

INTERAÇÃO FAGO-*Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson
A NÍVEL DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, EFEITO DO
VIRAZOLE E ESTUDO RADIOAUTOGRÁFICO DA AÇÃO DO
FAGO SOBRE O HOSPEDEIRO.

ILZA MARIA SITTOLIN

Orientador: Prof. Dr. DARCY MARTINS DA SILVA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril, 1982

Aos meus pais

João Carlos e Iolanda

pelo incentivo, compreensão
e apoio..

Com minha gratidão,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram para a realização desse trabalho e em especial:

Ao Prof. Dr. Darcy Martins da Silva, pela valiosa orientação, incentivo constante, dedicação e amizade demonstrados no decorrer do nosso trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), na pessoa do diretor Prof.Dr. Eneas Salati, onde o presente trabalho foi realizado.

A Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pelas facilidades oferecidas durante o curso de Pós-Graduação e pela concessão da bolsa de estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo durante a realização desta pesquisa.

Ao Projeto UNDP/IAEA/BRA/78/006 para o desenvolvimento da Produção Agrícola através da Aplicação de Técnicas Nucleares, na pessoa do Dr. Peter Vose, cujas doações contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Chukichi Kurozawa e Nilton Luiz de Souza da Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP-Botucatu, pelas plantas infectadas.

Ao Departamento de Fitopatologia-ESALQ-USP nas pessoas dos Professores Dr. Clélio Lima Salgado e Dr.Armando Bergamin Filho pelo auxílio no início desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Avelino R. Oliveira do Instituto de Biologia (UNICAMP), pelo auxílio nos testes serológicos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), na pessoa do Dr. Cassio G. Munhoz e Guilherme Blumen, pela utilização do fotomicroscópio.

Ao José Elias Gomes, técnico do Setor de Microscopia Eletrônica pela amizade e auxílio na realização deste trabalho.

À M.S. Irene Maria Gatti de Almeida pela amizade e auxílio na aprendizagem das técnicas em microscopia eletrônica.

À M.S. Maria das Graças Ongarelli pela amizade, colaboração e incentivo.

Ao M.S. Pablo Guzman Vargas pela amizade e colaboração.

À Nelci Teixeira Maniero pela gentileza e eficiência durante a execução dos trabalhos datilográficos.

Ao Sr. Louis D. Palmer pela versão do resumo para o inglês.

Aos colegas do Setor de Microscopia Eletrônica do CENA pelos bons momentos passados juntos.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	
SUMMARY	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Considerações gerais	5
2.1.1. Fontes de fagos	7
2.2. Características gerais do fago	7
2.2.1. Morfologia da placa de lise ..	7
2.2.2. Morfologia da partícula: cri- térios de classificação	9
2.2.3. Nomenclatura do fago	14
2.3. Microscopia eletrônica como método pa ra estudo dos fagos	14
2.3.1. Procedimentos gerais	14
2.3.2. Secções ultrafinas	16
2.4. Radioautografia	17
2.4.1. Traçador radioativo	17
2.5. Virazole como agente antiviral	19
2.5.1. Emprego do virazole no contro- le de viroses no homem	21
2.5.2. Emprego do virazole no contro- le de viroses de plantas	21

	Página
2.5.3. Ação do virazole no sistema fago-bactéria	22
2.5.4. Mecanismo de ação do virazole.	23
2.6. Serologia	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Meios de cultura	26
3.2. Origem e isolamento da bactéria	27
3.3. Inoculação de plantas e reisolamento do patógeno	28
3.4. Isolamento e purificação do bacteriófago	28
3.4.1. Detecção do fago: teste quantitativo	29
3.5. Estoque de fago com alto título	30
3.6. Caracterização do fago ao microscópio eletrônico	31
3.6.1. Coloração negativa com ácido fosfotungstico (PTA) 2 %, pH 7,2	32
3.7. Detecção das fases do processo infeccioso ao microscópio eletrônico	32
3.7.1. Através da coloração negativa com ácido fosfotungstico (PTA) 2 %, pH 7,0	32

3.7.2. Através da inclusão para obtenção de secções ultrafinas	33
3.7.2.1. Cortes e coloração ..	34
3. 8. Radioautografia	35
3.8.1. Tratamento e preparação do espécime para a técnica de radioautografia	35
3.8.2. Radioautografia a nível de microscopia óptica	38
3.8.2.1. Cobertura com emulsão fotográfica	38
3.8.2.2. Revelação, fixação e coloração das radioautografias para microscopia óptica	39
3.8.3. Radioautografia a nível de microscopia eletrônica	40
3.8.3.1. Cobertura com emulsão fotográfica	40
3.8.3.2. Revelação, fixação e coloração das radioautografias para microscopia eletrônica	41
3. 9. Determinação da densidade dos grãos de prata	43

3.10. Efeito do virazole (1-beta-ribofuranosyl 1, 2,4-triazole-3-carboxamide) sobre o processo de replicação do fago	44
3.10.1. Através de secções ultrafinas	44
3.10.2. Coloração negativa (PTA).....	45
3.11. Serologia	46
3.11.1. Preparação do anti-soro	46
3.11.2. Teste de dupla difusão em agar	47
3.11.3. Teste de precipitação em tubos	48
4. RESULTADOS	49
4. 1. Isolamento da bactéria	49
4. 2. Teste de patogenicidade	50
4. 3. Isolamento e purificação do fago	50
4. 4. Estoque de fago com alto título	52
4. 5. Morfologia da partícula	52
4. 6. Detecção das fases do processo infeccioso	52
4. 7. Cinética de incorporação de timidina tritiada em <i>X. campestris</i> infectada com fago	54
4. 8. Efeito do virazole no processo de infecção do fago em <i>X. campestris</i>	60

4.8.1. Através das secções ultrafinas.	60
4.8.2. Através da coloração negativa..	60
4. 9. Serologia	64
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES	74
7. LITERATURA CITADA	77

LISTA DE QUADROS

	Página
1 - Grupos morfológicos básicos de bacteriófagos com os tipos de ácido nucleico (BRADLEY,1967)	10
2 - O sistema LHT depois das recomendações do PCNV (1965)	12
3 - A situação do sistema LHT (Lwoff e Tournier, 1971)	13

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 - Esquema de algumas etapas da biossíntese dos nucleotídeos ácido guanílico e ácido adenilico e local de atuação do virazole	24
2 - Morfologia das placas de lise produzidas pelo fago de <i>X. campestris</i> . Placas de lise na diluição 10^3 (A) e 10^{10} (B) da preparação do extrato original	51
3 - Morfologia do fago de <i>X. campestris</i> . A) Partículas com bainhas contraídas e agregadas a pequenos fragmentos de bactéria. B) Partículas com bainhas distendidas mostrando a placa terminal. Coloração negativa com PTA 2 %, pH 7,0	53
4 - Fases do processo infectivo do fago de <i>X. campestris</i> . I - Estudo das fases do processo infectivo através da técnica de coloração negativa com ácido fosfotungstíco (PTA) 2 %, pH 7,0. II- Estudo das fases do processo infectivo através de inclusões e secções ultrafinas	55

- 5 - Curvas das densidades de grãos de prata no interior e exterior das bactérias sadias e infectadas com fago 58
- 6 - Eletrofotomicrografias das secções ultrafinas de *X. campestris* infectadas com fagos e tratadas com timidina tritiada durante: A) 5 minutos; B) 1 hora; C) 2 horas; D) 3 horas.... 59
- 7 - Coloração negativa com PTA 2 %, pH 7,0 de *X. campestris* mostrando o efeito do virazole (0,5 mg/ml) 60 minutos após a interação fago-bactéria. A) Bactérias não tratadas com virazole. B) Bactérias tratadas com virazole ... 61
- 8 - Estudo com virazole. I - Eletrofotomicrografias de secções ultrafinas de preparações de *X. campestris* infectadas com fago e tratadas com virazole. II - Eletrofotomicrografias de secções ultrafinas de preparações de *X. campestris* infectadas com fago e sem tratamento com virazole (controle) 62
- 9 - Eletrofotomicrografias das preparações serológicas dos testes de precipitação. A) Extrato de fago com soro heterólogo. B) Reação positiva entre fago e soro homólogo, mostrando o resultado da reação específica que permite a identificação de vírus 65

INTERAÇÃO FAGO-*Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson A NÍVEL DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, EFEITO DO VIRAZOLE E ESTUDO RADIOAUTOGRÁFICO DA AÇÃO DO FAGO SOBRE O HOSPEDEIRO.

Candidata: Ilza Maria Sittolin

Orientador: Prof.Dr. Darcy Martins da Silva

RESUMO

Na presente Dissertação foi isolado um bacteriófago de plantas de repolho infectadas com *Xanthomonas campestris*, provenientes da região de Botucatu-SP.

O extrato purificado apresentou um título de 10^{10} partículas viáveis/ml e produziu placas de lise de 1 mm de diâmetro.

O bacteriófago apresentou as seguintes características ao microscópio eletrônico: cabeça hexagonal com 82 nm de comprimento por 71 nm de largura, cauda com 112 nm de comprimento por 20 nm de largura e placa terminal com 45 nm de comprimento por 17 nm de altura. Devido a estas características o fago foi classificado no sistema LHT, como pertencente à Divisão Deoxyvira, Classe Deoxybinala, Ordem Urovirales e Família

Phagoviridae e ao Grupo A na classificação de Bradley sendo de nominado de *Xac-CENA*.

O processo de infecção foi estudado através das técnicas de coloração negativa (PTA) e secções ultrafinas, permitindo distinguir as fases de adsorção, período latente, lise e liberação dos fagos.

O exame das radioautografias mostrou que ocorreu um máximo de incorporação da timidina tritiada pelas bactérias infectadas com fago após 5 minutos de tratamento, indicando que o fago apresenta razoável domínio sobre o genoma da bactéria hospedeira desde o início do tratamento.

O efeito do virazole sobre o processo de infecção do fago à bactéria, pode estar mostrando uma ação inibidora e competitiva sobre a enzima inosina 5'-fosfato desidrogenase no sistema fago-bactéria, tal como tem sido relatado em *E. coli*.

As reações serológicas indicaram que ocorreu a indução de anticorpos específicos para o fago, como se pode ver através dos testes de dupla difusão em agar e de precipitação em tubos. O material obtido no teste de precipitação foi examinado ao microscópio eletrônico, observando-se agregados de partículas apenas entre as reações fago e anti-soro homólogo.

INTERACTION OF THE PHAGE-*Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson
AT THE ELECTRONIC MICROSCOPY LEVEL, VIRAZOLE EFFECT AND RADIOAU-
TOGRAPHIC STUDY OF THE PHAGE ACTION ON THE HOST.

Candidate: Ilza Maria Sittolin

Adviser: Prof.Dr. Darcy Martins da Silva

SUMMARY

A bacteriophage from the cabbage tissue infected with *Xanthomonas campestris* coming from the region of Botucatu SP was isolated in the present work.

The purified extract presented a titer of 10^{10} viable particles/ml and produced clear plaques of 1 mm diameter.

Electron microscopy revealed the following characteristics of the bacteriophage: hexagonal head with a length of 82 nm and a width of 71 nm, contractible tail with a length of 112 nm and a width of 20 nm. Terminal plaque with a length of 45 nm a height of 17 nm. Due to these characteristics the phage was classified, in the LHT system, as belonging to Deoxyvira Division, Deoxybinal Class, Urovirales Order and Phagoviridae Family and to the group A in the Bradley classification. We named it *Xac-CENA*.

The infection process was studied through a negative staining technique (PTA) and ultrathin section, permitting to distinguish the phases of adsorption, latent period, lysis and release of the phages.

Radioautography showed that a maximum incorporation of the tritiated thymidine in infected bacteria with the phage occurred after 5 minutes indicating that the phage presented a reasonable domain on the bacterial host genome since the beginning of the treatment.

The effect of virazole on the infection process of the phage present in the bacteria, may show an inhibitive and competitive action of the inosine 5'-phosphate dehydrogenase enzyme of the phage-bacterium system, such as has been reported in *E. coli*.

Serological reactions indicated that induction of specific antibodies for the phage, occurred as shown by the diffusion tests in agar and precipitation tests in test tubes. The material obtained in the precipitation tests was examined by electronic microscopy. Aggregated virus particles were observed only in the reactions between the phage and homologous anti-serum.

1. INTRODUÇÃO

A podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson é a principal doença que ocorre sobre as crucíferas cultivadas. As perdas frequentemente são totais nos períodos quentes e úmidos. A bactéria agente causal é cosmopolita e tem sido observada em todo o país nas mais variadas condições durante todos os períodos agrícolas (GALLI et alii, 1968).

A disseminação de *X. campestris* é feita de região para região, principalmente através de sementes infectadas (WALKER, 1969).

Dentre as medidas de controle e detecção de patógenos em sementes que poderiam ser utilizadas, BERGAMIN FILHO (1975) sugeriu o emprego de bacteriófagos ativos contra este agente patogênico.

Deste modo, dentre outras possíveis utilizações de bacteriófagos parece razoável considerar as pesquisas no sentido de se fazer o controle biológico de bactérias fitopatogênicas através de fagos, visando assim reduzir o efeito poluente dos produtos químicos no meio ambiente.

Outro aspecto importante e bastante recente da utilização de bacteriófagos se refere aos fagos de algas ("Cyanophages") no controle da população de algas em reservatórios de tratamento de água, lagoas de estabilização, lagos e rios.

O fago tem sido usado como modelo para a exploração das propriedades biológicas fundamentais dos vírus e essa área devidamente explorada deu considerável avanço à Engenharia Genética. O conhecimento dos aspectos básicos do seu processo replicativo poderá também contribuir para a estratégia do controle dos vírus em geral.

De maneira geral os bacteriófagos constituem material interessante para testes com viricidas pois são melhor conhecidos geneticamente, são de curto ciclo vital e se multiplicam em condições experimentais mais facilmente controláveis que os vírus de plantas e animais.

Recentemente tem sido utilizado viricidas com o objetivo de testar sua ação inibidora na replicação de diversos vírus que afetam variados hospedeiros. Na literatura existem trabalhos relatando resultados da ação do virazole sobre os vírus que afetam o homem e plantas (SHEPARD, 1977; LERCH, 1977; STREETER et alii, 1973; SIDWELL et alii, 1972; De FAZIO et alii, 1978 e GUZMAN, 1980).

Pode-se acrescentar ainda que estudos do poder inibidor dos viricidas sobre o fago venham resolver problemas causados por bacteriófagos que infectam bactérias de interesse nas fermentações industriais.

Devido a escassez de trabalhos que tratam especificamente de bacteriófagos de bactérias fitopatogênicas é de grande interesse que pesquisas envolvendo fagos sejam realizadas no nosso meio.

Por este motivo, foi planejado o presente trabalho com os seguintes objetivos:

1. Isolar e caracterizar o bacteriófago de *X. campestris*.
2. Estudar as fases do processo infectivo do fago em *X. campestris*.

3. Estudar a cinética de absorção de timidina tritiada pela bactéria nos vários estágios da infecção através de estudos radioautográficos a nível de microscopia eletrônica.
4. Testar o efeito do viricida virazole no processo de infecção do fago em *X. campestris* através das técnicas de coloração negativa com ácido fosfotungstico (PTA) e de secções ultrafinas.
5. Obter anti-soro para o fago de *X. campestris* visando estudar as reações serológicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Considerações gerais

Os estudos sobre os bacteriófagos tiveram um avanço bastante grande nos últimos anos, especialmente o estudo de fagos descritos na bacteriologia médica. Todavia pouco se sabe até agora sobre os fagos em relação as bactérias fitopatogênicas, especialmente no que se refere a pesquisa básica de sua natureza (OKABE e GOTO, 1963).

Segundo MUNCIE e PATEL (1930) provavelmente Malman e Hemstreet em 1924 foram os primeiros autores a descreverem a ação de um agente inibidor numa espécie fitopatogênica. Foi obtido um agente lítico contra *Bacillus carotovorus* que inibia o crescimento da bactéria em meio de cultura.

Em seguida, COONS e KOTILA (1925) isolaram fagos de *B. carotovora* (*Erwinia carotovoras*). A partir daí, existe um grande número de trabalhos na literatura até os mais recentes, referentes a pesquisas sobre o controle de doença (CIVEROLO, 1973), sobre ecologia (DOWLER e WEAVER, 1975), sobre patologia de sementes (KAUFFMAN e REDDY, 1975) e sobre ultraestrutura (FRANKLIN e GRANBOULAN, 1966; SIMON e ANDERSON, 1967; BRADLEY, 1967; TIKHONENKO, 1970; SITTOLIN e SILVA, 1979; LIEW e ALVAREZ, 1980).

Entretanto, no Brasil, afirma textualmente BERGAMIN FILHO (1975) "não há trabalho algum que trate especificamente de fagos de bactérias fitopatogênicas. Apenas Namekata (1971), num trabalho com *Xanthomonas citri*, utilizou bacteriófagos mas, mesmo neste caso, os bacteriófagos foram importados do Japão e aqui se procedeu somente a testes de sensibilidade com vários isolados da bactéria".

Deste modo, o primeiro trabalho com fagos de bactérias fitopatogênicas realizado no Brasil foi o de BERGAMIN FILHO em 1975, que procedeu ao isolamento de fagos ativos contra *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas vesicatoria* como também constatou ser eficiente o método para detecção de patógenos de sementes. Sobre o controle das doenças causadas por *X. campestris* e *X. vesicatoria* através dos fagos, observou que houve redução de até 99,83 % da doença quando o fago e a bactéria foram inoculados juntos. Para *X. vesicatoria* a redução foi de 95,02 %.

Depois deste trabalho, temos referência de que somente MATYIS et alii (1976) através de observações ao microscópio eletrônico, relatou a ocorrência de 3 tipos de bacteriófagos de *Xanthomonas sp.* com base na morfologia e MOHAN (1980) que isolou 4 fagos de *Pseudomonas syringae pv. garcae* no Estado do Paraná.

2.1.1. Fontes de fagos

As próprias bactérias são normalmente a fonte mais adequada de fagos. Assim, bacteriófagos ativos contra bactérias fitopatogênicas tem sido isolados de lesões do tecido vegetal doente (KLEMENT, 1959; COOK e KATZNELSON, 1960; ECHANDI e SUN, 1973; BERGAMIN FILHO, 1975), de solo (ERSKINE, 1973 e LIEW e ALVAREZ, 1981), de sementes (SUTTON e KATZNELSON, 1953; KLEMENT, 1957) e de água de irrigação que também pode ser fonte de fagos para os patógenos de plantas doentes localizadas próximas a canais de irrigação, conforme trabalho de Yoshimura e Morihaski (1959), citado por OKABE e GOTO (1963).

2.2. Características gerais do fago

2.2.1. Morfologia da placa de lise

MANDELL e EINSENSTARK (1953) estudaram os fatores que afetam a formação da placa de lise usando bacteriófagos de

X. pruni e observaram que aumentando a concentração do agar as placas diminuíram em tamanho e nitidez, embora esse efeito não fosse tão pronunciado como outros. Observaram também uma diminuição no tamanho das placas de lise, quanto maior a quantidade de células bacterianas. À temperatura acima de 25°C as placas apresentavam-se pequenas, acima de 30°C muito pequenas e irregulares e acima de 33°C não foi observado placas de lise. O tamanho máximo das placas de lise foi obtido quando se usou uma concentração máxima de NaCl na qual a bactéria crescia.

EISENSTARK e THORNBERRY (1950), detectaram 3 tipos diferentes de placas de lise embora não foi possível afirmar se pertenciam a fagos diferentes, devido ao fato de que em repicagens subsequentes destas placas eles observaram um único tipo de placas de lise.

Bacteriófagos de *Corynebacterium michiganense* produziram placas de lise claras e com bordos nítidos medindo 0,5-1,0 mm de diâmetro (ECHANDI e SUN, 1973).

Segundo BERGAMIN FILHO (1975) as placas de lise produzidas por bacteriófagos de *X. campestris* apresentaram forma circular com bordos nítidos e tem seu interior absolutamente livre de crescimento bacteriano. O diâmetro médio da placa foi de 1,0-1,5 mm.

LIEW e ALVAREZ (1981) estudaram sete fagos virulentos de *X. campestris* isolados de solos e sementes infectadas, que foram caracterizados no Havaí e comparados com dois fagos um do Japão e outro da Carolina do Norte. Obtiveram placas de lise de diâmetros diferentes e bordos lisos e irregulares. As dimensões das placas variaram de 0,5 a 3,5 mm.

2.2.2. Morfologia da partícula: critérios de classificação

Com o desenvolvimento da microscopia eletrônica tornou-se possível classificar os fagos com base na sua morfologia.

BRADLEY (1967), relata os tipos morfológicos básicos de bacteriófagos em seis grupos, sugerindo que, uma diferença fundamental na morfologia reflete uma diferença no tipo de ácido nucleico. O tipo de ácido nucleico encontrado nos componentes de cada grupo tem mostrado ser o mesmo indiferente ao gênero da bactéria hospedeira. O Quadro 1 resume os grupos morfológicos.

Quadro 1 - Grupos morfológicos básicos de bacteriófagos com os tipos de ácido nucleico (BRADLEY, 1967).

Grupo	Descrição	Tipo de Ácido Nucleico
A	Cauda contrátil	2-DNA (fita dupla)
B	Cauda longa não contrátil	2-DNA (fita dupla)
C	Cauda curta não contrátil	2-DNA (fita dupla)
D	Sem cauda, com capsômeros grandes	1-DNA (fita simples)
E	Sem cauda, com capsômeros pequenos	1-DNA (fita simples)
F	Sem cabeça, filamento flexível	1-DNA (fita simples)

Posteriormente TIKHONENKO (1970) preferiu combinar os grupos 4 e 5 da classificação de Bradley em um somente dividindo-os em 5 grupos morfológicos: (1) fagos em forma de filamento; (2) fagos com um princípio de cauda; (3) fagos com uma cauda curta; (4) fagos com uma cauda longa não contrátil; (5) fagos com uma cauda de estrutura complexa e uma bainha contrátil.

Em 1962, foi publicado pela primeira vez o sistema LHT, assim denominado por ser elaborado por Andre Lowff, Robert Horne e Paul Tournier, que é baseado única e exclusivamente nas características do virion, deixando de lado hospedeiros, sinto-

mas, vetores e outros elementos levados em conta anteriormente. O sistema é simples e a ordem hierárquica das características é a seguinte:

I. Tipo de ácido nucleico

São existem duas possibilidades: DNA ou RNA.

II. Tipo de simetria do capsídeo

São existem três possibilidades: cúbica, helicoidal e complexa.

III. Presença ou não de pêlos.

IV. Número de capsômeros (para vírus de simetria cúbica)
Diâmetro do nucleocapsídeo (para vírus de simetria helicoidal).

Assim, em 1965, o sistema LHT foi escolhido pelo "Provisional Committee for Nomenclature of Viruses" (PCNV), como o mais adequado às necessidades do momento da virologia. A última atualização do sistema LHT foi feita em 1971, com poucas alterações.

Os Quadros 2 e 3, extraídos de Lowff e Tournier resumem o sistema de classificação.

Quadro 2 - O sistema LHT depois das recomendações do PCNV (1965).

Phylúm	Divisão	Classe	Ordem	Sub-ordem	Família
			N	-	-
		Deoxyhelica	E-Chitovirales		Poxviridae 100 A
			N-Haplovirales		Microviridae 12 Parvoviridae 32 Papilloviridae 72 Adenoviridae 252 Iridoviridae 812 Inoviridae
	Deoxyvira	Deoxycubica			
			E-Peplovirales		Herpesviridae 162
		Deoxybinala	N-Urovirales		Phagoviridae
			E		
Vira		Riboelica	N-Rhabdovirales	Rigidovirales	Dolichoviridae 120-130 A Protoviridae 150 A Pachyviridae 200 A
				Flexiviridae	Leptoviridae 100-110 A Mesoviridae 120-130 A Adroviridae 150 A
	Ribovira		E-Sagovirales		Myxoviridae 90 A Paramyxoviridae 180 A Stomatoviridae
		Ribocubica	N-Gymnovirales		Napoviridae 32 Reoviridae 92
			E-Togavirales		Arboviridae

Os números da última coluna representam diâmetro do nucleocapsídeo (vírus de simetria helicoidal) e número de capsômeros (vírus de simetria cúbica). N = nucleocapsídeos nus; E = nucleocapsídeos com peplô.

Quadro 3 - A situação do Sistema LHT (Lwoff e Tournier, 1971)

Ácido Nucleico	Simetria do capsídeo	Com (E) ou sem (N) peplos	Família	Diâmetro ou nº de capsômeros	
DNA	H	N	Inoviridae	50 Å	
		E	Poxviridae	?	
		N	Microviridae	12	
	C			Parvoviridae	32
				Densoviridae	42
				Papiloviridae	72
				Adenoviridae	252
				Iridoviridae	812
		E	Herpesviridae	162	
	RNA	B	N	Phagoviridae	
				Dolichoviridae	120-130 Å
		H	N	Protoviridae	150 Å
			Pachyviridae	200 Å	
			Leptoviridae	100-110 Å	
			Mesoviridae	120-130 Å	
E			Adroviridae	150 Å	
			Myxoviridae	90 Å	
			Paramyxoviridae	180 Å	
			Stomatoviridae		
	Thylaxoviridae	?			
C	N	Naporividae	32		
		Reoviridae	92		
	E	Encephaloviridae	?		

Os nomes das Divisões, Ordens e Subordens continuam iguais aos do Quadro 1.

2.2.3. Nomenclatura do fago

A nomenclatura é o último passo na caracterização e ACKERMANN et alii (1978) sugerem que o nome dos fagos iniciem com as duas primeiras letras do gênero do hospedeiro seguido pela primeira letra do nome das espécies. Deste modo, *Bacillus cereus* poderá ser denominado "Bac" e *Bacillus subtilis* de "Bas". A nomenclatura proposta não deve ser utilizada sem maiores considerações afim de evitar uma mesma denominação para diferentes fagos.

2.3. Microscopia eletrônica como método para estudo dos fagos

2.3.1. Procedimentos gerais

A microscopia eletrônica é de grande importância como método para caracterização de vírus pois frequentemente permite uma classificação imediata dos novos isolados em grupos morfológicos (ACKERMANN et alii, 1978).

Os extratos contendo fagos devem ser purificados para o estudo de sua estrutura. Uma recomendação geral é sedimentá-los duas vezes durante 30-60 minutos (BRADLEY, 1967).

A fixação pode ser utilizada para prevenir diminuição das partículas. A fixação com glutaraldeído durante 15-60

minutos protege a cauda do fago de *Xanthomonas*, XP-12, contra o encolhimento ou diminuição induzido pelo acetato de uranila.

Para a coloração, o ácido fosfotungstico (PTA) e o acetato de uranila são os corantes mais indicados, pois possibilitam melhor contraste para os espécimes biológicos. Eles dão uma coloração negativa satisfatória, além disso, o acetato de uranila faz a coloração positiva dos capsídeos contendo frações variáveis de DNA. Entretanto, o acetato de uranila cristaliza facilmente podendo causar uma diminuição das cabeças dos fagos coloridos positivamente e um aumento das estruturas proteicas. Por outro lado, ele aumenta as estriações da cauda e facilita a detecção de capsômeros pentagonais (ACKERMANN et alii, 1974).

Por este fato, ACKERMANN et alii, 1978, aconselham que a coloração positiva com acetato de uranila não deve ser utilizada para estudo das dimensões dos fagos.

Segundo BRADLEY (1967), o método mais adequado para coloração negativa é a utilização de volumes iguais de uma suspensão de fago (em solução 0,1 M de acetato de amônia e solução 2 % de PTA neutro). A resolução obtida com este método é muito alta, subunidades morfológicas de 10 Å são reveladas.

A fixação com O_5O_4 antes da coloração negativa tem sido também sugerida para os fagos NERMUT (1972).

2.3.2. Secções ultrafinas

A preparação de secções ultrafinas é necessária para estudar a multiplicação intracelular de bacteriófagos (KELLENBERGER et alii, 1959; FRANKLIN e GRANBOULAN, 1966; BRADLEY, 1967; TIKHONENKO, 1970).

Para o exame das bactérias infectadas com fago, procede-se a fixação com glutaraldeído e depois com tetróxido de ósmio. Após desidratação em acetona contendo acetato de urânio, os espécimes são colocados em resina apropriada. As secções são feitas de ultramicrótomo e colocadas em grades. A coloração adicional com citrato de chumbo ou outros metais complexos é usualmente realizada antes do exame ao microscópio eletrônico. Embora este procedimento mostre partículas de vírus particularmente bem, mudanças no nucleoplasma não são claras, e para este propósito pode ser útil seguir o procedimento de KELLENBERGER et alii, 1959 que usou apenas tetróxido de ósmio tamponado na presença de Ca^{++} e aminoácidos para fixação. (BRADLEY, 1967 e SIMON e ANDERSON, 1967).

TIKHONENKO (1970) sugere uma modificação no método de Kellenberger para a obtenção de estruturas ultrafinas pre

servadas de células bacterianas infectadas ou não com fagos, por achá-lo inadequado para algumas espécies de bactéria.

2.4. Radioautografia

A radioautografia é uma técnica que tem como objetivos localizar e visualizar um traçador radioativo dentro de uma célula, de um órgão ou do organismo todo (BIENZ, 1977).

Pelo processo radioautográfico quantidades muito pequenas de material radioativo são detectados por meio das emulsões fotográficas. A radiação produz uma imagem latente na emulsão que se torna visível através dos processos fotográficos convencionais. As estruturas que incorporaram o precursor radioativo serão focos de emissão de radiação, produzindo grão de prata pela redução do AgBr utilizado na cobertura dos espécimes.

2.4.1. Traçador radioativo

Os radioisótopos mais empregados em radioautografia são os isótopos emissores de partículas beta de baixa energia, porque melhoram a resolução do método. O radioisótopo mais utilizado é o ^3H , seguido do ^{14}C , ^{125}I e ocasionalmente ^{32}P e ^{35}S .

Na escolha do radioisótopo, deve-se considerar as seguintes características:

- A meia vida física da partícula deve ser suficientemente longa para permitir a realização do trabalho, com desprezível queda de radioatividade durante a pesquisa;

- A atividade específica deve ser suficiente para sensibilizar os cristais de brometo de prata da emulsão fotográfica;

- A energia de emissão deve ser baixa, pois a energia de radiação está diretamente relacionada com a resolução das radioautografias.

Com a utilização de emissores de partículas beta de alta energia, estas poderão passar através da fina camada de emulsão fotográfica, produzindo sua ionização longe da fonte, ou ainda apresentando mais de um grão de prata por radiação emitida.

Deste modo, o radioisótopo mais frequentemente empregado em radioautografia é o trítio (^3H) isótopo de hidrogênio produzido artificialmente.

Segundo LEDERER et alii (1967) o trítio apresenta algumas características como: número atômico 1, número de massa 3, meia vida física 12,3 anos, emissor beta puro (elétrons), energia máxima 0,0186 MeV e energia média 0,0056 MeV. O ^3H permite uma alta resolução, pois o seu R_{β} max (camada necessária para absorção completa da radiação beta do ^3H) é de $0,5 \text{ mg/cm}^2$ ou seja uma trajetória de $5 \mu\text{m}$ em água.

Foi demonstrado por PELC (1963) que praticamente cada radiação emitida pelo trítio é capaz de afetar apenas um cristal de brometo de prata.

Para microscopia eletrônica, a resolução é definida em termos de probabilidade de ser formado um grão de prata.

BACKMANN e SALPETER (1965) introduziram uma definição de resolução como sendo a distância da fonte, dentro da qual se localizam 50 % do total de grãos por ela produzidos.

Para se tomar a medida das áreas, WILLIAMS (1969) mostrou a possibilidade de se determiná-las por ponto ou linha, círculos ou planimetria.

2.5. Virazole como agente antiviral

A história do controle de moléstias do homem, animal e planta tem sido marcada por descobertas de compostos de natureza diversa e que se revelaram decisivos na luta contra os patógenos.

A primeira etapa se caracterizou pelo pequeno número de drogas para o combate às doenças e que antecedeu o período das sulfas.

Posteriormente ocorreu a fase dos antibióticos em que os patologistas viram enriquecer os meios de controle de doenças com uma diversidade muito grande de antibióticos. Finalmente, vem se desenvolvendo uma nova fase onde se destacam os

antivírus; surgidos de pesquisas para descobrir fármacos efetivos no controle de diversos tipos de câncer.

A síntese e desenvolvimento de um agente antiviral de largo espectro tem sido um desafio devido a íntima associação entre a replicação do vírus e os processos bioquímicos da célula hospedeira (STREETER et alii, 1973).

No início do desenvolvimento dos produtos quimioterápicos, pensou-se na impossibilidade de se encontrar compostos com capacidade para interferir somente no ciclo dos vírus sem matar as células do hospedeiro. Entretanto, pesquisas utilizando tais substâncias tem mostrado a viabilidade prática deste método de controle.

Grandes avanços tem sido feitos ultimamente principalmente porque já se conta com o virazole tritiado permitindo portanto, o desenvolvimento de técnicas mais precisas de radioautografia (STREETER et alii, 1973).

Na literatura encontram-se alguns trabalhos relatando resultados da ação de agentes viricidas sobre os vírus que afetam variados hospedeiros.

2.5.1. Emprego do virazole no controle de viroses no ho mem

Segundo MAUGH, 1976, alguns compostos já estão sendo comercializados para a utilização no controle quimioterápico de viroses no homem, como é o caso do idoxuridine (5-iodo-2'-deoxyrudine) utilizado nos Estados Unidos para o controle de uma infecção nos olhos ocasionada por *Herpes ceratitis*, do methisazone (N-methylisatin-beta-thiosemicarbazone) utilizado na Inglaterra para o controle dos vírus "small pox" e "vaccinia" (cowpox).

O virazole está sendo comercializado no México para o controle de infecções virais respiratórias e no Brasil para o tratamento da hepatite.

O virazole parece ser efetivo no controle de três diferentes tipos de doenças: infecções pelo vírus herpes, hepatite e influenza (MAUGH, 1976).

2.5.2. Emprego do virazole no controle de viroses de plantas

Pesquisas visando o controle de fitoviroses através da utilização de viricidas tem sido realizadas empregando-se especialmente o virazole.

Segundo De FAZIO et alii, 1978, o virazole foi utilizado com sucesso contra o vírus do tomateiro e de plantas de fumo. Com este trabalho fez-se pela primeira vez, no Brasil, a recomendação do uso destes compostos para o controle de vírus de plantas.

Num trabalho recente GUZMAN (1980), estudou o efeito quimioterápico do virazole sobre os vírus do mosaico do fumo (TMV), do mosaico amarelo do feijoeiro e isolado Piracicaba (VMAF-P) e do mosaico da vigna e concluiu com os resultados obtidos que existe uma ação viricida do virazole sobre estes vírus quando inoculados, principalmente, imediatamente após a inoculação.

2.5.3. Ação do virazole no sistema fago-bactéria

Os bacteriófagos poderiam ser utilizados como modelo para testar a ação desses agentes antivirais, pela sua facilidade de manipulação.

Os bacteriófagos são também economicamente importantes na infecção de bactérias utilizadas nas fermentações industriais. Bactérias de ácido lático são empregadas amplamente na indústria do leite, primeiramente para a manufatura do queijo e leite fermentado; sendo que muitos casos de baixa produção de ácido tem sido atribuídos a presença de bacteriófagos infectando as culturas (SOZZI et alii, 1980).

Outro problema do ataque por fagos numa fermentação bacteriana ocorre com *Clostridium acetobutylicum* empregado na fermentação acetona-butanol. A evolução dos gases dióxido de carbono e hidrogênio cessam quando as células bacterianas são lisadas pelo fago (CASIDA, 1968).

Com relação a ação do virazole em fagos não existe quase nada relatado na literatura. Apenas os trabalhos de MENZEL e STENZ, 1978 e SITTOLIN et alii, 1980.

MENZEL e STENZ 1978, utilizou o virazole em fagos LPP-1 que infectavam a alga *Plectonema boryanum* e observou que o virazole inibiu a formação de placas de cianofago LPP-1.

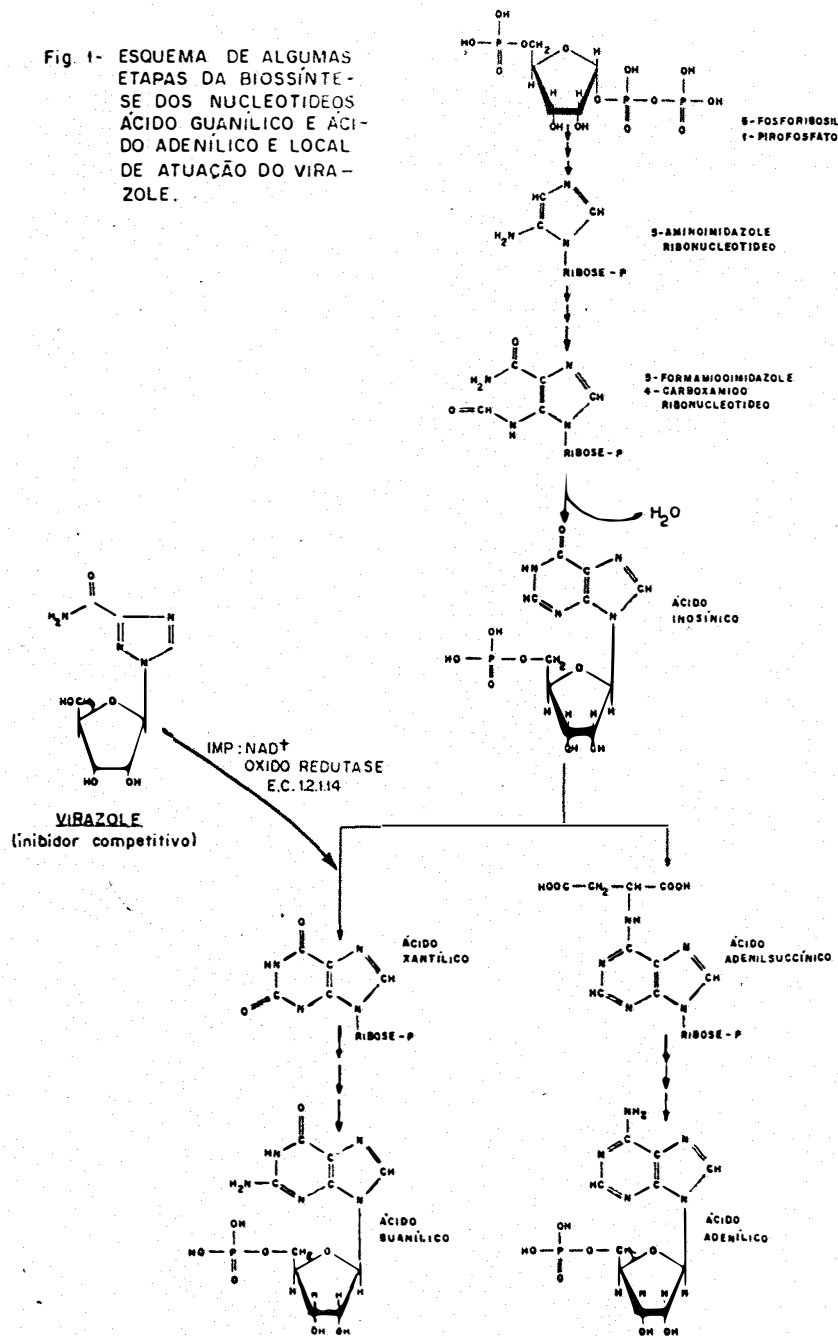
SITTOLIN et alii, 1980 observou o efeito inibidor do virazole em fagos de *X. campestris* através de estudos ao microscópio eletrônico.

2.5.4. Mecanismo de ação do virazole

O amplo espectro da substância antiviral virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1-2-4-triazole-3-carboxamide) inibem um número de eventos bioquímicos, de modo que, sua ação leva a um efeito "viricida".

A Figura 1 esquematiza o local de atuação do virazole.

Fig. 1- ESQUEMA DE ALGUMAS ETAPAS DA BIOSÍNTESE DOS NUCLEOTÍDEOS ÁCIDO GUANÍLICO E ÁCIDO ADENÍLICO E LOCAL DE ATUAÇÃO DO VIRAZOLE.



Devido a uma analogia química entre o substrato ácido inosínico e o inibidor virazole, ocorre uma competição entre estes dois compostos para a enzima inosina 5'fosfato desidrogenase (IMP:NAD⁺ óxido redutase). Este fato foi demonstrado através de estudos cinéticos onde se caracterizou com segurança uma inibição competitiva (SMITH, 1980).

2.6. Serologia

A alta especificidade das reações serológicas é determinada pela natureza química do antígeno, particularmente proteínas e polissacarídeos.

Em geral bacteriófagos são bons antígenos, produzindo anti-soro com alta constante de inativação (BRADLEY, 1967).

As técnicas serológicas mostram-se úteis na identificação de patógenos, nas relações filogenéticas e na pesquisa básica.

Diversos são os tipos de reações serológicas descritas por muitos autores, dentre os quais se destacam trabalhos como os de LOVREKOVICH e KLEMENT, 1965; MATHEUS, 1970; OLIVEIRA, 1975; TAYLOR, 1970 e 1972 e DERRICK, 1973.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura

Para os isolamentos e manutenção das culturas foram usados os seguintes meios:

Caldo nutriente

Extrato de carne	-	3 g
Peptona	-	10 g
Sacarose	-	10 g
Água destilada	-	1000 ml

Agar nutriente

Extrato de carne	-	3 g
Peptona	-	10 g
Sacarose	-	10 g
Agar	-	15 g
Água destilada	-	1000 ml

Agar nutriente semi-sólido

Extrato de carne	-	3	g
Peptona	-	10	g
Sacarose	-	10	g
Agar	-	7,5	g
Água	-	1000	ml

3.2. Origem e isolamento da bactéria

A bactéria *X. campestris* foi isolada de tecido foliar de repolho (*Brassica oleracea*) com sintomas de podridão negra, provenientes da região de Botucatu, SP.

Pequenas secções do material vegetal doente foram desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio 0,5% durante 1 minuto e lavados com água esterilizada.

Em seguida essas peças foram colocadas em placas de Petri contendo nutriente agar e incubadas a 28°C, durante 24 horas. Seguiram-se repicagens de colonias isoladas fazendo-se a transferência para tubos de ensaio contendo agar nutriente inclinado.

3.3. Inoculação de plantas e reisolamento do patógeno

Foi realizado o teste de patogenicidade inoculando uma suspensão bacteriana na concentração de 10^8 células/ml. Essa concentração foi estimada pela escala McFarland. As hospedeiras utilizadas foram variedades de couve susceptíveis à *X. campestris*, provenientes do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP. Com o auxílio de seringa estéril provida de agulha bem fina, fez-se a injeção da suspensão bacteriana no tecido foliar.

A suspensão de *X. campestris* também foi inoculada por pulverização em plantas submetidas às condições de câmara úmida durante 24 horas. Após a pulverização de toda a superfície das folhas, as plantas foram recolocadas na câmara úmida por mais 24 horas.

A avaliação foi feita 7 dias após a inoculação.

3.4. Isolamento e purificação do bacteriófago

O bacteriófago foi isolado de plantas de repolho intensamente infectadas com *X. campestris*. O método consistiu em tomar uma amostra de aproximadamente 150 gramas de tecido vegetal doente, que foi adicionada a 500 ml de caldo nutriente e homogeneizada em liquidifica

dor. O homogeneizado foi colocado em um erlenmeyer ao qual se adicionou uma suspensão de 10^8 células/ml de *X. campestris*, com 24 horas de idade, para favorecer a replicação dos fagos caso estivessem presentes no material macerado. Incubou-se a 28°C , durante 48 horas. A essa operação denominamos de enriquecimento. Após esse tempo, procedeu-se a centrifugação do homogeneizado a 3.000 g durante 30 minutos. O sobrenadante foi purificado através de filtros bacteriológicos Millipore devidamente esterilizados, com membranas de $0,45\ \mu\text{m}$ (tamanho do poro). O extrato filtrado foi armazenado assepticamente a 4°C . O teste para detecção do fago foi feito utilizando-se como bactéria indicadora a *X. campestris* isolada em 3.1.

3.4.1. Detecção do fago: teste quantitativo

Do filtrado obtido em 3.4 foram feitas uma série de diluições em condições assépticas, transferindo-se 0,5 ml da solução original para tubos de ensaio contendo 4,5 ml de caldo nutriente e assim sucessivamente até a obtenção de várias concentrações diferentes: original, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ... 10^{-10} . Além disso, preparou-se uma suspensão da bactéria indicadora em 5 ml de caldo nutriente provenientes de uma cultura de bactéria semeada em agar nutriente inclinado, com 24 horas de idade.

Em tubos de ensaio contendo 3 ml de agar semi-sólido, mantidos em estado líquido a 46⁰C em banho-maria, foram colocados 0,1 ml de cada diluição do bacteriófago e 0,1 ml da suspensão da bactéria indicadora. Após suave agitação, o conteúdo do tubo foi vertido sobre uma placa de Petri, previamente preparada, com 15 ml de agar nutriente. Incubou-se a 28⁰C e após cerca de 12 a 18 horas fez-se a leitura das placas de lise (modificado de ADAMS, 1959).

Além da detecção do fago o teste quantitativo permite a caracterização da morfologia da placa de lise, resultante da interação bacteriófago-bactéria. Foi observado a forma e o diâmetro médio das placas de lise.

3.5. Estoque de fago com alto título

O método tradicional utilizado para a obtenção de fago com alto título, consistiu em adicionar uma suspensão de fagos a uma cultura da bactéria indicadora, em meio líquido, e na fase logarítmica de crescimento. Após um período de 12 horas a mistura foi filtrada em filtro bacteriológico.

O segundo método empregado foi o de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955), que consistiu na utilização de placas de Petri apresentando placas de lise confluentes (10^4 partículas viáveis por placa) obtidas como descrito em 3.4.1. A cada uma des

As placas foram adicionado 5 ml de uma suspensão antiga de fagos e com uma espátula, procedeu-se a remoção da camada de agar semi-sólido da placa de Petri.

O material coletado foi então triturado em liquidificador por 15 segundos, ao qual foi adicionado uma suspensão da bactéria indicadora *X. campestris*. Incubou-se a 28°C por aproximadamente 12 horas. Em seguida procedeu-se a uma nova trituração, por 15 segundos, e a uma baixa centrifugação (3000 g por minuto) para remoção das partículas sólidas e bactérias. Finalmente a mistura foi filtrada em filtro bacteriológico e armazenada assepticamente a 4°C.

Adicionalmente, foram feitos testes de longevidade com as preparações purificadas e estocadas em geladeira (4°C), durante 10 e 12 meses.

3.6. Caracterização do fago ao microscópio eletrônico

Para caracterização dos fagos ao microscópio eletrônico, utilizou-se uma suspensão de fagos com alto título conforme descrito em 3.5.1. A suspensão de fagos foi submetida primeiramente a uma baixa centrifugação de 3000 g por 20 minutos, numa ultracentrífuga Beckman Model L-2. Em seguida o sobrenadante foi centrifugado a 26.000 g durante 1 hora. O sedimento foi ressuspendido em solução salina 0,85 %.

3.6.1. Coloração negativa com ácido fosfotungstíco (PTA) 2 %, pH 7,2.

Sobre grades de cobre de 400 "mesh", previamente cobertas com película de parafina e carvão, foi depositada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur uma gota da suspensão do fago. Após a eliminação do excesso de líquido através de um papel de filtro, colocou-se uma gota do corante PTA 2 %, pH 7,2 (BRENNER e HORNE, 1959). Retirou-se o excesso do corante com papel de filtro e em seguida as grades foram examinadas num microscópio eletrônico Elmiskop IA da Siemens operando a 80.000 volts.

3.7. Detecção das fases do processo infectivo ao microscópio eletrônico

3.7.1. Através da coloração negativa com ácido fosfotungstíco (PTA) 2 %, pH 7,0

Visando delimitar as fases do processo de infecção foram retiradas amostras da mistura bactéria (10^8 células/ml e fago 10^9 partículas viáveis/ml) em intervalos de 5 min., 20 min., 30 min., 45 min., 1 h, 2 h, 3 h e 4 h). Após cada intervalo de tempo as amostras foram fixadas com glutaraldeído 10 % por 10 minutos. Após fixação cada amostra foi colocada em grades de cobre e coloridas com PTA como descrito em 3.6.1. O material foi

examinado ao microscópio eletrônico para observação dos processos de adsorção, penetração e liberação das partículas do fago.

3.7.2. Através da inclusão para obtenção de secções ultrafinas

Uma suspensão pesada de bactérias com 24 horas de idade foi inoculada com bacteriófagos (10^9 partículas/viã - veis/ml) e mantida durante os intervalos de tempo de 5 min., 30 min., 45 min., 1 h, 2 h, 3 h e 4 h. Após cada intervalo de tempo as amostras foram fixadas com glutaraldeído (6,5 % em tampão cacodilato 0,125 M, pH 7,2) durante 30 minutos.

Em seguida as amostras foram centrifugadas a 3.000 g durante 20 minutos e o sedimento incluído em agar 2 % e tratadas pela técnica usual de preparação do espécime para microscopia eletrônica que constou dos seguintes passos:

Fixação: com glutaraldeído 6,5 % em tampão cacodilato 0,125 M pH 7,2, durante 1 hora a 4°C.

Pós-fixação: com ácido ôsmico 2 % em tampão cacodilato 0,125 M pH 7,2, durante 1 hora.

Pré-coloração: em solução de acetato de uranila 2 % dissolvida em acetona 75 %, durante toda a noite a 4°C.

Desidratação: duas trocas em acetona 90 % de 10 minutos cada, seguida de três trocas em acetona 100 % de 20 minutos cada e duas trocas em óxido de propileno de 15 minutos cada.

Infiltração: a infiltração foi realizada com resina Epon 812 (LUFT, 1961) em etapas que representam gradientes crescentes da resina em óxido de propileno, como segue:

- 50 % Epon + 50 % de óxido de propileno - 2 horas - 37°C;
- 75 % Epon + 25 % de óxido de propileno - 2 horas - 37°C;
- Epon puro - durante toda noite - 4°C.

Inclusão: os espécimes foram colocados em moldes de borracha apropriados juntamente com a resina pura. A polimerização foi realizada, em estufas de 37°C, 45°C e 60°C durante 8, 16 e 24 horas, respectivamente.

3.7.2.1. Cortes e coloração

Em seguida foram obtidos os cortes ultrafinos em um ultramicrotomo Porter Blum modelo MT-1, da Sorvall, utilizando-se navalhas de vidro cristal de 6 mm de espessura.

Os cortes ultrafinos com espessura entre 60 e 90 nm foram colocados em grades de cobre de 200 "mesh" previamente cobertas com película de parafina e carvão.

A coloração foi feita com solução aquosa de acetato de uranila 2,5 % durante 6 minutos e com citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) durante 4 minutos e logo após examinados ao microscópio eletrônico.

3.8. Radioautografia

3.8.1. Tratamento e preparação do espécime para a técnica de radioautografia

Para os estudos radioautográficos, preparou-se uma suspensão de 50 ml de *X. campestris* (10^8 células/ml) cultivadas em caldo nutriente, com 24 horas de idade. A suspensão foi centrifugada a 2.000 g durante 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 10 ml de um extrato purificado de bacteriófagos com 10^9 unidades formadoras de placa (PFU) e deixadas 20 minutos para o tempo de adsorção. Adicionou-se à mistura 2 ml de uma solução aquosa de timidina tritiada (atividade específica 20 Ci/mmol), da New England Nuclear, Boston.

Da mistura acima, foram retiradas 6 amostras de 2 ml que foram fixadas com glutaraldeído (6,5 % em tampão cac-

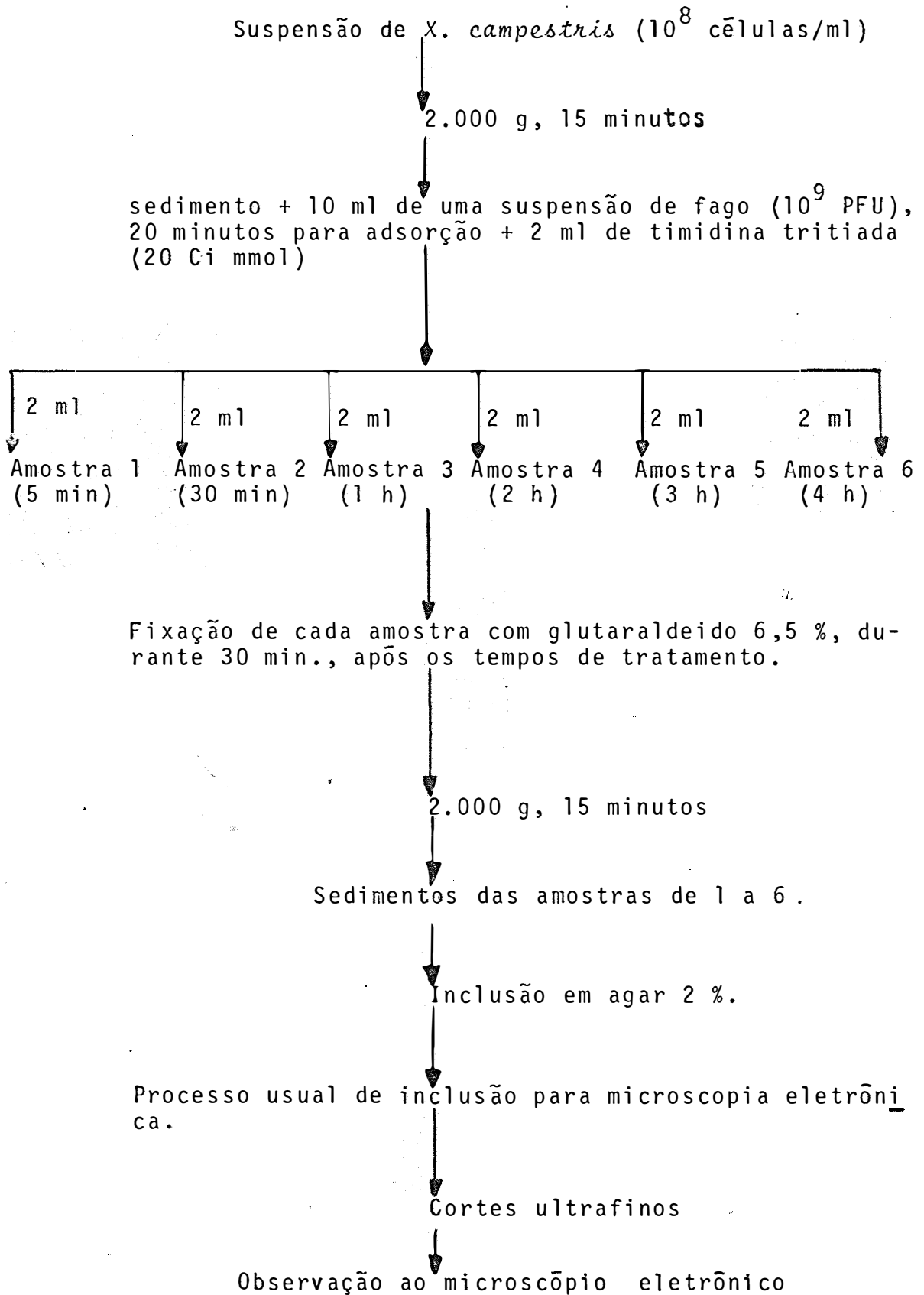
dilato 0,125 M pH 7,2) durante meia hora, após os seguintes intervalos de tempo: 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas. Após a fixação cada amostra foi centrifugada a 2.000 g por 15 minutos. Em seguida, procedeu-se a lavagem com tampão cacodilato 0,125 M, pH 7,2 para remover a timidina radioativa não incorporada.

O sedimento de cada amostra foi incluído em agar 2 %. Após a solidificação do agar, o material foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 mm. Estes segmentos foram novamente fixados em glutaraldeído (6,5 % em tampão cacodilato 0,125 M pH 7,2) durante 1 hora. A partir dessa etapa, seguiu-se o processo usual de incubação (pós-fixação, pré-coloração, desidratação, in filtração e inclusão) descritos em 3.7.2.

Bactérias não infectadas com fago e tratadas com timidina tritiada, submetidas ao mesmo tratamento, serviram de controle.

O tratamento descrito em 3.8:1 encontra-se esquematizado na página 37.

Esquema do tratamento:



3.8.2. Radioautografia a nível de microscopia óptica

A radioautografia para microscopia óptica foi utilizada para se estimar o período de exposição para a radioautografia a nível de microscopia eletrônica. O tempo de exposição em dias, necessário para se obter um número de grãos de prata adequado foi multiplicado por um fator 10, para a obtenção do período de exposição para microscopia eletrônica.

O material incluído para microscopia eletrônica descrito em 3.8.1 foi também utilizado para a radioautografia ao microscópio óptico.

As secções semifinas de 0,5 μm de espessura foram cortadas em ultramicrotomo e transferidas para lâminas de vidro previamente limpas com detergente e solução de eter-álcool na proporção 1:1. A posição dos cortes foi marcada com um círculo no verso da lâmina e secadas em chapa quente, para evitar o enrugamento dos cortes (BIENZ, 1977).

3.8.2.1. Cobertura com emulsão fotográfica

A cobertura dos cortes ultrafinos com emulsão fotográfica foi realizada pelo método do "Streaking" (BIENZ, 1977). A emulsão Ilford L4 (Ciba-Geigy Company, England) foi diluída em água bidestilada (1:1) em banho-maria a 45°C.

Após a diluição, foi mantida a 32°C. Em seguida, colocou-se 2 a 3 gotas da emulsão sobre a lâmina ao lado dos cortes. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estas gotas foram espalhadas, formando uma película homogênea sobre os cortes. As lâminas foram então colocadas verticalmente em caixas pretas vedadas e mantidas a 4°C em atmosfera seca para exposição, durante 3, 6 e 9 dias.

Toda vidraria usada na manipulação da emulsão fotográfica foi previamente fervida em solução de água oxigenada 15 % durante 20 minutos, lavadas com água bidestilada e secadas em estufa, para prevenir o "background" da emulsão fotográfica.

3.8.2.2. Revelação, fixação e coloração das radioautografias para microscopia optica

Decorrido o tempo de exposição, as lâminas foram reveladas com o revelador Dektol da Kodak durante 4 minutos e fixadas com fixador F-5 também da Kodak durante 5 minutos, ambos a 22°C.

A coloração dos cortes semifinos foi realizada com azul de toluidina 1 %. Algumas gotas do corante foram colocadas sobre a lâmina contendo os cortes e depois de aquecida por 1 minuto o excesso do corante foi retirado com água destilada corrente e secadas a 37°C.

Para o exame das lâminas contendo os cortes semifinos foi utilizado um Fotomicroscópio II da Zeiss, equipado com câmara fotográfica. Os negativos fotográficos foram obtidos utilizando-se um filme rígido Panatomic X da Kodak, ASA 32.

3.8.3. Radioautografia a nível de microscopia eletrônica

O material utilizado foi preparado conforme descrito em 3.8.1.

As secções ultrafinas, com espessura entre 60 e 90 nm foram cortadas em ultramicrótomo e colocadas em grades de cobre de 200 "mesh," previamente cobertas com película de parafina e carvão.

3.8.3.1. Cobertura com emulsão fotográfica

Para a cobertura dos cortes ultrafinos com emulsão fotográfica (Ilford L4) foi utilizado o método da alça de CARO e Van TUBERGEN (1962) modificado por STEVENS (1966).

As grades contendo os cortes ultrafinos foram fixadas no topo de bastonetes de vidro com uma cola de borracha apropriada. Todo material usado na manipulação da emulsão fotográfica foi previamente limpo, com uma solução ferven

te de água oxigenada 15 % e lavado em água bidestilada com o auxílio de alças de aço de 12 mm de diâmetro, procedeu-se a cobertura das grades da seguinte maneira: a alça de aço foi mergulhada na emulsão, previamente diluída em água bidestilada (1:1) a 45°C e mantida em banho a 32°C. Retirou-se o excesso da emulsão com papel absorvente, colocando-se a alça em posição vertical num suporte de madeira para a gelatina se solidificar. Formou-se então, a aproximadamente 6 mm da extremidade uma monocamada perfeita de halogeneto de prata (a cor de interferência dourada indica a melhor área). Esta área foi usada para a cobertura, pela aplicação da alça sobre as grades fixadas no topo dos bastonetes.

Para a exposição, as grades cobertas foram acondicionadas em caixas apropriadas vedadas à luz e mantidas a 4°C, em atmosfera seca, durante aproximadamente 3 meses.

3.8.3.2. Revelação, fixação e coloração das radioautografias para microscopia eletrônica

Revelação: as grades foram colocadas em contato com o revelador Microdol X da Kodak durante 5 minutos, a 22°C. Seguiu-se uma lavagem com água destilada por alguns segundos.

Fixação: as grades foram colocadas no fixador tiosulfato de sódio 3 % durante 2 minutos e 45 segundos, a 22^oC. O tempo para a fixação é crítico para a preservação da ultraestrutura.

Para remoção da gelatina, procedeu-se da seguinte forma:

- 3 lavagens de 10 minutos com água bidestilada;
- 1 lavagem com água bidestilada durante 30 minutos a temperatura controlada de 37^oC;
- 1 lavagem com ácido acético 4 % a 37^oC, durante 15 minutos;
- 3 lavagens de 5 minutos cada com água bidestilada a temperatura ambiente.

Coloração: as grades contendo os cortes ultrafinos foram coloridas com acetato de uranila 2,5 % durante 6 minutos, lavadas com água bidestilada e em seguida com citrato de chumbo, durante 4 minutos e novamente lavadas com água bidestilada.

As secções ultrafinas foram examinadas ao microscópio eletrônico, para a obtenção de eletrofotomicrografias.

Os negativos das eletrofotomicrografias foram obtidos utilizando-se no microscópio chapas fotográficas de vidro tipo Projector Slide Plates da Kodak de 6,5 x 9,0 cm. A revelação e ampliação dos negativos foram feitas pelos processos fotográficos comumente usados em laboratório.

3.9. Determinação da densidade dos grãos de prata

Foram utilizadas eletrofotomicrografias das bactérias infectadas e não infectadas com fago e tratadas com timidina tritiada, nos vários intervalos de tempo, como descrito em 3.8.1.

A contagem do número de grãos de prata reduzida nos radioautogramas foi realizada através de círculos (WILLIAMS, 1969), adotando-se os seguintes critérios:

- Para a medida da área ocupada pelas bactérias foram desenhados quadrados em plástico transparente, cujas dimensões de 6 mm, 9 mm e 12 mm foram equivalentes aos diversos aumentos das eletrofotomicrografias.

- Para a contagem do número de grãos de prata foram utilizados círculos desenhados em plástico transparente com 5,0 mm, 7,5 mm e 10,0 mm de diâmetro equivalente a resolução do sistema radioautográfico (BACHMANN e SALPETER, 1965 e LAGE, 1980).

- Escolheu-se o ponto médio do eixo maior do filamento de prata como sendo o centro do círculo de "resolução limite".

- Considerou-se duas possibilidades: (a) os círculos de resolução que circunscreviam os grãos de prata que podiam tocar ou estar sobre a bactéria, foram considerados produzidos por radiações originadas do interior da bactéria; (b) os grãos de prata cujos círculos de resolução não tocavam a bactéria foram considerados produzidos por radiações fora da bactéria.

3.10. Efeito do virazole (1-beta-D-ribofuranosyl 1,2,4-triazole-3-carboxamide) sobre o processo de replicação do fago

3.10.1. Através de secções ultrafinas

Preparou-se uma suspensão de *X. campestris* e de bacteriófagos como foi descrito em 3.8.1.

Após o tempo de adsorção (20 minutos), adicionou-se a mistura bactéria-fago, 1 ml de virazole na concentração de 0,5 mg/ml (ICN Chemical & Radioisotope Division, California). Dessa mistura foram retiradas amostras nos seguintes intervalos de tempo: 5 minutos, 1 hora e 3 horas. No final

de cada intervalo de tempo as amostras foram centrifugadas a 2.000 g durante 15 minutos para retirar o excesso de virazole e fixadas com glutaraldeido (6,5 % em tampão cacodilato 0,125M, pH 7,2) por meia hora. Após a fixação cada amostra foi centrifugada a 2.000 g por 15 minutos e os sedimentos incluídos em agar 2 %. Após solidificação do agar, o material foi cortado em pedaços de aproximadamente 2 mm. Estes segmentos foram novamente fixados em glutaraldeido (6,5 % em tampão cacodilato 0,125 M, pH 7,2) durante 1 hora. A partir dessa etapa, seguiu-se o processo usual de inclusão para microscopia eletrônica, descrito em 3.7.2.

Bactérias infectadas com fago, mas, sem o tratamento com virazole foram submetidas ao mesmo procedimento para servir de controle.

3.10.2. Coloração negativa (PTA)

Para o estudo do efeito do virazole através da coloração negativa, utilizou-se alíquotas da mistura bactéria-fago tratadas com virazole em 3.10.1. Após os referidos intervalos de tempo as misturas foram fixadas com glutaraldeido 10% durante 10 minutos. Em seguida o material foi colocado em grades de cobre e coloridos através da técnica da coloração negativa conforme descrito em 3.6.1.

O controle, submetido ao mesmo procedimento mas sem o tratamento com virazole foi levado a efeito.

3.11. Serologia

3.11.1. Preparação do anti-soro

Para a obtenção do antígeno, preparou-se uma suspensão do fago (10^8 partículas viáveis/ml).

O anti-soro específico foi obtido utilizando-se um coelho macho da raça Nova Zelândia pesando cerca de 3 kg.

O antígeno emulsionado (1:1) em adjuvante incompleto de Freund (Difco) foi injetado no linfonóculo segundo técnica empregada por OLIVEIRA (1975). Foram feitas 3 injeções, sendo de 16 dias o intervalo entre a primeira e a segunda injeção e de 22 dias o intervalo entre a segunda e a terceira injeção. Antes da primeira injeção de imunização o animal foi submetido a uma sangria para a obtenção do soro normal.

Decorrido o tempo de imunização, o animal foi submetido novamente a sangria. O sangue coletado foi mantido durante 2 horas, em temperatura ambiente, para coagulação. O soro liberado foi centrifugado a 3.000 g por 10 minutos para separação das hemácias. O soro foi estocado em congelador após a adição de mertiolato (1:10000) para evitar contaminação.

3.11.2. Teste de dupla difusão em agar

O teste de dupla difusão em agar segundo Ouchterlony citado por FIGUEIREDO et alii (1977) foi realizado da seguinte forma: 5 ml de meio agar fundido 1 % foram colocados sobre lâminas de vidro. Após a solidificação, foram feitos os orifícios na camada de agar com o auxílio de um "furagar" (gel punch da Gelman) contendo um orifício circular central, circundado por mais seis furos em posição hexagonal. Na perfuração central colocou-se o antígeno e nas demais os anti-soros com o auxílio de pipetas de Pasteur. As lâminas foram colocadas num equipamento da Gelman, com função de câmara úmida, onde se processou a difusão do antígeno e do anti-soro até o aparecimento das linhas de precipitação. As lâminas que apresentaram linhas de precipitação foram lavadas com NaCl 0,85 % por 24 horas e secadas a 37°C ou a temperatura ambiente.

A coloração foi feita com Comassie Blue durante 15-20 minutos e as lâminas foram lavadas com solução removedora por 3 vezes, secadas a 28°C e fotografadas.

O corante e a solução removedora utilizados apresentaram as seguintes formulações:

Corante:

Comassie Blue C-250	1,25 g
Metanol	227 ml
Ácido Acético Glacial	46 ml
Água destilada completando	500 ml
Filtrado em papel de filtro	

Solução removedora:

Metanol	50 ml
Ácido Acético Glacial	75 ml
Água destilada completando	1.000 ml

3.11.3. Teste de precipitação em tubos

Os testes de precipitação foram realizados em tubos serológicos de 7 x 70 mm. Consistiu da mistura, em volumes iguais, do antígeno com os anti-soros em diversas diluições. Os tubos contendo esta mistura foram incubados a 37°C, por 2 horas e mantidos a 4°C durante 12 horas. Em seguida, observou-se a ocorrência de precipitação através de uma leve agitação dos tubos. Os precipitados foram observados ao microscópio eletrônico, através da coloração negativa como descrito em 3.6.1.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento da bactéria

A bactéria isolada de plantas de repolho intensamente infectadas, mostrou as seguintes características:

Tipo de crescimento em caldo nutriente: turvação com formação de anel e película;

Tipo de colônia em agar nutriente: cor amarela brilhante, forma circular com bordos inteiros.

Forma: bastonete, com flagelo polar.

Dimensões médias: 0,2-0,8 por 0,6-2,0 μm .

Temperatura ótima para desenvolvimento: 28⁰C.

Coloração de Gram: Gram negativa.

4.2. Teste de patogenicidade

Em ambos os testes de patogenicidade descritos em 3.3., as plantas apresentaram sintomas típicos da doença.

O patógeno foi novamente reisolado e submetido as mesmas observações, mostrando tratar-se do mesmo isolado.

Pela chave de classificação do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (BUCKMAN e GIBBONS, 1975) o isolado pode ser classificado dentro do gênero *Xanthomonas* e na descrição das espécies desse gênero, foi incluída em *X. campestris* (Pammel) Dowson, 1935.

4.3. Isolamento e purificação do fago

O extrato isolado de tecido vegetal doente purificado através de filtros bacteriológicos produziu placas de lise de forma circular, com bordos nítidos e com seu interior livre de crescimento bacteriano. As placas de lise apresentaram um diâmetro de 1 mm, Fig. 2.

O teste para avaliar a longevidade das partículas virais de suspensões estocadas a 4°C, revelaram grande quantidade de placas de lise após um período de 10 e 12 meses.

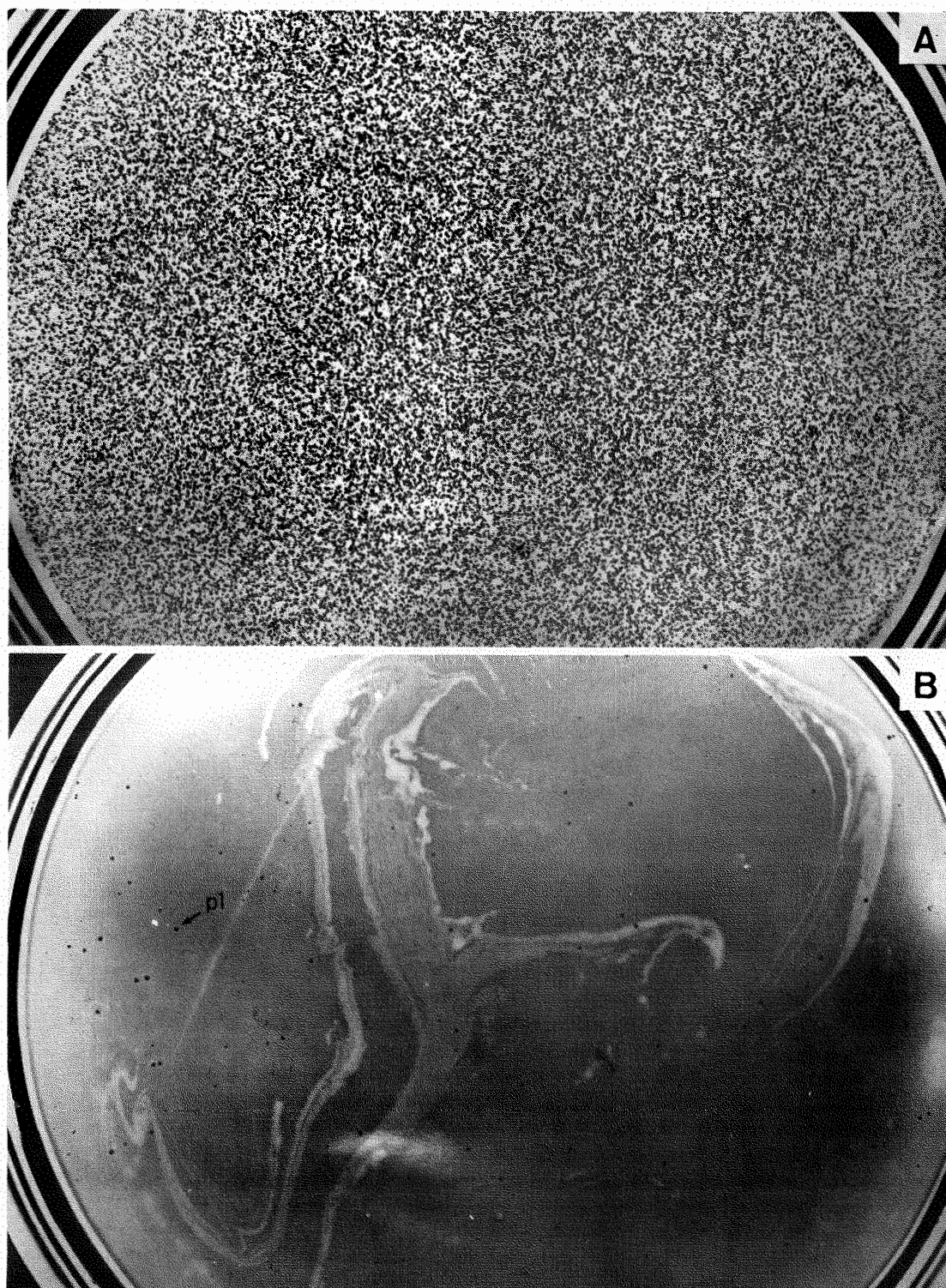


Fig. 2 - Morfologia das placas de lise produzidas pelo fago de *X. campestris*. Placas de lise na diluição 10^3 (A) e 10^{10} (B) da preparação do extrato original.
pl = placa de lise

4.4. Estoque de fago com alto título

Utilizando-se o método tradicional para a obtenção de fago com alto título (descrito em 3.5) conseguiu-se somente suspensões de bacteriófagos contendo 10^7 partículas viáveis/ml. Através da utilização do método de enriquecimento segundo BERSNTEIN e EISENSTARK (1955) conseguiu-se um título de 10^{10} partículas viáveis/ml.

4.5. Morfologia da partícula

As eletrofotomicrografias do fago apresentando cabeça hexagonal, cauda contrátil e placa terminal encontram-se na Fig. 3.

As suas dimensões médias foram: cabeça hexagonal com 82 nm de comprimento por 71 nm de largura, cauda contrátil 112 nm de comprimento por 20 nm de largura, placa terminal com 45 nm de comprimento por 17 nm de altura.

4.6. Detecção das fases do processo infectivo

As fases do processo infectivo do fago de *X. campestris* encontram-se ilustradas na Fig. 4.I através da coloração negativa e Fig. 4.II através das secções ultrafinas.

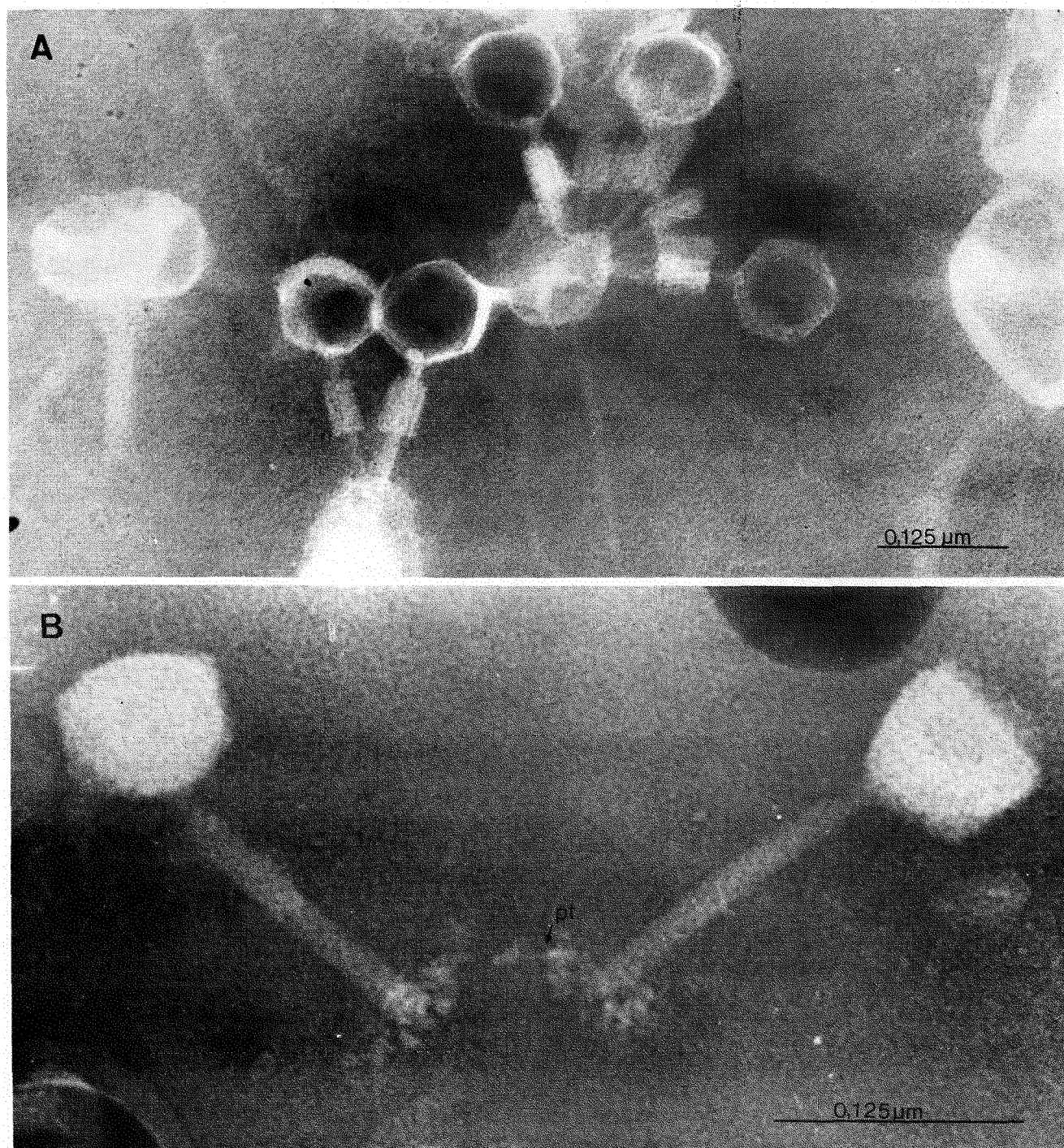


Fig. 3 - Morfologia do fago de *X. campestris*. A) Partículas com bainhas contraídas e agregadas a pequenos fragmentos de bactéria. B) Partículas com bainhas distendidas mostrando a placa terminal. Coloração negativa com PTA 2 %, pH 7,0. pt = placa terminal

As eletrofotomicrografias mostraram a bactéria não infectada (Fig. 4.I,A) e fagos ainda não adsorvidos à bactéria (Fig. 4.II,A). De 20-30 minutos após infecção pode-se observar o processo de adsorção do fago à superfície bacteriana (Fig. 4.I,B,B' e 4.II,B). Após 35-45 minutos de infecção, observou-se o período latente (Fig. 4.I,C e D e Fig. 4.II,C,D). Após 2 horas de infecção pode-se notar a lise e degradação da bactéria (Fig. 4.I,E e 4.II,E). De 3-4 horas, foi possível observar o processo de liberação das partículas do bacteriófago (Fig. 4.I,F e 4.II,F).

4.7. Cinética de incorporação de timidina tritiada em *X. campestris* infectada com fago

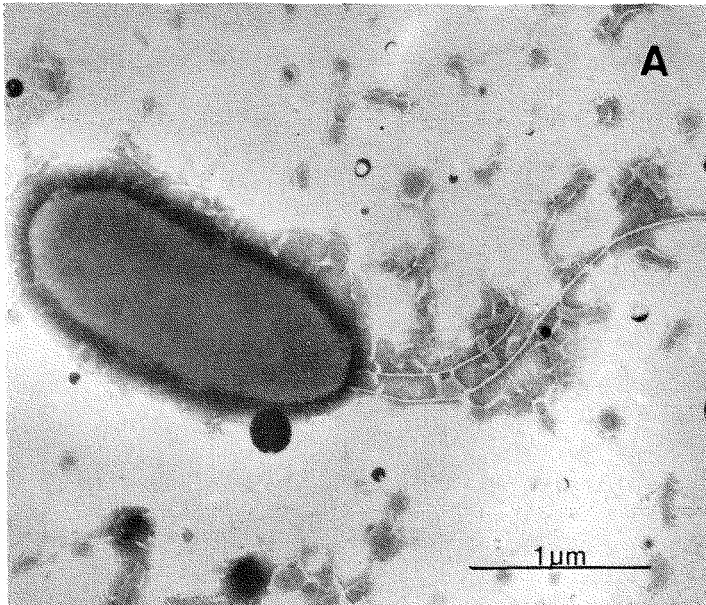
Os resultados obtidos referentes à contagem de grãos de prata por μm^2 encontram-se representados graficamente na Fig. 5 e os radioautogramas representados na Fig. 6.

Os grãos de prata por μm^2 encontrados nas eletrofotomicrografias de amostras coletadas nos intervalos de 5 minutos, 1, 2 e 3 horas após a introdução de timidina marcada, revelaram uma maior incorporação aos 5 minutos com posterior decréscimo nos intervalos de tempo subsequentes.

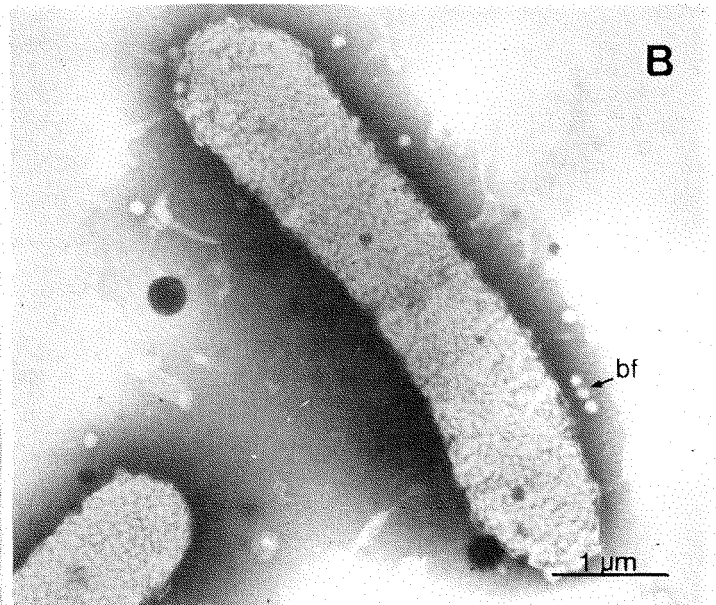
As amostras de bactéria não infectadas que serviram como controle mostraram que ocorreu um máximo de incorporação após 2 horas de tratamento com timidina marcada.

Fig. 4 - FASES DO PROCESSO INFECTIVO DO FAGO de *X. campestris*.

I-Estudo das fases do processo infectivo através da técnica de coloração negativa com ácido fosfotungstico (PTA) 2 %, pH 7,0.

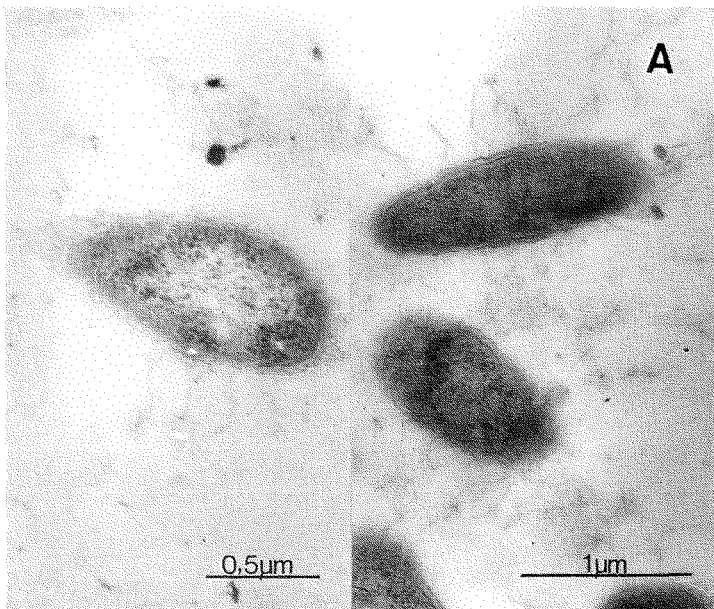


Xanthomonas campestris não infectada.

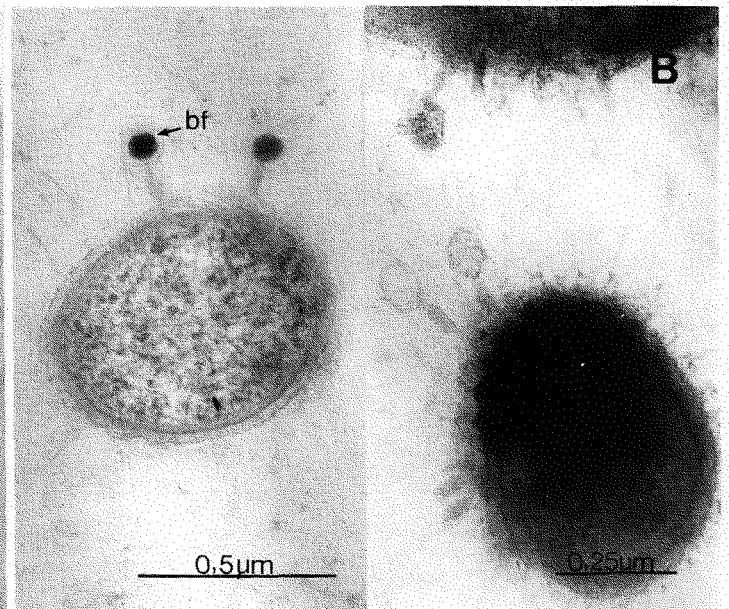


Adsorção do fago à bactéria (20-30 minutos). bf = fago

II-Estudo das fases do processo infectivo através de inclusões e secções ultrafinas.



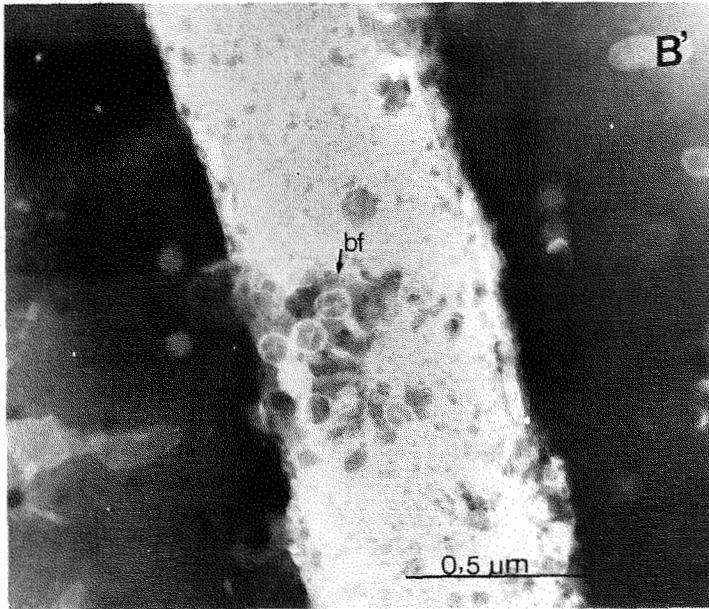
Bactéria não infectada pelo fago (5 minutos).



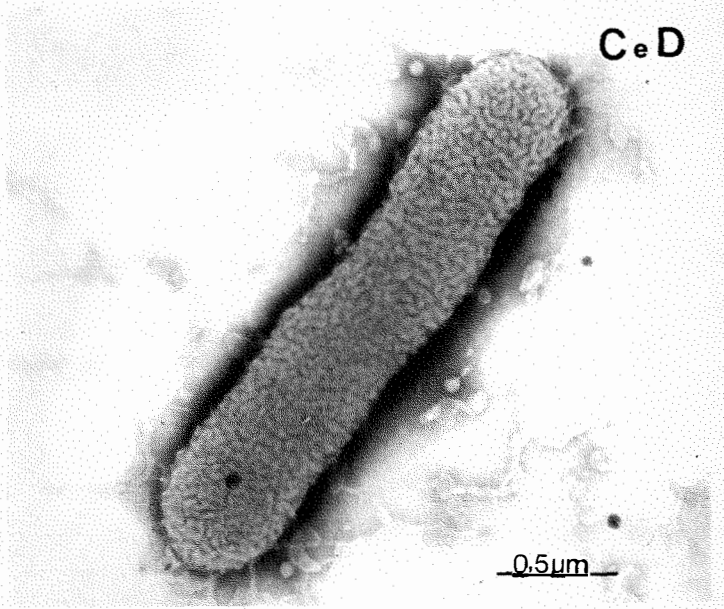
Adsorção do fago à bactéria (20-30 minutos).

Continua

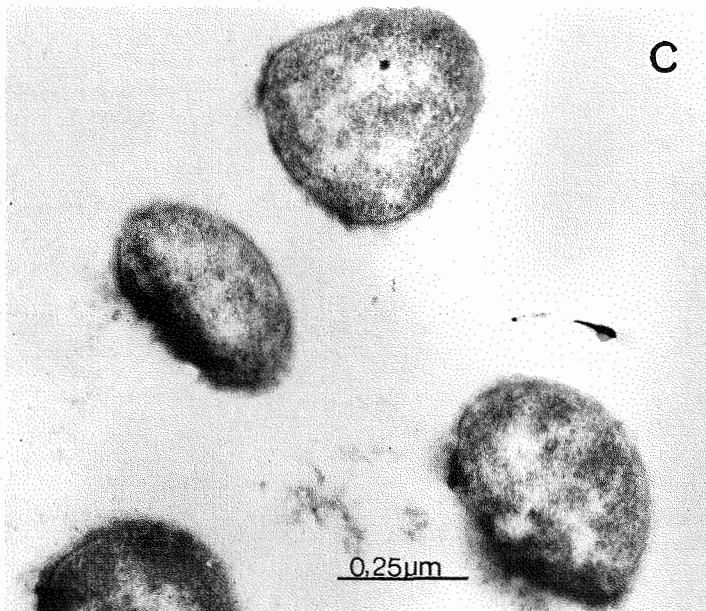
Continuação



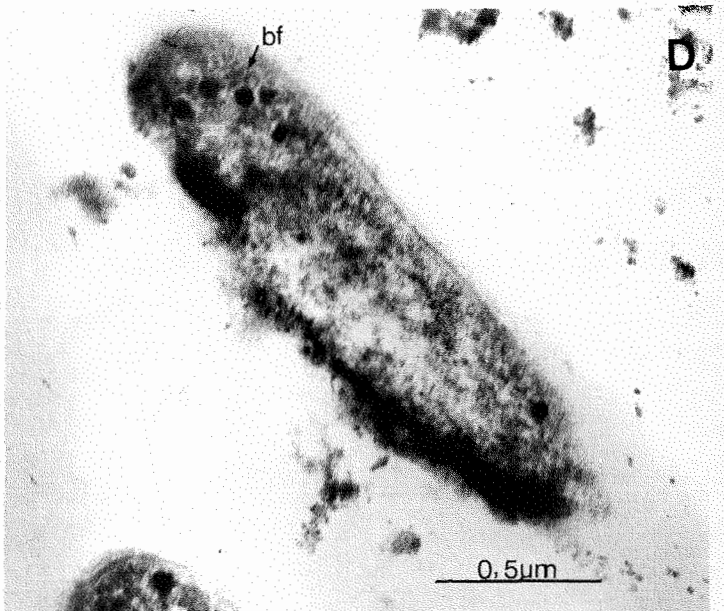
Detalhe do processo de adsorção



Período latente (35-45 minutos).



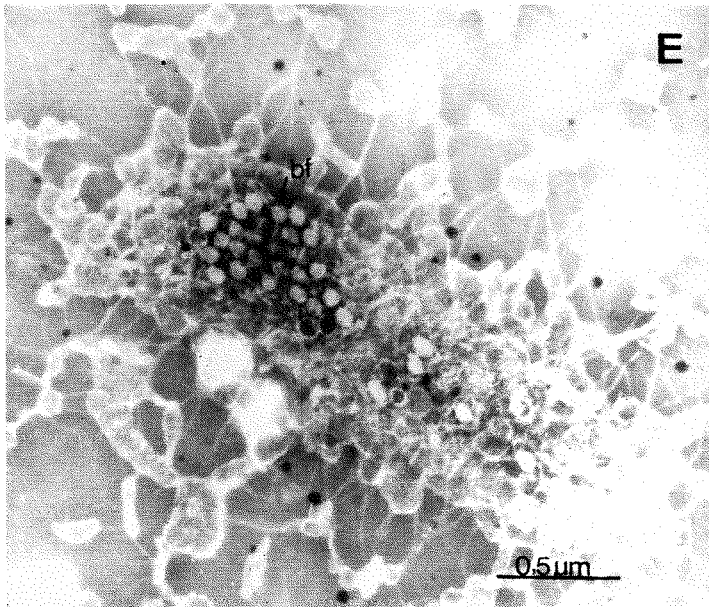
Período latente (35-45 minutos).



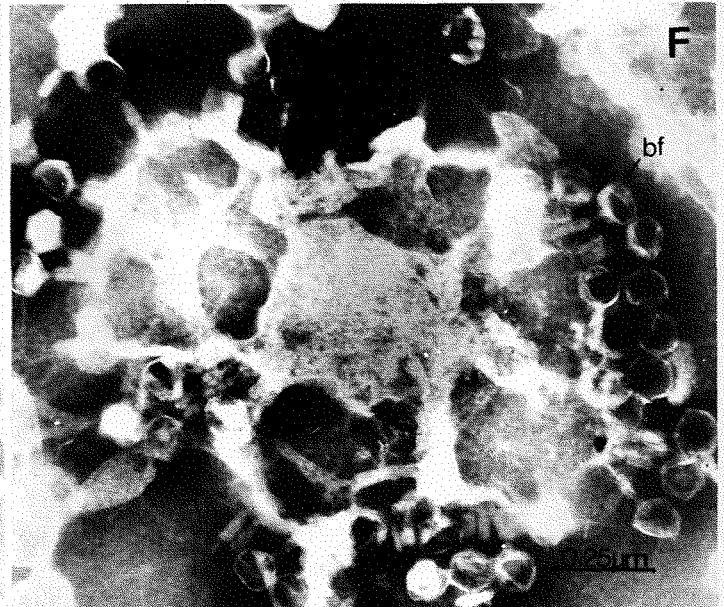
Síntese de novas partículas no interior da bactéria (1 hora).

Continua

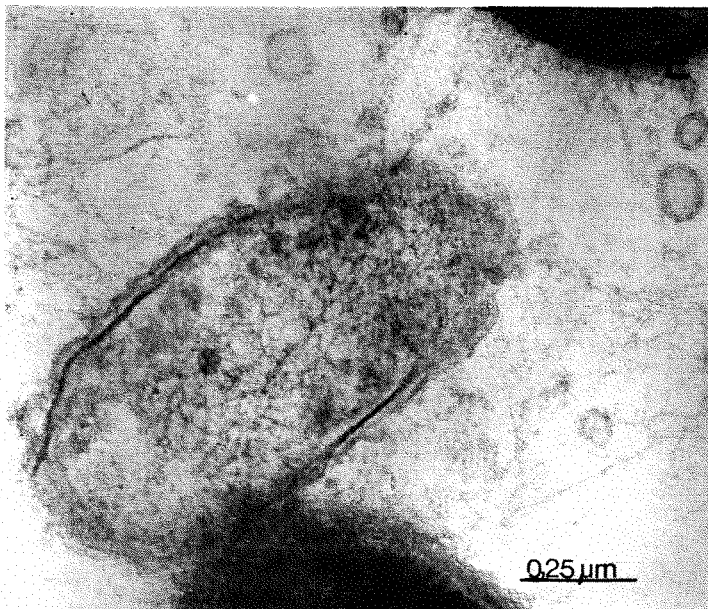
Continuação



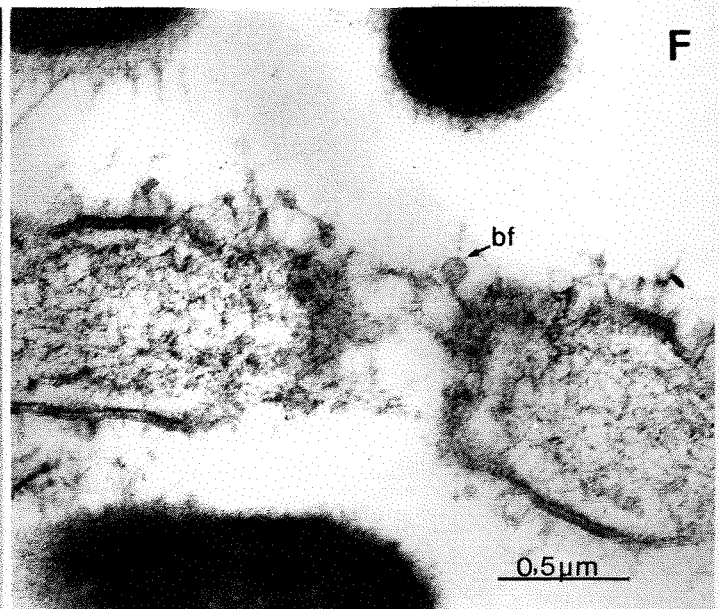
Lise e degradação da bactéria (2 horas).



Liberação de fagos (3-4 horas).



Lise e degradação da bactéria (2 horas).



Liberação dos fagos (3-4 horas).

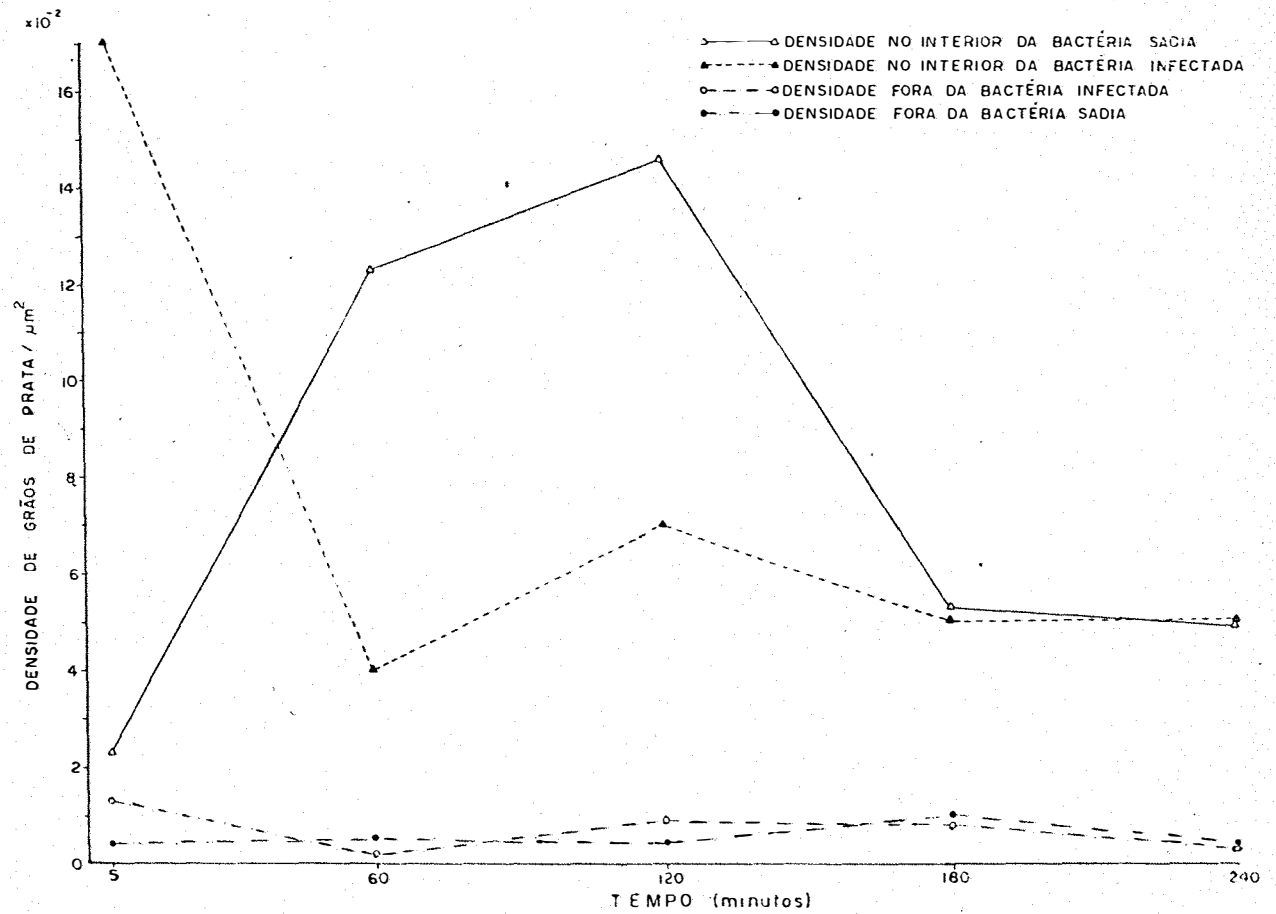


Fig. 5 - Curvas das densidades de grãos de prata no interior das bactérias sádias e infectadas com fago.

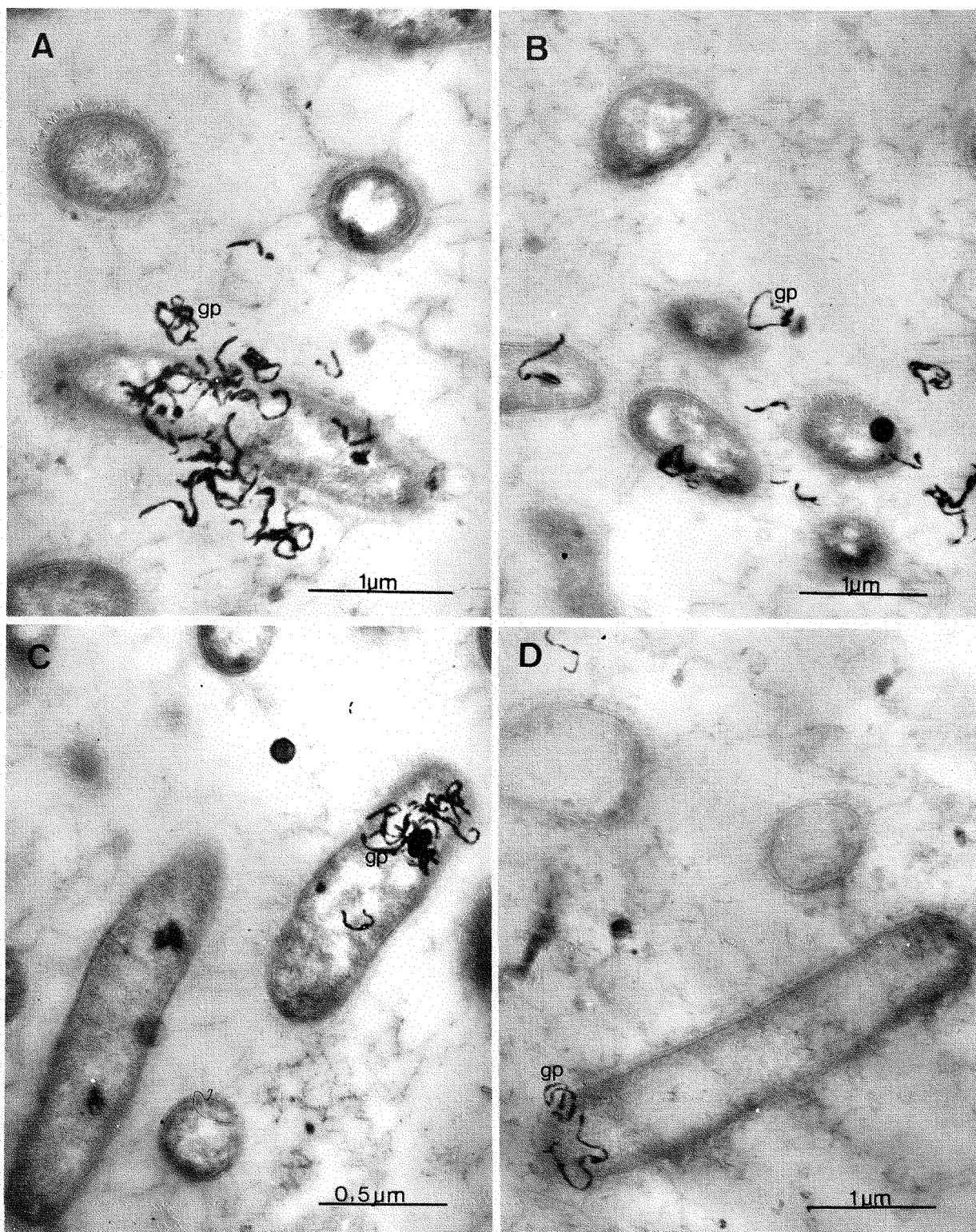


Fig.6 - Eletrofotomicrografias das secções ultrafinas de *X. campestris* infectada com fago e tratada com timidina tritiada durante: A) 5 minutos; B) 1 hora; C) 2 horas; D) 3 horas.

gp = grãos de prata.

4.8. Efeito do virazole no processo de infecção do fago em *X. campestris*

4.8.1. Através das secções ultrafinas

O exame das secções ultrafinas ao microscópio eletrônico (Fig. 8.1.A,B,C) permitiu observar o efeito controlador do virazole sobre as bactérias infectadas com fago durante 5 minutos, 1 hora e 3 horas.

Nas secções ultrafinas das preparações infectadas com fago e sem o tratamento com virazole (Fig. 8.II,A,B,C) que serviram de controle, pode-se notar a presença de partículas no interior da célula com posterior lise da bactéria.

4.8.2. Através da coloração negativa

Através da observação das amostras do sistema fago-bactéria pela técnica da coloração negativa (PTA), constatou-se pelo exame das eletrofotomicrografias que as bactérias infectadas pelo fago e tratadas com virazole na concentração de 0,5 mg/l (Fig. 7, B) permaneceram íntegras durante o tratamento com o viricida. Nas amostras sem o tratamento com o viricida (Fig. 7, A) as bactérias foram lisadas pela ação do fago.

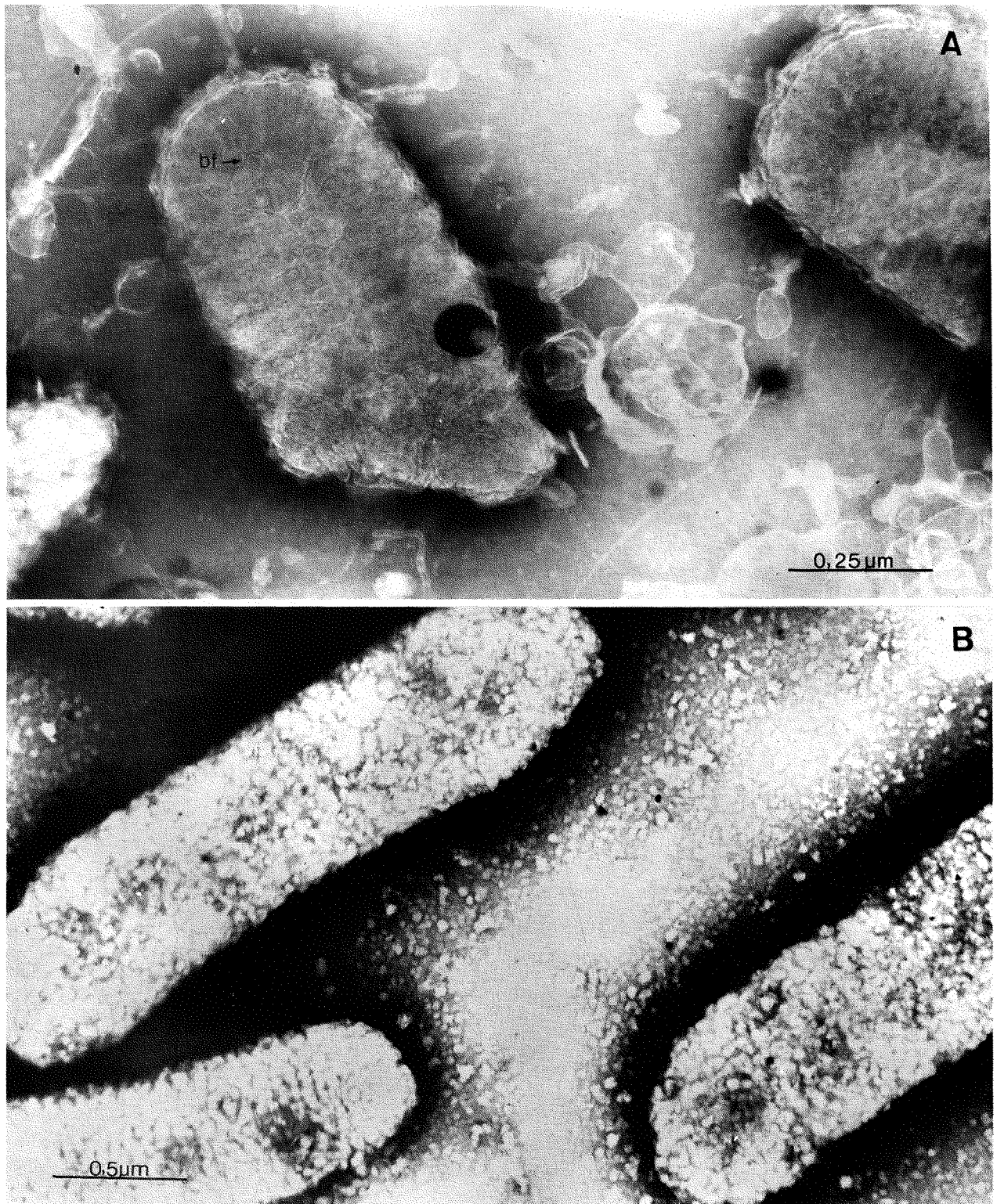
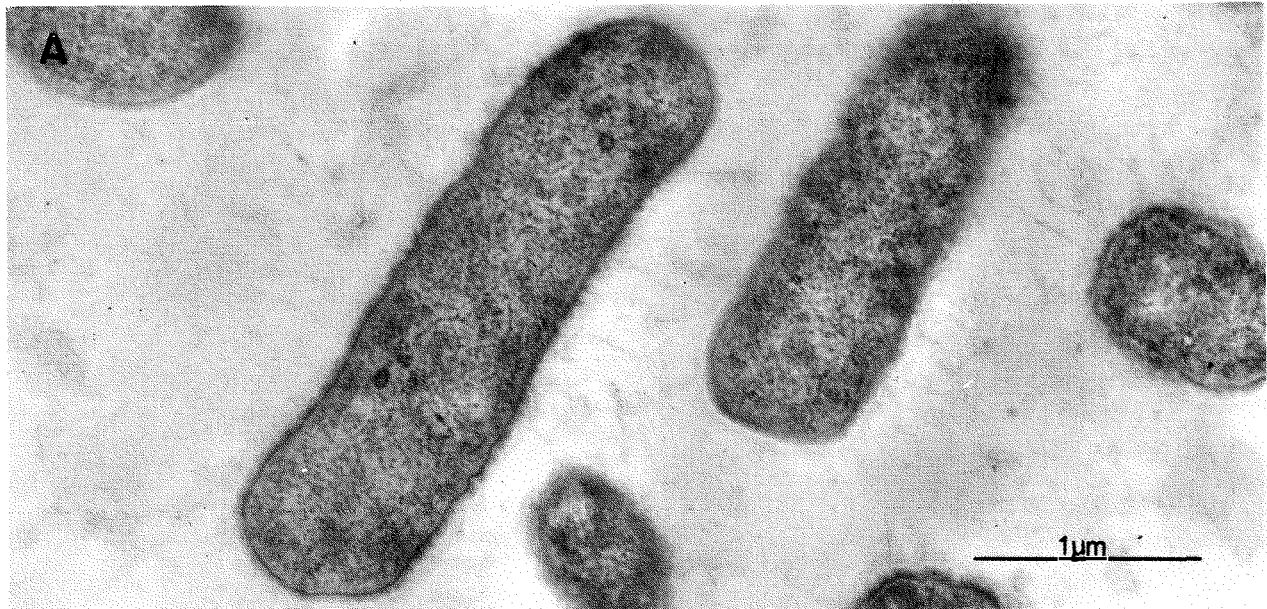


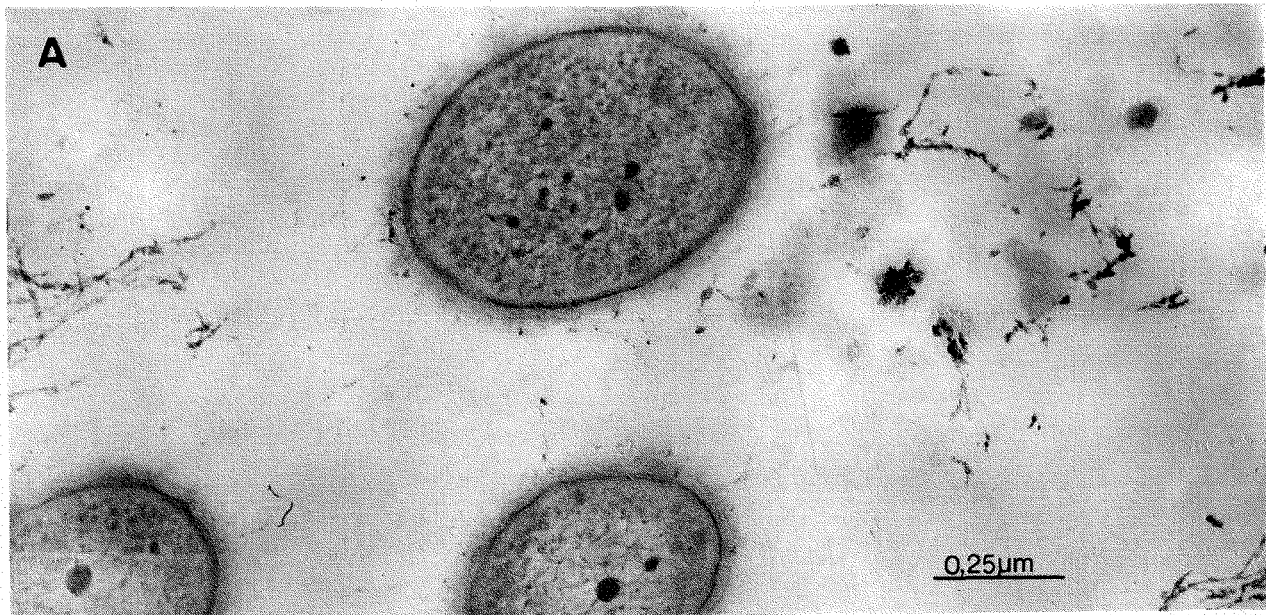
Fig.7 - Coloração negativa com PTA 2 %, pH 7,0 de *X. campestris* mostrando o efeito do virazole (0,5 mg/ml) 60 minutos após a interação fago-bactéria. A) Bactérias não tratadas com virazole. B) Bactérias tratadas com virazole.

I-Eletrofotomicrografias de secções ultrafinas de preparações de *X. campestris* infectadas com fago e tratadas com virazole.



5 minutos apōs a infecção e tratamento com virazole.

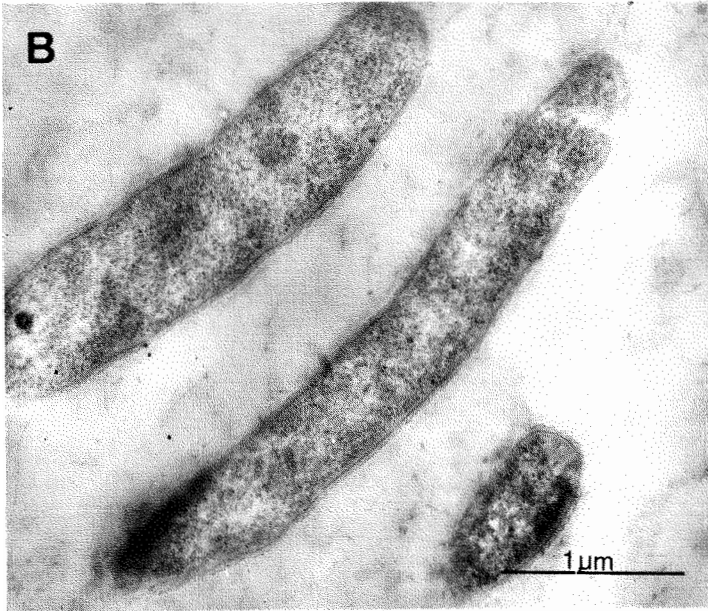
II-Eletrofotomicrografias de secções ultrafinas de preparações de *X. campestris* infectadas com fago e sem tratamento com virazole (controle).



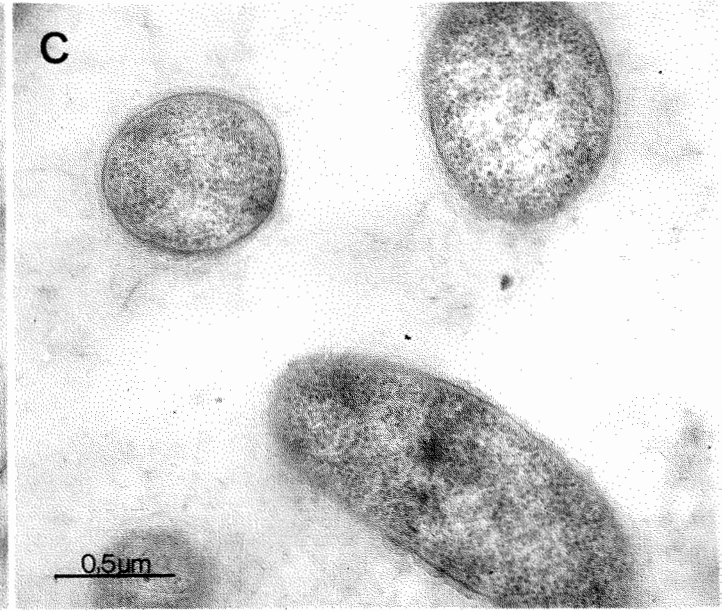
45 minutos apōs a infecção com fago.

Continua

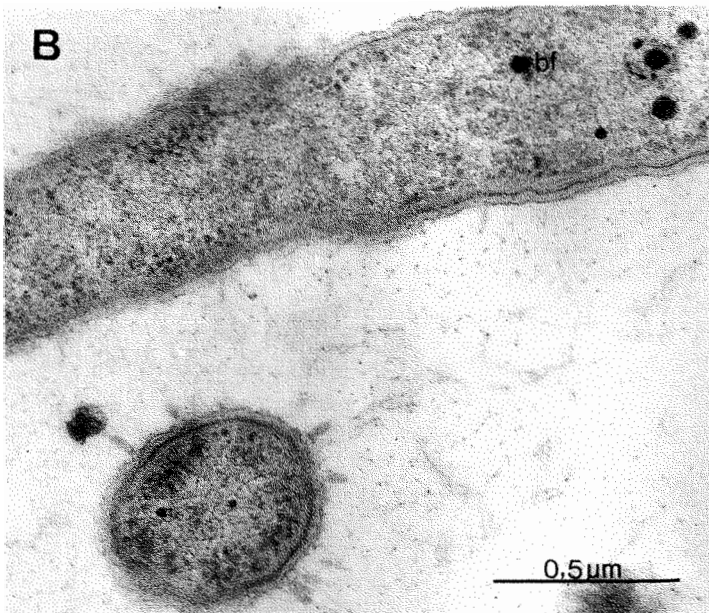
Continuação



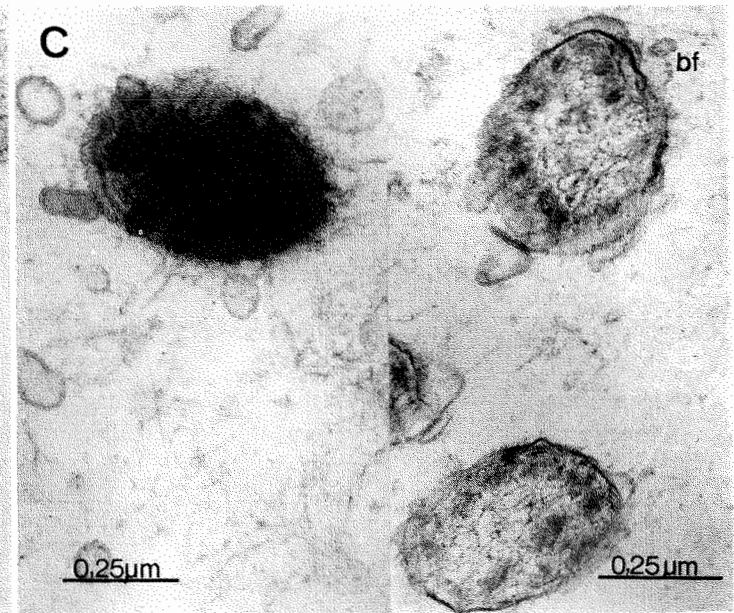
1 hora apōs a infecção e tratamento com virazole.



3 horas apōs a infecção e trata-
mento com virazole.



1 hora apōs a infecção com fago.



2 horas apōs a infecção com fago.

4.9. Serologia

Os resultados obtidos com os testes de dupla difusão em agar mostraram a formação de linhas de precipitação, revelando a reação do complexo antígeno-anticorpo.

Os testes de precipitação em tubos mostraram também uma reação positiva entre antígeno-anticorpo. O exame ao microscópio eletrônico dos precipitados mostrou que as partículas se encontravam agregadas (Fig. 9, B); podendo-se observar melhor a combinação entre a cabeça do bacteriófago e seu anticorpo homólogo em contraposição ao que se notou na reação entre o bacteriófago e o anti-soro heterólogo (Fig. 9, A).

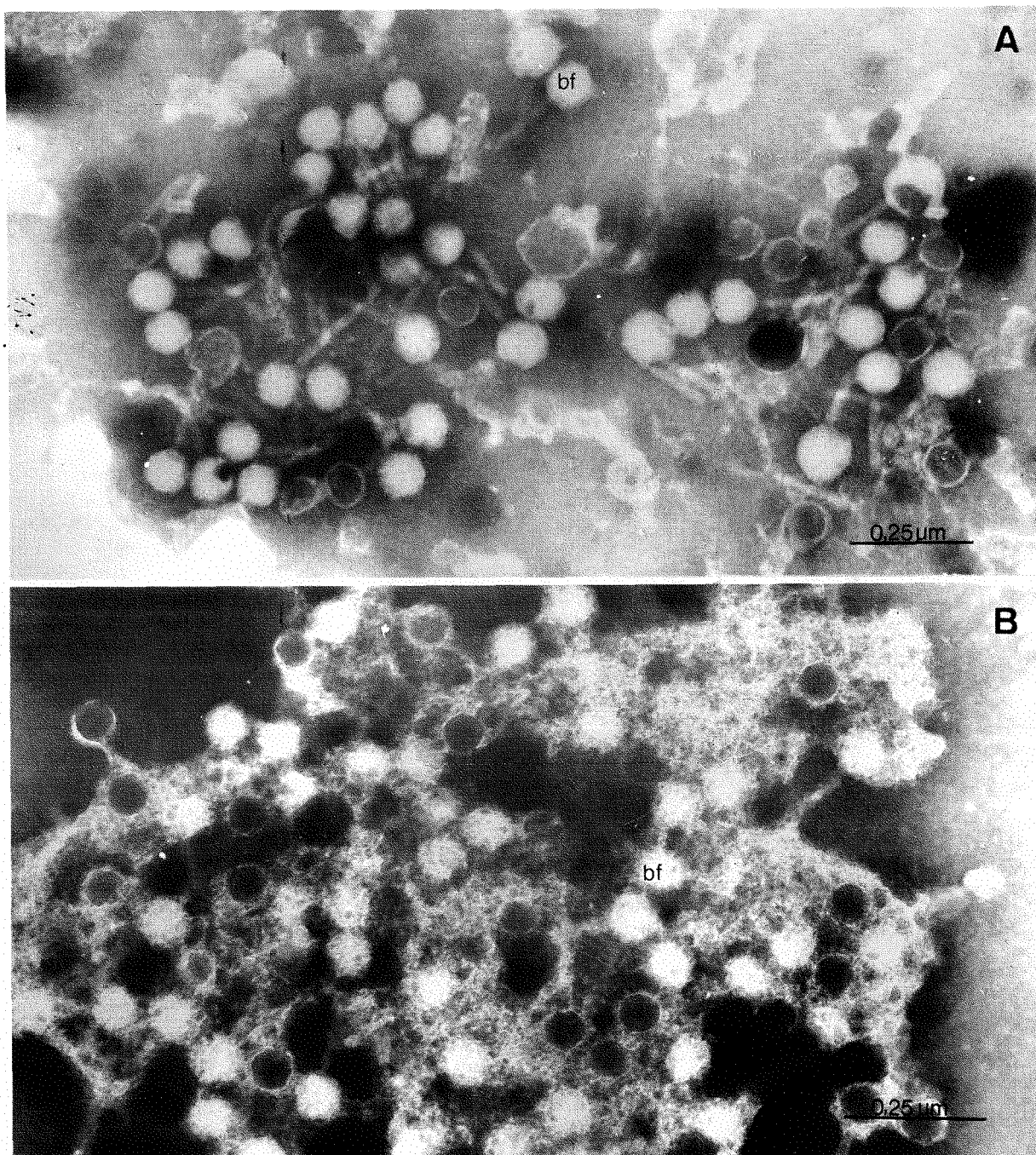


Fig. 9 - Eletrofotomicrografias das preparações serológicas dos testes de precipitação. A) Extrato de fago com soro heterólogo. B) Reação positiva entre fago e soro homólogo, mostrando o resultado da reação específica que permite a identificação de vírus. bf = fago

5. DISCUSSÃO

Os isolamentos de bacteriófagos a partir de tecido vegetal doente foram bem sucedidos em contraposição com os isolamentos de solo pelo mesmo método de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955).

Segundo BERGAMIN FILHO (1975) o insucesso do isolamento do fago a partir de solo pode ser compreendido considerando-se que o repolho é uma planta de ciclo muito curto. Assim, a possibilidade de queda das folhas atacadas, com conseqüente incorporação da bactéria e de seu fago ao solo é bastante remota.

O método de purificação através do clorofórmio não foi utilizado neste trabalho, pois não foi necessário manipular muitas amostras ao mesmo tempo. Acrescente-se a isto também a ressalva da possível ação inativadora do clorofórmio contra alguns bacteriófagos (ADAMS, 1959). Preferiu-se para os ensaios, o emprego do filtro bacteriológico que elimina as esporádicas contaminações que ocorrem quando o clorofórmio é utilizado.

Um aspecto bastante importante que deve ser considerado na metodologia de isolamento é o processo de enriquecimento (CROSSE e HINGORANI, 1958; SUTTON e WALLEN, 1967). O enriquecimento se revela fundamental devido ao fato dos bacteriófagos ocorrerem, naturalmente, em número muito pequeno. Assim, com o enriquecimento aumenta-se a possibilidade de contato entre as partículas dos vírus existentes na suspensão e as células da bactéria hospedeira (BERGAMIN FILHO, 1975).

Títulos máximos conseguidos neste trabalho estão de acordo com os resultados de outros autores que também trabalharam com fagos de bactérias fitopatogênicas, entre os quais: SUTTON et alii (1958), que conseguiram $2,5 \times 10^9$ partículas por ml com o método tradicional e cerca de $1,0 \times 10^{10}$ partículas/ml com o método semelhante ao de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955), BILLING (1970) conseguiu resultados entre 10^9 e 10^{11} partículas por ml trabalhando com diversos fagos de várias espécies de *Pseudomonas* e BERGAMIN FILHO (1975) conseguiu $6,0 \times 10^8$ partículas por ml pelo método tradicional e empregando o método de Bernstein e Eisenstark, conseguiu o título máximo de $8,5 \times 10^{10}$ partículas viáveis por ml. No presente trabalho obteve-se um título de 10^{10} partículas/ml, graças à técnica de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955) em substituição a tradicional que em nosso laboratório apresentou um título máximo da ordem de 10^7 partículas viáveis/ml.

A placa de lise resultante da interação fago-bactéria hospedeira apresentou um diâmetro médio de 1 mm.

Os valores encontrados neste trabalho foram semelhantes aos já citados na literatura para outros fagos e outras bactérias. O diâmetro mais comum relatado pelos trabalhos de KLEMENT (1957); ECHANDI e SUN (1973); ERSKINE (1973) e BERGAMIN FILHO (1975) está ao redor de 1-2 mm.

É importante salientar que o diâmetro da placa de lise depende de uma série de fatores (MANDELL e EISENSTARK, 1953) como concentração do agar, temperatura de incubação, concentração da bactéria indicadora. Devido a isso, a importância da placa de lise para caracterização do fago é muito pequena (ACKERMANN et alii, 1978).

As partículas apresentavam-se ao microscópio eletrônico, constituídas de cabeça hexagonal, cauda contrátil e placa terminal. Segundos estas características e com base na evidência de que todos os fagos com semelhante organização estrutural são possuidores de DNA de cadeia dupla (BRADLEY, 1967; TIKHONENKO, 1970 e ACKERMANN et alii, 1978) tentou-se uma classificação preliminar do bacteriófago estudado no Grupo A de Bradley (BRADLEY, 1967) e no sistema LHT de classificação (LOWFF e TOURNIER, 1966 e 1971) como pertencente à Divisão Deo-

xyvira por ter DNA como material genético; Classe Deoxybinala por ter simetria completa; Ordem Urovirales por ter capsídeo nũ e também incluído na Família Phagoviridae, como citado por BERGAMIN FILHO (1978).

Visando a identificação do bacteriófago de *X. campestris*, foi considerada a proposta de ACKERMAN et alii (1978) com respeito a um critério de nomenclatura para os fagos. O critério em questão utiliza as duas primeiras letras do gênero do hospedeiro seguido pela primeira letra do nome da espécie. Acrescentamos ã esse critério o nome do local onde o fago foi isolado. Assim o nome proposto ficou Xac-CENA.

Levando-se em conta principalmente as medidas de bacteriófagos de *X. campestris* descritos por BERGAMIN FILHO (1975) e por MATYIS et alii (1976) e o caracterizado no presente trabalho, pode-se agrupã-los em duas categorias. Uma constituída de fagos com um comprimento total de 130 nm (cabeça 42 nm e cauda 88 nm) e outra de fagos com um comprimento ao redor de 200 nm (cabeça 80 e cauda 120 nm).

O ciclo de infecção do fago de *X. campestris* foi estudado através das técnicas de coloração negativa e seções ultrafinas ao microscópio eletrônico. A duração das fases

de adsorção, período latente, lise e liberação dos fagos encontram-se ilustrados na Fig. 4.I e II. Comparando-se estes resultados com uma apreciação de BERGAMIN FILHO (1975) acerca da duração das fases do ciclo lítico de alguns fagos de diversas bactérias fitopatogênicas, pode-se dizer que os valores obtidos no presente trabalho foram praticamente os mesmos encontrados para *X. oryzae*, *X. phaseoli* e *X. pruni* infectadas pelos respectivos fagos.

Os períodos em que o ciclo foi dividido apresenta certa subjetividade e apesar das concordâncias com os da literatura devem ser considerados com certa reserva pois não houve durante as pesquisas cuidados especiais no sentido de otimizar as condições experimentais.

A respeito da duração das fases do ciclo de infecção é interessante considerar, que a cinética de incorporação de timidina tritiada na bactéria infectada se deu em um período de 5 minutos. Um resultado como este sugere períodos de ciclo mais curtos. Contudo, parece razoável lembrar que a transcrição do genoma viral compreende genes necessários à fase inicial, intermediária e final do ciclo e não é feita dentro de um programa de sequência imediata. Sabe-se que o fago T₄ exige pré-requisitos para o sequenciamento das fases, especialmente quanto à alteração da partícula sigma e substituição por proteínas biossintetizadas nas fases posteriores do ciclo.

Além, o programa temporal dos eventos durante o ciclo, como no fago R17 é altamente dependente das proteínas da capa proteica (1º gene transcrito e traduzido). As subunidades da capa proteica do fago R17 são absolutamente necessárias para o início da transcrição do gene da enzima de replicação. O gene da "proteína A" que é tido como o último a ser transcrito depende da replicase, pois a sua biossíntese só ocorre em segmentos do RNA nascente. Tudo isso mostra como é difícil de estabelecer uma correspondência entre o período de incorporação da timidina e as diversas fases do ciclo *Xac-CENA*.

A comparação dos resultados obtidos nesta pesquisa com os relatados por GRAMBOULAN e FRANKLIN (1966) parecem indicar que a ação dos vírus dotados de ácido nucleico tipo RNA sobre o hospedeiro, pode diferir da ação dos vírus tipo DNA. Essa sugestão é baseada no fato de que a replicação do RNA do fago R17 em *E. coli*, provocou de imediato um bloqueio à entrada de nucleotídeo tritiado enquanto no caso do *Xac-CENA* em *X. campestris* (Fig. 5), foi possível encontrar um máximo na taxa de incorporação de timidina tritiada 5 minutos após a infecção. A incorporação da timidina tritiada parece indicar um consumo do composto radioativo no processo de replicação, evitando assim uma competição com o genoma do hospedeiro que em nosso estudo atinge um máximo após duas horas (Fig. 5) a partir da introdução da timidina tritiada.

Evidentemente outra possibilidade em relação a diferença encontrada poderia ser explicada num mecanismo mais complexo, relacionando o fago com hospedeiros de diferentes espécies.

Os resultados positivos do virazole no desenvolvimento do processo infectivo do fago em *X. campestris* sugerem a utilização desse sistema de ciclo vital relativamente curto como um interessante modelo para estudos sobre os mecanismos de ação desse e de outros viricidas em procariotos.

Os resultados do virazole examinados pela técnica de coloração negativa podem ser melhor considerados pela visualização ao microscópio eletrônico dos cortes ultrafinos especialmente no período pós-adsorção até a lise bacteriana.

Um estudo posterior da localização intra bacteriana do virazole poderá ser planejado utilizando virazole tritiado e as mesmas técnicas anteriormente descritas. Neste caso espera-se observar as possíveis regiões em que o virazole poderia acumular e exercer sua função de inibidor competitivo com o ácido inosínico pela enzima inosina 5'-fosfato desidrogenase.

Além dos resultados de natureza básica, é possível realizar estudos visando talvez o controle dos vírus que afetam bactérias úteis como é o caso das bactérias utilizadas na fermentação industrial.

O anti-soro obtido apresentou resultados positivos tanto nos testes de dupla difusão em agar como nos testes de precipitação. Os sedimentos do teste de precipitação observados ao microscópio eletrônico revelaram que embora os anticorpos melhor observados foram os formados contra a cabeça do fago, há evidência de que foram formados também anticorpos para a cauda.

Com a obtenção do anti-soro dotado de anticorpos específicos para o vírus em estudo, será possível a realização de testes para se identificar e estudar a relação de parentesco entre bacteriófagos com idêntica ou diferente morfologia. Adicionalmente, o anti-soro para o fago de *X. campestris* permitirá a realização preliminar de testes visando reconhecer semelhanças e diferenças entre isolados de regiões diferentes.

Finalmente parece-nos interessante lembrar que os dados, as informações e o domínio de técnicas com *X. campestris* e seu fago se constituem em elementos fundamentais para o futuro desenvolvimento de técnicas de Engenharia Genética no Setor de Fitopatologia do CENA.

6. CONCLUSÕES

1. A utilização da técnica de BERNSTEIN e EISENSTARK (1955) apresenta significativa diferença com relação as técnicas de rotina, pois através dela foi possível passar de suspensões com títulos de 10^7 para 10^{10} partículas viáveis por ml.
2. Em vista de sua morfologia e algumas outras informações o bacteriófago estudado foi classificado no sistema LHT, como pertencente a divisão Deoxyvira, classe Deoxybinala, ordem Urovirales e família Phagoviridae e também no Grupo A da classificação de Bradley. A fim de identificá-lo, foi-lhe atribuído a denominação "Xac-CENA".

3. As técnicas utilizadas permitiram distinguir com razoável facilidade os períodos: adsorção (20-30 minutos), fase latente (35-45 minutos), lise e degradação das bactérias (2 horas) e liberação dos fagos (3-4 horas).
4. Ocorreu um máximo de incorporação de timidina tritiada pelas bactérias infectadas com fagos aos 5 minutos de tratamento, indicando que o vírus apresenta razoável domínio sobre o genoma da bactéria hospedeira desde o início do seu ciclo.
5. O virazole mostrou um efeito inibidor sobre a infecção do fago à bactéria observado através das colorações negativas e das secções ultrafinas, o que pode indicar uma ação inibidora e competitiva sobre a enzima inosina 5'-fosfato desidrogenase.
6. Os testes serológicos indicaram que houve a indução de anticorpos específicos principalmente para a cabeça do bacteriófago, evidenciando também anticorpos para a cauda.

7. Os resultados da ação do virazole no sistema vírus-procaríoto parece servir de modelo adequado para testes com viricida.

7. LITERATURA CITADA

ACKERMANN, H.W.; P. JOLICOEUR e L. BERTHIAUME, 1974. Avantages et inconvénients de l'acétate d'uranyle em virologie comparée: étude de quatre bactériophages caudés. *Can J. Microbiol.* Ottawa, 20: 1093-1099.

ACKERMANN, H.W.; A. AUDURIER; L. BERTHIAUME; L.A. JONES; A.J. MAYO e A.K. VIDAVER, 1978. Guidelines for bacteriophages characterization. *Advances in Virus Research*, New York, 23: 2-21.

ADAMS, M., 1959. *Bacteriophages*. New York, Interscience Publishers, 590 p.

BACHMANN, L. e M.N. SALPETER, 1965. Autoradiography with the electron microscope. A quantitative evaluation. *Lab. Invest.*, Washington, 14: 1041-1053.

- BERGAMIN FILHO, H., 1975. Caracterização de um bacteriófago ativo contra *X. campestris* (Pammel) Dowson e *X. vesicatoria* (Doidge) Dowson e seu emprego no controle desses patógenos. Piracicaba, ESALQ/USP, 108 p. (Tese de Doutorado).
- BERGAMIN FILHO, A., 1978. Vírus. In GALLI, F. Coord. *Manual de Fitopatologia*. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, p. 141-159.
- BERNSTEIN, H. e L.B. EISENSTARK, 1955. A method for the production of high-titer stocks of bacteriophages of *Xanthomonas pruni*. *Phytopathol.* Lancaster, 45: 580.
- BIENZ, K.A., 1977. Techniques and applications of autoradiography in the light and electron microscope. *Microscopica Acta*. Stuttgart, 79 (1): 1-22.
- BILLING, E., 1970. Further studies on the phage sensitivity and the determination of phytopathogenic. *Pseudomonas* spp. *J. Appl. Bacteriol.* London, 26: 193-210.
- BRADLEY, D.E., 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol Rev.* Baltimore, 31 (4): 230-314.

BRADLEY, D.E., 1971. A comparative study of the structure and biological properties of bacteriophages. In: MARAMOROSCH, K. e KURSTAK, E. Ed. *Comparative Virology*. New York, Academic Press, p. 208-250.

BRENNER, S. e R.W. HORNE, 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*. Amsterdam, 34: 103-111.

BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS, Ed., 1975. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1268 p.

CARO, L.G. e R.P. Van TUBERGEN, 1962. High resolution autoradiography. I. Methods. *J. Cell. Biol.* New York, 15: 173 - 188.

CASIDA, L.E., 1968. *Industrial Microbiology*. New York, John Wiley, p. 151-160.

CIVEROLO, E.L., 1973. Relationship of *Xanthomonas pruni* bacteriophages to bacterial spot disease in *Prunus*. *Phytopathol.* Lancaster, 63: 1279-1284.

- CONNS, G.H. e J.E. KOTILA, 1925. The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogens. *Phytopathol.* Lancaster, 7: 357-370.
- COOK, F.D. e H. KATZNELSON, 1960. Isolation of bacteriophages for the detection of *Corynebacterium insidiosum*, agent of bacterial wilt of alfafa. *Can J. Microbiol.* Ottawa, 6:121-125.
- CROSSE, J.E. e M.K. HINGORANI, 1958. A method for isolating *Pseudomonas morsprunorum* phages from the soil. *Nature*. London, 181: 60-61.
- De FAZIO, G.; J. CANER e M. VICENTE, 1978. Inhibitory effect of virazole (Ribavirin) on the replication of tomato white necrosis virus (VNBT). *Archives of Virology*. Vienna, 58: 153-156.
- DERRICK, K.S., 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology*. New York, 56: 652-653.
- DOWLER, W.M. e D.J. WEAVER, 1975. Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads from apparently healthy peach trees. *Phytopathol.* Lancaster, 65: 233-236.

- ECHANDI, E. e M. SUN, 1973. Isolation and characterization of a bacteriophage for the identification of *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathol.* Lancaster, 63: 1398-1401.
- EISENSTARK, A. e H.H. THORNBERRY, 1950. Plaque formation by *X. pruni* bacteriophage. *Phytopathol.* Lancaster, 40: 876-877.
- ERSKINE, J.M., 1973. Characteristics of *Erwinia amylovora* bacteriophage and its possible role in the epidemiology of fire blight. *Can J. Microbiol.* Ottawa, 19: 837-845.
- FIGUEIREDO, M.B.; A.P.C. ALBA e A.R. OLIVEIRA, 1977. Sorologia aplicada ao estudo dos fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica.* Piracicaba, 3 (4): 233-259.
- FRANKLIN, R.M. e N. GRAMBOULAN, 1966. Ultrastructure of *Escherichia coli* cells infected with bacteriophage R. 17. *J. Bacteriol.* Baltimore, 91 (2): 834-848.
- GALLI, F. Coord., 1968. *Manual de Fitopatologia.* São Paulo, Editora Agronômica Ceres. 640 p.

- GRANBOULAN, N. e R.M. FRANKLIN, 1966. High resolution autoradiography of *Escherichia coli* cells infected with bacteriophage R.17. *J. Bacteriol.* Baltimore, 91 (2): 849-857.
- GUZMAN, V.P., 1980. Efeito quimioterapêutico do nucleosídeo sintético virazole (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) sobre os vírus do mosaico do fumo (TMV), do mosaico amarelo do feijoeiro, isolado em Piracicaba (VMAF-P) e do mosaico da *Vigna*. Piracicaba, ESALQ/USP, 59 p. (Dissertação de Mestrado).
- KAUFFMAN, H.E. e A.P.K. REDDY, 1975. Seed transmission studies of *Xanthomonas oryzae* in rice. *Phytopathol.* Lancaster, 65: 663-666.
- KELLENBERGER, E.; J. SÉCHAUD e A. RYTER, 1959. Electron microscopical studies of phage multiplication. IV. The establishment of the DNA pool of vegetative phage and the maturation of phage particles. *Virology*. New York, 8: 478-498.
- KLEMENT, Z., 1957. Two new bacteriophages for bacterial pathogens of the bean. *Nature*. London, 180: 41-42.
- KLEMENT, Z., 1959. Some new bacteriophages for plant pathogenic *Xanthomonas* spp. *Nature*, London, 184: 1248-1249.

- KLEMENT, Z. e B. LOVAS, 1959. Isolation and characterization of a bacteriophage for *Corynebacterium flaccumafaciens*. *Phytopathol.* Lancaster, 49: 107-112.
- LAGE, G., 1980. Autoradiografia quantitativa a nível de microscopia eletrônica em células de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) infectadas com vírus do anel do pimentão. Piracicaba, ESALQ/USP, 108 p. (Dissertação de Mestrado).
- LEDERER, C.M.; J.M. HOLLANDER e I. PEARLMAN, 1967. *Table of Isotopes*. 6th ed. New York, John Wiley, 155 p.
- LERCH, B., 1977. Inhibition of biosynthesis of potato virus by ribavirin. *Phytopath. Z.* Berlin, 89: 44-49.
- LIEW, K.W. e A.M. ALVAREZ, 1981. Biological and morphological characterization of *Xanthomonas campestris* bacteriophages. *Phytopathol.* Lancaster, 71 (3): 269-273.
- LOVREKOVICH, L. e Z. KLEMENT, 1965. Serological and bacteriophage sensitivity studies on *Xanthomonas vesicatoria* strains isolated from tomato and pepper. *Phytopath. Z.* Berlin, 52: 222-228.

- LUFT, H.H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* New York, 9: 404-414.
- LWOFF, A. e P. TOURNIER, 1966. The classification of viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* California, 20: 45-74.
- LOWFF, A. e P. TOURNIER, 1971. Remarks on the classification of viruses. In: MARAMOROSCH, K. e E. KURSTAK, Ed. *Comparative Virology*. New York, Academic Press, p. 2-41.
- MANDELL, J.D. e A. EISENSTARK, 1953. Factors affecting plaque formation by *Xanthomonas pruni* bacteriophage. *Phytopathol.* Lancaster, 43: 27-29.
- MATHEUS, R.E.F., 1970. Serological reactions. In: *Plant virology*. New York, Academic Press, 475-506.
- MATYIS, J.C.; D.M. SILVA; C.L. SALGADO e A. BERGAMIN FILHO, 1976. Observações ao microscópio eletrônico de três bacteriófagos de *Xanthomonas* sp. In: *Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica*, 5º, Piracicaba, p. 80-81.
- MAUGH II, T.H., 1976. Chemoterapy: antiviral agent come of age. *Science*, Washington, 192: 128-132.

- MENZEL, G. e E. STENZ, 1978. Wirkungen von virazol (ribavirin) in virus prokariyonten systemen. *Acta microbiol. Acad. Sci. hung. Eingeganger*, 25: 11-15.
- MOHAN, S.K., 1981. Fagotipagem e patogenicidade de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (PSG), agente da mancha aureolada do cafeeiro. *Fitopatol. Bras.* Brasília, 6 (2) p. 311.
- MUNCIE, J.H. e M.K. PATEL, 1930. Studies upon a bacteriophage specific for *Pseudomonas tumefaciens*. *Phytophatol. Lancaster*, 20: 289-305.
- NERMUT, M.V., 1972. Negative staining of viruses. *Journal Microscopy. Oxford*, 96: 351-362.
- OKABE, N. e M. GOTO, 1963. Bacteriophages of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytophatol. California*, 1: 397-418.
- OLIVEIRA, A.R., 1975. Considerações sobre o preparo de antisoro pela técnica de injeção do antígeno no linfonódulo. *Summa Phytopathol. Piracicaba*, 1: 61-64.
- PELC, S.R., 1963. Teory of electron autoradiography. *J. Royal Micro. Soc. Oxford*, 81: 131.139.
- REYNOLDS, E.S., 1963. The use of the lead citrate and high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol. New York*, 17: 208-212.

- SHEPARD, J.F., 1977. Regeneration of plants from protoplast of potato virus X-infected tobacco leaves. II. Influence of virazole on the frequency of infection. *Virology*, New York, 78: 261-266.
- SIDWELL, R.W.; J.H. HUFFMAN; G.P. KHARES; L.B. ALLEN; J.T. WITROWSKI e R.K. ROBINS, 1972. Broad spectrum antiviral activity of virazole, 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science*, Washington, 177: 705-706.
- SIMON, L.D. e T.F. ANDERSON, 1967. The infection of *Escherichia coli* by T₂ and T₄ bacteriophages as seen in the electron microscope. I. Attachment and penetration. *Virology*. New York, 32: 279-297.
- SITTOLIN, I.M. e D.M. SILVA, 1979. Observações sobre a adsorção e liberação dos fagos de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson ao microscópio eletrônico. *Summa Phytopathol.* Piracicaba, 5(3,4): 173-175.
- SITTOLIN, I.M.; P. GUZMAN V. e D.M.SILVA, 1980. Observações ao microscópio eletrônico do efeito do virazole sobre um bacteriófago de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. In: *Congresso Paulista de Fitopatologia*, 39, Jaboticabal, p.32.

- SMITH, R.A., 1980. Mechanism of action of ribavirin. In: SMITH, R.A. e W.KIRKPATRICK, Ed. *Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent*. New York, Academic Press, p. 99-118.
- SOZZI, T.; H. BAUER; R. MARIT e E. DENTAN, 1980. Some characteristics of five phages capable of lysing a strain of *Streptococcus lactis*. *Milchwissenschaft*, Munich, 35 (1): 17-20.
- STEVENS, A.R., 1966. High resolution autoradiography. In: PRESCOTT, D.M., Ed. *Methods in Cell Physiology*. New York, Academic Press, vol. 2, p. 255-310.
- STREETER, D.G.; J.T. WITKOENSKI; G.P. KHARE; R.W. SIDWELL; R.J. BAUER; R.K. ROBINS e L.N. SIMON. 1973. Mechanism of action of 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (viralazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Washington, 70(4): 1174-1178.
- SUTTON, M.D. e H. KATZNELSON, 1953. Isolation of bacteriophages for the detection and identification of some seed-borne pathogenic bacteria. *Can. J. Botany*. Ottawa, 31: 201-305.
- SUTTON, M.D.; H. KATZNELSON e C. QUADLING, 1958. A bacteriophage that attacks numerous phytopathogenic *Xanthomonas* species. *Can. J. Microbiol.* Ottawa, 4: 493-497.

- SUTTON, M.D. e W.R. WALLEN, 1967. Phage types of *Xanthomonas phaseoli* isolated from beans. *Can J. Botany*, Ottawa, 45: 267-280.
- TAYLOR, J.D., 1970. Bacteriophage and serological methods for the identification of *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh) Dowson. *Ann. Appl. Biol.*, London, 66: 387-397.
- TAYLOR, J.D., 1972. Specificity of bacteriophages and antiserum for *Pseudomonas pisi*. *N.Z.J. Agric. Res.*, 15: 421-431.
- TIKHONENKO, A.S., 1970. *Ultrastructure of Bacterial Viruses*. New York, Plenum Press. 294 p.
- WALKER, J.C., 1969. *Plant Pathology*. New York, McGraw-Hill, 819 p.
- WILLIAMS, M.A., 1969. The assessment of electron microscopic autoradiographs. In: BARER, R. e V.E. COSSLETT. Ed. *Advances in Optical and Electron Microscopy*. New York, Academic Press, vol. 3, p. 219-269.