

INDUÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE *Xanthomonas campestris* (Pam) Dowson E ESTUDO DE SUA PATOGENICIDADE EM PLÂNTULAS DE REPÔLHO (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)

FAUSTO FORESTI
Licenciado em História Natural

Orientador: Dra. RAHME NELLY NEDER

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção
do grau de DOUTOR em Ciências.

CAMPINAS
São Paulo - Brasil
1972

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
Biblioteca Central

AGRADECIMENTOS

Apresentamos os nossos agradecimentos a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho e em especial, às seguintes pessoas:

Dra. Rahme Nelly Neder, pela sua dedicação, orientação e apoio. Seus conselhos, suas críticas e amizade foram, sem dúvida, elementos de fundamental importância para o bom êxito do presente trabalho.

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, com quem iniciamos nossos trabalhos com microrganismos.

Prof. Dr. Almiro Brumenschein, que colocou a nossa disposição os recursos do Instituto de Genética da E.S.A.L.Q., onde foram desenvolvidos os trabalhos de campo.

Prof. Dr. Otávio Valsechi, que colocou a nossa disposição os recursos do Instituto Zimotécnico da E.S.A.L.Q., onde foram realizados os trabalhos de laboratório.

Prof. Dr. Roland Vencovsky, pela orientação prestada na realização da análise estatística.

Dr. Marcílio Dias, pelo fornecimento das sementes utilizadas.

Senhor Antonio José Rocha Campos, pela colaboração técnica, Srta. Lúcia Bombo e Sr. Otales Matos Almeida, pelos serviços datilográficos.

Expressamos também nossos agradecimentos à CAPES, pelos recursos recebidos durante nossa participação no Curso de Pós-Graduação na E.S.A.L.Q., de Piracicaba.

ÍNDICE

	página
1. INTRODUÇÃO	1-2
2. REVISÃO DA LITERATURA	3-15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16-33
3.1. Meios de cultura e soluções usadas	16-19
3.1.1. Nutriente líquido ou caldo simples	16
3.1.2. Agar nutriente	16
3.1.3. Meio mínimo líquido	16
3.1.4. Meio mínimo sólido	17
3.1.5. Meio de Yeastrel	17
3.1.6. Antibiótico	17
3.1.7. Solução de ácido nucleico de leveduras hidrolizado	17-18
3.1.8. Solução de vitaminas	18
3.1.9. Solução de caseína	18
3.1.10 Soluções de aminoácidos	18-19
3.2. Bactéria	19
3.3. Curva de sobrevivência à luz ultravioleta da li nhagem de <u>X. campestris</u>	19-20
3.4. Isolamento de mutantes auxotróficos	20-23
3.5. Caracterização dos mutantes isolados	23-24
3.6. Curva de crescimento de três mutantes específi cos frente a diferentes concentrações do aminoá cido respectivo	24-25
3.7. Hospedeiro	25-26
3.8. Avaliação da patogenicidade das linhagens mutan tes "in vitro"	26-28
3.8.1. Inoculação de tecido de planta com bacté ria crescida em diferentes doses do ami noácido respectivo	26-27

3.8.2. Inoculação de tecido de planta com bactéria e posterior suplementação com solução de 100,00 mcg/ml do aminoácido respectivo	27-28
3.8.3. Inoculação de tecido de planta com bactéria e posterior suplementação com diferentes doses do aminoácido respectivo...	28
3.9. Avaliação da patogenicidade das linhagens mutantes "in vivo"	29-31
3.9.1. Inoculação de plântulas com bactéria crescida em diferentes doses do aminoácido respectivo	29
3.9.2. Inoculação de plântulas com bactérias e posterior suplementação com solução de 100,0 mcg/ml do aminoácido respectivo...	30
3.9.3. Inoculação de plântulas com bactérias e posterior suplementação com diferentes doses do aminoácido respectivo	30-31
3.10 Método de avaliação da severidade da doença..	31
3.11 Reisolamento e caracterização das bactérias mutantes	31-32
3.12 Método estatístico	32-33
4. RESULTADOS	34-57
4.1. Sobrevivência à luz ultravioleta da linhagem de <u>Xanthomonas campestris</u>	34
4.2. Isolamento e caracterização dos mutantes auxotróficos	34-37
4.3. Curva de crescimento dos mutantes glicina, argi	

	página
nina e histidina	37-43
4.4. Avaliação da patogenicidade das linhagens mutan- tes "in vitro"	44-48
4.4.1. Inoculação de tecido de planta com bacté- ria crescida em meio de cultura com dife- rentes doses do aminoácido respectivo...	44-45
4.4.2. Inoculação de tecido de planta com bacté- ria e posterior suplementação com solu- ção de 100,0 mcg/ml do aminoácido respec- tivo	45-46
4.4.3. Inoculação de tecido de planta com bacté- ria e posterior suplementação com dife- rentes doses do aminoácido respectivo...	47-48
4.5. Avaliação da patogenicidade das linhagens mutan- tes "in vivo"	49-56
4.5.1. Inoculação de plântulas com bactérias crescida em meio de cultura com diferen- tes doses do respectivo aminoácido	49-51
4.5.2. Inoculação de plântulas com bactéria e posterior suplementação com solução de 100,0 mcg/ml do aminoácido respectivo...	51-53
4.5.3. Inoculação de plântulas com bactéria e posterior suplementação com diferentes doses do aminoácido respectivo	53-57
4.6. Reisolamento e caracterização das bactérias mu- tantes	58
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	59-68
6. RESUMO E CONCLUSÕES	69-70
7. SUMMARY	71
8. BIBLIOGRAFIA CITADA	72-78

1. INTRODUÇÃO

A utilização de mutação induzida tem sido amplamente aplicada, principalmente em microrganismos, onde o grupo dos mutantes bioquímicos tem sido o mais estudado. Entre esses, incluem-se os mutantes auxotróficos, caracterizados pela exigência de fatores de crescimento no meio, dispensáveis pelas células originais.

A relação hospedeiro-parasita, no que se refere à nutrição, tem se mostrado correlacionada com os requerimentos nutricionais do patógeno e com a disponibilidade dos mesmos no hospedeiro. Mutantes auxotróficos de patógenos têm sido de grande valor no estudo desse aspecto da patogenicidade. Em vários microrganismos a patogenicidade pode ser anulada e, então, temporariamente restaurada sob condições experimentais genéticas e nutricionais controladas; um composto específico que pode determinar a reação de patogenicidade ou não patogenicidade tem sido identificado em cada caso; esses compostos são usualmente aminoácidos ou bases nitrogenadas ou vitaminas.

Neste trabalho propusemo-nos ao isolamento e identificação de mutantes auxotróficos de Xanthomonas campestris (Pam) Dowson, bactéria fitopatogênica responsável pela "podridão negra" das crucíferas. Procuramos saber se as deficiências nutricionais induzidas eram parciais ou completas, examinando a variação e extensão do crescimento de mutantes em resposta às substâncias que requeriam. Em seguida, estudamos o comportamento desses mutantes "in vitro" e "in vivo" em plântulas de repêlho; as inoculações foram feitas sem suplementação e com suplementação exógena da substância requerida pelo patógeno. Dessa maneira, visamos esclarecer se as diferentes deficiências nutricionais poderiam manter ou anular a patogenicidade e, se suple-

mentação posterior com o nutriente requerido poderia modificar a reação de patogenicidade apresentada pelos mutantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Mutantes auxotróficos têm sido amplamente investigados tanto por geneticistas como por bacteriologistas, sendo que técnicas de isolamento e caracterização em várias espécies de microrganismos acham-se bem estabelecidas e são rotineiramente empregadas. A extensão desse assunto pode ser verificada através das revisões de LURIA (1947), LEDERBERG (1949), TATUM e PERKINS (1950), KAPLAN (1952), HAYES (1964) e BRAUN (1966).

Os trabalhos publicados sobre mutantes auxotróficos de microrganismos fitopatogênicos são, porém, pouco numerosos.

BOONE e KEITT (1952) isolaram de Venturia inaequalis mutantes deficientes nutricionais para colina, inositol, purinas, pirimidinas, histidina e arginina. Neste trabalho os autores relataram que experimentos estavam em andamento para determinar os possíveis efeitos dessas deficiências na patogenicidade do fungo.

KEITT e BOONE (1954), em continuação ao trabalho anterior, ensaiaram os mutantes auxotróficos em meio mínimo e em meio mínimo suplementado com a substância correspondente a sua deficiência. O crescimento quantitativo foi determinado através do peso seco do micélio produzido com diferentes concentrações da substância requerida. Também foram estudados os possíveis efeitos das mutações na patogenicidade do fungo. Os mutantes deficientes em vitaminas, exceção feita à colina e à riboflavina, mostraram-se patogênicos. Mutantes para aminoácidos e bases nitrogenadas não apresentaram reação de patogenicidade.

GARBER e HACKETT (1954) partiram do princípio de que a virulência de um patógeno depende de numerosos fatores, incluindo a disponibilidade de nutrientes essenciais no hospedeiro. Se o hospedeiro não dispõe de todos esses nutrientes, em quantida-

de ou em forma adequada à assimilação, o patógeno não pode proliferar e produzir as reações características no hospedeiro. Como exemplo, citam os trabalhos de BACON, BURROWS e YATES (1950) e de GARBER, HACKETT e FRANKLIN (1952), os quais, trabalhando, respectivamente, com mutantes de Salmonella typhosa e Klebsiella pneumoniae deficientes para purina, verificaram que os mesmos foram avirulentos para ratos porque a deficiência para purina não foi suprida pelo hospedeiro. BACON, BURROWS e YATES (1951) verificaram ainda que a virulência demonstrada pelo tipo selvagem de S. typhosa pode ser recuperada em mutantes deficientes para PABA, através da injeção dessa substância no hospedeiro. Dessa maneira, GARBER e HACKETT (1954) entenderam que o mesmo poderia se dar com patógenos de planta. Isolaram dois mutantes auxotróficos de Erwinia aroideae que requeriam treonina e triptofano. Após inoculação na superfície cortada de batata, verificaram que o mutante para treonina era virulento e que o mutante para triptofano só se mostrava virulento quando havia suplementação de triptofano à superfície cortada de batata, indicando a não disponibilidade de triptofano em batata. Demonstraram ainda que reversões do mutante triptofano apresentavam-se tão virulentas quanto a linhagem paternal.

GARBER (1954) obteve mutantes auxotróficos de Erwinia aroideae por irradiação com luz ultravioleta, seguida de tratamento com penicilina. A produção de mutantes foi de aproximadamente um mutante em 10^3 células da bactéria. Ensaiou "in vitro" a patogenicidade desses mutantes, cada um requerendo um ou dois aminoácidos, em superfície cortada dos seguintes hospedeiros: pepino, batata, rabanete, nabo e cenoura. Todos os mutantes foram virulentos para o pepino e batata, com exceção do mutante deficiente para cisteína, que se apresentou pouco virulento ou avirulento para a batata. Três tipos de reação foram notados pa

ra nabo e cenoura: virulência, avirulência e virulência variável. Os mutantes patogênicos apresentaram crescimento quando blocos de tecidos dos hospedeiros foram adicionados ao meio de cultura como suplementos nutricionais, o mesmo não acontecendo quando tal suplementação foi feita com mutantes não patogênicos. Porém, homogenados de tecidos dos hospedeiros forneceram os nutrientes requeridos quando adicionados como suplemento auxono gráfico a mutantes não patogênicos. A não patogenicidade de mutantes auxotróficos específicos para certas espécies de hospedeiro foi relacionada com a incapacidade desses mutantes de utilizar a concentração disponível do nutriente requerido existente na superfície do hospedeiro.

BOONE, LAMEY, KLINE e KEITT (1954) estudaram mutantes induzidos de Venturia inaequalis deficientes para seis diferentes vitaminas. Os resultados de medidas do peso seco de mutantes crescidos em diferentes concentrações das vitaminas requeridas, indicaram que as deficiências eram completas. Os mutantes para biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico e inositol foram patogênicos, enquanto os mutantes para colina e riboflavina foram não patogênicos. Aplicações de uma solução de colina em folhas inoculadas com o mutante colina permitiram que esse mutante se desenvolvesse e se mostrasse patogênico.

GARBER, GOLDMAN e HIRSHHORN (1955), determinaram a virulência de 3 mutantes auxotróficos de Agrobacterium tumefaciens, inoculando-os em folhas de Bryophyllum. Uma linhagem deficiente para metionina mostrou-se tão virulenta quanto a linhagem paterna; uma deficiente para triptofano mostrou virulência muito baixa ou não virulência; uma linhagem deficiente para metionina e adenina mostrou virulência alta ou baixa. Os autores concluem que esses resultados podem estar relacionados com o suprimento dos nutrientes requeridos no hospedeiro, com o tamanho do

inóculo e com a frequência de reversão nas linhagens auxotróficas.

BOONE, STAUFFER, STAHMANN e KEITT (1956) isolaram mutantes morfológicos e auxotróficos de Venturia inaequalis por indução com mostarda nitrogenada e luz ultravioleta, com a finalidade de estudá-los em relação a sua genética, nutrição e patogenicidade.

LAMEY, BOONE e KEITT (1956) estudaram doze mutantes auxotróficos de Venturia inaequalis (isolados pelos autores citados no parágrafo anterior) em relação ao seu crescimento na presença dos nutrientes para os quais eram deficientes; foram dadas curvas de crescimento de cada mutante e do tipo selvagem, comparativamente; através disso foi possível estabelecer: a) se a deficiência nutricional era completa ou parcial; b) a mais baixa concentração da substância requerida que permitia o crescimento do mutante e c) o crescimento do mutante em diferentes concentrações da substância requerida, pontos esses que os autores apontam como importantes na relação hospedeiro-parasita.

GARBER, SHAEFFER e GOLDMAN (1956) isolaram mutantes auxotróficos de Erwinia aroideae, os quais foram ensaiados "in vitro" em relação a sua patogenicidade a nove variedades de rabanete e três variedades de nabo. Três tipos de resposta do hospedeiro foram notados, quando fatias de órgão de reserva eram inoculados: resistente, suscetível e uma resposta variável na qual indivíduos de uma dada variedade foram resistentes ou suscetíveis a um mutante específico. Os mutantes mostraram-se virulentos para o rabanete, com exceção de dois mutantes para a arginina, que foram avirulentos para as nove variedades. Esses mesmos mutantes para arginina foram também avirulentos para as três variedades de nabo, enquanto os mutantes requerendo cisteína ou glicina permaneceram virulentos e os mutantes requerendo histi-

dina ou isoleucina e valina apresentaram sua virulência grandemente diminuída para essas variedades de nabo.

KLINE, BOONE e KEITT (1956) trabalharam com oito mutantes auxotróficos não patogênicos de *Venturia inaequalis*. A patogenicidade foi restaurada nos mutantes, quando soluções dos nutrientes que requeriam eram aplicadas, diariamente, na superfície das fôlhas, após inoculação. O número mínimo de dias de suplementação suficiente para restaurar a patogenicidade variou entre os mutantes. A patogenicidade dos mutantes que requeriam adenina ou guanina não foi restaurada.

BUXTON (1956) isolou mutantes de *Fusarium oxysporum* diferentes do tipo paternal pela sua morfologia, patogenicidade e requerimentos nutricionais. Formou heterocarions, em meio não suplementado com pares de mutantes auxotróficos. A maioria dos auxotróficos mostrou-se menos patogênica do que o tipo paternal, enquanto os heterocarions entre os mutantes apresentaram a mesma patogenicidade do tipo paternal.

GARBER (1956) fez uma revisão de dados obtidos com mutantes auxotróficos de bactérias patogênicas para plantas e animais. Considerou uma hipótese na qual duas condições no hospedeiro afetam diretamente o parasita: um ambiente nutricional e um ambiente inibitório. O ambiente nutricional pode ser adequado ou inadequado para favorecer a proliferação e metabolismo da população do parasita; o ambiente inibitório pode ser efetivo ou não na supressão da proliferação ou do metabolismo da população do parasita. Das quatro possíveis combinações, só um ambiente adequado de nutrição e não inibição resultou em virulência. Exemplos de virulência e avirulência como uma consequência do parasita encontrando ambientes específicos no hospedeiro foram apresentados.

KEITT e BOONE (1956) relataram que mais de cem mutan-

tes de Venturia inaequalis foram caracterizados para seus requerimentos nutricionais, os quais pertenciam às categorias de vitaminas, aminoácidos e bases nitrogenadas. Em quase todos os mutantes estudados, as deficiências foram completas. Testes para patogenicidade foram feitos e o fato de que um mutante de uma linhagem patogênica se revelasse não patogênico foi considerado como evidência de que a deficiência nutricional condiciona a perda da patogenicidade. Nenhuma reversão foi observada em qual quer dos mutantes auxotróficos estudados. O fornecimento ao hospedeiro das substâncias requeridas, durante o período de incubação, por aplicações externas ou internas, restauraram completamente ou em grande parte a patogenicidade dos mutantes.

GARBER e SCHAEFFER (1957), trabalhando "in vitro", apresentaram evidências indicando que órgãos de reserva das plantas de três variedades de nabo diferem, em sua resistência ou suscetibilidade, para três mutantes deficientes em histidina de Erwinia aroideae e relacionaram essas respostas com diferenças nas concentrações de histidina livre do hospedeiro. Em uma variedade, a resistência para todos os mutantes estava relacionada com uma baixa concentração de histidina. Entretanto, dois mutantes apresentaram virulência para certas plantas de cada variedade, as quais tinham concentrações de histidina aparentemente adequadas para proliferação. Um mutante mostrou-se avirulento para plantas com concentrações de histidina muito maior do que as presentes em plantas suscetíveis. Os mutantes não apresentaram diferenças em suas respostas de crescimento frente a concentrações variadas de caseína hidrolisada, histidina ou extratos de nabo.

BOONE, KLINE e KEITT (1957) estudaram "in vitro" a patogenicidade para folhas de maçã de cento e sete mutantes auxotróficos de Venturia inaequalis. Mutantes requerendo respectiva

mente, biotina, inositol, ácido nicotínico e ácido pantotênico, mostraram-se patogênicos; outros, requerendo colina, riboflavina, purinas, pirimidinas, arginina, histidina, metionina e prolina, foram não patogênicos. Os autores formularam hipóteses indicando que as perdas de patogenicidade foram somente devidas às deficiências nutricionais.

KLINE, BOONE e KEITT (1957) julgaram que, se mutantes auxotróficos de *Venturia inaequalis* eram não patogênicos por causa de sua deficiência nutricional, eles deveriam tornar-se patogênicos se a substância que requeriam fôsse adicionada a eles durante o período de incubação. Este trabalho foi feito com a finalidade de provar essa hipótese. A patogenicidade foi restaurada em seis dos oito mutantes não patogênicos, quando sua nutrição era suplementada com as substâncias requeridas, colocadas na superfície de fôlhas de maçã inoculadas, durante o período de incubação. Os mutantes nos quais a patogenicidade foi restaurada requeriam, respectivamente, colina, riboflavina, pirimidina, arginina, histidina e metionina. O crescimento de onze mutantes auxotróficos (alguns dos quais patogênicos em fôlhas não suplementadas) num homogenado de fôlhas de maçã indicou que todas as substâncias requeridas estavam presentes nas fôlhas. Os autores concluíram que algumas dessas substâncias requeridas, embora presentes nos tecidos do hospedeiro, não se encontram em quantidades suficientes no lugar da infecção para permitir um crescimento substancial dos mutantes.

SCHWINGHAMER (1957) apresentou uma descrição dos agentes mutagênicos e métodos de tratamento que podem ser aplicados a patógenos de plantas, no estudo das relações hospedeiro-parasita e de algumas fases do parasitismo. Relacionando as alterações bioquímicas induzidas por esses agentes com alterações da patogenicidade, reportou resultados descritos por KEITT e BOONE

(1954 e 1956) que encontraram uma correlação positiva entre perda de virulência e incapacidade de fungo V. inaequalis de sintetizar certos fatores de crescimento. Citou ainda resultados apresentados por GARBER (1954 e 1956) e GARBER, GOLDMAN e HIRSH HORN (1955) em Erwinia aroideae e Agrobacterium tumefaciens, respectivamente, onde foi encontrada a correlação entre requerimento em aminoácidos e perda de virulência em mutantes induzidos. A reversão para a prototrofia era acompanhada pela restauração da virulência.

GARBER e HEGGESTAD (1958) trabalharam com cinco mutantes auxotróficos de Pseudomonas tabaci, os quais requeriam determinados aminoácidos para crescer. Inocularam-nos em folhas de vinte variedades de Nicotiana tabacum L. e dez outras espécies de Nicotiana. Os mutantes não foram patogênicos para a maior parte das espécies e variedades e nenhuma espécie ou variedade foi suscetível a todos os mutantes. O mutante que requeria leucina foi patogênico para qualquer variedade de Nicotiana tabacum.

GARBER (1958) estudou a resistência ou suscetibilidade de órgãos de reservas individuais de doze plantas de três variedades de nabo, em relação a três mutantes para histidina de Erwinia aroideae e a concentração de histidina livre de cada órgão foi determinada. O modelo de resistência e suscetibilidade foi diferente do apresentado em plantas das colheitas de 1956 e 1957. A concentração média de histidina de cada variedade também diferiu da apresentada por aquelas plantas. O autor supõe que essas diferenças sejam resultado de fatores ambientais. A avirulência de mutantes-histidina para plantas com adequadas concentrações de histidina leva o autor a supor que a presença de um ou mais inibidores interfere na proliferação dos mutantes.

GARBER (1959), estudando mutantes auxotróficos de

Pseudomonas tabaci, verificou que nenhum mutante foi virulento para qualquer espécie ou variedade de Nicotiana que era resistente à linhagem paternal. Só os mutantes para ácido glutâmico e para glicina foram virulentos para todas as espécies suscetíveis de Nicotiana. Sete outros mutantes ensaiados mostraram-se avirulentos.

TUVESON e GARBER (1959) inocularam dezoito mutantes auxotróficos da raça 1 de Fusarium oxysporum (isolada por BUXTON) e treze mutantes auxotróficos da raça 2 (isolada por SCHROEDER) do mesmo fungo, em cinco variedades de ervilha. O trabalho foi feito "in vitro" e "in vivo". Pedacos de raiz e haste de variedades suscetíveis adicionados a um meio mínimo, forneceram os requerimentos nutricionais para todos os mutantes virulentos; todos os mutantes que não cresceram nesse meio mostraram-se avirulentos, ou pelo menos de virulência duvidosa para as variedades que forneceram os pedacos de raiz e haste. O fungo foi reisolado das plantas inoculadas com mutantes e, em cada caso, o fungo era ainda mutante.

KEITT, BOONE e SHAY (1959) relataram que cada um dos caracteres dos cinquenta e quatro mutantes auxotróficos de Venturia inaequalis estudados era controlado por um único gene. Estudos genéticos estabeleceram grupos de ligação para seis cromossomos. Em cruzamentos de várias linhagens não patogênicas com a linhagem selvagem, todas as linhagens da progênie que carregavam o gene mutante eram não patogênicas e todas que carregavam o alelo selvagem eram completamente patogênicas; segundo esses autores, a possibilidade de que algum fator genético não conhecido controlava a patogenicidade foi assim virtualmente eliminada. A perda da patogenicidade de muitos mutantes bioquímicos foi temporariamente restaurada, pela aplicação das substâncias requeridas ao hospedeiro durante incubação. As substâncias

requeridas ocorreram comumente em quantidade adequada nos tecidos do hospedeiro porém, não se achavam em quantidade suficiente no lugar da infecção.

DUTTA, HALL e HEYNE (1960) isolaram mutantes auxotróficos de Colletotrichum lagenarium. Mutantes para leucina, isoleucina, serina, lisina, histidina, prolina, alanina, valina, inositol e pirimidina mostraram-se avirulentos para três variedades de melão. Os mutantes avirulentos tornaram-se patogênicos, produzindo sintomas de antracnose em sete a dez dias, quando os suplementos nutricionais respectivos eram colocados em solução aquosa na superfície de folhas inoculadas de plantinhas de uma das variedades, exceção feita ao mutante de pirimidina.

GARBER (1960) sugeriu três diferentes mecanismos responsáveis pela perda da virulência de patógenos deficientes-nutricionais, reunindo para exemplificá-los resultados de trabalhos já apresentados nas citações anteriores. Dessa maneira evidencia que os possíveis mecanismos são os seguintes: 1) o hospedeiro não apresenta concentrações adequadas do nutriente requerido pelo patógeno; 2) o hospedeiro apresenta concentrações adequadas do nutriente requerido porém, outros compostos interferem na sua utilização; 3) o hospedeiro apresenta concentrações adequadas do nutriente requerido porém, a presença de outros compostos é necessária para promover sua utilização pelo patógeno.

BOONE (1962) observou que certos mutantes auxotróficos de Venturia inaequalis, que eram não patogênicos quando inoculados sozinhos em folhas de maçã, mostraram-se patogênicos quando misturas dessas linhagens serviram como inóculo, indicando sintrofismo dos mutantes. Só os mutantes originais foram encontrados entre os reisolamentos de folhas atacadas. Foram observadas fusões entre tubos germinais "in vitro" porém, tentativas para

produzir heterocarions balanceados não tiveram sucesso.

NEDER, AZEVEDO e VENCovsky (1962) estudaram a reversão de auxotrofia para prototrofia num mutante de Xanthomonas campestris deficiente para triptofano. Como agentes indutores da reversão foram usados H_2O_2 , $MnCl_2$ e luz ultra-violeta, sendo o último o mais efetivo, apresentando 561,9 reversões por 10^8 células de bactérias enquanto o número de reversões espontâneas foi 1,02 por 10^8 células de bactéria.

TINLINE (1963) determinou a patogenicidade de linhagens de Cochiobolus sativus para plantinhas de trigo. Essas linhagens compreendiam mutantes prototróficos e auxotróficos do mesmo tipo paternal, heterocarions sintetizados de auxotróficos, diplóides obtidos dos heterocarions e recombinantes selecionados de um diplóide. Mutantes prototróficos e auxotróficos requerendo tiamina, arginina e piridoxina foram tão patogênicos quanto o tipo paternal. Mutantes requerendo metionina e lisina foram não patogênicos. As evidências de que os requerimentos nutricionais dos últimos mutantes controlavam diretamente sua patogenicidade foram as seguintes: a) dois auxotróficos para lisina e dois para metionina foram uniformemente não patogênicos; b) heterocarions feitos com mutantes para lisina e metionina foram patogênicos; diplóides heterozigotos para os requerimentos nutricionais foram patogênicos; c) recombinantes prototróficos de um diplóide foram patogênicos porém, recombinantes auxotróficos foram não patogênicos.

YAMASAKI e SUWA (1963) estudaram duas linhagens de Xanthomonas oryzae (X-18 e X-82) com diferentes níveis de patogenicidade, submetendo-as a tratamento com irradiação ultravioleta. Os mutantes bioquímicos obtidos foram inoculados em variedades de arroz que também apresentaram diferentes níveis de resistência à Xanthomonas oryzae. As linhagens deficientes para leucina,

isoleucina-valina, arginina e fenilalanina mostraram a patogenicidade diminuída, mas as linhagens deficientes para triptofano, treonina e histidina não mostraram nenhuma relação entre patogenicidade e a deficiência nutricional. Os mutantes deficientes para ácido nicotínico, originários da linhagem X-82 mostraram uma pequena diminuição da patogenicidade, enquanto os originários da linhagem X-18 mostraram a patogenicidade aumentada. Os autores concluem que a alteração na patogenicidade está relacionada com a exigência nutricional da bactéria e com a disponibilidade do suprimento requerido no hospedeiro.

KUO, YANG, YEH e LI (1967) isolaram dezesseis mutantes auxotróficos de Piricularia oryzae e ensaiaram sua patogenicidade de em treze variedades de plantas de arroz. Alguns mutantes tiveram sua patogenicidade reduzida, outros perderam completamente sua patogenicidade e outros ainda mostraram-se bastante patogênicos.

AZEVEDO e MIRANDA (1968) isolaram de Xanthomonas campestris mutantes auxotróficos para adenina, triptofano, adenina ou guanina, glicina, cisteína e treonina, assim como mutantes independentes de metionina, com a finalidade de empregá-los posteriormente na demonstração da existência de processos de recombinação nessa bactéria.

KUO, LEE, YUAN e LI (1968) verificaram que mutantes de Piricularia oryzae requerendo ácido glutâmico mostraram crescimento variável de acordo com a variação da concentração de ácido glutâmico no meio de cultura. Entretanto, mutantes para arginina e histidina puderam crescer com baixa concentração de arginina e histidina no meio de cultura e o crescimento não foi muito aumentado quando concentrações altas de arginina e histidina foram fornecidas. Quando o nutriente requerido foi suplementado exogenamente, os mutantes para ácido glutâmico tiveram sua patogenicidade

genicidade restaurada para alguns dos hospedeiros usados, porém os mutantes para arginina e histidina permaneceram avirulentos mesmo depois que uma grande quantidade dos aminoácidos requeridos foi fornecida. A resistência ou suscetibilidade de seis variedades de arroz a esses mutantes e o conteúdo de aminoácido livre, nelas contido, foram comparados. A patogenicidade desses mutantes para as seis variedades de arroz não apresentou correlações com a concentração do aminoácido específico contido nessas variedades.

SCHWINGHAMER (1970) estudou o comportamento em cultura de uma linhagem auxotrófica de Rhizobium trifolii deficiente para riboflavina, que se apresentou ineficiente para promover simbiose quando inoculada em Trifolium pratense. A atividade simbiótica do mutante foi restaurada com a adição de 6,0 mcg/ml do requerimento específico no meio de crescimento da planta. Quando ensaiada sem suplementação em outros hospedeiros da mesma espécie e de espécies diferentes, essa linhagem mutante apresentou diferentes níveis de eficiência. Em todos os casos, a adição de riboflavina capacitou o mutante de atingir um nível aproximado e até de igualar o comportamento da linhagem T1 original. Esses resultados sugerem que a habilidade do mutante de diferenciar o hospedeiro pode estar relacionada ao conteúdo ou disponibilidade do requerimento nutricional específico no hospedeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura e soluções usadas

3.1.1. Nutriente líquido ou caldo simpes (Difco, 1948)

peptona	5 g
extrato de carne	3 g
água destilada	1000 ml
pH - 7,3	

3.1.2. Ágar nutriente (Difco, 1948)

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

3.1.3. Meio mínimo líquido (Starr, 1946)

H_3BO_3	5 mcg
$CaCO_3$	0,1 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	10,0 mcg
$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$	0,5 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10,0 mcg
$MoO_4(NH_4)_6 \cdot 4H_2O$	1,0 mcg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	50,0 mcg
KI	1,0 mcg
NH_4Cl	1,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
glucose	5,0 g
metionina	20,0 g
água destilada	1000 ml
pH - 6,8	

3.1.4. Meio mínimo sólido (Starr, 1946)

Ao meio mínimo líquido foram adicionados 18 g de ágar "Difco" ou "Oxoid"

3.1.5. Meio de Yeastrel (Dowxon, 1957)

extrato de levedura	5 g
glicose	20 g
CaCO ₃	20 g
água destilada	1000 ml
Ágar	18 g

pH - 7,0

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por quinze minutos, excessão feita ao meio mínimo, que foi autoclavado a 110°C por dez minutos.

3.1.6. Antibiótico

O antibiótico usado foi penicilina G potássica cristalina do laboratório Fontoura-Wyeth S/A.. A solução do antibiótico foi sempre preparada momentos antes de ser utilizada, por dissolução de quantidade apropriada do mesmo, em solução salina esterilizada (cloreto de sódio a 0,89% em água destilada) a fim de dar uma concentração de 5000,0 mcg por mililitro.

3.1.7. Solução de Ácido nucleico de leveduras hidrolisado.

Ácido nucleico de leveduras (Oxoid).... 2 gramas
- em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico
Ácido nucleico de leveduras (Oxoid).... 2 gramas
- em 15 ml de solução normal de hidróxido de sódio

Ambas as soluções foram aquecidas a 40°C por 20 minu-

tos, misturadas, o pH ajustado a 6,0 e a solução resultante filtrada. O volume foi ajustado para 40 ml e a preparação guardada no refrigerador sobre clorofórmio.

3.1.8. Solução de vitaminas.

ácido p-aminobenzóico	10 mg
piridoxina	50 mg
aneurina	50 mg
ácido nicotínico	100 mg
riboflavina	100 mg
biotina	0,2 mg
água destilada	100 ml

A solução foi esterilizada em banho maria por 15 minutos, repetindo-se a operação durante 3 dias, após os quais a solução foi guardada em frasco escuro, no refrigerador.

3.1.9. Solução de caseína (STARR, 1946)

A solução de caseína foi sempre adicionada ao meio mínimo em proporção tal que desse 0,5% de concentração final.

3.1.10. Soluções de aminoácidos (GARBER, 1954).

Foram preparadas soluções estoques com concentração de 10 mg/ml dos seguintes aminoácidos: histidina, prolina, ácido glutâmico, glutamina, isoleucina, lisina, cisteína, ácido aspártico, asparagina, valina, triptofano, fenilalanina, tirosina, arginina, serina, leucina, alanina, treonina, metionina e glicina.

Tais soluções foram diluídas para a concentração final de 30 mcg/ml de meio mínimo, no momento de serem ensaiados os mutantes.

As soluções estoques foram esterilizadas em vapor flu-

ente, durante 15 minutos.

3.2. Bactéria,

Foi usada uma linhagem de Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson, isolada de repólho (LEMOS, 1969) inoculado com uma mistura de linhagens de Xanthomonas campestris, isoladas de repólho e couve-flor de variedades locais (KIMOTO, 1968).

3.3. Curva de sobrevivência à luz ultra-violeta da linhagem de Xanthomonas campestris.

Foi utilizada uma cultura desenvolvida em 10 ml de meio completo líquido, por 72 horas, a 28°C. Tal cultura foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos; o sobrenadante foi desprezado e as células decantadas foram resuspensas em 10 ml de solução salina; essa operação foi repetida mais duas vezes. Da suspensão final, 5 ml foram adicionados a 5 ml de solução salina e determinada, então, a densidade óptica em colorímetro Coleman Junior. Em seguida, foram feitas diluições dessa suspensão, com a finalidade de se avaliar o número de células por mililitro da mesma, pipetando-se um volume conhecido para 9 ml de solução salina. Alíquotas de 0,1 ml das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas em placas de petri (3 placas para cada diluição) contendo meio de cultura completo. Este foi considerado o tempo zero de irradiação, ou seja, cultura não irradiada usada como controle. Em geral, 20 ml de meio de cultura foi usado em cada placa de petri de 9 cm de diâmetro na base; um espalhador de vidro, esterilizado em álcool e flambado foi usado para espalhar o inóculo sobre a superfície do meio de cultura.

A fonte de luz ultra-violeta foi uma lâmpada Mine-

ralight, modelo R-51, colocada a uma distância de 20 cm da suspensão de células da bactéria. Foram colocados 9 ml da suspensão em uma placa de petri e irradiados com agitação moderada no decorrer da irradiação. Os tempos de irradiação foram os seguintes: 10, 20, 30, 40 e 50 segundos. Depois de cada tempo de exposição foi tomada uma alíquota da suspensão e procedidas as diluições indicadas na tabela abaixo.

Relação dos tempos de irradiação e diluições empregadas.

Tempo de Irradiação (seg)			Diluições		
0			10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
10		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
20		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
30		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
40	 sd	10^{-1}	10^{-2}		
50	 sd	10^{-1}			

De cada diluição foi semeado 0,1 ml por placa (3 placas para cada diluição) contendo meio completo. Essas placas foram incubadas a 28°C por 72 horas. Após esse período, efetuou-se a contagem das colônias que se desenvolveram.

Por comparação entre o número de colônias do controle (tempo 0) e o número de colônias dos tratamentos, calculou-se a percentagem de sobrevivência nos diversos tempos de irradiação.

3.4. Isolamento de mutantes auxotróficos.

A obtenção de mutantes auxotróficos foi feita através de indução com luz ultravioleta (BRAUN, 1966) seguida pelo tra-

tamento com penicilina (DAVIS, 1948, e LEDERBERG e ZINDER, 1948). Este método é aplicável a todas as espécies de bactérias sensíveis à penicilina e se baseia no fato de que penicilina é bactericida para células em divisão. Quando uma população de prototróficos é colocada em meio mínimo contendo uma concentração bactericida de penicilina, a maior parte dos prototróficos será morta porque eles se dividem nesse meio; ao mesmo tempo, qualquer mutante auxotrófico presente não crescerá nesse meio, sobrevivendo apesar da presença da penicilina. Subsequente plaqueamento da população tratada pela penicilina em meio completo produz uma certa proporção de mutantes auxotróficos, o que pode ser verificado pela sua incapacidade de produzir crescimento em meio mínimo.

Foi utilizada uma cultura desenvolvida em 10 ml de meio completo líquido, por 72 horas, a 28°C. Essa cultura foi centrifugada seguindo o mesmo procedimento já descrito no item 3.3., com a finalidade de obter uma suspensão de células em solução salina. Tal suspensão foi, em seguida, medida colorimetricamente e diluída, afim de dar uma densidade óptica de 0,50 correspondente, neste caso, a 10^7 células por mililitro de solução, aproximadamente; essa relação entre densidade óptica e número de células por mililitro de suspensão foi obtida anteriormente através do desenvolvimento no item 3.3., para o tempo zero de irradiação.

Antes de se proceder à irradiação, 1 ml da suspensão foi transferido para um tubo de 9 ml de solução salina, procedendo-se à diluição adequada e semeando-se alíquotas de 0,1 ml em placas de petri contendo meio completo. Essas placas representaram o tempo zero de irradiação e serviram como controle.

Os 9 ml restantes de suspensão foram irradiados por 30 segundos, tomando-se o cuidado de manter a placa de petri com a

suspensão a 20 cm de distância da lâmpada U.V. e procedendo a uma agitação moderada no decorrer da irradiação. Dessa suspensão irradiada, alíquotas de 0,1 ml de diluições adequadas foram semeadas em placas de petri com meio completo, com a finalidade de se obter, por comparação com a suspensão não irradiada, a percentagem de sobrevivência à luz ultra-violeta.

Em seguida, amostras de 0,1 ml da suspensão irradiada foram transferidas para 10 tubos contendo 5 ml de meio mínimo adicionado de 500 mcg de penicilina por mililitro, os quais foram incubados a 28°C por aproximadamente 15 horas. Foi inoculado um tubo de meio mínimo sem penicilina como controle, a fim de se comparar apenas pela turvação o crescimento da amostra irradiada.

Após o período de incubação, foram semeadas 100 placas de petri contendo meio completo, cada qual com uma alíquota de 0,1 ml proveniente dos 5 tubos de meio mínimo mais penicilina; outras 100 placas foram semeadas com uma alíquota de 0,1 ml de uma diluição a 10^{-1} em solução salina de cada um dos cinco tubos. Essas placas foram incubadas por 96 horas a 28°C.

Em seguida, foram selecionadas as placas que apresentaram um crescimento de 30 a 100 colônias cada uma. A partir dessas placas foi desenvolvido o método da réplica (LEDERBERG e LE DERBERG, 1952). Esta técnica permite a transferência ou réplica das colônias de uma placa inicial para lugares correspondentes em uma série de outras placas. A transferência é feita com o auxílio de um pedaço de veludo esterilizado, o qual é colocado em um bloco de madeira cujo diâmetro é pouco menor que o da placa de petri; com um elástico prende-se o tecido ao bloco. As colônias da placa inicial são transferidas ao veludo, invertendo-se a placa sobre ele; o veludo irá servir como modelo para inocular outras placas. O lugar de crescimento das colônias nas pla-

cas inoculadas irá corresponder, uma vez que as células de cada colônia da placa inicial são transferidas para as que são inoculadas sem modificação dos seus lugares.

Dessa maneira, as colônias de uma mesma placa foram replicadas para uma placa contendo meio mínimo e para uma placa contendo meio completo.

Após incubação apropriada, as placas correspondentes, replicadas em meio mínimo e em meio completo, foram comparadas em relação ao crescimento das colônias. Colônias crescidas em meio completo e que não apresentaram crescimento no meio mínimo, foram transferidas do meio completo para tubos de meio completo inclinado. Após desenvolvimento a 28°C por 96 horas, tais culturas foram inoculadas em tubos com meio mínimo líquido. A linhagem de X. campestris selvagem ou normal foi também inoculada em meio mínimo. Após incubação desses tubos na temperatura e tempo adequados, foi feita a observação do crescimento ou não da cultura, pela turvação do meio e comparando tal turvação com o crescimento apresentado pela linhagem selvagem. Foram selecionadas, então, culturas que não apresentaram crescimento no meio mínimo, procedendo-se a seguir à caracterização dessas prováveis linhagens mutantes em relação a sua deficiência nutricional.

3.5. Caracterização dos mutantes isolados.

O requerimento nutricional específico dos mutantes foi caracterizado de acordo com PONTECORVO (1953).

A linhagem considerada como possível mutante foi inoculada em tubos com meio mínimo líquido adicionado de um dos seguintes suplementos nutricionais: a) caseína hidrolizada, a qual permitiria o crescimento se o mutante requeresse um aminoá

cido específico; b) uma mistura de vitaminas que permitiria o crescimento, se uma dessas vitaminas fôsse requerida; c) ácido nucleico de levedura que iria satisfazer os requerimentos nutricionais para purinas e pirimidinas.

Uma vez detectada a exigência da linhagem mutante para qualquer um desses grandes grupos de substâncias, passou-se à caracterização dos requerimentos específicos.

Como a totalidade das linhagens apresentou resposta à caseína hidrolizada, foram então ensaiados individualmente os aminoácidos citados no item 3.1.10.. Cada uma das linhagens mutantes foi desenvolvida em meio completo líquido por 96 horas; em seguida foi centrifugada e lavada duas vezes e resuspensa em igual volume de solução salina. Dessa suspensão semeou-se 0,1 ml em meio mínimo líquido e 0,1 ml em meio mínimo adicionado de um aminoácido, numa concentração final de 30 mcg por mililitro de meio de cultura. O mesmo procedimento foi seguido para todas as linhagens em questão.

3.6. Curva de crescimento de três mutantes específicos frente a diferentes concentrações do aminoácido respectivo.

Dos mutantes isolados e caracterizados em relação a sua deficiência bioquímica, somente três deles foram usados para dar prosseguimento ao proposto neste trabalho.

Assim, três linhagens mutantes, tomadas ao acaso, deficientes, respectivamente, para glicina, histidina e arginina, foram a seguir ensaiadas em relação ao seu crescimento em meio mínimo com diferentes concentrações do aminoácido respectivo.

Cada linhagem mutante foi desenvolvida em 10 ml de meio completo líquido, por 96 horas a 28°C. Após esse tempo, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos e resus-

pensas em 10 ml de solução salina; esse procedimento foi repetido três vezes. De cada uma das suspensões finais em solução salina, foram retiradas alíquotas de 0,1 ml que serviram como inóculo para tubos contendo 10 ml de meio mínimo adicionado das respectivas soluções de aminoácidos, para os quais eram deficientes, nas seguintes concentrações finais: 0,0, 5,0, 20,0, 50,0, 100,0 e 200,0 mcg por mililitro de meio mínimo. Como controle foi inoculado, de cada mutante, um tubo contendo meio mínimo sem adição de aminoácido.

O crescimento das linhagens inoculadas foi medido por densidade óptica. Após a inoculação, foi feita a primeira leitura, que corresponde a zero horas de crescimento. As outras leituras foram feitas nos seguintes tempos: 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas.

O mesmo procedimento foi seguido, usando-se a linhagem de X. campestris selvagem, inoculada da mesma maneira em meio mínimo adicionado dos respectivos aminoácidos, para os quais os mutantes eram deficientes. As leituras foram feitas nos mesmos intervalos de tempo.

3.7. Hospedeiro.

Foram utilizadas sementes de repólho do híbrido Natsu maki Risô, cedidas pelo Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

O hospedeiro foi sempre cultivado em uma mistura formada de uma parte de terra rôxa e uma parte de esterco de curral peneirado; serviu como cobertura outra parte de esterco peneirado.

Foram utilizados vasos de barro com as dimensões 18 cm de comprimento x 18 cm de largura x 6 cm de altura.

As misturas de solo e esterco e os vasos foram sempre esterilizados em autoclave a 120°C durante 2 horas, com bastante antecedência a sua utilização.

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

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

Afim de fornecer uma atmosfera úmida, foi feita uma cobertura das plântulas, 24 horas antes da inoculação, com um filme de polietileno, o qual foi amarrado firmemente ao redor do vaso (DYE, 1958). Os vasos foram abundantemente irrigados antes da colocação do polietileno.

3.8. Avaliação da patogenicidade das linhagens mutantes "in vitro".

3.8.1. Inoculação de tecido de planta com bactéria crescida em diferentes doses do aminoácido respectivo.

As linhagens mutantes para glicina, arginina e histidina e a linhagem selvagem foram crescidas a 28°C por 96 horas, em meio mínimo líquido adicionado de glicina, arginina e histidina, respectivamente, nas seguintes concentrações finais: 0,0, 5,0, 20,0, 50,0 e 100,0 mcg por mililitro de meio.

Fôlhas das plantas de repôlho foram cortadas com o auxílio de um perfurador de cortiça esterilizado, sendo que os discos de fôlhas obtidos tiveram sempre um centímetro de diâmetro. Estes foram mergulhados em uma solução de hipoclorito de

sódio a 20,0%, durante cinco minutos (GARBER, SHAEFFER e GOLDMAN, 1956); em seguida foram lavados três vezes com água destilada.

A inoculação dos discos de fôlhas foi feita pelo método da injeção, usando-se um inoculador de agulhas múltiplas (ANDRUS, 1948). O inoculador foi feito montando-se 20 alfinetes entomológicos nº 0, dispostos separadamente, em um pedaço de cortiça de 1,5 cm de diâmetro. O disco de fôlha foi então colocado sobre uma esponja esterilizada (contida em uma placa de petri) embebida da suspensão bacteriana a ser inoculada. O inoculador foi pressionado sobre a superfície do disco de fôlha, perfurando-a e penetrando na esponja saturada da suspensão da bactéria. Após inoculação de cada disco, o mesmo foi colocado em placa de petri contendo meio mínimo sólido. Foram colocados 3 discos por placa e feitas 3 repetições, para cada diferente dose de aminoácido usado, para cada mutante.

Como controle, procedeu-se à inoculação de discos de fôlhas com a bactéria selvagem, fazendo-se também 3 repetições.

As leituras foram feitas no 5º e 7º dias.

3.8.2. Inoculação de tecido de planta com bactéria e posterior suplementação com solução de 100,0 mcg/ml do aminoácido respectivo.

As linhagens mutantes para glicina, arginina, histidina e a linhagem selvagem foram crescidas a 28°C por 96 horas, em 10 ml de meio completo líquido. Foram então centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos e resuspensas em 10 ml de solução salina; esse procedimento foi repetido três vezes.

Cada uma das suspensões dessas bactérias foi usada para a inoculação por injeção em discos de fôlhas, da maneira descrita no ítem anterior. Foram colocados 3 discos por placa e

feitas 3 repetições, para cada mutante.

Após inoculação foi feita suplementação de aminoácido com o auxílio de uma pipeta, colocando-se 0,1 ml de cada solução de aminoácido, sobre os discos inoculados com os mutantes glicina, arginina e histidina, respectivamente. Tal suplementação foi feita 2 vezes, uma logo após a inoculação e a outra 24 horas depois. A concentração das soluções dos aminoácidos usados foi sempre 1000,0 mcg/ml.

Da mesma maneira foram inoculados discos de fôlhas com as três linhagens mutantes com 3 repetições, não se fazendo, entretanto, a suplementação.

Procedeu-se também à inoculação com a bactéria selvagem, com 3 repetições.

As leituras foram feitas no 5º e 7º dias.

3.8.3. Inoculação de tecido de planta com bactéria e posterior suplementação com diferentes doses do aminoácido respectivo.

A obtenção de inóculos das linhagens mutantes e selvagem e a inoculação seguiram o procedimento descrito no item anterior. A suplementação também foi feita da mesma maneira, porém as concentrações das soluções de glicina, arginina e histidina foram as seguintes: 0,0, 5,0, 20,0, 50,0 e 100,0 mcg/ml. Para cada diferente dose de aminoácido com a qual foi feita a suplementação, foram feitas 3 repetições para cada mutante.

O mesmo foi seguido para igual número de discos inoculados, não se fazendo, porém, a suplementação.

Procedeu-se também à inoculação com bactéria selvagem, com 3 repetições.

As leituras foram feitas no 5º e 7º dias.

3.9. Avaliação da patogenicidade das linhagens mutantes "in vivo".

3.9.1. Inoculação de plântulas com bactéria crescida em diferentes doses do aminoácido respectivo.

Sementes de repólho híbrido Natsumaki Risô sofreram o tratamento e semeadura descritos no item 3.7.. Após germinação, as plântulas defeituosas foram eliminadas e um desbaste foi feito para reduzir o número de plântulas para 20, em cada vaso.

Os inóculos das bactérias mutantes foram preparados repicando-as, respectivamente, em 250 ml de meio mínimo líquido com suplementação apropriada de aminoácido e incubando-as a 28°C por 96 horas. A seguir, procedeu-se à inoculação foliar por injeção, de acordo com o já descrito no item 3.8.1., porém inoculando-se, agora, as duas primeiras fôlhas de cada plântula. Antes e depois da inoculação as plântulas foram mantidas em condição de câmara úmida por 24 horas. As plântulas permaneceram na casa de vegetação por vinte dias, quando então foi feita a avaliação da severidade da doença.

Os inóculos utilizados foram: a) culturas dos mutantes glicina, arginina e histidina em meio mínimo líquido suplementado das seguintes concentrações dos aminoácidos respectivos: 0,0, 5,0, 20,0, 50,0 e 100,0 mcg por mililitro de meio; para cada uma dessas culturas foram inoculadas 60 plântulas (3 vasos) para cada concentração; b) culturas dos mutantes em meio mínimo líquido, sendo inoculadas plântulas em igual número; c) cultura da bactéria selvagem em meio mínimo líquido, sem suplementação de aminoácido, sendo inoculadas plântulas em igual número.

3.9.2. Inoculação de plântulas com bactéria e posterior suplementação com solução de 100,0 mcg/ml do aminoácido respectivo.

As plântulas de repólho foram obtidas da maneira descrita no item 3.9.1..

Os inóculos das bactérias mutantes e selvagem foram preparados repicando-as, respectivamente, em 250 ml de meio completo e incubando-as a 28°C por 96 horas. Essas culturas foram centrifugadas e lavadas duas vezes e resuspensas em igual volume de solução salina. Cada suspensão foi inoculada, por injeção, nas fôlhas de 60 plântulas (3 vasos) submetidas às condições de câmara úmida por 24 horas, antes e após inoculação. Em seguida, procedeu-se à pulverização de soluções de glicina, arginina e histidina, na concentração de 100,0 mcg por mililitro de água destilada, nas plântulas inoculadas, respectivamente, com mutantes glicina, arginina e histidina e com a bactéria selvagem. Essa pulverização foi feita três vezes com intervalos de 24 horas; as plântulas permaneceram em condição de câmara úmida enquanto durou o processo de suplementação com aminoácidos, depois do que foram conservadas em casa de vegetação por 20 dias.

Inoculou-se igual número de plântulas com essas mesmas linhagens, não se fornecendo, entretanto, suplementação dos aminoácidos.

3.9.3. Inoculação de plântulas com bactéria e posterior suplementação com diferentes doses do aminoácido respectivo.

As plântulas de repólho foram obtidas da maneira descrita no item 3.9.1..

Os inóculos das bactérias mutantes e selvagem foram preparados da maneira descrita no item 3.9.2.. Procedeu-se à

inoculação por injeção foliar, da maneira descrita no ítem anterior. Em seguida, procedeu-se à pulverização de soluções de glicina, arginina e histidina nas seguintes concentrações: 0,0, 5,0, 20,0, 50,0 e 100,0 mcg por mililitro de água destilada, nas plântulas inoculadas com mutantes de glicina, arginina e histidina, respectivamente e com a bactéria selvagem. Essa pulverização foi feita três vezes com intervalos de 24 horas; as plântulas permaneceram em condição de câmara úmida enquanto durou o processo de suplementação com aminoácidos, depois do que foram conservadas em casa de vegetação por 20 dias. Foram inoculadas 60 plântulas (3 vasos) para cada dose de cada linhagem mutante e da bactéria selvagem. Igual número de plântulas foram inoculadas da mesma maneira, não se fornecendo, entretanto, suplementação de aminoácidos.

3.10. Método de avaliação da severidade da doença.

Para a avaliação das plantas doentes, as leituras foram efetuadas 20 dias após a inoculação. Foram consideradas: plantas não atacadas e plantas atacadas pela doença. Plantas não atacadas ou sadias não apresentaram sintomas externos ou internos observáveis nas folhas ou no caule cortado na altura do primeiro internódio. Plantas atacadas apresentaram-se mortas ou com sintomas externos e internos da doença.

3.11. Reisolamento e caracterização das bactérias mutantes.

Após a avaliação da severidade da doença nos diversos tratamentos, procedeu-se ao reisolamento e caracterização dos patógenos anteriores inoculados. Foram tomadas ao acaso 10 plantas doentes de cada tratamento.

O isolamento foi feito seguindo o método indicado por DOWSON (1957). As hastes ou as nervuras das folhas de repolho com sintomas da doença foram desinfetadas superficialmente por flambagem. O córtex foi removido em seguida e um pequeno pedaço do tecido foi retirado da região dos vasos e transferido para um tubo com 2 ml de água destilada esterilizada, para obtenção da suspensão bacteriana. Depois de 20 a 30 minutos, uma alça da suspensão foi semeada numa pequena área de uma placa de petri contendo meio de Yeastrel; sem flambar a alça, estrias foram feitas em outras áreas desse meio de cultura contido na placa, a qual foi incubada a 28°C durante 72 horas. As colônias crescidas foram purificadas pelo método da diluição em série (PELCZAR e REID, 1965); colônias purificadas foram semeadas em meio completo inclinado e incubadas a 28°C, por 96 horas.

Dessa maneira, foram reisoladas para cada tratamento 10 linhagens de cada um dos mutantes auxotróficos inoculados nas plântulas. A etapa seguinte foi a caracterização desses isolados; a partir de cada cultura em meio inclinado foi feita uma suspensão de células em solução salina; alíquotas de 0,1 ml de cada suspensão foram semeadas em meio mínimo líquido, meio mínimo líquido adicionado do aminoácido para o qual a linhagem era anteriormente deficiente, numa concentração final de 30 mcg por mililitro de meio, e em meio completo. Assim, foi verificado pelo crescimento ou não nesses meios, se os mutantes para glicina, histidina e arginina guardavam, após a inoculação em plântulas e desenvolvimento da doença, suas características auxotróficas.

3.12. Método estatístico.

A análise estatística do ataque das linhagens de bacté

rias aos discos de fôlhas e às plântulas de repôlho, foi feita aplicando o teste χ^2 (STELL e TORRIE, 1960). Este método de análise visou testar a hipótese de que não há diferença entre as percentagens de plântulas atacadas, nos diversos estágios do trabalho. A significância foi constatada usando a tabela de limites unilaterais de χ^2 (PIMENTEL GOMES, 1970).

A partir do χ^2 calculado, foi feito o desdobramento, visando testar a natureza linear das linhas de regressão que relacionam a percentagem de plântulas atacadas com as dosagens. Deste processo resulta um χ^2 relativo ao efeito linear e um χ^2 para os desvios de regressão (STELL e TORRIE, 1960).

4. RESULTADOS.

4.1. Sobrevivência à luz ultravioleta da linhagem de Xanthomonas campestris.

As percentagens de sobrevivência após irradiação de células da linhagem de Xanthomonas campestris são dadas no quadro I. A curva de sobrevivência é dada na figura 1.

Quadro I - Percentagem de sobreviventes de células da linhagem de Xanthomonas campestris.

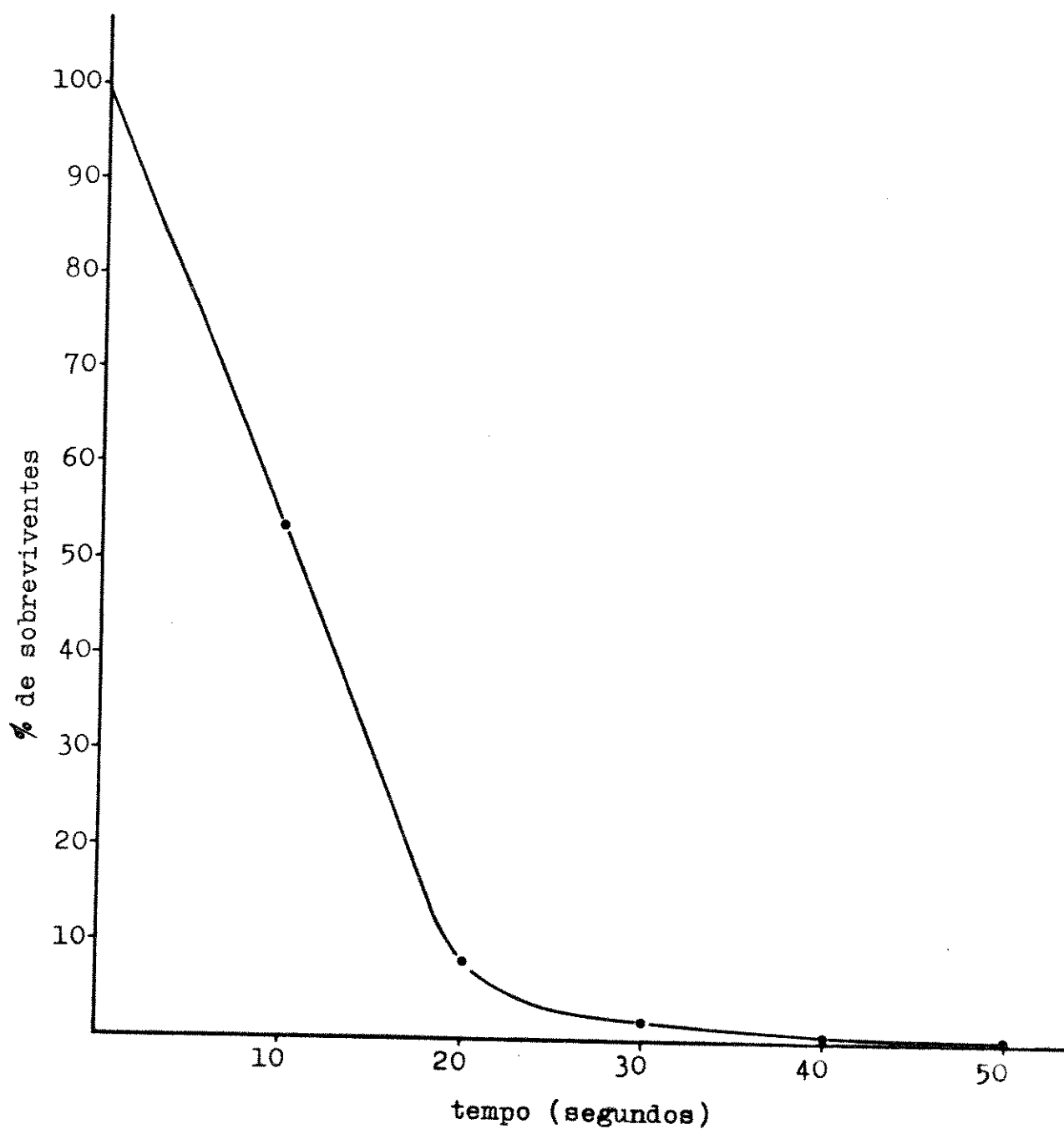
Tempo (segundos)	Nº de sobreviventes (células/ml)	% de sobreviventes
0	$1,93 \times 10^7$	100,00
10	$1,03 \times 10^7$	53,36
20	$1,66 \times 10^6$	8,60
30	$3,93 \times 10^5$	2,03
40	$6,66 \times 10^4$	0,34
50	$2,15 \times 10^3$	0,01

4.2. Isolamento e caracterização dos mutantes auxotróficos.

A população de bactérias exposta à luz ultravioleta por 30 segundos, a partir da qual foram isolados os mutantes, foi de $3,12 \times 10^7$ células por mililitro. Após a irradiação essa população foi de $7,58 \times 10^3$ células por mililitro, correspondendo a 2,43% de sobreviventes.

Os resultados da réplica de 1712 colônias em meio completo e meio mínimo permitiram separar, com base nas diferenças de crescimento nos dois meios, doze culturas apontadas no qua-

Figura 1 - Curva de sobrevivência de Xanthomonas campestris frente à luz ultravioleta (média de três repetições)



dro II. No mesmo quadro, encontram-se os resultados do auxonograma inicial a que foram submetidas essas culturas. No quadro III, encontram-se os resultados do auxonograma final, que nos permitiu caracterizar os requerimentos nutricionais específicos desses mutantes isolados.

A frequência de mutação, pelo método usado, foi de 0,70%.

Quadro II - Culturas mutantes, resultantes de irradiação U.V. e tratamento com penicilina. Auxonograma inicial.

Culturas mutantes	Meio completo	Meio mínimo	Sol. de caseína	Sol. de vitamina	Sol. de ac. nucleicos
1	+	-	+	-	-
2	+	-	+	-	-
3	+	-	+	-	-
4	+	-	+	-	-
5	+	-	+	-	-
6	+	-	+	-	-
7	+	-	+	-	-
8	+	-	+	-	-
9	+	-	+	-	-
10	+	-	+	-	-
11	+	-	+	-	-
12	+	-	+	-	-

+ = crescimento

- = não crescimento

Quadro III - Culturas mutantes. Auxonograma final

Culturas mutantes	Requerimento nutricional
1	histidina
2	cisteína
3	fenilalanina
4	arginina
5	histidina
6	cisteína
7	cisteína
8	arginina
9	glicina
10	treonina
11	glicina
12	cisteína

Portanto, foram obtidos: 4 mutantes para cisteína, 2 para histidina, 2 para arginina, 2 para glicina, 1 para fenilalanina e 1 para treonina.

4.3. Curva de crescimento dos mutantes glicina, arginina e histidina.

Os quadros IV, V e VI mostram os resultados do crescimento em meio mínimo sem suplementação e suplementado com diversas doses dos aminoácidos respectivos, dos mutantes para arginina, histidina e glicina, obtidos através de medida da densidade óptica.

Os quadros VII, VIII e IX mostram os resultados do crescimento em meio mínimo sem suplementação e suplementado com

diversas doses dos aminoácidos arginina, histidina e glicina, da linhagem de Xanthomonas campestris selvagem.

As figuras 2, 3 e 4 mostram alguns dos resultados expressos através de curvas de crescimento.

Quadro IV - Densidade óptica do crescimento do mutante arginina frente a diversas doses de arginina.

Horas mcg/ml	0	24	48	72	96	120	144
0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
5	0,01	0,02	0,04	0,08	0,08	0,08	0,08
20	0,02	0,04	0,09	0,18	0,23	0,23	0,23
50	0,02	0,05	0,11	0,23	0,30	0,30	0,30
100	0,02	0,06	0,18	0,30	0,40	0,40	0,40
200	0,02	0,06	0,18	0,30	0,40	0,40	0,40

Quadro V - Densidade óptica do crescimento do mutante histidina frente a diversas doses de histidina.

Horas mcg/ml	0	24	48	72	96	120	144
0	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
5	0,02	0,02	0,04	0,06	0,06	0,06	0,06
20	0,02	0,03	0,07	0,14	0,20	0,20	0,20
50	0,02	0,04	0,10	0,20	0,30	0,30	0,30
100	0,02	0,05	0,15	0,30	0,38	0,38	0,38
200	0,02	0,05	0,17	0,30	0,38	0,38	0,38

Quadro VI - Densidade óptica do crescimento do mutante glicina frente a diversas doses de glicina.

Horas mcg/ml	0	24	48	72	96	120	144
0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
5	0,01	0,03	0,07	0,10	0,13	0,13	0,13
20	0,01	0,04	0,10	0,20	0,28	0,28	0,28
50	0,01	0,05	0,15	0,30	0,36	0,36	0,36
100	0,01	0,07	0,20	0,34	0,45	0,45	0,45
200	0,01	0,07	0,23	0,34	0,45	0,45	0,45

Quadro VII - Densidade óptica do crescimento de Xantho monas campestris frente a diversas doses de arginina.

Horas mcg/ml	0	24	48	72	96	120	144
0	0,01	0,05	0,25	0,35	0,35	0,35	0,35
5	0,01	0,08	0,25	0,40	0,40	0,40	0,40
20	0,01	0,10	0,30	0,45	0,45	0,45	0,45
50	0,01	0,18	0,35	0,50	0,50	0,50	0,50
100	0,01	0,20	0,38	0,50	0,50	0,50	0,50
200	0,01	0,20	0,38	0,50	0,50	0,50	0,50

Quadro VIII - Densidade óptica do crescimento de Xanthomonas campestris frente a diversas doses de histidina.

Horas mcg/ml	0	24	48	72	96	120	144
0	0,02	0,06	0,25	0,34	0,34	0,34	0,34
5	0,02	0,08	0,25	0,40	0,40	0,40	0,40
20	0,02	0,10	0,30	0,45	0,45	0,45	0,45
50	0,02	0,15	0,35	0,45	0,45	0,45	0,45
100	0,02	0,18	0,40	0,50	0,50	0,50	0,50
200	0,02	0,18	0,40	0,50	0,50	0,50	0,50

Quadro IX - Densidade óptica do crescimento de Xanthomonas campestris frente a diversas doses de glicina.

Horas mcg/ml	0	24	48	72	96	120	144
0	0,01	0,06	0,20	0,35	0,35	0,35	0,35
5	0,01	0,10	0,25	0,48	0,48	0,48	0,48
20	0,01	0,10	0,30	0,50	0,50	0,50	0,50
50	0,01	0,20	0,30	0,55	0,55	0,55	0,55
100	0,01	0,19	0,45	0,55	0,55	0,55	0,55
200	0,01	0,25	0,35	0,55	0,55	0,55	0,55

Figura 2 - Curvas de crescimento do mutante deficiente para arginina e da linhagem selvagem, frente a diversas concentrações de arginina.

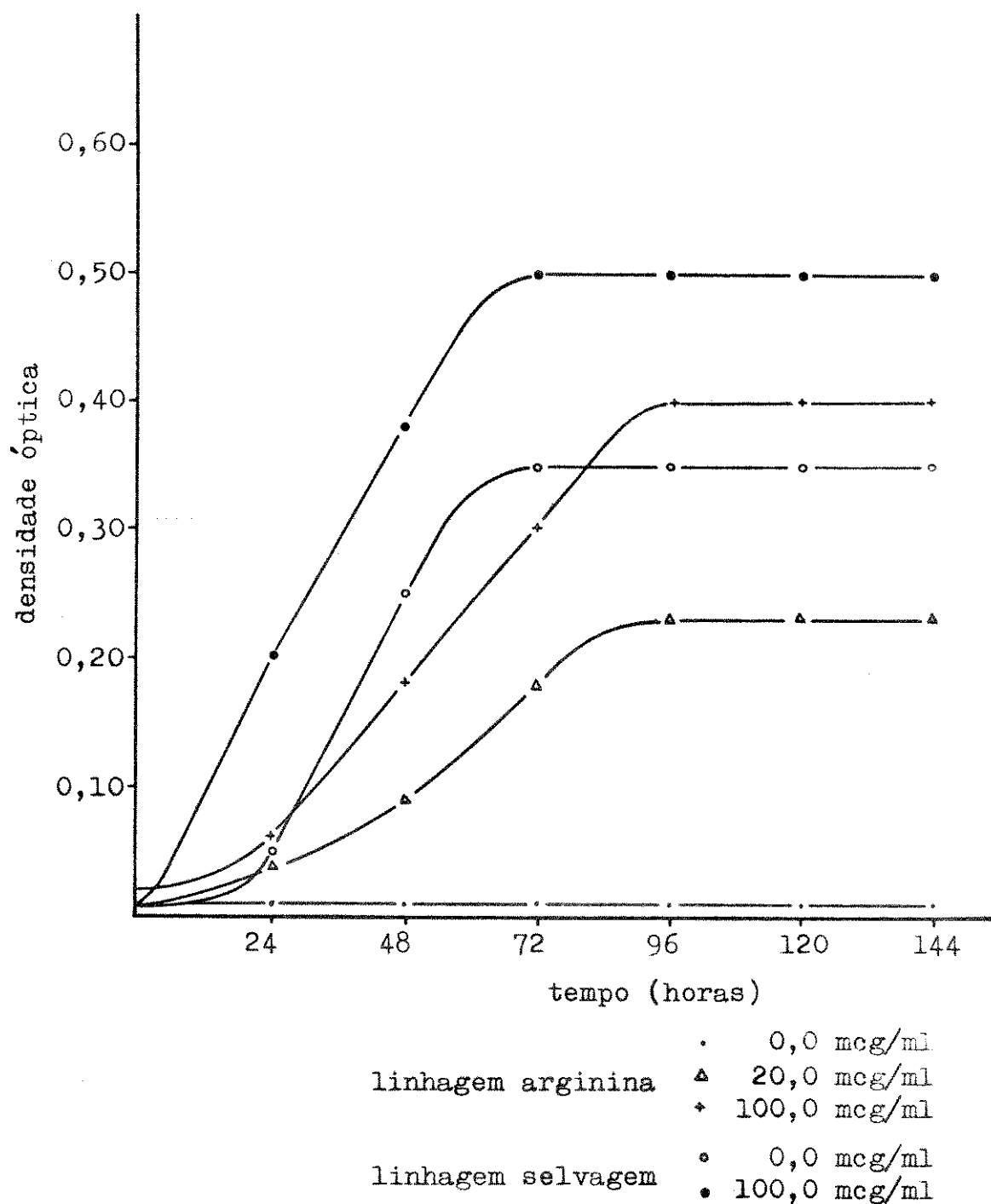


Figura 3 - Curvas de crescimento do mutante deficiente para histidina e da linhagem selvagem, frente a diversas concentrações de histidina.

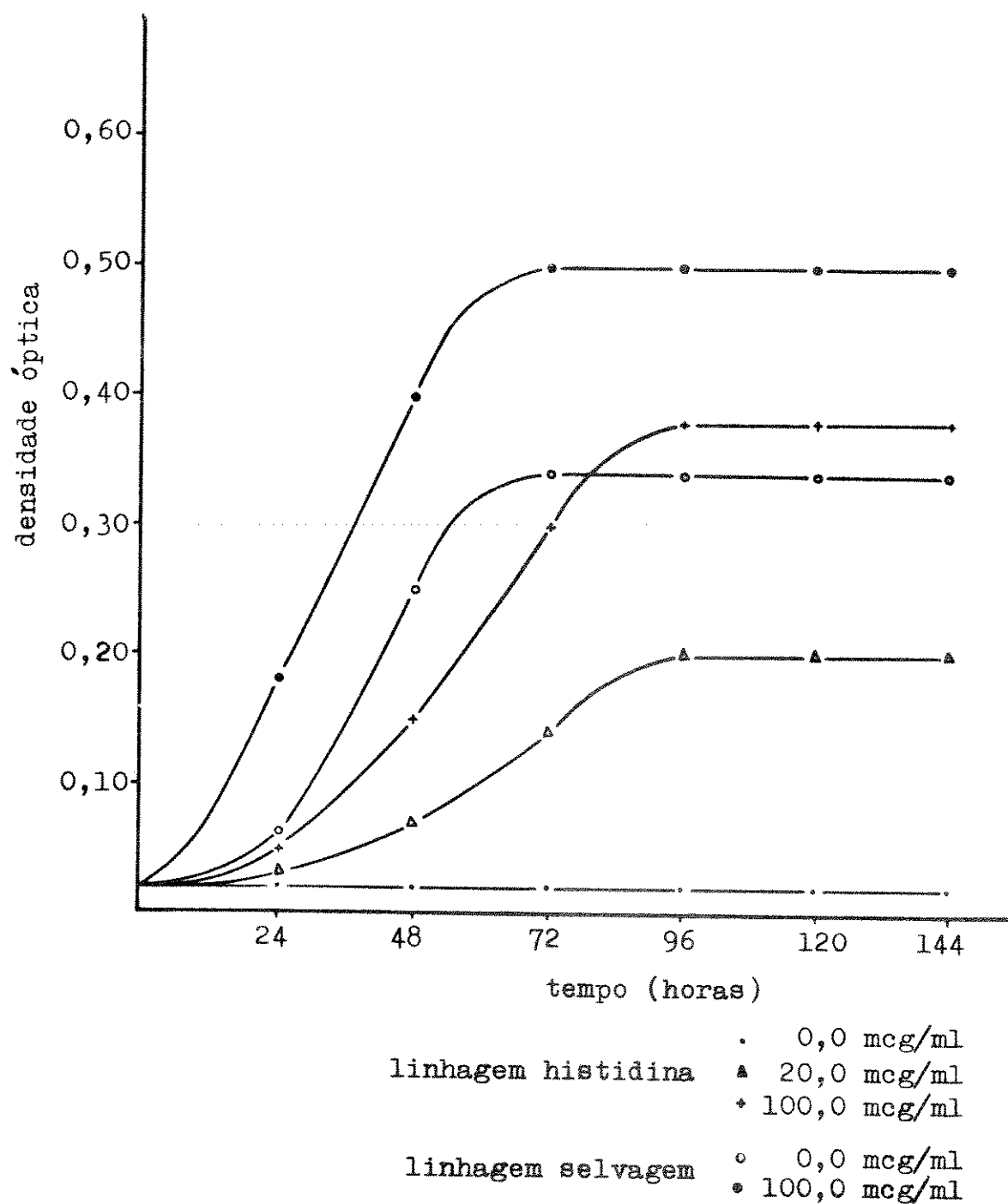
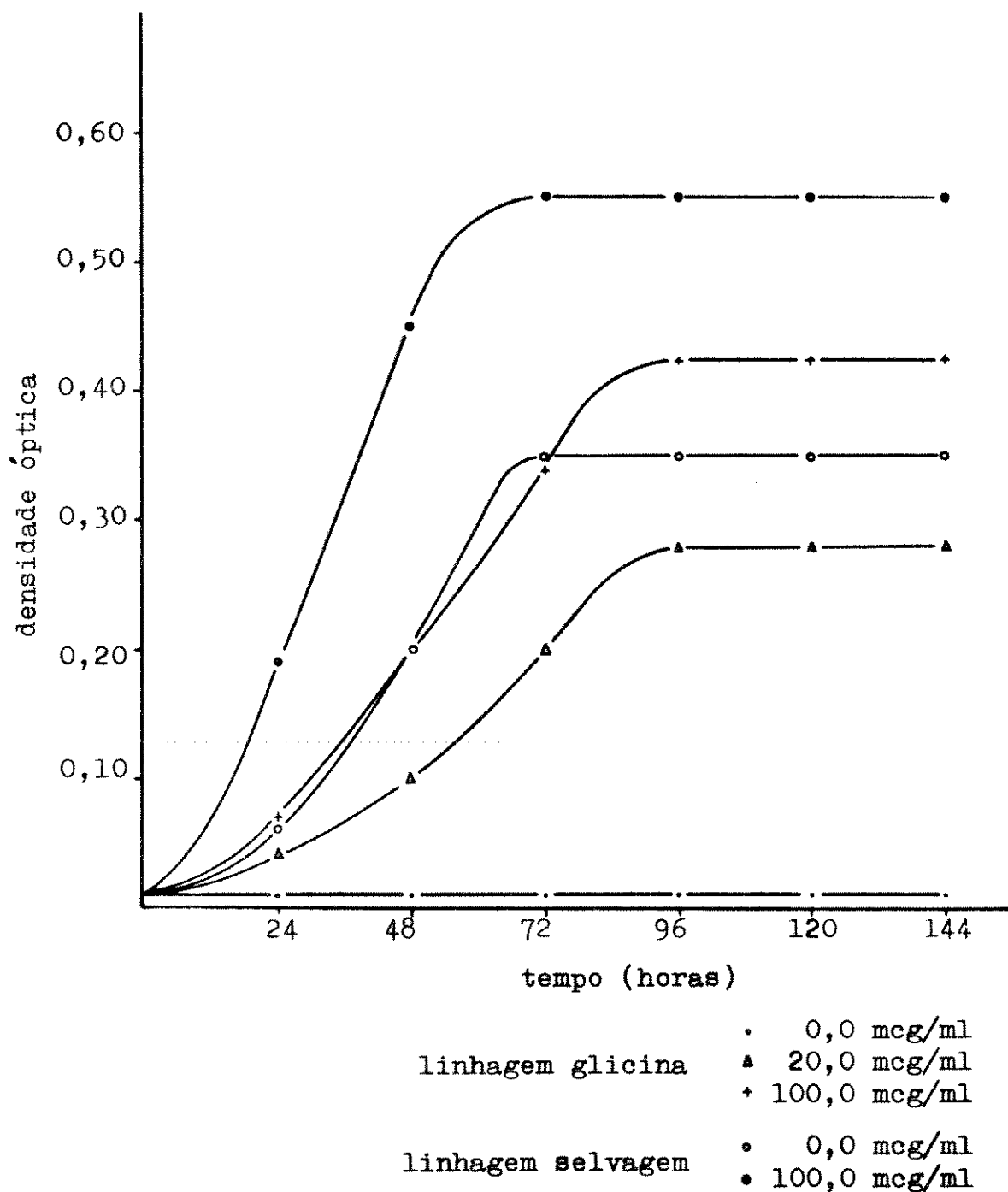


Figura 4 - Curvas de crescimento do mutante deficiente para glicina e da linhagem selvagem, frente a diversas concentrações de glicina.



4.4. Avaliação da patogenicidade das linhagens mutantes "in vitro".

4.4.1. Inoculação de tecido de planta com bactéria crescida em meio de cultura com diferentes doses do aminoácido respectivo.

Os resultados apresentados no quadro X mostram o número de discos de folhas que desenvolveram a doença e as percentagens correspondentes. Os dados obtidos com suplementação de 0,0, 5,0 e 20,0 mcg do aminoácido respectivo por mililitro de meio, foram agrupados em < 50 e com suplementação de 50,0 e 100,0 mcg/ml foram agrupados em ≥ 50 .

Os testes χ^2 realizados para testar as diferenças entre as percentagens de discos de folhas atacadas, indicam o seguinte: não significância para a diferença dentro da linhagem arginina ($\chi^2 = 3,75$); significância ao nível de 5,0% de probabilidade para a diferença dentro da linhagem histidina ($\chi^2 = 6,59$); e significância ao nível de 1,0% de probabilidade para a diferença dentro da linhagem glicina ($\chi^2 = 6,69$). Os mesmos testes, aplicados para a linhagem selvagem recebendo as mesmas doses de suplementação, de cada um dos aminoácidos, não mostraram significância.

Na comparação do comportamento de cada linhagem mutante com a linhagem selvagem, para os valores dos tratamentos com suplementação igual e superior a 50,0 mcg/ml, os χ^2 mostraram diferença significativa ao nível de 1,0% de probabilidade para as três linhagens mutantes ensaiadas: arginina $\chi^2 = 13,48$; histidina $\chi^2 = 11,11$ e glicina $\chi^2 = 9,75$.

Quadro X - Inoculação de discos de folhas de repólho com bactéria crescida em meio com diferentes doses do aminoácido respectivo.

Linhagem de bactéria	Suplementação mcg/ml de meio	Total de discos	Discos atacados	%	χ^2
Mutante Arginina	< 50	27	1	3,7	3,75 ns
	$\geq$ 50	18	4	22,2	
Arginina					
Selvagem	< 50	27	22	81,5	0,02 ns
	$\geq$ 50	18	15	83,3	
Mutante Histidina	< 50	27	0	0,0	6,59 ⁺
	$\geq$ 50	18	4	22,2	
Histidina					
Selvagem	< 50	27	21	77,8	0,00
	$\geq$ 50	18	14	77,8	
Mutante Glicina	< 50	27	2	7,4	6,69 ⁺⁺
	$\geq$ 50	18	7	38,9	
Glicina					
Selvagem	< 50	27	22	81,5	0,46 ns
	$\geq$ 50	18	16	88,9	

+ = significativo ao nível de 5%

++ = significativo ao nível de 1%

ns = não significativo

4.4.2. Inoculação de tecido de planta com bactéria e posterior suplementação com solução de 100,0 mcg/ml do aminoácido respectivo.

Os resultados apresentados no quadro XI mostram o número de discos de folhas que desenvolveram a doença e as percentagens correspondentes.

Quadro XI - Inoculação de discos de fôlhas de repôlho com bactéria e posterior suplementação com solução de 100,0 mcg/ml do aminoácido respectivo.

Linhagem de bactéria	Com Suplementação				Sem Suplementação		
	total de discos	discos atac.	%	X^2	total de discos	discos atac.	%
Mutante Arginina	18	10	55,5		18	0	0,0
Mutante Histidina	18	8	44,4	1,05 ns	18	0	0,0
Mutante Glicina	18	11	61,1		18	0	0,0
Selvagem	18	17	94,4		18	16	88,9

ns = não significativo

Os testes X^2 realizados para comparar as percentagens obtidas de discos de fôlhas atacados pelas três linhagens mutantes não mostraram significância ($X^2 = 1,05$). Mostraram significância os resultados dos testes X^2 entre cada linhagem mutante com a linhagem selvagem (mutante arginina x selvagem, $X^2 = 7,26^{++}$; mutante histidina x selvagem, $X^2 = 10,60^{++}$; mutante glicina x selvagem, $X^2 = 5,78^+$).

Nos tratamentos sem suplementação não houve crescimento de nenhuma das linhagens mutantes. A linhagem selvagem desenvolveu-se normalmente.

4.4.3. Inoculação de tecido de planta com bactéria e posterior suplementação com diferentes doses do aminoácido respectivo.

Os resultados apresentados no quadro XII mostram o número de discos de fôlhas que desenvolveram a doença e as percentagens correspondentes. Os dados obtidos com suplementação de 0,0, 5,0 e 20,0 mcg do aminoácido respectivo, foram agrupados em <50 e com suplementação de 50,0 e 100,0 mcg, foram agrupados em ≥ 50 .

Os testes X^2 das comparações entre as percentagens de ataque aos discos de fôlhas, para os tratamentos com suplementação inferior a 50 mcg/ml e para os tratamentos com suplementação igual e superior a 50 mcg/ml, apresentaram diferença significativa ao nível de 1,0% de probabilidade: arginina $X^2 = 15,73$; histidina $X^2 = 12,44$ e glicina $X^2 = 15,00$. Os mesmos testes aplicados para a linhagem selvagem, recebendo as mesmas doses de suplementação de cada um dos aminoácidos, não mostraram significância.

Na comparação do comportamento de cada linhagem mutante com a linhagem selvagem, para os tratamentos com suplementação igual e superior a 50 mcg/ml, os testes X^2 foram significativos ao nível de 5% de probabilidade para selvagem x arginina ($X^2 = 4,99$) e selvagem x glicina ($X^2 = 4,42$). A comparação selvagem x histidina mostrou significância ao nível de 1,0% de probabilidade ($X^2 = 9,75$).

Nos tratamentos sem suplementação não houve crescimento de nenhuma das linhagens mutantes. A linhagem selvagem desenvolveu-se normalmente.

Quadro XIII - Inoculação de discos de fôlhas de repôlho com bactéria e posterior suplementação com diferentes doses de aminoácido.

Linhagem de bactéria	Suplementação mcg/ml de meio	total de discos	discos atac.	%	χ^2
Mutante Arginina	arginina < 50	27	1	3,7	15,73 ⁺⁺
	≥ 50	18	10	55,5	
	- -	27	0	0,0	
	- -	18	0	0,0	
Selvagem	arginina < 50	27	24	88,9	0,0
	≥ 50	18	16	88,9	
	- -	27	23	85,2	0,04
	- -	18	15	83,3	
Mutante Histidina	histidina < 50	27	0	0,0	12,44 ⁺⁺
	≥ 50	18	7	38,9	
	- -	27	0	0,0	0,0
	- -	18	0	0,0	
Selvagem	histidina < 50	27	23	85,2	0,13
	≥ 50	18	16	88,9	
	- -	27	22	81,5	0,09
	- -	18	14	77,8	
Mutante Glicina	glicina < 50	27	3	11,1	15,00 ⁺⁺
	≥ 50	18	12	66,7	
	- -	27	0	0,0	0,0
	- -	18	0	0,0	
Selvagem	glicina < 50	27	25	92,6	0,06
	≥ 50	18	17	94,4	
	- -	27	25	92,6	0,18
	- -	18	16	88,9	

- = sem suplementação ++ = significativo ao nível de 1,0%

4.5. Avaliação da patogenicidade das linhagens mutantes "in vivo".

4.5.1. Inoculação de plântulas com bactéria crescida em meio de cultura com diferentes doses do aminoácido do respectivo.

Os resultados dos níveis de patogenicidade das linhagens mutantes ensaiadas, encontram-se no Quadro XIII. Mostram o número de plântulas atacadas, com a percentagem correspondente a cada dose.

Os χ^2 para as diferenças entre as percentagens de plântulas atacadas, nas doses de 0,0, 5,0, 20,0, 50,0 e 100,0 mcg/ml de suplementação, apresentaram significância ao nível de 1,0% de probabilidade, para a linhagem mutante arginina ($\chi^2 = 14,07$) e ao nível de 0,1% para as linhagens mutantes histidina ($\chi^2 = 23,71$) e glicina ($\chi^2 = 29,87$). As comparações entre as percentagens de plântulas atacadas, em cada uma das três linhagens sem suplementação, não apresentaram significância.

Os χ^2 para comparar a percentagem de plântulas atacadas da linhagem selvagem, com a percentagem de plântulas atacadas de cada mutante, todas suplementadas com 100,0 mcg/ml do respectivo aminoácido, apresentaram significância ao nível de 0,1% de probabilidade: arginina x selvagem ($\chi^2 = 82,84$); histidina x selvagem ($\chi^2 = 70,84$) e glicina x selvagem ($\chi^2 = 59,99$).

Quadro XIII - Inoculação de plântulas com bactéria crescida em diferentes doses do aminoácido respectivo.

Linhagem de bactéria	Suplementação mcg/ml de meio	total de discos	discos atac.	%	χ^2
Mutante Arginina	0	60	1	1,7	14,07 ⁺⁺
	5	60	2	3,3	
	arginina 20	60	7	11,7	
	50	60	9	15,0	
	100	60	11	18,3	
	-	60	1	1,7	3,03
	-	60	0	0,0	
	-	60	0	0,0	
	-	60	1	1,7	
	-	60	0	0,0	
Mutante Histidina	0	60	0	0,0	23,68 ⁺⁺
	5	60	3	5,0	
	histidina 20	60	5	8,3	
	50	60	12	20,0	
	100	60	14	23,3	
	-	60	0	0,0	3,03
	-	60	1	1,7	
	-	60	0	0,0	
	-	60	0	0,0	
	-	60	1	1,7	
Mutante Glicina	0	60	0	0,0	29,86 ⁺⁺
	5	60	6	10,0	
	glicina 20	60	8	13,3	
	50	60	15	25,0	
	100	60	20	33,3	
	-	60	0	0,0	0,00
	-	60	0	0,0	
	-	60	0	0,0	
	-	60	0	0,0	
	-	60	0	0,0	
Selvagem	arginina 100	60	60	100,0	0,00
	-	60	60	100,0	
	histidina 100	60	59	98,3	0,29
	-	60	60	100,0	
	glicina 100	60	60	100,0	0,00
	-	60	60	100,0	

- = sem suplementação ++ = significativo ao nível de 1,0%

O desdobramento dos X^2 para verificar o tipo de regressão que há entre percentagem de patogenicidade e doses, mostrou (Quadro XIV e figura 5) que há significância ao nível de 1,0% de probabilidade para o efeito linear e não significância para os desvios da regressão.

Quadro XIV - Valores do X^2 - componente linear e desvios da regressão (Y = percentagem de ataque; X = 0,0, 0,5, 20,0, 50,0 e 100,0 mcg/ml).

Linhagem de bactéria	X^2 (linear)	X^2 (desvios)	X^2 total
Mutante Arginina	11,50 ⁺⁺	2,57 ns	14,07 ⁺⁺
Mutante Histidina	20,87 ⁺⁺	2,81 ns	23,68 ⁺⁺
Mutante Glicina	26,92 ⁺⁺	2,94 ns	29,86 ⁺⁺

++ = significativo ao nível de 1,0% ns = não significativo

4.5.2. Inoculação de plântulas com bactéria e posterior suplementação com solução de 100,0 mcg/ml do aminoácido respectivo.

Os resultados apresentados no quadro XV mostram o número de plantas que desenvolveram doença e as percentagens correspondentes.

Quadro XV - Inoculação de plântulas com bactéria e posterior suplementação com solução de 100,0 mcg/ml do aminoácido.

Linhagem de bactéria	Com Suplementação				Sem Suplementação			
	total de plânt.	plânt. atac.	%	χ^2	total de plânt.	plânt. atac.	%	χ^2
Mutante Arginina	120	97	80,8		120	11	9,2	
Mutante Histidina	120	106	88,3	16,84 ⁺⁺⁺	120	24	20,0	10,61 ⁺⁺
Mutante Glicina	120	117	97,5		120	30	25,0	
Selvagem	120	120	100,0		120	120	100,0	

++ = significativo ao nível de 1,0%

+++ = significativo ao nível de 0,1%

O valor do X^2 entre as linhagens mutantes com suplementação mostrou significância ao nível de 0,1% de probabilidade ($X^2 = 16,84$) e entre as linhagens mutantes sem suplementação mostrou significância ao nível de 1,0% ($X^2 = 10,61$).

As comparações entre as frequências de ataque de cada linhagem mutante suplementada, com a linhagem selvagem, apresentaram significância ao nível de 0,1% para arginina x selvagem ($X^2 = 25,33$) e para histidina x selvagem ($X^2 = 14,67$); apresentaram não significância para glicina x selvagem ($X^2 = 3,05$). As comparações entre as frequências de ataque de cada linhagem sem suplementação, com a linhagem selvagem, apresentaram significância ao nível de 0,1% de probabilidade para as três linhagens ensaiadas: arginina x selvagem ($X^2 = 199,71$) histidina x selvagem ($X^2 = 160,00$) e glicina x selvagem ($X^2 = 144,05$).

4.5.3. Inoculação de plântulas com bactéria e posterior suplementação com diferentes doses do aminoácido respectivo.

Os resultados dos níveis de patogenicidade das linhagens ensaiadas encontram-se no quadro XVI e figura 5. Mostram o número de plântulas atacadas, com a percentagem correspondente a cada dose.

Os X^2 realizados para testar as diferenças entre as percentagens de plântulas atacadas após suplementação com doses de 0,0, 5,0, 20,0, 50,0 e 100,0 mcg/ml do respectivo aminoácido, apresentaram significância ao nível de 0,1% para cada uma das linhagens mutantes ensaiadas: para arginina $X^2 = 98,27$; para histidina $X^2 = 84,08$ e para glicina $X^2 = 100,47$.

As comparações entre as percentagens de plântulas atacadas em cada uma das três linhagens, as quais não sofreram suplementação após inoculação das plântulas, apresentaram não

significância: para arginina $\chi^2 = 0,52$, para histidina $\chi^2 = 0,77$ e para glicina $\chi^2 = 0,90$.

Os χ^2 feitos para comparar a percentagem de plântulas atacadas da linhagem selvagem, com a percentagem de plântulas atacadas de cada linhagem mutante, todas suplementadas com 100,0 mcg/ml do respectivo aminoácido, mostraram que a linhagem arginina apresenta diferença significativa ao nível de 1,0% de probabilidade ($\chi^2 = 10,85$), a linhagem histidina, ao nível de 5,0% ($\chi^2 = 6,31$); a linhagem glicina não apresentou significância ($\chi^2 = 0,29$).

As comparações das percentagens das plântulas atacadas pelas três linhagens mutantes que não sofreram suplementação após inoculação, mostraram significância ao nível de 0,1% de probabilidade ($\chi^2 = 17,86$).

Quadro XVI - Inoculação de plântulas com bactéria e suplementação com diferentes doses do aminoácido respectivo.

Linhagem de bactéria	Suplementação mcg/ml de meio	total de discos	discos atac.	%	X ²
Mutante Arginina	0	60	5	8,3	98,28 ⁺⁺⁺
	5	60	12	20,0	
	20	60	28	46,7	
	50	60	42	70,0	
	100	60	50	83,3	
	-	60	6	10,0	0,52
	-	60	5	8,3	
	-	60	7	11,7	
	-	60	6	10,0	
	-	60	5	8,3	
	0	60	10	16,7	84,08 ⁺⁺⁺
	5	60	15	25,0	
Mutante Histidina	20	60	21	35,0	
	50	60	34	56,7	
	100	60	54	90,0	
	-	60	12	20,0	0,77
	-	60	9	15,0	
	-	60	10	16,7	
	-	60	11	18,3	
	-	60	12	20,0	
Mutante Glicina	0	60	15	25,0	100,49 ⁺⁺⁺
	5	60	25	41,7	
	20	60	38	63,3	
	50	60	54	90,0	
	100	60	59	98,3	
	-	60	13	21,7	0,90
	-	60	15	25,0	
	-	60	12	20,0	
	-	60	15	25,0	
	-	60	12	20,0	
	arginina 100	60	60	100,0	0,00
	-	60	60	100,0	
Selvagem	histidina 100	60	60	100,0	0,00
	-	60	60	100,0	
	glicina 100	60	60	100,0	0,00
	-	60	60	100,0	

- = sem suplementação +++ = significativo ao nível de 0,1%

O desdobramento do X^2 para verificar o tipo de regressão que há entre percentagem de patogenicidade e doses, mostrou (quadro XVII e figura 5) que há significância ao nível de 0,1% de probabilidade para o efeito linear, nos três mutantes ensaiados. Os desvios da regressão mostraram significância ao nível de 1% nas linhagens arginina e glicina e não significância para a linhagem histidina.

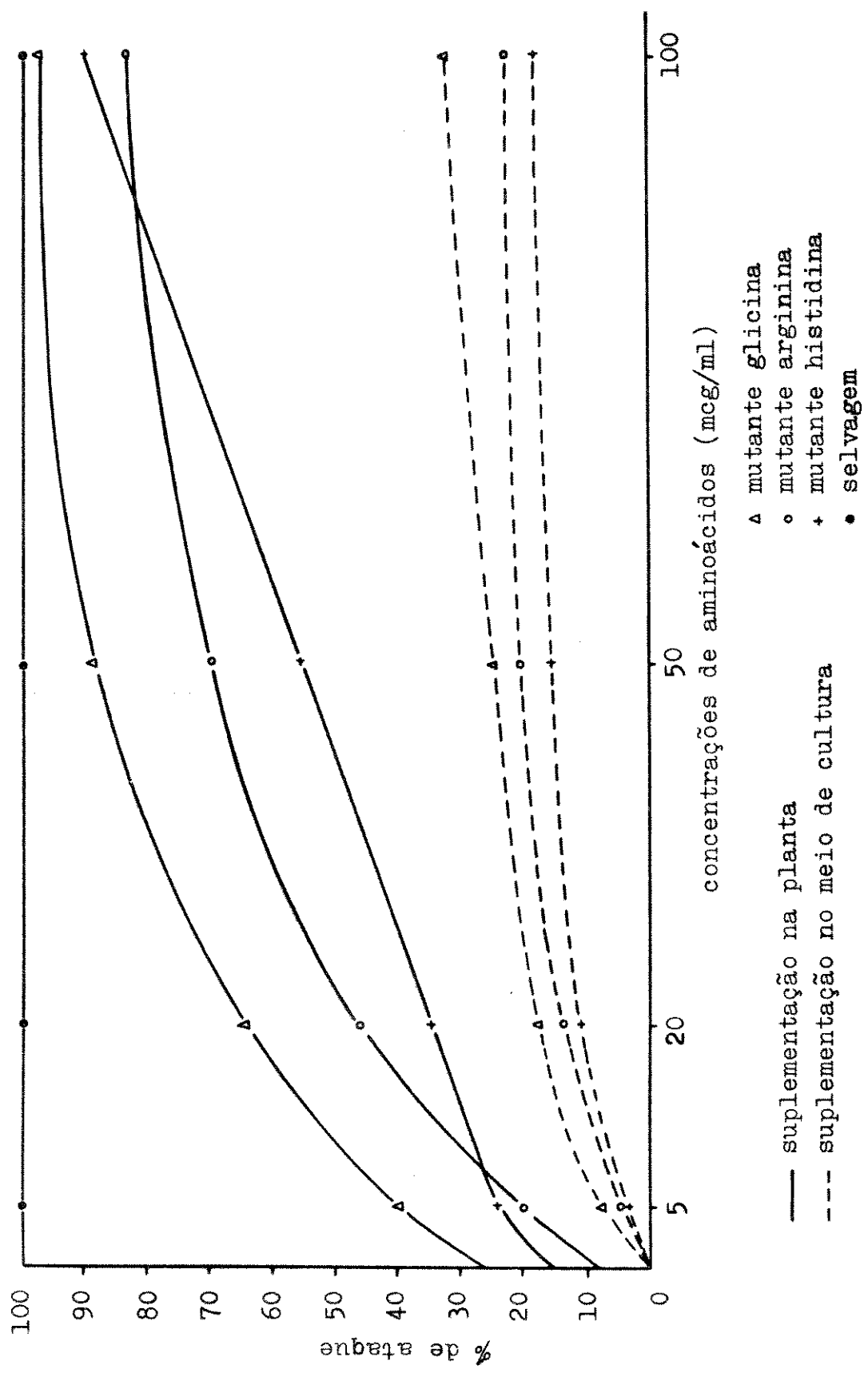
Quadro XVII - Valores do X^2 - componente linear e desvios da regressão (Y = percentagem de ataque; X = 0,0, 5,0, 20,0, 50,0 e 100,0 mcg/ml).

Linhagem de bactéria	X^2 (linear)	X^2 (desvios)	X^2 total
Mutante Arginina	84,52 ⁺⁺⁺	13,76 ⁺⁺	98,28 ⁺⁺⁺
Mutante Histidina	83,71 ⁺⁺⁺	0,37	84,08 ⁺⁺⁺
Mutante Glicina	83,08 ⁺⁺⁺	17,41 ⁺⁺	100,49 ⁺⁺⁺

++ = significativo ao nível de 1,0%

+++ = significativo ao nível de 0,1%

Figura 5 - Curvas de patogenicidade das linhagens mutantes e selvagem frente a diversas concentrações de aminoácido.



4.6. Reisolamento e caracterização das bactérias mutantes

Todas as linhagens mutantes inoculadas nas plântulas, conservaram suas características após reisolamento das plantas doentes. Dessa maneira, todos os reisolamentos do mutante arginina não apresentaram crescimento em meio mínimo e apresentaram crescimento em meio suplementado com arginina. O mesmo aconteceu com reisolamento dos mutantes histidina e glicina, os quais não se desenvolveram em meio mínimo, mas se desenvolveram em meio mínimo suplementado dos respectivos aminoácidos.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A irradiação com luz ultravioleta permitiu 2,43% de sobreviventes da população, dos quais foram isolados somente mutantes para aminoácidos. Entretanto, não podemos dizer que tais resultados sejam provenientes de uma ação seletiva do agente mutagênico usado, desde que AZEVEDO e MIRANDA (1968) isolaram do mesmo microrganismo e com o mesmo método, mutantes para purinas, vitaminas e aminoácidos; esses autores encontraram também uma frequência maior de mutantes para aminoácidos; talvez a presença de mutantes para vitaminas e purinas seja devida à percentagem de sobrevivência de 5,0% com a qual eles trabalharam; porém, novos isolamentos de mutantes com ultravioleta devem ser feitos usando-se diferentes percentagens de sobrevivência da população, para que se possa esclarecer o ocorrido.

A frequência de mutantes isolados foi de 0,7%, o que aproximadamente coincide com os resultados obtidos para outros microrganismos, que variam ao redor de 0,5%. Com Xanthomonas campestris não encontramos dados na bibliografia que permitissem uma comparação com nossos resultados. Trabalhando nas mesmas condições com Erwinia aroideae, bactéria fitopatogênica, GARBBER (1954) obteve 0,1% de mutantes, frequência essa que o autor considera relativamente baixa.

Dos mutantes isolados, a ocorrência maior foi de 33,33% de mutantes para cisteína, seguindo-se 16,16% para histidina, arginina e glicina, respectivamente e de 9,09% de mutantes para fenilalanina e treonina, respectivamente. O resultado obtido para a frequência de mutantes cisteína é aproximadamente o mesmo que o apresentado por AZEVEDO e MIRANDA (1968).

A não ser pela auxotrofia, todos os mutantes se mostraram com aspecto morfológico e características bioquímicas nor-

mais da espécie, excessão feita ao mutante para treonina, que mostrou formação de minúsculas colônias, quando semeado em meio mínimo ou completo; esse mutante deverá ser estudado posteriormente.

Pelos resultados do crescimento das linhagens mutantes para arginina, histidina e glicina e da linhagem selvagem de Xanthomonas campestris, apresentados nos quadros IV, V, VI, VII, VIII e IX e pelas figuras 2, 3 e 4, podemos verificar que nenhum mutante mostrou traços de crescimento em meio mínimo não suplementado. Os mutantes apresentaram, pois, deficiência completa para as substâncias que requeriam. Portanto, podem ser considerados bons (LAMEY, BOONE e KEITT, 1956) para o estudo da relação hospedeiro-parasita. Mostraram, ainda, respostas claras quando tais substâncias foram adicionadas ao meio de cultura; a resposta desses tipos de mutantes à presença ou ausência da substância requerida, associada com sua capacidade patogênica, torna possível seu uso em testes "in vivo" para determinar a disponibilidade dessas substâncias em tecido vivo do hospedeiro (KEITT e BOONE, 1954).

Os três mutantes ensaiados alcançaram a fase estacionária após 96 horas de desenvolvimento, enquanto a linhagem selvagem alcançou a mesma fase após 72 horas.

Os mutantes entre si mostraram uma diferença na rapidez de crescimento, mas de modo geral o crescimento total foi o mesmo, sendo um pouco menor para o mutante histidina. Com suplementação de 50,0 mcg/ml do aminoácido requerido, os três mutantes apresentaram um crescimento que pode ser considerado satisfatório, por comparação com o crescimento da linhagem selvagem em meio mínimo sem suplementação. Com suplementação de 100,0 mcg/ml do aminoácido requerido, os três mutantes apresentaram crescimento menor que o da linhagem selvagem desenvolvida em

meio mínimo com igual suplementação, porém um crescimento maior do que a linhagem selvagem desenvolvida sem suplementação. Os três mutantes apresentaram, com suplementação de 100,0 mcg/ml, um desenvolvimento equivalente ao apresentado pela linhagem selvagem quando suplementada com 20,0 mcg/ml do aminoácido requerido pelo mutante. O crescimento apresentado pelos mutantes quando suplementados com 50,0 mcg/ml do aminoácido requerido, foi equivalente ao crescimento da linhagem selvagem desenvolvida em meio mínimo sem suplementação. Quando desenvolvidos em 200,0 mcg/ml do aminoácido requerido, não deram crescimento maior do que o apresentado com 100,0 mcg/ml e também não foram inibidos por essa concentração. Dos três mutantes, o que respondeu mais prontamente ao aumento da suplementação, dando por consequência um aumento no crescimento, foi o mutante glicina, vindo em seguida o mutante arginina e por fim o mutante histidina.

Em relação à linhagem selvagem, podemos dizer que, quando crescida em meio de cultura suplementado, tais aminoácidos pareceram ser estimulantes do seu crescimento. A dose de 200,0 mcg/ml deu resposta igual à da dose de 100,0 mcg/ml e não pareceu ser inibitória do crescimento.

Essas linhagens mutantes quando ensaiadas "in vitro" foram inoculadas em discos de folhas de plântulas de repêlho, sendo que dois tipos de suplementação dos aminoácidos respectivos foram fornecidos: suplementação do meio de cultura no qual o mutante cresceu e suplementação sobre os discos de folhas após inoculação.

Os resultados obtidos (quadro X) quando se ensaiaram as linhagens mutantes com concentrações de aminoácidos de 0,0 a 100,0 mcg/ml no meio de cultura, mostraram uma variação na percentagem de ataque entre elas, de acordo com o aumento da concentração da suplementação dos respectivos aminoácidos. Mostra-

ram que essa variação está estreitamente relacionada com a população desenvolvida no meio de cultura e inoculada nos discos; com doses pequenas houve desenvolvimento nulo ou fraco e com doses maiores o desenvolvimento foi maior, proporcionando então um inóculo de maior população. A linhagem glicina mostrou maiores frequências de ataque aos discos de fôlhas, para qualquer dose de suplementação, quando comparada com as demais linhagens mutantes. A linhagem arginina mostrou-se mais efetiva que a linhagem histidina, com doses de suplementação menores que 50,0 mcg/ml; com dose igual e superior a essa concentração, apresentou a mesma efetividade. Esse comportamento pode ser relacionado com os resultados encontrados nos quadros IV, V e VI, onde verificamos que o maior crescimento em meio de cultura suplementado foi alcançado pelo mutante glicina, seguido pelos mutantes arginina e histidina. Na comparação do comportamento de cada mutante com a linhagem selvagem, ficou demonstrado que a suplementação de até 100,0 mcg/ml dos respectivos aminoácidos, para esse tipo de tratamento, é insuficiente para dar às linhagens mutantes o mesmo comportamento da linhagem selvagem, isto é, os mutantes não se apresentaram patogênicos.

Os resultados do quadro XI, indicaram que, no tratamento com suplementação, as linhagens mutantes não apresentaram diferença entre si. Na comparação entre cada linhagem mutante com a selvagem, ficou evidenciado um comportamento diferente entre mutantes e selvagem. Nos tratamentos sem suplementação, não houve crescimento de nenhuma das linhagens mutantes. Portanto, os resultados obtidos nesse tratamento também parecem evidenciar a não patogenicidade dos mutantes.

Os resultados do quadro XII, que se referem aos tratamentos com suplementação inferior a 50,0 mcg/ml e com suplementação igual e superior a 50,0 mcg/ml, indicaram que existe va-

riação na percentagem de ataque dos três mutantes ensaiados; tal variação ocorreu de acordo com a concentração das soluções de aminoácidos usados na suplementação dos discos de fôlhas, nos quais os mutantes foram inoculados. Na comparação de cada linhagem mutante com a linhagem selvagem, verificamos que nenhum deles mostrou comportamento semelhante ao da linhagem selvagem. O mutante glicina foi o que mostrou maiores frequências de ataque, para qualquer dose de suplementação; a seguir, o mutante arginina e depois o histidina. Nos tratamentos sem suplementação não houve crescimento das linhagens mutantes. Esses resultados permitiram, portanto, dizer que a variação da concentração da suplementação dos discos de fôlhas, após a inoculação da bactéria, aumenta a frequência de ataque quando comparada com o tratamento sem suplementação; porém, não permitiram dizer que os mutantes se mostraram virulentos.

Esses mesmos mutantes, quando ensaiados "in vivo", foram também suplementados de duas maneiras: no meio de cultura em que foram desenvolvidos e na plântula, após inoculação.

Os resultados obtidos (quadro XIII) quando se ensaiaram as linhagens mutantes com concentrações de aminoácidos de 0,0 a 100,0 mcg/ml no meio de cultura, mostraram um comportamento diferente dos mutantes em relação à percentagem de ataque, quando comparados entre si, de acordo com as doses usadas na suplementação do meio de cultura. Isto é coincidente com os resultados obtidos "in vitro" e levam a supor que, com doses baixas de suplementação no meio de cultura, os mutantes não produziram quantidade de inóculo suficiente para o desenvolvimento da doença da planta e que com doses maiores, apesar de haver desenvolvimento, as plantas pareceram não ter em disponibilidade as quantidades de aminoácidos exigidas pelos mutantes para posterior desenvolvimento; ou pelo menos que tais quantidades não se

encontravam em disponibilidade no local da inoculação. Pelos resultados, podemos ainda dizer que o comportamento desses mutantes não é comparável ao da linhagem selvagem. As mais elevadas frequências de plântulas atacadas foram encontradas para o mutante glicina, em todas as doses ensaiadas. O mutante histidina aparece a seguir, com frequências mais altas de ataque em relação à linhagem arginina. Foi também verificado que há um aumento linear da percentagem de ataques com o aumento da dose, dentro das concentrações usadas, para esse tipo de tratamento.

Pelos resultados do quadro XV, verificamos que os mutantes apresentaram diferença entre si, tanto nos testes com suplementação posterior de 100,0 mcg/ml do aminoácido correspondente, quanto nos testes sem suplementação. Na comparação dos tratamentos com suplementação das linhagens mutantes com a selvagem, arginina e histidina foram diferentes da selvagem, enquanto glicina mostrou o mesmo comportamento. Na mesma comparação dos tratamentos sem suplementação, todos os mutantes mostraram-se diferentes da linhagem selvagem.

Pelos resultados do quadro XVI, verificamos que existiu variação na percentagem de ataque em todas as linhagens mutantes ensaiadas de acordo com a dose empregada na suplementação. Na comparação da linhagem selvagem com cada mutante houve indicação de que com suplementação de 100,0 mcg/ml, os mutantes arginina e histidina são diferentes do selvagem, ao passo que glicina tem o mesmo comportamento. Nos tratamentos sem suplementação não existiu variação na percentagem de ataque em cada uma das linhagens mutantes ensaiadas, mas tal variação existiu quando tais mutantes foram comparados entre si; ainda para os tratamentos sem suplementação, todos os mutantes mostraram-se diferentes da linhagem selvagem. Foi também verificado que há um aumento linear da patogenicidade com o aumento da dose para o mutante

tante histidina, ao passo que essa linearidade não foi encontrada para as curvas de patogenicidade dos mutantes arginina e glicina.

Na comparação da percentagem de ataque "in vitro" e "in vivo" pudemos verificar que, nos dois casos, o mutante glicina apresentou a maior percentagem de ataque; essa percentagem "in vitro" para a arginina foi maior que para a linhagem histidina, ao passo que "in vivo" o mutante histidina mostrou uma percentagem de ataque maior que a da arginina. Portanto, verificamos que o crescimento "in vitro" foi semelhante ao apresentado pelos mutantes no ensaio das doses das substâncias que requeriam para crescer (quadro IV, V e VI), no qual a histidina se mostrou mais exigente nutricionalmente; no estudo "in vivo" parece ser possível dizer, então, que as condições oferecidas pelo hospedeiro favoreceram o crescimento do mutante histidina, talvez pela disponibilidade da substância na planta ou por outros fatores. GARBER (1954), estudando "in vitro" o comportamento de mutantes auxotróficos de E. arzoideae, verificou que o crescimento podia se dar ou não quando os mesmos eram inoculados em superfície cortada no hospedeiro; entretanto, todos cresciam quando inoculados em homogenado de tecido do hospedeiro.

Comparando o comportamento "in vitro" e "in vivo" em relação à patogenicidade, podemos dizer que "in vitro" nenhuma linhagem apresentou-se patogênica, enquanto "in vivo" apenas a linhagem glicina mostrou-se patogênica, com a maior suplementação. Nos tratamentos "in vitro" sem suplementação, nenhum mutante apresentou crescimento, enquanto "in vivo" houve crescimento, apesar da baixa percentagem de ataque; portanto, sem suplementação, nenhum mutante mostrou-se patogênico. A percentagem de ataque de plântulas nos tratamentos sem suplementação, variou con-

forme a deficiência nutricional, tendo sido maior para o mutante glicina, seguindo-se o mutante histidina e depois arginina. Com esses três tipos de mutantes ensaiados sem suplementação, verificamos, então, só um tipo de resposta em relação a sua patogenicidade para a variedade de repólho empregada. Seria interessante sabermos se o comportamento desses mutantes seria o mesmo se fôsse ensaiadas outras variedades de repólho; poderíamos então avaliar quanto um hospedeiro resistente, por exemplo, difere de um suscetível, na concentração de aminoácidos específicos requeridos pelo patógeno, ou então verificar se a avirulência desses mutantes auxotróficos é decorrente da sua incapacidade de crescer num hospedeiro, devido principalmente à deficiência do aminoácido pertinente. Ensaando diversas variedades de rabanete e nabo, GARBER, SHAEFFER e GOLDMAN (1956) relataram que foram notados três tipos de resposta quando fatias do hospedeiro eram inoculadas com um mutante específico: uniformemente resistente, uniformemente sensível e uma resposta variável, na qual indivíduos de uma dada variedade podiam ser resistentes ou suscetíveis. Entretanto, a presença de aminoácidos requeridos no hospedeiro não leva necessariamente à virulência, uma vez que o hospedeiro pode apresentar mecanismos de inibição (GARBER e HEGGESTAD, 1958).

No presente trabalho, dos mutantes isolados, apenas três, tomados ao acaso, foram ensaiados. Ensaados os restantes, outros resultados talvez sejam obtidos para serem adicionados aos aqui apresentados e para que se consiga ter uma visão maior do comportamento geral dos mutantes auxotróficos de Xanthomonas campestris. Talvez possam ser colocados, em relação a sua patogenicidade, junto ao grupo apresentado por KLINE et al. (1957) que só obteve mutantes auxotróficos patogênicos de Venturia inaequalis após suplementação com as substâncias para as quais

eram deficientes. Entretanto, outros resultados podem ser esperados, desde que GARBER e HEGGESTAD (1958) encontraram, para Pseudomonas tabaci, mutantes que foram patogênicos sem precisar de suplementação; KUO et al. (1967) encontraram que todos os seus mutantes de Piricularia oryzae tiveram sua patogenicidade reduzida; GARBER (1954) e GARBER, SHAEFFER e GOLDMAN (1956) encontraram mutantes virulentos e avirulentos em Erwinia aroideae e também YAMASAKI e SUWA (1963), quando estudaram mutantes auxotróficos de Xanthomonas oryzae, verificaram que deficiências apenas para certos aminoácidos determinaram alteração na patogenicidade.

No reisolamento e caracterização dos **mutantes** não foi encontrada nenhuma reversão para prototrofia. Isso indicou que a doença foi causada pelos mutantes auxotróficos que conseguiram se desenvolver através da suplementação da substância requerida, ou devido à presença dessas substâncias nas plantas. GARBER e HACKETT (1954) demonstraram que reversões prototróficas de um mutante auxotrófico avirulento de Erwinia aroideae eram virulentas. GARBER, SHAEFFER e GOLDMAN (1956) obtiveram reversões de um mutante requerendo arginina e de um mutante auxotrófico não caracterizado, ambos não virulentos, que se mostraram tão virulentos quanto a linhagem paternal de Erwinia aroideae. Nesse mesmo trabalho, os autores determinaram a frequência de reversão de vários mutantes de Erwinia aroideae, "in vitro", a qual só foi alta para um mutante cisteína e um mutante metionina; para esses mutantes, os testes para patogenicidade foram então realizados em condições desfavoráveis ao aparecimento de reversões. A inexistência de reversão espontânea "in vivo" de Xanthomonas campestris neste trabalho, vem coincidir com o resultado obtido por NEDER, AZEVEDO e VENKOVSKY (1962), no qual reversão espontânea "in vitro" de Xanthomonas campestris apresentou

uma baixa frequência (1 por 10^8 células de bactérias); TUWESON e GARBER (1959) também não encontraram reversão para prototrofia com mutantes de Fusarium oxysporum ensaiados "in vivo" e "in vitro".

6. RESUMO E CONCLUSÕES.

Mutantes auxotróficos de Xanthomonas campestris foram obtidos através de indução com luz ultravioleta, seguida pelo tratamento com penicilina. Três desses mutantes foram ensaiados "in vitro" e "in vivo" em relação a sua patogenicidade em plântulas de repólho. Dentre os resultados obtidos podemos tirar as seguintes conclusões:

- a) A frequência de mutação foi de um mutante por $1,4 \times 10^2$ colônias testadas, ou seja 0,7%.
- b) O requerimento nutricional, determinado por auxonografia, foi específico para cada mutante.
- c) Foram obtidos 4 mutantes para cisteína, 2 para histidina, 2 para arginina, 1 para fenilalanina e 1 para treonina.
- d) Na determinação das curvas de crescimento dos mutantes glicina, histidina e arginina, nenhum deles mostrou traços de crescimento em meio mínimo não suplementado; apresentaram, pois, deficiência completa para as substâncias que requeriam.
- e) Os mutantes entre si, quando suplementados com os respectivos aminoácidos, mostraram uma diferença na rapidez de crescimento, mas de modo geral o crescimento total foi o mesmo, sendo um pouco menor para o mutante histidina.
- f) Com suplementação de 100,0 mcg/ml do aminoácido requerido, os três mutantes apresentaram crescimento menor que o da linhagem selvagem desenvolvida em meio mínimo com igual suplementação, porém um crescimento maior que a linhagem selvagem desenvolvida sem suplementação.
- g) Em relação à linhagem selvagem, quando crescida em meios de cultura suplementados, tais aminoácidos pa

receram ser estimulantes do seu crescimento. A dose de 200,0 mcg/ml deu resposta igual à da dose de 100,0 mcg/ml e não pareceu ser inibitória do crescimento.

h) Em todos os ensaios realizados "in vitro", a linhagem glicina foi a que apresentou maior percentagem de ataque aos discos de folhas de repolho, para qualquer dose de suplementação; a seguir, o mutante arginina e depois o mutante histidina. Nos tratamentos sem suplementação não houve crescimento das linhagens mutantes.

i) No tratamento "in vitro" ficou evidenciada a não patogenicidade dos mutantes.

j) No ensaio dos mutantes "in vivo" com concentrações de aminoácidos de 0,0 a 100,0 mcg/ml no meio de cultura, foi verificado que as mais elevadas frequências de plântulas atacadas foram encontradas para o mutante glicina, em todas as doses usadas. Entretanto, para esse tipo de tratamento, nenhum mutante se mostrou patogênico.

k) No ensaio dos mutantes "in vivo" com suplementação dos aminoácidos respectivos após inoculação das plântulas, foi verificado que o mutante glicina mostrou-se tão patogênico como a linhagem selvagem; os mutantes histidina e arginina não se mostraram patogênicos. Sem suplementação nenhum mutante foi patogênico.

l) Foi também verificado que há um aumento linear da patogenicidade com o aumento da dose de suplementação para o mutante histidina.

7. SUMMARY.

Auxotrophic mutants of Xanthomonas campestris were induced by ultraviolet irradiation, followed by penicillin treatment. The mutant yield was approximately one mutant per $1,4 \times 10^2$ tested colonies. The nutritional requirements of these mutants were determined auxonographically and were specific in that no other growth factor would support growth. Twelve amino acid requiring mutants were obtained.

Three of these mutants were tested for their pathogenicity on cabbage plants in laboratory and green-house experiments. The auxotrophic mutations seemed to have effects on pathogenicity. Mutants showed to be avirulent "in vitro" even when their required substances were furnished from a external source to the host. When exogenous required nutrient were supplied "in vivo", the pathogenicity of glycine requiring mutant was restored; however, the mutant requiring histidine and arginine remained avirulent. No reversion was observed in any of the auxotrophic mutant studied.

8. BIBLIOGRAFIA CITADA.

- ANDRUS, C.F., 1948. A method of testing beans for resistance to bacterial blights. *Phytopathology* 38: 757-759.
- AZEVEDO, J.L. e J.B. MIRANDA F^o., 1968. Crescimento de linhagens selvagens e mutantes de X. campestris em diferentes meios de cultura. Boletim da Associação Paulista de Medicina, Secção Regional de Piracicaba, 10: 1-11.
- BACON, G.A.; T.W. BURROWS e M. YATES, 1950. The effects of biochemical mutation on the virulence of Bacterium typhosum: the virulence of mutants. *Br. J. exp. Path.* 31: 714-724.
- BACON, G.A.; T.W. BURROWS e M. YATES, 1951. The effects of biochemical mutation on the virulence of Bact. typhosum: the loss of virulence of certain mutants. *Br. J. exp. Path.* 32: 85-96.
- BOONE, D.M., 1962. Syntrophism in V. inaequalis in relation to pathogenicity. *Phytopathology* 52: 725.
- BOONE, D.M. e G.W. KEITT, 1952. Induced biochemical mutants in Venturia inaequalis. *Phytopathology* 42: 479.
- BOONE, D.M.; D.M. KLINE e G.W. KEITT, 1957. Venturia inaequalis (CKE) Wint. XIII. Pathogenicity of induced biochemical mutants. *Am. J. Bot.* 44: 791-796.
- BOONE, D.M.; H.A. LAMEY; D.M. KLINE e G.W. KEITT, 1954. Genetic, nutritional and pathogenic studies with induced vitamin defi

- cient mutants of Venturia inaequalis. Phytopathology 44: 482.
- BOONE, D.M.; J.F. STAUFFER, M.A. STAHMANN e G.W. KEITT, 1956. Venturia inaequalis (CKE) Wint. VII. Induction of mutants for studies on genetics, nutrition and pathogenicity. Am. J. Bot. 43: 199-204.
- BRAUN, W., 1966. Bacterial genetics. 2nd. Ed., London. W.B. Saunders. 380 pp.
- BUXTON, E.W., 1956. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of Fusarium oxysporum. J. gen. Microbiol. 15: 133-139.
- DAVIS, B.D., 1948. Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. J. Am. chem. Soc., 70: 4267.
- DIFCO Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents. 1948. 8th Ed. Detroit. Difco Laboratories. 224 pp.
- DOWSON, W.J., 1957. Plant diseases due to bacteria. 2nd Ed. Cambridge. The University Press. 231 pp.
- DUTTA, S.K.; C.V. HALL e E.G. HEYNE, 1960. Pathogenicity of biochemical mutants of Colletotrichum lagenarium. Bot. Gaz. 121: 166-170.
- DYE, D.W., 1958. Host specificity in Xanthomonas. Nature 182: 1813-1814.
- GARBER, E.D., 1954. The role of nutrition in the host-parasite

- relationship. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 40: 1112-1118.
- GARBER, E.B., 1956. A nutrition - inhibition hypothesis of pathogenicity. Am. Nat. 90: 183-194.
- GARBER, E.D., 1958. Further data on the concentration of free histidine of turnip varieties and their response to inoculation with histidine-requiring mutants of Erwinia aroideae. Am. J. Bot. 45: 523-525.
- GARBER, E.D., 1959. Further observations on biochemical mutants of Pseudomonas tabaci. Bot. Gaz. 120: 157-161.
- GARBER, E.D., 1960. The host as a growth medium. Ann. N.Y. Acad. Sci. 88: 1187-1194.
- GARBER, E.D. e H.E. HEGGESTAD, 1958. Observations on the pathogenicity of biochemical mutants of Pseudomonas tabaci. Phytopathology 48: 535-537.
- GARBER, E.D. e S.G. SHAEFFER, 1957. Free histidine content of turnip varieties and their resistance to histidine requiring mutants of Erwinia aroideae. J. Bact. 74: 392-395.
- GARBER, E.D.; M. GOLDMAN e S.G. HIRSHHORN, 1955. Auxotrophy and virulence in Agrobacterium tumefaciens. (Abs.) Bact. Proc., p. 122.
- GARBER, E.D. e A.J. HACKETT, 1954. Virulence of auxotrophic mutants of Erwinia aroideae. Nature 173: 88.

- GARBER, E.D.; A.J. HACKETT e R. FRANKLIN, 1952. The virulence of biochemical mutants of Klebsiella pneumoniae. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 38: 693-697.
- GARBER, E.D.; S.G. SHAEFFER e M. GOLDMAN, 1956. The virulence of biochemical mutants of Erwinia aroideae for varieties of radish and turnip. J. gen. Microbiol. 14: 261-267.
- HAYES, W., 1964. The genetics of bacteria and teheir viruses. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 740 pp.
- KAPLAN, R.W., 1952. Genetics of microorganisms. A. Rev. Microbiol. 6: 49-76.
- KEITT, G.W. e D.M. BOONE, 1954. Induction and inheritance of mutant characters in Venturia inaequalis in relation to its pathogenicity. Phytopathology 44: 362-370.
- KEITT, G.W. e D.M. BOONE, 1956. Use of induced mutations in the study of host-pathogen relationships. Brookhaven Symp. Biol. 9: 209-225.
- KEITT, G.W.; D.M. BOONE e J.R. SHAY, 1959. Genetic and nutritional controls of host-parasite interactions in apple scab. Plant Pathology-problems and progress: 1908-1958. Univ. Wisconsin Press, Madison. pp. 157-167.
- KIMOTO, T., 1968. Contribuição ao estudo do método de seleção de variedades locais de repólho (Brassica oleracea var. capitata L.) resistentes a Xanthomonas campestris (Pam) Dowson.

Tese de doutoramento. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz"
64 pp.

KLINE, D.M.; D.M. BOONE e G.W. KEITT, 1956. Experimental control of pathogenicity of biochemical mutants of Venturia inaequalis. Phytopathology 46: 17.

KLINE, D.M.; D.M. BOONE e G.W. KEITT, 1957. Venturia inaequalis (CKE) Wint. XIV. Nutritional control of pathogenicity of certain induced biochemical mutants. Am. J. Bot. 44: 797-803.

KUO, T.T.; L.H. YANG, P.Z. YEH e H.W. LI, 1967. Studies on induced mutants of Piricularia oryzae and on their pathogenicity. Bot. Bull. Acad. sin. 8: 20-29.

KUO, T.T.; Y.S. LEE; H.F. YUAN e H.W. LI, 1968. Nutritional aspect of hosp-parasite relationship in the rice blast fungus. Bot. Bull. Acad. sin. 9: 36-45.

LAMEY, H.A.; D.M. BOONE e G.W. KEITT, 1956. Venturia inaequalis (CKE) Wint. X. Growth responses of biochemical mutants. Am. J. Bot. 43: 828-834.

LEDERBERG, J., 1949. Bacterial variation. A. Rev. Microbiol. 3: 1-22.

LEDERBERG, J. e E.M. LEDERBERG, 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact. 63: 399-406.

LEDERBERG, J. e N. ZINDER, 1948. Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin J. Am. chem. Soc. 70: 4267.

- LEMOS, M.A., 1969. Comportamento de mutantes de Xanthomonas campestris (Pam) Dowson resistentes à aureomicina e à estreptomicina em relação ao tratamento de sementes de repólho (Brassica oleracea var. capitata L.) com esses antibióticos. Tese de doutoramento. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz" 60 pp.
- LURIA, S.E., 1947. Recent advances in bacterial genetics. Bact. Rev. 11: 1-40.
- NEDER, R.N. e J.L. AZEVEDO e R. VENCOSKI, 1962. Reversão do mutante Try-2 de Xanthomonas campestris. Cienc. Cult. 14: 172.
- PELCZAR, M. J.Jr. e R.D. REID, 1965. Microbiology. 2nd Ed., New York, McGraw-Hill. 662 pp.
- PIMENTEL GOMES F., 1970. Curso de Estatística Experimental. 4ª ed. Piracicaba. E.S.A. "Luiz de Queiroz", 430 pp.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMMONS; K.D. MACDONALD; H.W. J. BUFTON - 1953. - The genetics of Aspergillus nidulans. Adv. Genet. 5: 141-238.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1957. Induced mutations of pathogens for the study of host-parasite interactions. Plant Pathology-problems and progress: 1908-1958. Univ. Wisconsin Press, Madison. pp. 193-201.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1970. Requirement for riboflavin for effective symbiosis on clover by an auxotrophic mutant strain of Rhizobium trifolii. Aust. J. biol. Sci. 23: 1187-1196.

- STARR, M.P., 1946. The nutrition of phytopatogenic bacteria genus Xanthomonas J. Bact. 51: 131-146.
- STELL, R.G.P. e J.H. TORRIE, 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Co., New York. 481 pp.
- TATUM, E.L. e D.D. PERKINS, 1950. Genetics of microorganisms. A. Rev. Microbiol. 4: 129-150.
- TINLINE, R.D. 1963. VII - Nutritional control of the pathogenicity of some auxotrophs to wheat seedlings. Can. J. Bot. 41: 489-497.
- TUVESON, R.W. e E.D. GARBER, 1959. Genetics of phytopathogenic fungi. I. Virulence of biochemical mutants of Fusarium oxysporum f. pisi. Bot. Gaz. 121: 69-74.
- WALKER, J.C., 1965. Patologia vegetal. Barcelona Ed. Omega 818 pp.
- YAMASAKI, Y. e T. SUWA, 1963. Virulence of UV induced mutants of Xanthomonas oryzae. Jap. J. Breed. 13: 67.