *Erwinia* I. The "Amylovora" group. **N. Z. J. Sci.**, Wellington, v.11, p.590-607, 1968.
- DYE, D. W., BRADBURY, J. F., GOTO, M., et al. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Rev. Plant Pathol.**, Wallingford, v.59, n.4, p.153-168, 1980.
- ERCOLANI, G. L. Practical problems with the pathovar scheme in plant quarantine. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 6., Maryland, 1985. Proceedings...CIVEROLO, E. L., COLLMER, A. DAVIS, R. E., GILLASPIE, A. G. (Ed.). **Current plant science and biotechnology in agriculture; plant pathogenic bacteria**. Dordrecht : Martinus Nijhoff Publs., 1987. p.786-794.
- FAHY, P. C., HAYWARD, A. C. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: _____, PERSLEY, G. J. (Ed.). **Plant Bacterial Diseases: a diagnostic guide**. Sidney : Academic Press, 1983. p.337-378.
- FRIEDMAN, B. A. Serological tests with some phytopathogenic species of *Pseudomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v.43, p.412-414, 1953.
- GALLI, F., TOKESHI, H., CARVALHO, P. C. T. et al. Doenças das cucurbitáceas. In: **Manual de Fitopatologia - doenças das plantas e seu controle**. São Paulo : Ceres, 1968. p.533-551.
- HILDEBRAND, D. C., SCHROTH, M. N., SANDS, D. C. *Pseudomonas*. In: SCHAAD, N. W. (Ed.). **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 2.ed. St. Paul : APS Press, 1988. p.60-80.
- HOLT, J. C., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9.ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1994. 787p.
- HOPKINS, D. L., SCHENCK, N. C. Bacterial leaf spot of watermelon caused by *Pseudomonas lachrymans*. **Phytopathology**, St. Paul, v.62, p.542-545, 1972.
- JACKMAN, P. J. H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole cell proteins patterns. In: GOODFELLOW, M., MINNIKIN, E. D. (Ed.). **Chemical methods in bacterial systematics**. London : Academic Press, 1985. p.115-129.
- JARVIS, W. R., NUTTALL, V. W. Cucumber diseases. **Agric. Canada**, Ottawa, p.8-9, 1979.
- KERSTERS, K. Polyacrylamide gel electrophoresis of bacterial proteins. In: KLEMENT, Z., RUDOLPH, K., SANDS, D. C. (Ed.). **Methods in Phytobacteriology**. Budapest : Akadémiai Kiadó, 1990. p.191-198.

- KING, E. O., WARD, M. K., RANEY, D. E. Two simple-media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v.44, p.301-307, 1954.
- KLEMENT, Z. Description and classification of disease symptoms. In: _____, RUDOLPH, K., SANDS, D. C. (Ed.). **Methods in Phyto bacteriology**. Budapest : Akademiai Kiadó, 1990. p.25.
- _____, FARKAS, G. L., LOVREKOVICH, L. Hipersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, p.474-477, 1964.
- KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. **Nature**, London, v.178, p.703, 1956 (Abstr.).
- KRITZMAN, G., ZUTRA, D. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in soil, plant debris and the rhizosphere of non-host plants. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.11, n.2, p.99-108, 1983.
- LAPAGE, S. P., SNEATH, P. H. A., LESSEL, E. F. et al. (Ed.). **International Code of nomenclature of bacteria; 1976 Revision**. Washington : American Society for Microbiology, 1975. 180p.
- LEBEN, C. Chemicals plus heat as seed treatments for control of angular leaf spot of cucumber seedlings. **Plant Dis.**, St. Paul, v.67, n.9, p.991-993, 1983.
- LEITE, A. F., OLIVEIRA, A. R. Furagar. **Summa Phytopathol.**, Jaboticabal, SP, v.1, n.2, p.143-146, 1975.
- LELLIOTT, R. A., BILLING, E., HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads*. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.29, n.3, p.470-489, 1966.
- _____, STEAD, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants**. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1987. 216p.
- LEVINE, M. **An Introduction to Laboratory Technique in Bacteriology**. New York : McMillan, 1954. p.68-79.
- LUCAS, L. T., GROGAN, R. G. Some properties of specific antigens of *Pseudomonas lachrymans* and other *Pseudomonas* nomenspecies. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, p.1913-1917, 1969a.
- _____, _____. Serological variation and identification of *Pseudomonas lachrymans* and other phytopathogenic *Pseudomonas* nomenspecies. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, 1908-1912, 1969b.

- LUCAS, L. T., GROGAN, R. G. Pathogenicity and other characteristics of smooth and rough isolates of *Pseudomonas lachrymans*. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, 1918-1923, 1969c.
- MAKISHIMA, N. Perfil da horticultura brasileira. **Circuito Agrícola - ABRACEN**, São Paulo, n.38, p.6-7, 1996.
- MARQUES, A. S. A., ROBBS, C. F., BOITEUX, L. S. et al. **Índice de Fitobacterioses assinaladas no Brasil**. Brasília : EMBRAPA-CENARGEN/SPI, 1994. 65p.
- MISAGHI, I., GROGAN, R. G. Nutritional and biochemical comparisons of plant pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, p.1436-1450, 1969.
- MULLIN, R. S., SCHENCK, N. C. Bacterial leaf spot on watermelon. **Plant Dis. Repr.**, St. Paul, v.47, n.9, p.848, 1963.
- OLIVEIRA, A. R. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. **Summa Phytopathol.**, Jaboticabal, SP, v.1, p.61-64, 1975.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion in-gel-methods for immunological analysis. **Progr. Allergy**, Basel, v.5, p.1-78, 1958.
- PINTO, C. M. F., CRUZ FILHO, J. Cucurbitáceas: doenças causadas por fungos e bactérias. **Informe Agropecuário: Doenças de Plantas III**, Belo Horizonte, v.11, n.131, p.28-32, 1985.
- POHRONEZNY, K., LARSEN, P. O., EMMATTY, D. A., et al. Fields studies of yield losses in pickling cucumber due to angular leaf spot. **Plant Dis. Repr.**, St. Paul, v.61, n.5, p.386-390, 1977.
- _____, _____, LEBEN, C. Observations on cucumber fruit invasion by *Pseudomonas lachrymans*. **Plant Dis. Repr.**, St. Paul, v.62, n.4, p.306-309, 1978.
- RODRIGUES NETO, J. **Lista de Culturas Bacterianas. Pré-Catálogo 1995**. Instituto Biológico. Seção de Bacteriologia Fitopatológica. Estação Experimental de Campinas. Campinas, 1995. 71p.
- SCHAAD, N. W. Serological identification of plant pathogenic bacteria. **Ann. Rev. Phytopathol.**, Palo Alto, v.17, p.123-147, 1979.
- SCORTICHINI, M., ROSSI, M. P. Influence of subculturing some phytopathogenic bacteria on their carbohydrate utilizing profile. **Letters Appl. Microbiol.**, Oxford, v.21, p.237-241, 1995.

SMITH, E. F., BRYAN, M. K. Angular leaf spot of cucumber. **J. Agric. Res.**, Washington, v.5, p.465-475, 1915.

SNEATH, P. H. A. (Ed.). **International Code of Nomenclature of Bacteria. Bacteriological Code, 1990 Revision.** Washington : American Society for Microbiology, 1992. 189p.

SOWELL Jr., G. A bacterial causing severe damage to susceptible plant introductions of muskmellon. **Plant Dis.**, St. Paul, v.65, p.609-610, 1981.

TOKESHI, H., GALLI, F. Mancha angular do pepino (*Cucumis sativus*) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith & Bryan) Young et al. **Olericultura**, Viçosa, v.2, p.118-121, 1962.

THORNLEY, M. J. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.23, p.37-52, 1960.

VOLCANI, Z. Development of angular leaf spot of cucumbers grown under plastic in Israel. **Plant Dis. Reprtr.**, St. Paul, v.48, n.4, p.256-257, 1964.

WALKER, J. C., CHAND, J. N., WADE, E. K. Relation of seed-and soil-borne inoculum to epidemiology of angular leaf spot of cucumber in Wisconsin. **Plant Dis. Reprtr.**, St. Paul, v.47, n.1, p.15, 1963.

YOUNG, J. M., DYE, D. W., BRADBURY, J. F., et al. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **N. Z. J. Agricult. Res.**, Wellington, v.21, p.153-177, 1978.

_____, BRADBURY, J. F., DAVIS, R. E. et al. Nomenclatural revision of plant pathogenic bacteria and list of names 1980-1988. **Rev. Plant Pathol.**, Wallingford, v.70, n.4, p.211-221, 1991.

_____, TRIGGS, C. M. Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.77, p.195-207, 1994.

_____, SADDLER, G. S., TAKIKAWA, Y. et al. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Rev. Plant Pathol.**, Wallingford, v.75, n.9, p.721-763, 1996.

7 - APÊNDICE

7.1. Meios de cultura utilizados:

- Para isolamento e cultivo

Nutriente-ágar (NA) (LEVINE, 1954)

Peptona	5g
Extrato de carne	3g
NaCl	5g
Ágar	15g
Água destilada	1000ml

B de King (BK) (KING, WARD, RANEY, 1954)

Proteose peptona nº 3	20g
K ₂ HPO ₄	1,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5g
Glicerol	10g
Ágar	15g
Água destilada	1000ml

pH 7,2.

- Para a produção de ácidos de carboidratos, utilização de ácidos orgânicos e aminoácidos

Meio de Ayers (AYERS, RUPP, JOHNSON, 1919)

NH ₄ H ₂ PO ₄	1g
KCl.....	0,2g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,2g
Azul de bromotimol.....	0,0016%
Ágar (opcional).....	12g
Água destilada.....	1000ml

Os carboidratos, após esterilização por filtração, são acrescentados ao meio basal autoclavado e resfriado a 50°C e a concentração final dos carboidratos no meio é de 0,4 a 1%.

Os ácidos orgânicos (geralmente na forma de sais sódicos) e aminoácidos são acrescentados em uma concentração de 0,2%.

- Para testar a presença de arginina-dihidrolase

Meio de Thornley (THORNLEY, 1960)

Peptona.....	1g
NaCl.....	5g
K ₂ HPO ₄	0,3g
Ágar.....	3g
“Phenol-red”.....	0,01g
L(+) arginina HCl.....	10g
Água destilada.....	1000ml

- Para testar a liquefação da gelatina (LELLIOTT, STEAD, 1987)

Extrato de levedo.....	3g
Peptona.....	5g
Gelatina (B.D.H.).....	120g
Água destilada.....	1000ml

7.2. Tampões e géis utilizados (BENEDETTI, 1992)

- Gel de resolução-acrilamida 10%

Misturar:

Acrilamida + bisacrilamida (30: 0,8).....	8,3ml
Tris-HCl 1M pH 8,8.....	9,3ml
SDS 10%.....	0,25ml
Água destilada.....	5,9ml
Persulfato de amônio 30%.....	1,25ml
Temed.....	0,0015ml

- Gel de empacotamento-acrilamida 3,75%

Misturar:

Acrilamida + bisacrilamida.....	0,9ml
Tris-HCl 1M pH 6,8.....	0,9ml
SDS 10%.....	0,07ml
Água destilada.....	4,8ml
Persulfato de amônio 3%.....	0,35ml
Temed.....	0,015ml

- Tampão de amostra

Tris-HCl 63mM pH 6,8.....	0,76g
SDS.....	2g
2 β -mercaptoetanol.....	5g
Sacarose.....	10g
Água destilada.....	100ml

- Tampão do reservatório 10x concentrado

Tris 0,25M.....	15,14g
Glicina 1,92M.....	72g
SDS 1%.....	5g
Água destilada.....	500ml

7.3. Coloração por prata (BLUM, BEYER, GROSS, 1987):

Fixar o gel de eletroforese em ácido acético 12% + etanol 50% (solução fixadora) por no mínimo 1 hora;

Lavar com etanol 50% por 3 x 20 min.

Tratar com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (0,2g/l) por 1 min.

Lavar com água destilada 3 x 20 seg.

Tratar com impregnação de solução de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%) + 75 ul formaldeído por 20 seg.

Lavar com água destilada 3 x 20 seg.

Tratar com o líquido revelador:

Na_2CO_3 6g

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 2ml

Formaldeído 50 ul

Água 100ml

Após a revelação suficiente, colocar em solução fixadora, como descrita no início deste item.
