

MARGARIDA AGOSTINHO LEMOS

Engenheiro Agrônomo

Comportamento de mutantes de Xanthomonas
campestris (Pam.) Dowson resistentes à au-
reomicina e à estreptomicina em relação
ao tratamento de sementes de repólho
(Brassica oleracea var. capitata L.),
com êsses antibióticos.

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Uni-
versidade de São Paulo, para obtenção
do título de "Magister Scientiae".

Piracicaba
Estado de São Paulo
1969

AGRADECIMENTOS

Expressamos os nossos mais sinceros agradecimentos às pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho, principalmente àquelas relacionadas, e Instituição.

Prof. Dr. José Carvalho Ferreira da Silva, Diretor do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Nordeste, pelo incentivo na realização do nosso curso.

Dra. Rahme Nelly Neder, por sugerir o assunto, orientar e incentivar na realização do nosso trabalho.

Prof. Dr. Almiro Blumenschein, pelas sugestões e críticas.

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, colocando à nossa disposição o laboratório de microrganismos do Instituto de Genética.

Dr. Marcílio Dias e Dr. Tosiaki Kimoto, pelo fornecimento das sementes.

Dr. Roland Vencovsky, pela orientação nas análises estatísticas.

CAPES, pelos recursos que nos forneceu durante os nossos estu-dos.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. RESUMO DA LITERATURA	2
3. MATERIAL E MÉTODO	9
3.1. Meios de cultura	9
3.2. Reativos	11
3.3. Corantes	13
3.4. Antibióticos	13
3.5. Isolamento e classificação do patógeno	13
3.6. Origem das sementes	14
3.7. Preparo do solo	14
3.8. Câmara úmida	15
3.9. Inoculação das plântulas	15
3.10. Teste de patogenicidade dos isolamentos e reisolamentos	15
3.11. Inoculação de meios de cultura	16
3.12. Tratamento das sementes	16
3.13. Outras bactérias usadas em testes dos antibióticos ..	16
3.14. Sobrevivência do patógeno frente aos antibióticos ..	17
3.14.1. Sobrevivência à estreptomicina	17
3.14.2. Sobrevivência à aureomicina	17
3.15. Obtenção e isolamento de mutantes resistentes aos anti- tibióticos	17
3.15.1. Mutantes resistentes à estreptomicina	17
3.15.2. Mutantes resistentes à aureomicina	18
3.16. Determinação dos níveis inibitórios e da absorção dos antibióticos	18
3.16.1. Níveis inibitórios dos antibióticos no isola- mento da bactéria, através do método da difu- são pelo uso de discos de papel de filtro ..	18
3.16.2. Absorção de antibiótico pelas sementes e sua ação sobre organismos específicos aos anti- bióticos	19
3.16.3. Absorção de antibióticos pelas sementes e ní- veis inibitórios, usando-se a bactéria isola- da	20
3.16.4. Tratamento de sementes com estreptomicina e aureomicina e determinação dos níveis inibi- tórios em mutantes resistentes a êsses anti- bióticos	20

	<u>Página</u>
3.16.4.1. Inibição dos mutantes por sementes tratadas com estreptomina.	20
3.16.4.2. Inibição dos mutantes por sementes tratadas com aureomicina ..	20
3.17. Avaliação do comportamento das sementes inoculadas artificialmente com os mutantes da bactéria, resistentes aos antibióticos	21
3.18. Inoculação de plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com os antibióticos	21
3.18.1. Avaliação do nível de inibição do mutante resistente à aureomicina, em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com aureo- micina	21
3.18.2. Avaliação dos níveis de inibição de mutantes resistentes à estreptomina e à aureomicina em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com êsses antibióticos	22
3.19. Método de avaliação da severidade da doença	23
3.20. Métodos de análise estatística	24
3.21. Reisolamento e caracterização das bactérias mutantes resistentes	24
4. RESULTADOS OBTIDOS	26
4.1. Isolamento e classificação do patógeno	26
4.2. Teste de patogenicidade de <u>Xanthomonas campestris</u> e reisolamentos	27
4.3. Sobrevivência de <u>Xanthomonas campestris</u> frente aos antibióticos	27
4.3.1. Sobrevivência à estreptomina	27
4.3.2. Sobrevivência à aureomicina	27
4.4. Obtenção e isolamento de mutantes resistentes aos antibióticos	27
4.4.1. Mutantes resistentes à estreptomina	27
4.4.2. Mutantes resistentes à aureomicina	33
4.5. Determinação dos níveis inibitórios e da absorção dos antibióticos	34
4.5.1. Níveis inibitórios dos antibióticos em <u>Xanthomonas campestris</u> através do método da difusão, pelo uso de discos de papel de filtro	34
4.5.2. Absorção dos antibióticos pelas sementes e sua ação sobre organismos específicos aos antibióticos	35
4.5.3. Absorção dos antibióticos pelas sementes e sua ação sobre <u>Xanthomonas campestris</u> ...	36
4.5.4. Tratamento de sementes com estreptomina e aureomicina e determinação dos níveis inibitórios em mutantes de <u>Xanthomonas campestris</u> resistentes a êsses antibióticos	37

	<u>Página</u>
4.5.4.1. Inibição dos mutantes de <u>Xanthomonas campestris</u> por sementes tratadas com estreptomicina	37
4.5.4.2. Inibição dos mutantes de <u>Xanthomonas campestris</u> por sementes tratadas com aureomicina	38
4.6. Avaliação do comportamento das sementes inoculadas artificialmente com os mutantes de <u>Xanthomonas campestris</u> resistentes aos antibióticos	39
4.7. Inoculação de plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com os antibióticos	40
4.7.1. Avaliação do nível de inibição do mutante de <u>Xanthomonas campestris</u> resistentes à aureomicina, em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com aureomicina	40
4.7.2. Avaliação dos níveis de inibição de mutantes resistentes à estreptomicina e à aureomicina em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com êsses antibióticos	42
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	47
6. CONCLUSÕES	53
7. RESUMO	54
8. SUMMARY	55
9. BIBLIOGRAFIA CITADA	56

1. INTRODUÇÃO

Mutantes resistentes a antibióticos têm sido amplamente estudados sob o ponto de vista médico. Só recentemente, atenção tem sido voltada para tais tipos de mutantes sob o ponto de vista fitopatogênico.

O tratamento de sementes por antibióticos e drogas tem merecido especial atenção no controle de doenças causadas em plantas por fungos e bactérias. Isso levantou o problema do aparecimento de mutantes resistentes nesses organismos fitopatogênicos, revestindo-se de grande importância, não só no que se refere ao controle da doença, como também no estudo das relações patógeno resistente-planta e modo de ação do antibiótico sobre o hospedeiro ou depois de ser transformado dentro da planta.

A podridão negra, causada por Xanthomonas campestris, é a principal doença que ocorre em crucíferas. Tem causado grandes prejuízos, principalmente em nossas condições, com a introdução de repolhos híbridos japoneses que são muito suscetíveis à doença. Como medidas de controle têm sido recomendadas a rotação de cultura, introdução de variedades resistentes e tratamento de sementes com antibiótico.

O objetivo deste trabalho foi, então proceder ao isolamento de mutantes de Xanthomonas campestris resistentes a dois antibióticos (estreptomicina e aureomicina) e proceder ao tratamento de sementes de repolho com tais antibióticos; em seguida, inocular plântulas com tais mutantes, visando, principalmente, estudar o comportamento dos mesmos em relação ao tratamento das sementes e também o grau de patogenicidade desses mutantes em relação à bactéria sensível, e a estabilidade da resistência adquirida "in vitro", quando em contato com a planta. Tais aspectos devem ser considerados como etapas iniciais para trabalhos posteriores, nos quais muito provavelmente, as respostas às nossas especulações serão importantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A doença conhecida como "podridão negra das crucíferas", de acordo com Meier (1934), foi citada pela primeira vez por Garman em 1891, causando danos à cultura de repólho, durante períodos de alta temperatura e excessiva umidade.

Russel (1898) e Smith (1898), estudando a doença, confirmaram que a mesma ocorria na época quente e chuvosa do ano.

Drechesler (1914) trabalhou com plântulas de couve, desenvolvidas em solo, previamente inoculado com Pseudomonas campestris (Pam.) Smith. Demonstrou que a "podridão negra das crucíferas" ataca plântulas, mais rapidamente e com maiores efeitos de destruição, do que plantas mais velhas.

Brown e Harvey (1920) confirmaram os resultados de Garman quanto à necessidade de alta temperatura e de excessiva umidade para o desenvolvimento mais favorável da doença. Mostraram que o organismo causal da doença penetra através dos hidatódios das folhas e através de ferimentos das raízes e do caule.

Clayton (1925a) demonstrou que sementes de couve infectadas se desenvolvem normalmente. A doença primeiro aparece como lesão dos cotilédones, de onde a bactéria se espalha para o caule principal. As plantas podem so apresentar normais até a época de transplante. O primeiro sintoma da doença das plantas quando no campo é a morte de uma ou mais folhas inferiores.

Meier (1934) e Cook, Walker e Larson (1952a), estudando o ciclo da "podridão negra das crucíferas", declararam que na natureza, estômatos não é uma importante via da penetração do patógeno, uma vez que a entrada da bactéria depende da continuidade líquida entre a abertura estomatal e a câmara subestomática. Demonstraram também que dano mecânico às raízes de plântulas de repólho não é um pré-requisito para a infecção. Contudo, uma maior percentagem de plantas infectadas era obtida quando injúria precedia à inoculação. O desenvolvimento da doença foi observado, utilizando temperaturas de 16°, 20°, 24° e 28°C. As temperaturas mais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno foram a partir de 20°C.

Walker (1965) descreveu os sintomas da doença, o organismo causal, o ciclo da doença e o seu controle.

O agente causal foi primeiramente descrito por Pammel, em 1895, como Bacillus campestris, de acordo com Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, (Breed e outros, 1957).

Mais detalhadamente, foi descrito por McCulloch (1929), num es-

tudo morfológico e fisiológico comparativo entre Bacterium campestre var. ar-
moraciae, n. var., Bacterium campestre e Bacterium phaseoli, concluindo que
esses três organismos são bastante semelhantes, diferindo apenas nas suas re-
lações com os hospedeiros.

O estudo do gênero Xanthomonas, sua posição e variação em rela-
ção à planta hospedeira e em relação à sua disposição taxonômica, pode ser
encontrada, detalhadamente na revisão feita por Starr (1959).

Estudo apresentado por De Ley (1964), sugeriu que a lista de 60
espécies referida ao gênero Xanthomonas, no Bergey's Manual of Determinative
Bacteriology, (Breed e outros, 1957), deverá, em futuro muito próximo, ser re-
duzida a poucas espécies, partindo-se do princípio que a diferenciação en-
tre elas não envolve características importantes e é quase exclusivamente,
baseada na especificidade fitopatogênica.

Desde o seu primeiro isolamento, o agente causal da "podridão
negra das crucíferas" tem recebido as seguintes denominações, de acordo com
Walker (1965): Bacillus campestris (Pam.), 1895; Pseudomonas campestris
(Pam.) E. F. Sm., 1897; Bacterium campestris (Pam.) Chester, 1897; Bacte-
rium campestris (Pam.) E.F. Sm., 1911; Phytomonas campestris (Pam.) Bergey
e outros, 1923; Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson, 1939.

Sobre a ação de antibiótico e aparecimento de formas resisten-
tes em bactérias, o maior número de trabalhos se refere a bactérias de inte-
rêsse médico. Bryson e Szybalski (1957), Schnitzer e Grumberg (1957), Wata-
nabe (1963), em notáveis revisões, nos mostram a importância e extensão do as-
sunto.

Os trabalhos publicados sobre a atividade de antibióticos em bac-
térias fitopatogênicas, e também sobre o desenvolvimento de resistência aos
mesmos, não são muito numerosos.

Gilliver (1946) observou a ação de treze antibióticos em fungos
e bactérias fitopatogênicas. Concluiu que Xanthomonas campestris era inibi-
da em doses maiores do que 8 unidades Oxford por mililitro de penicilina.

Mitchel, Zaumeyer e Anderson (1952) assinalaram que Xanthomonas
phaseoli e outras bactérias fitopatogênicas, quando em contato com estrepto-
micina, podem adquirir resistência a esse antibiótico.

English e Van Halsema (1954) notaram que quando se combinam dois
antibióticos, o aparecimento de mutante resistente torna-se menos frequente
para Xanthomonas e Erwinias. Eles utilizaram estreptomina e terramicina.

Ark e Stanley (1956) estudaram a ação de aureomicina, neomicina,
terramicina, polimixina e tetraciclina em várias bactérias fitopatogênicas,
inclusive Xanthomonas campestris, verificando que embora esses antibióticos

mostrassem grande atividade contra tais patógenos "in vitro", os mesmos não puderam ser usados "in vivo", pelos danos que causavam às plantas.

Carmona-Gomez (1956) verificou que o mecanismo genético da resistência de Xanthomonas phaseoli variedade fuscans e Xanthomonas vignicola com relação ao antibiótico A-C, produzido por um Streptomyces, seguia o modelo denominado por Demerec (1948) de "múltiplos passos".

Thirumalacher, Patel, Kulkarni e Dhand (1956) estudaram a ação da aureomicina, terramicina, penicilina G, dihidro-estreptomicina e cloranfenicol em trinta e duas espécies do gênero Xanthomonas. Por difusão em meio sólido, os antibióticos foram usados em solução de concentração de 20 ug/ml para dihidro-estreptomicina, 50 ug/ml para penicilina e 60 ug/ml para os demais antibióticos. Em Xanthomonas campestris houve aparecimento de halo de inibição para todos os antibióticos usados, exceção feita à penicilina.

Corey e Starr (1957) isolaram mutantes resistentes à estreptomicina de Xanthomonas phaseoli. Células estreptomicina-sensíveis foram transformadas em estreptomicina-resistentes pelo DNA das células estreptomicina-resistentes. As células usadas como fonte de DNA eram mutantes-resistentes a pelo menos 2.000 ug/ml de estreptomicina e as células transformadas para estreptomicina-resistentes foram também resistentes a pelo menos 2.000 ug de estreptomicina por mililitro de meio de cultura.

Lindenfelser, Prindham, Shotwell e Stodola (1958) ensaiaram a ação de duramicina sobre Xanthomonas campestris, verificando que a bactéria era inibida por 80 ug do antibiótico por mililitro de meio de cultura.

Gyorffy, Iigali, Kallay, Kárasz, Klément e Szende estudaram mutantes de Xanthomonas phaseoli variedade fuscans resistentes a três antibióticos: penicilina, estreptomicina e cloranfenicol. Sobre a resistência dessa bactéria à estreptomicina, verificaram que ela ocorre em um "só passo"; quanto à penicilina e cloranfenicol, a resistência ocorre em "múltiplos passos".

Mehta, Gottlieb e Powell (1959) observaram a ação de vancomicina sobre trinta espécies de bactérias fitopatogênicas. Para a Xanthomonas campestris a ação inibitória foi de 0,5 ug/ml.

Troutman (1959) obteve mutantes resistentes à estreptomicina de Pseudomonas tabaci "in vitro". Tais mutantes eram então inoculados em planta de fumo e de novo semeados em meio de cultura com estreptomicina. Esse processo foi repetido oito vezes. Os isolamentos mostraram uma rápida perda de resistência à estreptomicina, durante as primeiras passagens com um gradual aumento no final da 8ª repetição. A estabilidade da resistência na ausência da estreptomicina foi testada, através do mesmo processo na ausên-

cia do estreptomicina, e somente uma leve diminuição na resistência foi notada.

Quadling (1960) fez um estudo sobre a resistência da Xanthomonas phaseoli, linhagem XP8 à estreptomicina. Obteve mutantes resistentes e dependentes à droga. Estudou a taxa de mutação espontânea de resistência à estreptomicina e várias propriedades dos mutantes resistentes. Na maioria dos casos, resistência à alta concentração de estreptomicina não afetou a virulência do organismo em relação à planta.

Azevedo (1961) isolou mutantes de X. campestris resistentes à estreptomicina, penicilina e aureomicina; os primeiros ocorreram em "um só passo" e os dois últimos segundo o modelo de "vários passos". Não encontrou resistência cruzada e nem sensibilidade colateral.

Kulykovs'ka (1962) apresentou os resultados de um estudo sobre as propriedades patogênicas de mutantes de Xanthomonas campestris resistentes a tiosulfato. Encontrou que a virulência dos mutantes era consideravelmente mais fraca do que a virulência da linhagem original.

Kulykovs'ka (1963) verificou que a resistência a antibióticos-tiosulfato em Erwinia carotovora e Xanthomonas campestris, aumentou 2,5 - 18,7 vezes como resultado de 19 passagens em meio de cultura de batata, com concentrações crescentes de antibióticos. As propriedades morfológicas e bioquímicas das culturas mutantes de Xanthomonas campestris sofreram consideráveis alterações. Não foram notadas mudanças particulares em Erwinia carotovora.

Desal, Patel e Desal (1967) verificaram que estreptomicina, em todas as concentrações usadas, inibiu o crescimento de 19 espécies dos gêneros Xanthomonas e Pseudomonas ensaiadas "in vitro", sugerindo o emprego desse antibiótico no controle das doenças causadas por essas bactérias.

O uso de antibióticos no controle de doenças de plantas em geral, sua aplicação direta ou associação a substâncias químicas, suas relações com a planta e mecanismo de ação, pode ser bem visualizado nas revisões feitas pelos seguintes autores: Stoddard e Dimond (1949), Weindling, Katznelson e Beale (1950), Ark e Stanley (1956), Zauneyer (1958), Barnett (1959) e Dekker (1963).

O tratamento de sementes para o controle de doenças recebeu atenção dos seguintes pesquisadores:

Brown e Harvey (1920) recomendaram tratamento de semente de couve chinesa com sublimado corrosivo 1:1000, por quinze minutos ou com solução de 500 g de formaldeído em 100 litros de água, a fim de prevenir o aparecimento de Bacillus campestris.

Walker e Tisdale (1920) assinalaram que a transmissão de Bacterium campestre (Pam.) Smith, através de sementes foi primeiro demonstrada por Harding, Stewart e Pruch (1904), em sementes de couve, depois da colheita. Sementes quando banhadas em uma suspensão do organismo e deixadas a secar, continham a bactéria ainda viável e patogênica, depois de onze meses. Quando as sementes foram tratadas com cloreto de mercúrio 1:1000 por trinta minutos, a doença foi bem controlada.

Monteith (1921) com sua experiência mostrou que sementes de couve inoculadas artificialmente com o agente causal da "podridão negra das crucíferas", deixadas a secar, durante 3 dias e plantadas em solo esterilizado, produziram plântulas com alta percentagem de infecção nos cotilédones. A doença, raramente aparecia nas primeiras folhas verdadeiras, em menos de oito semanas depois do plantio. Evidências apontam fatores climáticos, durante o desenvolvimento da semente, como importantes para determinar a rapidez da disseminação da doença no canteiro.

Clayton (1924 a e b) fêz os seguintes tratamentos de sementes de couve de Bruxelas infectadas com Bacterium campestre: cloreto de mercúrio 1:1000 por trinta minutos e água a 50°C por vinte e cinco e trinta e três minutos.

Clayton (1925b) fêz o tratamento de sementes de couve-flor, couve e couve de Bruxelas infectadas com Pseudomonas campestris, usando soluções de Uspulum a 0,25%, Semesan a 0,25%, HgCl₂ a 0,1%, HgI₂ a 0,05% adicionado de KI a 0,1% e água quente, empregando em todos os tratamentos vários períodos de tempo. Todos deram resultados não satisfatórios. A desinfecção das sementes com solução de Germisan a 0,25% por meia, uma e duas horas e com Hg (CN)₂ a 0,1% por 1 hora, resultaram num controle completo da doença, porém o último tratamento, provocando germinação reduzida.

Walker (1934) concluiu que sementes infectadas com Bacterium campestre quando plantadas em Skagit Valley, Estados Unidos, não produziamp^lantas doentes, por causa da baixa precipitação, durante os três meses que se seguem à semente e não precisando, portanto serem tratadas contra a doença.

Ark (1947) notou que estreptomomicina era tóxica a catorze espécies de bactérias fitopatogênicas, empregando uma solução de 200 ug/ml de estreptomomicina, no tratamento de sementes de pepino, tomate, cevada e girasol. O tratamento de sementes de pepino infectadas com Pseudomonas lachrymans, usando 100 unidades dêsse antibiótico por mililitro, deu origem a plantas sadias.

Goodman e Henry (1947) usaram subtilina para o tratamento de sementes de cevada, artificialmente, inoculadas com Xanthomonas translucens.

cerealis. Os resultados obtidos levaram os autores a concluir que com refinamentos de técnica, o emprêgo de antibióticos na desinfecção de sementes teria aplicação prática.

Burkholder (1948) assinalou que a erradicação de bactérias associadas a sementes de couve e couve-flor pode ser feita com tratamento pelo calor e substâncias químicas. Xanthomonas malvacearum pode ser eliminada de sementes de algodão quando tratadas com ácido sulfúrico diluído.

Katznelson e Sutton (1951) compararam a atividade de seis antibióticos contra um grande número de espécies de bactérias fitopatogênicas "in vitro" e verificaram que aureomicina foi o mais potente. Aureomicina inibiu completamente o crescimento da maioria das Xanthomonas, incluindo Xanthomonas campestris a concentrações de 0,1 a 0,05 ug/ml.

Cook, Walker e Larson (1952 b), relacionando a disseminação da doença com sementes infectadas, sugerem que o tratamento das mesmas com água quente ou com substâncias químicas seria suficiente para o controle de "podridão negra das crucíferas"

Sutton e Bell (1954), considerando a eficiência de aureomicina no combate à Xanthomonas campestris, testaram soluções desse antibiótico em várias concentrações, no combate à "podridão negra das crucíferas". Por comparação com outros tratamentos realizados com substâncias químicas comprovaram que aureomicina em solução de concentração 1:1000, atuando sobre as sementes, durante trinta minutos, foi o mais eficiente no combate à bactéria.

Dowson (1957) recomendou para o controle da doença, desinfecção das sementes de crucíferas, com sublimado corrosivo em solução de concentração de 1:1000, por quinze minutos.

Echegaray (1958), conduzindo numerosos testes em laboratório, casa de vegetação e campo, concluiu que a mais eficiente substância foi a estreptomomicina, sozinha ou em combinação com outros antibióticos, para o controle de bactérias fitopatogênicas.

Popov (1958) baseado em 3 anos de experimentos conduzidos em Voronezh, recomendou para o controle de Xanthomonas campestris, tratamento de sementes com cloreto de mercúrio, Granosan ou água a 50°C por vinte a vinte e cinco minutos.

Klisiowicz e Pound (1961) empregaram soluções aquosas de terramicina, agrimicina, estreptomomicina, aureomicina, acromicina, cloreto de mercúrio e combinações de antibióticos no tratamento de sementes para o controle da "podridão negra das crucíferas", em laboratório e casa de vegetação. O máximo de inibição de Xanthomonas campestris "in vitro" foi obtido com uma concentração das substâncias de 3.000 ppm. A desinfecção completa de semente

tes de couve e brócoli, naturalmente infectadas, não foi obtida com concentrações de até 3.000 ppm; todavia, a porcentagem de plântulas doentes foi reduzida para menos de 1%. Concluíram ainda que a completa desinfecção das sementes é aparentemente impedida pela falta de absorção das substâncias pelas sementes, ação bacteriostática das tetraciclinas e resistência de Xanthomonas campestris à estreptomomicina.

Malekzadeh (1965) testou soluções aquosas de cloreto de fenacridano (Morton EP-166) em tratamento de sementes de crucíferas, durante trinta minutos, em laboratório e em casa de vegetação, para o controle de Xanthomonas campestris. Sementes inoculadas artificialmente com a bactéria, foram completamente desinfectadas por uma solução da substância na concentração de 500 ppm.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Meios de cultura

a) Nutriente líquido ou caldo simples

peptona	5 g
extrato de carne	3 g
H ₂ O destilada	1000 ml
pH - 7,3	

b) Ágar nutriente

Ao nutriente líquido foram adicionadas 18 g de ágar "Difco" ou "Oxoid".

c) Yeastrel

extrato de levedura	5 g
glicose	20 g
CaCO ₃	20 g
H ₂ O destilada	1000 ml
ágar	18 g
pH - 7,0	

d) Produção de indol

triptona	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O destilada	1000 ml
pH - 7,4	

e) Redução de nitrato

triptona	20 g
K ₂ HPO ₄	2 g
glicose	1 g
KNO ₃	1 g
H ₂ O destilada	1000 ml
pH - 7,6	

f) Fermentação

peptona	5 g
extrato de carne	3 g
glicose	5 g
H ₂ O destilada	1000 ml
pH - 7,4	

Em substituição à glicose, a mesma fórmula foi usada para os testes de sacarose, lactose, glicerol e manitol.

- g) Produção de gás sulfídrico
- | | |
|--|---------|
| proteose-peptona | 20 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 2 g |
| glicose | 1 g |
| água destilada | 1000 ml |
- pH - 7,6
- h) Hidrólise do amido
- | | |
|------------------------|---------|
| peptona | 5 g |
| extrato de carne | 3 g |
| amido | 2 g |
| água destilada | 1000 ml |
- pH - 7,3
- i) Produção de acetil-metil-carbinol
- | | |
|---------------------------------------|---------|
| proteose-peptona | 5 g |
| glicose | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 5 g |
| água destilada | 1000 ml |
- pH - 7,3
- j) Leite-bromocresol púrpura
- | | |
|---|---------|
| leite fresco desnatado .. | 1000 ml |
| solução alcoólica de bromo-
sol púrpura a 1,6% | 1 ml |
- l) Hidrólise da gelatina ...
- | | |
|----------------|-----|
| gelatina | 5 g |
|----------------|-----|
- pH - 7,4
- m) Liquefação de pectato
- | | |
|---------------------------|--------|
| extrato de solo | 500 ml |
| NaCl | 0,5 g |
| CaCl ₂ | 2,5 g |
| extrato de levedura | 0,5 g |
| ágar | 10,0 g |
- pH - 9,0

Distribuir o meio em placas e colocar em dessecador por dois dias. Solução de pectina: Preparar uma solução a 2% de polipectato de sódio. Adicionar 4% de azul de bromotimol e ajustar o pH para 8,0. Autoclavar a 115°C por dois minutos. Distribuir uma camada dessa solução à superfície das placas com o meio atrás, e conservar por oito dias em um dessecador. As placas estão prontas para serem semeadas.

n) Teste de antibióticos

extrato de carne	1,5 g
extrato de levedura	1,5 g
peptona	5,0 g
dextrose	1,0 g
NaCl	3,5 g
K_2HPO_4	3,68 g
KH_2PO_4	1,32 g
água destilada	1000 ml
ágar	18 g
pH - 7,0	

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C, por quinze minutos. Excessão foi feita ao meio de gelatina que foi autoclavado a 110°C por dez minutos. As indicações para tais meios de cultura se encontram nas seguintes publicações: Skerman (1959), Dowson (1957) e Difco Manual (1948).

3.2. Reativos

a) Produção de indol (Ehrlich - Böhme)

Solução a' - p-dimetilaminobenzaldeído	1 g
álcool etílico (95%)	95 ml
HCl concentrado	20 ml
Solução a'' - persulfato de potássio	2 g
H ₂ O destilada	100 ml

Adicionar ao meio da cultura partes iguais das soluções a' e a''. O aparecimento de côr vermelha após 5 minutos, indica que a prova é positiva.

b) Redução de nitrato

Solução b' - ácido sulfanílico	8 g
ácido acético 5 N	1000 ml

Solução b" - α -naftilamina 5 g
 ácido acético 5 N 1000 ml

Colocar algumas gôtas das soluções b' e b" nos tubos de cultura em meio líquido. O aparecimento de uma coloração róseo-avermelhada nítida indica a presença de nitrito.

c) Produção de acetil-metil-carbinol

Prova do vermelho de metila (VM)

 vermelho de metila 0,1 g
 álcool etílico 95% 300 ml
 H₂O destilada 500 ml

Colocar algumas gôtas da solução nos tubos da cultura em meio líquido. O aparecimento de uma coloração vermelha indica que a prova é positiva e coloração amarela indica que é negativa.

Prova de Voges-Proskauer (VP)

Solução c' - naftol 6 g
 álcool etílico a 95% 100 ml

Solução c" - hidróxido de K 16 g
 H₂O destilada 100 ml

A 1 ml do meio da cultura adicionar 0,5 ml de cada solução. Agitar e deixar ao ambiente durante 5 a 15 minutos. O aparecimento de coloração vermelha indica reação positiva (presença de acetil-metil-carbinol).

d) Hidrólise de amido

A hidrólise de amido foi verificada com uma solução diluída de lugol. Coloração azul indica que não houve hidrólise, coloração avermelhada indica hidrólise parcial; líquido incolor, claro, indica hidrólise total, com produção de maltose.

Solução de lugol
 iodo 1 g
 iodeto de potássio 2 g
 H₂O destilada 300 ml

e) Produção de gás sulfídrico

É indicada pelo escurecimento (formação de sulfuretos) de uma tira de papel de filtro impregnado de uma solução saturada de acetato de chumbo. Essa tira é colocada no tubo, presa pelo tampão de algodão, sem tocar o meio.

As indicações para tais reativos podem ser encontradas em Skerman (1959) e Neder (1968).

3.3. Corantes

- a) Solução de cristal violeta (gram)
- | | |
|---------------------------------------|-------|
| Solução a' - cristal violeta | 2 g |
| álcool a 95% | 20 ml |
| Solução a'' - oxalato de amônio | 0,8 g |
| H ₂ O destilada | 80 ml |
- Misturar as soluções a' e a''.
- b) Solução de safranina (gram)
- | | |
|--|--------|
| safranina em sol. alcoólica a 2,5% | 10 ml |
| H ₂ O destilada | 100 ml |
- c) Solução de safranina (esporos)
- | | |
|----------------------------------|-------|
| safranina | 0,5 g |
| álcool | 50 ml |
| H ₂ O destilada | 50 ml |
- d) Solução de verde malaquita (esporos)
- | | |
|----------------------------------|-------|
| verde malaquita | 1 g |
| H ₂ O destilada | 20 ml |

3.4. Antibióticos

Os antibióticos usados foram: sulfato de estreptomicina da Fontoura-Wyeth S.A. e cloridrato de clortetraciclina cristalina da Cyamamid Química do Brasil S.A., divisão Lederle. Os referidos antibióticos serão designados por estreptomicina e aureomicina, respectivamente.

As soluções de antibióticos foram sempre preparadas, momentos antes de serem utilizadas, por dissolução de quantidades apropriadas dos mesmos, em solução salina esterilizada (cloreto de sódio foi dissolvido em água destilada para dar uma solução a 0,89%).

3.5. Isolamento e classificação do patógeno

O presente trabalho foi conduzido com uma linhagem de bactéria isolada da plantação de repólho da Seção de Horticultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Tal repólho era um híbrido de origem japonesa, Shikidori (Ikuta, 1965), inoculado com uma mistura de linhagens de Xanthomonas campestris isoladas de repólho e couve-flor de variedades locais

(Kimoto, 1968).

O isolamento foi feito segundo o método indicado por Dowson, (1957). As hastes ou as nervuras das fôlhas de repôlho, com sintomas da doença, foram selecionadas e desinfectadas superficialmente por flambagem. O córtex foi removido em seguida e um pequeno pedaço do tecido foi retirado da região dos vasos e transferidos para um tubo com 2 ml de água destilada esterilizada, para a obtenção da suspensão bacteriana. Depois de 20 a 30 minutos de repouso, uma alça da suspensão foi semeada numa pequena área de uma placa de petri, contendo meio de Yeastrel; sem flambar a alça, estrias foram feitas em outras áreas dêsse meio de cultura contido na placa, a qual foi, em seguida, incubada a 28°C durante 48 horas. As colônias crescidas separadamente foram purificadas pelo método da diluição em série (Pelczar e Reid, 1965). Dez colônias foram isoladas e submetidas aos testes de identificação.

Para a identificação das bactérias foram feitos os seguintes testes morfológicos e bioquímicos (Skerman, 1959): tipo de crescimento da cultura em tubos com nutriente líquido, tipo da colônia em placas com ágar nutriente, forma e dimensão das células, coloração de gram, motilidade, esporos, produção de gás sulfídrico, hidrólise do amido, redução de nitrato, ação sobre o leite, produção de indol, hidrólise da gelatina, em carboidratos e produção de acetil-metil-carbinol.

Para a classificação usou-se o Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Breed e outros, 1957).

Após a identificação e classificação das bactérias, três linhagens foram conservadas para serem em seguida testadas em relação à patogenicidade.

3.6. Origem das sementes

As sementes empregadas neste trabalho foram cedidas pelo Instituto de Genética e pela Seção de Horticultura da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". São elas, respectivamente, sementes de Repôlho Louco e sementes do híbrido Natsumaki Risô.

3.7. Preparo do solo

Em todos os experimentos cultivou-se o hospedeiro em uma mistura formada de uma parte de terra roxa e uma parte de estêrco de curral peneirado; serviu como cobertura outra parte de estêrco peneirado.

Utilizámos caixas de barro com as dimensões 18 cm de comprimento x 18 cm de largura e 16 cm de altura.

As misturas de solo e estêrco e as caixas foram sempre esterilizadas em autoclave a 120°C e durante 2 horas, com bastante antecedência à sua utilização.

3.8. Câmara úmida

A câmara úmida, para inoculação do patógeno, foi feita dentro da casa de vegetação, cobrindo-se as caixas contendo plântulas, com filmes de polietileno. As caixas eram abundantemente irrigadas antes da colocação do polietileno.

3.9. Inoculação das plântulas

Para o preparo do inóculo, a bactéria isolada foi repicada em 250 ml de nutriente líquido, contidos em frasco Erlenmeyer, e a incubação foi a 28°C durante 96 horas.

Após a incubação, o inóculo foi diluído em água destilada na proporção de 1:1.

A suspensão foi inoculada, por pulverização, nas plântulas previamente submetidas às condições da câmara úmida por 24 horas. Após a pulverização de toda a superfície das folhas, as plântulas foram recolocadas na câmara úmida onde permaneceram por um período de 24 a 36 horas.

Completado esse período, as caixas com plântulas foram retiradas da câmara úmida, e permaneceram na casa de vegetação até a época de seleção.

3.10. Teste de patogenicidade dos isolamentos e reisolamentos

Após a aplicação dos testes para a identificação e classificação das bactérias, três isolamentos foram testados em plântulas, para a verificação da patogenicidade.

Neste teste, utilizamos sementes originárias do Repólho Louco.

Foram usadas 60 plântulas para o teste de cada linhagem e 60 plântulas serviram como controle. Em ambos os casos as sementes foram tratadas com água a 50°C, durante 30 minutos. A inoculação das plântulas foi feita segundo item descrito atrás, sendo que as plântulas controle não sofreram inoculação com o patógeno, e sim apenas pulverização com o meio de cultura líquido diluído.

Após 30 dias, fizemos os reisolamentos do patógeno, seguidos de nova identificação e classificação das três linhagens. Em seguida, dentre essas, escolhemos aquela que se mostrou mais patogênica e esta foi a que utilizamos neste trabalho.

Essa linhagem foi conservada em meio nutriente líquido e repica

da cada três meses.

3.11. Inoculação de meios de cultura

O inóculo usado foi sempre proveniente da linhagem de bactéria isolada semeada em tubos contendo 10 ml de meio nutriente líquido, e incubados a 28°C durante 96 horas.

A inoculação dos meios de cultura foi sempre feita dependendo da natureza do experimento em questão: a) semeadura de 0,1 ml do inóculo sem diluição em tubos com meio líquido ou em placas com meio sólido; b) diluições foram feitas quando requeridas, pipetando-se volumes conhecidos da cultura em 9 ml de solução salina; 0,1 ml da diluição apropriada foi semeado em placas de petri contendo o meio de cultura; um espalhador de vidro, esterilizado em álcool e flambado, foi usado para espalhar a suspensão sobre a superfície do meio de cultura; c) semeadura de 1 ml do inóculo sem diluição em tubo com 20 ml de meio sólido líquido feito e resfriado a 47°C; o conteúdo do tubo foi imediatamente invertido em placa de petri.

3.12. Tratamento das sementes

Tôdas as sementes usadas foram tratadas com água a 50°C durante 30 minutos e deixadas a secar ao ar em papel de filtro, por 24 horas (Walker, 1965).

O tratamento das sementes com os antibióticos estreptomicina e aureomicina, foi feito de acordo com a técnica recomendada por Klisiewicz e Pound (1961). Foram mergulhadas nas soluções de concentração adequada dos respectivos antibióticos, durante 30 minutos e deixadas a secar ao ar em papel de filtro, por 24 horas. A seguir, para moderar a ação fitotóxica dos antibióticos as sementes foram mergulhadas, durante 30 minutos em uma solução de sal específico (0,25 M) e deixadas secar ao ar.

Os sais usados foram cloreto de cálcio e fosfato de potássio monobásico, para as sementes tratadas, respectivamente, com estreptomicina e aureomicina.

A semeadura foi feita em sulco a uma profundidade de 1 cm, e as sementes foram cobertas com estêrco de curral peneirado e esterilizado. Após a germinação as plântulas defeituosas foram eliminadas.

3.13. Outras bactérias usadas em testes dos antibióticos

Bacillus subtilis, IZ-341 e Sarcina lutea, IZ-458, foram empregados como organismos específicos (Klisiewicz e Pound, 1961), em testes de níveis de inibição aos antibióticos usados neste trabalho.

3.14. Sobrevivência do patógeno frente aos antibióticos

3.14.1. Sobrevivência à estreptomicina

Alíquotas de soluções do antibiótico foram adicionadas a tubos com 20 ml de ágar nutriente líquido e resfriado a 47°C, de tal maneira que as concentrações finais foram as seguintes: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0 ug/ml de meio de cultura. O meio foi então invertido em placa de petri, esperado solidificar e em seguida semeado com 0,1 ml de diluições adequadas do inóculo.

Como controle foram semeadas placas com meio de cultura sem antibiótico.

Para cada concentração foram semeadas três placas, assim como para o controle. Foram feitas 3 repetições.

As placas semeadas foram incubadas durante 5 dias, a 28°C. Após esse período efetuou-se a contagem das colônias.

Por comparação entre controle e tratamentos, calculou-se a percentagem de sobrevivência nas diversas concentrações do antibiótico.

3.14.2. Sobrevivência à aureomicina

O mesmo procedimento do item anterior foi usado.

Para a aureomicina as seguintes concentrações finais foram usadas: 0,125; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 ug/ml de meio de cultura.

3.15. Obtenção e isolamento de mutantes resistentes aos antibióticos

3.15.1. Mutantes resistentes à estreptomicina

O método de isolamento foi adotado segundo o modelo de resistência da estreptomicina (Braun, 1966), que é de um só passo mutacional. Procedemos à semeadura de 0,1 ml de inóculo da bactéria sem diluição em 100 placas contendo ágar nutriente mais 64 ug/ml de estreptomicina por mililitro de meio de cultura. Um controle foi feito em placas com o mesmo meio de cultura sem estreptomicina com a finalidade de sabermos o número de células por mililitro de inóculo. Após incubação, através do número de colônias que se desenvolveram nos dois meios, foi calculada a frequência de mutação da bactéria em relação à resistência à estreptomicina.

Em seguida, as colônias que cresceram nessa concentração de estreptomicina, foram isoladas em tubos de ágar nutriente, inclinado. A resistência à estreptomicina, foi então testada novamente pelo seguinte procedimento: 0,1 ml de inóculo de cada uma das linhagens supostas resistentes, foi inoculado, isoladamente, em uma série de tubos com nutriente líquido,

com as seguintes concentrações finais do antibiótico: 0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0; 512,0; 1024,0; 2048,0 ug/ml de meio de cultura. Os tubos com 0 ug/ml de estreptomicina serviram como controle. Outro controle feito foi a inoculação da linhagem original sensível em meio com as mesmas concentrações de estreptomicina usadas para os tratamentos. Após 4 dias de incubação a 28°C foi observada a turvação do líquido.

3.15.2. Mutantes resistentes à aureomicina

Utilizámos o método da placa em gradientes (Braun, 1966), recomendado segundo modelo de resistência da aureomicina que é de vários passos mutacionais. Consiste na preparação de uma placa com ágar, contendo uma concentração do agente inibidor, a qual vai aumentando linearmente ao longo de um eixo horizontal da placa. Quando essas placas são semeadas com uma suspensão de bactérias, só as células resistentes formam colônias à medida que o gradiente da concentração do antibiótico vai aumentando. Repicando as colônias que se desenvolveram nas zonas de concentração crescente, a resistência poderá ser aumentada posteriormente, pela repetição da técnica, mas com uma concentração de antibiótico duas e quatro vezes maior.

Os gradientes usados para a aureomicina foram os seguintes: 0 a 0,125 ug/ml; 0 a 0,25 ug/ml; 0 a 0,50 ug/ml; 0 a 1,0 ug/ml; 0 a 2,0 ug/ml; 0 a 4,0 ug/ml e 0 a 8,0 ug/ml. Foram feitas três placas para as três primeiras concentrações e dez placas para as três últimas.

Colônias isoladas do gradiente mais elevado no qual conseguiram se desenvolver, foram ensaiadas em meio líquido, à mesma maneira do descrito para a estreptomicina, porém empregando as seguintes concentrações de aureomicina: 0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 ug/ml de meio de cultura. Da mesma maneira que para a estreptomicina, serviram como controle os meios, contendo 0 ug de aureomicina por mililitro de meio de cultura original sensível ensaiada nas mesmas concentrações de aureomicina. Após quatro dias de incubação a 28°C, foi observado o crescimento através da turvação de cultura líquido.

3.16. Determinação dos níveis inibitórios e da absorção dos antibióticos.

3.16.1. Níveis inibitórios dos antibióticos no isolamento da bactéria, através do método da difusão pelo uso de discos de papel de filtro.

A tubos com 20 ml de meio de cultura sólido, líquido feito e resfriado a 47°C, foi adicionado 1 ml de inóculo da bactéria sem diluição. Os

meios inoculados foram, então invertidos em placas de petri e deixados solidificar.

Discos de papel de filtro (Carl Schleicher e Schuell Co., nº 740-E) foram colocados nas extremidades de alfinêtes entomológicos fixados em uma peça retangular de parafina. Com o auxílio de uma pipeta foram impregnados com 0,1 ml das diferentes concentrações das soluções de antibióticos usadas, e aí deixados por uma hora ou tempo suficiente para que se apresentassem sêcos.

As soluções dos antibióticos usadas foram preparadas a fim de impregnar os discos de papel de filtro com as seguintes quantidades de estreptomicina: 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0; 512,0; 1024,0; 1536,0 e 2048,0 ug e as seguintes de aureomicina: 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0; 512,0; 1024,0; 1536,0 e 2048,0 ug.

Com o auxílio de uma pinça, os discos foram colocados sobre o meio de cultura inoculado e solidificado. Por placa de petri foi colocado um disco de papel de filtro impregnado com determinada concentração de antibiótico. Para cada concentração de antibiótico foram usados três discos de papel de filtro.

As zonas de inibição foram medidas com um compasso medidor, depois de 24 horas de incubação a 28°C.

3.16.2. Absorção de antibiótico pelas sementes e sua ação sobre organismos específicos aos antibióticos.

A tubos com 20 ml de meio de cultura sólido liq~~ue~~feito e resfriado a 47°C, foi adicionado 1 ml de inóculo de Bacillus subtilis por tubo, organismo teste para a atividade de estreptomicina e 1 ml de Sarcina lutea, organismo teste para a atividade de aureomicina. Os meios inoculados foram, então invertidos em placas de petri e deixados a solidificar.

As sementes utilizadas foram originadas do híbrido Natsumaki-Risô e tratadas com água quente, antibiótico e solução de sal específico, de acordo com o já descrito no item 3.12.

As sementes foram tratadas com soluções de estreptomicina nas seguintes concentrações: 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0; 1024,0; 1536,0 e 2048,0 ug/ml e com as seguintes concentrações de aureomicina: 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0; 512,0; 1024,0; 1536,0 e 2048,0 ug/ml.

Com o auxílio de uma pinça flambada, as sementes foram colocadas sobre o meio de cultura solidificado. Foram colocadas três sementes, com diferentes concentrações de antibiótico por placa. Foram feitas três

repetições para cada série de concentração de antibiótico.

As sementes não tratadas, mas previamente mergulhadas em água destilada, por trinta minutos, foram usadas, como controle.

As zonas de inibição foram medidas com um compasso medidor, depois de 24 horas de incubação a 28°C.

3.16.3. Absorção de antibióticos pelas sementes e níveis inibitórios, usando-se a bactéria isolada.

O mesmo procedimento do item anterior foi desenvolvido, utilizando-se, como inóculo, 1 ml da bactéria isolada.

As sementes utilizadas foram da mesma origem e sofreram o mesmo tratamento já citado no item anterior, empregando-se as mesmas concentrações dos antibióticos. Sementes não tratadas, mas previamente mergulhadas em água destilada por 30 minutos, foram usadas como controle.

As zonas de inibição foram medidas com um compasso medidor, depois de 24 horas de incubação a 28°C.

3.16.4. Tratamento de sementes com estreptomicina e aureomicina e determinação dos níveis inibitórios em mutantes resistentes a êsses antibióticos.

3.16.4.1. Inibição dos mutantes por sementes tratadas com estreptomicina.

A tubos com 20 ml de meio de cultura sólido líquidofeito e resfriado a 47°C, foi adicionado 1 ml de uma cultura do mutante resistente a 64,0 ug/ml de estreptomicina, 1 ml de inóculo de uma cultura mutante resistente a 8,0 ug/ml de aureomicina e 1 ml de inóculo de uma cultura sensível a êsses antibióticos, por tubo, respectivamente. Os meios inoculados foram invertidos em placas de petri e deixados solidificar.

Sementes tratadas com concentrações de estreptomicina que variaram de 4,0 a 2048,0 ug/ml, de acôrdo com o já citado no item 3.12., foram colocadas nas placas de petri com meio de cultura inoculado, em número de três por placa e por concentração. Foram feitas três repetições.

3.16.4.2. Inibição dos mutantes por sementes tratadas com aureomicina.

Placas de petri, contendo meio de cultura, foram preparadas e inoculadas com as mesmas culturas já mencionadas no item 3.16.4.1.

Sementes tratadas com concentrações de aureomicina que variaram de 4,0 a 2048,0 ug/ml, de acôrdo com o já citado no item 3.12., foram colocadas nas placas, em número de três por placa e por concentração. Foram fei

tas três repetições.

3.17. Avaliação do comportamento das sementes inoculadas artificialmente com os mutantes da bactéria, resistentes aos antibióticos.

As sementes foram inicialmente tratadas com água a 50°C, durante trinta minutos e deixadas a secar ao ar em papel de filtro por 24 horas. Em seguida, procedemos à inoculação das mesmas, mergulhando-as em dois tubos de cultura líquida, nos quais se encontravam desenvolvidos, respectivamente, os mutantes de bactéria resistentes à estreptomicina e à aureomicina. As sementes aí permaneceram por três horas, sendo depois colocadas a secar ao ar, em papel de filtro, por 24 horas.

A seguir, as sementes inoculadas com mutante resistente à estreptomicina foram tratadas com êsse antibiótico, de acordo com as indicações do item 3.12., nas seguintes concentrações: 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0; 512,0; 1024,0; 1536,0 e 2048,0 ug/ml.

O mesmo foi feito em relação às sementes inoculadas com o mutante resistente à aureomicina, porém empregando-se no tratamento das mesmas, as seguintes concentrações do aureomicina: 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0; 512,0; 1024,0; 1536,0 e 2048,0 ug/ml.

Tôdas as sementes foram, em seguida, com o auxílio de uma pinça flambada, colocadas em placas de petri, contendo 20 ml de meio de cultura sólido apropriado. Cada placa de petri comportou três sementes tratadas com a mesma concentração do antibiótico; foram feitas três repetições de cada placa, para cada série de concentração de cada antibiótico. As placas foram incubadas a 28°C e examinadas diariamente, durante dezoito dias, a fim de se observar o crescimento ou não da bactéria.

Como controle, o mesmo procedimento foi desenvolvido, porém usando-se para a inoculação das sementes uma cultura líquida do isolamento sensível da bactéria. Estas placas também foram incubadas a 28°C, e o período de observação foi de 18 dias.

3.18. Inoculação de plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com os antibióticos.

3.18.1. Avaliação do nível de inibição do mutante resistente à aureomicina, em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com aureomicina.

Sementes de repólho híbrido Natsumaki-Risô sofreram o tratamento já descrito no item 3.12., empregando-se as seguintes concentrações de aureomicina: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0 e 1,000,0 ml de solu

ção.

A semeadura foi feita em sulco, em caixas preparadas de acordo com o item 3.7.. Após a germinação, as plântulas defeituosas foram eliminadas e um desbaste foi feito para reduzir o número de plântulas para 20, em cada caixa. Para cada concentração de antibiótico empregada no tratamento das sementes, foram usadas três caixas (60 plântulas).

Após o aparecimento das duas primeiras folhas verdadeiras, foi feita a inoculação das plântulas, por pulverização, segundo o descrito no item 3.9..

O inóculo usado foi de uma cultura líquida do mutante resistente a 8,0 ug/ml de aureomicina e diluída em água destilada esterilizada na proporção de 1:1.

Como controle foram inoculadas 60 plântulas (3 caixas), de sementes que não sofreram tratamento pela aureomicina.

3.18.2. Avaliação dos níveis de inibição de mutantes resistentes à estreptomicina e à aureomicina em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com esses antibióticos.

Sementes de repólho do híbrido Natsumaki-Risô foram tratadas com água a 50°C. Em seguida, foram separadas em três grupos. Para cada grupo foram usadas aproximadamente seiscentas sementes. No primeiro grupo conservaram-se as sementes sem tratamento posterior, que serviram como controle. No segundo grupo, foram tratadas com uma solução de 1000,0 ug de estreptomicina por mililitro de solução. No terceiro grupo, as sementes foram tratadas com uma solução de 16,0 ug de aureomicina por mililitro de solução. Cada grupo continha quatro caixas e três repetições. Em cada caixa, após o desbaste, ficaram vinte plântulas. Os tratamentos das sementes foram feitos de acordo com o item 3.12..

Após o aparecimento das duas primeiras folhas verdadeiras, foi feita a inoculação das plântulas, segundo o descrito no item 3.9..

Os inóculos usados foram (quadro I): a) cultura líquida do mutante resistente à estreptomicina, diluída em água destilada, na proporção de 1:1; com essa cultura foram inoculadas: plântulas de sementes tratadas com estreptomicina e plântulas de sementes tratadas com aureomicina; b) cultura líquida do mutante resistente à aureomicina, diluída em água destilada, na proporção de 1:1; com essa cultura foram inoculadas plântulas de sementes tratadas com água a 50°C, plântulas de sementes tratadas com estreptomicina e plântulas de sementes tratadas com aureomicina; c) cultura líquida da bactéria isolada, sensível, diluída em água destilada, na proporção de

1:1; com essa cultura foram inoculadas plântulas de sementes tratadas com água a 50°C, plântulas de sementes tratadas com estreptomina e plântulas de sementes tratadas com aureomicina; d) meio de cultura líquido, livre do patógeno; com esse meio foram, também pulverizadas as plântulas de sementes tratadas com estreptomina e plântulas de sementes tratadas com aureomicina. As plântulas, após a inoculação foram conservadas em estufa por trinta dias, quando então foi feita a avaliação da severidade da doença.

Quadro I - Esquema da distribuição dos tratamentos das sementes e tipos de inoculação usados nas plântulas.

Sementes tratadas com	Inoculação de Patógeno			Sem inóculo
	Sensível	Mutante resistente à estreptomina	Mutante resistente à aureomicina	
Água a 50°C	20	20	20	20
	20	20	20	20
	20	20	20	20
Estreptomina (1.000,0 ug/ml)	20	20	20	20
	20	20	20	20
	20	20	20	20
Aureomicina (16,0 ug/ml)	20	20	20	20
	20	20	20	20
	20	20	20	20

3.19. Método de avaliação da severidade da doença.

Para a avaliação das plantas doentes empregamos o critério utilizada por Tokeshi (1966), com modificações de Neder e outros (1964), isto é, leituras efetuadas com trinta dias após a inoculação e classificação das plântulas de acordo com os sintomas macroscópicos internos e externos, causados por Xanthomonas.

O critério usado na classificação das plântulas foi o seguinte:

Nota	Sintomas apresentados pelas plântulas
0	Plantas sadias sem sintomas externos ou internos observáveis no caule cortado na altura do primeiro internódio, logo acima dos cotilédones.
1	Vasos coloridos na região do primeiro internódio sem outros sintomas visíveis.
2	Vasos coloridos até a altura da primeira fôlha, com pelo menos, um folíolo com amarelecimento.
3	Vasos coloridos até a metade do comprimento do caule, com duas ou mais fôlhas com amarelecimento.
4	Vasos coloridos até próximo ao ponteiro; maioria das fôlhas murchas, com exceção do ponteiro.
5	Plantas mortas, ou com vasos coloridos e fôlhas murchas até o ponteiro.

3.20. Métodos de análise estatística

Na realização das análises estatísticas, todos os dados foram transformados para arco seno \sqrt{P} , de acôrdo com Snedecor (1956).

Foi utilizado o teste de Tukey para as comparações das médias, de acôrdo com Pimentel Gomes (1966).

3.21. Reisolamento e caracterização das bactérias mutantes resistentes.

Após a avaliação da severidade da doença, procedeu-se o reisolamento e identificação dos patógenos resistentes aos antibióticos, de acôrdo com o já descrito no item 3.5.. Foram tomadas ao acaso vinte plântulas doentes provenientes de sementes tratadas com estreptomicina e inoculadas com bactéria mutante resistente à estreptomicina e vinte plântulas provenientes de sementes tratadas com aureomicina e inoculadas com bactéria mutante resistente à aureomicina.

As vinte primeiras linhagens de bactérias reisoladas foram desenvolvidas em meio nutriente líquido e incubadas por 56 horas a 28°C. Em seguida, 0,1 ml dessas culturas desenvolvidas foram semeadas em placas de petri, contendo nutriente ágar adicionado de estreptomicina nas concentrações finais de 64,0; 1024,0 e 2048,0 ug por mililitro de meio de cultura. Foram feitas três placas para cada linhagem. Foram incubadas por 96 horas a 28°C.

As outras vinte linhagens reisoladas foram da mesma maneira semeadas em placas de petri, contendo nutriente ágar adicionado de aureomicina numa concentração final de 8,0 ug por mililitro de meio de cultura. Foram feitas três placas para cada linhagem. Foram incubadas por 96 horas a 28°C.

4. RESULTADOS OBTIDOS

4.1. Isolamento e classificação do patógeno.

Após a purificação das dez colônias isoladas das hastes de repô-
lho, tipicamente infestadas, aplicaram-se os testes morfológicos e bioquímicos para a identificação das mesmas. Três dessas culturas apresentaram os seguintes resultados:

Tipo de crescimento da cultura em tubos com nutriente líquido: turvação com formação de anel e película.

Tipo de colônia em ágar nutriente: amarela, redonda, lisa, brilhante, translúcida, margens inteiras.

Temperatura ótima de desenvolvimento: entre 28 e 30°C.

Forma: bacilos isolados.

Dimensão: 0,3 a 0,5 u de largura por 1,0 a 2,0 u de comprimento.

Motilidade: móveis.

Coloração de gram: gram-negativo.

Coloração de esporos: esporos ausentes.

Produção de gás sulfídrico: positiva.

Hidrólise do amido: positiva.

Redução de nitrato: nitrato não produzido

Ação sobre o leite: reação alcalina, caseína digerida.

Produção de indol: fracamente produzido.

Hidrólise da gelatina: positiva.

Ação em carboidratos: ácido, mas não gás produzido de glucose, sacarose, lactose, glicerol e manitol.

Liquefação de pectato: positiva.

Produção de acetil-metil-carbinol:

a- Produção do vermelho de metila - negativa.

b- Prova de Voges-Proskauer - negativa

Pela chave de classificação do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, de Breed e outros (1957), essas três linhagens de bactéria isoladas ficaram enquadradas dentro do gênero Xanthomonas, e na chave de espécies desse gênero, se classificaram como Xanthomonas campestris (Pammel,

1895) Dowson, 1939.

4.2. Teste de patogenicidade de Xanthomonas campestris e reisolamentos.

Nos testes de patogenicidade, as plântulas inoculadas apresentaram sintomas nas fôlhas entre quatro a cinco dias após a inoculação. Primeiramente, os bordos das fôlhas mostraram pontos necróticos. Partindo desses pontos, os tecidos tornavam-se amarelos e as necroses progrediam para o centro da fôlha, usualmente em forma de V, com base voltada para a nervura central. Nos tecidos cloréticos as nervuras apresentavam-se de cor escura. Ocorreram necroses nos tecidos vasculares.

Das três linhagens testadas quanto à sua patogenicidade em relação às plântulas de repolho Louco, encontramos que uma delas causou total prejuízo, apresentando um resultado de 100% de plântulas doentes. Esta foi a escolhida para a realização deste trabalho. Reisolamentos das linhagens utilizadas neste teste, de acordo com o item 3.10., foram submetidas aos testes de identificação (item 3.5.), confirmando tratar-se, como era esperado, de Xanthomonas campestris.

4.3. Sobrevivência de Xanthomonas campestris frente aos antibióticos.

4.3.1. Sobrevivência à estreptomicina.

O número de células sobreviventes nas diversas concentrações de estreptomicina, encontram-se no quadro II. Colocando-se num gráfico a percentagem de sobreviventes em relação às concentrações de estreptomicina, vamos obter uma curva que vai nos mostrar como se processa a queda de viabilidade com o aumento de concentração de antibiótico (gráfico 1). A linha pontilhada nesse gráfico, indica como se processaria, teoricamente a queda de viabilidade, se o material fosse uniforme com relação à resistência à estreptomicina.

4.3.2. Sobrevivência à aureomicina.

As percentagens de sobreviventes nas diversas concentrações de aureomicina usadas, encontram-se no quadro III. O gráfico 2 mostra a curva de resistência da bactéria ao antibiótico. A linha pontilhada indica como continuaria, teoricamente a curva, se a população fosse uniforme com relação à aureomicina.

4.4. Obtenção e isolamento de mutantes resistentes aos antibióticos.

4.4.1. Mutantes resistentes à estreptomicina.

As cem placas de petri, contendo 20 ml de nutriente ágar mais

64,0 ug de estreptomicina por mililitro, semeadas com 0,1 ml da linhagem da bactéria sensível, apresentaram um total de vinte e três colônias desenvolvidas ou seja, colônias mutantes resistentes a essa concentração de estreptomicina. Pelo contróle feito, pôde-se saber que o título da população semeada foi de 7×10^9 bactérias por mililitro de inóculo. No total das cem placas foi, então semeada uma população de 7×10^{10} . Portanto, vinte e três mutantes numa população de 7×10^{10} bactérias sensíveis, nos permite dizer que a frequência de mutação, nessa população e com essa concentração de antibiótico, foi de um mutante em $3,04 \times 10^9$ células de bactérias.

Essas vinte e três colônias mutantes resistentes à estreptomicina foram isoladas em tubos de ágar nutriente inclinado e foram testadas novamente em relação a diferentes doses de estreptomicina em meio de cultura líquido; foram observadas quanto ao crescimento pela turvação produzida no meio de cultura por comparação com a turvação produzida em meio de cultura sem estreptomicina. Os resultados relativos a cinco dêsses mutantes, encontram-se no quadro IV.

Quadro II - Percentagem de sobreviventes de Xanthomonas campestris sensível à estreptomicina adicionada ao meio sólido.

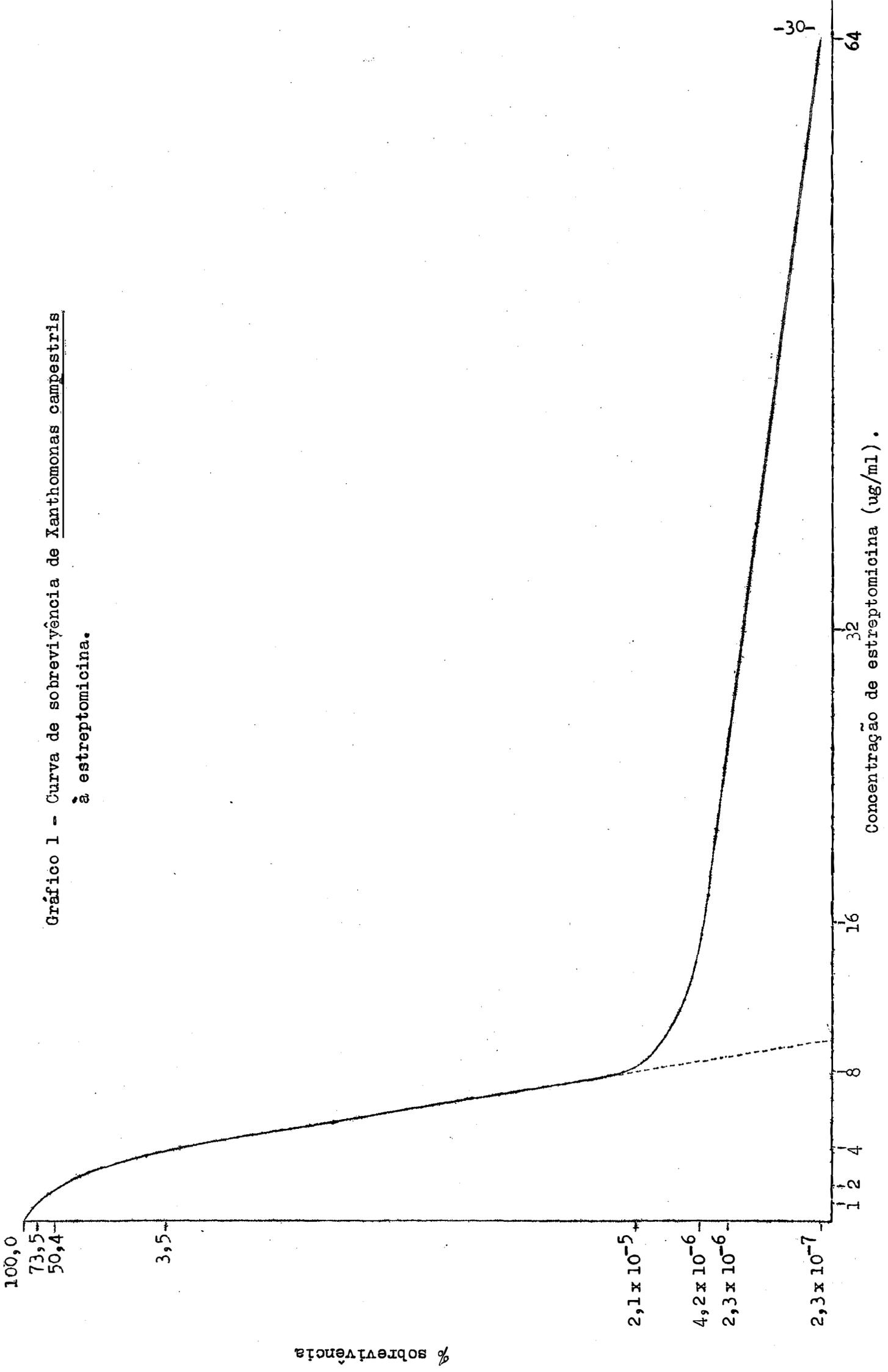
(Média de três experimentos)

Concentração de estreptomicina ug/ml	diluição [≡]	Nº médio de colônia por placa ⁺	Nº de sobreviventes	Percentagem de sobreviventes	Percentagem média
0,0	10 ⁻⁶	106	1,0 x 10 ⁹	100,0	100,0
		141	1,4 x 10 ⁹	100,0	
		80	8,4 x 10 ⁸	100,0	
1,0	10 ⁻⁶	69	6,9 x 10 ⁸	69,0	73,5
		97	9,7 x 10 ⁸	69,2	
		66	6,6 x 10 ⁸	82,5	
2,0	10 ⁻⁶	47	4,7 x 10 ⁸	47,0	50,4
		71	7,1 x 10 ⁸	50,7	
		43	4,3 x 10 ⁸	53,7	
4,0	10 ⁻⁵	40	4,0 x 10 ⁷	4,0	3,5
		58	5,8 x 10 ⁷	4,1	
		20	2,0 x 10 ⁷	2,5	
8,0	s/ diluir	25	2,5 x 10 ²	2,5 x 10 ⁻⁵	2,1 x 10 ⁻⁵
		30	3,0 x 10 ²	2,1 x 10 ⁻⁵	
		14	1,4 x 10 ²	1,7 x 10 ⁻⁵	
16,0	s/ diluir	11	1,1 x 10 ²	1,1 x 10 ⁻⁵	4,2 x 10 ⁻⁶
		9	9,0 x 10 ¹	6,4 x 10 ⁻⁶	
		5	5,0 x 10 ¹	6,2 x 10 ⁻⁶	
32,0	s/ diluir	3	3,0 x 10 ¹	3,0 x 10 ⁻⁶	2,3 x 10 ⁻⁶
		2	2,0 x 10 ¹	1,4 x 10 ⁻⁶	
		2	2,0 x 10 ¹	2,5 x 10 ⁻⁶	
64,0	s/ diluir	0	0	0	2,3 x 10 ⁻⁷
		1	1,0 x 10 ¹	7,0 x 10 ⁻⁷	
		0	0	0	

≡ 0,1 ml semeado

+ pelo menos três placas

Gráfico 1 - Curva de sobrevivência de *Xanthomonas campestris* à estreptomicina.



% sobrevivência

Quadro III - Percentagem de sobreviventes de Xanthomonas campestris sensível à aureomicina adicionada ao meio sólido.

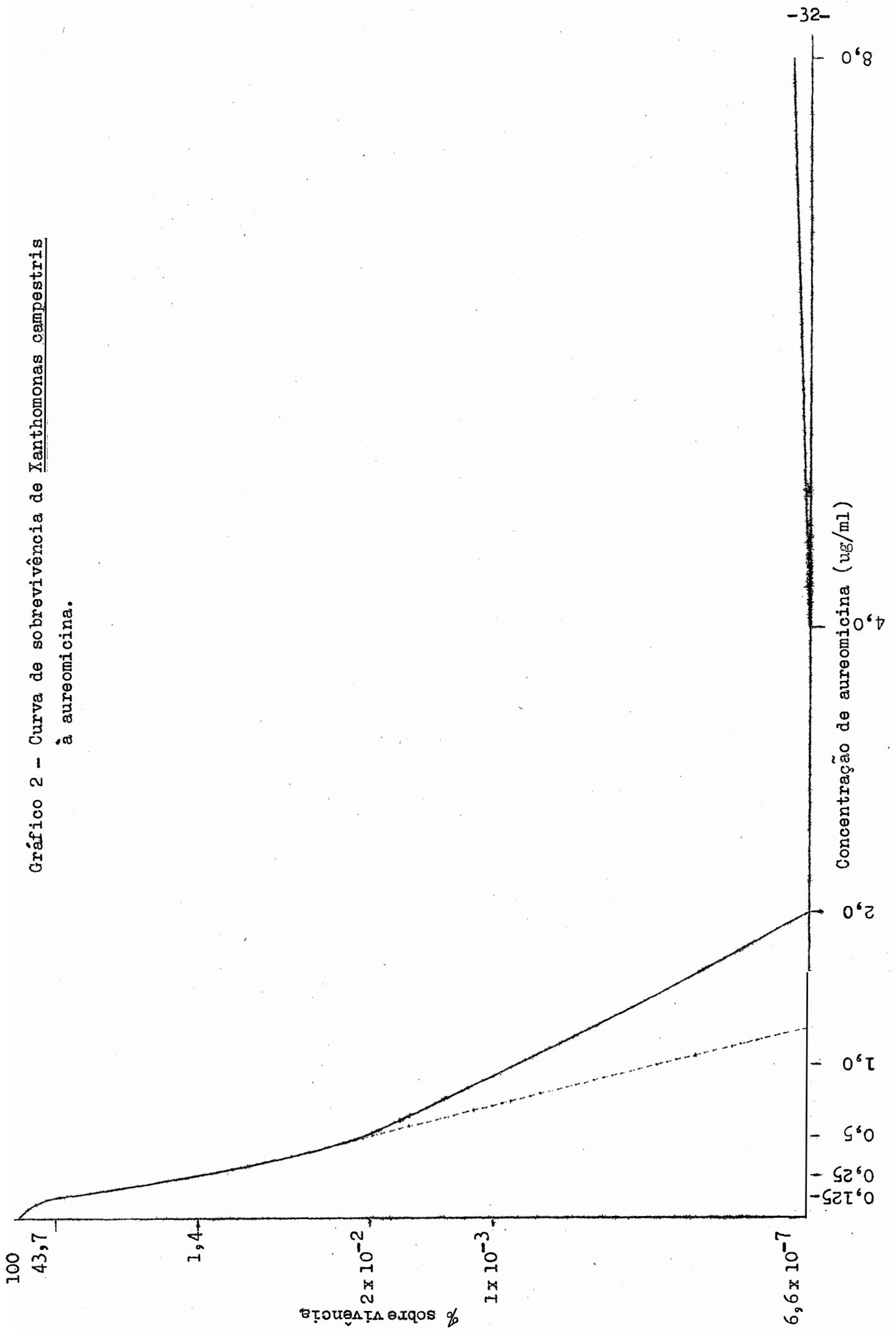
(Média de três experimentos)

Concentração de aureomicina ug/ml	diluição [≡]	Nº médio de colônia por placa ⁺	Nº de sobreviventes	Percentagem de sobreviventes	Percentagem média
0,0	10 ⁻⁶	45	4,5 x 10 ⁸	100,0	100,0
		54	5,4 x 10 ⁸	100,0	
		42	4,2 x 10 ⁸	100,0	
0,125	10 ⁻⁶	21	2,1 x 10 ⁸	46,0	43,7
		23	2,3 x 10 ⁸	42,5	
		19	1,9 x 10 ⁸	45,2	
0,25	10 ⁻⁴	73	7,3 x 10 ⁶	1,6	1,4
		65	6,5 x 10 ⁶	1,2	
		60	6,0 x 10 ⁶	1,4	
0,50	10 ⁻²	94	9,4 x 10 ⁴	2 x 10 ⁻²	2 x 10 ⁻²
		110	1,1 x 10 ⁵	2 x 10 ⁻²	
		105	1,0 x 10 ⁵	2 x 10 ⁻²	
1,00	10 ⁻¹	68	6,8 x 10 ³	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻³
		72	7,2 x 10 ³	1 x 10 ⁻³	
		61	6,1 x 10 ³	1 x 10 ⁻³	
2,00	s/ diluir	0	0	0	0
		0	0	0	
		0	0	0	
4,00	s/ diluir	0	0	0	0
		0	0	0	
		0	0	0	
8,00	s/ diluir	0	0	0	6,6 x 10 ⁻⁷
		0	0	0	
		1	1 x 10 ¹	2 x 10 ⁻⁶	

≡ 0,1 ml semeado

+ pelo menos três placas

Gráfico 2 - Curva de sobrevivência de Xanthomonas campestris à aureomicina.



Quadro IV - Mutantes resistentes à estreptomicina testados em meio líquido mais diferentes concentrações de antibiótico.

Colônias testadas	Concentração de estreptomicina (ug/ml)												
	0	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	1536	2048
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mutante 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linhagem sensível	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ crescimento

- não crescimento

4.4.2. Mutantes resistentes à aureomicina

No isolamento de mutantes resistentes à aureomicina, obteve-se crescimento de três colônias em zonas do gradiente com concentração, aproximadamente de 3 ug do antibiótico, por mililitro de meio. Essas colônias de pois do reisoladas e inoculadas no gradiente de 0,0 a 8,0 ug/ml de aureomicina não apresentaram resistência às concentrações maiores que 3,0 ug/ml.

Contudo, neste trabalho, foi obtido um mutante resistente a 8,0 ug de aureomicina por mililitro de meio de cultura. Esse mutante apareceu quando se realizou a avaliação da sobrevivência de Xanthomonas campestris em relação a diferentes doses de aureomicina (item 3.14.2.).

Três linhagens mutantes resistentes a 3,0 ug de aureomicina e a linhagem resistente a 8,0 ug, quando ensaiadas em meio líquido com diversas concentrações desse antibiótico, apresentaram os resultados que se encontram no quadro V.

Quadro V - Mutantes resistentes à aureomicina testados em meio líquido com diferentes concentrações do antibiótico.

Colônias testadas	Concentração de aureomicina (ug/ml)					
	0	2	4	8	16	32
Mutante 1	+	+	-	-	-	-
Mutante 2	+	+	-	-	-	-
Mutante 3	+	+	-	-	-	-
Mutante 8	+	+	+	+	-	-
Linhagem sensível	+	-	-	-	-	-

+ crescimento

- não crescimento

mutantes 1, 2, 3 são resistentes a 3 ug/ml

mutante 8 é resistente a 8,0 ug/ml

4.5. Determinação dos níveis inibitórios e da absorção dos antibióticos.

4.5.1. Níveis inibitórios dos antibióticos em Xanthomonas campestris através do método da difusão, pelo uso de discos de papel de filtro.

A inibição de Xanthomonas campestris pelos dois antibióticos foi determinada em concentrações dos antibióticos que variaram de 4,0 a 2048,0 ug. Os resultados dados pelos diâmetros dos halos de inibição, encontram-se no quadro VI.

Quadro VI - Inibição de Xanthomonas campestris pelos dois antibióticos, determinada pelo método da difusão com disco de papel de filtro.

(Média de três repetições)

Concentrações dos antibióticos ug	Diâmetro dos halos de inibição (mm)	
	<u>Xanthomonas campestris</u>	
	estreptomicina	aureomicina
0,0	0,0	0,0
4,0	4,0	17,0
8,0	10,0	26,0
16,0	14,0	29,0
32,0	21,0	31,0
64,0	23,0	32,0
128,0	25,0	33,0
256,0	27,0	34,0
512,0	28,0	35,0
1024,0	30,0	37,0
1536,0	30,0	37,0
2048,0	30,0	37,0

4.5.2. Absorção dos antibióticos pelas sementes e sua ação sobre organismos específicos aos antibióticos.

A absorção dos antibióticos pelas sementes foi medida nas zonas de inibição do crescimento de Bacillus subtilis e de Sarcina lutea, em meio de cultura inoculado com êsses organismos. A inibição dessas duas bactérias foi determinada em concentrações que variaram de 4,0 a 2048,0 ug/ml. Os resultados dados pelos diâmetros dos halos de inibição, encontram-se no quadro VII.

Quadro VII - Inibição de Bacillus subtilis e Sarcina lutea por sementes tratadas com estreptomomicina e com aureomicina, respectivamente.

(Média de três repetições)

Concentrações dos antibióticos ug/ml	Diâmetro dos halos de inibição (mm)	
	<u>Bacillus subtilis</u>	<u>Sarcina lutea</u>
	estreptomomicina	aureomicina
0,0	0,0	0,0
4,0	0,4	3,6
8,0	0,5	4,0
16,0	1,2	5,3
32,0	2,3	7,6
64,0	3,6	9,0
128,0	5,0	10,0
256,0	7,0	12,0
512,0	8,2	12,6
1024,0	9,3	13,8
1536,0	11,4	14,6
2048,0	13,2	15,8

4.5.3. Absorção dos antibióticos pelas sementes e sua ação sobre Xanthomonas campestris.

A absorção dos antibióticos pelas sementes foi medida pelas zonas de inibição do crescimento de Xanthomonas campestris, que se formaram pela difusão do antibiótico para o meio de cultura inoculado com esse microrganismo. A inibição dessa bactéria foi determinada em concentrações que variaram de 4,0 a 2048,0 ug/ml (quadro VIII).

Quadro VIII - Inibição de Xanthomonas campestris por sementes tratadas com estreptomomicina e aureomicina.

(Média de três repetições)

Concentrações dos antibióticos ug/ml	Diâmetro dos halos de inibição (mm)	
	<u>Xanthomonas campestris</u>	
	estreptomomicina	aureomicina
0,0	0,0	0,0
4,0	0,0	1,5
8,0	2,6	2,8
16,0	2,8	5,4
32,0	3,0	6,5
64,0	3,3	9,0
128,0	3,8	10,5
256,0	4,6	12,0
512,0	7,6	12,8
1024,0	8,0	13,0
1536,0	10,3	14,2
2048,0	12,2	15,7

4.5.4. Tratamento de sementes com estreptomomicina e aureomicina e determinação dos níveis inibitórios em mutantes de Xanthomonas campestris resistentes a esses antibióticos.

4.5.4.1. Inibição dos mutantes de Xanthomonas campestris por sementes tratadas com estreptomomicina.

As zonas de inibição dos mutantes de Xanthomonas campestris resistentes aos antibióticos, determinadas por sementes tratadas com estreptomomicina, acham-se no quadro IX. O mutante resistente à estreptomomicina não apresentou inibição por sementes tratadas até com uma solução de concentração de 2048,0 ug/ml. O mutante resistente à aureomicina não apresentou inibição por sementes tratadas até com uma solução de 256,0 ug de estreptomomicina por mililitro. A linhagem sensível mostrou inibição para todas as concentrações usadas, exceto à de 4,0 ug/ml.

Quadro IX - Zonas de inibição dos mutantes determinadas por sementes tratadas com estreptomicina.

(Média de três repetições)

Estreptomicina ug/ml	Diâmetro dos halos de inibição (mm)		
	<u>Xanthomonas campestris</u>		
	sensível	mutante resistente à estreptomicina	mutante resistente à aureomicina ^{tv}
4,0	0,0	0,0	0,0
8,0	2,5	0,0	0,0
16,0	2,7	0,0	0,0
32,0	3,1	0,0	0,0
64,0	3,3	0,0	0,0
128,0	4,0	0,0	0,0
256,0	4,8	0,0	0,0
512,0	7,2	0,0	2,6
1024,0	8,2	0,0	4,3
1536,0	9,8	0,0	5,3
2048,0	12,5	0,0	7,2

4.5.4.2. Inibição dos mutantes de Xanthomonas campestris por sementes tratadas com aureomicina.

As zonas de inibição dos mutantes de Xanthomonas campestris resistentes aos antibióticos, determinadas por sementes tratadas com aureomicina, acham-se no quadro X.

O mutante resistente à aureomicina não apresentou zona de inibição nas concentrações de 4,0 e 8,0 ug de aureomicina por mililitro de solução; a partir dessas concentrações, as medidas dos halos de inibição podem ser vistas no quadro X. O mutante resistente à estreptomicina não apresentou zona de inibição até a concentração de 32,0 ug de aureomicina por mililitro da solução; a partir dessa concentração esse mutante passou a ser inibido. A linhagem sensível mostrou halo de inibição em tôdas as concentrações usadas no tratamento das sementes.

Quadro X - Zonas de inibição dos mutantes determinadas por sementes tratadas com aureomicina.

(Média de três repetições)

Aureomicina ug/ml	Diâmetro dos halos de inibição (mm)		
	sensível	mutante resistente à estreptomicina	mutante resistente à aureomicina
4,0	2,0	0,0	0,0
8,0	4,2	0,0	0,0
16,0	5,3	0,0	3,8
32,0	6,7	0,0	5,2
64,0	8,8	8,0	8,0
128,0	9,5	8,3	8,6
256,0	11,7	10,0	9,0
512,0	12,8	10,8	11,0
1024,0	13,3	12,0	13,8
1536,0	14,7	12,6	15,3
2048,0	16,2	13,2	17,3

4.6. Avaliação do comportamento das sementes inoculadas artificialmente com os mutantes de Xanthomonas campestris resistentes aos antibióticos.

As sementes inoculadas artificialmente com o mutante de Xanthomonas campestris resistente à estreptomicina e tratadas com esse antibiótico, em concentrações que variaram de 4,0 a 2048,0 ug/ml de solução, apresentaram crescimento em tôdas as placas com meio de cultura onde foram colocadas. Tôdas as sementes inoculadas com Xanthomonas campestris sensível, que serviram como contrôlo, tiveram seu crescimento completamente inibido pelo antibiótico.

As sementes inoculadas, artificialmente com o mutante de Xanthomonas campestris resistente à aureomicina e tratadas com esse antibiótico em concentrações que variaram de 2,0 a 2048,0 ug/ml de solução, apresentaram os seguintes resultados: houve crescimento do patógeno nas placas onde estavam sementes tratadas com até 8,0 ug do antibiótico por mililitro da solução. A partir dessa concentração, essa linhagem mutante, testada não apresentou crescimento no meio de cultura, mostrando-se, portanto, sensível à concentração do antibiótico, superiores a 8,0 ug/ml. Tôdas as sementes ino

culadas com Xanthomonas campestris sensível, tiveram crescimento completamente inibido pelo tratamento com a aureomicina.

4.7. Inoculação de plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com os antibióticos.

4.7.1. Avaliação do nível de inibição do mutante de Xanthomonas campestris resistente à aureomicina, em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com aureomicina.

Os resultados do nível de inibição do mutante resistente à aureomicina pela classificação das plântulas, de acordo com o item 3.19. e expressos em percentagem da severidade da doença, encontram-se no quadro XI, e no gráfico 3.

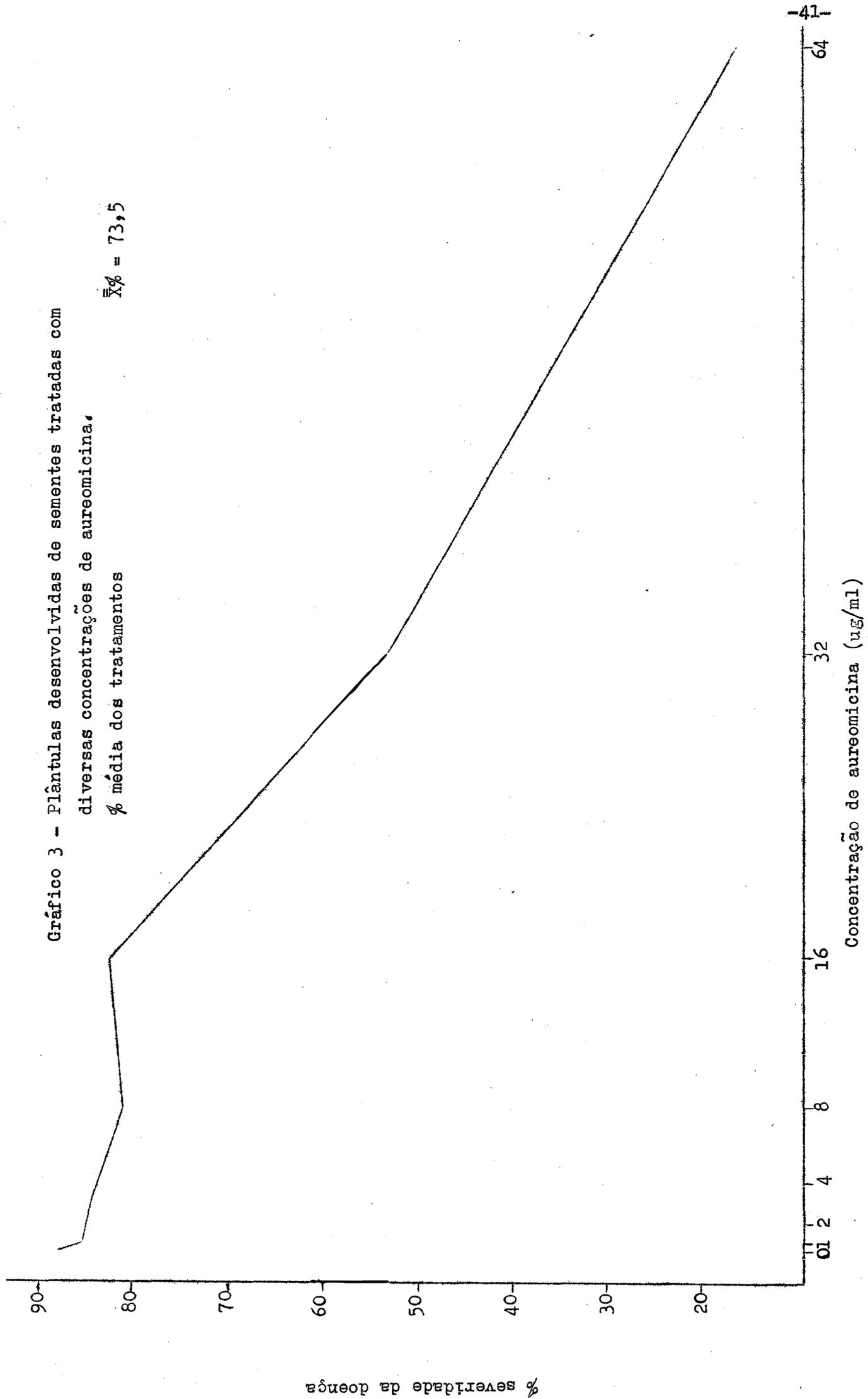
A análise da variância dos dados, encontra-se no quadro XII.

Quadro XI - Resultados da classificação das plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com aureomicina e inoculadas com mutante resistente a 8,0 ug/ml de aureomicina, expressos em percentagem da severidade da doença; dados das três repetições do experimento.

Tratamentos ug/ml	Repetições			Médias	
	I	II	III	%	arco seno \sqrt{P}
0,0	89,0	90,0	86,0	88,4	70,1
1,0	86,0	83,0	87,0	85,4	67,5
2,0	85,0	86,0	84,0	85,0	67,2
4,0	84,0	81,0	88,0	84,4	66,8
8,0	88,0	69,0	85,0	81,3	64,4
16,0	89,0	82,0	75,0	82,4	65,2
32,0	59,0	50,0	51,0	53,4	46,9
64,0	16,0	15,0	20,0	17,0	24,3

Gráfico 3 - Plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com
diversas concentrações de aureomicina,
% média dos tratamentos

$\bar{X}\% = 73,5$



Quadro XII - Análise da variância dos resultados do nível de inibição do mutante de *Xanthomonas campestris* resistente à aureomicina. (Dados transformados para arco seno \sqrt{P}).

F. de variação	GL	S.Q.	Q.M.	D.P.	\bar{v}
Tratamento	7	5.218,4075	745,4867	27,30	7,46 ^{***}
Erro	16	213,9579	13,3724	3,66	
Total	23	5.423,3654			

C.V. = 6,2%

*** = significativo ao nível de 1%

A análise da variância apresentou diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade para os tratamentos.

A diferença mínima significativa, relativa ao teste de Tukey foi de $\Delta_{1\%} = 12,89$. Esse teste mostrou que as médias das plântulas de sementes tratadas com concentrações de 0,0 a 16,0 ug/ml de aureomicina não apresentaram diferenças estatísticas entre si. O tratamento das sementes com concentrações de antibiótico, superiores a 16,0 ug/ml, apresentaram as menores médias de severidade da doença, donde se escolheu essa concentração para o tratamento das sementes, quando da avaliação do nível de inibição dos mutantes resistentes à estreptomicina e à aureomicina.

4.7.2. Avaliação dos níveis de inibição de mutantes resistentes à estreptomicina e à aureomicina em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com êsses antibióticos.

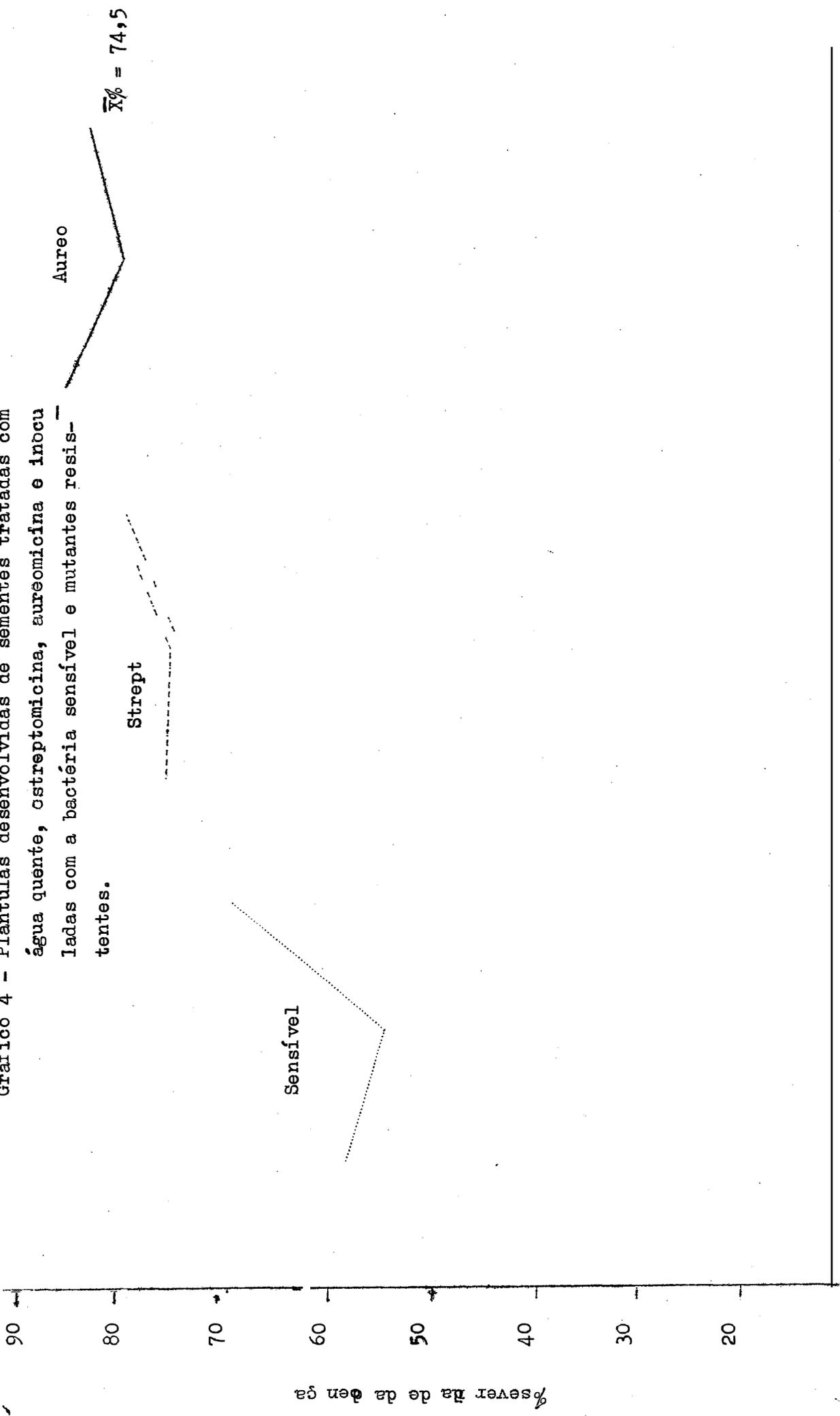
Os resultados dos níveis de inibição dos mutantes resistentes à estreptomicina e à aureomicina, pela classificação das plântulas, de acordo com o item 3.19. e expressos em percentagem de severidade da doença, encontram-se no quadro XIII e gráfico 4.

A análise da variância dos dados encontram-se no quadro XIV.

Quadro XIII - Resultados da classificação das plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com estreptomomicina e com aureomicina, e inoculadas com os mutantes resistentes, e expressos em percentagem de severidade da doença.

Tratamentos		Repetições			Médias	
Inóculo	Semente	I	II	III	%	arco seno \sqrt{P}
sensível	A.q. + estrep.	67,0	55,0	54,0	58,7	50,0
	A.q. + aureo.	56,0	51,0	59,0	55,3	48,1
	A. quente	72,0	71,0	76,0	73,0	58,7
Mut. estrep.	A.q. + estrep.	71,0	79,0	75,0	75,1	60,1
	A.q. + aureo.	72,0	84,0	67,0	74,7	59,8
	A. quente	83,0	82,0	74,0	79,8	63,3
Mut. aureo.	A.q. + estrep.	87,0	89,0	81,0	85,8	67,9
	A.q. + aureo.	79,0	79,0	82,0	80,0	63,5
	A. quente	90,0	81,0	78,0	83,3	65,9

Gráfico 4 - Plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com água quente, estreptomina, aureomicina e indociladas com a bactéria sensível e mutantes resistentes.



Strep. Aureo. A. quente A.q. + strep. A.q. + aureo. A. quente A.q. + strep. A.q. + aureo. Ag. quente

Tratamento das sementes

% severidade da doença

Quadro XIV - Análise da variância dos resultados dos níveis de inibição dos mutantes de *Xanthomonas campestris* resistentes, em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com os antibióticos. (Dados transformados para arco seno \sqrt{P}).

F. de variação	GL	S.Q.	Q.M.	D.P.	\bar{V}
Sementes	2	139,7720	69,8860	8,36	2,30 n.s.
Inoculação	2	842,4928	421,2454	20,52	5,65 **
A x B	4	105,3102	26,3276	5,13	1,41 n.s.
(Tratamentos)	(8)	(1087,5730)	135,9466	11,66	3,21 **
Erro	18	236,9762	13,1653	3,63	
Total	26	1324,5492			

C.V. = 6,1%

** = significativo ao nível de 1%

A análise da variância apresentou diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade para os tratamentos. Não houve diferença significativa entre os tipos de tratamento usados nas sementes. Houve diferença significativa para os tipos de inóculo usados, ao nível de 1% de probabilidade. A interação semente x inóculo não apresentou significância. Isto vem indicar que o efeito dos inóculos, estatisticamente é o mesmo para os diversos tratamentos das sementes. A diferença mínima significativa referente ao teste de Tukey, para tratamentos foi de $\Delta_{1\%} = 12,76$. Este teste mostrou que as médias das plântulas de sementes tratadas e inoculadas apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Quadro XV - Valôres médios da infestação de plântulas provenientes de sementes tratadas com água quente, água quente mais estreptomomicina e água quente mais aureomicina, quando da inoculação com bactéria sensível, mutante resistente à estreptomomicina e mutante resistente à aureomicina.

Inóculo	Tratamento das sementes			Médias		
	A. quente	A.q. + estrept.	A.Q. + aureo.	%	arco seno \sqrt{P}	
Sensível	73,0	58,7	55,3	62,5	52,3	
M. estrept.	79,8	75,1	74,7	76,6	61,0	
M. aureo.	83,3	85,8	80,0	83,1	65,7	
Médias	%	78,9	74,0	70,5	74,5	-
	arco seno \sqrt{P}	62,6	59,3	57,1	-	59,69

As diferenças mínimas significativas, relativas ao teste de Tukey, para os tratamentos usados nas sementes e para os tipos de inóculo usados, foram de $\Delta 5\% = 4,37$ e de $\Delta 1\% = 5,69$. Esse teste mostrou que as médias das plântulas diferem entre si quanto ao tipo de inóculo usado, havendo diferença significativa entre plântulas inoculadas com o mutante resistente à aureomicina e plântulas inoculadas com a bactéria sensível, ao nível de 1% de probabilidade. Houve diferença estatística significativa ao nível de 5% de probabilidade entre plântulas inoculadas com o mutante resistente à estreptomomicina e plântulas inoculadas com o mutante resistente à aureomicina. A diferença significativa entre plântulas inoculadas com o mutante resistente à estreptomomicina e plântulas inoculadas com a bactéria sensível foi de 1% de probabilidade.

4.8. Reisolamento e caracterização dos mutantes resistentes à estreptomomicina e à aureomicina.

As vinte linhagens de bactérias resistentes à estreptomomicina, reisoladas, apresentaram crescimento completo nas concentrações de 64,0, 1024,0 e 2048,0 ug de estreptomomicina por mililitro de meio de cultura.

As vinte linhagens de bactérias resistentes à aureomicina, reisoladas, apresentaram crescimento completo na concentração de 8,0 ug de antibiótico por mililitro de meio de cultura.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

As características morfológicas e bioquímicas apresentadas pela bactéria isolada, coincidem, exatamente com as indicadas no Manual de Bergey (Breed e outros, 1957) para a espécie Xanthomonas campestris. Entretanto, fazendo uma comparação entre as características atribuídas às espécies de Xanthomonas que atacam as Crucíferas, constatamos que as mesmas se diferenciam quase que exclusivamente nas suas relações com o hospedeiro. Numa análise mais ampla, e de acordo com idéias e trabalhos de vários autores, que passaremos a expor, poderemos dizer que o gênero Xanthomonas poderia ser reduzido a umas poucas espécies. Colwell e Liston (1961) analisaram no computador eletrônico, 16 espécies de Xanthomonas que caíram em dois grandes grupos. As diferenças entre elas eram relativas à peptonização do leite, liquefação da gelatina e hidrólise do amido, as quais os autores consideraram não significativas para separá-las em espécies. Usando as mesmas linhagens De Ley e Van Muylem (1963) determinaram a composição de bases do DNA; os resultados levaram, também a um agrupamento das espécies. Portanto, parece realmente restar a hipótese de que a real diferença entre essas espécies reside nas suas relações fitopatogênicas, as quais também têm recebido especial atenção de vários autores. Assim, Xanthomonas corylina (patogênica para a avôlã) e Xanthomonas juglandis (patogênica para a noz) que são bacteriologicamente idênticas, podem infectar ambos os hospedeiros, diferindo somente no tamanho das lesões causadas nas folhas. Da mesma maneira Xanthomonas campestris só difere de Xanthomonas campestris var. armoraciae pelo fato de não infectar "horseradish", podendo, porém fazê-lo em condições consideradas ótimas, de acordo com McCulloch (1929).

Dessa maneira, colocando atenção em fatores tais como: parte da planta inoculada, concentração de inóculo, técnica de inoculação e outros que não são usualmente considerados com maior atenção em testes de patogenicidade, poder-se-ia chegar às mesmas conclusões que Dye (1958), o qual desenvolveu um trabalho no qual, após quatro passagens sucessivas de vinte espécies de Xanthomonas em plântulas de feijão, todas elas mostraram-se patogênicas. Isso nos sugere que um mesmo trabalho poderia ser feito nesse sentido, em relação às Crucíferas, quando então se poderia reforçar a idéia de que relativamente poucas espécies fitopatogênicas de Xanthomonas existem e que são caracterizadas por uma adaptabilidade elástica a determinadas plantas.

Das três linhagens de Xanthomonas campestris isoladas, foi usada neste trabalho a que apresentou, no teste de patogenicidade resultado de

100% de plântulas doentes, portanto, muito conveniente para os testes dos mutantes resistentes aos antibióticos que foram desenvolvidos.

Pode-se verificar pelos resultados apresentados no quadro II e gráfico 1, que o número de colônias sobreviventes de Xanthomonas campestris em relação à estreptomicina, decresce com o aumento de concentração de estreptomicina. A curva de sobreviventes pode ser dividida em três partes: a primeira (até 2,0 ug/ml) indica que a sobrevivência não é grandemente reduzida; a segunda parte da curva (de 2,0 a 8,0 ug/ml) indica um grande decréscimo no número de sobreviventes, e a última parte (de 8,0 a 64,0 ug/ml) mostra que a viabilidade continua a cair com o aumento da concentração de antibiótico, porém menos acentuadamente, aparecendo sobreviventes em tôdas as concentrações ensaiadas. Se essa população de bactéria fôsse completamente uniforme com relação à sua resistência à estreptomicina, encontraríamos apenas as duas primeiras partes da curva, isto é, as bactérias não sofreriam ação de doses mínimas do antibiótico e a queda de viabilidade seria logarítmica, segundo a linha pontilhada teórica, de acôrdo com Demerec (1950), e indicada no gráfico 1. A diferença entre essa linha teórica e a realmente encontrada, mostra que existe na população, indivíduos mais resistentes à estreptomicina do que a maioria da população. Comparando nossos resultados com os obtidos por Demerec (1950), em E. coli, verificamos que Xanthomonas campestris apresenta um comportamento bastante semelhante a essa bactéria em relação à estreptomicina. Quadling (1960), verificou que em Xanthomonas phaseoli semeada em meio sólido com diversas concentrações de estreptomicina, a maior parte das bactérias são mortas em concentrações entre 2,0 e 8,0 ug/ml. Xanthomonas campestris apresentou comportamento semelhante ao da Xanthomonas phaseoli com relação à resistência à droga.

O quadro III e o gráfico 2 mostram que a percentagem de células sobreviventes à aureomicina diminui com o aumento da concentração do antibiótico. A curva representada no gráfico 2 apresenta três partes: de 0 a 0,125 ug/ml indica pequena queda da viabilidade; de 0,125 a 0,5 ug/ml a queda é bastante acentuada, e de 0,5 a 2,0 é menos acentuada que a anterior e a curva encontra a linha da base do gráfico. Como acontece com a estreptomicina, a diferença entre a linha pontilhada e a realmente encontrada, indica que na população existem indivíduos mais resistentes à droga do que a maioria da população. Na concentração de 8,0 ug/ml houve a sobrevivência de uma única célula de bactéria, a qual deu origem à linhagem mutante resistente à aureomicina usada neste trabalho. O aparecimento de tal colônia resistente a tão elevada concentração, poderia ser atribuída a uma coincidência com a existência de tal mutante nesta população. Entretanto, acreditamos que tal

acontecimento mereça estudos posteriores, procurando-se pesquisar melhor o modelo característico da aureomicina em relação ao aparecimento da resistência nessa linhagem. Isto porque, embora sabendo-se que o modelo de resistência é característico para os antibióticos e não para os microrganismos, sabendo haver exceções, como é o caso de Mycobacterium ranac, que segue o modelo de um só passo para o cloranfenicol, quando a regra para esse antibiótico é o modelo de múltiplos passos, de acordo com Szybaski e Bryson (1954).

Mutantes de Xanthomonas campestris resistentes à estreptomicina foram encontrados após uma única passagem da bactéria em meio de cultura, contendo antibiótico numa concentração final de 64,0 ug/ml, segundo o modelo denominado por Demerec (1948) de "um só passo". Dessa maneira, com um isolamento apenas, apareceram mutantes altamente resistentes (quadro IV). O comportamento da bactéria em relação à resistência à estreptomicina, pode ser explicado pela hipótese de que existem vários gens determinando tal resistência. Tais gens, apresentam diferentes potencialidades. Assim, se a mutação ocorrer em um gen, determina resistência a altas concentrações de estreptomicina, a bactéria torna-se altamente resistente ao antibiótico em uma só passagem. Os resultados de testes de recombinação (por transformação, transdução ou conjugação) têm confirmado que diferentes sítios genéticos podem ser envolvidos no controle da resistência à estreptomicina, de acordo com Hashimoto (1960).

Pelo quadro IV, dos cinco mutantes ensaiados em meio líquido, mais estreptomicina, um deles cresceu até a concentração de 1024,0 ug/ml, enquanto todos os outros apresentaram crescimento até uma concentração de 2048,0 ug/ml; dessa maneira, obtivemos mutantes com dois graus diferentes de resistência, obtida com uma única passagem em meio de cultura com estreptomicina, confirmando-se mais uma vez que os gens que conferem resistência à estreptomicina apresentam diferentes potencialidades.

Pelo quadro IV pode-se observar também que todos os mutantes para a estreptomicina foram resistentes sem serem dependentes do mesmo. Mutantes dependentes de estreptomicina foram encontrados por muitos autores, em diversas bactérias, como se pode verificar no trabalho de Newcombe e de Harwirko (1949). Quadling (1960) encontrou mutantes dependentes desse antibiótico em Xanthomonas phascoli, somente depois de tratar essa bactéria com raios ultra-violeta. Trabalhando com mutantes resistentes não encontrou nenhum dependente. No entanto, depois do tratamento da bactéria com luz U.V., cerca de 30% das colônias resistentes tornaram-se completamente dependentes da estreptomicina.

Mutantes resistentes à aureomicina foram obtidos pela técnica

da placa em gradiente. Dessa forma, com gradientes do antibiótico cada vez maiores, a bactéria teve oportunidade de sofrer mutações sucessivas nos gens que conferem resistência à aureomicina. Todos êsse gens são aproximadamente iguais em sua potência (Demerec, 1948), daí decorrendo, ser difícil a obtenção de mutantes altamente resistentes a essa droga em uma só passagem pelo meio de cultura mais êsse antibiótico. Por meio de seis transferências sucessivas, foram obtidos mutantes resistentes a 3,0 ug/ml de aureomicina, como pode ser verificado no quadro V. Porém, o mutante resistente usado neste trabalho, foi obtido em "um só passo" (resistente a 8,0 ug/ml), como já descrito anteriormente.

Os níveis inibitórios dos dois antibióticos ensaiados em Xanthomonas campestris sensível, através do método da difusão pelo uso de discos de papel de filtro (quadro VI), mostram a efetividade dos mesmos em relação à inibição desse microrganismo. Os dados indicam que, uma vez alcançada de terminada concentração de antibiótico, concentrações superiores a essa, não mostram aumento posterior da zona de inibição. Para a estreptomicina as concentrações a partir de 1024,0 ug/ml não apresentaram posterior aumento, e para a aureomicina, o mesmo ocorreu. Os dados indicam, também que a aureomicina possui poder de inibição "in vitro", para Xanthomonas campestris maior do que o apresentado pela estreptomicina. Comparando a concentração na qual o nível máximo de efetividade é alcançado por êsses dois antibióticos, em relação à Xanthomonas campestris por nós isolada, com os resultados por Klisiewicz e Pound (1961) e com os de Sutton e Bell (1954), constatamos que os primeiros autores empregaram 3000 ug/ml desses antibióticos, e os últimos 1000 ug/ml de aureomicina para conseguir a mesma efetividade. Provavelmente essa diferença é proveniente das propriedades inerentes das linhagens usadas. Ainda, com base nos dados, foi escolhida a dose de 1000,0 ug de estreptomicina por mililitro de solução para o tratamento de sementes com êsse antibiótico.

O tratamento das sementes pelos antibióticos com a finalidade de verificar a absorção dos mesmos pode ser avaliado numa comparação dos resultados nos quadros VII e VIII. Eles indicam que os halos de inibição aumentaram com o aumento da concentração do antibiótico usado. Estreptomicina mostrou-se mais efetiva contra Bacillus subtilis do que contra Xanthomonas campestris e a aureomicina foi mais efetiva contra Xanthomonas campestris do que contra Sarcina lutea.

Na determinação dos níveis inibitórios dos mutantes de Xanthomonas campestris resistentes à estreptomicina e à aureomicina pelo tratamento das sementes com estreptomicina, podemos constatar (quadro IX) que a não for

mação de halo de inibição pelo mutante resistente à estreptomicina, comprova a sua resistência a êsse antibiótico, mesmo usando concentração tão alta quanto 2048,0 ug/ml. Em relação ao mutante resistente à aureomicina, as sementes tratadas com estreptomicina inibiram o crescimento dêsse mutante até a concentração de 256,0 ug/ml, donde se pode constatar o aparecimento de resistência cruzada; segundo Schnitzer e Grumberg (1957), resistência cruzada não é comum entre estreptomicina e aureomicina, porém a literatura mostra uma exceção que é a resistência cruzada dêsses dois antibióticos em Salmonella typhi e Salmonella enteritidis (Yamakawa, 1952).

Na determinação dos níveis inibitórios dos mutantes de Xanthomonas campestris resistentes à estreptomicina e à aureomicina, pelo tratamento de sementes com aureomicina, podemos constatar (quadro X) que a não formação de halo de inibição pelo mutante resistente à aureomicina até a concentração de 8,0 ug/ml, comprova a sua resistência a êsse antibiótico nessa concentração. Em relação ao mutante resistente à estreptomicina, as sementes tratadas com aureomicina, inibiram o crescimento dêsso mutante até a concentração de 32,0 ug/ml, constatando-se também, aqui, a presença de resistência cruzada. A avaliação do comportamento das sementes inoculadas artificialmente com os mutantes de Xanthomonas campestris resistentes aos antibióticos, também veio comprovar a eficiência da resistência de tais mutantes.

A avaliação do nível de inibição do mutante de Xanthomonas campestris resistentes à aureomicina, em plântulas de sementes tratadas com aureomicina, indicou que o mutante foi inibido a partir de doses de antibiótico superiores a 16,0 ug/ml. Êsse resultado difere do apresentado pelo mesmo tratamento "in vitro" onde a inibição se deu a partir do 8,0 ug/ml, no tratamento das sementes. Essa diferença de comportamento "in vitro" e "in vivo" não é suficiente para que se chegue a uma conclusão definitiva, podendo-se porém sugerir que o modo de ação do antibiótico esteja influenciado por mecanismos de transformações químicas dentro da planta (Dokker, 1963). Pelos resultados apresentados no quadro XI, pode-se verificar que em plântulas inoculadas com mutante resistente a 8,0 ug/ml de aureomicina, o tratamento de sementes com êsse antibiótico nas concentrações de 0,0 a 16,0 ug/ml, não apresentou diferenças quanto à severidade da doença. Contudo, o tratamento das sementes com doses superiores a 16,0 ug/ml de aureomicina, mostrou inibição significativa do mutante, inibição essa mais acentuada quando se usou 64,0 ug/ml; com a dose de 1000,0 ug/ml, houve completa inibição do mutante resistente à aureomicina. Portanto, êsses resultados ainda indicam que o tratamento de sementes com aureomicina na concentração de 1000,0 ug/ml,

previnem o aparecimento de mutantes resistentes a tal antibiótico.

A avaliação dos níveis de inibição de mutantes resistentes à estreptomicina e à aureomicina em plântulas desenvolvidas de sementes tratadas com êsses antibióticos, mostrou haver diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade entre os tratamentos (quadro XIV). Com o desdobramento da soma de quadrados de tratamentos verificamos haver diferença entre os tipos de inóculo usados; não houve diferença entre tipos de tratamentos das sementes e a interação semente x inóculo não foi significativa. Isto vem indicar que o efeito dos inóculos, estatisticamente é o mesmo, independentemente dos tratamentos para as sementes. O mutante resistente à aureomicina apresentou a maior média de severidade da doença, independente do tipo de tratamento da semente; mostrou, assim, ser a linhagem mais patogênica em comparação com o mutante resistente à estreptomicina e à linhagem sensível. Ainda podemos notar que ambos os mutantes resistentes aos antibióticos foram mais patogênicos que a linhagem sensível de Xanthomonas campestris, dados êsses que não estão de acôrdo com Kulykovs'ka (1962) o qual encontrou que a patogenicidade de mutantes de Xanthomonas campestris resistente a tiosulfato, era consideravelmente mais fraca do que a virulência da linhagem original.

Os reisolamentos feitos dos mutantes resistentes aos antibióticos, das plântulas doentes, foram ensaiados nas mesmas concentrações de antibióticos, às quais eram inicialmente resistentes. Pelos resultados podemos verificar que tais mutantes continuam resistentes às mesmas concentrações "in vitro". Isto está em desacôrdo com os resultados de Troutman (1959), cujos mutantes de Pseudomonas tabaci, resistentes à estreptomicina, mostraram uma rápida perda de resistência após várias passagens pelas plantas de fumo. No nosso caso, somente uma passagem foi feita, ficando aberta a possibilidade de testarmos, novamente nossos mutantes através de várias passagens por plântulas de repólho.

6. CONCLUSÕES

a - Testes morfológicos, bioquímicos e de patogenicidade, permitiram classificar a bactéria isolada, como Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson.

b - A curva de sobrevivência da bactéria apresentou queda maior na viabilidade da população entre as doses de 2,0 a 8,0 ug/ml para a estreptomomicina e entre 0,125 e 0,5 ug/ml para a aureomicina.

c - Foram isolados mutantes resistentes a 64,0 ug/ml de estreptomomicina; a frequência de mutação para esse antibiótico foi de um mutante em $3,04 \times 10^9$ células de bactérias.

d - Foram isolados mutantes resistentes a 3,0 ug/ml e a 8,0 ug/ml de aureomicina. O mutante resistente a 8,0 ug/ml não seguiu o modelo de resistência denominado de "múltiplos passos".

e - O nível máximo de efetividade alcançado pelos dois antibióticos em relação à Xanthomonas campestris sensível foi de 1024,0 ug/ml. Concentrações superiores a essa, não apresentaram aumento posterior de inibição da bactéria.

f - A aureomicina possui poder de inibição para Xanthomonas campestris, maior do que o apresentado pela estreptomomicina.

g - A linhagem mutante à estreptomomicina foi resistente a todas as doses de antibiótico usadas "in vitro" e "in vivo". O tratamento de sementes com estreptomomicina na concentração de 1000,0 ug/ml não previne o aparecimento de mutantes resistentes a esse antibiótico.

h - A linhagem mutante resistente à aureomicina começou a ser inibida "in vitro" com doses superiores a 8,0 ug/ml e "in vivo" com doses superiores a 16,0 ug/ml. O tratamento de sementes com aureomicina na concentração de 1000,0 ug/ml previne o aparecimento de mutantes resistentes a esse antibiótico.

i - Os mutantes resistentes à estreptomomicina e à aureomicina foram mais patogênicos do que a linhagem da bactéria sensível.

j - O mutante resistente à aureomicina foi mais patogênico do que o mutante resistente à estreptomomicina.

k - Os mutantes resistentes inoculados em plântulas, depois de reisolados não tiveram sua resistência alterada em relação aos dois antibióticos.

7. RESUMO

No presente trabalho foi feito o isolamento de mutantes de Xanthomonas campestris resistentes a 64,0 ug/ml de estreptomicina e a 8,0 ug/ml de aureomicina. Foi estudado o comportamento desses mutantes "in vitro" e "in vivo" pelo tratamento de sementes com os referidos antibióticos. Dentre os resultados obtidos podemos tirar as seguintes conclusões: a) a linhagem mutante resistente à estreptomicina foi resistente a todas as doses de antibiótico usadas "in vitro" e "in vivo". O tratamento de sementes com estreptomicina na concentração de 1000,0 ug/ml não previne o aparecimento de mutantes resistentes a esse antibiótico; b) a linhagem resistente à aureomicina começou a ser inibida "in vitro" com doses superiores a 8,0 ug/ml e "in vivo" com doses superiores a 16,0 ug/ml. O tratamento de sementes com aureomicina na concentração de 1000,0 ug/ml previne o aparecimento de mutantes resistentes a esse antibiótico; c) os mutantes resistentes à estreptomicina e à aureomicina foram mais patogênicos do que a linhagem da bactéria sensível; d) o mutante resistente à aureomicina foi mais patogênico do que o mutante resistente à estreptomicina; e) os mutantes resistentes inoculados em plântulas não tiveram sua resistência alterada em relação aos dois antibióticos.

8. SUMMARY

Black rot of crucifers, caused by the bacterium Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson is world wide spread. The black rot bacteria which naturally contaminate the seed are reported to remain viable for 3 years. Seed disinfection by antibiotics treatment have enhanced efforts to reduce incidence of the disease.

This investigation has the objective of providing some information about the development of antibiotic-resistant pathogens as a result of seed treatment with antibiotic.

Streptomycin and aureomycin-resistant mutants were obtained from an isolate of Xanthomonas campestris. Antibiotic treated cabbage seeds and antibiotic treated seed plants were inoculated with these two mutants strains in laboratory and green-house experiments. From the results obtained the following are the main conclusions achieved: the streptomycin mutant strain showed resistance to the streptomycin concentrations tested "in vitro" and "in vivo"; treatment of the seeds with 1000,0 ug of streptomycin per ml do not prevent the development of streptomycin resistant mutants; the aureomycin resistant strain was inhibited "in vitro" by concentrations of aureomycin higher than 8,0 ug/ml and "in vivo" by concentrations higher than 16,0 ug/ml; treatment of the seeds with 1000,0 ug of aureomycin per ml do prevent the development of aureomycin resistant mutants; the streptomycin and aureomycin-resistant mutants were more virulent than the sensitive strain while the aureomycin-resistant mutant was more virulent than the streptomycin-resistant mutant; the antibiotic-resistant strains inoculated on cabbage plants and reisolated were still resistant to the same doses of antibiotics.

9. BIBLIOGRAFIA CITADA

- ARK, P.A., 1947. Effect of crystalline streptomycin on phytopathogenic bacteria and fungi. *Phytopathology* 37: 842.
- ARK, P.A. e M.A. Stanley, 1956. Antibiotics as bactericides and fungicides against diseases of plants. *Plant Dis. Repr.* 4: 85-92.
- AZEVEDO, J.L. de, 1961. Resistência e mutação de X. campestris (Pam.) Dowson, em relação a alguns antibióticos. Tese de doutoramento. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz". 48 pp.
- BARNETT, H.L., 1959. Plant disease resistance. *Ann. Rev. Microbiol.* 13: 191-210.
- BRAUN, W., 1966. *Bacterial Genetics*. 2nd Ed., London. W. B. Saunders. 380 pp.
- BREED, R.S., E.G.D. Murray e N.R. Smith, 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th Ed., Baltimore, William & Wilkins. 1094 pp.
- BROWN, N.A. e R.B. Harvey, 1920. Heat rot, rib rot and leaf spot of chinese cabbage. *Phytopathology* 10: 81-90.
- BURKHOLDER, W.H., 1948. Bacteria as plant pathogens. *Ann. Rev. Microbiol.* 2: 389-412.
- BRYSON, V. e W. Szybalski, 1955. Microbial drug resistance. *Advanc. Genet.* 7: 1-47.
- CARMONA-GOMEZ, J., 1956. "In vitro" development of resistance to an antibiotic by two plant pathogenic bacteria. *Phytopathology* 46: 522-523.
- CLAYTON, E.E., 1924 a. A progress report on blackrot investigations, with special reference to cauliflower on Long Island (abst.). *Phytopathology* 14: 24.
- CLAYTON, E.E., 1924 b. Control of blackrot and blackleg of cruciferous crops by seed and seed bed treatments (abst.). *Phytopathology* 14: 24-25.
- CLAYTON, E.E., 1925 a. Second progress report of blackrot (Pseudomonas campestris) investigations on Long Island: seed infection seasonal development (abst.). *Phytopathology* 15: 48-49.
- CLAYTON, E.E., 1925 b. Second progress report on seed treatment for black leg (Phoma lingam) and blackrot (Pseudomonas campestris) of cruciferous crops (abst.). *Phytopathology* 15: 49.
- COLWELL, R.R. e J. Liston, 1961. Taxonomic analysis with the electronic computer of some Xanthomonas and Pseudomonas species. *J. Bact.* 82: 913-919.
- COOK, A.A., J.C. Walker e R.H. Larson, 1952 a. Studies on the disease cycle of blackrot of cruciferous. *Phytopathology* 42: 162-167.
- COOK, A.A., J.C. Walker e R.M. Larson, 1952 b. Relation of the blackrot pathogen to cabbage seed. *Phytopathology* 42: 316-320.

- COREY, R.R. e M.P. Starr, 1957. Genetic transformation of colony type in Xanthomonas phaseoli. J. Bact. 74: 141-145.
- DEKKER, J., 1963. Antibiotics in the control of plant diseases. Ann. Rev. Microbiol. 17: 243-262.
- DE LEY, J., 1964. Pseudomonas and related genera. Ann. Rev. Microbiol. 18: 18-39.
- DE LEY, J. e J. Van Muylem, 1963. Some applications of deoxyribonucleic acid base composition in bacterial taxonomy. Antonie van Leeuwenhoek 29: 344-358.
- DEMEREC, M., 1948. Origin of bacterial resistance to antibiotics. J. Bact. 56: 63-74.
- DEMEREC, M., 1950. Genetic mechanism controlling bacterial resistance to streptomycin. Trans. N.Y. Acad. Sci. 12: 186-188.
- DESAL, S.G., M.K. Patel e M.V. Desal, 1967. "In vitro" activity of streptocycline against bacterial plant pathogens. Indian Phytopathol. 20 (4): 296-300. Apud Biol. Abstr. 50 (4): 293, 1969.
- DIFCO MANUAL of Dehydrated culture media and Reagents. 8th Ed., 1948. Detroit. Difco Laboratories. 224 pp.
- DOWSON, W.J., 1957. Plant diseases due to bacteria. 2nd Ed. Cambridge. The University Press. 231 pp.
- DRECHESLER, C., 1914. Cotyledon infection of cabbage seedlings by Pseudomonas campestris. Phytopathology 9: 275-282.
- DYE, D.W., 1958. Host specificity in Xanthomonas. Nature 182: 1813-1814.
- ECHEGARAY, A., 1958. Los antibioticos en el control de las bacterias fitopatogenas. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo. México, 1958. pp. 463-469. Apud Biol. Abstr. 38 (6): 1867, 1962.
- ENGLISH, A.R. e G. Van Halsema, 1954. A note on the delay in the emergence of resistant Xanthomonas and Erwinia strains by the use of streptomycin plus terramycin combinations. Plant Dis. Repr. 38: 429-431.
- GILLIVER, K., 1946. The inhibitory action of antibiotics on plant pathogenic Bacteria and Fungi. Ann. Bot. Lond. 10: 271-282.
- GOODMAN, J.J. e A.W. Henry, 1947. Action of subtilin in reducing infection by a seed-borne pathogen. Science 105: 320-321.
- GYORFFY, B., S. Iigali, I. Kállay, I.B. Kárasz, I. Klément e Szende, 1959. Genetics studies on a phytopathogenic Xanthomonas. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. suppl., 3: 34. Apud Azevedo, J.L. de, 1961. Resistência e mutação de Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson, em relação a alguns antibióticos. Tese de doutoramento. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz", p. 3. (mimeografado).
- HASHIMOTO, K., 1960. Streptomycin resistance in Escherichia coli analysed by transduction. Genetics 45: 49-62.

- IKUTA, J., S. Kawasaki, R. Vencovsky, 1965. Ensaio de variedades e híbridos de repólho para o verão. V Reunião da Sociedade de Olericultura do Brasil. Instituto de Genética. Piracicaba. E.S.A. "Luiz de Queiroz". (mimeografado).
- KATZNELSON, H. e M.D. Sutton, 1951. Inhibition of plant pathogenic bacteria in vitro by antibiotics and quaternary ammonium compounds. Canad. J. Bot. 29: 270-278.
- KIMOTO, T., 1968. Contribuição ao estudo do método de seleção de variedades locais de repólho (Brassica oleracea var. capitata L.) resistentes a Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson. Tese de Doutorado. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz". 64 pp. (mimeografado).
- KLISIEWICZ, J.M. e G.S. Pound, 1961. Studies on control of black rot of crucifera by treating seeds with antibiotics. Phytopathology 51: 495-500.
- KULYOVS'KA, M.D., 1962. Changes in certain biological properties of Xanthomonas campestris under the effect of thiosulfate-ethers. Mikrobiol. Zhur. Akad. Nauk. Ukrain. R.S.R. 24: 20-24. Apud Biol. Abstr. 39: 20651, 1962.
- KULYOVS'KA, M.D., 1963. Development of resistance in Erwinia carotovora (Jones) Holland and Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson to thiosulfate ethers. Mikrobiol. Zhur. Akad. Nauk. Ukrain. R.S.R. 25: 58-64. Apud Biol. Abstr. 44: 1169, 1963.
- LINDENFELSER, L.A., T.G. Pridham, O.L. Shotowell e F.H. Stodola, 1958. Antibiotics against plant diseases - IV - Activity of duramycin against selected microorganisms. Antibiot. Ann. 1957-58, 241-47.
- MALEKZADEH, F., 1965. Evaluation of phenacridane chloride as a seed treatment for control of black rot (X. campestris) of crucifers. Plant Dis. Repr. 49: 439.
- MCCULLOCH, L., 1929. A bacterial leaf spot of horse-radish caused by Bacterium campestris var. armoraciae, n. var.. J. agric. Res. 38: 269-287.
- MEHTA, P.P., D. Gottlieb e D. Powell, 1959. Vancomycin, a potential agent for plant disease prevention. Phytopathology 49: 177-183.
- MEIER, D., 1934. A cytological study of the early infection stages of the blackrot of cabbage. Bull. Torrey Bot. Cl. 61: 173-190.
- MITCHEL, J.W., W.J. Zaumeyer e W.P. Anderson, 1952. Translocation of streptomycin in bean plants and its effect on bacterial blights. Science 115: 587-597.
- MONTEITH, J., Jr., 1921. Seed transmission and overwintering of cabbage blackrot. Phytopathology 11: 53-54.
- NEDER, R.N., 1968. Introdução à Microbiologia. Piracicaba, I. Zimotécnico, E.S.A. "Luiz de Queiroz". 118 pp. (mimeografado).

- NEDER, R.N., M.S. Dias, R. Vencovsky e H. Ikuta, 1964. Ensaio de virulência de 33 isolamentos de Fusarium oxysporum f. lycopersici. Snyder e Hansen. XVI Reuniao Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Instituto de Genética. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz". (mimeografado).
- NEWCOMBE, H.B. e R. Hawirko, 1949. Spontaneous mutation to streptomycin resistance and dependence in Escherichia coli. J. Bact. 57: 585-597.
- PAMMEL, L.H., 1895. Bacteriosis of rutabaga (Bacillus campestris n. sp.). Iowa Sta. Bull. 27: 130-134. Apud J. Agr. Res. 38 (5): 269-287, 1929.
- PELCZAR, M.J., Jr. e R.D. Ried, 1965. Microbiology. 2nd Ed. New York: Mc Graw-Hill. 662 pp.
- PIMENTEL GOMES, F., 1966. Curso de estatística experimental. Piracicaba. E.S.A. "Luiz de Queiroz". 404 pp.
- POPOV, V.I., 1958. Vascular bacteriosis of cabbage. Zashchita Rast. et Vrediteli i Boleznei. 6: 55. Apud Biol. Abstr. 45 (6): 5729, 1964.
- QUADLING, C., 1960. Mutation conferring streptomycin resistance in Xanthomonas phaseoli. Canad. J. Microbiol. 6: 387-396.
- RUSSEL, H.L., 1898. A bacterial rot of cabbage and allied plants. Wisconsin Agr. Exp. Sta. Bull. 65. Apud Kimoto, T., 1968. Contribuição ao estudo de método de seleção de variedades locais de repólho (Brassica oleracea var. capitata L.) resistentes a Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson. Tese de doutoramento. Piracicaba. E.S.A. "Luiz de Queiroz". p. 3. (mimeografado).
- SCHNITZER, R.J. e E. Grumberg, 1957. Drug resistance of microorganisms. New York. Academic Press. 395 pp.
- SKERMAN, V.B.D., 1959. A guide to the identification of the genera of bacteria. Williams e Wilkins. 217 pp.
- SMITH, E.E., 1898. The blackrot of cabbage. U.S. Dept. Agr. Farmer's Bull. 68. Apud Kimoto, T., 1968. Contribuição ao estudo do método de seleção de variedades locais de repólho (Brassica oleracea var. capitata L.) resistentes a Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson. Tese de doutoramento. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz". p. 3 (mimeografado).
- SNEDECOR, G.W., 1956. Statistical Methods. 5nd Ed. Ames. Iowa. The Iowa State University Press. 534 pp.
- STARR, M.P., 1959. Bacteria as plant pathogens. Ann. Rev. Microbiol. 13: 211-238.
- STODDARD, E.M. e A.E. Dimond, 1949. The chemotherapy of plant diseases. Bot. Rev. 15 (6): 345-376.
- SUTTON, M.D. e W. Bell, 1954. The use of aureomycin as a treatment of swede seed for the control of blackrot (Xanthomonas campestris). Plant Dis. Repr. 38: 547-552.

- SZIBALSKI, W. e V. Bryson, 1954. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. Cross resistance of Mycobacterium ranae to twenty-eight antimycobacterial agents. Am. Rev. Tuber. 69: 267-279.
- THIRUMALACHER, M.J., M.K. Patel, N.B. Kulkarni e G.H. Dhand, 1956. Effects "in vitro" of some antibiotics on thirty-two Xanthomonas species occurring in India. Phytopathology 46: 486-488.
- TOKESHI, H., 1966. Murcha de Fusarium em tomateiro. Estudo da variabilidade do patógeno e hospedeiro. Tese para livre-docência. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz". 64 pp. (mimeografado).
- TROUTMAN, J.L., 1959. Development of resistance to streptomycin by Pseudomonas tabaci (abst.). Phytopathology 49: 553.
- WALKER, J.C., 1934. Production of cabbage seed free from Phoma lingam and Bacterium campestre. Phytopathology 24: 158-160.
- WALKER, J.C., 1965. Patologia vegetal. Barcelona. Ed. Omega. 818 pp.
- WALKER, J.C. e W.B. Tisdale, 1920. Observations on seed transmission of the cabbage blackrot organism. Phytopathology 10: 175-177.
- WATANABE, T., 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bact. Rev. 27: 87-115.
- WEINDLING, R., H. Katznelson e H.P. Beale, 1950. Antibiosis in relation to plant diseases. Ann. Rev. Microbiol. 4: 247-260.
- YAMAKAWA, T., 1952. Studies on the development and revision of the resistance of S. typhi and S. enteritidis to chloramphenicol, aureomycin and streptomycin. J. Antibiotics 5: 113-114.
- ZAUMEYER, W., 1958. Antibiotics in the control of plant diseases. Ann. Rev. Microbiol. 12: 415-440.